

**DESARROLLO DE LAS CELULAS PIRAMIDALES DEL HIPOCAMPO
DE RATA Y ESTUDIO DE SU CONTENIDO EN ADN**

**Trabajo de Tesis Doctoral realizado por:
Meritxell López Gallardo**

Madrid, Diciembre de 1994

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLOGICAS
Departamento de Biología Celular

**DESARROLLO DE LAS CELULAS PIRAMIDALES DEL
HIPOCAMPO DE RATA Y ESTUDIO DE SU CONTENIDO EN ADN**

Trabajo de Tesis Doctoral realizado por:
Meritxell López Gallardo

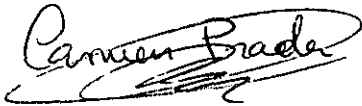
Director: Carmen Prada Elena
Departamento de Fisiología
Facultad de Medicina
Universidad Complutense de Madrid

Madrid, Diciembre de 1994

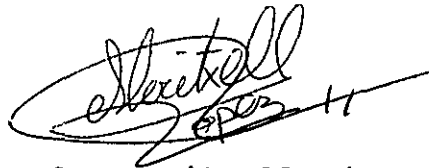
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLOGICAS
Departamento de Biología Celular

**DESARROLLO DE LAS CELULAS PIRAMIDALES DEL
HIPOCAMPO DE RATA Y ESTUDIO DE SU CONTENIDO EN ADN**

Trabajo realizado por Meritxell López Gallardo, en el Departamento de Fisiología de la Facultad de Medicina de la Universidad Complutense de Madrid, bajo la dirección de la Dra. Carmen Prada Elena.



Fdo. Carmen Prada Elena
Profesora Titular de Biología
Facultad de Medicina



Fdo. Meritxell López Gallardo
Licenciada en CC. Biológicas

Madrid, Diciembre de 1994

AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar a la Dra. Carmen Prada Elena, mi más sincero agradecimiento por su gran dedicación para conseguir formarme en el campo de la investigación en Neurobiología, por contagiarme su entusiasmo por el trabajo y por haberme transmitido su gran calidad científica. Su apoyo total, estímulo continuo y, lo más importante, su amistad, no faltaron nunca. Carmen, muchas gracias.

A la Dra. Enriqueta Muñiz por aceptar la tutoría de esta tesis.

A la Dra Asunción Colino por su desinteresada ayuda en algunos aspectos de este trabajo.

A la Dra. Matilde Hernández por su disposición total y desinteresada para que pudiese utilizar el citofotómetro, haciéndome muy gratas las cortas estancias en su laboratorio.

A la Dra. M^a Angeles Villanúa y a Raúl Martínez Muñoz, por su ayuda en el procesamiento estadístico de parte de los resultados por ordenador.

A mis compañeros del laboratorio Juan Ignacio Medina Crespo y Rosario López López, con los qué durante estos años he compartido muchas horas de trabajo y una profunda amistad, por su desinteresada y sincera ayuda, así como por el agradable clima de trabajo, aún en los momentos más difíciles.

A mi familia y a Juan que han sabido entender lo que este trabajo significa para mí, por intentar siempre que pudiese dedicar todo el tiempo que necesitaba a desarrollarlo, por comprender mis retrasos diarios, fines de semana y vacaciones de trabajo en el laboratorio. A mi hermana, Yolanda, por sus ánimos durante estos años para continuar adelante, y por su ayuda en la corrección final.

A Carmen, mi familia y Juan.

INDICE

	página
1.Introducción	
1.1. Organización estructural del hipocampo de los vertebrados	3
1.1.1. Nomenclatura y topografía	3
1.1.2. Organización estructural del hipocampo y el giro dentado	7
1.1.3. Aferencias, eferencias, conexiones comisurales y asociacionales de la formación hipocampal	11
1.2. El desarrollo de la formación hipocampal	21
1.2.1. Histogénesis del hipocampo y giro dentado	22
1.2.2. Neurogénesis y gliogénesis en el hipocampo y giro dentado	26
1.2.3. La diferenciación en el hipocampo y el giro dentado	29
1.3. Contenido en ADN de las células neuroepiteliales, las neuronas y células de glía del Sistema Nervioso Central de los vertebrados	35
2. Objetivos e interés de los mismos	40
3. Diseño experimental	42
4. Material y métodos	
4.1. Material	44
4.2. Métodos	45
5. Resultados	
5.1. Puesta a punto de un nuevo método para la disgregación celular del hipocampo de rata	53

5.2. Puesta a punto de un método de semidisgregación de rodajas de hipocampo de rata	60
5.3. Patrones espacial y temporal de morfogénesis de las células piramidales	64
5.4. Determinación del contenido de ADN de las células piramidales	81
5.4.1. Condiciones óptimas para la determinación del contenido de ADN	81
5.4.2. Determinación del contenido de ADN	86
6. Discusión	
6.1. Método de disgregación	92
6.2. Método de semidisgregación	96
6.3. Patrón espacial y temporal de morfogénesis de las células piramidales	98
6.4. Contenido de ADN de las células piramidales	107
7. Conclusiones	116
8. Bibliografía	118

1. INTRODUCCION

1.1. ORGANIZACION ESTRUCTURAL DEL HIPOCAMPO DE LOS VERTEBRADOS

1.1.1. Nomenclatura y topografía

El hipocampo es una de las partes del cerebro que más intensamente se ha estudiado. El interés hacia él se debe tanto a su papel funcional (implicación en procesos de memoria y aprendizaje), como a las peculiaridades únicas de la organización del hipocampo y de su desarrollo, pues contiene varias subregiones con diferente organización y ritmo de desarrollo. Su ordenada organización estructural en capas y la elevada capacidad de reinervación, hacen del hipocampo el modelo experimental más empleado para el estudio del funcionamiento de los circuitos neuronales y la plasticidad y capacidad regenerativa del cerebro (Reznikov, 1991).

Conviene distinguir entre los términos región hipocampal, formación hipocampal, e hipocampo. En el cerebro de mamíferos la **región hipocampal** es el componente central del sistema límbico. Este se compone de una porción cortical y una porción subcortical. La porción cortical está constituida por la circunvolución límbica, la cual es parte de la corteza cerebral, tiene forma de anillo, está situada en la cara interna de cada hemisferio, separa la neocorteza del hipotálamo y del tronco encefálico, e incluye el giro parahipocampal, cíngulato y subcalloso. La porción subcortical incluye la región hipocampal, la corteza olfatoria medial a la fisura rinal, la amígdala, el

septum, los cuerpos mamilares, y el núcleo talámico anterior (Reznikov, 1991; Cardinali, 1992). La región hipocampal se subdivide en dos partes (Ramón y Cajal, 1911; Lorente de Nó, 1934; Blackstad, 1956; Angevine, 1965, 1975; Isaacson, 1987): a) la formación hipocampal, consistente en el hipocampo propiamente o asta de Ammon, el giro dentado, y el subículus (incluyendo el prosubículus), y b) la formación parahipocampal, consistente en el presubículus, el parasubículus (incluyendo el área retroplenial) y la corteza entorrinal. Sin embargo, el término hipocampo es empleado a menudo para designar la formación hipocampal, especialmente para referirse al asta de Ammon y al íntimamente asociado giro dentado (Isaacson, 1987). En el presente trabajo utilizaremos el término hipocampo para referirnos al asta de Ammon.

Filogenéticamente, el sistema límbico corresponde a las partes más antiguas del telencéfalo y a las estructuras subcorticales que de él derivan (Cardinali, 1992). El hipocampo se considera como la arquicorteza intermedia en el desarrollo evolutivo, entre la paleocorteza olfatoria y la neocorteza (Nieuwenhuys y col., 1982; Shepherd, 1979). La topografía de la formación hipocampal es más bien complicada y difiere ligeramente en distintas especies de mamíferos (Angevine, 1975). Sólo los mamíferos placentarios poseen una bien desarrollada formación hipocampal postcallosa, situada bajo la corteza temporal y formada por un pliegue de la pared del hemisferio medial. Por su lado lateral, la formación bordea la pared mediobasal del ventrículo lateral. El hipocampo representa una continuación de la corteza cerebral que se enrolla, mientras que el giro dentado representa su final libre. La formación hipocampal está curvada a lo largo de su eje longitudinal (septo-temporal), de manera que la parte dorsal posee una orientación casi horizontal, y la porción ventral desciende a la base cerebral (Blackstad et al, 1970; Hjorth-Simonsen, 1972; Kalhe, 1988; entre otros), es decir,

posee forma de "C".

En secciones perpendiculares a su eje longitudinal la formación hipocampal presenta dos arcos, uno grande, constituido por las células piramidales del hipocampo, cuyo extremo inferior está incluido en la apertura del arco pequeño, formado por las células granulares del giro dentado (Fig. 1).

El hipocampo se ha subdividido en diversas regiones o áreas. Ramón y Cajal (1911) distinguió en los roedores dos regiones, una inferior, que comprende la zona de células piramidales grandes, y otra superior, que comprende el resto del hipocampo. Un análisis morfológico más detallado permitió a Lorente de Nó (1934) subdividir el hipocampo en cuatro campos: CA1, CA2, CA3, y CA4 (Fig. 1). El área CA1 corresponde a la mayor parte de la región superior, CA2 está situada cerca de la curva del arco del hipocampo, CA3 ocupa la mayor parte de la región inferior, y CA4 se encuentra dentro de la apertura del arco que forma el giro dentado, en la región del hilus.

En base a los patrones dendrítico y axonal de las neuronas de CA1 y CA3 observados en tinción de Golgi, Lorente de Nó distinguió tres partes en ellas (a, b, y c): CA3c, la parte más próxima al giro dentado, CA3a, la más próxima a CA2, y CA3b entre las anteriores; CA1c, la más cercana a CA2, y CA1a la más cercana al subículum. Sin embargo es bien conocido que los patrones de proyección de las piramidales dentro de un mismo área varían progresivamente (Ishizuka y col., 1990), existiendo un gradiente a lo largo del eje transversal del hipocampo, lo que lleva a considerar más exacta una terminología de ubicación de las células según su posición próximo-distal respecto al giro dentado: CA3 proximal es la zona de CA3 más cercana al giro dentado y la distal es la más cercana a CA2; CA1 más cercana a CA2 es la proximal y la más cercana al subículum es la distal. En el presente trabajo emplearemos la nomenclatura de Lorente de Nó (CA1, CA2, CA3, CA4) para referirnos a los distintos campos

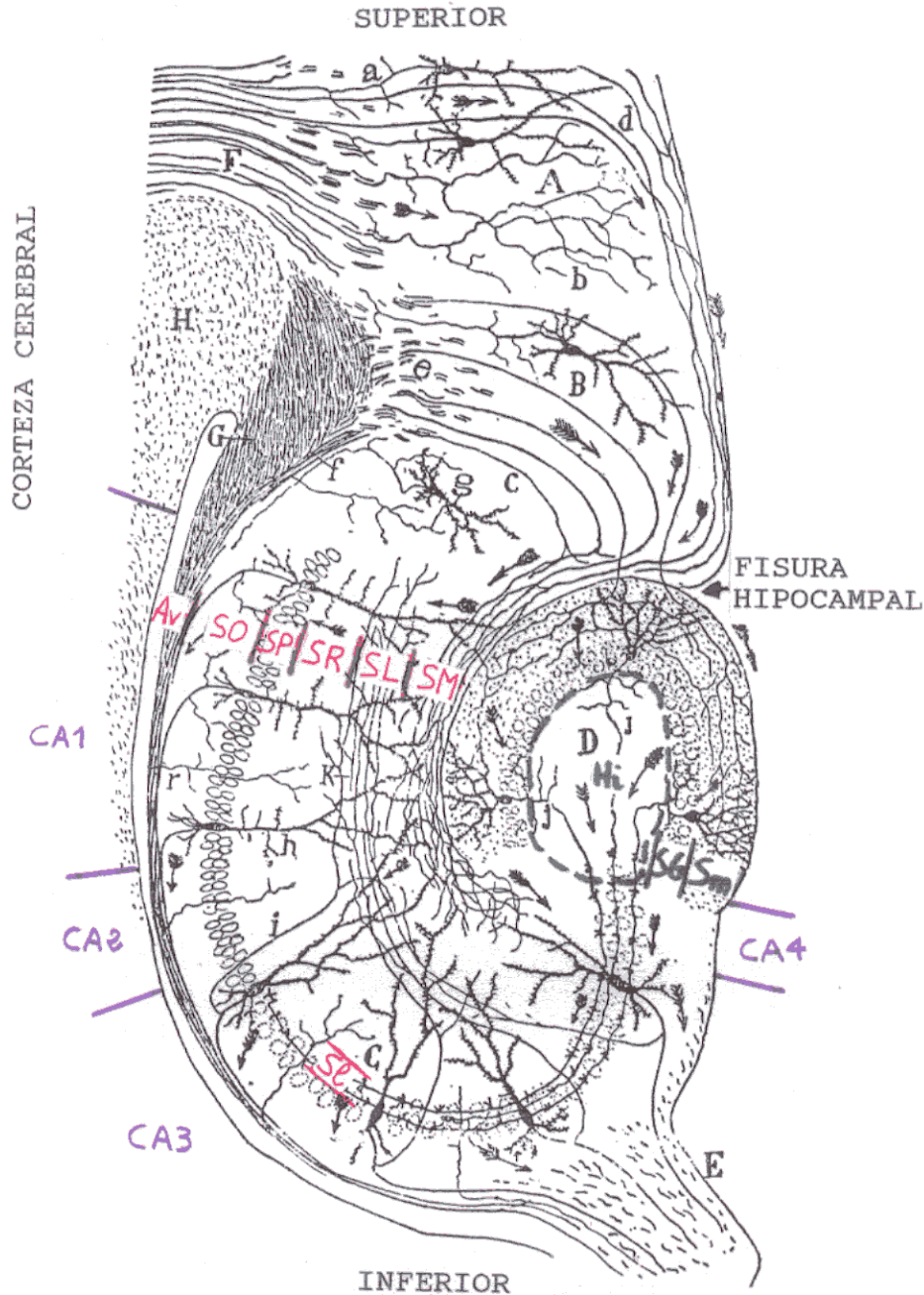


FIGURA 1. Esquema de la estructura y de las conexiones del hipocampo y giro dentado. A, ganglio del extremo occipital; -B, subículo; -C, hipocampo; -D, giro dentado; -E, fimbria; -F, cíngulo; -G, fascículo angular o tracto temporo-ammónico cruzado; H, cuerpo calloso; -K, colaterales recurrentes resultantes de las células piramidales y entrando al stratum lacunosum del hipocampo; -a, cilindro-eje penetrando en el cíngulo; -b, fibras del cíngulo terminando en el núcleo del extremo occipital; -c, fibras temporo-ammónicas perforantes o directas; -d, fibras perforantes del cíngulo; -e, plano de fibras temporo-ammónicas superiores; -g, célula del subículo; -h, células piramidales de la región superior del hipocampo; -i, colaterales ascendentes de las grandes células piramidales; -j, cilindro-eje de un grano; -r, colaterales de fibras del alveus. Tomado de Ramón y Cajal (1911) y modificado. Hemos remarcado en rojo los distintos strata del hipocampo y sus límites (Av, alveus; SO, stratum oriens; SP, stratum pyramidale; SR, stratum radiatum; SL, stratum lucidum; SL, stratum lacunosum; SM, stratum moleculare); y en azul la subdivisión en áreas del hipocampo (CA1, CA2, CA3, CA4). En verde señalamos las capas del giro dentado (Sm, stratum moleculare; SG, stratum granulosum; Hi, hilus).

o áreas del hipocampo, aunque adaptándola a los posteriores descubrimientos de Ishizuka y col. (1990).

El giro dentado consta de la *fascia dentata* (arco menor de la formación hipocampal) y el hilus (Fig. 1). La *fascia dentata* se subdivide en dos porciones: la más próxima al área CA1 se denomina brazo suprapiramidal y la otra infrapiramidal (Isaacson, 1987).

1.1.2. Organización estructural del hipocampo y el giro dentado

La organización estructural del hipocampo y del giro dentado ha sido estudiada con gran detalle en roedores (Ramón y Cajal, 1911; Lorente de Nó, 1934; Blackstad, 1956; Laatsch y Cowan, 1966; Blackstad y col., 1970; Hjorth-Simonsen, 1972, 1973; Andersen, 1975; Amaral, 1978; Gaarskjaer, 1986; Laurberg, 1979; Stanfield y col., 1979; Stanfield y Cowan, 1979a; Braitenberg y Schüz, 1983).

A) En el hipocampo, se distinguen las siguientes capas, comenzando desde el ventrículo lateral (Fig. 1):

1. **Capa endodimal**, consistente en *células endodimales* que rodean la pared del ventrículo (no representada en la Fig. 1).

2. El **alveus** (Av) contiene los axones mielinizados de las neuronas piramidales hipocampales que discurren paralelos al *stratum pyramidale*, las *fibras del tracto alveolar* procedentes de la corteza entorrinal, y *proyecciones desde el septum*.

3. El **stratum oriens** (SO), formado por las dendritas basales de las neuronas piramidales hipocampales. En la parte proximal de dichas dendritas terminan las *aferencias comisurales* procedentes del hipocampo contralateral.

4. El **stratum pyramidale** (SP), formado por los somas de las *células piramidales*, densamente empaquetados. En este *stratum* las *células en cesto de axón corto* forman glomérulos alrededor del cuerpo de las piramidales.

5. El **stratum lucidum** (Sl) sólo existe en el área CA3 y

representa la franja de *fibras musgosas* que proceden del giro dentado discurriendo inmediatamente suprayacentes al *stratum pyramidale*.

6. El *stratum radiatum* (SR), contiene las ramas primarias de las células piramidales; las *colaterales Schaffer* de los axones de las piramidales de CA3 que acaban en la parte proximal de las ramas de la dendrita apical de las piramidales en CA1; las porciones distales de las ramas de dendritas apicales de las piramidales existentes en este *stratum*, son el campo donde finalizan las *proyecciones comisurales desde CA3* del hipocampo contralateral y de las *aferencias desde el septum*.

7. El *stratum lacunosum* (SL), consiste en las ramificaciones de las dendritas apicales de las neuronas piramidales. Esta capa es campo de finalización de la *vía perforante*, procedente de la corteza entorrinal y del *tracto cruzado temporoamónico* procedente de la corteza entorrinal medial contralateral.

8. El *stratum moleculare* (SM), formado por las ramas terminales de las dendritas apicales procedentes de las células piramidales. Aquí terminan los axones de la *vía perforante* y del *tracto cruzado temporoamónico* procedentes de la parte lateral de la corteza entorrinal ipsi y contralateral.

A excepción del *stratum pyramidale*, el resto de capas contiene una variedad de tipos celulares (Ramón y Cajal, 1911; Lorente de Nó, 1934):

El *stratum oriens* posee varios tipos de células de axón corto: a) *células horizontales con axón descendente*, el cual se subdivide horizontalmente; se sitúan en la parte más profunda del *stratum*, y sus dendritas son horizontales; b) *células poligonales con axón ascendente* hacia el *stratum moleculare* y a veces al *radiatum*; se encuentran por todo el espesor del *stratum* y sus dendritas quedan en el *oriens* o bien ascienden hasta los *strata radiatum y moleculare*; c) *células en cesto*, que pueden ser poligonales u horizontales. Las primeras poseen dendritas en el

stratum oriens y axón ascendente al *moleculare* sin ramificarse en el *pyramidale*; las segundas poseen dendritas en el *stratum oriens* y axón ascendente al *radiatum* y a veces al *moleculare*, dando ramas a nivel del *stratum pyramidale*; d) células horizontales con axón ramificado en el *stratum radiatum* y dendritas en el *oriens*; y e) células con axón horizontal sin prolongaciones fuera del *stratum oriens*.

En el *stratum pyramidale* las células poseen distintas características en cada área hipocámpal. Las de CA1 presentan en su dendrita apical ramas laterales muy finas en el *stratum radiatum* que no existen ni en las de CA2 ni las de CA3; el soma y la parte inicial de su dendrita apical posee contorno liso, sin excrescencias; su axón es delgado y con varias colaterales ascendentes que ramifican en el *stratum radiatum* y otras colaterales que permanecen en el *oriens*. En CA3 las piramidales tienen mayor tamaño (similar a las de CA2) y su dendrita apical se divide en 2-3 ramas verticales que llegan al *stratum moleculare*, la parte inicial de la misma posee gruesas excrescencias. El axón es grueso y produce colaterales o bien cortas, que acaban en el *stratum oriens* o entre las piramidales de CA3, o bien largas que cruzan el *stratum pyramidale* y el *radiatum* donde constituyen fibras horizontales (colaterales Schaffer). Las piramidales de CA2 poseen dendritas similares a las de CA3 pero carentes de excrescencias. Su axón no produce colaterales Schaffer, aunque sí de otros tipos. En CA4 las piramidales tienen un soma normalmente poligonal o fusiforme y de contorno liso, su dendrita principal posee grandes excrescencias y su axón sigue un curso similar al de las de CA3 más próximas al giro dentado.

En los *strata radiatum* y *lacunosum* se distinguen también varios tipos de células: a) células con axón ramificado en el *stratum radiatum*, de las que se distinguen subtipos según las características de sus dendritas y axón; b) células con axón ascendente ramificado en el *stratum moleculare*, que a su vez

envía ramas a los *strata radiatum* y *lacunosum*, sus dendritas se ramifican en los *strata lacunosum*, *radiatum* y *pyramidale*, e incluso en el *oriens*; c) células horizontales con axón ramificado horizontalmente en el *stratum lacunosum*.

En el *stratum moleculare*, al igual que en los otros *strata* hay: a) células de axón corto y de soma poligonal, tanto el axón como las dendritas permanecen en este *stratum*; y b) células horizontales, de soma fusiforme y dendritas horizontales con aspecto similar al del axón.

B) En el giro dentado se distinguen tres capas o *strata*: el *moleculare*, el *granulosum* y el hilus (Fig. 1).

1. El *stratum moleculare* (Sm) contiene las dendritas apicales de las neuronas del *stratum granulosum*, orientadas verticalmente, y fibras aferentes que discurren en dirección horizontal. Las aferencias de la vía perforante procedentes del área entorrinal lateral acaban en el tercio superficial del *stratum*, las procedentes del área entorrinal medial se localizan en el tercio medio del mismo, y en el tercio interno acaban las fibras comisurales y asociacionales procedentes del hilus, las aferencias del septum, y las aferencias de la vía perforante procedentes del área entorrinal medial.

2. El *stratum granulosum* (SG) consiste principalmente en los somas densamente empaquetados de las neuronas granulares. Los axones de estas células, las fibras musgosas, descienden hacia el hilus dónde envían colaterales a las neuronas de esa zona, y continúan en haces al área CA3 del hipocampo, donde acaban formando sinapsis gigantes sobre las espinas de las dendritas de dichas piramidales en el *stratum lucidum*.

3. El hilus o capa polimórfica del giro dentado (Hi) está formado por células piramidales, modificadas, de la porción de CA4 que se introduce en el giro dentado, y por otros tipos de neuronas polimórficas localizadas predominantemente cerca del *stratum granulosum*. La localización tan próxima del campo CA4

respecto al giro dentado ha llevado a que sea considerado por muchos autores como una parte de éste (Amaral, 1978; Swanson y col., 1978). En la actualidad, con CA4 se designa a la porción del *stratum pyramidale* que se introduce en el hilus del giro dentado (Lacaille y col., 1994).

La distribución de las células gliales (principalmente los astrocitos) en la formación hipocampal tiene algunas peculiaridades (Reznikov, 1991). La colocación de los cuerpos celulares y la orientación de sus prolongaciones, tanto en el hipocampo como en el giro dentado, se corresponde con la organización laminar y la orientación de las fibras aferentes. Así, en el *stratum moleculare* del giro dentado, los somas de los astrocitos tienden a estar alineados entre las aferencias comisurales y asociacionales en el tercio más interno, entre las aferencias de la vía perforante medial en el tercio medio, y en un alineamiento menos obvio entre éstas y las aferencias de la vía perforante lateral en el tercio externo. Otra zona de pronunciado alineamiento de astrocitos en el giro dentado, es la zona subgranular, localizada en el hilus, inmediatamente bajo la capa granular. Esta zona contiene astrocitos de tipo radial con prolongaciones verticalmente orientadas dentro de la capa granular. En el hipocampo cada capa se caracteriza por presentar una arquitectura astroglial característica, en términos de densidad y orientación de las prolongaciones gliales (Reznikov, 1991).

1.1.3. Aferencias, eferencias, conexiones comisurales y asociacionales de la formación hipocampal

El hipocampo y el giro dentado poseen un sistema de aferencias, conexiones intrínsecas y eferencias, altamente complicado. En la Fig. 2 mostramos un esquema de las mismas, que resume las áreas de terminación y de salida de la mayoría de ellas en la formación hipocampal.

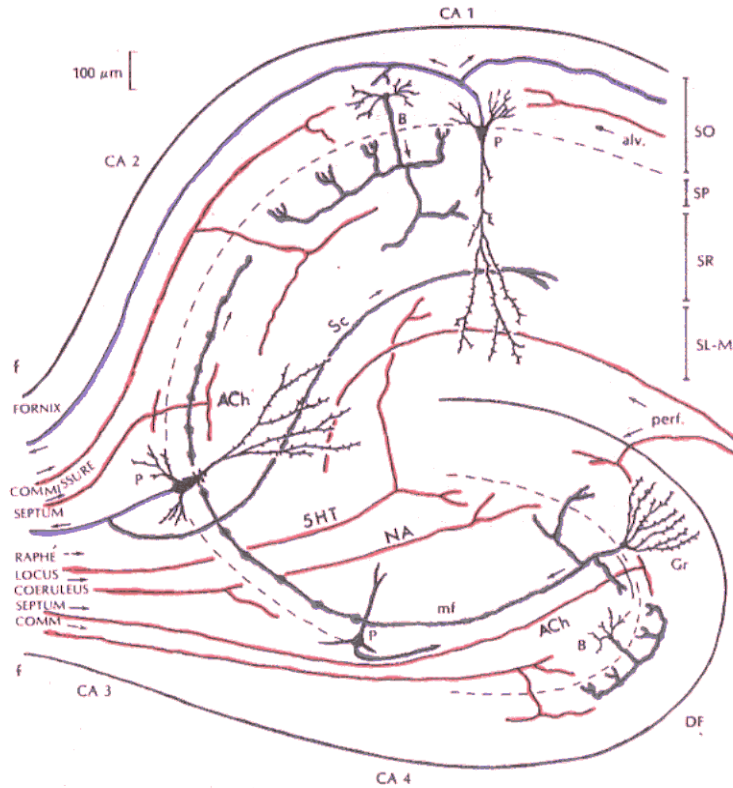


Figura 2. Neuronas del hipocampo y giro dentado, con las principales aferencias, eferencias y conexiones intrínsecas. Tomado de Shepherd (1979). Hipocampo: P, neurona piramidal (neurona principal); B, célula en cesto (neurona intrínseca); Sc, colateral recurrente Schaffer (axónica) de las células piramidales; CA1-CA4, regiones hipocámpales; capas: SO, stratum oriens; SP, Stratum pyramidale; SR, stratum radiatum; SL-M, stratum lacunosum-moleculare; aferencias: perf, fibras en las vías perforantes; alv, fibras de la vía alveolar; mf, fibras musgosas desde el giro dentado; f, fibras llegando a través del fórnix. Giro dentado (DF): Gr, célula granular (neurona principal); B, célula en cesto (neurona intrínseca); aferencias: perf, fibras en las vías perforantes; f, fibras llegando a través del fórnix. Sobre el original hemos remarcado en azul las eferencias, en rojo las aferencias, y en verde los circuitos intrahipocámpales.

A) Las vías aferentes al hipocampo y al giro dentado, son las siguientes:

a. Proyecciones desde la corteza entorrinal que son mayoritariamente ipsilaterales y en menor proporción contralaterales (Stewart, 1976). La proyección predominantemente ipsilateral es la denominada vía perforante (tracto temporo-ammónico directo), la cual abandona la sustancia blanca que rodea la corteza entorrinal y asciende perforando las cortezas presubicular, subicular y prosubicular hacia la fisura hipocámpal

(Fig. 2, perf), terminando las fibras en los dos tercios más externos de la capa molecular del giro dentado y en los *strata lacunosum* y *moleculare* del área CA3. Para llegar a este área, tiene que pasar por CA1 y CA2 (Hamilton, 1976; Hjorth-Simonsen y Jeune, 1972).

Otra vía de distribución de fibras desde la corteza entorrinal al hipocampo es el tracto témporo-alvear, que surge de células de la parte medial del área entorrinal y cuyas fibras discurren medial y dorsalmente para entrar en el *alveus* (Fig. 2, alv), desde el cual terminan en piramidales de CA1 (Hamilton, 1976; Shepherd, 1979). Existe una pequeña proyección desde la corteza entorrinal al giro dentado contralateral, aunque las principales aferencias bilaterales que surgen desde la corteza entorrinal son las de la vía que va a los *strata lacunosum* y *moleculare* de CA1 (también llamado tracto temporo-ammónico cruzado). Las fibras de la vía perforante puede que utilicen también glutamato (Ottersen y Storm-Mathisen, 1989).

Steward (1976), mostró cómo las fibras entorrinales del área medial a la lateral se distribuyen en un gradiente próximo-distal a lo largo de las dendritas de las células granulares dentadas y de las dendritas apicales de las células piramidales de CA3. Este patrón de terminación es similar en las proyecciones cruzadas del área entorrinal al giro dentado contralateral. La organización es diferente en la región superior (CA1), en la cual existe un gradiente de terminación en la dimensión longitudinal: aferencias del área entorrinal medial acaban en la zona cercana a la transición CA1-CA2 (tanto ipsi como contralateralmente); aferencias del área entorrinal lateral acaban en la zona de CA1 más próxima al subículum. La anterior organización longitudinal se mantiene a lo largo del eje rostro-caudal de la formación hipocampal (Andersen, 1975).

b. Proyecciones procedentes del núcleo septal medial y del núcleo de la banda diagonal, que llegan a la formación hipocampal

a través de tres vías: una vía que asciende rostralmente al cuerpo calloso, desde el cual penetra por la zona dorsal de la formación hipocampal; una segunda vía dorsal que por el fórnix dorsal penetra a través de la fimbria caudalmente en la formación hipocampal (Fig. 2); y una vía que penetra ventralmente en la formación (Gage y Björklund, 1985). Poseen un campo de terminación semidisperso localizado en los *strata oriens* y *radiatum* de la región inferior (CA3) del hipocampo, y una zona de terminación estrecha en la parte más profunda de la capa molecular del giro dentado (Swanson y Cowan, 1979). Constituyen una aferencia colinérgica al hipocampo y giro dentado, y también glutamatérgica sobre algunas piramidales del hipocampo (Fig.4) (Shepherd, 1979).

c. Aferencias noradrenérgicas procedentes del locus coeruleus, las cuales salen del mismo por el haz noradrenérgico dorsal y alcanzan el haz medial del cerebro anterior, desde el cual llegan a la formación hipocampal por tres vías: la primera se establece en el hipotálamo rostral y se denomina haz ventral amigdalóide, ansa peduncularis o vía ventral, y entra en la formación hipocampal por la zona más próxima a la base del cerebro; la segunda es una vía dorsal que asciende por la parte lateral del septum y a través del fórnix-fimbria llega a la formación (Fig. 2); la tercera es otra vía dorsal que llega a la formación hipocampal caudalmente pasando por encima del cuerpo calloso y cíngulo (Gage y Björklund, 1985). Terminan de forma difusa sobre la dendrita apical de las células piramidales y las neuronas granulares en el hipocampo y el giro dentado respectivamente, pero forman los plexos más densos de elementos terminales en el hilus a lo largo del límite con la capa granular, y en el *stratum lucidum* del área CA3 (Ungerstedt, 1971; Pickel y col., 1974; Swanson y Hartman, 1975).

d. Aferencias serotoninérgicas procedentes de los núcleos del rafe que cursan rostralmente por el haz medial del cerebro anterior, como las noradrenérgicas, llegando a la formación

hipocampal a través de varias vías: una primera que, separándose de la anterior, gira dorsalmente hacia el septum y entra vía fórnix-fimbria en la formación hipocampal (Fig. 2); otra que asciende hacia el cuerpo calloso y gira caudalmente en la estría supracallosa, entrando al hipocampo vía subículum; y una vía ventral que, por el ansa lenticularis, llega al hipocampo entrando por el polo más temporal del subículum (Gage y Björklund, 1985). Inervan en un patrón similar al de las aferencias noradrenérgicas (Conrad y col., 1974; Moore y Halaris, 1975).

e. Existen aferencias difusamente organizadas procedentes de regiones del tronco del encéfalo diferentes al locus coeruleus y núcleos del rafe; por ejemplo, áreas reticulares tegmentales, la sustancia gris central, el núcleo tegmental dorsal, y los núcleos reticulares tegmento pontinos (Wyss y col., 1979).

Bayer (1980a) encontró relación entre el patrón de neurogénesis de las células de origen de las aferencias al hipocampo y el orden de terminación de las mismas sobre las dendritas de las células piramidales de CA1 y CA3, y de las células granulares del giro dentado (Fig. 3). Esta relación consiste, en resumen, en que las células de origen que salen del ciclo celular más pronto (las más viejas), envían sus axones a las ramificaciones dendríticas apicales más distales al soma (*stratum lacunosum-moleculare*), mientras que las células que abandonan el ciclo más tarde (las más jóvenes) los envían a la porción de la dendrita apical más próxima al soma y a las dendritas basales. Este hallazgo constituye un ejemplo de cómo el estudio del desarrollo del hipocampo, nos puede aportar información necesaria para entender aspectos estructurales y funcionales del mismo.

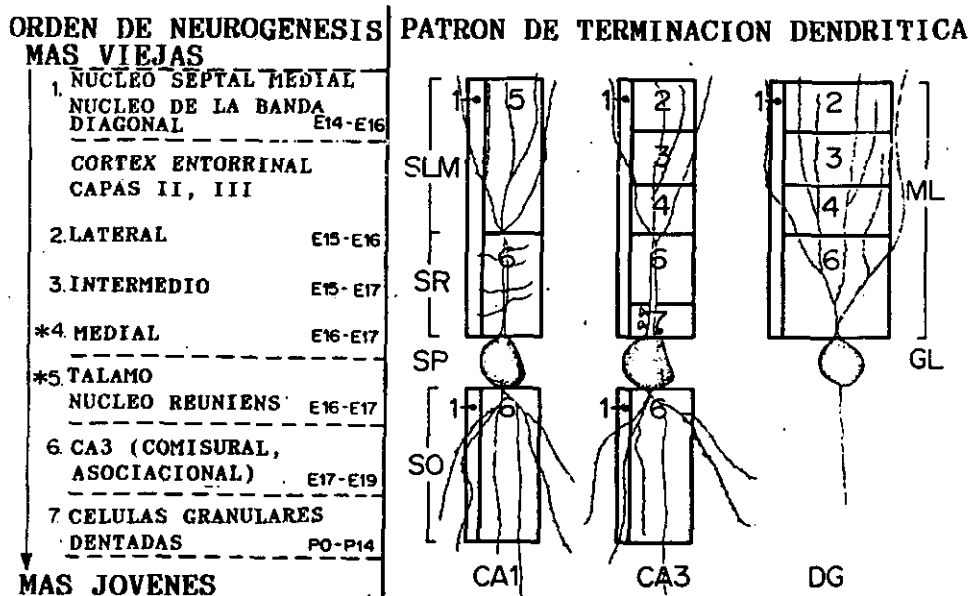


Figura 3. Orden de neurogénesis de las células de origen de las fibras aferentes del hipocampo en relación al orden de terminación sobre las dendritas de CA1, CA3, y el giro dentado. Tomada de Bayer (1980a).

B) **Sistemas comisurales y asociacionales.** Hay dos sistemas comisurales que conectan los dos hipocampus, la comisura hipocampal ventral (*psalterium ventral*) (Voineda y col., 1981; Van Groen y Wyss, 1988), y la comisura hipocampal dorsal (*psalterium dorsal*) (Hamilton, 1976). El origen y campo de terminación de estos sistemas comisurales se ha estudiado principalmente en la rata y se suponía que el resto de especies tenía el mismo patrón de conexiones. Trabajos recientes (Amaral y col., 1984; Van Groen y Wyss, 1988) demuestran que hay diferencias notables entre las especies. La rata tiene mayor abundancia de proyecciones comisurales que el resto de las especies estudiadas (Van Groen y Wyss, 1988). Estas proyecciones se componen de fibras de piramidales de CA4 que terminan en el *stratum moleculare* del giro dentado y en CA4 contralateral; fibras de CA3 que terminan en los *strata oriens* y *radiatum* de CA1 y CA3 y en el giro dentado contralaterales; y fibras de CA1 que terminan en CA1 y subículo contralaterales. Las proyecciones que

se originan en CA3 o CA4 son mucho más abundantes que las que se originan en CA1. Por lo tanto, por las comisuras pasan fibras de proyección homotópica (CA1 a CA1, CA3 a CA3 y CA4 a CA4); pero no es un sistema homotópico puro, puesto que de CA1 también hay proyecciones al subículum, de CA3 a CA1 y de CA4 al giro dentado; y además, fibras (por ejemplo) de CA3 de la porción rostral de un hipocampo proyectan a porciones en situación más caudal del otro hipocampo. En el mono macaco, sin embargo, las proyecciones que se originan en CA3 y CA4 son mucho menos abundantes que en la rata y ambas quedan restringidas a la porción caudal de la formación hipocampal (Amaral y col., 1984).

Las principales proyecciones asociacionales del hipocampo que se conocen son: las colaterales axónicas (Schaffer) de las células piramidales de CA3 que proyectan ipsilateralmente a CA1, axones de piramidales de CA3 y de CA4 que proyectan ipsilateralmente, como hemos visto, para las proyecciones comisurales, y los axones o fibras musgosas de las células granulares del giro dentado (únicas fibras asociacionales del mismo) que proyectan a las piramidales de CA3. Esta última proyección asociacional se conoce también como tracto dentado-ammónico, y forma parte del importante circuito intrahipocampal (Ramón y Cajal, 1911; Hamlyn, 1962; Blackstad y col., 1970; Hjorth-Simonsen, 1973; Gaarskjaer, 1986; Laurberg, 1979; Amaral, 1993), que mostramos en la Fig. 4.

El circuito intrahipocampal está constituido por tres vías principales: 1) las fibras de la vía perforante procedentes de la corteza entorrinal, las cuales acaban, como hemos dicho anteriormente, en la parte superficial (capa molecular) del giro dentado y actúan sobre las células granulares, así como sobre las células piramidales de CA3 (Blackstad, 1958; Andersen y col., 1966; Lomo, 1971; Hjorth-Simonsen y June, 1972; Andersen, 1975; Swanson y col., 1978); 2) las fibras musgosas, que de las células granulares del giro dentado llegan a las piramidales de CA3.

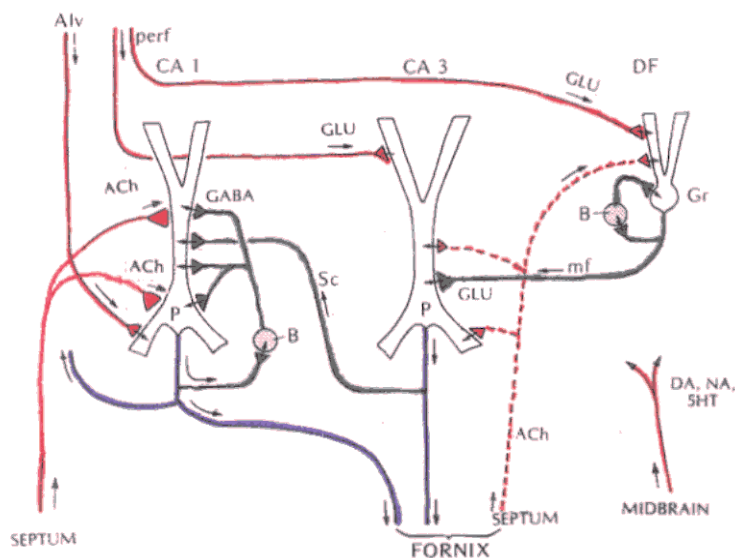


Figura 4. Diagrama del circuito básico y neurotransmisores para el hipocampo y giro dentado. Alv, alveus; perf, vía perforante; DF, fascia dentata; P, célula piramidal; Gr, célula granular; B, célula en cesto; mf, fibras musgosas; Sc, colaterales Schaffer. Tomado de Shepherd, 1979. Hemos remarcado en rojo las aferencias, en azul las eferencias, y en verde el circuito intrahipocámpal.

Está descrito un gradiente septo-temporal de terminación de estas fibras sobre CA3 (Gaarskjaer, 1978 a y b); 3) los axones de las células piramidales de CA3 emiten colaterales que terminan sobre las piramidales de CA3 y CA1, a nivel de los *strata oriens* y *radiatum* (Ramón y Cajal, 1911, Lorente de Nó, 1934; Andersen y col., 1966; Hjorth-Simonsen, 1973; Andersen, 1975; Swanson y col., 1978; Ishizuka y Amaral, 1990). Las colaterales enviadas a CA1 se denominan colaterales Schaffer, y se caracterizan por presentar un gran número de varicosidades. Se ha descrito un gradiente septo-temporal en el patrón de proyección a CA1 (Ishizuka y Amaral, 1990): las células de CA3 más próximas al giro dentado proyectan principalmente a la porción de CA1 próxima al septum, y las de CA3 más próximas a CA2 proyectan más intensamente a niveles más temporales respecto al lugar de origen. Existe otro gradiente de proyección a lo largo del eje transversal del hipocampo: las colaterales de CA3 proximal (recordemos que son las más cercanas al giro dentado) proyectan

principalmente a porciones distales de CA1 (cerca del subículum), y las que surgen de CA3 distal (más cercanas a CA2) acaban principalmente en la porción de CA1 más cercana al límite con CA2. Las colaterales axónicas de las células piramidales también sinaptan con las células en cesto, distribuidas por los *strata oriens* y *pyramidale* tanto de CA1 como de CA3, a las que activan. Las células en cesto, a su vez, sinaptan a través de sus axones sobre el soma de las piramidales inhibiéndolas.

Muy recientemente se ha descubierto un circuito inhibitorio intrahipocampal nuevo (Sik y col., 1994), que viene a añadir mayor complejidad a lo ya visto. Células de CA1 con sus somas en el *alveus* y *stratum oriens* envían axones directamente a CA3, y al hilus atravesando la fisura hipocampal. Estas células son inhibitorias, de conducción muy rápida y su proyección inter-regional (CA1 a CA3; CA1 al hilus) tiene implicaciones funcionales que aportan una nueva visión sobre el funcionamiento del hipocampo. Actualmente se entiende la organización funcional del hipocampo como una serie de grupos de células que forman una cadena (*stratum pyramidale*) excitada unidireccionalmente, regulada por circuitos inhibitorios locales (inhibición de las células piramidales por las células en cesto próximas, ver Fig. 4). Esta nueva proyección intrahipocampal descubierta, se piensa (Sik y col., 1994) que podría estar involucrada en la sincronización de los potenciales de acción de neuronas piramidales distantes espacialmente, y por lo tanto en la génesis de descargas sincrónicas y oscilaciones coherentes, que ocurren en el funcionamiento normal y en estados patológicos del hipocampo.

C) **Eferencias.** Las vías eferentes del hipocampo consisten en las proyecciones corticales y subcorticales de las células piramidales del hipocampo (Raisman y col., 1966; Hjorth-Simonsen, 1973; Meibach y Siegel, 1977; Jay y col., 1989; tomado de Reznikov, 1991; Swanson y Cowan, 1977, 1979). El hipocampo da

lugar a una extensa serie de conexiones intracorticales. El área CA1 envía proyecciones unilateralmente al subículum y da lugar también a proyecciones más limitadas al presubículum, parasubículum, corteza entorrinal, corteza cingulado, y corteza prelímbico prefrontal. Las áreas CA2 y CA3 envían proyecciones al subículum, parasubículum y área perirrinal. La única proyección subcortical de las células piramidales de las áreas CA1-3 es al núcleo septal lateral.

Las fibras eferentes hipocampales alcanzan el fórnix a través de la fimbria, que es un haz de fibras que constituye el borde ventrolateral del hipocampo durante alguna distancia. Cuando el fórnix cruza la comisura blanca anterior se divide en fibras precomisurales y postcomisurales (Nieuwenhuys y col., 1982). Cada componente de la formación hipocampal (hipocampo, giro dentado y subículum) tiene distinto patrón de conexiones eferentes y una representación específica en el fórnix (Hamilton, 1976; Swanson y Cowan, 1977; Shepherd, 1979). Las fibras precomisurales surgen de piramidales de CA1 y CA3 y van a la región septal lateral y las postcomisurales surgen del subículum y van a los cuerpos mamilares y núcleo ventromedial del hipotálamo.

1.2. EL DESARROLLO DE LA FORMACION HIPOCAMPAL

La transformación del tubo neural en las distintas porciones del sistema nervioso central de los vertebrados, sigue una misma serie de etapas en todas ellas (Jacobson, 1991) que enumeramos a continuación: 1) proliferación de las células neuroepiteliales; 2) neurogénesis y gliogénesis; en esta etapa las células neuroepiteliales abandonan el ciclo celular y se convierten en neuroblastos, o glioblastos; 3) emigración de los neuroblastos hacia sus posiciones definitivas; 4) formación de las prolongaciones celulares y de contactos sinápticos (morfogénesis); 5) muerte de las neuronas producidas en exceso y que no han realizado contactos sinápticos estables (apoptosis o muerte neuronal programada); 6) síntesis de neurotransmisores y moléculas específicas de cada tipo de ellas. Estas etapas, aunque son sucesivas, se solapan durante la mayor parte del desarrollo.

La formación hipocampal pasa, obviamente, por las etapas anteriormente referidas. Para entender cómo se desarrolla una estructura tan compleja, como ya hemos visto que es la formación hipocampal, sería necesario llegar a conocer en detalle (a nivel celular y molecular) cada una de aquellas etapas. La etapa de neurogénesis es sin duda la mejor conocida, pues se han estudiado a nivel celular, con bastante detalle, los patrones espacial y temporal de neurogénesis; habiéndose realizado la mayoría de los trabajos en rata y en ratón. La etapa de emigración también se ha estudiado ampliamente en el hipocampo y el giro dentado. Sin embargo, la etapa de morfogénesis está pobremente estudiada, así como también es escasa la información relativa a la síntesis de moléculas específicas y

neurotransmisores durante el desarrollo. No se conoce prácticamente nada sobre la muerte neuronal programada (o apoptosis) en la formación hipocampal (Jacobson, 1991; Reznikov, 1991).

1.2.1. Histogénesis del hipocampo y giro dentado

La formación hipocampal se desarrolla a partir de dos primordios telencefálicos, identificables en la rata en el día embrionario 16 (E16) (Fig. 5). Uno de ellos se localiza en la pared dorsomedial y genera una porción del subículum, hipocampo y giro dentado, y se continúa dorsalmente con el neocorteza a lo largo de toda su longitud; anteroventralmente se une a la región septal y foramen de Monro, y posteriormente al plexo coroideo. El otro se localiza en la pared dorsoposterior y genera la corteza entorrinal y parte del parasubículum y presubículum; en su límite anterior se une a la región telencefálica más avanzada en el desarrollo (Bayer, 1980b).

Los trabajos de Bayer y Altman (1974) y Bayer (1980 a y b) sobre histogénesis de la formación hipocampal en la rata, muestran que la pared dorsomedial del telencéfalo empieza a curvarse en el ventrículo lateral en E14. Entre E15-E16 (Fig. 6), una zona de células dispersas y aleatoriamente dispuestas forma el primordio del hipocampo. En E17 el hipocampo es una estructura saliente de la corteza en forma de lengua que descansa sobre el tálamo. Se distingue una capa delgada de células ependimales neuroepiteliales limitante al ventrículo lateral, la cual forma la parte dorsal del hipocampo; justo bajo esta capa hay una zona subependimal, donde se observan grupos de células pequeñas, bajo la cual existe una región de células grandes que posiblemente están ya diferenciándose. Entre las células grandes y la superficie ventral pial se aprecia una delgada capa de células pequeñas densamente empaquetadas y que ocupan el futuro sitio del giro dentado. La fimbria todavía no se observa claramente en este estadio.

PRIMORDIOS DE LA REGION HIPOCAMPAL

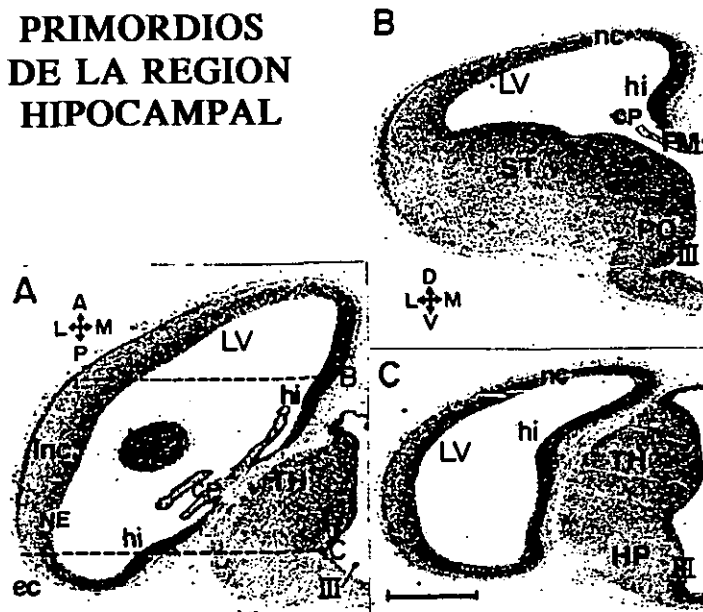


Figura 5. Cerebros de embriones de E16 en los planos horizontal (A) y coronal (B y C); flechas direccionales (A, anterior; P, posterior; M, medial; L, lateral; D, dorsal; V, ventral). Los dos primordios que formarán la región hipocampal (hi y ec) están en las paredes telencefálicas dorsomedial y dorsoposterior. CP, plexo coroideo; ec, primordio de la corteza entorrinal; FM, foramen de Monro; hi, primordio hipocampal; HP, hipotálamo; lnc, primordio lateral neocortical; nc, primordio neocortical; NE, neuroepitelio; PO, área preóptica; ST, striatum; TH, tálamo. Tomado de Bayer (1980b)

En E18-E19, una masa subpial de células en forma de balón forma el primordio del giro dentado. Este es más patente rostralmente, extendiéndose posteriormente bajo la capa de piramidales, de las que queda separado por la fisura hipocampal. En E19 empieza a ser aparente el alineamiento de las células piramidales del hipocampo. La forma tanto de la fimbria como de la fisura hipocampal son también distinguibles. En E20 aparece el brazo suprapiramidal (o ectal) del giro dentado, y el primordio del infrapiramidal (o endal) se puede distinguir entre E21-E22. En E21, una gruesa capa endependimal rodea aún al hipocampo, mientras que la zona subependimal se adelgaza. El alineamiento de las células piramidales es bastante claro, salvo en la porción rostral.

En el día postnatal 0 (P0), la zona endependimal es muy

delgada y la subependimal ha desaparecido. La capa de piramidales ha incrementado su longitud y se curva más tarde, introduciéndose en el hilus del giro dentado para adquirir la típica morfología adulta. La capa granular también empieza a adquirir su forma adulta.

Hasta P5 ocurren pocas variaciones en la morfología del hipocampo. La histogénesis del giro dentado está también prácticamente completa, puesto que presenta ya la forma adulta. Sin embargo, la zona subgranular, a la que se considera el remanente de la matriz proliferativa subpial, continúa produciendo células granulares en el adulto; por lo tanto, existen precursores indiferenciados entre las células granulares diferenciadas adultas.

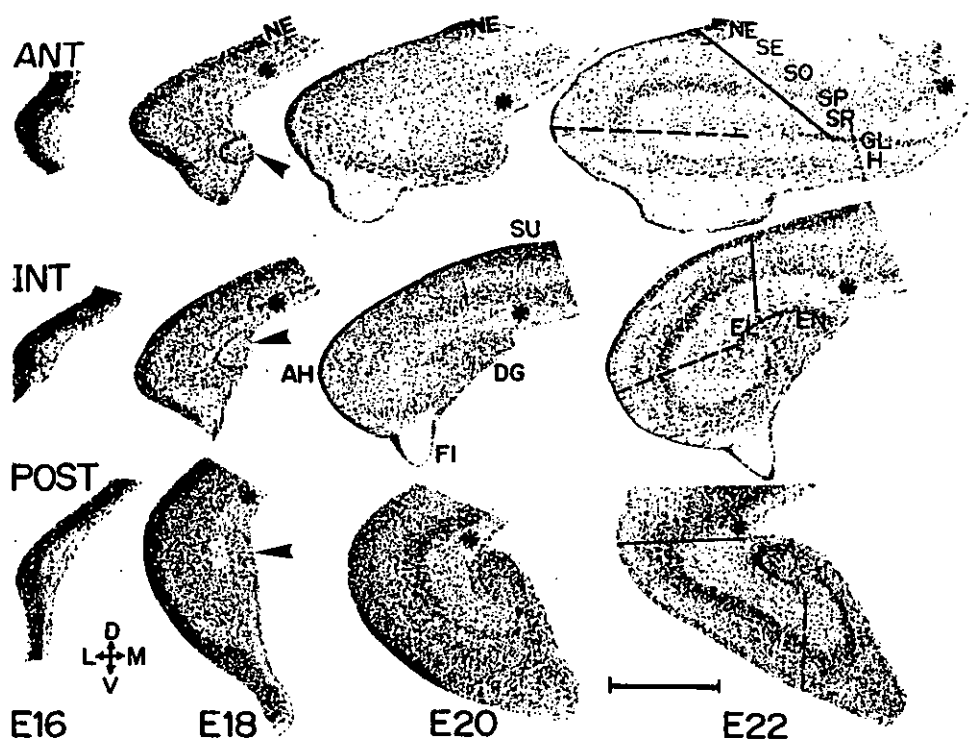


Figura 6. Secciones coronales de una porción del subículo (SU), hipocampo (AH), giro dentado (DG), y fimbria (FI) a niveles anterior (ANT), intermedio (INT), y posterior (POST) desde E16, E18, E20, y E22. La localización de las secciones se corresponde al vértice del hipocampo en el cerebro. Flechas direccionales dan la orientación; las secciones anterior y posterior de E16 son las mismas que en la Fig. 5B, C. Las limitaciones de áreas de estas secciones (los asteriscos muestran las localizaciones de las líneas de corte) son similares a las empleadas para la determinación volumétrica total de la formación hipocámpal (Fig. 7). Las cabezas de flecha señalan el primordio del giro dentado en E18. NE, neuroepitelio; SE, zona subependimal; SO, stratum oriens; SP, stratum pyramidale; SR, stratum radiatum; GL, capa granular; H, hilus del giro dentado; EL, brazo ectal de la capa granular del giro dentado; EN, brazo endal de la capa granular del giro dentado. Tomado de Bayer (1980b) y modificado.

El estudio detallado del orden de aparición y crecimiento de las distintas capas del hipocampo y giro dentado ha sido realizado en conejo por Stensaas (1967a-f) y en rata por Bayer (1980b). Comparando los resultados de ambos estudios se concluye que el proceso de estructuración en capas es muy similar en ambas especies. La Fig. 7 muestra el volumen de las capas que van apareciendo en el hipocampo y giro dentado de la rata entre los estadios E15 y P21. El neuroepitelio formado por las células en ciclo celular ocupa inicialmente un gran volumen, que va disminuyendo a lo largo del desarrollo y desaparece en P1. La zona subependimal se empieza a distinguir en E18 y desaparece hacia P7. Los *strata oriens* y *radiatum* experimentan un crecimiento rápido entre E16-E17, y los *lacunosum* y *moleculare* entre E22-P1. La capa de piramidales crece rápidamente entre E18 y E21. El crecimiento del hilus del giro dentado es rápido prenatalmente y decae postnatalmente, mientras que las capas granular y molecular del giro dentado crecen de forma continua postnatalmente.

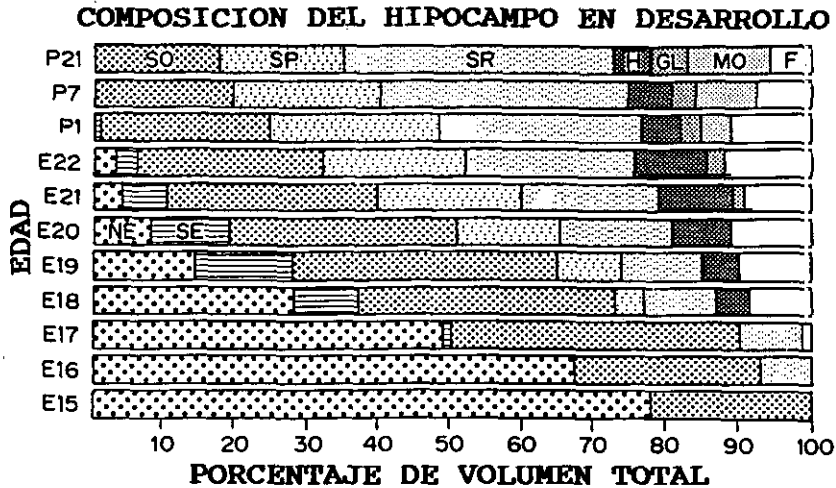


Figura 7. Volumen relativo ocupado por los componentes del hipocampo entre E15-P21. Al reducir el neuroepitelio (NE) su volumen relativo, se expanden las laminaciones del hipocampo (SO, SP, SR) y del giro dentado (H, GL, MO). Tomado de Bayer (1980b).

1.2.2. Neurogénesis y gliogénesis en el hipocampo y giro dentado

La neurogénesis ha sido estudiada en ratón (Angevine, 1965; Caviness, 1973; Stanfield y Cowan, 1979b; Reznikov, 1979, 1981), rata (Altman y Das, 1965; Bayer y Altman, 1974, 1975; Hine y Das, 1974; Schlessinger y col., 1975; Kaplan y Hinds, 1977; Bayer, 1980a, 1982), conejo (Fernández, 1969; Fernández y Bravo, 1974; Gueneau y col., 1982; tomado de Reznikov, 1991; Stensaas, 1967a-f), cobaya (Altman y Das, 1966) y mono (Nowakowski y Rakic, 1981; Rakic y Nowakowski, 1981). En todas las especies se han encontrado los mismos patrones espacial y temporal de neurogénesis. Las diferencias encontradas están en la duración total y en la fecha de inicio y terminación de la neurogénesis.

Las neuronas y glía del hipocampo se forman prenatalmente por división de las células de la capa neuroepitelial, también llamada zona germinal ventricular, inmediatamente adyacente al ventrículo lateral (Fig. 6, NE) (Bayer y Altman, 1974; Stanfield y Cowan, 1979b; Bayer, 1980b). Sin embargo, las células granulares del giro dentado se forman por división de células germinales que emigran desde la capa neuroepitelial al primordio del giro dentado (Fig. 6, cabeza de flecha) a través de la fimbria ya desarrollada, donde proliferan y generan las células granulares. Durante el periodo prenatal la capa neuroepitelial va disminuyendo hasta desaparecer. Postnatalmente, las células proliferantes están localizadas en las zonas subpial, subgranular, e hilus del giro dentado. En animales adultos permanece la zona subgranular como fuente de producción de células granulares, aunque en forma reducida (Bayer y Altman, 1974; Schlessinger et al, 1975; Bayer, 1980b; Reznikov, 1975, 1981).

Se han descrito tres gradientes espacio-temporales de neurogénesis en la formación hipocampal (Fig. 8): de superficial a profundo, en sandwich, y de rinal a dentado. Las neuronas más

interno. Las neuronas piramidales del hipocampo se generan en "sandwich", entre las neuronas suprapiramidales e infrapiramidales que se forman primero, y las neuronas granulares del giro dentado también se generan en sandwich, entre las neuronas grandes del hilus y las medianas de la capa molecular (Bayer y Altman, 1987, revisión). Finalmente, el gradiente latero-medial (o de rinal a dentado) con células originándose primero en las proximidades de la fisura rinal y las últimas más próximas al giro dentado (Angevine, 1965; Schlessinger y col., 1978; Bayer, 1980a). El significado exacto de los gradientes no está claro, presumiblemente son adaptaciones para facilitar el ensamblaje de sistemas neuronales complejos, como es el de la formación hipocampal (Jacobson, 1991).

En el hipocampo de la rata la neurogénesis empieza en E15. Entre E15 y E17 se generan las grandes neuronas de las capas infrapiramidal y suprapiramidal. Entre E17 y E19 se generan las neuronas piramidales, terminando la neurogénesis primero en el área CA2 y después en las áreas CA3 y CA1. En el giro dentado, las grandes neuronas de la capa molecular y las medianas del hilus se generan primero, entre E15 y E19, mientras que la producción neuronal de la capa granular empieza en E17, continúa hasta P20 (Bayer y Altman, 1974; Schlessinger y col., 1975; Bayer, 1980a; Reznikov, 1979, 1981), y persiste aunque a pequeña escala en animales adultos (Kaplan y Hinds, 1977; Bayer, 1982, 1985; y Kaplan y Bell, 1984; Crespo y col., 1986; Trice y Stanfield, 1986). La génesis postnatal de la mayoría de las neuronas granulares del giro dentado, es una característica no sólo de la formación hipocampal de la rata y el ratón, sino también de todas las especies de mamíferos estudiadas.

Recientemente, trabajos en los que han combinado la autorradiografía y la inmunohistoquímica, han demostrado que en el hipocampo la mayoría de las neuronas GABAérgicas dejan el ciclo muy temprano, en E13, mientras que una pequeña proporción

lo dejan entre E15-E18 (Amaral y Kurz, 1985; Lübbers y col., 1985). Las neuronas somatostatina positivas se generan entre E12 y E15; primero la mayoría de las áreas CA1 y CA3, en E14, y después las del hilus del giro dentado en E15 (Rapp y Amaral, 1988).

La gliogénesis se ha estudiado menos extensamente en la formación hipocampal que la neurogénesis. Las células de glía en el hipocampo son producidas por las células de la zona neuroepitelial bordeante del ventrículo, la misma zona de la que se generan las neuronas. En la rata sólo el 44% de las células de glía, localizadas en las capas suprapiramidal e infrapiramidal del hipocampo se generan durante la embriogénesis. El 70% se genera en periodos postnatales del desarrollo. El resto son producidas durante el último periodo de la vida postnatal. En el giro dentado el 90% de las células del *stratum moleculare* y el 70% del *stratum* polimórfico se generan durante el periodo postnatal. La mayoría de ellas durante las dos primeras semanas después del nacimiento (Bayer y Altman, 1974).

Estudios inmunocitoquímicos utilizando anticuerpos contra vimentina y la proteína fibrilar ácida de la glía (GFAP), específicos de glía radial, han detectado células vimentina positivas en el giro dentado de la rata en E13 y células GFAP positivas en E17 (Rickman y col., 1987).

1.2.3. La diferenciación en el hipocampo y el giro dentado

La diferenciación de las neuronas y glía del SNC comienza en el mismo momento de abandonar el ciclo celular. El proceso de diferenciación neuronal comprende los procesos de emigración, morfogénesis y síntesis del conjunto de moléculas (específicas o no) que caracterizan a cada tipo de neurona, ya sean neurotransmisores u otras moléculas. Los neuroblastos y glioblastos emigran desde la capa neuroepitelial (o ventricular) hasta sus posiciones definitivas, salvo excepciones. Las células

granulares del giro dentado son una excepción, puesto que como vimos en el apartado de neurogénesis, no se generan a partir de células neuroepiteliales, sino a partir de células con capacidad proliferativa que se establecen en el primordio del giro dentado tras emigrar desde la capa neuroepitelial. La morfogénesis es literalmente la génesis de la forma, y por lo tanto es el proceso por el que las neuronas y células de glía adquieren su forma adulta. Este proceso incluye, en las neuronas, la emisión de prolongaciones, el establecimiento de contactos sinápticos, así como procesos moleculares subyacentes (Jacobson, 1991). La síntesis de moléculas características de cada tipo de neuronas o glía (marcadores de diferenciación) puede comenzar en cualquier momento después de abandonar el ciclo, o incluso durante el último ciclo.

El proceso de emigración en el hipocampo y giro dentado es sin duda el más extensamente estudiado. Los trabajos de Stensaas (1967 a-f) en conejo muestran claramente que los neuroblastos de células piramidales adoptan formas bipolares durante su proceso de emigración, pero no indican con claridad si estos neuroblastos emigran libres, o conectados a la limitante pial. Los trabajos de Nowakowski y Rakic (1979) muestran sin embargo una variedad de formas de células migrando libremente a través de la capa intermedia del hipocampo de mono. Estos autores encontraron no sólo formas bipolares, sino también formas con dos, tres, o más prolongaciones, cuya identidad no pudieron confirmar, no dejando claro si los neuroblastos bipolares corresponden a células piramidales. Sus resultados muestran, en cambio, cómo los neuroblastos bipolares están unidos a las prolongaciones de las células de glía radial todo el trayecto de emigración, mediante contactos sinápticos especializados, y extendieron la hipótesis, formulada previamente en estudios de corteza cerebral, de que los neuroblastos emigran guiados por la glía radial.

Trabajos "in vitro" muy recientes, han logrado que células de la formación hipocampal y células grano del cerebelo de la rata emigran sobre las prolongaciones de un lecho de astrocitos (Edmonson y Hatten, 1987; Hatten, 1990), imitando la emigración "in vivo". El proceso ha sido estudiado y filmado, y se ha observado cómo el neuroblasto que está emigrando se elonga en estrecho contacto con y envolviendo parcialmente a la prolongación de la célula de glía. Este comportamiento es similar al descrito por Nowakowski y Rakic (1979) "in vivo". Sin embargo, "in vitro" los neuroblastos se mueven a una velocidad de 20-60 μm /hora, mayor de lo que se ha estimado "in vivo", 4 μm /hora, en diferentes regiones del cerebro (Altman, 1966; Fujita y col., 1966; La Vail y Cowan, 1971b; Rakic, 1974; Clarke y col., 1976), y además son capaces de moverse en cualquiera de las direcciones de una prolongación glial dada. Experimentos "in vitro" en los que se han utilizado combinaciones heterotípicas entre neuronas y glía del hipocampo y cerebelo (Hatten, 1990), muestran cómo los neuroblastos del hipocampo migran sobre fibras gliales del cerebelo, y neuroblastos del cerebelo migran sobre prolongaciones gliales del hipocampo, indicando que la asociación neurona-glía no es región-específica.

Sobre el mecanismo molecular de la emigración se sabe poco. Diversas moléculas fueron implicadas inicialmente en la emigración celular, principalmente moléculas de adhesión neuronal (N-CAM, L1) y moléculas de adhesión neurona-glía. Sin embargo, experimentos recientes en los que han utilizado anticuerpos contra esas moléculas demuestran que, al menos en la emigración "in vitro", las N-CAM y L1 no están implicadas. Anticuerpos contra astrotactina, una molécula de superficie que media las interacciones neurona-glía (Edmonson y Hatten, 1987), inhiben la adhesión de membranas de neuroblastos a las células de glía, indicando que la astrotactina sí participa en la adhesión del neuroblasto a la glía radial. No sólo la astrotactina participa

en la emigración, pues la idea es que están implicados numerosos sistemas de receptores (Hatten, 1990), puesto que el movimiento requiere: 1) la adhesión del neuroblasto a la fibra de glía radial, 2) la emisión de filopodios y lamelipodios por la prolongación de avance del neuroblasto y el desplazamiento de la célula, lo cual implica al citoesqueleto y por lo tanto, al sistema de receptores de membrana y moléculas intracelulares asociadas al citoesqueleto, y 3) la orientación de la célula para el avance en la dirección correcta, lo cual estaría mediado por otro sistema de receptores.

Los neuroblastos migratorios secretan proteasas que rompen los componentes de la matriz extracelular a su paso por el camino de emigración. Se ha demostrado, "in vitro", que las células grano en emigración del cerebelo (Krystosek y Seeds, 1981a; Jacobson, 1991) y los conos de crecimiento (Krystosek y Seeds, 1981b; Pittman, 1985; Monard, 1988; Pittman y Bnettner, 1989) segregan activadores de plasminógeno, los cuales inician una cascada proteolítica que concluye con la activación de diversos enzimas que rompen componentes de la matriz extracelular tales como el fibrinógeno y colágeno.

El proceso de morfogénesis de las células piramidales del hipocampo y de las células granulares del giro dentado ha sido objeto de estudio en sólo unos pocos trabajos realizados en ratón (La Vail y Wolf, 1973; Reznikov, 1991), rata (Engelhard y col., 1967; Minkwitz, 1976, citados por Reznikov, 1991; Altman y Bayer, 1990) y conejo (Stensaas, 1967 a-f). Los trabajos en rata indican que en el momento del nacimiento, las células piramidales son inmaduras, y muchas de ellas tienen sólo la prolongación que se transformará posteriormente en dendrita apical, sin ramificación dendrítica alguna. Este dato contrasta con los resultados de Stensaas (1967 a-f) que muestran, en el estadio equivalente (E22), células piramidales cuyas dendritas apicales están ramificadas en el extremo distal al soma. En la rata, al

final de la primera semana postnatal (P7) las dendritas de las células piramidales se acercan al *stratum moleculare* y poseen ramificaciones de tercer orden. Las dendritas basales de CA3 entran en el *stratum oriens* en este estadio, mientras que en el área CA1 ocurre a partir de P10-P11. En conjunto, las células piramidales de CA3 maduran más pronto que las de CA1 (Reznikov, 1991). Este dato contrasta con el gradiente de comienzo de neurogénesis de rinal a dentado (es decir de CA1 a CA3) descrito en el ratón, y con el patrón de terminación de neurogénesis en la rata (recordemos que terminan primero las piramidales de CA2 y después las de CA1 y CA3). No se han encontrado diferencias en la morfogénesis de las áreas CA3 y CA4. La diferenciación de las neuronas piramidales del hipocampo terminaría al comienzo de la cuarta semana postnatal.

La sinaptogénesis apenas se ha estudiado en el hipocampo de la rata. Se desconoce el calendario y el patrón espacial de sinaptogénesis de las distintas aferencias, y poco se sabe de la sinaptogénesis en el circuito intrínseco. Las células en cesto hacen contactos sinápticos con las neuronas piramidales en P5 (Seress y col., 1989), siendo ésta la explicación aceptada para la inhibición que manifiestan las neuronas piramidales muy pronto en el desarrollo.

En el giro dentado la morfogénesis de las células granulares se caracteriza por: varicosidades sobre sus dendritas, conos de crecimiento dendríticos, aparición transitoria de dendritas basales, y formación progresiva de espinas dendríticas (Lübbers y Frotscher, 1988). Los primeros axones de células granulares se observan en E16, pero la mayoría de las fibras musgosas se forman durante las tres primeras semanas postnatales (P0-P20). La sinaptogénesis comienza en P4, y hay un incremento rápido de sinapsis entre P4 y P11, duplicándose diariamente el número total de sinapsis en la capa molecular. Entre P4 y P90 dicho número incrementa unas 100 veces (Crain y col., 1973).

Aunque en E25 el número total de sinapsis en la capa molecular del giro dentado de la rata alcanza el valor característico del animal adulto, su desarrollo y complicación continúa durante estadios posteriores. En el ratón, los trabajos de La Vail y Wolf (1973) indican que las sinapsis entre las fibras musgosas y las piramidales de CA3 y CA4 también aparecen muy tarde, al final de la segunda semana postnatal (P12-P13).

El patrón espacial de sinaptogénesis tiene una correlación con la neurogénesis de las células granulares (Gottlieb y Cowan, 1972). La proporción de fibras cruzadas y no cruzadas que reciben las células granulares se correlaciona con el momento de salida del ciclo celular de estas células; la proporción de fibras cruzadas es mayor en las células que se generan más pronto. Así, en el momento en que las granulares más tempranamente formadas están dispuestas para recibir sinapsis sobre las porciones proximales de sus dendritas, las únicas aferencias presentes son las del mismo lado, mientras que las fibras del lado opuesto no llegan hasta algunos días después.

La llamativa escasez de información, tanto a nivel celular como a nivel molecular, sobre la diferenciación de las células piramidales del hipocampo, y en especial la falta de trabajos en rata (animal ampliamente utilizado en la actualidad en estudios de fisiología y desarrollo de función del hipocampo), junto con la pobreza de información existente sobre el patrón espaciotemporal de morfogénesis de estas células, nos motivaron a plantear el estudio de la morfogénesis de las células piramidales como objetivo de esta tesis.

1.3. CONTENIDO DE ADN DE LAS CELULAS NEUROEPITELIALES, LAS NEURONAS Y CELULAS DE GLIA DEL SISTEMA NERVIOSOS CENTRAL DE LOS VERTEBRADOS

Diversos trabajos han tenido como objetivo el estudio del contenido en ADN de las células neuroepiteliales, las neuronas y las células de glía del SNC de los vertebrados, desde que por primera vez Sauer y Chittenden (1959) tiñeran por el método de Feulgen (Feulgen y Rossenbech, 1924) secciones de tubo neural del embrión de pollo y estudiaran el contenido en ADN de sus células, con el objetivo de demostrar el "movimiento nuclear interquinético" de las células en interfase del ciclo de división celular. Estos autores demostraron un contenido variable entre 2C (diploide) y 4C (tetraploide) en las células del tubo neural. Observaron que los núcleos de células lindando con el ventrículo, en telofase, o que acaban de terminar la división celular (G1), tienen un contenido 2C; mientras que los núcleos de células próximas al ventrículo en profase visible, tienen el doble (4C); los núcleos de las células del resto del tubo neural contienen cantidades variables, entre 2C y 4C. Así, dedujeron el movimiento que el núcleo de las células neuroepiteliales realiza, durante G1 desde el ventrículo a la superficie externa del neuroepitelio, y durante G2 a la inversa. Sauer y Chittenden encontraron además que el contenido en ADN de los núcleos es aproximadamente proporcional a su tamaño.

Diversos trabajos han demostrado también que el tamaño de las neuronas es proporcional a su ploidía (Frankhauser, 1941, 1945a, b; Gurdon, 1959; Bradom, 1960; Jacobson, 1978; Jacobson y Hirose, 1979; Sperry, 1988a,b; Jacobson, 1993). Cuando a un

embrión de *Xenopus* se le somete a un tratamiento corto y brusco de temperatura justo antes de que el cigoto realice la primera división, a veces se desarrolla mosaicismo como resultado de que un blastómero se vuelve poliploide (Jacobson y Hirose, 1978). El sistema nervioso central de estos embriones contiene mosaicos de células poliploides, las cuales, son de tamaños muy superiores a las células diploides. Los mosaicos poliploides contienen menor número de células que los diploides (Fig. 9).

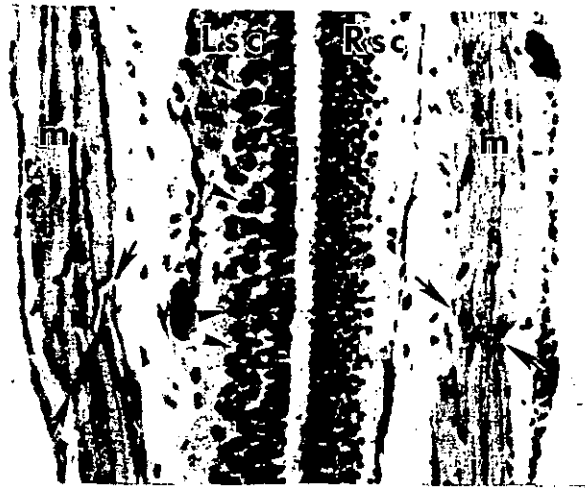


Figura 9. Variación del número y tamaño celular en un embrión de *Xenopus* con poliploidía en mosaico. En esta sección horizontal a través de la médula espinal a nivel torácico, el lado izquierdo está formado por células poliploides (algunas señaladas con cabezas de flechas), las cuales son mayores y son la mitad de las existentes en el lado derecho. Sin embargo, la simetría bilateral y el metamerismo son básicamente normales. Por ejemplo, las posiciones de las raíces espinales en la separación entre miotomos (flechas) son bilateralmente simétricas. Lsc, lado izquierdo de la médula espinal; Rsc, lado derecho de la médula espinal; ■, músculo somático. Tomado de Jacobson y Hirose, 1978.

Una relación muy estricta entre el tamaño de las neuronas del SNC y la ploidía de la salamandra fue también encontrada por Bradom (1960). Las neuronas de las salamandras haploides son pequeñas, las de las tetraploides son grandes y las de las salamandras diploides son intermedias (Fig. 10). Sin embargo, los cerebros de estas salamandras tienen tamaños iguales, por lo que la diferencia entre ellos está en el número de neuronas.

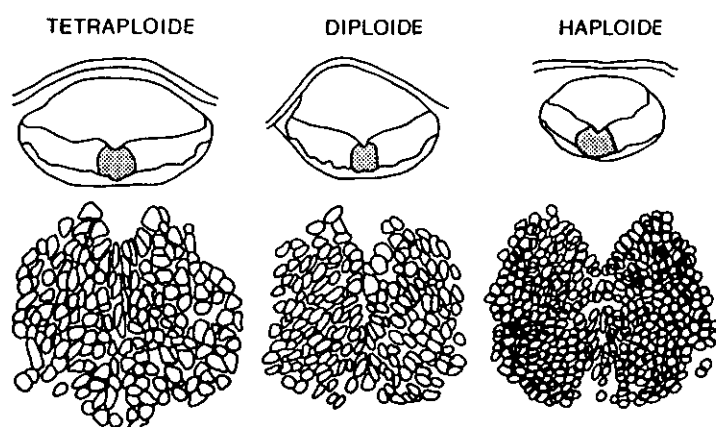


Figura 10. Regulación del tamaño del cerebro en la heteroploidía. Secciones transversales del bulbo de salamandras tetraploides, diploides, y haploides. El núcleo del bulbo señalado con áreas sombreadas, de salamandras tetraploides, diploides, y haploides, se muestra abajo para indicar las diferencias en tamaño y número de células. Tomado de Bradom (1960).

La capacidad de aprendizaje de las salamandras haploides, diploides y tetraploides ha sido estudiada por Frankhauser y col. (1955) y Vernon y Butsh (1957), quienes encontraron que la capacidad de aprendizaje de las salamandras tetraploides, con un número reducido de neuronas y muy grandes, es peor que el de las salamandras haploides, con gran número de neuronas de pequeño tamaño. Vernon y Butsh (1957) concluyeron que "la poliploidía produce un decremento en la capacidad de aprendizaje". Sin embargo, no se sabe si tal efecto es el resultado del incremento en el tamaño celular, la reducción del número de células o la reducción en el número de conexiones neuronales que probablemente resulta del número reducido de células.

La relación entre contenido en ADN y tamaño celular está, pues, bien demostrada en SNC de los vertebrados, al igual que en el resto de la escala biológica (Szarski, 1976). Esto motivó a varios investigadores a medir el contenido en ADN en neuronas de tamaño grande, en diversas porciones del cerebro de los vertebrados, como son: las motoneuronas de la médula espinal,

las células de Purkinje del cerebelo o las células piramidales de la corteza cerebral y del hipocampo de los mamíferos. Los resultados obtenidos por citofotometría, utilizando secciones de tejido teñidas por el método de Feulgen (al igual que lo hicieran Sauer y Chittenden (1959)) son controvertidos, como explicamos a continuación.

Herman y Lapham (1969) fueron los primeros en encontrar que ciertas neuronas de la corteza cerebral poseen un contenido próximo a 4C, es decir, tetraploides. Posteriormente, Bregnard y col. (1979) confirmaron estos resultados. Sin embargo, las neuronas de la médula espinal fueron encontradas diploides por Novakova y col. (1970) y Fujita (1974), y una mezcla de diploides y tetraploides por Herman y Lapham (1969). En el caso de las células de Purkinje del cerebelo, los primeros trabajos realizados en cerebelo de rata (Sandritter y col., 1967; Lenz y Lapham, 1969; Novakova y col., 1970; Bohn y Mitchell, 1976), gato (Herman y Lapham, 1968), y en cerebelo humano (Lapham, 1968), obtuvieron cantidades tetraploides de ADN. Trabajos posteriores, en alguno de los cuales usaron bien "squash" de células, o frotis de células, o preparaciones de núcleos, en lugar de secciones, no encontraron ningún núcleo tetraploide, concluyendo que todas las células de Purkinje son diploides (Cohen y col., 1973; Mann y Yates, 1973; Fujita, 1974; Manuelides y Manuelides, 1974; Mann y col., 1978; Mares y col., 1985). Otros investigadores, en cambio, han encontrado porcentajes variables de células hiperploides en una población básicamente diploide (Mares y col., 1980; Bernocchi y Sherini, 1981; Swartz y Bhatnagar, 1981). Sin embargo, las células de glía poliploides descubiertas en la capa de células de Purkinje por Lapham y Johnston (1963) han sido confirmadas en el cerebelo humano por Mann y Yates (1973). Estos investigadores encontraron una relación numérica estricta entre estas células de glía y las células de Purkinje: por cada Purkinje una octoploide, 50 tetraploides y 250 células de glía diploides.

En el caso de las células piramidales del hipocampo, Herman y Lapham (1968) obtuvieron cantidades tetraploides de ADN en el hipocampo de gato. Novakova y col. (1970) también encontraron cantidades 4C de ADN en las células piramidales del hipocampo de rata. Sin embargo, otros investigadores (artículo en ruso, citado por Mares y col., 1985) han encontrado que la mayoría de las neuronas piramidales del hipocampo de ratas jóvenes y adultas son diploides.

La lectura minuciosa de los artículos sobre contenido en ADN de células piramidales nos llevó a la conclusión de que la controversia no está resuelta (véase el apartado de discusión), y nos planteamos como objetivo de este trabajo de tesis el estudio del contenido en ADN de las células piramidales disgregadas del hipocampo de rata. El uso de células piramidales recién disociadas, con una preservación de su integridad muy superior a las células obtenidas por squash o squash más extensión, es un abordaje nuevo que, desde nuestro punto de vista, añade precisión al trabajo (véase la discusión). Pensamos que sigue siendo atractiva la hipótesis de que la complejidad estructural y funcional de determinadas neuronas y células de glía podría tener relación con cantidades extra de ADN. Ejemplos de esta relación tenemos en otros tejidos de los vertebrados, como por ejemplo el hematopoyético, en el que determinadas células, los megacariocitos (células precursoras de las plaquetas de la sangre), de gran tamaño y citoplasma de gran complejidad estructural y funcional, han resultado ser poliploides (Alberts y col., 1992). Por otra parte, la poliploidía en las células de glía del cerebelo, como dijimos anteriormente, parece ser ya un hecho. El resolver de manera fiable la controversia sobre el contenido en ADN de estas células es, pues, de gran interés.

2. OBJETIVOS E INTERES DE LOS MISMOS.

Los objetivos propuestos al comienzo del presente trabajo de Tesis Doctoral fueron:

PRIMERO. Conseguir las condiciones óptimas de disgregación celular que nos permitieran aislar lo más íntegras posible las células piramidales del hipocampo desde estadios tempranos de diferenciación hasta su maduración. Las células así disgregadas nos permitirían conseguir los objetivos tercero y cuarto.

SEGUNDO. Conseguir la semidisgregación de rodajas de hipocampo, de forma que pudiésemos estudiar "in vivo" los patrones espacial y temporal de morfogénesis en cada área del hipocampo a lo largo del desarrollo postnatal.

TERCERO. Estudiar los patrones espacial y temporal de morfogénesis de estas células, utilizando células disgregadas y rodajas semidisgregadas.

CUARTO. Medir el contenido de ADN en las células piramidales adultas disgregadas. Para conseguir este objetivo teníamos primero que determinar los tiempos y temperatura de hidrólisis óptimos para las células piramidales y las células control (leucocitos de rata y eritrocitos de pollo).

Ahondar en el conocimiento de cómo se desarrolla una porción del SNC, tan compleja estructuralmente como el hipocampo, y que participa en los procesos de memoria y aprendizaje, es de gran interés en el campo de la neurobiología del desarrollo.

La disgregación de neuronas lo más íntegras posible ha sido objeto de numerosos trabajos científicos, siendo no muy satisfactorios los resultados obtenidos hasta la fecha con las neuronas piramidales del hipocampo. El diseño experimental que

hemos empleado para el estudio de la morfogénesis de las células piramidales, mediante rodajas semidisgregadas, constituye una innovación ya aceptada (López-Gallardo y Prada, 1992) en el campo de la neurobiología del desarrollo. La obtención de neuronas aisladas, lo más íntegras posible, interesa también a los neurocientíficos dedicados al estudio de la fisiología neuronal por los modernos métodos de "patch clamp" y "voltage clamp", así como a los dedicados al campo de los trasplantes neuronales.

El determinar de manera fiable un supuesto contenido extra de ADN en las células piramidales es esencial para resolver la controversia existente en la literatura, y apoyar o rebatir la debatida idea de correlación entre contenido de ADN y complejidad estructural de determinadas neuronas. Por otra parte, el estudio del contenido en ADN de las neuronas y células de glía, es de interés, no sólo por la posible relación entre poliploidía y complejidad estructural y funcional de algunas de estas células, sino porque conociendo el contenido en ADN podemos llegar a responder una pregunta de interés general para los investigadores del desarrollo del SNC: ¿en qué momento de la interfase abandonan estas células el ciclo celular?, si en la fase G1 o en la fase G2. Un contenido 2C indica que las células abandonan el ciclo en G1. Un contenido 4C nos permitiría pensar en la posibilidad de que abandonasen el ciclo en algún momento de G2, aunque existe la posibilidad de que las células con contenidos superiores a 2C continúen sintetizando ADN después de abandonar el ciclo en G1.

3. DISEÑO EXPERIMENTAL

Para conseguir los objetivos planteados, diseñamos series correspondientes de experimentos.

A) Para obtener las condiciones óptimas de disgregación y semidisgregación celular (objetivos primero y segundo), se planificaron dos series de experimentos de disgregación enzimática.

En una serie, se trataba de variar distintos factores que afectan al resultado de la disociación, principalmente la concentración de proteasa, la temperatura y el tiempo de incubación, hasta conseguir las condiciones óptimas de disgregación; es decir, aislar las células piramidales del hipocampo lo más íntegras posible. Se utilizaron crías de rata de edades comprendidas entre el día de nacimiento (P0) y los 11 días postnatales (P11).

En otra serie de experimentos, se trataba de determinar las condiciones óptimas de semidisgregación de las rodajas de hipocampo. Se pretendía conseguir que las células quedasen ligeramente separadas, sin perder su forma ni posición relativa, permitiendo fácilmente su observación por contraste de fase. Se utilizaron crías de rata de las mismas edades que en la serie anterior.

B) Una vez obtenidas las condiciones óptimas de disgregación y semidisgregación, en otra serie de experimentos estudiaríamos la morfogénesis de las células piramidales (objetivo tercero), observando en preparaciones frescas, tanto de disgregaciones completas como de rodajas semidisgregadas, las diferentes formas de las células durante su proceso de

diferenciación. Se utilizaron hipocampos de ratas comprendidas entre P0 y P12. En el caso de las rodajas semidisgregadas, se planeó hacer el estudio de las formas en cada uno de los subcampos en que se divide el hipocampo: CA1, CA2, CA3 y CA4.

C) Para estudiar el contenido de ADN de las células piramidales (objetivo cuarto), diseñamos una serie de experimentos con ratas P10-P11. Se eligió esta edad porque es el estadio más avanzado en el que habíamos conseguido disgregaciones óptimas, y además en este estadio las células piramidales están ya diferenciadas. Planeamos determinar por citofotometría el contenido de ADN por célula piramidal, utilizando el método de Feulgen. Como células control decidimos utilizar en una serie de experimentos eritrocitos de pollo, células cuyo contenido en ADN está bien establecido, para comparar núcleos problema con núcleos 2C de otra especie; en otra serie, leucocitos de rata, para comparar los núcleos problema con núcleos 2C de la misma especie; y en una tercera serie ambos tipos celulares, para comparación de controles 2C de dos especies distintas entre sí y además con las piramidales. Las células control siempre se extendieron sobre el mismo portaobjetos que las células piramidales. Para cada uno de los pares control-problema se realizó una curva de hidrólisis completa. Todos los portas empleados en un misma curva de hidrólisis fueron sometidos al método de tinción de Feulgen el mismo día y con los mismos reactivos.

4. MATERIAL Y METODOS

4.1. MATERIAL

Material biológico

1) Los experimentos se han realizado con crías de rata (*Rattus rattus*) de distintas camadas y de edades comprendidas entre P0 y P12 y ratas adultas (varios meses de vida) de la raza Wistar procedentes del animalario de la Facultad de Medicina.

2) Pollos adultos de la raza White Leghorn (*Gallus domesticus*) estirpe Shaver, procedentes del animalario del Centro de Biología Molecular de Madrid.

Instrumentos

Entre los instrumentos principales utilizados en este trabajo están: fotomicroscopio "Zeiss", modelo Universal, estereomicroscopio "Zeiss", modelo SR, centrífuga KUBOTA 5100, microtomo SORVALL TC-2 Tissue Chopper, microdensitómetro "Vickers", modelo M-85.

Productos químicos

Se utilizó anestésico Equithesin, el cual se preparó en nuestro laboratorio, disolviendo 21,25 gr de hidrato de cloral en 49,4 ml de etanol absoluto, solución a la que se añadió en orden: 4,86 gr de pentobarbital sódico disueltos en 21 ml de agua bidestilada; 198 ml de 1,2-propilenglicol; 10,63 gr de sulfato magnésico disueltos en 50 ml de agua bidestilada; y agua bidestilada hasta completar 500 ml. El anestésico Equithesin se administró por vía intraperitoneal, en dosis de 2 ml/kg de peso.

Se utilizó una proteasa no comercializada, extraída de

Streptomyces, facilitada por Fermentaciones y Síntesis Española S.A. (FYSE), a la que nos referiremos como proteasa FYSE.

El resto de los reactivos químicos corrientes se obtuvieron a través de empresas especializadas. La mayoría de ellos fueron de la firma Merck. Las características relevantes de algunos de estos productos se describen en las secciones correspondientes.

4.2. METODOS

Condiciones de crianza y mantenimiento de las ratas

Las ratas estuvieron sometidas a ciclos de 12 horas luz/oscuridad y a una temperatura constante de 18-20 °C y con acceso libre en todo momento a agua y comida. Se tuvo un seguimiento riguroso del periodo de gestación de las ratas, mediante la realización de frotis vaginales y su observación al microscopio, al objeto de determinar con exactitud el día del nacimiento y poder seguir el desarrollo postnatal a partir de ese momento.

Método de disgregación celular en hipocampo de crías de rata P0-P11

El método se basa en el utilizado por Prada y col. (1991) para disgregar las células de la retina del pollo. Consiste en la disgregación enzimática del tejido mediante una proteasa FYSE, de actividad enzimática 24134 uA/mg. El procedimiento general utilizado se indica en el esquema de la Fig. 11.

El hipocampo se extrajo cuidadosamente según la técnica descrita por Schwartzkroin (1981). Se realizaron manualmente (con bisturí) rodajas finas, las cuales se trocearon muy finamente en 200 µl de una solución de sacarosa al 10,26% en agua destilada. A continuación se incubó el tejido en una solución que contenía proteasa (4,2-17,4 mgr/ml $\times 10^{-3}$), sacarosa (10,26%) y agua

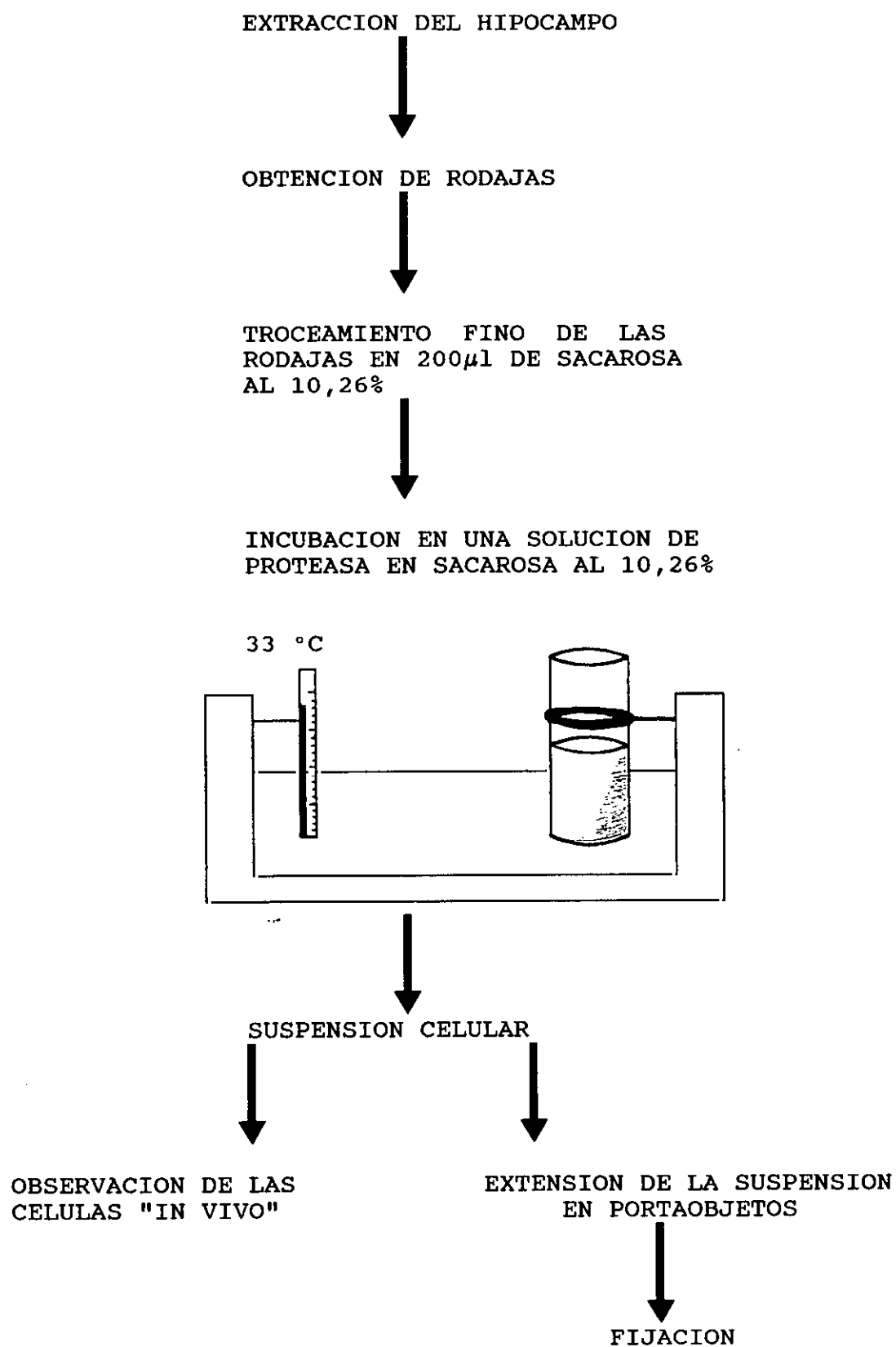


Figura 11. Esquema del método de disgregación celular.

destilada. Debido a la inestabilidad de la proteasa en solución acuosa, cada día de experimentación se realizó una solución stock con 1 mg de proteasa y 2,4 ml de solución de sacarosa al 10,26% en agua, de la cual se tomaban alícuotas para obtener la solución de incubación. La concentración de proteasa usada varió en función del estadio de desarrollo del animal. Cada 5 minutos y con una punta de micropipeta de boca ancha, se ayudó mecánicamente, pasando lentamente 5 a 10 veces la solución de incubación a través de la misma. La temperatura de incubación fue siempre de 33°C. El proceso de disgregación fue seguido visualmente a intervalos de 10 minutos en microscopía de contraste de fase. La digestión fue detenida entre los 30 y 45 minutos de incubación, según la cantidad de tejido digerido, añadiendo un volumen de sacarosa igual al existente en el tubo de incubación y dejando la solución a temperatura ambiente.

La suspensión celular así obtenida se utilizó durante las 2 horas siguientes para el estudio de las formas de las células piramidales. Para la determinación del contenido de ADN, al finalizar la digestión se hizo extensión de la suspensión celular sobre portaobjetos, y las extensiones fueron procesadas por el método de Feulgen, como se indica más adelante.

Los dibujos de células jóvenes y de células piramidales diferenciadas se realizaron a 25x, utilizando cámara lúcida. Las fotografías se tomaron con película Kodacolor Gold 100 ASA a 25x o con Kodak T-MAX 400 ASA a 25x para las fotos en blanco y negro.

Obtención de rodajas semidisgregadas de hipocampo de crías de rata P0-P12

Las rodajas las realizamos por el método desarrollado por Schwartzkroin (1981) para obtener rodajas de hipocampo de cualquier especie de animal. Brevemente, las crías de rata eran decapitadas, y sus cabezas introducidas en Krebs (NaCl 120 mM, KCl 3mM, MgCl₂ 1,2mM, NaHCO₃ 25mM, D-glucosa 11mM, CaCl₂ 2,5mM; a pH 7,3) burbujeado con 95% de aire y 5% de CO₂. El hipocampo era

extraído con ayuda de una pequeña espátula y se situaba en el microtomo sobre una base de agar, orientándolo convenientemente con respecto a la cuchilla para obtener cortes transversales. Las rodajas, entre 50-100 μm de grosor, eran recogidas con un pincel y colocadas en solución de Krebs oxigenado. Después eran transferidas también mediante pincel a la solución de sacarosa al 10,26% en agua para su lavado, y a continuación, con ayuda de una pipeta Pasteur y utilizando como extremo de succión el de diámetro mayor, se transferían al tubo de incubación que contenía la solución de proteasa. Esta solución era realizada de la misma manera que explicamos en el apartado anterior, pero utilizando concentraciones entre 5,2 y 20,8 mgr/ml $\times 10^{-3}$, según el estadio de desarrollo del animal.

El tiempo de incubación osciló entre 20 minutos (los 10 primeros minutos a 33°C y el resto del tiempo a temperatura ambiente), y 30 minutos (los 15 primeros a 33°C y el resto a temperatura ambiente), también en función de la edad del animal. Las rodajas semidisgregadas se depositaron sobre un portaobjetos, con pequeñas gotas de la solución de incubación, para su estudio en microscopía de contraste de fase.

Los dibujos de las rodajas y de las células de interés se realizaron a 2,5x y 25x. Las fotografías fueron tomadas con película Kodak T-MAX 400 ASA a 25x y a 16x.

Preparación de las extensiones celulares y tinción de Feulgen

Sobre las tres cuartas partes de portaobjetos gelatinados, se extendieron las células disociadas del hipocampo de rata de 11 días postnatal, y sobre el tercio restante se extendieron las células control: eritrocitos de pollo y/o leucocitos de rata. Se hicieron tres tipos de extensiones: células piramidales con eritrocitos de pollo, células piramidales con leucocitos de rata, y células piramidales con eritrocitos de pollo y leucocitos de rata. Para realizar la extensión de

eritrocitos de pollo adulto (2 semanas) se sacrificó al animal por decapitación y se recogió la sangre en un tubo heparinizado. Inmediatamente se tomó una gota de sangre y se extendió sobre el portaobjetos. Para obtener los leucocitos de rata adulta (2-3 meses), realizamos una extracción de sangre al animal anestesiado, recogiénola en un tubo heparinizado. Después la sangre se centrifugó a baja velocidad (2000 rpm) durante 10 minutos, y con una micropipeta se tomó cuidadosamente la banda correspondiente a las células blancas de la sangre. A continuación, se resuspendió el volumen de células obtenido en doble cantidad de suero salino fisiológico glucosado (ClNa glucosa anhidra, 5 g; agua para inyección c.p.s., 100ml). Se tomaron gotas de la solución y se extendieron sobre los portaobjetos.

Las extensiones sobre portaobjetos se secaron rápidamente y se dejaron a temperatura ambiente (19-22°C) 1-2 horas; a continuación se fijaron en etanol 100%-ácido acético glacial (3:1), durante tres cuartos de hora, seguido de tres lavados de 15 minutos en agua destilada. Se dejaron secar y se conservaron a temperatura ambiente hasta el momento de realizar la tinción de Feulgen.

El método de tinción de Feulgen consiste en hidrólisis parcial ácida del ADN, bien con HCl 5N a temperatura ambiente, o con HCl 1N a 60°C, seguida de reacción con la base de Schiff. El reactivo de Schiff, fucsina básica decolorada con anhídrido sulfuroso, reacciona con los grupos aldehídos libres y genera una macromolécula coloreada insoluble, la cual queda unida covalentemente al ADN. (Fig. 12). La reacción es estequiométrica y específica. Esto último se evidencia por la ausencia de tinción cuando a las células se las trata con ADNsas antes de comenzar el protocolo de tinción. En nuestras hidrólisis hemos preferido utilizar ClH 5N a temperatura ambiente, en base a los trabajos que demuestran que en estas condiciones las medidas de contenido

de ADN en células animales son más fiables que cuando se hidroliza con ClH 1N a 60°C (Decosse y Aiello, 1966).

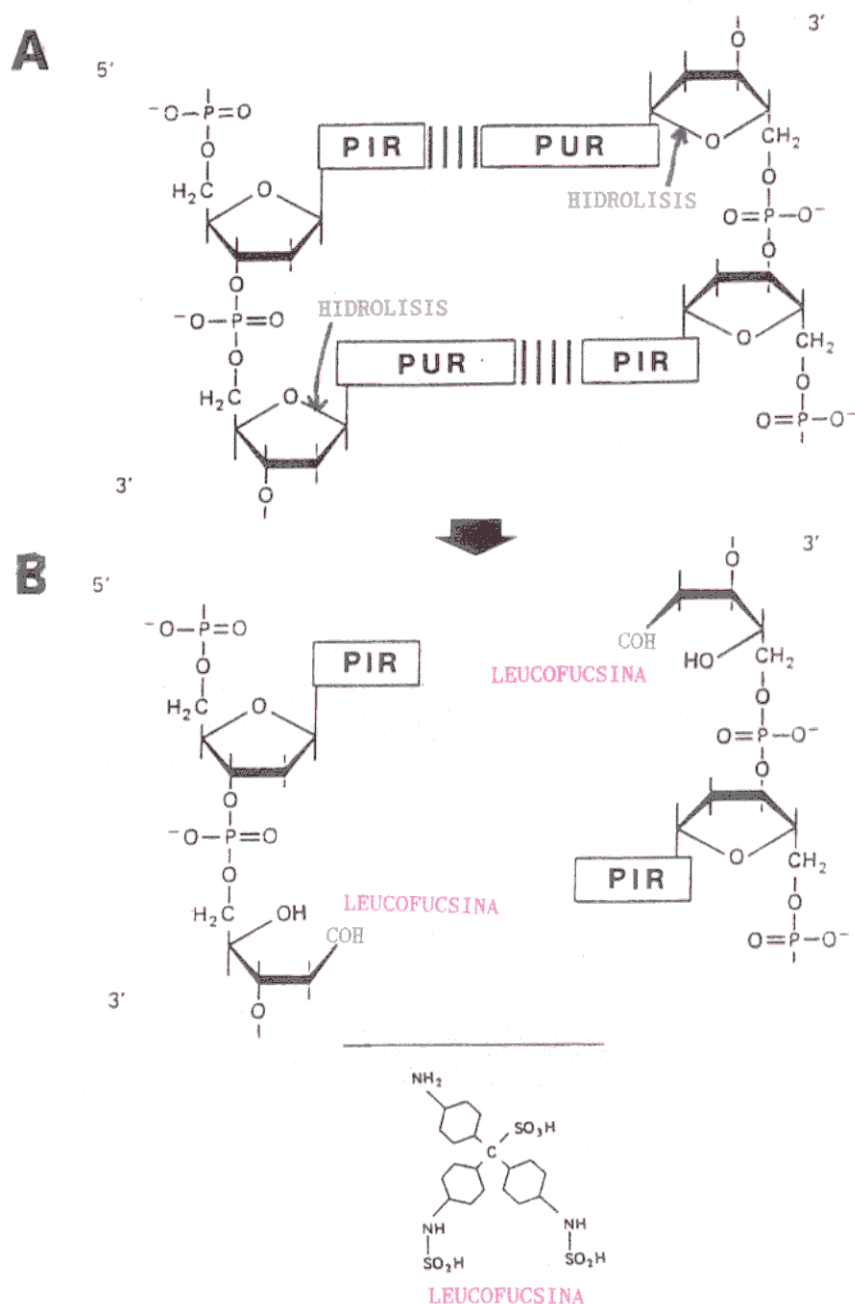


Figura 12. Reacciones que tienen lugar en el núcleo de la célula al realizar la tinción de Feulgen. A, muestra el lugar de hidrólisis sobre las desoxirribosas unidas a las purinas. B, muestra el resultado de la hidrólisis y lugar de unión de la leucofucsina. Azul, grupos aldehído libres, pir, pirimidina; pur, purina.

Se realizó una curva de hidrólisis para cada tipo de extensión a tiempos y temperatura determinados experimentalmente,

como veremos en el apartado de resultados. Para ello, se rehidrataron las extensiones con agua destilada durante 15 minutos previamente a la hidrólisis; después de la hidrólisis se realizaron tres lavados de 15 minutos cada uno en agua destilada fría (4 °C), e inmediatamente se aplicó el reactivo de Schiff al 1%, preparado según el método de Lillie (tomado de Martoja, 1970), durante 2,5 horas en cámara húmeda y temperatura ambiente. A continuación se lavaron tres veces (2 minutos cada) en agua sulfurosa (5 ml de ClH 1N y 5 ml de metabisulfito sódico 10% en 90 ml de agua destilada) preparada en el momento de su utilización, y se les dió un lavado final en agua destilada de 15 minutos. Las extensiones se dejaron secar a temperatura ambiente y se almacenaron en oscuridad hasta la valoración de su contenido en ADN. En el momento de hacer la lectura del ADN las extensiones se montaron provisionalmente, utilizando agua destilada y colocando un cubreobjetos, el cual se selló al portaobjetos mediante laca de uñas.

Las lecturas del contenido de ADN se realizaron con un microdensitómetro integrador Vickers M-85. Se utilizó un objetivo de 100x, con máscaras que delimitan un campo entre 10 y 30 micras de diámetro, luz de 550 nm de longitud de onda, con una anchura de banda de 30 nm (de 520 a 580 nm) y utilizando un ojo lector ("spot") de 0,4 micras de diámetro. Se eligieron núcleos al azar, recorriendo el porta ordenadamente, y aplicamos para cada lectura los siguientes criterios: 1) comprobación de que el núcleo elegido correspondía a una célula piramidal inequívocamente identificada; 2) selección de la máscara de tamaño adecuado al núcleo; 3) ajuste de la transmitancia a 100% colocando el ojo lector fuera del núcleo, pero dentro del campo delimitado por la máscara; 4) comprobación de los blancos, midiendo la transmitancia sobre el citoplasma celular y fuera de las células, sobre el porta mismo; 5) cada lectura se obtuvo hallando la media de dos lecturas del mismo núcleo.

Un mínimo de 35 células control y 45 células piramidales fueron medidas por cada portaobjetos estudiado. La lecturas integradas que nos proporciona el microdensitómetro, es el contenido en ADN en Unidades Arbitrarias (UA). Los valores absolutos de ADN expresados en picogramos (pg) que se muestran en los resultados para las células piramidales, se obtuvieron calculándolos a partir de los valores absolutos de contenido en ADN, ya conocidos, de las células diploides utilizadas como control 2C: 1,7-3,1 para los eritrocitos de pollo (Fasman, 1976) y 6,1-6,7 pg para los leucocitos de rata (Fasman, 1976).

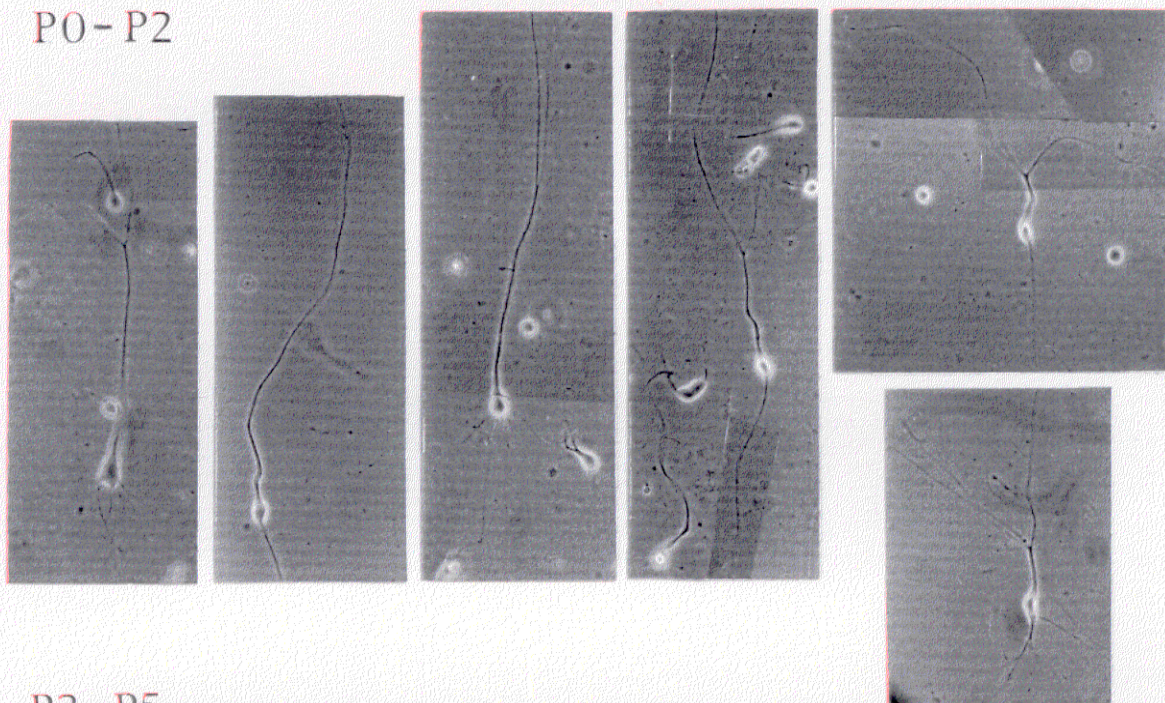
5. RESULTADOS

5.1. PUESTA A PUNTO DE UN NUEVO METODO PARA LA DISGREGACION CELULAR DEL HIPOCAMPO DE RATA

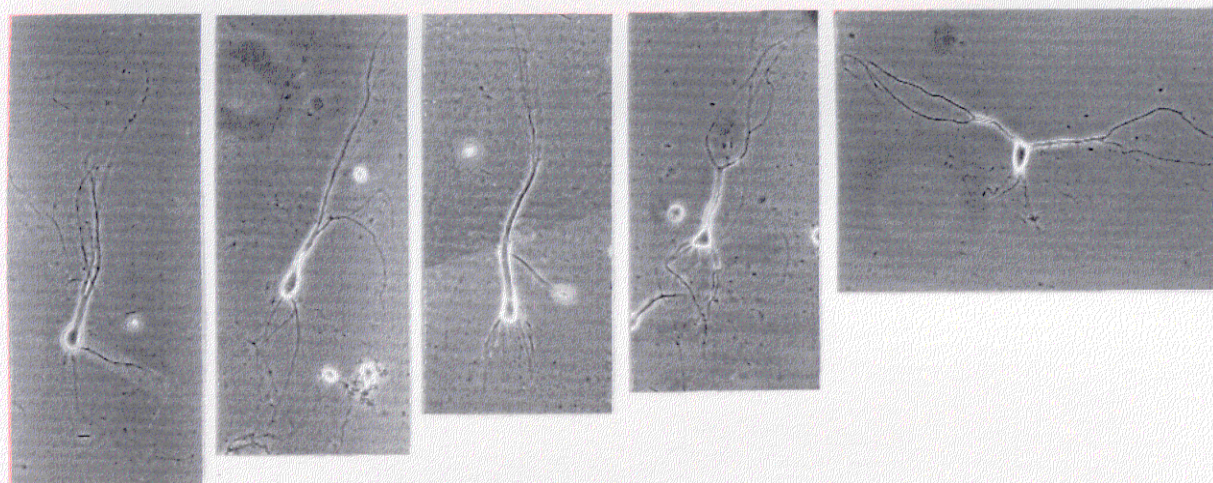
La experiencia obtenida previamente en nuestro laboratorio con la proteasa FYSE, en la disgregación de retina y cerebelo de pollo y rata, nos indicó que es necesario establecer las condiciones óptimas de disociación para cada tipo de tejido nervioso. La relación masa de tejido/volumen total del medio de incubación, y la concentración de proteasa, se revelaron como factores críticos que varían en función del estadio de desarrollo. Por ello, tuvimos que realizar numerosos experimentos para conseguir las condiciones óptimas de disgregación de las células piramidales del hipocampo de rata: un total de 139 experimentos con animales de edades comprendidas entre los días postnatales 0 y 11 (P0-P11). Elegimos comenzar en P0 porque nuestro objetivo era disgregar las células durante el periodo de morfogénesis en el que las células piramidales han emigrado, y están ya en su capa correspondiente, comenzando a transformarse para adquirir su forma adulta. Dado que en E19 termina la neurogénesis, en P0 las células piramidales estarían comenzando su morfogénesis. En P11 encontramos la morfología prácticamente adulta.

Determinamos como experimentos óptimos aquellos en los que obtuvimos el mayor número de células piramidales morfológicamente bien preservadas (ejemplos en Fig 13), sin signos de vacuolización, viables y un tiempo de supervivencia máximo.

P0 - P2



P3 - P5



P6 - P11

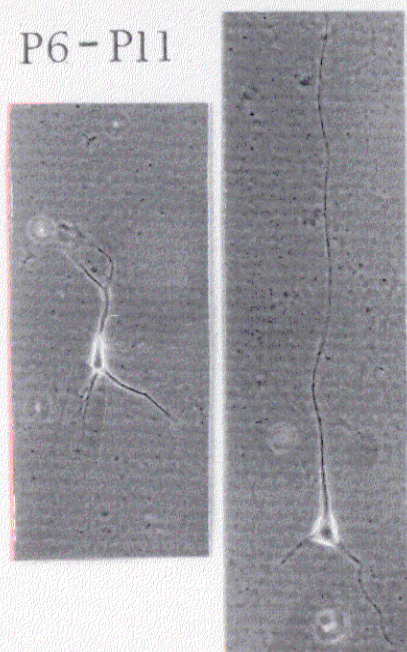


Figura 13. Ejemplos de algunas células piramidales disgregadas obtenidas en experimentos óptimos con ratas de distintos estadios. 237x.

En todos los estadios, la mayoría de las células morfológicamente bien preservadas sobrevivieron en el medio de disgregación y a temperatura ambiente durante al menos dos horas. Las células de los estadios más jóvenes (P0-P5) se disgregan más fácilmente, salen con más prolongaciones y más largas, y sobreviven más tiempo en el medio de disgregación (hasta 3h y media) que las de los estadios más avanzados.

En la Tabla I se muestra el número de experimentos realizados para cada estadio, así como la relación masa de tejido/volumen de incubación (M/V) y la concentración de proteasa encontradas como óptimas en cada estadio del desarrollo. La concentración de proteasa aumenta ligeramente de P0 a P1, se mantiene entre P1 y P3 y se duplica entre P3 y P5. Entre P6 y P7, la diferencia de concentraciones es máxima ($5,2 \text{ mg/ml} \times 10^{-3}$), y entre P7 y P10 la concentración se mantiene, hasta P11, estadio en el que es necesario un ligero aumento para obtener células bien preservadas. Por lo tanto, la concentración de proteasa aumenta con el estadio de desarrollo, y presenta los máximos incrementos entre los estadios P3/P4, P4/P5, y P6/P7.

La variación de la concentración de proteasa en función del estadio del desarrollo, es un resultado que diferencia nuestro método de disgregación de los utilizados hasta ahora para disgregar SNC con otras proteasas, en los cuales la concentración usada para disgregar tejido embrionario es la misma que para tejido adulto. Las concentraciones óptimas de proteasa utilizadas en nuestros experimentos, $4,2-17,4 \text{ mg/ml} \times 10^{-3}$, contrastan con las de las otras proteasas. Todas ellas, ya sea tripsina, colagenasas, pronasa, o papaína, se utilizan a concentraciones alrededor de 1 mg/ml (Waymouth, 1974). Por lo tanto, nosotros utilizamos concentraciones entre 50 y 200 veces menores lo cual pone de manifiesto la gran actividad proteolítica de la proteasa FYSE. Determinados experimentos demostraron que la adición de $4 \text{ mg/ml} \times 10^{-3}$ de proteasa a una solución de incubación que

contenía la concentración óptima resultó en la destrucción total de tejido P2 en pocos minutos.

Estadio	N	Experimento óptimo		Incremento [proteasa]
		M/V	[Proteasa]	
P0	4	4H/800	4,2	1,0
P1	7	4H/800	5,2	0
P2	10	4H/800	5,2	0
P3	9	4H/800	5,2	2,6
P4	7	3H/800	7,8	2,6
P5	13	2H/800	10,4	0
P6	8	2H/800	10,4	5,2
P7	14	2H/800	15,6	0
P8	13	2H/800	15,6	0
P9	15	2H/1200	15,6	0
P10	13	2H/1200	15,6	1,8
P11	24	2H/1200	17,4	

Tabla I. Número de experimentos realizados por cada estadio de desarrollo y condiciones óptimas de disgregación de las células piramidales del hipocampo de rata. Columnas de izquierda a derecha: Estadio, en días postnatales (P); N, número de experimentos; M/V expresa la relación masa de tejido (número de hipocampos-H-) por volumen (en microlitros) del medio de incubación; la concentración de proteasa está referida a $\text{ng/ml} \times 10^{-3}$, en las columnas última y penúltima de la derecha; el tiempo de incubación varió entre 30 y 45 minutos a temperatura de 33°C.

La relación M/V también varió en relación al estadio. Entre P3 y P5 hubo que disminuir la cantidad de tejido, y entre P8 y P9 aumentamos el volumen de la solución de incubación, para obtener disgregación total del tejido, y una densidad de células tal que permitiese fácilmente la observación de las mismas al colocar una alícuota de 30-50 μl de la suspensión celular entre porta y cubre.

En la Tabla II se muestra el porcentaje de células piramidales bien preservadas morfológicamente ("íntegras") respecto al total de células piramidales disgregadas.

EDAD	PIRAMIDALES BIEN PRESERVADAS	PIRAMIDALES DAÑADAS	TOTAL DE PIRAMIDALES	PIRAMIDALES "íntegras"/ totales
P0	442	135	577	77%
P1	425	152	577	73%
P2	441	136	577	76%
P3	379	198	577	66%
P4	401	176	577	69%
P5	420	157	577	73%
P6	414	163	577	72%
P7	412	165	577	71%
P8	397	180	577	69%
P9	390	187	577	67%
P10	387	190	577	67%
P11	352	225	577	61%

Tabla II. Evaluación de la eficacia del método en porcentaje de células piramidales que se disgregan bien preservadas respecto al total de piramidales disgregadas. Los conteos se han realizado al menos en cuatro animales distintos por cada estadio.

La evaluación se realizó en cada estadio eligiendo al azar 6-10 campos ópticos; en cada campo se contó el número de células piramidales bien preservadas morfológicamente y de aspecto saludable (sin vacuolización y con soma refringente en contraste de fase) y el número de células piramidales dañadas. Consideramos células piramidales bien preservadas aquellas que presentaban dendrita apical más o menos larga, con más o menos ramificaciones (en los estadios muy jóvenes las ramificaciones son escasas) y axón, o dendritas basales, o ambos. Se consideraron células piramidales dañadas, no sólo aquellas con un

soma claramente deteriorado, sino también las células con somas de aspecto saludable reconocibles como piramidales, tuviesen axón o no, pero sin dendrita apical.

El estudio de la viabilidad de las células, por el método de exclusión del azul de tripano, realizado inmediatamente después de terminar la incubación, demuestra que en las disgregaciones óptimas el 100% de las células piramidales morfológicamente bien preservadas y con buena apariencia, excluyen el azul de tripano, es decir, son células vivas. El 92-98% de las células consideradas como dañadas excluyen también el colorante. Las células que lo incorporan (entre el 2-7%), en número considerable presentan mal aspecto, son oscuras y no refringentes, y muchas en claro estado de vacuolización. Obviamente el índice de viabilidad disminuye con el tiempo después de la disgregación si las células no son cambiadas de medio.

El número medio de células piramidales morfológicamente bien preservadas, muchas con sus prolongaciones más finas, que se extraen en nuestras condiciones es de aproximadamente 120.000 por hipocampo de rata P7 (evaluaciones realizadas a los 20 minutos de incubación). A los 30 minutos de incubación el número de piramidales es mayor, pero disminuye el número de células "íntegras", debido obviamente a la ayuda mecánica y a la mayor exposición a la digestión enzimática. En estadíos anteriores a P7 el número de células que se obtiene es muy superior y desde P8 a P11 es inferior.

La suspensión celular obtenida con nuestro método de disgregación no sólo contiene células piramidales bien preservadas, sino que también contiene neuronas de otras capas del hipocampo, células de glía, y células granulares del giro dentado. En la Fig 14 mostramos fotografías de algunas de estas células. Sin embargo, las concentraciones de proteasa indicadas en la Tabla I son las óptimas para obtener el número máximo de

células piramidales viables y bien preservadas morfológicamente. No son, sin embargo, las adecuadas para disgregar de forma óptima las otras poblaciones celulares del hipocampo. Los experimentos realizados en un rango de concentraciones para determinar la óptima, nos enseñaron que, por ejemplo, concentraciones más elevadas de proteasa entre P0 y P5 proporcionan mayor número de células de glía, pero las células piramidales salen más dañadas. En cambio, las concentraciones de la Tabla I son también adecuadas para obtener gran cantidad de glía en P9. Por lo tanto, usando la proteasa FYSE es necesario adecuar las concentraciones al tipo de célula que se desea disgregar, en cada estadio.

En resumen, hemos puesto a punto un nuevo método para disgregar el hipocampo de rata, con el que se extraen con gran eficacia las células piramidales en diferenciación, viables, y con un alto grado de preservación morfológica, de los estadios P0-P11.

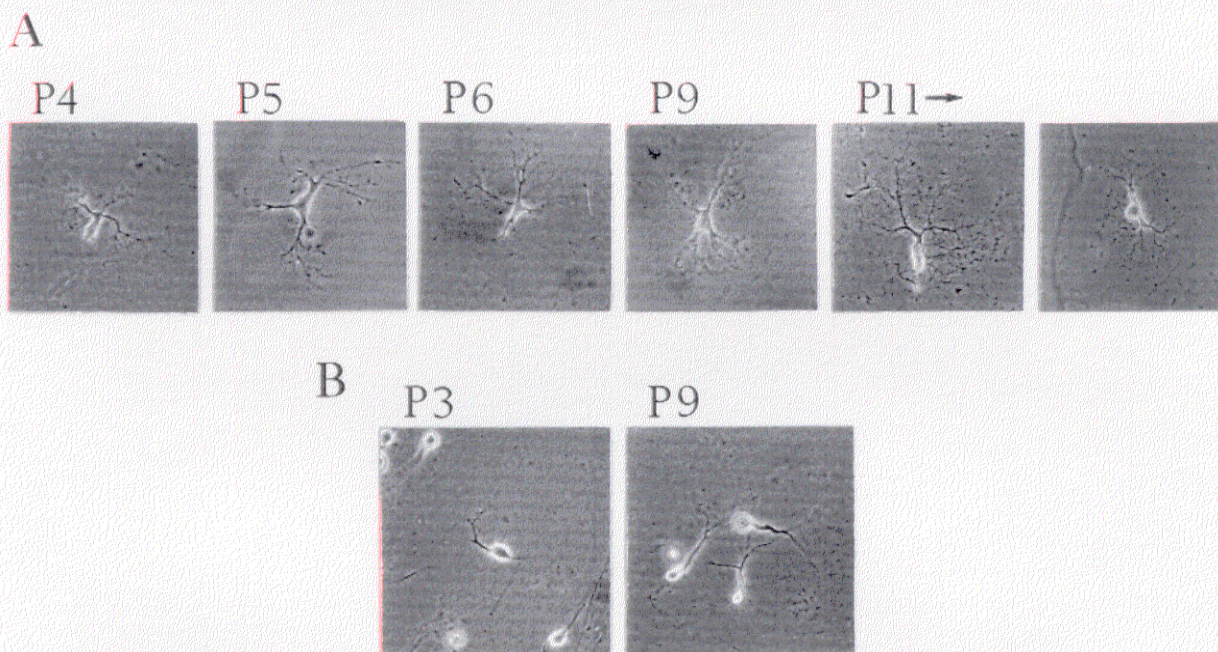


Figura 14. Ejemplos de células no piramidales, disgregadas del hipocampo y giro dentado. A: células supuestamente de glía del hipocampo y giro dentado de diferentes estadios. B: células granulares del giro dentado de diferentes estadios. Compárese el tamaño y forma de estas células con las células piramidales mostradas en la Fig. 13. 237x.

5.2. PUESTA A PUNTO DE UN METODO DE SEMIDISGREGACION DE RODAJAS DE HIPOCAMPO DE RATA

La observación al microscopio óptico de pequeños pedazos de tejido, durante el seguimiento de las disgregaciones, demostró que la proteasa FYSE separa las células unas de otras sin romperlas, de modo que el tejido pasa durante la incubación por un estado de semidisgregación. La distancia entre las células va incrementando sin perder su forma ni su posición relativa. Esto nos hizo pensar en la posibilidad de encontrar el método de conseguir un grado de semidisgregación adecuado para estudiar la morfogénesis de las células piramidales en las rodajas.

Se realizaron una serie de experimentos empezando en P0 con la concentración óptima determinada en los experimentos de disgregación celular. Enseguida supimos que, a partir de P3, era necesario subir la concentración de proteasa.

En total realizamos 81 experimentos con animales de edades comprendidas entre P1 y P12. Encontramos que la concentración óptima de proteasa varía de 5,2 a 20,8 mg/ml $\times 10^{-3}$ (Tabla III) en función del estadio de desarrollo. De P1 a P3 la concentración idónea es de $5,2 \times 10^{-3}$; en P4 y P5 es necesario aumentarla a $10,4 \times 10^{-3}$ y $15,6 \times 10^{-3}$ respectivamente; durante P6-P8 no varía, y de P9 a P12 incrementa la concentración a $20,8 \times 10^{-3}$.

Si se comparan los resultados de los experimentos de semidisgregación (Tabla III) con los obtenidos en los experimentos de disgregación total (Tabla I), se observa que hasta P3 las concentraciones podemos decir que son las mismas, mientras que de P4 a P6 las concentraciones óptimas para semidisgregar son superiores a las requeridas para llegar a la disgregación completa. En los estadios P7 y P8 se igualan las concentraciones, y de P9 a P12 son mayores las concentraciones empleadas en las semidisgregaciones.

Estadio	N	Experimento óptimo	
		M/V	[Proteasa]
P1	8	4H/400	5,2
P2	6	4H/400	5,2
P3	9	2H/400	5,2
P4	5	2H/400	10,4
P5	7	2H/400	15,6
P6	5	2H/400	15,6
P7	7	2H/400	15,6
P8	9	2H/400	15,6
P9	5	2H/1000	20,8
P10	5	2H/1200	20,8
P11	6	2H/1200	20,8
P12	8	2H/1200	20,8

Tabla III. Número de experimentos realizados por cada estadio del desarrollo y condiciones óptimas condiciones óptimas de semidisgregación de rodajas del hipocampo de rata. Columnas de izquierda a derecha: Estadio, días postnatales (P); N, número de experimentos; M/V expresa la relación masa de tejido (número de hipocampos-H-) por volumen (en microlitros) del medio de incubación; la concentración de proteasa está referida en mgr/ml $\times 10^{-3}$ en la última columna de la derecha. El tiempo de incubación varió entre 20 y 30 minutos a temperatura de 33°C.

La semidisgregación del tejido requiere una penetración de la proteasa en el mismo encaminada a digerirlo parcialmente, por lo que teóricamente se necesitaría una concentración de proteasa menor o igual que la empleada en disgregación completa. Sin embargo, al no trocear las rodajas ni ayudarlas mecánicamente en el proceso de semidisgregación, en los estadios en los que la matriz extracelular es más densa (sería a partir de P4), parece lógico que las concentraciones usadas para disgregar completamente pequeños trozos de rodaja resulten insuficientes

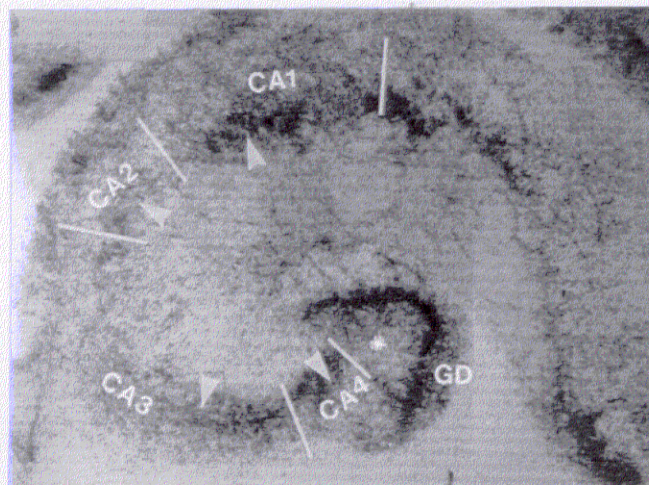
para semidisgregar rodajas de 50-100 μ m. Por otro lado, para conseguir un cierto grado de disgregación en un periodo de tiempo lo más corto posible (20-30 minutos en semidisgregación frente a 30-45 minutos en disgregación), parece también lógico que cuando la matriz extracelular es más densa se necesite mayor o igual concentración de proteasa que la empleada en disgregación.

En la Fig 15 mostramos a pocos aumentos una rodaja semidisgregada de rata de 1 día de vida (A) en la que puede observarse cómo el estado de semidisgregación conseguido, mostrado a mayores aumentos en B, sigue permitiendo identificar las regiones de la formación hipocampal, así como las áreas del hipocampo. En B se pueden observar células piramidales bien preservadas muchas con prolongación de la dendrita apical espectacularmente largas, y también células deterioradas. Estas últimas son inevitables, debido por una parte al proceso de corte del tejido, y entre otras causas a que el simple peso del cubre estará incrementando el deterioro de las células superficiales, más dañadas por la mayor concentración de proteasa utilizada. Otro factor que hemos encontrado como acelerante del deterioro celular es la cantidad de medio con el que se coloca la rodaja entre el porta y el cubre. Si el cubre se coloca directamente encima de la rodaja, o se pone menos medio del adecuado, las células se deterioran más rápidamente que cuando se pone una cantidad de medio adecuada. Debido a la disposición tridimensional del árbol dendrítico apical, no se puede fotografiar la célula completa en un sólo plano de enfoque con un microscopio óptico corriente (no confocal) como del que disponemos, razón por la cual se ha recurrido a los dibujos a cámara lúcida para ilustrar los resultados de morfogénesis, como veremos en el apartado correspondiente.

En resumen, hemos puesto a punto un método por el que se obtienen rodajas semidisgregadas de la formación hipocampal desde los estadios P0 a P12, en las cuales se puede observar la

forma completa de las células piramidales de las distintas áreas del hipocampo, así como células de otros strata del hipocampo y del giro dentado.

A



B

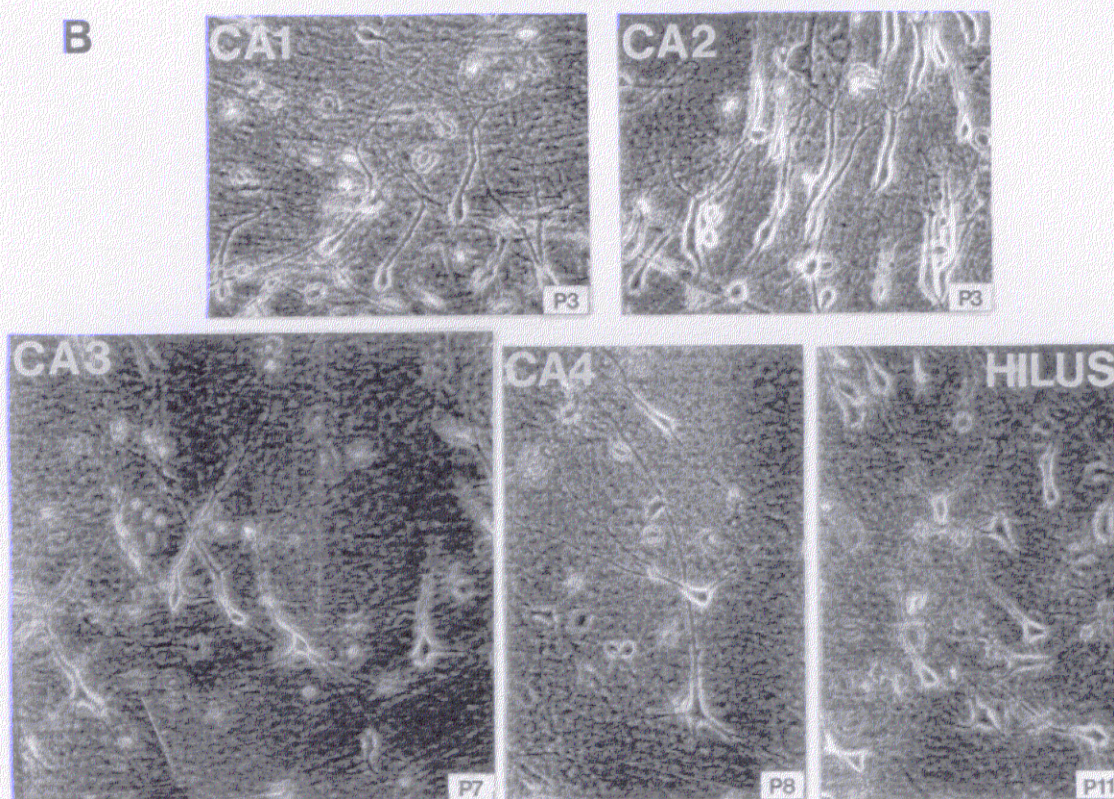


Figura 15. A, rodaja de P1 semidisgregada; CA1, CA2, CA3, CA4, áreas del hipocampo; las cabezas de flecha, marcan la posición aproximada de la que se han tomado los campos mostrados en B de distintas rodajas; el asterisco señala el hilus; GD, giro dentado. 95x. B, vista a mayor aumento (237x) de campos observados en las distintas áreas del hipocampo e hilus del giro dentado de rodajas semidisgregadas de diversos estadios.

5.3. PATRONES ESPACIAL Y TEMPORAL DE MORFOGENESIS DE LAS CELULAS PIRAMIDALES

La morfogénesis de las células piramidales se ha estudiado en células disgregadas y rodajas semidisgregadas. Nos propusimos con este estudio responder a dos preguntas: 1) ¿cómo se transforma una célula bipolar sencilla, inicialmente con dos prolongaciones (una de las cuales es el axón y la otra es la que dará origen al árbol dendrítico apical (Stensaas, 1967 a-f)), en una célula tan compleja como es la piramidal adulta, con dos árboles dendríticos opuestos, uno apical y otro basal?, 2) ¿se diferencian simultáneamente todas las células piramidales del hipocampo, o por el contrario existe algún gradiente similar, o diferente, a los de comienzo y terminación de la neurogénesis?.

En los primeros experimentos de disgregación observamos una variedad de formas, supuestas células piramidales, en todos los estadios desde P0 a P11, que ya nos indicó que la diferenciación de estas células no era un proceso que ocurriese sincrónicamente en todo el hipocampo, porque si así fuese tendríamos una única morfología en cada estadio.

La Fig 16 muestra la variedad de formas encontradas en los estadios P0, P4, P8 y P11, a modo de ejemplo. Determinadas formas, como las marcadas con un asterisco en la figura, eran fácilmente identificadas como células piramidales, por su soma triangular, su prolongación apical más o menos ramificada, sus prolongaciones basales, y porque algunas de ellas además se disgregan con el axón. En los estadios más jóvenes, P0-P2, las formas bipolares más sencillas, como la señalada con una flecha (P0), podrían ser identificadas como las formas más simples que sabemos que adoptan las células piramidales inmediatamente después de abandonar el ciclo; pero podrían ser también neuroblastos de los múltiples tipos de células del *stratum oriens*

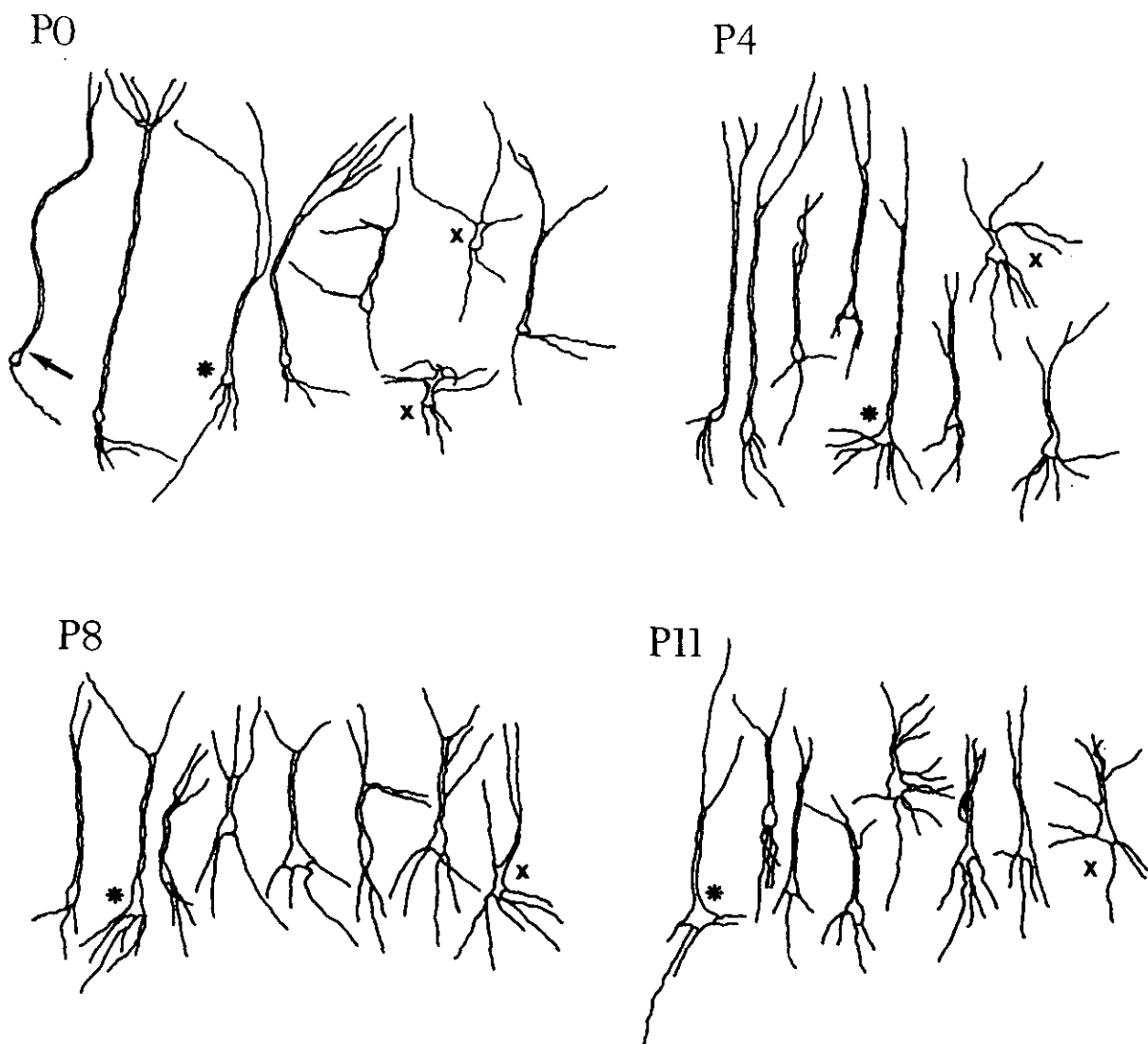


Figura 16. Muestra representativa de la variedad de formas de células piramidales observadas en disgregados de diversos estadios, dibujadas a cámara lúcida. 150x. La flecha señala una forma bipolar simple, adoptada por las células inmediatamente después de abandonar el ciclo celular. El asterisco señala células claramente identificables como piramidales. Las células señaladas con x son las formas llamadas "complejas" en el texto, menos parecidas a las típicas piramidales (las no marcadas).

(capa infrapiramidal) o del *stratum radiatum* (capa suprapiramidal), de cuya morfogénesis prácticamente nada se sabe. Las formas más complejas y sin parecido con las formas clásicamente conocidas de las células piramidales, como las marcadas con una x, no era posible saber si correspondían 1) al *stratum pyramidale* del hipocampo, 2) a capas diferentes al

stratum pyramidale, o 3) al giro dentado, cuyas células estaban también en los disgregados, puesto que éste no era separado del hipocampo por la dificultad de aislarlo. En los estadios más avanzados, P10-P11, las formas complejas sin mucho parecido con las células piramidales (también marcadas con una x por su similitud con las obtenidas en los estadios anteriores) tampoco podíamos identificarlas. Por lo tanto, en un primer estudio sólo pudimos saber que la morfogénesis de las células piramidales no ocurre de manera sincrónica en el hipocampo, y que termina hacia P11, puesto que en este estadio encontramos mayoría de formas claramente de células piramidales, con abundantes prolongaciones basales, y además ya no encontrábamos las formas más simples observadas en estadios anteriores.

La observación en rodajas semidisgregadas de cientos de células de cada área del hipocampo y del giro dentado, en cada estadio, nos permitió distinguir las formas de las células granulares jóvenes de las de las células piramidales, y conocer la distribución en el hipocampo de las formas obtenidas por disgregación. Hicimos un estudio sistemático en cada estadio, consistente en dibujar 30 células de cada área del hipocampo elegidas aleatoriamente; así reconstruimos múltiples pedazos de cada área. El análisis de las formas celulares en cada área y la comparación de los pedazos reconstruidos de cada área a lo largo del periodo de morfogénesis, nos ha proporcionado una visión dinámica no sólo de cómo se diferencia cada célula piramidal, sino también de cómo lo hacen el conjunto de células de cada área.

La presentación de resultados relativos a procesos biológicos que cambian en el espacio y en el tiempo resulta difícil, siendo éste el caso de la morfogénesis de las células piramidales. Por ésto mostramos los resultados de la manera más gráfica posible, mediante dibujos y microfotografías, para restar subjetividad a la presentación de los mismos. Debido a la

celeridad con que hay que actuar a la hora de dibujar muchas células antes del deterioro de las preparaciones en fresco, en general las células de los dibujos presentan menos prolongaciones y bastante más cortas de lo que se puede apreciar en las fotografías.

La observación de rodajas de los estadios P0-P2 (Fig. 17), evidenció que: 1) todas las formas observadas previamente en los disgregados del mismo estadio, supuestamente células piramidales, están realmente en la capa piramidal del hipocampo y están mezcladas en cada una de las áreas (en los dibujos, sin embargo, las hemos ordenado con criterio que explicamos más adelante), 2) desde CA1 a CA3 las células están colocadas en disposición paralela, pero en cambio en CA4 tienen una disposición aleatoria (no representada en el dibujo correspondiente), 3) existe un gradiente de distribución de formas de CA1 a CA4 que explicamos a continuación. Las formas bipolares más simples (I, formas 1 y 2) con la prolongación apical sin ramificaciones, o con pocas prolongaciones en su extremo distal, y sin prolongaciones o pocas prolongaciones saliendo del polo basal del soma, son las predominantes en CA1 y se aprecia claramente una disminución desde CA1 a CA3 (obsérvense las prolongaciones apicales de las células de la Fig IIa, respecto a las de las Figs. IIb-d), siendo difícil encontrarlas en CA4. En cambio, las formas complejas (I, formas 4), caracterizadas unas por presentar una prolongación apical muy corta (o casi inexistente), de la que salen numerosas ramificaciones y otras por tener un soma irregular del que salen todo alrededor prolongaciones (flechas), son mayoritarias en CA4 y disminuyen hacia CA1.

Estudiando las formas dibujadas de cada una de las áreas CA1, CA2 y CA3, vimos que era posible ordenarlas en una secuencia lógica de progresiva transformación de las formas bipolares sencillas (formas 1) en células piramidales típicas (formas 3).

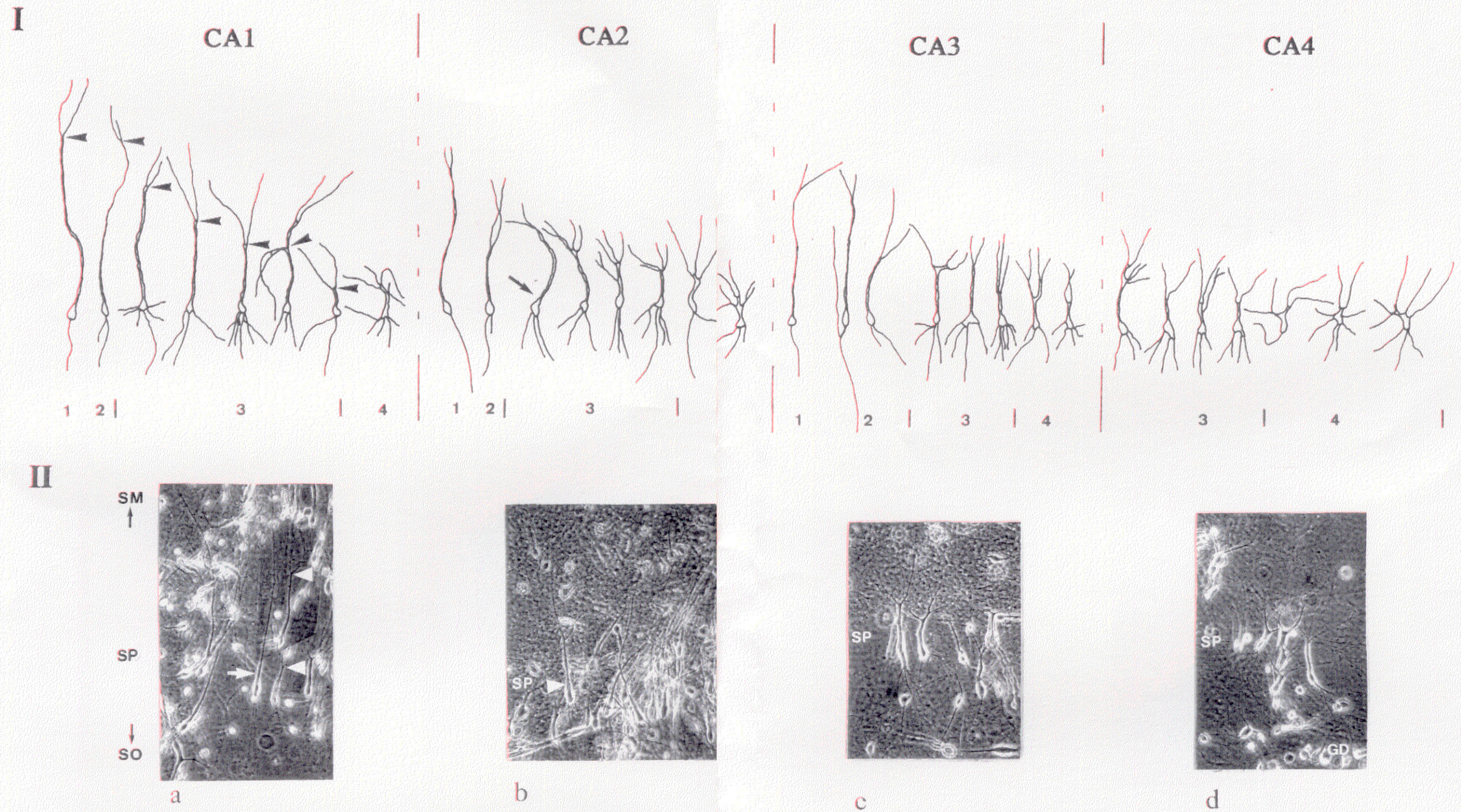


Figura 17. Células de la capa de piramidales de una rodaja P2.

I, dibujos a cámara lúcida de una muestra representativa de la variedad de formas encontradas en cada área del hipocampo (150x). Hemos ordenado las formas de cada área indicando una secuencia lógica de transformación de las bipolares más sencillas (1 y 2) en formas típicas de células piramidales (3) y formas complejas (4) también de células piramidales (4) en cada serie (1 a 4) el punto de bifurcación de la prolongación apical (señalado con cabezas de flecha en CA1) se aproxima al soma. II, microfotografías por contraste de fases de las distintas áreas, tomadas de diversas rodajas (237x). Las cabezas de flecha en a señalan el punto de bifurcación de la prolongación apical de dos células a distinta distancia del soma; nótese que la célula señalada con una flecha tiene el punto de bifurcación fuera de foco (no se observa) y sin duda mucho más distante del soma que las otras. En b la cabeza de flecha señala una célula muy parecida a la señalada con una flecha en la serie I CA1; obsérvese que tiene más prolongaciones basales y el punto de bifurcación se ha aproximado al soma. En c se muestra cómo la gran mayoría de células de CA3 tienen el punto de bifurcación muy próximo al soma. En d se muestra la disposición aleatoria de las células en CA4 y la gran proximidad del punto de bifurcación al soma. SM, stratum moleculare; SP, stratum pyramidal; SO, stratum oriens; GD, giro dentado.

Así hemos distinguido en cada una de las áreas 4 grupos de formas. Las formas 1 son las bipolares más sencillas de las que hablamos anteriormente. Las formas 2 se diferencian de las formas 1 por poseer una o dos prolongaciones basales cortas, y comparten con las formas 1 el poseer soma ovalado y una larga prolongación apical que se ramifica lejos del soma. Las formas 3 se diferencian de las 2 en poseer más prolongaciones en el polo basal y más ramificaciones en la prolongación apical (no siempre dibujadas), y son formas ya con mucho parecido con las células piramidales adultas. Por esto, en los dibujos hemos colocado sucesivamente las formas 1, 2 y 3, y al final de esta secuencia hemos puesto las formas 4, las más irregulares y muy parecidas a las formas mayoritarias de CA4. Además, el orden de las formas en la secuencia también es de células con prolongación apical primaria más larga a más corta. Llamamos prolongación apical "primaria" al pedazo de esta prolongación comprendido entre el soma y el punto en el que empieza a bifurcarse, señalado con cabeza de flecha en I, CA1. También estudiamos la forma de los somas y hemos encontrado que las formas 1 y 2 tienen somas o bien ovalados, o en formas de pera, mientras que las formas 3 tienen soma o en forma de pera, o triangular, o de forma intermedia entre ambas.

Durante la simple observación de las rodajas P0-P2 adquirimos la idea de que en general la prolongación apical de las células de la capa de piramidales se ramifica progresivamente más cerca del soma a medida que íbamos observando de CA1 a CA4. También observamos que las células de somas triangulares eran muy escasas en CA1 y su número aumentaba de CA1 a CA3, aunque la mayoría de somas parecían ser tipo ovalado, o en forma de pera en todas las áreas. Los estudios cuantitativos, de la longitud de la prolongación apical desde el soma al punto de bifurcación, y de las formas de los somas, confirmaron nuestras primeras observaciones, como veremos más adelante.

Durante el periodo P3-P5, las células con formas 3 de las áreas CA1, CA2 y CA3 incrementan el número de prolongaciones del polo basal y las ramificaciones de la prolongación apical (no dibujadas en toda su longitud en Fig. 18 I). En P5 se sigue observando el gradiente de CA1 a CA3 de células con el punto de ramificación de la prolongación apical más lejos del soma a células con el punto de ramificación más cerca del soma. El número de células con soma triangular aumenta claramente en CA3. Las formas 1 y 2 que se observan de forma mayoritaria en CA1 entre P0 y P2 decrecen entre P2 y P5; en P5 ya no se observan, y tampoco se encuentran en CA2 y CA3, observándose mayoritariamente formas 3 y, en menor proporción, formas 4. Por lo tanto, hay una transformación progresiva de formas 1 y 2 en formas 3. Estos resultados confirmaron de nuevo que CA1 va globalmente más retrasada en la diferenciación que CA2 y ésta que CA3. Si se comparan área por área las formas dibujadas en los estadíos P2 y P5, se comprueba que, a medida que progresa la diferenciación en el tiempo, la bifurcación de la dendrita apical está más próxima al soma.

De P5 a P12 (Fig. 19) aumenta el número de ramificaciones de la prolongación apical primaria (no documentado) y claramente se observa en P12 cómo la mayoría de las células bifurcan esta prolongación mucho más cerca del soma que en estadíos precedentes; esto se comprueba comparando CA1 de P12 (Fig. 19) con CA1 de P5 (Fig 18). El proceso de acercamiento del punto de bifurcación de la prolongación apical al soma, a lo largo del periodo de morfogénesis estudiado, se hace más evidente todavía cuando se compara CA1, CA2 y CA3 de P0-P2 con sus respectivas áreas de P12. La misma comparación respecto a la forma de los somas evidencia la transformación de la mayoría de los ovalados en triangulares. La comparación de las áreas CA4 en los estadíos estudiados evidencia que las células no experimentan grandes transformaciones, que son muy polimórficas ya desde P0,

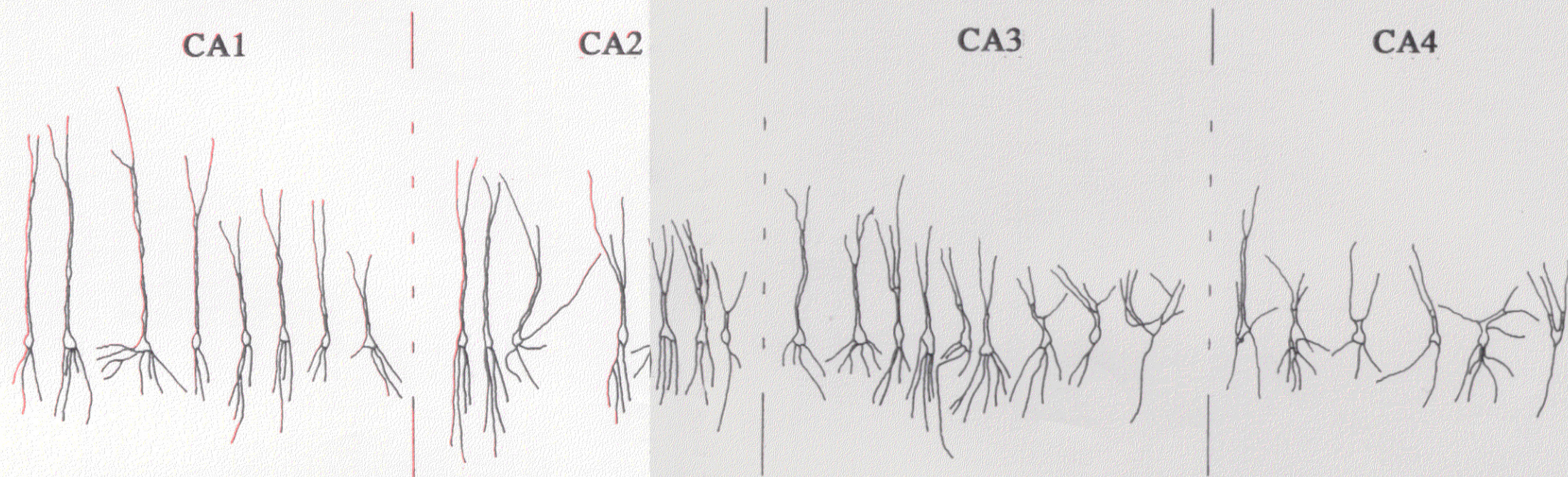
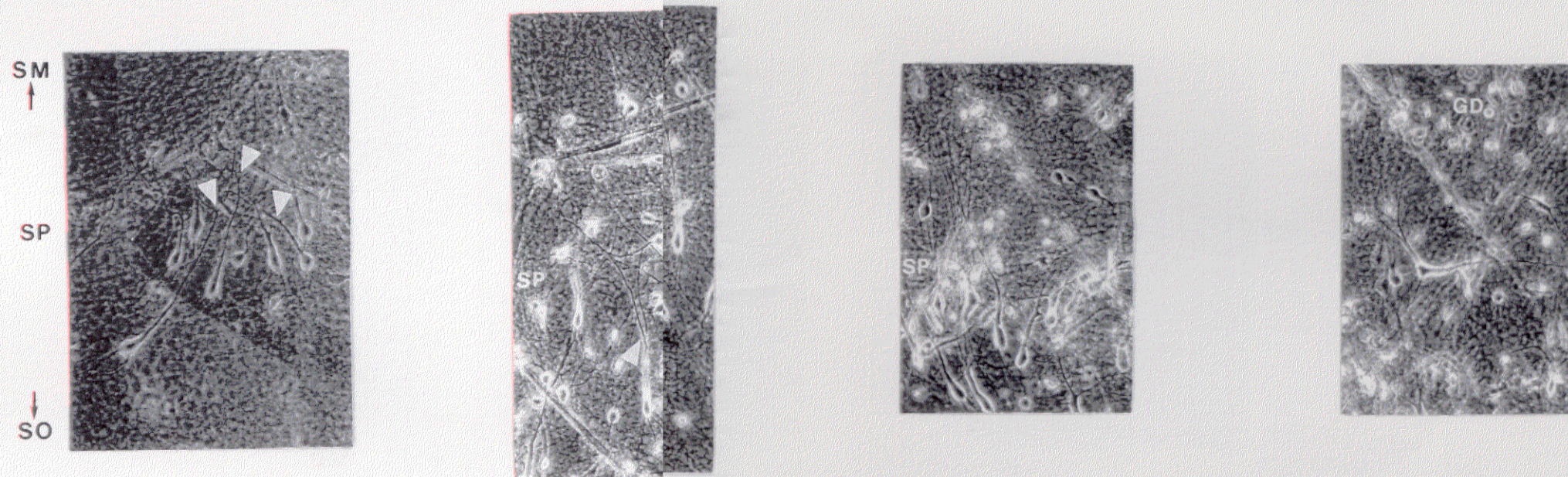
I**II**

Figura 18. Células de la capa de piramidales de una rodaja P5.

I, dibujos a cámara lúcida de una muestra representativa de las formas encontradas en cada área del hipocampo, ordenadas desde mayor a menor distancia del punto de bifurcación de la prolongación apical al soma (150x). Nótese el incremento en número de prolongaciones basales respecto a P2 (Fig. 17), que han desaparecido las formas 1 y 2, y que de CA1 a CA4 el punto de bifurcación de la prolongación apical es cada vez más próximo al soma. II, microfotografías por contraste de fase, de campos de las distintas áreas, tomadas de diferentes rodajas (237x). Las flechas señalan los puntos de bifurcación de la prolongación apical de algunas células en las áreas CA1-CA4. El acercamiento del punto de bifurcación al soma es evidente de CA1 a CA4. SM, stratum moleculare; SP, stratum pyramidale; SO, stratum oriens; GD, giro dentado.

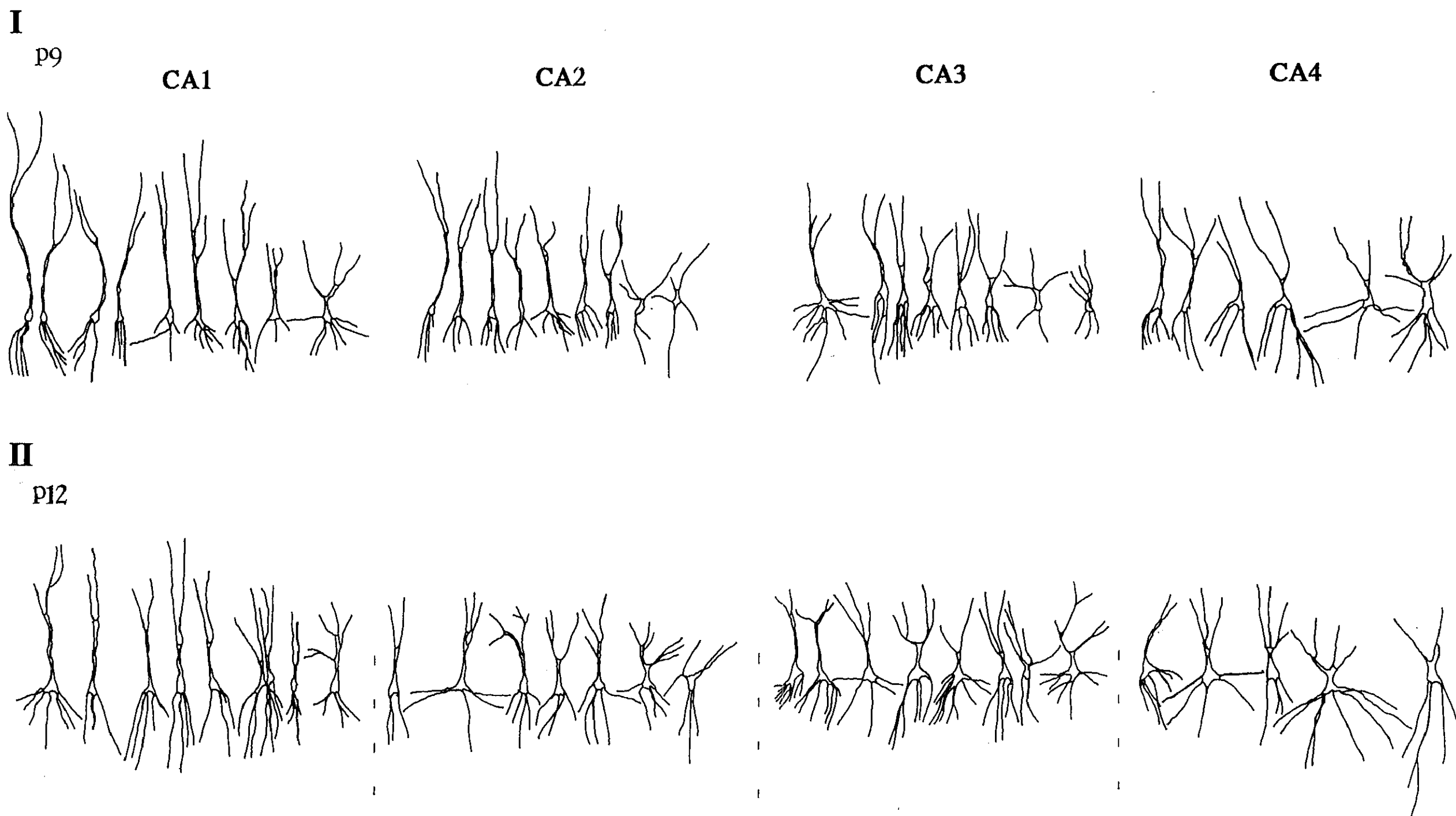


Figura 19. Células de la capa de piramidales dibujadas a cámara lúcida, observadas en rodajas P9 y P12. Obsérvese el acercamiento del punto de bifurcación de la prolongación apical al soma, en CA1 y CA2 de P9 a P12. 150x.

y que por lo tanto su morfogénesis ocurre principalmente durante el periodo prenatal.

Puesto que en cada estadio se observa una mezcla de células que bifurcan la prolongación apical a distancias variables del soma, quisimos hacer un estudio que de manera objetiva cuantificase el proceso de acercamiento del punto de bifurcación al soma, puesto que cabía la posibilidad de que estuviésemos haciendo una apreciación subjetiva. Se dibujaron al azar 30 células de cada área del hipocampo observadas en rodajas semidisgregadas, en todos los estadios de P1 a P12, y se midió la distancia desde el soma al punto de bifurcación de la prolongación apical. Se utilizaron al menos tres animales por estadio. La longitud mayor obtenida es de 310 μm , y la menor es de 0 μm , correspondiente a las células que carecen de prolongación apical, como ocurre con la mayoría de las células llamadas complejas del área CA4.

Para la representación de los resultados, hicimos cuatro grupos de células: A, con longitudes de prolongación apical primaria de más de 155 μm (prolongaciones muy largas); B, entre 93 y 155 μm (prolongaciones largas); C, entre 31 y 93 μm (prolongaciones intermedias); y D, entre 0 y 31 μm (prolongaciones cortas). La representación de los resultados en número de células de cada grupo, por estadio y por área, se muestra en la Fig. 20. En CA1 hay inicialmente (P0-P1) un número considerable de células con prolongación apical primaria muy larga (fila A correspondiente), que decrece de P2 a P9, y en P10 no hay células de esa longitud. Las células en el intervalo de prolongaciones largas (fila B) también decrece de P0 a P12, quedando reducidas entonces a un número muy pequeño. Las células en el intervalo de prolongaciones intermedias (fila C) aumentan hasta P7 y después disminuyen ligeramente. Las células en el intervalo de prolongaciones cortas (fila D) aumentan continuamente de P1 a P12. El análisis conjunto de todos los

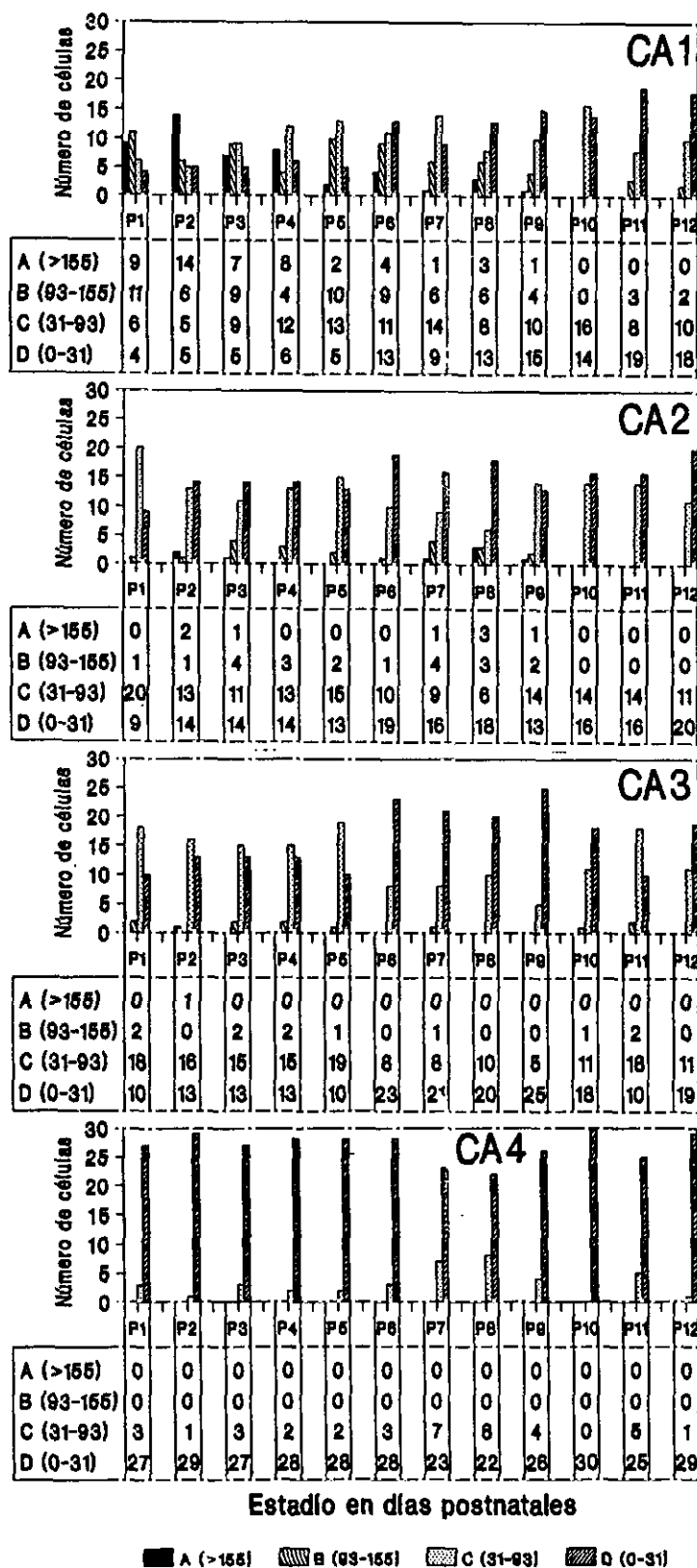


Figura 20. Estudio cuantitativo en rodajas semidisgregadas del proceso de acercamiento del punto de bifurcación de la prolongación apical al soma, a lo largo del desarrollo, por áreas. En ordenadas número de células con el punto de bifurcación a distintas distancias del soma (intervalos de longitud A-D en μm). En abscisas, estado. Las tablas debajo de cada gráfica muestran el número de células, representadas en las barras, para cada intervalo.

intervalos en cada estadio (análisis de la tabla correspondiente por columnas), indica que hasta P2 las células con prolongación muy larga y larga son mayoría, coincidiendo estos resultados con los obtenidos por observación simple de las rodajas. En P3 hay más o menos igual número de células en los cuatro intervalos. A partir de P4 las células con prolongación intermedia y corta son mayoría, de forma que en P12 no quedan células con prolongaciones largas (2 frente a 28). Por lo tanto, es evidente la transformación de las formas con prolongación apical primaria muy larga y larga, en formas con prolongación intermedia y corta.

Los resultados en CA2 son muy parecidos a los de CA3. Las formas con prolongaciones muy largas y largas son minoría frente a las de prolongaciones intermedias y cortas desde P1, inversamente a lo que sucede en CA1. El número de células en el intervalo de longitud intermedia desciende a lo largo del periodo de morfogénesis y el número de las del intervalo de longitud pequeña incrementa, indicando ésto la transformación de las primeras en las segundas.

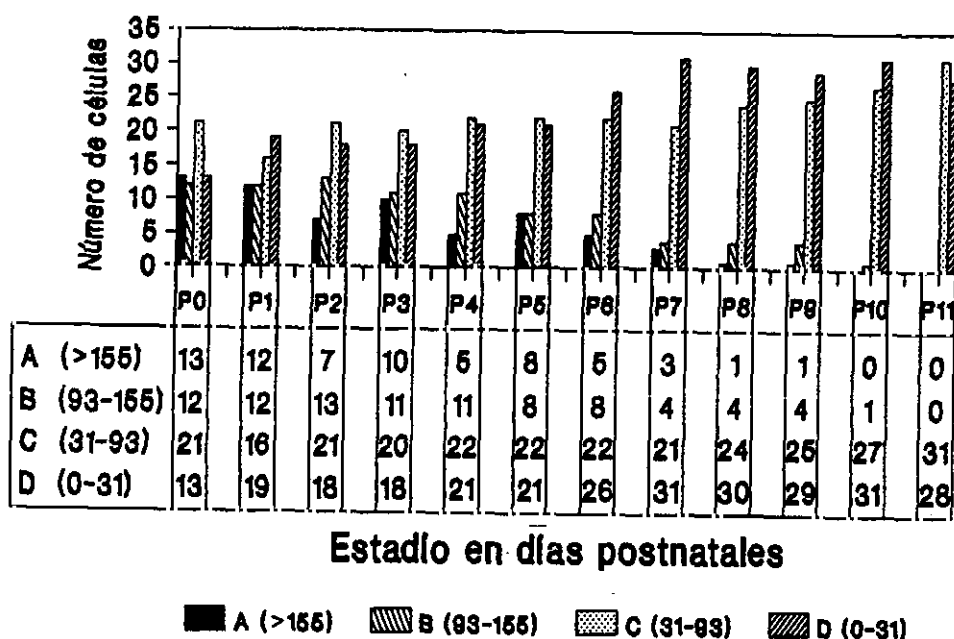
Los resultados de CA4 indican que desde P1, la inmensa mayoría de las formas tienen prolongación corta; hay un número muy reducido con prolongación intermedia y no hay ninguna de los intervalos de longitudes largas. Finalmente, un análisis conjunto de todas las áreas indica que en los estadios jóvenes (P0-P3) las células con prolongación larga y muy larga son mayoritarias en CA1, las de prolongaciones intermedias son mayoritarias en CA2 y CA3, y las de prolongaciones cortas lo son en CA4, quedando así demostrado numéricamente el gradiente espacial de células con mayor longitud de prolongación apical a menor longitud, de CA1 a CA4, el cual evidencian las rodajas semidisgregadas.

Anteriormente presentamos una muestra de células obtenidas por disgregación completa en cada estadio (Fig. 16). Después del estudio de la morfogénesis en rodajas nos preguntamos si midiendo la longitud de la prolongación apical principal en la

población total de células disgregadas en cada estadio, obtendríamos resultados comparables a los obtenidos analizando las medidas de la población conjunta de todas las áreas de cada estadio en rodajas semidisgregadas. Pensamos que, si los resultados fueran comparables, no sólo darían fiabilidad a nuestro estudio en rodajas, sino que además indicarían que la proteasa disgrega todas las células piramidales en proceso de diferenciación en proporciones similares.

Se eligieron al azar 55-60 células por estadio del desarrollo obtenidas en disgregaciones óptimas, utilizando al menos cuatro animales distintos. Se midieron las longitudes sobre dibujos a cámara lúcida, y se consideraron los mismos intervalos de longitud decididos para el estudio en rodajas. Las células con más de 155 μm de longitud entre el soma y la bifurcación de la prolongación principal (la mayor encontrada fue de 310 μm) constituyen el grupo A, de manera análoga a como hicimos para rodajas; las células con longitudes entre 93 y 155 μm (prolongaciones largas), el grupo B; las de longitudes entre 31 y 93 (prolongaciones intermedias), el grupo C, y las de 0 a 31 (prolongaciones cortas), el grupo D. Los resultados los mostramos en la Fig. 21A. El agrupamiento de las medidas de las células de todas las áreas del hipocampo obtenidas en rodajas semidisgregadas (Fig. 20) en cada estadio lo mostramos en la Fig. 21B. La comparación, en términos relativos, de los datos de ambas figuras, indica que en ambas: 1) decrece progresivamente a lo largo del desarrollo el número de células con prolongación apical primaria muy larga (fila A), desde los primeros estadios postnatales hasta P10, estadio en el que desaparecen; 2) decrece del mismo modo el número de células con prolongación larga (fila B), de las que también hay un número muy reducido a P10; 3) aumenta gradualmente a lo largo del desarrollo el número de células con prolongación muy pequeña (fila D). Sin embargo, el grupo de células C, con longitudes de prolongación apical

A



B

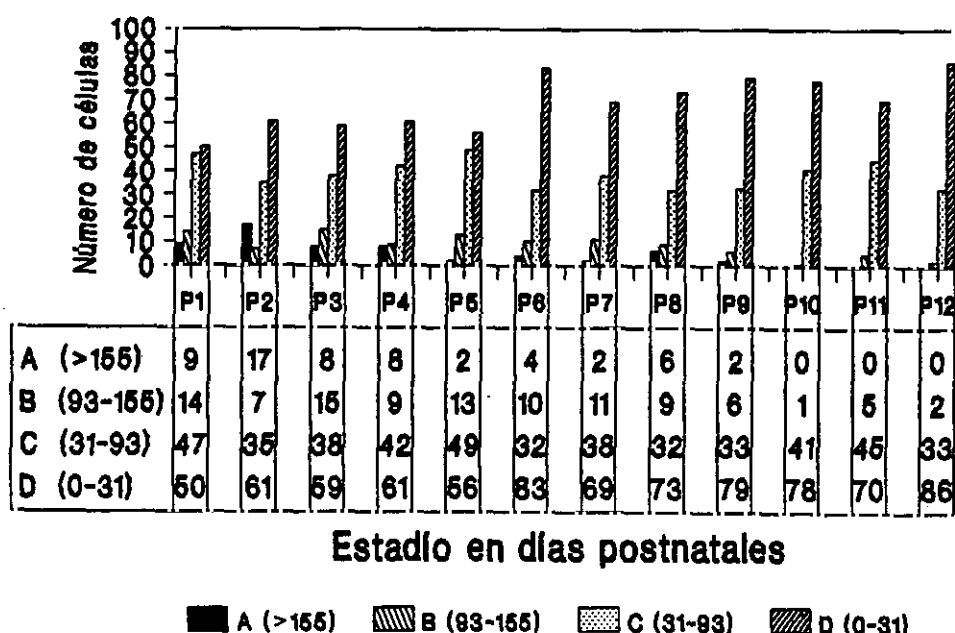


Figura 21. A, estudio cuantitativo en células disgregadas del proceso de acercamiento del punto de bifurcación de la prolongación apical al soma, a lo largo del desarrollo. En ordenadas, número de células con el punto de bifurcación a distintas distancias del soma (intervalos de longitud A-D, en μm). En abscisas, estadio. B, representación conjunta de las longitudes de la prolongación apical primaria de las células de todas las áreas, representadas individualmente en la Fig. 20, para comparación con A.

intermedias; aumenta en los resultados de disgregación, y se mantiene más o menos en los de rodajas. El número de células del grupo D respecto al total de células en cada estadio es la mitad en los disgregados que en el análisis conjunto de las rodajas. Para estas "aparentes" discrepancias, sin repercusión para la interpretación de nuestros resultados, ofrecemos una explicación metodológica en el apartado de discusión.

El estudio cuantitativo del número de células con somas de las diferentes formas encontradas en los distintos estadios, en disgregados y en rodajas semidisgregadas (Fig. 22), nos ha dado resultados muy similares con ambas técnicas, y demuestra numéricamente la transformación de las células con somas ovalados o piriformes en células de soma triangular. En las rodajas (Fig. 22A), el número de somas triangulares en CA1 incrementa considerablemente a partir de P8 y en CA2 a partir de P7; en CA3 el incremento es gradual a lo largo de todo el desarrollo postnatal y ya desde P2. Por lo tanto, estos resultados confirman el gradiente espacial de diferenciación de los somas de CA3 a CA1 encontrado por simple observación de las rodajas. Además, evidencian una diferenciación gradual de los somas de la población de CA3, y más abrupta en CA2 de P7 a P12, y en CA1 de P9 a P12.

En disgregados (Fig. 22 B), los resultados evidencian también la transformación de somas ovalados y piriformes en triangulares, y muestran una transformación global gradual de los somas a partir de P2, a lo largo del desarrollo postnatal. Por lo tanto, estos resultados simulan más lo que ocurre en CA3 que en CA2 o CA1, lo cual nos parece lógico, puesto que el área CA3

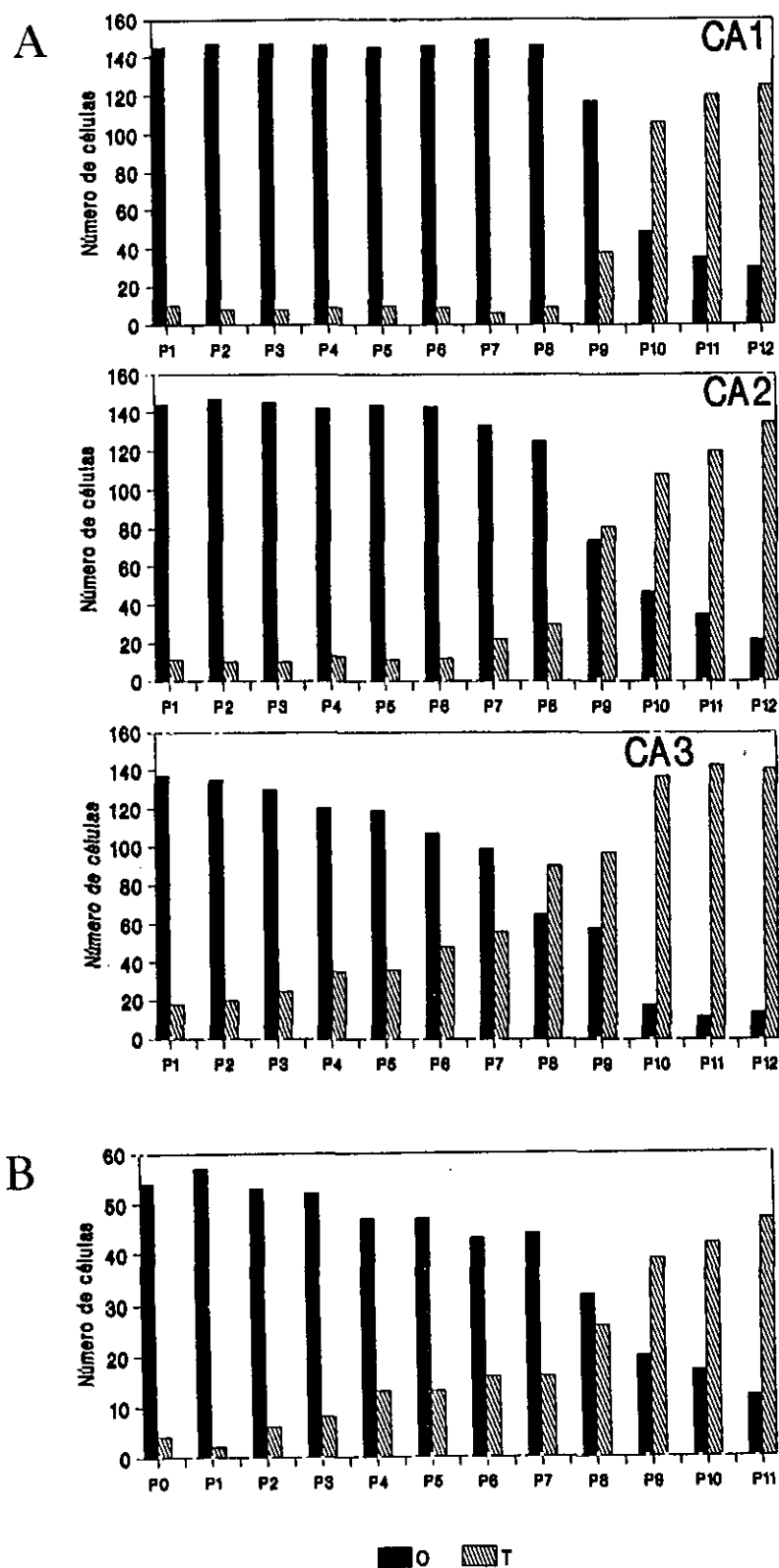


Figura 22. Estudio cuantitativo a lo largo del desarrollo del proceso de transformación de las células con somas ovalados en somas triangulares. A, estudio en rodajas semidisgregadas. B, estudio en disgregados. En ordenadas, número de células con soma ovalado (O), o triangular (T). En abscisas, estadio.

durante la mayor parte del desarrollo, es superior en longitud a CA1 y CA2 y, también se observa en la gráfica que es CA3 la que más contribuye al "pool" general de somas triangulares. Pensamos que esta similitud de resultados obtenida en las rodajas y en disgregaciones completas dan fiabilidad a nuestro estudio y al método de disgregación mismo.

En resumen, la morfogénesis de la población de células piramidales del área CA4 ocurre mayoritariamente en el periodo prenatal. La mayoría de las células de las áreas CA1, CA2 y CA3 experimentan la morfogénesis postnatalmente, entre P0 y P12. La morfogénesis no ocurre de forma sincrónica en estas áreas, sino que en CA3 ocurre globalmente antes que en CA2 y en ésta antes que en CA1, y por ésto se observa un gradiente de células más diferenciadas (morfológicamente más parecidas a las piramidales adultas) a menos diferenciadas, de CA3 a CA1. Del estudio de las formas a lo largo del periodo de morfogénesis, hemos deducido la secuencia de formas que adopta cada célula piramidal para transformar su forma bipolar simple, adoptada inmediatamente después de abandonar el ciclo celular, en la forma compleja adulta (Fig. 23). La célula piramidal empieza a ramificar el extremo distal de la larga prolongación apical antes de emitir prolongación basal alguna; después continúa ramificando la prolongación apical, desde el extremo distal a la porción proximal, a la vez que va emitiendo cada vez más prolongaciones basales. Hemos demostrado que la ramificación de la prolongación apical progresa de distal a proximal, midiendo la longitud de esta prolongación desde el soma al punto de bifurcación en una población de células representativa de cada área, a lo largo de todo el periodo de morfogénesis. Finalmente, la mayoría de las células adoptan somas triangulares, y lo hacen cuando ya han ramificado considerablemente la prolongación apical y han emitido varias prolongaciones basales. Mientras en la población de CA3 el número de células que adoptan soma triangular es más o

menos el mismo en cada estadio, en CA2 hay un mayor número de células que adoptan soma triangular entre P7 y P12, y en CA1 esto sucede más tarde, entre P9 y P12.

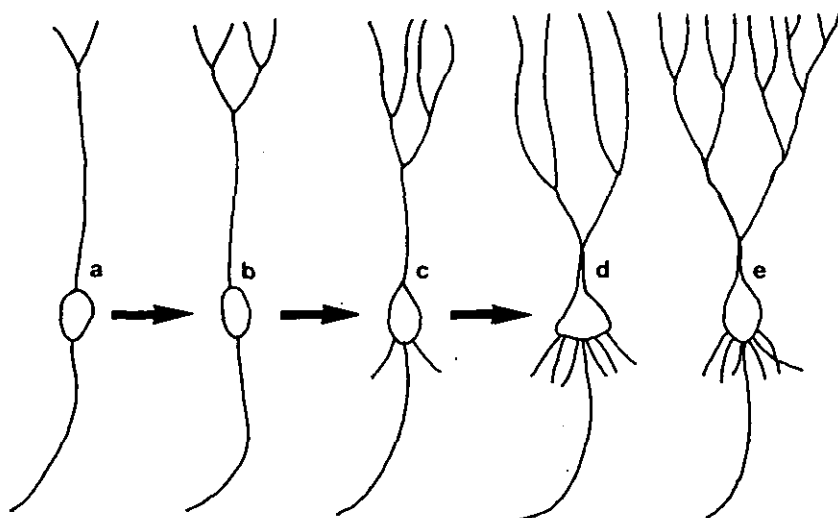


Figura 23. Esquema que muestra la secuencia de morfogénesis de las células piramidales. a, forma adoptada inmediatamente después de abandonar el ciclo celular; b y c, formas transitorias; d y e, formas diferenciadas.

5.4. DETERMINACION DEL CONTENIDO DE ADN DE LAS CELULAS PIRAMIDALES

5.4.1. Condiciones óptimas para la determinación del contenido de ADN

Al ser la primera vez que se hace un estudio del contenido de ADN de células piramidales disgregadas, tuvimos que establecer las condiciones óptimas de hidrólisis. Para ello realizamos curvas de hidrólisis a $19 \pm 1^\circ\text{C}$ y a $22 \pm 1^\circ\text{C}$, a los tres tipos de extensiones que usamos (células piramidales P11 con las células control). Elegimos esas temperaturas porque la experiencia previa obtenida en nuestro laboratorio, estudiando el contenido en ADN de las células de la retina de pollo, indica que

a 19°C se obtiene una meseta de valores máximos de ADN, mientras que a 22°C se obtiene sólo un pico de valores máximos, en ambos casos, el tiempo de hidrólisis puede no corresponder al tiempo de hidrólisis del valor máximo de ADN en las distintas poblaciones de células a estudiar. Ejemplos de células piramidales y de glía a las que medimos su contenido en ADN se muestran en la Fig. 24.

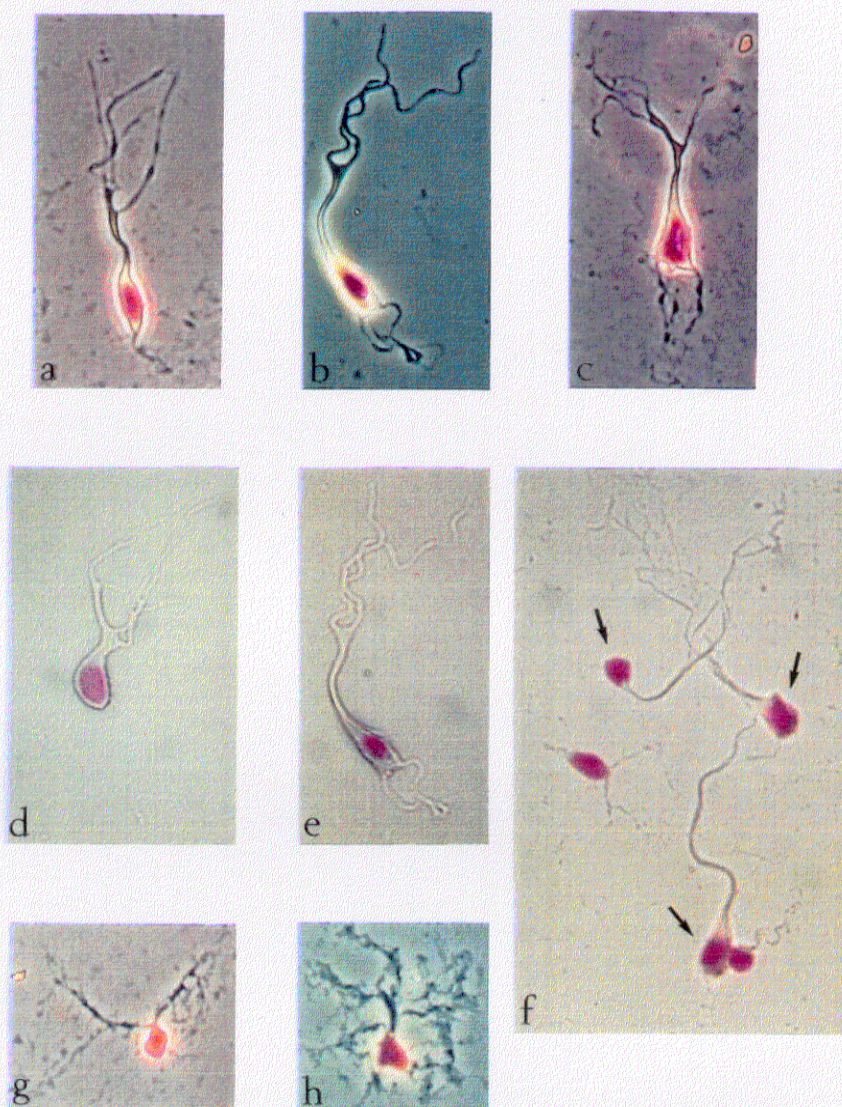


Figura 24. Ejemplos de células piramidales del hipocampo de rata P11, disgregadas y teñidas por el método de Feulgen, a las que se midió su contenido en ADN. a-c, microfotografías tomadas por contraste de fases de células piramidales con soma ovalado (a) y triangular (b y c). d-f, microfotografías tomadas por luz transmitida cerrando el diafragma de condensador lo suficiente para ver la silueta de la célula (modo de identificación en el citofotómetro, previo a la medición), d, célula piramidal ovalada; e, piramidal triangular, la misma que en b; f, campo de varias células piramidales (flechas). Las microfotografías g y h muestran células de glía del hipocampo en contraste de fases. 525x.

Obsérvese que la identificación de las células piramidales es inequívoca, y que la forma de las células fijadas con etanol-acético es básicamente la misma que la de las células "in vivo" mostradas en el apartado de morfogénesis, aunque es obvio que el fijador altera en cierto grado su forma. Se midió cualquier célula piramidal que apareciese en el campo óptico al recorrer el porta con una sistemática establecida, y se anotó el tipo de soma, ovalado o triangular.

Las curvas de hidrólisis correspondientes a células piramidales y eritrocitos de pollo, a $19 \pm 1^\circ\text{C}$, se muestran en la Fig.25.

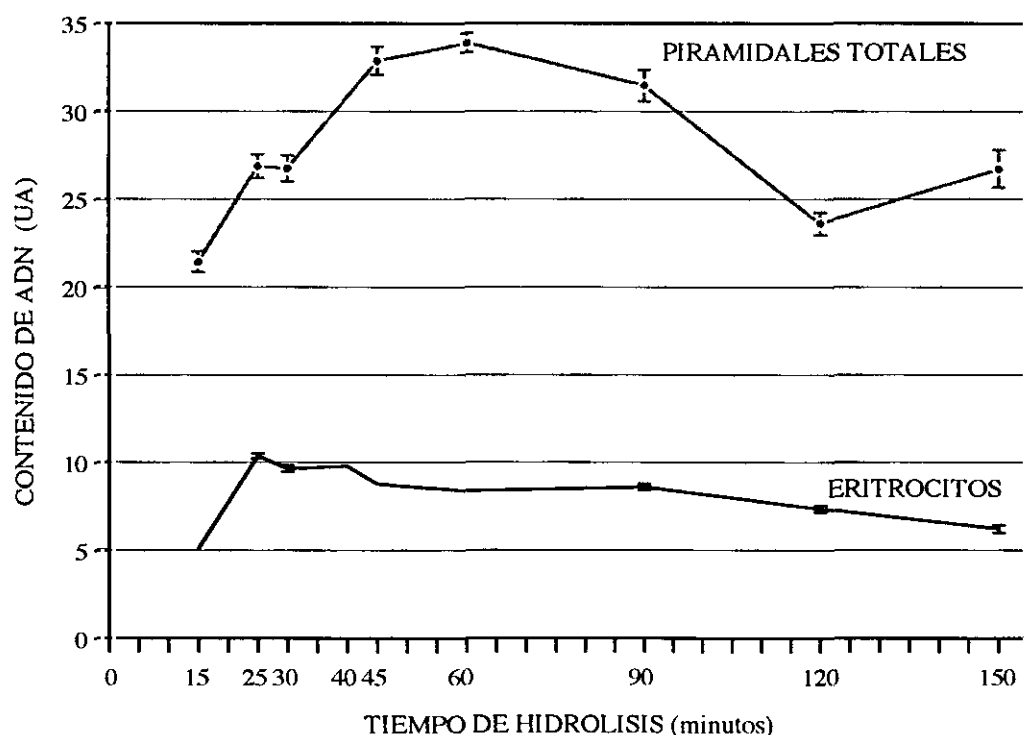


Figura 25. Curvas de hidrólisis obtenidas utilizando HCl 5N, a $19 \pm 1^\circ\text{C}$. Representación del contenido de ADN en UA (unidades arbitrarias) respecto al tiempo de hidrólisis. Cada punto de la gráfica de eritrocitos representa la media de un mínimo de 40 núcleos; en la gráfica de piramidales cada punto es la media de un mínimo de 45 núcleos.

Los eritrocitos presentan el valor máximo de ADN a los 25 minutos y una meseta de valores muy próximos al máximo entre los 30 y los 40 minutos, mientras que las células piramidales

tienen el máximo a los 60 minutos y valores muy próximos a éste entre los 45 y los 90 minutos. Al no coincidir el tiempo en el que se obtiene el valor máximo de ADN en ambas poblaciones, decidimos no utilizar los eritrocitos de pollo como células control en nuestro estudio. Sin embargo, más adelante compararemos los valores máximos obtenidos en la curva de eritrocitos de pollo con los valores máximos de la curva de leucocitos de rata (obtenidos en las extensiones de eritrocitos más leucocitos más células piramidales) para analizar la fiabilidad de nuestro estudio.

Las curvas correspondientes a las extensiones de leucocitos más células piramidales a $19\pm 1^{\circ}\text{C}$ (Fig. 26), muestran que los leucocitos tienen un valor máximo a los 90 minutos que coincide con el punto medio de una meseta de valores máximos para las células piramidales, obtenido entre los 60 y 120 minutos. Por lo tanto, consideramos 90 minutos como tiempo óptimo de hidrólisis. En estas mismas extensiones medimos el contenido de ADN de las células de glía (como las mostradas en la Fig. 24), cuya curva se superpone con la de leucocitos en la Fig. 27, para mostrar el alto grado de coincidencia. Por lo tanto, las células de glía también pueden ser utilizadas como células control.

También hicimos un primer análisis comparativo de los valores máximos de ADN entre las células control, la población total de células piramidales y las subpoblaciones de piramidales triangulares y ovaladas, que mostramos en la Tabla IV. Encontramos que el contenido medio de la población de células piramidales ovaladas es muy similar al de las células control. Sin embargo, la población de piramidales triangulares tiene un contenido medio 6 UA por encima del de las células control. La población total de células piramidales está sólo 3UA por encima de las control. Por lo tanto, en este análisis ya vimos que una subpoblación de las células piramidales supera en contenido de ADN a las células control 2C.

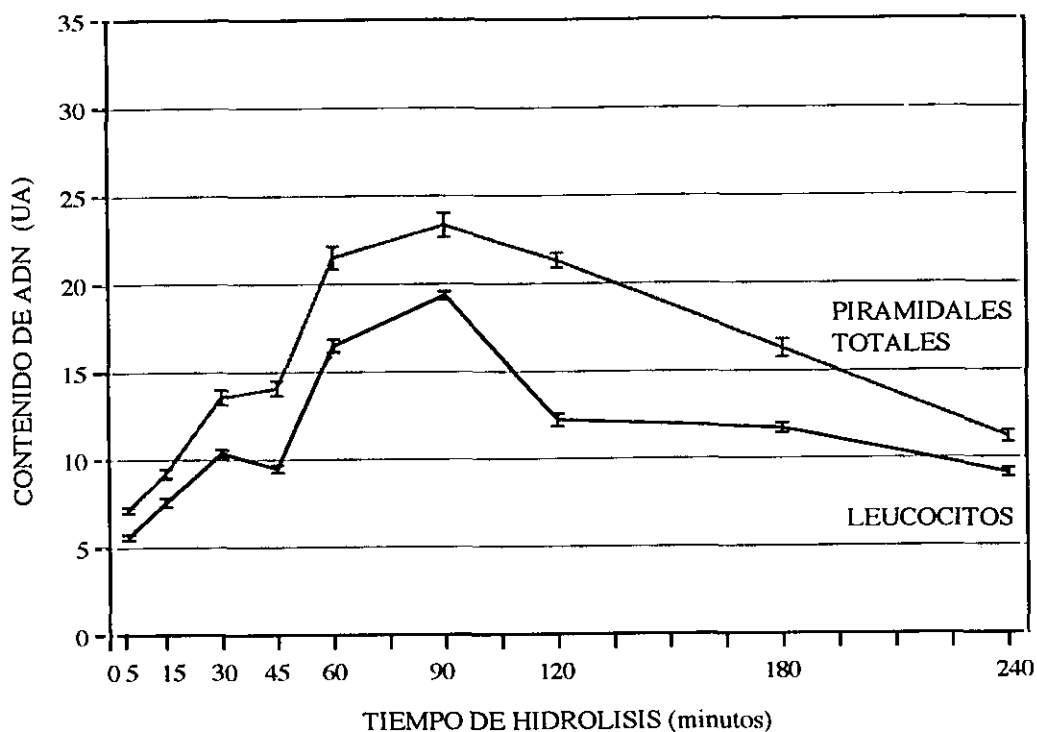


Figura 26. Curvas de hidrólisis obtenidas utilizando HCl 5N, a $19 \pm 1^\circ\text{C}$. Representación del contenido de ADN en UA (unidades arbitrarias) respecto al tiempo de hidrólisis. Cada punto de la gráfica de leucocitos representa la media de un mínimo de 35 núcleos, y en la de piramidales cada punto es la media de un mínimo de 45 núcleos.

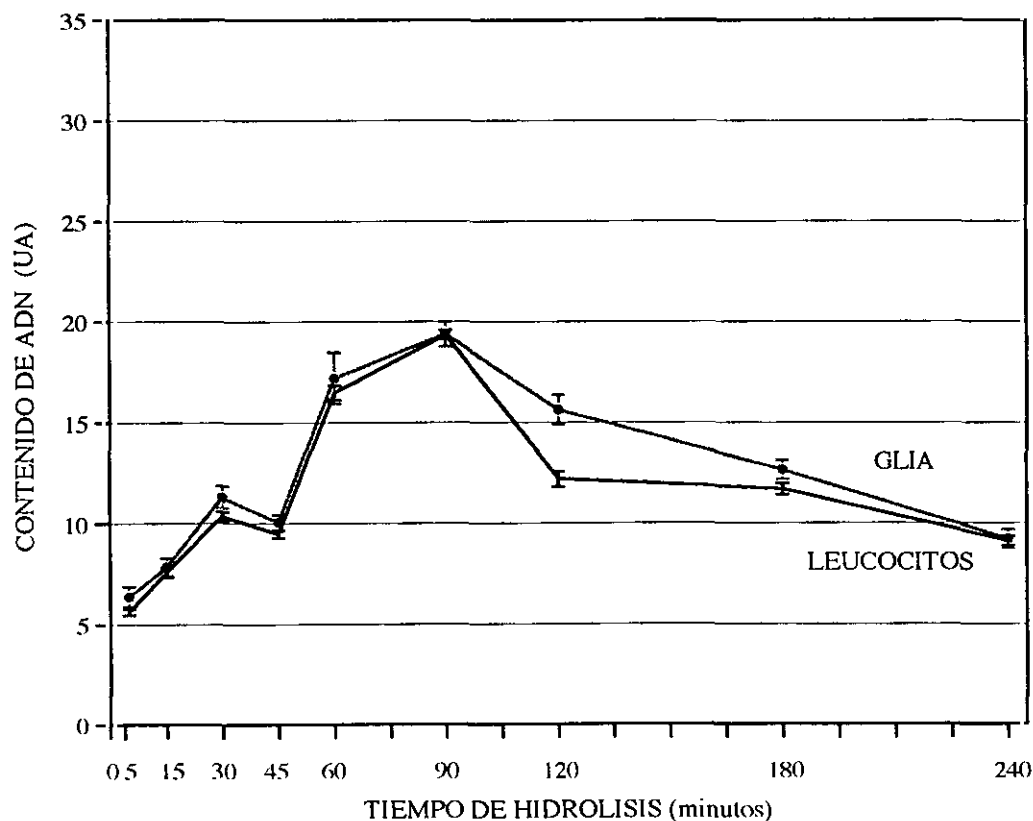


Figura 27. Curvas de hidrólisis obtenidas utilizando HCl 5N, a $19 \pm 1^\circ\text{C}$. Representación del contenido de ADN en UA (unidades arbitrarias) respecto al tiempo de hidrólisis.

Tipo Celular	$\bar{x}$	E.S.M.	n	Hidrólisis
Leucocitos	19,344	0,23	35	90 min
Piramidales Totales	22,331	0,70	45	90 min
Piramidales Triangulares	25,547	0,60	24	90 min
Piramidales Ovaladas	18,656	0,78	21	90 min

Tabla IV. Contenido de ADN de los distintos tipos celulares a tiempo óptimo de hidrólisis (90 minutos). $\bar{x}$, media del contenido de ADN de cada tipo de células; E.S.M., error standard de la media; n, número de células medidas en cada punto.

5.4.2. Determinación del contenido de ADN

El estudio del contenido de ADN en la población total de células piramidales en las condiciones óptimas obtenidas anteriormente (HCl 5N, 90 minutos de hidrólisis y $19 \pm 1^\circ\text{C}$), ha dado como resultado (Fig. 28) que tienen un contenido medio correspondiente a 2,31C ; por lo tanto, ligeramente superior al contenido 2C de leucocitos (control externo) y células de glía (control interno). El análisis por separado de las piramidales triangulares y las ovaladas indica que éstas tienen un valor 1,93C, mientras que las triangulares tienen 2,64C. Tomando como referencia 6,7pg de contenido medio de ADN de los leucocitos, el contenido medio de ADN por célula de la población de piramidales totales es 7,7pg.

En la Fig. 28, el histograma relativo a las piramidales totales muestra un amplio rango de valores de ADN; una parte de la población tiene valores dentro del rango de las células control, en tanto que otra parte se aleja de los valores control hacia contenidos de ADN mayores, presentando algunas células (7%)

valores muy próximos al doble del de las células control.

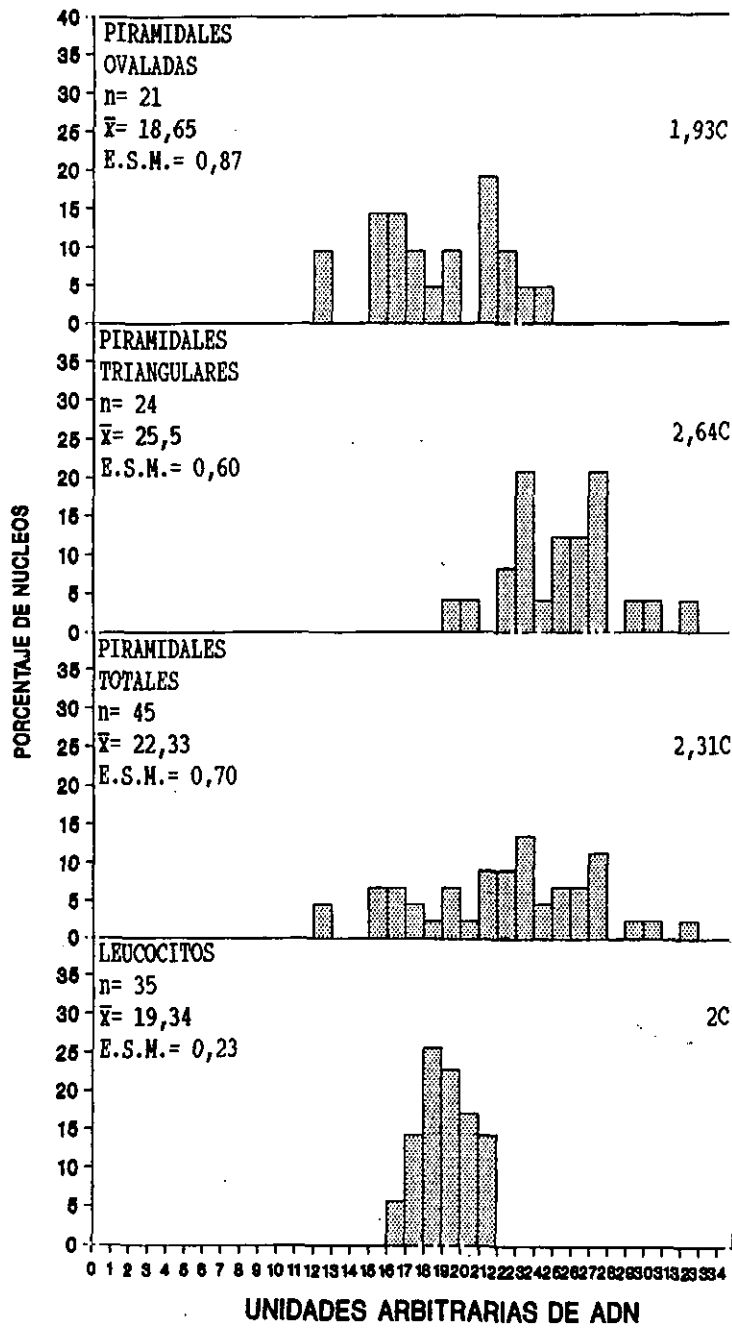


Figura 28. Contenido de ADN por núcleo, de leucocitos (control), piramidales totales, piramidales triangulares y piramidales redondas. Estos resultados corresponden a una sola de las preparaciones utilizadas: 90 minutos de hidrólisis con HCl 5N, a 19±1°C. Reactivo de Schiff durante 2,5 horas. n, número de células leídas; $\bar{x}$, media del contenido de ADN de cada población; E.S.M., error standard de la media. Los histogramas de piramidales ovaladas y triangulares corresponden a las subpoblaciones de la población total representada.

Los histogramas correspondientes a las subpoblaciones

de piramidales triangulares y ovaladas de la población de piramidales totales anteriormente referida, muestran que las triangulares son las que tienen valores de ADN mayores que las células control, mientras que las piramidales ovaladas presentan valores similares a los de los leucocitos. Analizando el porcentaje de células con valores superiores al máximo de las células control, se obtiene un 58% en la población total de piramidales, un 92% en la de triangulares y un 19% en la de ovaladas. Comparando estadísticamente estas poblaciones celulares mediante el test de la -t- de Student, se obtiene que hay diferencia significativa ($p < 0,05$) entre las células piramidales de soma triangular y los leucocitos, y no hay diferencia ($p > 0,05$) entre las células piramidales de soma ovalado y los leucocitos. Por otra parte, la diferencia entre las células piramidales triangulares y las ovaladas es significativa ($p < 0,05$), y entre los leucocitos y las células de glía (no mostradas), la diferencia no es significativa ($p > 0,05$). Resultados similares se obtuvieron en un total de 5 experimentos correspondientes a diferentes ratas en las mismas condiciones.

Numerosos trabajos (Decosse y Aiello, 1966; Fox, 1969; Mayall, 1969; Kjellstrand, 1977, 1980; Mares y Van der Ploeg, 1980; Navarrete y col., 1983; Rasch, 1985) recomiendan que se realice la hidrólisis a temperatura ambiente (considerada entre 19 y 28°C) e indican que variaciones a la alta en la temperatura pueden incrementar considerablemente la velocidad de la reacción. Variaciones de +5°C son suficientes para duplicar la velocidad de la reacción (Kjellstrand, 1977). Por ésto, decidimos conocer si a 22±1°C (valor superior del rango de temperatura ambiente) obtendríamos alguna variación en la curva de hidrólisis, y realizamos una curva a esta temperatura. Dado que al aumentar la temperatura aumenta la velocidad de la reacción de hidrólisis, esperábamos obtener la máxima lectura de ADN a tiempo menor que el de la curva de hidrólisis a 19°C, es decir, por debajo de 90

minutos. Los resultados (Fig. 29) indican que la lectura máxima de ADN se obtiene a los 15 minutos en ambas poblaciones, leucocitos y células piramidales. La hidrólisis se completa prácticamente a los 60 minutos también en ambas poblaciones.

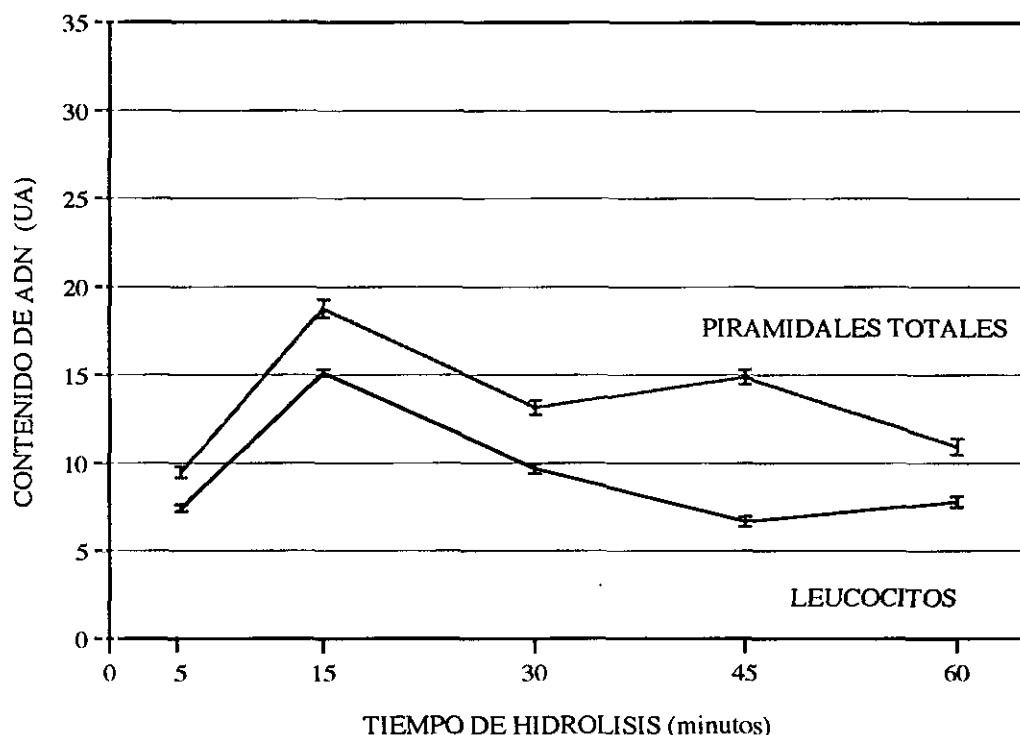


Figura 29. Curvas de hidrólisis obtenidas utilizando HCl 5N, a $22 \pm 1^\circ\text{C}$. Representación del contenido de ADN en UA (unidades arbitrarias) respecto al tiempo de hidrólisis. Cada punto de la gráfica de leucocitos representa la media de un mínimo de 35 núcleos; en la gráfica de piramidales totales cada punto es la media de un mínimo de 45 núcleos.

El estudio del contenido de ADN hidrolizando 15 minutos con ClH 5N a 22°C , nos dió resultados similares a los obtenidos a 19°C . La población de células piramidales totales (ovaladas y triangulares) tiene un valor de contenido medio de ADN de $2,48\text{C}$ (Fig. 30), siendo las piramidales triangulares $2,68\text{C}$ y las piramidales ovaladas las más próximas a 2C ($2,27\text{C}$). El contenido medio de ADN por célula, en picogramos, de la población de piramidales totales es $8,3$, valor superior al obtenido a $19 \pm 1^\circ\text{C}$ ($7,7$ picogramos).

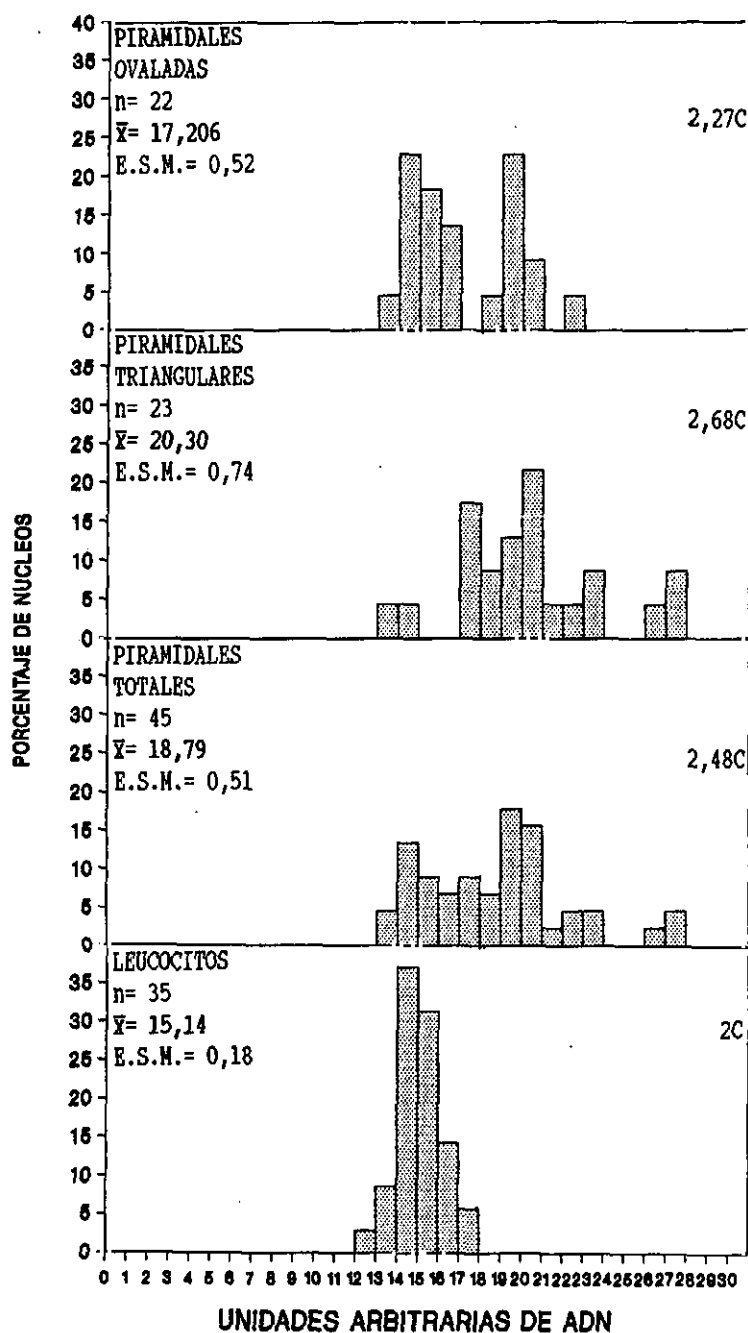


Figura 30. Contenido de ADN por núcleo, de leucocitos, piramidales totales, piramidales triangulares y piramidales redondas. Los histogramas se corresponden a una sola de las preparaciones obtenidas tras 15 minutos de hidrólisis con HCl 5N, a 22±1°C. Reactivo de Schiff durante 2,5 horas. n, número de células leídas; $\bar{x}$, media del contenido de ADN de cada población; E.S.M., error standard de la media. control.

Los histogramas de la Fig. 30 tienen formas similares a los correspondientes de la Fig. 28, presentando el de la población de piramidales totales y también el de las piramidales

triangulares una pequeña población que se separa del histograma, con valores prácticamente el doble del valor medio de las células control. El contenido medio de las células piramidales totales (18,78) supera al de los leucocitos (15,14) en 3,6 unidades, esta diferencia es prácticamente la misma que la obtenida a 19°C (Fig. 28). La diferencia entre leucocitos y piramidales triangulares es también la misma que a 19°C. Sin embargo, el análisis estadístico da diferencia significativa entre las piramidales ovaladas y los leucocitos.

En resumen: hemos medido por primera vez el contenido de ADN de las células piramidales del hipocampo aisladas. Hemos utilizado leucocitos como células de referencia y hemos determinado experimentalmente las condiciones óptimas de hidrólisis, que resultaron ser 90 minutos a temperatura de 19°C y 15 minutos a 22°C. Los resultados muestran, en ambas condiciones, una pequeña población (7%) de piramidales triangulares con contenido prácticamente doble del de las células control, es decir 4C. El contenido medio de ADN en la población total de triangulares corresponde a 2,6C y el de las ovaladas es muy próximo a 2C.

6. DISCUSION

6.1. METODO DE DISGREGACION

Es bien conocido que los diversos métodos de aislamiento de células nerviosas descritos, son en su mayoría muy complejos, laboriosos y no del todo eficaces (Althaus y Neuhoff, 1982 y Schaffer y Schnaar, 1983; Kay y Wong, 1986).

Waymouth (1974), realizó una revisión de las diversas técnicas o métodos de disgregación utilizados tanto para aislar células del SNC como de otros tejidos. Con la premisa de que cualquier método de disociación, sea mecánico o enzimático, produce daño celular, concluyó que unos métodos resultan menos traumáticos que otros. El tratamiento bien controlado con enzimas y/o agentes quelantes de Ca^{++} y Mg^{++} , o la simple variación del pH, o de la osmolaridad, pueden ser menos traumáticos que los métodos mecánicos, los cuales incluyen, entre otros tratamientos, estrujar el tejido. Además concluyó que sea cual sea la enzima empleada (tripsina, colagenasa, elastasa, pronasa, etc), las mejores disociaciones se obtienen empleando complejos multienzimáticos contenidos en los preparados crudos de enzimas, y no con las enzimas purificadas.

Las enzimas utilizadas para disgregar el hipocampo embrionario rompen las prolongaciones y, por lo tanto, las células piramidales de la suspensión celular resultante son todas más o menos redondeadas, sin prolongación alguna (Banker y Cowan, 1979). La enzima más utilizada es, sin duda, la tripsina (Banker y Cowan, 1977 y 1979; Banker, 1980; Bartlett y Banker, 1984a y 1984b; Wallicke y col., 1986; Dotti y col., 1988; Mattson y col.,

1988; Goslin y Banker, 1989; Baas y col., 1989; Dotti y Simons, 1990; Mattson y col., 1990; Fischer y Romano-Clarke, 1991; Campagne y col., 1992, entre otros); aunque también se han empleado otras, como la papaína (Fiszman y col., 1990; Enokido y Hatanaka, 1993; Eshlar y col., 1993), la colagenasa y pronasa, o la colagenasa y dispasa (Pennypacker y col., 1991). Las células mutiladas son empleadas para la realización de cultivos, usados ampliamente para estudiar la diferenciación de las células piramidales. "In vitro" se ha estudiado principalmente la aparición de la polaridad celular y la morfogénesis, así como algunos mecanismos moleculares que podrían estar implicados en estos procesos (citados anteriores). Sin pretender cuestionar los resultados de los experimentos "in vitro", ya anticipamos que nuestros resultados sobre morfogénesis evidencian que la morfogénesis "in vitro" no simula en absoluto el proceso "in vivo", y que por lo tanto sería necesario mejorar el sistema "in vitro" para poder estudiar los procesos moleculares de la morfogénesis de manera más aproximada a lo que ocurre "in vivo". En buena lógica, el cultivo de células piramidales simularía mejor el proceso de diferenciación "in vivo" si se sembraran células menos dañadas. Nuestro método de disgregación es mucho menos traumático que los actualmente utilizados, pues disocia las células embrionarias con un grado de integridad muy superior a los métodos empleados, y podría contribuir a mejorar el sistema de cultivo de neuronas piramidales. Nuestro grupo está ya, de hecho, empeñado en conseguirlo.

El método de disociación utilizado en nuestro trabajo es enzimático y mecánico, y se diferencia de los actualmente utilizados en que 1) empleamos una proteasa nueva, que es un complejo multienzimático de mayor actividad proteolítica que las proteasas conocidas, y por ésto usamos una concentración 50-200 veces menor; 2) la relación masa de tejido/volumen de disociación es mayor que la utilizada en los métodos corrientes; 3) el pH de

la solución de incubación es 6,2 y se mantiene estable en nuestras condiciones sin necesidad de tamponar el medio (resultados no incluidos en este trabajo de tesis), mientras que los otros métodos utilizan un pH de 7,2-7,4; 4) la temperatura (33°C) es menor que la generalmente usada para disgregar tejido embrionario (37°C) (Prada y col., 1991); 5) la ayuda mecánica es mucho menos traumática que en otros métodos.

Es obvio que la proteasa FYSE preserva la membrana plasmática de las células piramidales en diferenciación y que, por lo tanto, podría actuar a modo de tijera, digiriendo específicamente alguna/s proteína/s de la matriz extracelular. Nuestros experimentos (Tabla I) indican que la concentración óptima de proteasa varía con el estadio, aumentando a medida que éste aumenta. El aumento de la concentración de proteasa podría ser debido precisamente a aumento en la concentración de cierta/s molécula/s de la matriz extracelular que específicamente fuesen digeridas por la proteasa. En esta hipótesis trabajamos actualmente; aunque hay otras explicaciones posibles para el aumento de concentración de proteasa, como por ejemplo el aumento de superficie de membrana a separar. Las células incrementan sus prolongaciones a medida que avanza el desarrollo, y hay producción celular en el giro dentado (incrementa el número de células), todo lo cual explica un aumento de superficie de membrana. La Tabla I indica que a P7 se necesita mucha más proteasa que a P6, y sin embargo no se aprecia en estos estadios un incremento brusco de la complejidad de las células que suponga un gran aumento de superficie de membrana, y que pudiera explicar ese incremento de concentración de proteasa. Estos resultados, junto con otras evidencias obtenidas disgregando otros tejidos nerviosos, como es la retina (Prada y col., 1991) o el cerebelo (Vigara, 1992, tesis doctoral) nos inclinan hacia la hipótesis de que la concentración de proteasa aumenta en función de la concentración de la/s molécula/s que específicamente digiere.

Es preciso hacer hincapié en que el grado de integridad morfológica no es el mismo de P0 a P11. Las células salen más completas entre P0 y P8 que a partir de este estadio, como puede apreciarse en la Fig. 13. A partir de P11 las disociaciones empeoran aunque aumentemos o disminuyamos la concentración de proteasa.

En nuestras disociaciones óptimas, el porcentaje de células piramidales que hemos llamado bien preservadas oscila entre el 60-77% (según el estadio) de las piramidales obtenidas. La viabilidad celular es muy alta (92-98%) y el número de piramidales por hipocampo de P7 (120.000) supone un 25% del total de piramidales (320.000 por hipocampo de rata adulta según Schlessinger, 1978). Ningún otro método de disociación extrae las células piramidales del hipocampo de rata con semejante grado de integridad, viabilidad y eficacia, en animales jóvenes. En ratas adulta, sin embargo, los métodos empleados por Kay y Wong (1986), Kaneda y col. (1988) y Chad y col. (1991) permiten obtener células piramidales útiles para estudiar la fisiología de su membrana. El método de Kay y Wong podría ser comparable en eficacia al nuestro, puesto que obtiene un 10-20% de células de CA1 (aproximadamente 1200 ± 450 /hipocampo), pero este método no disocia el hipocampo de animales jóvenes.

Nuestro método de disgregación permite obtener otras células, no piramidales, del hipocampo y giro dentado. Tiempos cortos de incubación con la proteasa (5-10 minutos), proporcionan una población prácticamente pura de células de glía del hipocampo y algunas células de los strata más externos. Tiempos superiores (10-15 minutos) permiten obtener un alto número de células granulares del giro dentado. Tiempos de 20 minutos de incubación y superiores, muestran una mezcla de todos los tipos celulares, incluidas las piramidales, en alta proporción. Estos resultados abren la posibilidad de purificar las diferentes poblaciones celulares del hipocampo con fines bioquímicos. Por otra parte, la

utilidad de las células así disgregadas para el estudio a nivel celular y molecular de la diferenciación del hipocampo, es un campo de investigación que este trabajo de tesis deja abierto. Similar aplicación ha sido ya demostrada por nuestro grupo en investigaciones sobre la neurogénesis y diferenciación de la retina (Prada y col., 1991; Prada y col., 1994).

6.2. SEMIDISGREGACION DE RODAJAS

Rodajas frescas de tejido del SNC se utilizan ampliamente para estudios de electrofisiología (Skrede y Westgaard, 1971; Schwartzkroin, 1981; Bilkey y Schwartzkroin, 1990; Roberts y col., 1990; Kolodziejczyk y col., 1990; Lin, 1990; Eisemman, 1991, por citar algunos).

Con la misma proteasa utilizada para la disgregación completa del hipocampo hemos demostrado que se pueden semidisgregar rodajas de tejido fresco, de manera que las células piramidales no quedan totalmente dispersas, sino separadas de forma laxa, sin perder sus formas y posiciones relativas. Esto se ha conseguido, como hemos visto, realizando rodajas lo más finas posible (50-100 μm) por el mismo procedimiento empleado para estudios de electrofisiología, e incubando a continuación durante un tiempo muy corto en solución de proteasa a concentración igual o más alta que la utilizada para disgregar completamente el hipocampo. La preparación de rodajas semidisgregadas no tiene precedente.

De acuerdo con el punto de vista de Jacobson (1993), las neuronas no funcionan ni se desarrollan aisladamente, sino agrupadas en núcleos o capas. Por lo tanto, siendo muy importante el estudio de la morfogénesis de una célula, lo es aún más el estudio de la morfogénesis del conjunto de células que forman una capa o núcleo. Las rodajas semidisgregadas ofrecen la posibilidad de observar cientos de células, y por lo tanto se puede estudiar

la morfogénesis de las células individualmente y en su conjunto como una población. Esto es precisamente lo que hemos hecho en el presente trabajo de tesis, estudiar la morfogénesis de cada célula piramidal y del conjunto de células piramidales, en cada área del hipocampo. Así hemos obtenido el patrón espacial de morfogénesis.

La obtención de rodajas puede realizarse bien por corte manual, por vibratomo, o mediante "chopper". El grosor de las secciones es muy importante para la observación con nitidez de las células semidisgregadas, resultando especialmente difícil realizar manualmente secciones de grosor regular y suficientemente finas (rodajas de más de 150 μm no permiten obtener imágenes claras). Determinados autores (Alger y col., 1984), opinan que las rodajas realizadas mediante "chopper" tienen el inconveniente de la compresión del tejido al incidir la cuchilla sobre el mismo. La compresión del tejido no tiene un efecto detectable a nivel microscópico en las rodajas semidisgregadas. Tampoco ha resultado ser un problema importante para los numerosos electrofisiólogos que han hecho las rodajas de este modo. Kaneda y col. (1988) indican haber conseguido mejores resultados (menos necrosis celular) en las disgregaciones de hipocampo adulto cortado manualmente que en las de tejido cortado con "chopper". Nosotros no hemos encontrado diferencias sustanciales en las rodajas semidisgregadas utilizando uno u otro procedimiento. Sin embargo, pensamos que la obtención de rodajas mediante "chopper" enlentece el proceso de disgregación, lo cual puede aumentar la muerte celular; pero, por otro lado, las rodajas se obtienen de grosor más fino y uniforme utilizando "chopper", lo cual permite la penetración más rápida de la proteasa y resultados más uniformes.

El estudio de las formas mediante rodajas semidisgregadas tiene ventajas respecto a la utilización de otro método clásico ampliamente utilizado, el de Golgi, puesto que: 1)

se puede observar un mayor número de células (el método de Golgi tiñe de forma aleatoria un 10% aproximadamente de células); 2) el proceso de preparación es mucho más rápido (1/2 hora en total, respecto a días e incluso meses que se tarda en hacer una tinción de Golgi, cuando hay éxito). La principal desventaja es que es una preparación fresca, que sólo es útil durante 3-4 horas. Por otra parte, el método de Golgi tiñe mal el SNC embrionario de la rata en los estadios más jóvenes, motivo por el cual, pensamos, no se ha estudiado en detalle la morfogénesis inicial de muchas neuronas. Nuestro estudio de morfogénesis de las células piramidales mediante rodajas semidisgregadas, muestra una información poblacional difícilmente obtenida a base de tinciones de Golgi. Las rodajas semidisgregadas podrían tener otras muchas aplicaciones en neurobiología, a nivel celular y molecular. El estudio de distribución de moléculas por métodos inmunohistoquímicos o radiactivos es una de ellas, sobre la que nuestro grupo tiene ya resultados preliminares.

6.3. PATRON ESPACIAL Y TEMPORAL DE MORFOGENESIS DE LAS CELULAS PIRAMIDALES

El estudio de la estructura y desarrollo del hipocampo, ha pasado por sucesivas etapas marcadas por el desarrollo de diferentes técnicas experimentales. En un principio, con el empleo de tinciones histológicas, se inició el estudio de la organización del hipocampo y de las restantes estructuras que integran la formación hipocampal y de su estratificación (Meynert, 1871; Krause, 1876; Giacomini, 1883; Toldt y Kahler, 1888; Duval, 1894; Kölliker, 1896; citados por Ramón y Cajal, 1909-1911 y Lorente de Nó, 1934). Esta etapa culmina con los trabajos de Ramón y Cajal (1909-1911), quien usando la técnica de Golgi, estudió los tipos celulares existentes en los distintos

estratos o capas del hipocampo y giro dentado.

A partir de los años 60, el descubrimiento de dos nuevas técnicas de experimentación, la autorradiografía y la microscopía electrónica, permitió estudiar la neurogénesis y examinar la ultraestructura del hipocampo. La autorradiografía ha permitido conocer el calendario de salida de ciclo de las células piramidales, así como la distribución de estas neuronas recién generadas (Angevine, 1965; Altman y Das, 1965, 1966; Altman, 1966; Bayer y Altman, 1974; Schlessinger y col., 1975; Schlessinger y col., 1978; Bayer, 1980a y b; Rakic y Nowakowski, 1981; Nowakowski y Rakic, 1981; Altman y Bayer, 1990; Jacobson, 1993); también ha permitido conocer los movimientos de las células en ciclo. La microscopía electrónica (Kaplan y Hinds, 1977; Seress y Ribak, 1985; Schlander y Frotscher, 1986; Lang y Frotscher, 1990; Seress y Frotscher, 1990; Seress y Ribak, 1990) ha proporcionado información sobre la ultraestructura de las células piramidales y no piramidales adultas y en diferenciación. En los últimos años se han utilizado técnicas de ultraestructurales y de inmunohistoquímicas (Sloviter, 1989; Deitch y col., 1990; Sloviter y col., 1991; Xue y col., 1991; entre otros), aportando nuevos datos acerca de la organización y heterogeneidad molecular de las células piramidales y no piramidales del hipocampo.

Nuestras técnicas de disgregación celular y semidisgregación permiten hacer estudios de población, añadiendo una nueva dimensión al estudio del desarrollo del hipocampo. Los resultados de morfogénesis no hubiera sido posible obtenerlos con ninguna de las técnicas hasta ahora disponibles. Con la clásica técnica de tinción de Golgi o las modernas técnicas de tinción de células por inyección intracelular (Gaiarsa y col., 1992) sólo se puede observar un pequeño número de células, y la reconstrucción mediante cortes ultrafinos de un gran número de células es tarea imposible.

Nuestros resultados muestran por primera vez un gradiente de morfogénesis de CA4 a CA1 de células piramidales más diferenciadas a menos diferenciadas. La neurogénesis en la rata comienza más o menos al mismo tiempo en todas las áreas y termina globalmente antes en CA3 que en CA1, si bien no hay referencias a CA4 (Bayer, 1980a). Por lo tanto, el gradiente de morfogénesis es concordante con el de terminación de neurogénesis. Es decir, las células que terminan primero de salir del ciclo (las de CA3) son las más avanzadas en morfogénesis, y las últimas en dejar el ciclo (CA1) son las más retrasadas en hacer morfogénesis. La neurogénesis (recordemos que es la producción de células) de todo el hipocampo se completa en 5 días, de E16 a E21 (Bayer, 1980a), mientras que la morfogénesis de CA1 a CA3 dura como mínimo 15 días, de E21 a P12, pues la emisión de espinas dendríticas es a posteriori. Esta larga duración nos ha permitido estudiar extensamente el proceso, siendo la razón por la que el gradiente espacial se observa durante tantos días, P0-P11.

El patrón espacial de neurogénesis de las células piramidales presenta diferencias interesantes en las especies de vertebrados. En ratón, Angevine (1965) encontró un gradiente de comienzo de neurogénesis de CA1 a CA3 (E10-E12) y un gradiente de terminación de neurogénesis desde CA2 a CA3 y a CA1, no haciendo referencia a CA4. Por lo tanto, CA2 es el área que primero termina la neurogénesis (en E15), y después CA3 y CA1 a la vez (E18). La morfogénesis de las células piramidales del ratón no está estudiada en detalle, por lo que se desconoce si sigue el gradiente de comienzo o el de terminación de neurogénesis. En el mono, Rakic y Nowakowski (1981) encontraron que la neurogénesis comienza más o menos al mismo tiempo en todas las áreas del hipocampo, mientras que hay un gradiente de terminación de neurogénesis de CA2 a CA3, propagándose después a CA1 y CA4, que terminan a la vez. Tampoco está estudiada en detalle la morfogénesis de las células piramidales en esta especie, por lo

que desconocemos si existe gradiente espacial y, si existiese, si sigue el de terminación de neurogénesis.

Sería importante conocer en detalle la morfogénesis de las células piramidales en ratón y mono, para poder saber si existe la misma relación con los gradientes de neurogénesis que nosotros hemos encontrado en la rata. El interés en estudiar la morfogénesis en esas especies radica en que la relación encontrada por nosotros en hipocampo no es la misma que la encontrada en la retina de los vertebrados. En la retina de pollo y ratón (Prada y col., 1991; Young, 1985) la neurogénesis de la mayoría de los tipos celulares empieza y termina en el área central antes que en la periférica y la morfogénesis empieza y termina en el área central antes que en la periférica. Esto indica que las células que dejan primero el ciclo, empiezan primero la diferenciación, y las últimas en dejar el ciclo son las últimas en diferenciarse, sugiriendo un "reloj interno" de la célula programado para que ocurran una serie de sucesos en el tiempo. El modelo de diferenciación de las células piramidales del hipocampo parece más complejo en este sentido, puesto que, para empezar, los gradientes de comienzo y terminación de neurogénesis son diferentes en una misma especie y entre especies. En la medida en la que entendamos las diferencias en los procesos básicos del desarrollo de las distintas regiones del SNC, pensamos que avanzaremos en el conocimiento de éste.

Las células piramidales de CA4 varían poco en las formas durante el desarrollo postnatal, ya que realizan la morfogénesis prenatalmente, mientras que las células de las otras áreas la hacen postnatalmente, a pesar de que todas ellas terminan la neurogénesis prenatalmente. Bayer (1980a) en su esquema de neurogénesis (Fig. 16) no distingue el área CA4, pero el esquema indica que sería la porción más próxima al hilus del llamado sector CA3c. Por consiguiente, podemos asumir que la neurogénesis en CA4 termina cuando las células del sector CA3c,

o sea en E21, lo cual es un día más tarde incluso que CA1, que termina en E20, y en conclusión terminan todas (CA1-CA4) a tiempos muy próximos. Por lo tanto, la morfogénesis en CA4 ocurre mucho más rápidamente (3 días, desde el final de la neurogénesis a P0) que en las otras áreas, y las preguntas son ¿por qué empieza primero la morfogénesis en CA4 y quién le da la señal de comienzo?, o bien ¿qué retrasa la morfogénesis en CA3-CA1?, preguntas para las que no hay respuesta por el momento.

Nuestros resultados muestran que durante el proceso de morfogénesis la prolongación apical se bifurca en un punto que se aproxima cada vez más al soma. Somos nosotros los primeros en hablar de este proceso. Sin embargo, Stensaas (1967 a-f), quien estudió ampliamente la histogénesis del hipocampo de conejo entre E15 y E28, mediante la técnica de Golgi, muestra que en E22 (Fig. 9 de Stensaas, 1967d) hay un gradiente de CA1 a CA4 de células con el punto de bifurcación de la dendrita apical cada vez más próximo al soma. Estudiando detenidamente las formas de las células, se observa además que en CA3 hay muchas más células que en CA1 con dendritas basales y prolongación apical muy ramificada. Entre E22 y E28 (Fig.9 de Stensaas, 1967b; y lámina 3 de Stensaas, 1967f) se observa que el punto de bifurcación se acerca al soma en todas las áreas. Por lo tanto, la morfogénesis de las células piramidales parece ocurrir de forma similar en rata y conejo. Sin embargo, no sabemos si la neurogénesis ocurre también de manera similar en ambas especies, al no estar estudiado en conejo.

Banker y Cowan (1979) hicieron un estudio "in vitro" de la morfogénesis de las células piramidales del hipocampo de rata, y compararon las células diferenciadas "in vitro" con las correspondientes "in vivo". Es decir, cultivos de 8 días de células disgregadas en E18 las compararon con células de rata P4. La Fig. 7 de estos autores muestra un grupo de células de CA3 y otro grupo de CA1 teñidas por el método de Golgi. Las células de

CA3 tienen el punto de bifurcación de la prolongación apical muy próximo al soma, mientras que las de CA1 lo tienen a mayor distancia y las distancias son variables, igual que muestran nuestros resultados (Fig. 18).

De nuestros resultados y de los dibujos de Stensaas (1967 a-f) se deduce que el proceso de ramificación de la prolongación apical (futura dendrita apical) comienza en la porción distal de la misma y progresa hacia el segmento proximal. A medida que el punto de bifurcación se acerca al soma se van ramificando las prolongaciones distales, pero no se forman prolongaciones entre el punto de bifurcación y el soma. Nosotros no hemos observado conos de crecimiento saliendo de las prolongaciones, ni en las rodajas semidisgregadas, ni en las células disgregadas. En los numerosos dibujos de Stensaas tampoco se observa ni un solo cono de crecimiento. Sin embargo los dibujos a cámara lúcida de células de P4 teñidas por el método de Golgi por Banker y Cowan (1979) muestran algunos engrosamientos, supuestos conos de crecimiento, en el extremo de algunas prolongaciones. Esta discrepancia se podría explicar suponiendo que nuestro método de disgregación desorganiza los conos de crecimiento (lo cual explicaría que no se observen), y que el proceso de formación del árbol dendrítico es diferente en rata y conejo. En la rata cada prolongación sería formada por un cono de crecimiento, mientras que en el conejo no habría conos de crecimiento y las prolongaciones crecerían en forma filiforme.

Siendo posible que los conos de crecimiento de las células piramidales fuesen muy sensibles a la proteasa FISE y se desorganizasen o fuesen digeridos por ésta, hemos de decir que los conos de crecimiento dendrítico de las células de Purkinje de pollo y rata, y los conos de crecimiento de las prolongaciones de las células de glía (Müller) embrionaria de la retina de pollo se disgregan con sus prolongaciones más finas. La utilización de marcadores de moléculas específicas de conos de crecimiento, así

como de tinciones de Golgi, es parte de la experimentación que pensamos realizar para intentar resolver la controversia.

Sea como fuese el mecanismo por el que se forma el árbol dendrítico apical de la célula piramidal, nuestros resultados y los de Stensaas (1967 a-f) muestran que determinadas células, durante el proceso de morfogénesis, tienen el punto de bifurcación mucho más cerca del soma que otras, y algunas de esas sólo tienen un par de ramificaciones en el extremo distal de las dos prolongaciones que salen del punto de bifurcación. Stensaas ilustra ampliamente cómo va modelándose el árbol apical, y en sus dibujos llama la atención el que cada prolongación aparece bifurcada en dos de la misma longitud, y la uniformidad en longitud de los árboles apicales de cada área. Estos resultados indican que la prolongación apical inicial se bifurca en su extremo distal en dos y es este punto de bifurcación el que se aproxima al soma, a la vez que cada rama que sale del punto de bifurcación inicial se bifurcaría en dos distalmente y estos nuevos puntos de bifurcación se acercarían al soma, y así sucesivamente. Esta interpretación explicaría el que no aparezcan conos de crecimiento, pues las prolongaciones no parecen nacer desde los puntos de bifurcación. En apoyo de esta interpretación están las células antes mencionadas que poseen el punto de bifurcación inicial mucho más próximo que sus compañeras y los puntos de bifurcación secundarios muy distantes del inicial, lo cual podría indicar diferencias en la velocidad de acercamiento al soma de los puntos de bifurcación del árbol apical de una misma célula.

Las células no piramidales del área CA3 también van más avanzadas en la diferenciación que las de CA1, estableciéndose los circuitos inhibitorios en CA3 antes que en CA1 (Seress y col., 1989; Lang y Frotscher, 1990). La ventaja de las células piramidales de CA3 en realizar la morfogénesis respecto a CA1 podría estar relacionada, por una parte con la avanzada

diferenciación de las células no piramidales de CA3, y por otra con la llegada de aferencias al hipocampo. Aunque no se conoce en detalle el calendario de llegada de cada una de las aferencias, sí se sabe que las fibras procedentes de la corteza entorrinal y el hipocampo contralateral llegan antes a CA3 que a CA1 (Loy y col., 1977; Fricke y Cowan, 1977; Loy, 1980). Varias líneas de evidencia que exponemos a continuación apoyan la relación mencionada.

Las células no piramidales GABAérgicas se generan antes que las piramidales y se diferencian rápidamente, puesto que sintetizan GABA enseguida (Seress y Riback, 1988). Las células en cesto (GABAérgicas) hacen sinapsis antes sobre CA3 que sobre CA1 en los primeros días del desarrollo postnatal (Seress y col., 1989). El papel del GABA como morfógeno está todavía en investigación, pero las evidencias obtenidas "in vitro" parecen consistentes. En relación a esto, es interesante mencionar que nuestros resultados muestran un mayor número de somas triangulares en CA3 que en CA1 todo a lo largo del desarrollo (Fig. 22) y que precisamente el soma es el que recibe sinapsis GABAérgicas. Las aferencias procedentes de la corteza entorrinal, parte de las del septum, las colaterales Schaffer y las fibras musgosas son glutamatérgicas, e interesantemente existen experimentos "in vitro" cuyos resultados implican a los receptores de glutamato en la emisión de prolongaciones dendríticas (Mattson y col., 1988; Brewer y Cotman, 1989). De alguna manera este receptor contribuye a generar una señal que incrementa las ramificaciones del árbol dendrítico (Brewer y Cotman, 1989). Por lo tanto, sería razonable pensar que las aferencias glutamatérgicas están implicadas en la diferenciación del árbol dendrítico. Sin embargo, la morfogénesis inicial de las células piramidales podría ser independiente, o no altamente dependiente, de los contactos entre neuronas y de las aferencias, puesto que las células piramidales adoptan formas parecidas a "in

vivo" cuando son cultivadas a baja densidad, sobre poli L-lisina, y en un medio suplementado con suero fetal (Banker y Cowan, 1977, 1979).

Un 12% de las neuronas del hipocampo son no piramidales (Dietz y col., 1987), es decir, el 90% aproximadamente son piramidales. No descartamos que en nuestro estudio hayamos incluido como piramidal alguna célula que en realidad no lo es, pero serían muy pocas. Dada la proporción de piramidales, podemos afirmar, 1º que el 90% de las células estudiadas en los disgregados son piramidales y 2º, el estudio en rodajas semidisgregadas nos permitió estudiar sólo las de la capa de piramidales. No obstante, habría un pequeñísimo número de células no piramidales en la capa de piramidales (Lang y Frotscher, 1990) que podrían haber sido incluidas como piramidales en el estudio de las rodajas semidisgregadas. No nos cabe duda, pues, de que la secuencia de morfogénesis mostrada en la Fig. 23 es la de las células piramidales.

El área CA3 es la mayor de todas, CA2 es muy pequeña comparativamente y CA1 es bastante más pequeña que CA3 y mayor que CA2. En el estudio cuantitativo de la longitud del soma al punto de bifurcación de la prolongación apical en disgregados (Fig. 21A), las proporciones de células en los rangos de longitud media (C) y pequeña (D) son más parecidas a las de CA3 (Fig. 20) que a las de CA1 o CA4. Esto es concordante con el hecho de que CA3 sea el área mayor de todas y, por lo tanto, la mayoría de formas medidas son de CA3. Sin embargo, las proporciones de células de longitud grande (B) y muy grande (A) son más parecidas a CA1, porque éstas formas no están en el área CA4 y apenas están en las áreas CA2 y CA3. Las diferencias en el número de células en los rangos de longitud medio y pequeño entre las Figs. 21 A y B no son reales, puesto que en el análisis conjunto de las áreas (Fig. 21B) estamos contabilizando dos áreas cuantitativamente menores, CA2 y CA4, como si fuesen cuantitativamente iguales,

puesto que en todas ellas evaluamos 30 células. Por lo tanto las diferencias entre A y B se pueden explicar metodológicamente, y podemos concluir que las formas obtenidas en los disgregados son representativas del conjunto de formas del hipocampo en cada estadio.

6.4. CONTENIDO EN ADN DE LAS CELULAS PIRAMIDALES

Nuestros resultados muestran que la población de células piramidales del hipocampo de la rata P11 tiene un contenido medio de ADN 2,6C. Esta cantidad está, pues, por encima del contenido diploide 2C de las células control, los leucocitos de la misma especie. Los histogramas de las figuras 28 y 30 muestran que una pequeña subpoblación de células piramidales, el 7%, tiene valores de ADN muy próximos a 4C; el resto de la población tiene valores 2C o intermedios entre 2C y 4C. La Fig. 27 muestra un contenido 2C para las células de glía.

Nuestros resultados difieren de los obtenidos anteriormente por algunos autores en gato (Herman y Lapham, 1968) y rata (Novakova y col., 1970), quienes encontraron que las células piramidales son todas tetraploides, es decir 4C. Sin embargo, podrían ser más parecidos a los obtenidos por Marshak y col., (1983), quienes encontraron que "la mayoría de las neuronas piramidales de ratas adultas jóvenes son diploides" (información obtenida a través de Mares y col., 1985). Nuestros resultados no muestran una población mayoritaria de células diploides. En condiciones óptimas de hidrólisis, $19 \pm 1^{\circ}\text{C}$, obtuvimos un 58% de células con medidas de ADN por encima de los de la población de células control, a las que identificamos como piramidales triangulares (Fig. 28); un número pequeño de éstas son las que tienen valores 4C, al tener prácticamente el doble de la media del contenido de ADN de la población control. Al no haber leído

el artículo de Marshak y col. (1983) por estar en ruso, no sabemos el grado de coincidencia de los resultados, ni sabemos los detalles de la metodología empleada por estos autores. Si hubiesen utilizado la misma metodología (citofotometría en tejido aplastado) que en su estudio anterior del contenido de ADN de las células de Purkinje del cerebelo de la rata (Mares y Van der Ploeg, 1980), las condiciones de hidrólisis (ClH 5N, 60 min, a 20-22°C) podrían no ser óptimas. Nosotros encontramos que a 22°C, a los 60 minutos de hidrólisis tanto leucocitos como células piramidales tienen medidas de ADN muy bajas, próximas a las de comienzo de hidrólisis (Fig. 29). En estas condiciones, el contenido medio de ADN de las piramidales resulta sólo ligeramente superior o igual al de las células control, y la mayoría de las células piramidales tienen las medias de ADN de la población control, apenas hay dispersión.

Hay múltiples argumentos ya dados por otros autores (Cohen y col., 1973; Fujita, 1974; Mares y Van der Ploeg, 1980; Swartz y Bhatnagar, 1981; Mares y col., 1985), para explicar los resultados de los trabajos que han obtenido valores 4C de ADN en todas las células piramidales del hipocampo y células de Purkinje del cerebelo. Swartz y Bhatnagar (1981) hacen una revisión exhaustiva de las múltiples fuentes de error, tanto de metodología como de interpretación, que puede haber en los estudios de contenido de ADN por cualquiera de los métodos utilizados (citofotometría, bioquímica o autorradiografía), y concluyen que la controversia sobre la existencia o no de cantidades poliploides de ADN en determinadas neuronas no está resuelta. Ningún trabajo realizado en los últimos 13 años la ha resuelto, desde nuestro punto de vista.

Nosotros hemos controlado cuidadosamente las múltiples variables que pueden introducir error en los resultados cuando se utiliza la técnica de citofotometría y se tiñen los núcleos por el método de Feulgen. Este método exige gran meticulosidad en su

realización (Decosse y Aiello, 1966; Fox, 1969; Duijndam y Duijin, 1973; Kjellstrand, 1977; Navarrete y col., 1983; Rasch, 1985).

En la disgregación de las células utilizamos una proteasa de la que se podría pensar que distorsiona, de alguna manera (por ejemplo digiriendo proteínas nucleares) la estructura del ADN. Esta posibilidad queda descartada por los resultados obtenidos en un primer trabajo realizado en nuestro laboratorio por López-López (1991). En un mismo portaobjetos extendió eritrocitos de pollo control (recién extraídos, sin tratamiento alguno), eritrocitos incubados durante 30 minutos en sacarosa a concentración isotónica, a 34°C, y eritrocitos incubados 30 minutos, a 34°C, en sacarosa a concentración isotónica más proteasa a la concentración habitual empleada para extraer células nerviosas. Este experimento se realizó incubando 45 y 60 minutos. El resultado es que los valores de ADN son similares en todas las condiciones y la forma de los eritrocitos tampoco se altera en ninguno de los casos, siendo indistinguibles de los control.

Experimentos en nuestro laboratorio en los que se incubaron las células control en solución de proteasa disuelta en sacarosa a concentración hipotónica, dieron como resultados lecturas de ADN de los eritrocitos aumentadas. Otros autores (García, 1968; Mayall, 1969; Mares y col., 1985) obtuvieron los mismos resultados trabajando con gotas de sangre de conejo y con leucocitos humanos. Sometidas estas células a medios hipotónicos, se hinchan y sus núcleos aparecen en mal estado (próximos a lisarse). Sus valores de ADN en estas condiciones son superiores a los normales. Debido a esto, en nuestro trabajo, las células control se extendieron directamente (eritrocitos de pollo) o tras resuspenderse en solución salina isotónica (leucocitos) y las células problema se extrajeron en solución de proteasa disuelta en sacarosa a concentración isotónica (10,26%).

Usamos como fijador etanol absoluto-ácido acético glacial (3:1), porque 1) es el fijador más ampliamente utilizado (Denham, 1967; Herman y Lapham, 1968; Lapham, 1968; Fox, 1969; Lentz y Lapham, 1969; Bachman, 1972; Navarrete et al, 1978 y 1983; Mann, 1978; Barberá et al, 1979; Sans y de la Torre, 1979; Swartz y Bhatnagar, 1981; Allison et al, 1981) y 2) ha sido usado para estudiar el contenido de ADN de las células piramidales del hipocampo de gato (Herman y Lapham, 1968). El tiempo de fijación fue siempre de 45 minutos. El tipo de fijador y el tiempo de fijación son factores a tener muy en cuenta a la hora de buscar repetitividad en los resultados, puesto que es conocido que los fijadores acuosos dan una variabilidad de las medias de ADN mayor que los fijadores no acuosos, como es el etanol-acético, y que cuando se utilizan estos últimos, a medida que aumenta el tiempo de fijación aumenta la variabilidad. A este respecto es interesante decir que en todos los trabajos en los que las neuronas piramidales del hipocampo y Purkinje del cerebelo han resultado tener un contenido 4C de ADN, el fijador ha sido no acuoso (etanol-acético, o Carnoy) y tiempos más largos (4-5 horas para etanol-acético y 12 horas para Carnoy) que los utilizados en nuestro trabajo. Sin embargo, son varios los trabajos que obtuvieron un contenido 2C en células de Purkinje del cerebelo usando fijadores no acuosos que omiten el tiempo de fijación (Mares y Lodin, 1973; Mann y col., 1978; Mares y col., 1985), por lo que no podemos concluir que el tiempo de fijación sea el factor determinante o contribuyente de la discrepancia.

Numerosos trabajos (Decosse y Aiello, 1966; Fox, 1969; Kjellstrand, 1977 y 1980; Mares y van der Ploeg, 1980; Navarrete et al, 1983; Rasch, 1985) indican la conveniencia de que la hidrólisis se realice a baja temperatura (ambiental) y concentración elevada de ácido clorhídrico (5N), ya que de este modo se consigue una meseta de valores máximos de ADN, lo suficientemente amplia como para que pequeñas variaciones del

tiempo de hidrólisis no modifiquen las lecturas del ADN. Cuando se realiza a alta temperatura y baja concentración de HCl, el tiempo óptimo resulta ser muy corto, y pequeñas modificaciones en el tiempo de hidrólisis inducen grandes variaciones en la lectura de ADN. Nuestros resultados indican que es necesario controlar la temperatura estrictamente, puesto que aún en el rango de temperatura ambiente se obtienen variaciones en la curva de hidrólisis. A $19\pm 1^{\circ}\text{C}$ la curva de hidrólisis presenta una meseta de valores máximos de ADN, mientras que a 22°C no hay una meseta, y esto implica que es necesario controlar estrictamente el tiempo de hidrólisis cuando se hace a esta última temperatura.

En las curvas de hidrólisis se distingue una primera fase ascendente (véase Figs. 26 y 27) interpretada como la hidrólisis temprana en la que se produce la hidrólisis progresiva y parcial de las bases púricas, con el consiguiente aumento del número de aldehídos libres para unirse a la leucofucsina; la meseta de valores máximos se interpreta como el final de la despurinización (permaneciendo todavía los grupos fosfatos intactos) y el inicio de la hidrólisis total, que comienza hacia el final de la meseta (el número de grupos teñibles en esta fase prácticamente no varía); la tercera fase es la caída de la curva, resultado de la degradación progresiva del complejo polimérico residual, que conlleva la disminución del número de grupos que pueden unir la leucofucsina, al perderse las purinas. La despurinización depende principalmente de la concentración del ácido empleado. La temperatura lo que hace es acelerar la reacción de hidrólisis y favorecer la velocidad de degradación enormemente (Kjellstrand, 1977, 1980). Esto indica que a temperaturas altas se puede producir pérdida de ADN antes de que la hidrólisis exponga todos los grupos aldehídos, y en estas condiciones la reacción de Feulgen se aleja de ser estequiométrica. Estas consideraciones fueron las que nos llevaron a elegir como condiciones óptimas de la tinción de

Feulgen 90 minutos de hidrólisis con HCl 5N a $19 \pm 1^\circ\text{C}$. Ninguno de los estudios que preceden al nuestro, indican haber realizado curvas de hidrólisis a las temperaturas de trabajo para obtener el tiempo óptimo de hidrólisis, y ninguno indica específicamente haber controlado la temperatura, desprendiéndose de ellos que temperatura ambiente es entendida en un rango entre 19 y 28°C .

La rehidratación después de la fijación, así como los lavados con agua destilada fría, después de la hidrólisis clorhídrica, y los lavados con agua sulfurosa, tras la aplicación del reactivo de Schiff, se realizaron de forma rigurosa, pues son extremadamente importantes para el mantenimiento de la morfología celular y para que sólo el reactivo de Schiff que se una al ADN estequiométricamente quede en el núcleo (Navarrete et al, 1983). Ciertos autores recomiendan sustituir el lavado final con agua destilada por tampón fosfato-citrato a pH 5.6 antes de la deshidratación y montaje, pues así se conseguirían valores más altos de absorbancia y mayor estabilidad de los preparados (Duijndam y Duijin, 1973; Mares y van der Ploeg, 1980). Sin embargo, nuestras preparaciones no fueron sometidas a deshidratación e inclusión en medio de montaje, al comprobarse que los perfiles celulares se perdían. Nuestras muestras, después de ser lavadas consecutivamente con agua sulfurosa y destilada, se secaron con aire seco y se almacenaron en oscuridad hasta la lectura de ADN. Este procedimiento ha sido ampliamente utilizado por otros autores (véase Navarrete et al, 1983).

La utilización de secciones de tejido para determinar por citofotometría el contenido de ADN ha sido cuestionada por los autores de los trabajos que han encontrado a las células piramidales y de Purkinje con contenido 2C (Cohen y col., 1973; Mann y col., 1978; Mares y Van der Ploeg, 1980; entre otros), quienes han utilizado tejido aplastado ("squash"), o extensiones de núcleos del tejido a estudiar. Otros autores que utilizando secciones de tejido han obtenido también contenido 2C (Fujita,

1974; Swartz y Bhatnagar, 1981) explican la dificultad de medir el contenido de ADN en un solo núcleo en secciones, cuando puede haber fracciones de núcleos o núcleos enteros por debajo del seleccionado, y también indican que el citoplasma de otras células puede estar incrementando la absorbancia. Este problema está gráficamente muy bien explicado en Swartz y Bhatnagar (1981); en este mismo trabajo se comenta la falta de fiabilidad de los trabajos que han utilizado preparaciones de núcleos. Estamos de acuerdo con Swartz y Bhatnagar en que la absorbancia inespecífica no explica la diferencia de resultados entre los grupos discrepantes. Pensamos además que el uso de tejido aplastado no elimina el problema de la absorbancia inespecífica puesto que la posibilidad de que quede ADN y citoplasma de células rotas por debajo del núcleo a medir, como consecuencia del arrastre al realizar la preparación, no se elimina.

Nosotros hemos utilizado células disgregadas, las cuales eliminan los problemas que plantean las secciones y los "squash" a la hora de medir el contenido de ADN; hemos determinado el tiempo óptimo de hidrólisis para las células a estudiar; hemos hecho un control meticuloso de otros factores que son fuente de error; en cada medición hemos realizado el blanco sobre el citoplasma de la célula a medir, y no cabe duda de que en estas condiciones los resultados obtenidos son completamente fiables. Además, el contenido medio en ADN de los eritrocitos, leucocitos y células piramidales (población total) determinado en UA en las extensiones que contenían los tres tipos de células juntas: 9,3; 20,7 y 23,09, respectivamente (gráficas no mostradas), está en la misma relación que los contenidos absolutos conocidos para las células control (3 y 6,7pg respectivamente para eritrocitos y leucocitos). Así mismo, para las células piramidales resulta un contenido de 7,4pg; lo cual está muy próximo a los 7,7pg que corresponden al valor que se obtuvo en las extensiones de piramidales y leucocitos (Fig. 26),

e indican la fiabilidad de nuestros experimentos.

Sólo podemos especular sobre el contenido extra de ADN obtenido en las células piramidales triangulares. Las células con contenido entre 2C y 4C podrían tener secuencias altamente repetitivas, las cuales podrían explicar el contenido extra del ADN. Las secuencias repetitivas constituyen una gran fracción del genoma de eucariontes superiores (Alberts et al, 1983 y Singer, 1982) incluso en células de bajo contenido en ADN (Martínez-Zapater et al, 1986). En apoyo de nuestra interpretación está el hecho de que determinados trabajos (Flavell et al, 1974; Flavell, 1982) muestran que la fracción del genoma que corresponde a ADN repetitivo aumenta con el aumento en el contenido de ADN, y proponen que las variaciones en el contenido en ADN entre las especies se deben principalmente a la variación en la cantidad de ADN repetitivo. La pequeña población de células con contenido 4C podría explicarse bien por una elevada cantidad de ADN repetido, o bien por abandono del ciclo en la fase G₂. La demostración de estas hipótesis podría obtenerse si se lograsen separar las dos poblaciones celulares piramidales y se estudiase el contenido de ADN repetitivo en el genoma de ambas poblaciones mediante las técnicas de biología molecular desarrolladas para estos estudios. Después habría que identificar las secuencias repetidas, en un intento de entender el significado biológico de las mismas.

La relación obtenida en nuestro estudio entre morfología general de las células piramidales y contenido en ADN, indica heterogeneidad en la población de células piramidales. Interesantemente la heterogeneidad de esta población también es molecular y funcional, no sólo morfológica y de contenido en ADN. Por ejemplo, la proteína fijadora de Ca⁺⁺, Calbindina, sólo la tienen en niveles detectables por inmunohistoquímica determinadas piramidales, y la diversidad funcional (patrón de respuesta electrofisiológica a un estímulo dado) en relación a la morfología, ha sido demostrado en células de una misma área. Todo

esto indica complejidad de funcionamiento de las células piramidales, y nos hace reflexionar sobre lo lejos que estamos de entender el significado biológico del contenido extra de ADN.

7. CONCLUSIONES

- 1) La proteasa FYSE, a diferencia de las proteasas actualmente disponibles para la disgregación del SNC, disgrega las células piramidales en proceso de diferenciación del hipocampo de rata recién nacida (P0-P11) preservando su morfología. Este hecho, junto con las concentraciones extremadamente bajas de proteasa FYSE necesarias para la disgregación, son una fuerte evidencia de que rompe específicamente alguna o algunas proteínas de la matriz extracelular, sin afectar de forma importante a las de la membrana plasmática.
- 2) Hemos puesto a punto un método de semidisgregación de rodajas de hipocampo utilizando la proteasa FYSE, cuya utilidad para estudiar el desarrollo del SNC hemos puesto en evidencia en este trabajo de tesis doctoral.
- 3) La morfogénesis de las células piramidales del hipocampo de la rata no es un proceso sincrónico, ya que no ocurre al mismo tiempo en todas las áreas del *stratum pyramidale*, sino que sigue un gradiente espacio-temporal.
- 4) La morfogénesis del área CA4 ocurre en su mayor parte prenatalmente, mientras que la morfogénesis de las áreas CA1 a CA3 ocurre en su mayor parte postnatalmente, desde P0 a P12, periodo durante el cual se observa un gradiente de células más diferenciadas a menos diferenciadas de CA3 a CA1. Por lo tanto, CA4 termina la morfogénesis antes que CA3, ésta antes que CA2, y ésta antes que CA1.

- 5) Hemos mostrado como durante el proceso de diferenciación de la dendrita apical de las neuronas piramidales, el punto de bifurcación inicial de la prolongación apical se acerca progresivamente al soma, a medida que aparecen más prolongaciones distales en un patrón dicotómico sin, aparentemente, formación de conos de crecimiento. Este proceso parece muy diferente al seguido por neuronas principales de otras porciones del SNC para diferenciar su árbol dendrítico.
- 6) El valor medio en unidades arbitrarias del contenido de ADN por célula, en la población total de células piramidales, corresponde a 2,3C. Por lo tanto, tienen un contenido de ADN superior al de las células de la población control 2C.
- 7) El análisis del contenido de ADN de las subpoblaciones de células piramidales ovaladas y triangulares ha revelado que las ovaladas tienen un contenido 2C, mientras que las triangulares tienen un contenido medio de 2.6C, aproximándose un 7% de éstas a un contenido 4C. En base a este análisis, concluimos que una población pequeña de células piramidales triangulares son tetraploides, la mayoría de las células piramidales triangulares tienen contenido entre 2C y 4C, y las células piramidales ovaladas tienen un contenido 2C.

6. BIBLIOGRAFIA

- Alberts, D.; Bray, D.; Lewis, J.; Raff, M.; Roberts, K. and Watson, J. D. (1983). *Biología molecular de la célula*. Ed. Omega. Barcelona.
- Alberts, D.; Bray, D.; Lewis, J.; Raff, M.; Roberts, K. and Watson, J. D. (1992). *Biología molecular de la célula*. Ed. Omega. Barcelona.
- Alger, B. E.; Dhanjal, S. S.; Dingledine, R.; Garthwaite, J.; Henderson, G.; King, G. L.; Lipton, P.; North, A.; Schwartzkroin, P. A.; Sears, T. E.; Segal, M.; Whittingham, T. S. and Williams, J. (1984). En: *Brain slices*. Dingledine, R. (Ed). Plenum Press, New York. pp:381-437.
- Allison, C. D.; Ridelfo, P. F.; Rasch, E. M.; Rasch, R. W. and Johnson, T. S. (1981). Increased accuracy of absorption cytophotometric DNA values by control of stain intensity. *J. Histochem. and Biochem.*, 29:1219-1228.
- Althaus, H. H. and Neuhoff, V. (1982). Isolation and culture of brain cells and their experimental use. En: *Molecular approaches to neurobiology*. Ed. Brown, I. R. Academic Press. New York. pp:341-403.
- Altman, J. (1966). Autoradiographic and histological studies of postnatal neurogenesis (II). *J. Comp. Neurol.*, 128:431-474.
- Altman, J. and Bayer, S. A. (1990). Prolonged sojourn of developing pyramidal cells in the intermediate zone of the hippocampus and their settling in the Stratum Pyramidale. *J. Comp. Neurol.*, 301:343-364.
- Altman, J. and Das, G. D. (1965). Autoradiographic and histological evidence of postnatal hippocampal neurogenesis in rats(I). *J. Comp. Neurol.*, 124:319-336.
- Altman, J. and Das, G. D. (1966). Autoradiographic and histological studies of postnatal neurogenesis(I). *J. Comp. Neurol.*, 126:337-390.
- Amaral, D. G. (1978). A Golgy study of cell types in the hilar region of the hippocampus in the rat. *J. Comp. Neurol.*, 182:851-914.

- Amaral, D. G. (1993). Emerging principles of intrinsic hippocampal organization. *Current Opinion in Neurobiol.*, 3:225-229.
- Amaral, D. G.; Insausti, R. and Cowan, W. M. (1984). The commissural connections of the monkey hippocampal formation. *J. Comp. Neurol.*, 224:307-336.
- Amaral, D. G. and Kurz, J. (1985). The time of origin of cells demonstrating glutamic acid decarboxylase-like immunoreactivity in the hippocampal formation of the rat. *Neurosci. Lett.*, 59:33-39.
- Andersen. P. (1975). Organization of hippocampal neurons and their interconnections. En: *Hippocampus Vol. I: Structure and Development*. Ed. Isaacson, R. L. and Karl, H. Pribram. Plenum Press, New York. pp:155-175.
- Andersen, P; Blackstad, T. W. and Lomo, T. (1966). Location and identification of excitatory synapses on hippocampal pyramidal cells. *Exp. Brain Res.*, 1:236-248.
- Angevine, J. B. (1965). Time of origin in the hippocampal region. An autoradiographic study in the mouse. *Exp. Neurol. Suppl.* 2:1-70.
- Angevine, J. B. (1970). Time of neuron origin in the diencephalon of the mouse. *J. Comp. Neurol.*, 139: 129-187.
- Angevine, J. B. (1975). Development of the hippocampal region. En: *The Hippocampus. Vol. I*. Eds. Isaacson, R. L. and Pribram, K. H. Plenum, NY, pp 61-94
- Baas, P. W.; Black, M. M. and Banker, G. A. (1989). Changes in microtubule polarity orientation during the development of hippocampal neurons in culture. *J. Cell Biol.*, 109:3085-3094.
- Bachman, K. (1972). Genome size in mammals. *Chromosoma*, 37:85-93.
- Banker, G. A. (1980). Trophic interactions between astroglial cells and hippocampal neurons in culture. *Science*, 209:809-810.
- Banker, G. A. and Cowan, W. M. (1977). Rat hippocampal neurons in dispersed cell culture. *Brain Res.*, 126:397-425.
- Banker, G. A. and Cowan, W. M. (1979). Further observations on hippocampal neurons in dispersed cell culture. *J. Comp. Neurol.*, 187:469-494.
- Barberá, E.; Caliani, M. J.; Pagés, M. and Alonso, C. (1979). Chromosomal DNA denaturation and reassociation in situ. *Exp. Cell. Res.* 119:151-162.

- Bayer, S. A. (1980a). Development of the hippocampal region in the rat. I. Neurogenesis examined with ³H-Thymidine autoradiography. *J. Comp. Neurol.*, 190:87-114.
- Bayer, S. A. (1980b). Development of the hippocampal region in the rat. II. Morphogenesis during embryonic and early postnatal life. *J. Comp. Neurol.*, 190:115-134.
- Bayer, S. A. (1982). Changes in the total number of the dentate granule cells in juvenile and adult rats: a correlated volumetric and 3H-thymidine autoradiographic study. *Exp. Brain Res.*, 46:315-323.
- Bayer, S. A. (1985). Neuron production in the hippocampus and olfactory bulb in the adult rat brain: addition or replacement?. *Ann. NY. Acad. Sci.*, 457:163-172.
- Bayer, S. A. and Altman, J. (1974). Hippocampal development in the rat: cytogenesis and morphogenesis examined with autoradiography and low level X-irradiation. *J. Comp. Neurol.*, 158:55-80.
- Bayer, S. A. and Altman, J. (1975). Radiation induced interference with postnatal hippocampal cytogenesis in rats and its long-term effects on acquisition of neurons and glia. *J. Comp. Neurol.*, 163:1-20.
- Bayer, S. A. and Altman, J. (1987). Directions in neurogenetic gradients and patterns of anatomical connections in the telencephalon. *Prog. Neurobiol.*, 29:57-106.
- Bartlett, W. P. and Banker, G. A. (1984a). An electron microscopic study of the development of axons and dendrites by hippocampal pyramidal neurons in culture. I. Cells which develop without intercellular contacts. *J. Neurosci.*, 4:1944-1953.
- Bartlett, W. P. and Banker, G. A. (1984b). An electron microscopic study of the development of axons and dendrites by hippocampal pyramidal neurons in culture. II. Synaptic relationships. *J. Neurosci.*, 4:1954-1965.
- Bernochi, G. and Scherini, E. (1981). Cytochemical study of chromatin changes in Purkinje cell population as markers of rat cerebellar histogenesis. *Acta Histochem.*, 69:206-216.
- Bilkey, D. K. and Schwartzkroin, P. A. (1990). Variation in electrophysiology and morphology of hippocampal CA3 pyramidal cells. *Brain Res.*, 514:77-83.
- Blackstad, T. W. (1956). Commisural connections of the hippocampal region in the rat with special reference to their mode of termination. *J. Comp. Neurol.*, 105:417-537.

- Blackstad, T. W. (1958). On the termination of some afferents to the hippocampus and fascia dentata. An experimental study in the rat. *Acta Anat.*, (Basel), 35:202-214.
- Blackstad, T. W.; Brink, K.; Hem, J. and Jeune, B. (1970). Distribution of hippocampal mossy fibers in the rat: an experimental study with silver impregnation methods. *J. Comp. Neurol.*, 138:433-450.
- Bohn, R. C. and Mitchell, R. B. (1976). Cytophotometric identification of tetraploid Purkinje cells in young and aged rats. *J. Neurobiol.*, 7:255-258.
- Bradom, W. F. (1960). Genedosage studies in polyploid hybrids of California newts. *J. Exp. Zool.*, 143:323-345.
- Braitenberg, V. and Schüz, K. (1983). Some anatomical comments on the hippocampus. En: *Neurobiology of the hippocampus*. Ed, Seifert, W. Academic, New York. pp 21-37.
- Bregnard, A.; Ruch, F.; Lutz, H. and Kuenzle, C. C. (1979). Histones and DNA increase synchronously in neurons during early postnatal development of the rat forebrain cortex. *Histochemistry*, 61:271-279.
- Brewer, G. T. and Cotman, C. W. (1989). NMDA receptor regulation of neuronal morphology in cultured hippocampal neurons. *Neurosci. Lett.*, 99:268-273.
- Campagne, M. van L.; Dotti, C. G.; Verklen, A. J.; Gispen, W.H. and Oestreicher, A. B. (1992). Redistribution of B-50 /growth-associated protein 43 during differentiation and maturation of rat hippocampal neurons in vitro. *Neurosci.*, 51:601-619.
- Cardinali, D. P. (1992). *Manual de neurofisiología*. Ediciones Díaz de Santos.
- Caviness, V. S. (1973). Time of neuron origin in the hippocampus and dentate gyrus of normal and reeler mutant mice: an autoradiographic analysis. *J. Comp. Neurol.* 151:113-120.
- Chad, J. E.; Stanford, I.; Wheal, H. V.; Williamson, R. and Woodhall, G. (1991). Dissociated neurons from adult rat hippocampus. En: *Cellular Neurobiology. A practical approach*. Edts. Chad, J. and Wheal, H. Irl. Press at Oxford University Press. pp: 19-37.
- Clarke, P. G. H. and Cowan, W. M. (1976). The development of the isthmo optic tract in the chick, with special reference to the occurrence and correction of development errors in the location and connections of the isthmo optic neurons. *J. Comp. Neurol.*, 167:143-164.

- Cohen, J.; Mares, V. and Lodin, Z. (1973). DNA content of purified preparation of mouse Purkinje neurons isolated by a velocity sedimentation technique. *J. Neurochem.*, 20:651-657.
- Conrad, L. C. A. ; Leonard, C. M. and Pfaff, D. W. (1974). Connections of the medial and dorsal raphe nuclei in the rat. I. An autoradiographic and degeneration study. *J. Comp. Neurol.*, 156:179-206.
- Crain, B.; Cotman, C.; Talor, D. and Lynch, G. (1973). A quantitative electron microscopic study of synaptogenesis in the dentate gyrus of the rat. *Brain Res.*, 63:195-204.
- Crespo, D.; Stanfield, B. B. and Cowan, W. M. (1986). Evidence that the late generated granule cells do not simply replace earlier former neurons in the rat dentate gyrus. *Exp. Brain Res.*, 62:541-548.
- Decosse, J. J. and Aiello, N. (1966). Feulgen hidrolisis effect of acid and temperature. *J. Histochem. and Cytochem.*, 14:601-604.
- Deitch, S. J.; Smith, K. L.; Lee, C. L.; Swann, J. W. and Turner, J. N. (1990). Confocal scanning laser microscope images of hippocampal neurons intracellularly labeled with biocytin. *J. Neurosci. Methods*, 33: 61-76.
- Denham, S. (1967). A cell proliferation study of the neural retina in the two days rat. *J. Embryol. Exp. Morph.*, 18:53-66.
- Dietz, S.; Frotscher, M. and Abt, K. (1987). Quantitative untersuchungen zur schichtenspezifischen. *Verh. Anat. Ges.*, 81:883-884
- Dotti, C. G. and Simons, K. (1990). Polarized sorting of viral glycoproteins to the axon and dendrites of hippocampal neurons in culture. *Cell*, 62:63-72.
- Dotti, C. G.; Sullivan, C. A. and Banker, G. A. (1988). The establishment of polarity by hippocampal neurons in culture. *J. Neurosci.*, 8:1454-1468.
- Duijndam, W. A. L. and Van Duijn, P. (1973). The dependance of the absorbance of the final chromophore formed in the Feulgen-Schiff reaction on the pH of the medium. *Histochem.*, 35:373-375.
- Edmonson, J. C. and Hatten, M. E. (1987). Glial guided granule neuron migration in vitro: a high resolution time lapse video microscopic study. *J. Neurosci.*, 7:1928-1934.

- Eisenman, L. M.; Schalekamp, M. P. A. and Voogd, J. (1991). Development of the cerebellar cortical efferent projection: an in-vitro anterograde tracing study in brain slices. *Develop. Brain Res.*, 60:261-266.
- Engelhardt, E.; Esberard, C. A. and Alburquerque, A. M. (1967). Development del cellules pyramidales de l'hippocampe chez le rat. *C. R. Soc. Biol. (Paris)*, 161:1165-1168.
- Enokido, Y. and Hatanaka, H. (1993). Apoptotic cell death occurs in hippocampal neurons cultured in a high oxygen atmosphere. *Neurosci.*, 57:965-972.
- Eshlar, N.; Petralia, R. S.; Winters, C. A.; Niedzielski, A. S. and Wenthold, R. J. (1993). The segregation and expression of glutamate receptor subunits in hippocampal neurons. *Neurosci.*, 57:943-964.
- Fasman, G. D. (1976). *Handbook of biochemistry and molecular biology. Nucleic acids*, vol. II. (1976). Ed, Fasman, G. D. CRC Press, Inc.
- Fernández, V. (1969). An autoradiographic study of development of the anterior thalamic group and limbic cortex in the rabbit. *J. Comp. Neurol.*, 136:423-452.
- Fernández, V. and Bravo, H. (1974). Autoradiographic study of development of the cerebral cortex in the rabbit. *Brain Behav. Evol.*, 9:317-332.
- Feulgen, R. and Rossenbeck, H. (1924). Mikroskopisch-chemischer Nachweis einer Nucleinsäure vom Typus der Thymonucleinsäure und die darauf beruhende elektive Färbung von Zellkernen in mikroskopischen Präperaten. *Hoppe Seylers Z. Physiol. Chem.*, 135:203-248.
- Fischer, I. and Romano-Clarke, G. (1991). Association of microtubule-associated protein (MAP1B) with growing axons in cultured hippocampal neurons. *Molec. and Cell Neurosci.*, 2:39-51.
- Fiszman, M. L.; Novotny, E. A.; Lange, G. D. and Backer, J. L. (1990). Embryonic and early postnatal hippocampal cells respond to nanomolar concentration of muscimol. *Develop. Brain Res.*, 53:186-193.
- Flavell, R. B. (1982). Repeated sequences and genome architecture. En: *Structure and function of plant genomes*. Edts. Ciferri O. Dure III. L. Plenum Press. London P. 1.
- Flavell, R. B.; Bennet, M. D.; Smith, J. B. and Smith, D. B. (1974). Genome size and the proportion of repeated nucleotide sequence DNA in plants. *Biochem. Genet.*, 12:257-269.

- Fox, D. P. (1969). Some characteristics of the cold hydrolysis technique for staining plant tissues by the Feulgen reaction. *J. Histochem. and Cytochem.*, 17:266-272.
- Frankhauser, G. (1941). Cell size, organ and body size in triploid newts (*Triturus viridescens*). *J. Morphol.*, 68:161-177.
- Frankhauser, G. (1945a). Maintenance of normal structure in heteroploid salamander larvae, through compensation of changes in cell size by adjustment of cell number and cell shape. *J. Exp. Zool.*, 100:445-455.
- Frankhauser, G. (1945b). The effects of changes in chromosome number on amphibian development. *Quart. Rev. Biol.*, 20:20-78.
- Frankhauser, G.; Vernon, J. A.; Frank, H. and Slack, W. V. (1955). Effect of size and number of brain cells on learning in larvae of the salamander (*Triturus viridescens*). *Science*, 122:692-693.
- Fricke, R. A. and Cowan, W. M. (1977). An autoradiographic study of the development of the entorhinal and hippocampal afferents to the dentate gyrus of the rat. *J. Comp. Neurol.*, 173:231-250.
- Fujita, S. (1974). DNA constancy in neurons of the human cerebellum and spinal cord as revealed by Feulgen; cytophotometry and cytofluorometry. *J. Comp. Neurol.*, 155:195-202.
- Fujita, S.; Shimada, M. and Nakamura, T. (1966). ³H-Thymidine autoradiographic studies on the cell proliferation and differentiation in the external and internal granular layers of the mouse cerebellum. *J. Comp. Neurol.*, 128:191-208.
- Gaarskjaer, F. B. (1978a). Organization of the mossy fiber system of the rat studied in extended hippocampi. I. Terminal area related to number of granule and pyramidal cells. *J. Comp. Neurol.*, 178:49-72.
- Gaarskjaer, F. B. (1978b). Organization of the mossy fiber system of the rat studied in extended hippocampi. II. Experimental analysis of fiber distribution with silver impregnation methods. *J. Comp. Neurol.*, 178:73-88.
- Gaarskjaer, F. B. (1986). The organization and development of the hippocampal mossy fiber system. *Brain Res. Rev.*, 11:335-357.

- Gaiarsa, J. L.; Beandoin, M. and Ben-Ari, Y. (1992). Effect of neonatal degranulation on the morphological development of rat CA3 pyramidal neurons: inductive role of mossy fibers in the formation of thorny excrescences. *J. Comp. Neurol.*, 321:612-625.
- Gaje, F. D. and Björklund, A. (1987). Compensatory collateral sprouting of aminergic systems in the hippocampal formation following partial deafferentation. En: *The Hippocampus*, Vol. III. Ed. Isaacson, R. L. and Pribram, K. H. Plenum Press New York. pp: 33-59.
- García, A. M. (1968). Feulgen-deoxyribonucleic acid values after nuclear swelling. *Proc. of the histochemical society.* 24:508-509.
- Goslin, K. and Banker, G. (1989). Experimental observation on the development of polarity by hippocampal neurons in culture. *J. Cell Biol.*, 108:1507-1516.
- Gottlieb, D. I. and Cowan, W. M. (1972). Evidence for a temporal factor in the occupation of available synaptic sites during development of the dentate gyrus. *Brain Res.*, 41:452-456.
- Gottlieb, D. I. and Cowan, W. M. (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.
- Guéneau, G. A.; Privat, A.; Drouet, J. and Court, L. (1982). Subgranular zone of the dentate gyrus of young rabbits as a secondary matrix: a high resolution autoradiographic study. *Dev. Neurosci.*, 5:345-358.
- Gurdon, J. B. (1959) Tetraploid frogs. *J. Exp. Zool.*, 141:519-543.
- Hamilton, L. (1976). Basic limbic system anatomy of the rat. Plenum, New York.
- Hamlyn, L. H. (1962). The fine structure of the mossy fibre endings in the hippocampus of the rabbit. *J. Anat.*, 96:112-120.
- Hatten, M. E. (1990). Riding the glial monorail: a common mechanism for glial guided neuronal migration in different regions of the developing mammalian brain. *TINS*, 13:179-184.
- Herman, C. J. and Lapham, L. W. (1968). DNA content of neurons in the cat hippocampus. *Science*, 160:537.

- Herman, C. J. and Lapham, L. W. (1969). Neuronal polyploidy and nuclear volumes in the cat central nervous system. *Brain Res.*, 15:35-48.
- Hine, R. J. and Das, G. D. (1974). Neuroembryogenesis in the hippocampal formation of the rat. An autoradiographic study. *Z. Anat. Entwickl. Gesch.*, 144:173-186.
- Hjorth-Simonsen, A. (1972). Projection of the lateral part of the entorhinal area to the hippocampus and fascia dentata. *J. Comp. Neurol.*, 147:219-232.
- Hjorth-Simonsen, A. (1973). Some intrinsic connections of the hippocampus in the rat: an experimental analysis. *J. Comp. Neurol.*, 147:145-161.
- Hjorth-Simonsen, A. and Jeune, B. (1972). Origin and termination of the hippocampal perforant path in the rat studied by silver impregnation. *J. Comp. Neurol.*, 144:215-232.
- Isaacson, R. L. (1987). Hippocampus. En: *Encyclopedia of Neurosciences*, Vol. I. Ed. Adelman, G. Birkhäuser, Basel, pp 492-495.
- Ishizuka, N.; Weber, J. and Amaral, D. (1990). Organization of intrahippocampal projections originating from CA3 pyramidal cells in the rat. *J. Comp. Neurol.*, 295:580-623.
- Jacobson, M. (1978). Clonal origins of the central nervous system: towards a developmental anatomy. *Zoon*, 6:149-156.
- Jacobson, M. (1993). *Developmental Neurobiology* (Third Edition). Ed. Plenum Press.
- Jacobson, M. and Hirose, G. (1978). Origin of the retina from both sides of the embryonic brain: a contribution to the problem of crossing the optic chiasma. *Science*, 202:637-639.
- Jay, T. M.; Glowinski, J. and Thierry, A. M. (1989). Selectivity of the hippocampal projection to the prelimbic area of the prefrontal cortex in the rat. *Brain Res.*, 505:337-340.
- Kahle, W.; Leonhardt, H. and Platzer, W. (1988). *Atlas de Anatomía. Tomo 3: Sistema nervioso y órganos de los sentidos*. Werner Kahle. Ediciones Omega Barcelona.
- Kaneda, M.; Nakamura, H. and Akaike, N. (1988). Mechanical and enzymatic isolation of mammalian CNS neurons. *Neurosci. Res.*, 5:229-315.
- Kaplan, M. S. (1981). Neurogenesis in the 3 month old rata visual cortex. *J. Comp. Neurol.*, 195:323-338.

- Kaplan, M. S. and Bell, D. H. (1984). Mitotic neuroblasts in the 9 day old and 11 month old rodent hippocampus. *J. Neurosci.*, 4:1429-1441.
- Kaplan, M. S. and Hinds, J. W. (1977). Neurogenesis in the adult rat. Electron microscopic analysis of light radioautographs. *Science*, 197: 1092-1094.
- Kay, A. R. and Wong, R. K. S. (1986). Isolation of neurons suitable for patch-clamping from adult mammalian central nervous systems. *J. Neurosci. Methods.*, 16:227-238.
- Kjellstrand, P. (1977). Temperature and acid concentration in the search for optimum Feulgen hydrolysis conditions. *J. Histochem. and Cytochem.*, 25:129-134.
- Kjellstrand, P. (1980). Mechanisms of Feulgen acid hidrolysis. *J. Microscopy.*, 119:391-396.
- Kolodziejzyk, E.; Serrant, P. and Graft, M. R. F. (1990). A simple rapid method to slice biological specimens: an application for non-embedded and embedded golgi stained tissue. *J. Neurosci. Methods*, 31:183-186.
- Krystosek, A. and Seeds, N. W. (1981a). Plasminogen activator secretion by granule neurons in cultures of developing cerebellum. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 78:7810-7814.
- Krystosek, A. and Seeds, N. W. (1981b). Plasminogen activator release at the neuronal growth cone. *Science*, 213:1523-1534.
- Lacaille, S.; Lim, Ch.; Sobreviela, T.; Mufson, E. J.; Hersch, L. B. and Saper, C. B. (1994). Cholinergic innervation in the human hippocampal formation including the entorhinal cortex. *J. Comp. Neurol.*, 345:321-344.
- Laatsch, R. H. and Cowan, W. M. (1966). Electron microscopic studies of the dentate gyrus of the rat. Normal structure with special reference to synaptic organization. *J. Comp. Neurol.*, 128:359-396.
- Lang, U. and Frotscher, M. (1990). Postnatal development of nonpyramidal neurons in the rat hippocampus (areas CA1 and CA3): a combined Golgi and electron microscope study. *Anat. Embryol.*, 181:533-545.
- Lapham, L. W. (1968). Tetraploid DNA content of Purkinje neurons of human cerebellar cortex. *Science*, 159:310-311.
- Lapham, L. W. and Johnstone, M. A. (1963). Cytologic and cytochemical studies of neuroglia. II. The occurrence of two DNA classes among glial nuclei in the Purkinje cell layer of normal adult human cerebellar cortex. *Arch. Neurol.*, 9:194-202.

- Lauberg, S. (1979). Commisural and intrinsic connection of the rat hippocampus. *J. Comp. Neurol.*, 189:685-708.
- LaVail, J. H. and Cowan, W. M. (1971). The development of the chick optic tectum. II. Autoradiographics studies. *Brain Res.*, 28:421-441.
- LaVail, J. H. and Wolf, M. K. (1973). Postnatal development of the mouse dentate gyrus in organotypic cultures of the hippocampal formation. *Am. J. Anat.*, 137:47-66.
- Lentz, R. D. and Lapham, L. W. (1969). A quantitative cytochemical study of the DNA content of neurons of rat cerebellar cortex. *J. Neurochem.*, 16:379-384.
- Lin, Ch. (1990). Applicability of fixed brain slice for ultrastructural study. *J. Neurosci. Methods*, 32:117-121.
- López, R. (1991). Neurogénesis y diferenciación de los fotorreceptores de la retina. Estudio en el embrión de pollo. Tesis Doctoral. U. C. M.
- López, M and Prada, C. (1992). A novel method in morphogenetic studies of the central nervous system of vertebrates. *International J. Develop. Neurosci.*, 10:90.
- 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.* 46:113-177.
- Loy, R. (1980). Development of afferent lamination in Ammon's horn of the rat. *Anat. Embryol.*, 159:257-275.
- Loy, R.; Lynch, G. and Cotman, C. W. (1977). Development of afferent lamination in the fascia dentata of the rat. *Brain Res.*, 121:229-243.
- Lübbers, K. and Frotscher, M. (1988). Differentiation of granule cells in relation to GABAergic neurons in the rat fascia dentata. Combined Golgi/EM and immunocytochemical study. *Anat. Embryol. (Berl.)*, 178:119-127.
- Lübbers, K.; Wolff, J. and Frotscher, M. (1985). Neurogenesis of GABA-ergic neurons in the rat fascia dentata. Combined Golgi/EM and immunocytochemical study. *Neurosci. Lett.*, 62:317-322.
- Mann, D. M. A. and Yates, P. O. (1973). Polyploidy in the human nervous system. I. DNA content of neurons and glia of the cerebellum. *J. Neurol. Sci.*, 18:183-196.
- Mann, D. M. A.; Yates, P. O. and Barton, C. M. (1978). The DNA content of Purkinje cells in mammals. *J. Comp. Neu.* 180:345-348.

- Manuelides, L. and Manuelides, E. E. (1974). On the DNA content of cerebellar Purkinje cells in vivo and in vitro. *Exp. Neurol.*, 43:192-206.
- Marés, V.; Crkovska, J.; Marsak, T. L. and Stipek, S. (1985). DNA content in nerve-cell nucleus. A biochemical and cytophotometric study of the rat cerebrum. *Neurosci.*, 16:45-47.
- Marés, V. and Van Der Ploeg, M. (1980). Cytophotometric re-investigation of DNA content in Purkinje cells of the rat cerebellum. *Histochemistry*. 69:161-167.
- Marés, V.; Lodin, Z. and Sacha, J. (1973). A cytochemical and Autoradiographic study of nuclear DNA in mouse Purkinje cells. *Brain Res.*, 53: 273-289.
- Marshack, T. L.; Mares, V.; Stipek, S. and Crkovska, J. (1983). On the problem of "extra-DNA" in the rat brain neurons. A cytochemical study. (in russian). *Citologia, U.S.S.R.* 25: 539-545.
- Martínez-Zapater, J. M.; Estelle, M. A. and Somerville, C. R. (1986). A highly repeated DNA sequence in *Arabidopsis thaliana*. *Mol. Gen Genet.* 204:417-423.
- Martoja, R. and Martoja, M. (1970). Técnicas de histología animal. Edt. Toray-Masson S. A. pp: 323-234.
- Mattson, M. P.; Don, P. and Kater, S. B. (1988). Outgrowth regulating actions of glutamate in isolated hippocampal pyramidal neurons. *J. Neurosci.*, 8:2087-2100.
- Mattson, M. P.; Murain, M. and Guthrie, P. B. (1990). Localized calcium influx orients axon formation in embryonic hippocampal pyramidal neurons. *Develop. Brain Res.*, 52:201-209.
- Mayall, B. H. (1969). Deoxyribonucleic acid cytophotometry of stained human leukocytes. I. Differences among cell types. *J. Histochem. and Cytochem.*, 17:249-257.
- Meibach, R. C. and Siegel, A. (1977). Efferent connections of the hippocampal formation in the rat. *Brain Res.*, 124:197-224.
- Minkwitz, H. (1976). Zur entwicklung der neuronenstruktur del hippocampus während der prä-und postnatalen ontogenese der albinoratte. I. Mitteilung: Neurohistologische Darstellung der entwicklung langaxoniger neurone aus den regionen CA3 and CA4. *J. Hirnforsch.*, 17:213-231.
- Monard, D. (1988). Cell derived proteases eiand protease inhibitors as regulators of neurite outgrowth. *Trends Neurosci.*, 11:541-544.

- Moore, R. Y. and Halaris, A. E. (1975). Hippocampal innervation by serotonin neurons of the midbrain raphe in the rat. *J. Comp. Neurol.*, 164:171-184.
- Navarrete, M. H.; de la Torre, C. and Schwartzkroin, J. B. (1978). Compartmentalizing the S period. *Cell Biol. Internationals Reports*, 2:607-613.
- Navarrete, M. H.; Secados Campos, E. y Martin Hurtado, S. (1983). Análisis citofotométrico de las condiciones óptimas de la tinción Feulgen. *Morfología normal y patológica. Sec. A, Vol 7/2*:239-247.
- Nieuwenhuys, R.; Voogd, J. and van Huijzen, Chr. (1982). SNC, sinopsis y atlas del sistema nervioso central humano. Editorial AC, Madrid.
- Nováková, V.; Sandritter, W. and Schluetter, G. (1970). DNA content of neurons in rat central nervous system. *Exp. Cell. Res.* 60:454-456.
- Nowakowski, R. S. and Rakic, P. (1979). The mode of migration of neurons to the hippocampus: a Golgi and electron microscopic analysis in foetal rhesus monkey. *J. Neurocytol.*, 8:697-718.
- Nowakowski, R. S. and Rakic, P. (1981). The site of origin and route and rate of migration of neurons to the hippocampal region of the Rhesus monkey. *J. Comp. Neurol.* 196:129-154.
- Ottersen, O. P. and Storm-Mathisen, J. (1989). Excitatory and inhibitory amino-acids in the hippocampus. En: *The Hippocampus. New vistas.* Edts. Chan-Palay, V. and Köhler, Ch. Alan R. Liss, Inc, NY. pp:97-119.
- Pennypacker, K.; Fischer, I. and Levitt, P. (1991). Early in vitro genesis and differentiation of axons and dendrites y hippocampal neurons analyzed quantitatively with neurofilament-H and microtubule-associated protein 2 antibodies. *Exp. Neurol.*, 111:25-35.
- Pickel, V. M.; Segal, M. and Bloom, F. E. (1974). A radioautographic study of the efferent pathways of the nucleus locus coeruleus. *J. Comp. Neurol.*, 155:15-42.
- Pittman, R. N. (1985). Release of plasminogen activator and a calcium dependent metaloprotease from cultures sympathetic and sensory neurons. *Dev. Biol.*, 110:91-101.
- Pittman, R. N. and Buettner (1989). Degradation of extracellular matrix by neuronal proteases. *Dev. Neurosci.*, 11:361-375.

- Prada, C.; Puelles, L.; Genis-Gálvez, J. M. and Ramírez, G. (1987). Two models of free migration of amacrine cell neuroblasts in the chick retina. *Anat. Embryol.* 175:281-287.
- Prada, C.; Puga, J.; Perez-Mendez, L.; López, R. and Ramírez, G. (1991). Spatial and temporal patterns of neurogenesis in the chick retina. *Europ. J. of Neurosci.*, 3:559-569.
- Prada, F. A.; Dorado, M. E.; Quesada, A.; Prada, C.; Schwarz, V. and De la Rosa, E. J. (1994). Early expression of a novel radial glial antigen in the chick embryo. Enviado para publicación.
- Raisman, G.; Cowan, W. M. and Powell, T. P. S. (1966). An experimental analysis of the efferent projection of the hippocampus. *Brain*, 89:83-108.
- Ramon y Cajal, S. (1911). *Histologie du système nerveux de l'homme et des vertébrés*. Vol II. Reeditada en 1972 por Instituto Ramón y Cajal, C.S.I.C., Madrid.
- Rapp, P. R. and Amaral, D. G. (1988). The time of origin of somatostatin immunoreactive neurons in the rat hippocampal formation. *Dev. Brain Res.*, 41:231-239.
- Rasch, E. M. (1985). DNA "standards" and the range of accurate DNA Stimates by Feulgen absorption microspectrophotometry. *Advances in Microscopy*.137-166.
- Rakic, P. (1974). Neurons in rhesus monkey visual cortex: systematic relation between time of origin and eventual disposition. *Science* 183:425-427.
- Rakic, P. and Nowakowski, R. S. (1981). The time of origin of neurons in the hippocampal region of the Rhesus monkey. *J. Comp. Neurol.* 196:99-128.
- Reznikov, K. Y. (1979). Dynamics of production of nervous and glial cells in the granular layer of the dentate gyrus in mice (in Russian). En: Hruschov NG (ed) *Cytological mechanisms of histogenesis*. Nauka Publishing House of the USSR Academy of Sciences, Moscow. pp 217-218.
- Reznikov, K. Y. (1981). Cell proliferation in the brain of vertebrates in conditions of normal development and under the brain trauma (in Russian). Nauka Publishing House of the USSR Academy of Sciences, Moscow.
- Reznikov, K. Y. (1991). Cell proliferation and cytogenesis in the mouse hippocampus. En: *Advances in Anatomy Embriology and Cell Biology* 122. Springer-Verlag.

- Rickmann, M.; Amaral, D. G. and Cowan, W. M. (1987). Organization of radial glial cells during the development of the rat dentate gyrus. *J. Comp. Neurol.*, 264:449-479.
- Roberts, E. L.; Rosenthal, Jr. M. and Sick, T. J. (1990). Age-related modifications of potassium homeostasis and synaptic transmission during and after anoxia in rat hippocampal slices. *Brain Res.*, 514:111-118.
- Sandritter, W. V.; Nováková, V.; Pilny, J. and Kiefer, G. (1967). Cytophotometrische messungen des nukleinsäure und proteingehaltes von ganglienzellen der ratte während der postnatalen entwicklung und im alter. *Z. Zellforsch. Mikroskop. Anat.*, 80:145-152.
- Sans, J. and de la Torre, C. (1979). G₀ and G_{0,2} cells as identified by their chromatin pattern in dormant and proliferating meristems. *European J Cell Biol.* 19:229-298.
- Schaffer, A. E. and Schnaar, R. L. (1983). The isolation and purification of neurons from the vertebrate central nervous system. In: *Current methods in cellular neurobiology*. J. L. Barker and Mckelvy, J. F. (Eds), Vol IV, Wiley, New York. pp:131-187.
- Schlander, M. and Frotscher, M. (1986). Non-pyramidal neurons in the guinea pig hippocampus. A combined Golgy-electron microscope study. *Anat. Embryol.*, 174:35-47.
- Schlessinger, A. R.; Cowan, W. M. and Gottlieb, D. I. (1975). An autoradiographic study of the time of origin and the pattern of granule cell migration in the dentate gyrus of the rat. *J. Comp. Neurol.*, 159:149-176.
- Schlessinger, A. R.; Cowan, W. M. and Swanson, L. W. (1978). The time of origin of neurons in Ammon's Horn and the associated retrohippocampal fields. *Anat. Embryol.*, 154:153-173.
- Schwartzkroin, P. A. (1981). To slice or not to slice. En: *Electrophysiology of Isolated Mammalian CNS Preparation*. Edts. Kerkut, G. A. and Wheal. H. V. Academic Press. pp: 15-45
- Seress, L. and Ribak, C. E. (1985). A combined Golgy-electron microscopic study of non-pyramidal neurons in the CA1 area of the hippocampus. *J. Neurocytology* 14:717-730.
- Seress, L. and Ribak, C. E. (1988). The development of GABAergic neurons in the rat hippocampal formation. An immunocytochemical study. *Dev. Brain Res.*, 44:197-209.

- Seress, L. and Frotscher, M. (1989). Local circuit neurons in both the dentate gyrus and Ammon's horn establish synaptic connections with principal neurons in five days old rats: a morphological basis for inhibition in early development. *Exp. Brain Res.*, 78:1-9.
- Seress, L. and Frotscher, M. (1990). Morphological variability is a characteristic feature of granule cells in the primate fascia dentata: a combined Golgi/electron microscope study. *J. Comp. Neurol.* 293:253-267.
- Seress, L. and Ribak, C. E. (1990). Postnatal development of the light and electron microscopic features of basket cells in the hippocampal dentate gyrus of the rat. *Anat. Embryol.*, 181: 547-565.
- Shepherd, G. M. (1979). The synaptic organization of the brain (Second edition). Oxford University Press.
- Sik, A.; Ylinen, A.; Penttonen, M. and Buzsáki, G. (1994). Inhibitory CA1 CA3 region feedback in the hippocampus. *Science*, 265:1722-1724.
- Singer, R. M. F. (1982). Highly repeated sequences in mammalian genomes. *International Review of Cytology*, 76:67-112.
- Skrede, K. K. and Westgaard, R. H. (1971). The transverse hippocampal slice: a well defined cortical structure maintained in vitro. *Brain Res.*, 35:589-593.
- Sloviter, R. (1989). Calcium-binding protein (Calbindin-D28K) and parvalbumin immunocytochemistry: localization in the rat hippocampus with specific reference to the selective vulnerability of hippocampal neurons to seizure activity. *J. Comp. Neurol.*, 280:183-196.
- Sloviter, R. S.; Sollas, A. L.; Barbaro, N. M. and Laxer, K. D. (1991). Calcium-binding protein (calbindin D-28K) and parvalbumin immunocytochemistry in the normal and epileptic human hippocampus. *J. Comp. Neurol.*, 308:381-390.
- Sperry, D.G. (1988a). Lumbar lateral motor column development in triploid *Xenopus laevis*. *J. Comp. Neurol.*, 278:446-452.
- Sperry, D. G. (1988b). Effects on increasing ploidy on the lumbar lateral motor column hindlimb of newly metamorphosed *Xenopus laevis*: a comparison of diploid and triploid sibling. *J. Comp. Neurol.*, 278:499-508.
- Stanfield, B. B. and Cowan, W. M. (1979a). The morphology of the hippocampus and dentate gyrus in normal and reeler mice. *J. Comp. Neurol.*, 185:393-422.

- Stanfield, B. B. and Cowan, W. M. (1979b). The development of the hippocampus and dentate gyrus in normal and reeler mice. *J. Comp. Neurol.*, 185:461-483.
- Stanfield, B. B.; Caviness, V. S. and Cowan, W. M. (1979). The organization of certain afferents to the hippocampus and dentate gyrus in normal and reeler mice. *J. Comp. Neurol.*, 185:461-484.
- Stensaas, L. J. (1967a). The development of hippocampal and dorsolateral pallial regions of the cerebral hemisphere in fetal rabbits. I. Fifteen millimeters stage, spongioblast morphology. *J. Comp. Neurol.*, 129:59-70.
- Stensaas, L. J. (1967b). The development of hippocampal and dorsolateral pallial regions of the cerebral hemisphere in fetal rabbits. II. Twenty millimeters stage, neuroblast morphology. *J. Comp. Neurol.*, 129:71-84.
- Stensaas, L. J. (1967c). The development of hippocampal and dorsolateral pallial regions of the cerebral hemisphere in fetal rabbits. III. Twenty-nine millimeters stage, marginal lamina. *J. Comp. Neurol.*, 130:149-162.
- Stensaas, L. J. (1967d). The development of hippocampal and dorsolateral pallial regions of the cerebral hemisphere in fetal rabbits. IV. Forty-one millimeters stage, intermedia lamina. *J. Comp. Neurol.*, 131:409-422.
- Stensaas, L. J. (1967e). The development of hippocampal and dorsolateral pallial regions of the cerebral hemisphere in fetal rabbits. V. Sixty millimeters stage, glial cell morphology. *J. Comp. Neurol.*, 131:423-436.
- Stensaas, L. J. (1967f). The development of hippocampal and dorsolateral pallial regions of the cerebral hemisphere in fetal rabbits. VI. Ninety millimeters stage, cortical differentiation. *J. Comp. Neurol.*, 132:93-108.
- Steward, O. (1976). Topographic organization of the projections from the entorhinal area to the hippocampal formation of the rat. *J. Comp. Neurol.*, 167: 285-314.
- Swanson, L. W. and Cowan, W. M. (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. and Cowan, W. M. (1979). The connection of the septal region in the rat. *J. Comp. Neurol.*, 186:621-656.

- Swanson, L. W. and Hartman, B. K. (1975). The central adrenergic system. An immunofluorescence study of the location and cell bodies and their efferent connections in the rat utilizing dopamine-B-hydroxylase as a marker. *J. Comp. Neurol.*, 163:467-506.
- Swanson, L. W.; Wyss, J. M. and Cowan, W. M. (1978). An autoradiographic study of the organization of intrahippocampal association pathways in the rat. *J. Comp. Neurol.*, 181:681-716.
- Swartz, F. J. and Bhatnagar, K. P. (1981). Are CNS neurons polyploid? A critical analysis based upon cytophotometric study of DNA content of cerebellar and olfactory bulbar neurons of the bat. *Brain Res.*, 208:267-281.
- Szarski, H. (1976). Cell size and nuclear DNA content in vertebrates. *Inv. Rev. Cytol.*, 44:93-111.
- Trice, J. E. and Stanfield, B. B. (1986). Evidence for the generation in adult rat dentate gyrus of neurons which extend axonal projections. *Ann. Neurol.*, 20:392.
- Ungerstedt, U. (1971). Stereotaxic mapping of monoamine pathways in the rat brain. *Acta Physiol. Biochem. Pharmacol.*, 98:11-61.
- Van Groen, Th. and Wyss, J. M. (1988). Species differences in hippocampal commissural connections: studies in rat, guinea pig, rabbit, and cat. *J. Comp. Neurol.*, 267:322-334.
- Vernon, J. A. and Butsch, J. (1957). Effect of tetraploidy on learning and retention in the salamander. *Science*, 125:1033-1034.
- Vigara, M. R. (1992). Diferenciación de las células de Purkinje. Estudio comparativo en cerebelo de pollo y rata. Tesis Doctoral. U. C. M.
- Voneida, Th. J.; Vardaris, R. M.; Fish, S. E. and Reiheld, C. T. (1981). The origin of hippocampal commissure in the rat. *The Anatomical Record* 201:91-103.
- Waymouth, Ch. (1974). To disaggregate or not to disaggregate, injury and cell disaggregation, transient or permanent?. *In vitro*, 10:97-111.
- Wallicke, P.; Cowan, W. M.; Uleno, N.; Baird, A. and Guillemín, R. (1986). Fibroblast growth factor promotes survival of dissociated hippocampal neurons and enhances neurite extension. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 33:3012-3016.
- Wyss, J. M.; Swanson, L. W. and Cowan, W. M. (1979). A study of subcortical afferents to the hippocampal formation in the rat. *Neurosci.*, 4:463-476.

- Xue, G. P.; Pliego-Rivero, B. and Morris, J. (1991). The surface glycoprotein Thy-1 is excluded from growing axons during development: a study of the expression of Thy-1 during axogenesis in hippocampus and hindbrain. *Dev.*, 112:161-176.
- Young, R. W. (1985). Cell differentiation in the retina of the mouse. *Anat. Rec.*, 212:199-205.