

17.771

T.O.  
C/97

**UNIVERSIDAD DE SEVILLA**  
**FACULTAD DE MEDICINA**

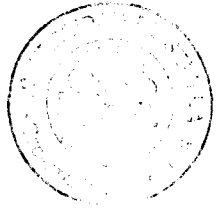
**DEPARTAMENTO DE CIENCIAS MORFOLOGICAS**

UNIVERSIDAD DE SEVILLA  
SECRETARIA GENERAL

Comisión de Exámenes de Grado Doctoral  
al nº 34 de 1990 de 75 del libro  
correspondiente. 2-007. 1990  
Sevilla, \_\_\_\_\_

El Jefe del Negociado de Tesis,

*Florencia Raffette*



Q.

**LA SUBSTANCIA NEGRA PARS COMPACTA  
DEL MONO ARDILLA  
Y EL SISTEMA NIGRO-ESTRIADO**

X

**Lcda. Dña. AMPARO CARMONA BONO**

**Sevilla, 1990**



UNIVERSIDAD DE SEVILLA  
FACULTAD DE MEDICINA

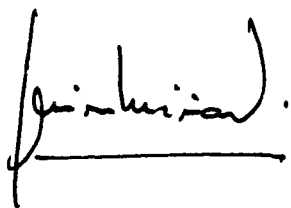
DEPARTAMENTO DE  
CIENCIAS MORFOLÓGICAS

AVDA. SANCHEZ PIZJUAN, 4  
TELEFONOS: (95) 437 11 81  
437 69 68  
FAX: 438 16 62  
41009 SEVILLA

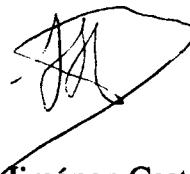
**JUAN JIMENEZ-CASTELLANOS BALLESTEROS**, Profesor Titular del Departamento de Ciencias Morfológicas, y **FRANCISCO JAVIER MIÑANO SANCHEZ**, Profesor Titular del Departamento de Farmacología de la Universidad de Sevilla.

**CERTIFICAN:** Que el trabajo titulado "**La substancia negra pars compacta del mono ardilla y el sistema nigro-estriado**", ha sido realizado bajo su dirección por la Lda. **D<sup>a</sup> Amparo Carmona Bono** para ser defendido como su Tesis Doctoral, y la autorizan por consiguiente para su presentación en el Negociado de Tercer Ciclo de esta Universidad.

Y para que así conste y surta los oportunos efectos a la interesada, lo firmamos en Sevilla, a uno de octubre de mil novecientos noventa.



Fdo. Fco. J. Miñano Sánchez



Fdo. J. Jiménez-Castellanos B.

**Excmo. Sr. Presidente de la Comisión del Doctorado. Universidad de Sevilla.**

*A mis padres  
A Juan  
A nuestro hijo*

## **AGRADECIMIENTOS**

**Al Prof. Jiménez-Castellanos Ballesteros**, director de esta tesis doctoral, mi más sincero agradecimiento y gratitud por brindarme la oportunidad de iniciarme en la investigación y darme todo tipo de facilidades para llevarla a buen fin. Su confianza en este proyecto y sus consejos, han sido de gran valor para mí.

**Al Prof. Miñano Sánchez**, mi agradecimiento por co-dirigir esta tesis.

A la **Prof. A.M. Graybiel**, catedrático de Neuroanatomía del Instituto Tecnológico de Massachusetts (M.I.T., Cambridge, EE.UU.), mi más rendido reconocimiento por su entrega y dedicación al trabajo. Su labor diaria es un estímulo continuo para los que hemos tenido la inmensa fortuna de trabajar a su lado. A ella le debo gran parte de lo que sé del laboratorio de Neuroanatomía. Sin su ayuda material y colaboración, este trabajo no hubiese sido posible.

**Al Prof. Jiménez-Castellanos y Calvo-Rubio**, por sus enseñanzas en nuestra Facultad y por el ejemplo y apoyo que me ha prestado siempre.

**Al Prof. Catalina Herrera**, por su inestimable amistad y constante cooperación durante la realización de este trabajo.

**Al Prof. Dorado Ocaña**, por su gran ayuda en el diseño y edición del texto, el cual nunca hubiera resultado el mismo sin su participación, agradeciéndole asimismo su paciencia y gran capacidad de trabajo.

**Al Instituto de Biología del Desarrollo** de la Facultad de Medicina de Sevilla, por su colaboración y medios puestos a mi disposición en la edición de esta tesis.

A todos y cada uno de los componentes del **Departamento de Ciencias Morfológicas**, que me ofrecieron su colaboración y animaron en todo momento.

Por último, a todos aquellos que con su apoyo incondicional y sus desinteresados consejos facilitaron y enriquecieron el resultado final de este trabajo, quiero con estas líneas expresarles mi gratitud sincera, profunda y entusiasta.

**LA SUBSTANCIA NEGRA PARS COMPACTA  
DEL MONO ARDILLA  
Y EL SISTEMA NIGRO-ESTRIADO**

**INDICE.**

	<b>Páginas</b>
<b>Abreviaturas.....</b>	<b>4</b>
<b>Justificación.....</b>	<b>6</b>
<b>Introducción.....</b>	<b>9</b>
1.-Organización anatómica de la sustancia negra.	
1.1.-La sustancia negra pars compacta (SNc).	
1.2.-La sustancia negra pars reticulata (SNr).	
1.3.-La sustancia negra pars lateralis (SNl).	
1.4.-La sustancia negra pars mixta (SNm).	
2.-El sistema dopaminérgico mesencefálico.	
2.1.-Grupo A10: el área tegmental ventral.	
2.2.-Grupo A9: la sustancia negra pars compacta.	
2.3.-Grupo A8: el área retrorrubral.	
3.-Heterogeneidad neuroquímica de la sustancia negra.	
<b>Material y Métodos.....</b>	<b>25</b>
1.-Casos experimentales.	
2.-Métodos.	
2.1.-Técnicas de trazado de conexiones nerviosas.	
2.2.-Cirugía.	
2.3.-Perfusión.	
2.4.-Microtomía de los bloques encefálicos y recogida de series histológicas.	

- 2.5.-Procesamiento de los cortes.
  - 2.5.1.-Tetrametilbenzidina (TMB).
  - 2.5.2.-Acetilcolinesterasa (AChE).
  - 2.5.3.-Inmunorreactividad a tirosina hidroxilasa (TH).
- 2.6.-Análisis de los cortes.

**Resultados.....43**

- 1.-Subdivisión histoquímica de la pars compacta (grupo A9).
- 2.-Marcaje neuronal en el complejo nigral.
  - 2.1.-Inyecciones en el núcleo caudado.
  - 2.2.-Inyecciones en el putamen.
  - 2.3.-Inyecciones mixtas (NC y Pu).
  - 2.4.-Inyecciones en la cápsula interna.

**Discusión.....98**

- 1.-Origen de la actividad acetilcolinesterásica en la substancia negra pars- compacta.
- 2.-Proyecciones nigro-caudadas y nigro-putaminales.
- 3.-Subdivisiones del estriado y compartimentación nigral.
- 4.-Consideraciones funcionales y clínicas.

**Bibliografía.....112**

**Resumen.....121**

**Conclusiones.....125**

**Figuras.....129**

## **ABREVIATURAS DE ICONOGRAFIA.**

**A8.-** Grupo dopaminérgico mesencefálico A8.

**A10.-** Grupo dopaminérgico mesencefálico A10.

**ATV.-** Area tegmental ventral de Tsai.

**BC.-** Brachium conjunctivum.

**C.-** Núcleo caudado.

**FR.-** Fascículo retroflexus de Meynert (tracto habénulo-interpeduncular).

**Ip.-** Núcleo interpeduncular.

**NC.-** Núcleo caudado.

**NM.-** Núcleos mamilares del Hipotálamo.

**NR.-** Núcleo rojo.

**P.-** Putamen.

**LM.-** Lemnisco medial.

**PC.-** Pedúnculo cerebral.



**SGC.-** Substancia gris central.

**SNC.-** Substancia negra, pars compacta.

**SNm.-** Substancia negra, pars mixta.

**SNr.-** Substancia negra, pars reticulata.

**StH.-** Núcleo subtalámico.

**TO.-** Tracto o cintilla óptica.

**III.-** Tercer par craneal (nervio motor ocular común).

## **JUSTIFICACION**

El estudio de la relación entre las neuronas dopaminérgicas del mesencéfalo y las neuronas del estriado (*núcleo caudado y putamen*) constituye un tema de gran interés desde el mismo momento en que la patogénesis de la enfermedad de Parkinson fue asociada a la degeneración de las neuronas dopaminérgicas del complejo nigral.

Hoy se sabe que grupos diferentes de neuronas dopaminérgicas se encuentran afectados en distintas entidades nosológicas. Por ejemplo, en la enfermedad de Parkinson de carácter idiopático, así como en otros síndromes parkinsonianos, incluyendo el parkinsonismo inducido por los metabolitos del tóxico 1-metil, 4-fenil, 1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP), la vía nigroestriada está mucho más afectada que la vía o sistema mesolímbico. Existen además otras neuronas dañadas en estos desórdenes parkinsonianos, incluyendo a neuronas del locus coeruleus y región pedunculopontina. Sin embargo, en estos dos síndromes mencionados la afectación neuronal más consistente y severa corresponde al propio complejo nigral. La implicación de estos patrones de degeneración se traduce en que los profundos déficits en el movimiento voluntario y otras actividades motoras, característicos del parkinsonismo, son probable y específicamente atribuibles a disfunciones de la innervación nigroestriada. Por lo tanto, el análisis de las relaciones funcionales entre estas neuronas dopaminérgicas y el estriado contribuirá a esclarecer los puntos de vista actuales sobre cómo el procesamiento de la información que llega y que sale del estriado afecta en último término al control del comportamiento motor voluntario.

Con el estudio de las conexiones nigroestriadas en el mono esperamos poder contribuir a dilucidar las relaciones neuroanatómicas que en condiciones de

normalidad ligan a estas estructuras encefálicas asociadas íntimamente a la patogénesis de la enfermedad de Parkinson.

# **INTRODUCCION**

# 1. ORGANIZACION ANATOMICA DE LA SUBSTANCIA NEGRA.

Las características neuroanatómicas de la sustancia negra han sido ampliamente descritas. Sin embargo estas descripciones difieren en lo concerniente a tipos neuronales, tamaño e incluso a la distribución de las neuronas que constituyen la sustancia negra.

Las clasificación de los tipos neuronales del complejo nigral se ha basado primordialmente en el estudio de material teñido: 1) por técnicas citológicas clásicas (Nissl o hematoxilina-eosina, por ejemplo); 2) por el método de Golgi; 3) por métodos que identifican elementos neuroquímicos específicos (por ejemplo métodos histofluorescentes o inmunohistoquímicos), y 4) por medio de cualquiera de los métodos anteriores utilizados conjuntamente con técnicas neuroanatómicas basadas en el transporte axonal de distintos trazadores.

Clásicamente y sobre la base de tipos y densidad neuronal, la sustancia negra es dividida en, al menos, dos regiones, la *pars compacta* (SNc), clásicamente considerada como el principal origen del sistema nigroestriado (LLAMAS Y REINOSO-SUAREZ, 1969), y la *pars reticulata* (SNr). Dorsolateral a la *pars compacta* se sitúa una tercera subdivisión, la *pars lateralis* (SNl), la cual, si bien individualizada por muchos autores, más frecuentemente es considerada como integrante de la *pars reticulata*. Una cuarta subdivisión, la *pars mixta* (SNm),



específica de los primates, generalmente no suele ser separada de la pars compacta. Sin embargo la diversidad de tipos celulares y proyecciones originadas en esta última región situada dorsalmente a la pars compacta sugieren que debería ser considerada como una zona distinta y separada del resto de la sustancia negra.

### **1.1. LA SUBSTANCIA NEGRA PARS COMPACTA (SNc).**

La pars compacta está constituida por numerosas neuronas que se encuentran densamente agrupadas. En secciones teñidas por la técnica de Nissl estas neuronas se caracterizan por una fuerte tinción citoplasmática, un núcleo pálido raramente situado en el centro de la célula y un nucleolo fuertemente teñido (POIRIER, GIGUERE y MARCHAND, 1983). Adicionalmente, la mayoría de las neuronas de la pars compacta contienen el neurotransmisor *dopamina* (ANDEN, CARLSSON, DAHLSTROM, FUXE, HILLARP y LARSSON, 1964; ARSENAULT, PARENT, SEGUELA y DESCARRIES, 1988). De acuerdo a FALLON y MOORE (1978), en la sustancia negra pars compacta de la rata se pueden distinguir dos grupos neuronales diferenciados. Un grupo celular dorsal, constituido por neuronas orientadas horizontalmente y que proyectan a regiones allocorticales, y otro grupo celular ventral, cuyas dendritas se orientan dorsoventralmente, y cuyas proyecciones se dirigen al estriado.

En el gato y mono una organización análoga no ha sido aún caracterizada, pero hay datos que evidencian claramente que existen grupos segregados de neuronas en la pars compacta y que estos grupos tienen unos patrones de proyecciones funcionalmente distintos. Incidiremos en mayor grado sobre las proyecciones eferentes de SNc en un apartado posterior, ya que básicamente nuestro trabajo va a estar centrado sobre las proyecciones nigro-estriadas.

## **1.2. LA SUBSTANCIA NEGRA PARS RETICULATA (SNr).**

No existe un límite definido entre la pars compacta y la pars reticulata de la sustancia negra, situada ventralmente. Estas dos regiones generalmente se diferencian, en primer lugar, por su densidad celular. En comparación con la SNC, existe un menor número de neuronas en la pars reticulata (88% menos en el mono según POIRIER et al., 1983), y además la SNr está mucho más difusamente organizada. Los cuerpos neuronales de SNr se hallan inmersos en una tupida red fibrilar. Estas fibras pueden ser claramente observadas en secciones procesadas para poner de manifiesto la inmunorreactividad frente a un neurotransmisor, el ácido gamma amino butírico (GABA), o neuropéptidos como la sustancia P o la encefalina (McLEAN, SKIRBOLL y PERT, 1985; MAI, STEPPHENS, HOPF y CUELLO, 1986; SMITH, PARENT, SEGUELA y DESCARRIES, 1987). La mayoría de las neuronas de la pars reticulata son igualmente inmunorreactivas frente a la enzima de síntesis gabaérgica ácido glutámico-dehidrogenasa (GAD) (MUGNAINI y OERTEL, 1985; SMITH et al., 1987).

Las principales proyecciones eferentes de las neuronas de la pars reticulata se dirigen al tálamo, colículo superior y al tegmento mesencefálico (FAULL y MEHLER, 1978; BECKSTEAD y FRANKFURTER, 1982; FRANCOIS, PERCHERON y YELNIK, 1984; JIMENEZ-CASTELLANOS y REINOSO-SUAREZ, 1985).

## **1.3. LA SUBSTANCIA NEGRA PARS LATERALIS (SNI).**

Situada dorsolateralmente en relación a la pars reticulata, las neuronas de la pars lateralis son muy similares a las de esta región nigral en cuanto a su forma y características tintoriales (POIRIER et al., 1983). Cuando esta subdivisión es individualizada del resto de la sustancia negra se distingue por su pobreza en



neuronas y el mayor tamaño de las mismas en relación a las de SNr (RIOCH, 1929; FRANÇOIS, PERCHERON, YELNIK y HEYNER, 1985).

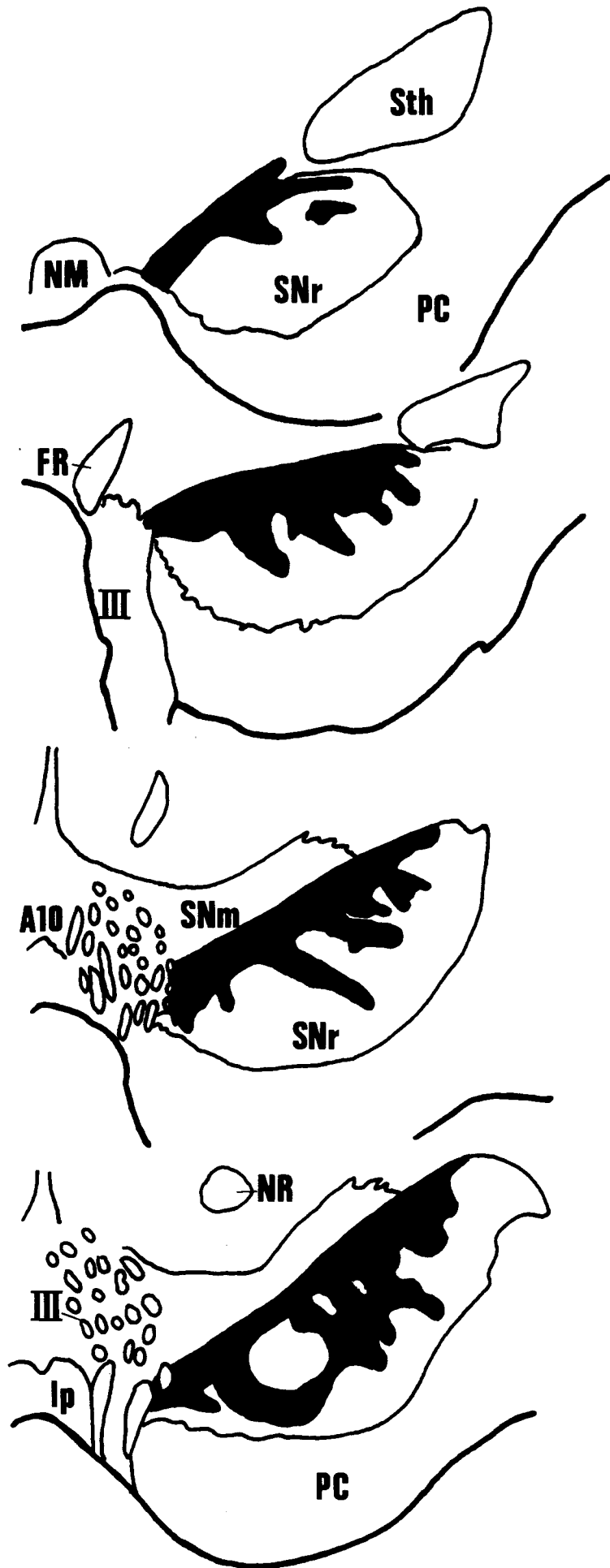
En el gato la pars lateralis es rica en fibras somatostatinérgicas (GRAYBIEL y ELDE, 1983). En el mono contiene prácticamente y con exclusividad sólo neuronas de proyección nigrotectal (FRANÇOIS et al., 1985).

#### **1.4. LA SUBSTANCIA NEGRA PARS MIXTA (SNm).**

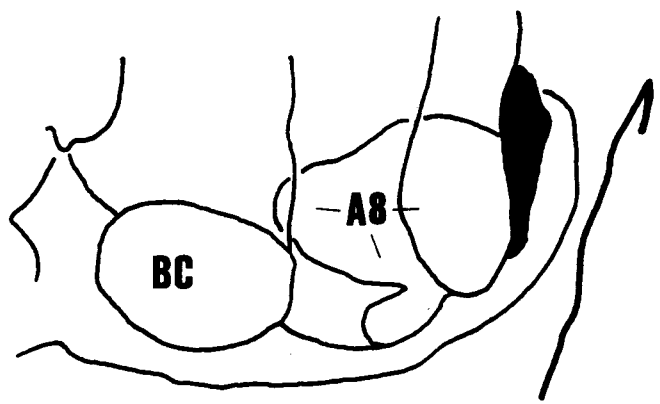
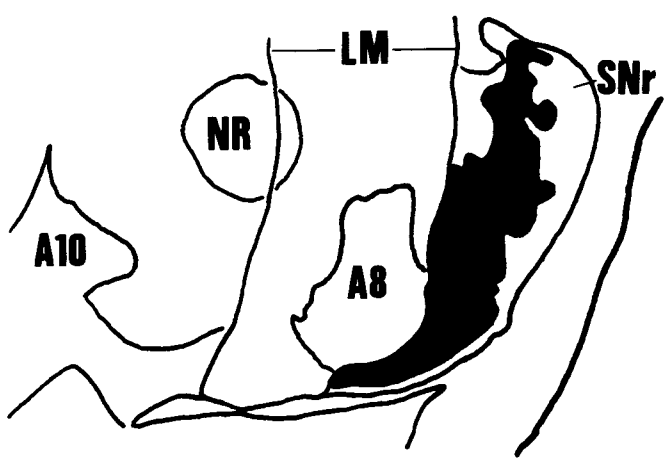
En el mono y situada dorsalmente a la pars compacta, se encuentra una colección de neuronas difusamente organizadas, descritas en muchos trabajos, pero raramente individualizadas (ARSENAULT et al., 1988). Este grupo celular podría ser equivalente al descrito en el encéfalo humano como pars gamma y pars beta de la sustancia negra pars compacta (OLSZEWSKI y BAXTER, 1954). De acuerdo a FRANÇOIS et al. (1984) esta región estaría formada por una mezcla de neuronas citológicamente similares a las de la pars compacta y pars reticulata, conteniendo un número aproximadamente igual de neuronas de proyección nigro-estriada, nigro-talámica y nigro-tectal, así como otras poblaciones de neuronas.

**ESQUEMA Nº 1.** En las dos páginas siguientes se han realizado dibujos iluminados de secciones frontales del complejo nigral del mono ardilla correspondientes al caso nº 9, ordenadas rostro-caudalmente de arriba a abajo donde, utilizando la inmunorreactividad frente a la enzima *tirosina hidroxilasa*, se representan los grupos dopaminérgicos mesencefálicos. En color negro se dibuja la extensión del grupo dopaminérgico mesencefálico A9, equivalente a la sustancia negra pars compacta. Cada sección está separada de la anterior por 480 micras.

**ROSTRAL**



1mm



**CAUDAL**

1mm

## **2. EL SISTEMA DOPAMINERGICO MESENCEFALICO (VER ESQUEMA 1 Y FIGURAS 1B y 2B).**

Adicionalmente a las subdivisiones citoarquitectónicas de la substancia negra que acabamos muy sumariamente de describir, hay que hacer obligada referencia a otros criterios de subdivisión del complejo nigral.

En 1964 DAHLSTROM y FUXE delimitaron tres grupos dopaminérgicos principales en el mesencéfalo de la rata, y les dieron la denominación numérica de 8, 9 y 10 en la serie A de grupos catecolaminérgicos del tronco del encéfalo. Los tres grupos celulares contribuyen a la inervación dopaminérgica del estriado así como a la de otras estructuras encefálicas. El *grupo A10*, que citoarquitectónicamente corresponde en gran medida al área tegmental ventral de Tsai (ATV) es el origen del sistema dopaminérgico mesolímbico que proyecta, entre otras estructuras, al núcleo accumbens septi y al tubérculo olfatorio, así como a la porción ventral del núcleo caudado y putamen (estriado ventral de HEIMER y WILSON, 1975). El *grupo A9* equivale en gran medida a la substancia negra pars compacta (SNc) y constituye la fuente del sistema dopaminérgico nigro-estriado que inerva al núcleo caudado y al putamen (estriado dorsal). El elevado número de neuronas dopaminérgicas que se sitúan a nivel tegmental, dorsal y caudalmente a la substancia negra pars compacta, constituyen en conjunto el peor conocido *grupo A8*. Este núcleo corresponde en parte al área retrorrubral y se piensa que envía fibras que forman parte tanto del sistema nigro-estriado como mesolímbico.

Los estudios realizados utilizando métodos de transporte axonal anterógrado y retrógrado han cuestionado la separación tajante entre un sistema "mesolímbico" y un sistema "nigro-estriado" ya que el estriado no sólo recibe proyecciones exclusivamente desde el grupo A9. Ya hemos comentado que el grupo A8 envía abundantes conexiones al estriado, y el grupo A10 inerva al menos, a la parte ventral del estriado dorsal, esto es al núcleo caudado y putamen.

Por tanto hoy se contempla a las neuronas dopaminérgicas del mesencéfalo como una banda continua de células que poseen de algún modo un solapamiento de proyecciones. Así nos referimos a los sistemas mesencefálicos de proyección generalmente bajo el prisma de sus campos de proyección terminal. Se habla entonces de sistemas mesoestriado, mesocortical (o mesolímbicocortical), mesodiencefálico y mesopontino. Estos sistemas reflejan la distribución de fibras desde el complejo A8-A9-A10 hacia:

- 1) El núcleo caudado, putamen, núcleo accumbens y globus pallidus.
- 2) Areas prosencefálicas límbicas (bulbo olfatorio, núcleo olfatorio anterior, tubérculo olfatorio, islotes de Calleja, núcleo septal lateral, núcleo intersticial de la estría terminal, corteza piriforme, núcleo amigdalino, corteza entorrinal ventral, hipocampo, corteza suprarrenal, corteza pregenual anteromedial, corteza perirrinal y corteza temporal asociativa).
- 3) El núcleo subtalámico de Luys y la habénula lateral.
- 4) El locus coeruleus (BJORKLUND y LINDVALL, 1984).

Entre estos sistemas mesencefálicos de proyección hay también neuronas que no contienen dopamina (VAN DER KOOY, COSCINA y HATTORI, 1981). Las fibras del *sistema mesoestriado*, que es el que principalmente nos interesa, son predominantemente ipsilaterales.

## 2.1. GRUPO A10: EL AREA TEGMENTAL VENTRAL.

Este grupo neuronal está particularmente desarrollado en el encéfalo de la rata. Estas células forman un amplio complejo neuronal que se extiende a nivel la línea media, desde los cuerpos mamilares hipotalámicos, tras la porción caudal del tercer ventrículo, hasta el nivel más caudal de los núcleos del rafe. A mitad de camino desde su porción mas rostral, las células de ATV se extienden lateralmente mezclándose con las neuronas de la pars compacta (HOKFELT et al., 1984). En el gato y en el mono estas células se distribuyen de modo similar en dirección anteroposterior, si bien el grupo es algo menor y confinado a una posición mas medial. Comparando las tres especies, parece que es en el mono donde este grupo neuronal es menos prominente.

Las neuronas *catecolaminérgicas* del grupo A10 están situadas en una región practicamente triangular a nivel de la línea media, colocándose medialmente a la pars compacta de la substancia negra, y estando limitadas lateralmente por las fibras del nervio motor ocular común. Algunas neuronas del grupo A10 se hallan entre las fibras de este par craneal.

A nivel de la porción caudal del área tegmental ventral, la extensión mediolateral (en secciones frontales) de la región triangular disminuye; este grupo neuronal está limitado ventralmente por el núcleo interpeduncular, y dorsalmente por el núcleo del motor ocular común.

En la mayoría de las descripciones citológicas, las neuronas de ATV se pueden distinguir de las de la pars compacta por su menor intensidad de histofluorescencia a catecolaminas (DiCARLO, HUBBARD y PLATE, 1973) y por su tamaño menor y forma redondeada (POIRIER et al., 1983; ARSENAULT et al., 1988).

## 2.2. GRUPO A9: LA SUBSTANCIA NEGRA PARS COMPACTA.

El patrón de distribución de las *neuronas dopaminérgicas* de la pars compacta (SNc) varía entre las especies. En la rata, las neuronas dopaminérgicas forman una capa

neuronal densa en las regiones dorsal y medial de la sustancia negra (HOKFELT, MARTENSSON, BJORKLUND, KLEINAU y GOLDSTEIN, 1984). En el gato estas células están más ampliamente distribuidas en la sustancia negra, si bien se pueden distinguir algunos grupos neuronales circunscritos, como el observado por ejemplo en la porción caudomedial de la pars compacta (JIMENEZ-CASTELLANOS y GRAYBIEL, 1987a). En el mono ardilla la organización de las neuronas dopaminérgicas aparentemente es más compleja. Es observable una densa banda horizontal de neuronas en la porción dorsomedial de la pars compacta (ver Figura 1B) que se extiende lateralmente en las regiones más caudales de la sustancia negra, donde mantiene una posición lateral respecto al lemnisco medial.

Muchas de estas neuronas están orientadas dorsoventralmente, agrupándose en zonas alargadas digitiformes (ver Figura 1B, F), en las que parecen extender sus procesos dendríticos que se hunden ventralmente en la región correspondiente a la pars reticulata. Una organización muy similar de las neuronas de SNc ha sido observada y descrita en el encéfalo humano, siendo designada como pars alpha (OLSZEWSKI y BAXTER, 1954).

Adicionalmente y en posición dorsal respecto a la banda horizontal densa se aprecia un grupo neuronal difusamente organizado de neuronas dopaminérgicas. Constituiría la pars mixta del mono, ya comentada, y quizá incluya a las partes beta y gamma de la sustancia negra del hombre.

### **2.3. GRUPO A8: EL AREA RETRORRUBRAL.**

En la rata, gato y mono, las *neuronas dopaminérgicas* más caudales se encuentran en el área retrorrubral. En la rata este grupo fue designado como A8 (DAHLSTROM Y FUXE, 1964). Constituye una colección de neuronas difusamente organizadas, situadas dorsalmente (en la rata y gato) y medialmente (en el mono) a las neuronas más caudales de la pars compacta.



A nivel del núcleo rojo en la rata y gato estas neuronas forman una banda dorsal de células que se extiende mediolateralmente desde las neuronas dopaminérgicas de la línea media (grupo A10) hasta la parte más lateral del tronco del encéfalo. En el mono estas neuronas están entremezcladas con la porción lateral de la decusación de las fibras del brachium conjunctivum, y medialmente respecto a las fibras del lemnisco medial. En su porción más caudal, las neuronas del grupo A8 se hallan dispersas entre las neuronas del núcleo pedunculopontino (ARSENAULT et al., 1988).

Existe cierta controversia sobre si debe hacerse una distinción entre los grupos neuronales A8 y A9. Así, HUBBARD y DiCARLO (1974) opinan que, en el mono, estos dos grupos son indistinguibles y deben ser considerados como una única entidad. HANAWAY McCONNEL y NETSKY (1970) también describen en la rata estos grupos unitariamente y consideran al grupo A8 como la porción caudal de la pars compacta. Sin embargo GARVER y SLADEK (1975), opinan que las células del grupo A8 son de algún modo menores y más oscuras que las del grupo A9, lo que coincide con la opinión de ARSENAULT et al. (1988) quienes, además observan que las neuronas de A8 presentan una mayor inmunorreactividad y sus dendritas son más cortas que las de los otros grupos dopaminérgicos mesencefálicos. Como ya se ha comentado anteriormente ambos grupos, A8 y A9, proyectan predominantemente al estriado. En el hombre, al menos parte del grupo A8 corresponde a la pars gamma y pars beta de la pars compacta de la sustancia negra. Se le considera más bien como una subdivisión de la pars compacta aunque se le distingue de la pars alpha, probablemente equivalente a la banda celularmente densa de la pars compacta de la sustancia negra (OLSZEWSKI y BAXTER, 1954).

Si los grupos A8 y A9 son considerados como regiones separadas, entonces surge una cuestión importante. ¿Forma la pars mixta parte integrante del grupo A8 o del grupo A9?. En la mayoría de los atlas de la sustancia negra en los primates las neuronas de la pars mixta no suelen ser distinguidas de la pars compacta de la sustancia negra (OLSZEWSKI y BAXTER, 1954; ARSENAULT et al., 1988), con la excepción de FRANÇOIS et al. (1984, 1985). Sin embargo, la mayoría de los estudios

que describen las neuronas dopaminérgicas del encéfalo de los primates rotulan como A8 a las neuronas que corresponden a la región de la pars mixta (HUBBARD y DiCARLO, 1974; GARVER y SLADEK, 1975). De igual modo la región correspondiente al grupo A8 en el hombre también incluye a la pars mixta (NOBIN y BJORKLUND, 1973).

La conclusión lógica de todo esto es que las *neuronas dopaminérgicas* de la pars mixta son análogas a las del grupo A8, o al menos de parte del mismo, y que dicho grupo A8 (incluyendo a la pars mixta) es una extensión de la pars compacta.

### **3. HETEROGENEIDAD NEUROQUÍMICA DE LA SUBSTANCIA NEGRA.**

Desde el punto de vista neuroquímico la sustancia negra no es en absoluto una estructura homogénea. Los datos que se tienen hoy día sobre esta materia están basados en la evidencia de que esta heterogeneidad está relacionada tanto con las conexiones aferentes de la sustancia negra como con las propias neuronas de este núcleo mesencefálico.

La mayoría de las aferencias de la sustancia negra, quizá con la excepción del estriado, están dirigidas fundamentalmente a la pars compacta (GRAYBIEL y RAGSDALE, 1979). Entre los neurotransmisores y neuropéptidos que se ha demostrado que son liberados en las terminales que proyectan a la sustancia negra están el ácido glutámico, la serotonina, la acetilcolina, la sustancia P, el GABA, la dinorfina y la somatostatina entre otros (GRAYBIEL y RAGSDALE, 1983). Las neuronas intrínsecas de la sustancia negra contienen dopamina, acetilcolinesterasa, GABA, encefalina, colecistoquinina y neurotensina (ANDEN et al., 1964; BUTCHER y MARCHAND, 1978; HOKFELT, SKIRBOLL, REHFELD, GOLDSTEIN, MARKEY y DANN, 1980; MUGNAINI y OERTEL, 1985). La distribución de todos estos componentes neuroquímicos en la sustancia negra no es homogénea.

La significación de estos particulares patrones de distribución es aún un asunto en vías de investigación, pero es posible que representen subdivisiones anatómicas distintas. Dentro del complejo nigral nos interesa comentar especialmente cómo en la

substancia negra pars compacta se ha identificado una especial compartimentación histoquímica que pone de manifiesto la existencia de zonas circunscritas con diferente actividad acetilcolinesterásica (JIMENEZ-CASTELLANOS y GRAYBIEL, 1987b). Estos compartimentos recuerdan a la subdivisión neuroquímica existente en el estriado caracterizada por la presencia de parcelas con baja actividad acetilcolinesterásica (*estriosomas*) frente al tejido estriatal circundante rico en acetilcolinesterasa (*matriz extraestriosómica*) (GRAYBIEL y RAGSDALE, 1978).

Dentro de la pars compacta del mono ardilla a nivel del grupo dopaminérgico A9 se observa cómo rostralmente se distingue una zona o banda horizontal donde, a veces son detectables zonas interdigitadas pobres o ricas en actividad colinesterásica (ver Figura 1A) (JIMENEZ-CASTELLANOS y GRAYBIEL, 1987b). Nos proponemos aquí estudiar si esta compartimentación neuroquímica de la substancia negra pars compacta, detectada hasta ahora mediante la técnica histoquímica de la acetilcolinesterasa, guarda alguna relación con una particular distribución de las neuronas de proyección nigro-estriada en el mono, considerando por separado las proyecciones *nigro-caudadas*, y por otro las *nigro-putaminales*.

# **MATERIAL Y METODOS**

## 1. CASOS EXPERIMENTALES.

Para los estudios que se recogen en este trabajo hemos utilizado el *mono ardilla adulto* (*Saimiri sciureus*), de ambos sexos y con un peso oscilante entre 645 y 1030 gr. Se ha preparado el material histológico correspondiente a un total de once monos (TABLA Nº 1), en cinco de los cuales se realizaron inyecciones de trazadores de vías nerviosas en ambos hemisferios cerebrales, con lo cual el número total de hemisferios inyectados fue de dieciseis.

En todos los casos, el marcador empleado fue la *peroxidasa de rábano* conjugada con *aglutinina de germen de trigo* (HRP-WGA, Sigma Chemical Co.), salvo en los casos números 10 y 12, en que además de lo anterior se utilizó otro trazador, en este caso fluorescente, como es el Fluoro-Gold (FG, Fluorochrome Inc.), inyectándose uno en el núcleo caudado y el otro en el putamen del hemisferio cerebral izquierdo (TABLA Nº 2).

Por otra parte, en el caso número 4, las inyecciones de trazador no permitieron poner de manifiesto el marcaje neuronal retrógrado en el complejo nigral por problemas en el procesamiento experimental, por lo que este caso fue desechado y los esquemas de marcaje neuronal no se incluyen en el estudio.

De acuerdo con las recomendaciones del Comité Nacional del *International Council for Laboratory Animal Science*, y las de la Directiva 86/809/CEE, recogidas en el R.D. 223/1988 de 14 de marzo, hemos extremado las medidas para reducir al mínimo el dolor y stress de nuestros animales de experimentación.

Nº Caso (lado)	Sexo(M/H)	Peso(gr)	Inyecciones		
			Trazadores	Volumen	Nº
1.- SMHN-1 (I)	M	1000	HRP-WGA	30 nl	1
2.- SMRN-2 (I)	M	1000	HRP-WGA	20 nl	1
3.- SMRN-2 (D)	M	1000	HRP-WGA	30 nl	1
4.- SMRN-3 (I)	M	1000	HRP-WGA	20 nl	<b>NO UTIL</b>
5.- SMRN-4 (I)	M	1000	HRP-WGA	20 nl	1
6.- SMHN-2 (I)	M	760	HRP-WGA	50 nl	1
7.- SMHN-2 (D)	M	760	HRP-WGA	50 nl	1
8.- SMHN-3 (I)	M	890	HRP-WGA	200 nl	4
9.- SMHN-3 (D)	M	890	HRP-WGA	160 nl	3
10.-SMRHN-1(I)	M	890	FG/HRP-WGA	250/200 nl	2/4
11.-SMRHN-2(I)	M	1030	HRP-WGA	300 nl	4
12.-SMHN-4(I)	M	1030	HRP-WGA/FG	400/300 nl	5/2
13.-SMHN-4(D)	M	1030	HRP-WGA	40 nl	1
14.-SMHN-5(I)	H	645	HRP-WGA	120 nl	4
15.-SMHN-5(D)	H	645	HRP-WGA	20 nl	1
16.-SMRHN-3(I)	M	745	HRP-WGA	300 nl	5

**TABLA nº 1.** Resumen de casuística donde se recogen datos identificativos referentes a cada animal, el sexo, peso y los trazadores inyectados en cada caso. Se incluye igualmente el volumen total de trazador o trazadores inyectados, así como el número de depósitos efectuados. **I/D:** hemisferio izquierdo/derecho. **HRP-WGA:** peroxidasa de rábano conjugada con germen de trigo. **FG:** Fluoro-Gold.

CASO N <sup>o</sup>	SUPERVIVENCIA	INYECCION	
		Trazador	Localización
1	48 horas	HRP-WGA	N.caudado
2	48 horas	HRP-WGA	N.caudado
3	48 horas	HRP-WGA	Putamen
4	48 horas	HRP-WGA	N.caudado (NO UTIL)
5	48 horas	HRP-WGA	Cápsula interna
6	48 horas	HRP-WGA	Putamen
7	48 horas	HRP-WGA	Putamen
8	48 horas	HRP-WGA	Cápsula interna
9	48 horas	HRP-WGA	Putamen
10	48 horas	FG	N.caudado
		HRP-WGA	Putamen
11	48 horas	HRP-WGA	N.caudado
12	48 horas	HRP-WGA	N.caudado
		FG	Putamen
13	48 horas	HRP-WGA	Putamen
14	48 horas	HRP-WGA	Putamen
15	48 horas	HRP-WGA	Putamen
16	48 horas	HRP-WGA	N.caudado

**TABLA n<sup>o</sup> 2.** Resumen de casuística indicando la supervivencia y las características de las inyecciones realizadas que se concretan en los trazadores empleados y la localización de los depósitos. **HRP-WGA:** peroxidasa conjugada con aglutinina de germen de trigo. **FG:** Fluoro-Gold.



## 2. METODOS.

### 2.1. TECNICAS DE TRAZADO DE CONEXIONES NERVIOSAS.

Los ribosomas de las neuronas se hallan localizados fundamentalmente en los alrededores del núcleo. Por ello, las organelas celulares y las proteínas sintetizadas en el soma celular necesitan ser transportadas a lo largo del axon o las dendritas hacia regiones sinápticas. Estos procesos se conocen como *transporte axónico*. Las distintas sustancias no se mueven a la misma velocidad, y así las vesículas y las partículas pequeñas (glicoproteínas, glicolípidos, AChE) se mueven mediante sistemas de transporte rápido (200-400 mm./ día), mientras que las proteínas estructurales lo hacen mucho mas lentamente (50 mm./ día) (DARNELL, LODISH y BALTIMORE, 1986). Los fenómenos de transporte rápido se dan sobre material contenido dentro de compartimentos membranosos intracelulares y se verifica tanto en sentido somatófugo (*anterógrado*), como somatópeto (*retrógrado*), en tanto que el transporte lento ocurre solo en sentido anterógrado, está intimamente asociado con el crecimiento axonal y afecta a elementos del citoesqueleto del axon y a las proteínas solubles citoplasmáticas (SCHAPP y REESE, 1986). El transporte axonal rápido es un proceso dependiente de los microtúbulos, existiendo al menos una proteína motriz para el transporte anterógrado (kinesina), y otra distinta (dyeneina citoplásmica) para el retrógrado (SHEETZ, STEVER y SCHROER, 1989).



En los primeros años setenta se introdujeron varias técnicas de estudio de conexiones nerviosas, todas ellas basadas en los fenómenos de captación y transporte axonal (KRISTENSSON, 1970; COWAN, GOTTLIEB, HENDRICKSON, PRICE y WOOLSEY, 1972; LA VAIL y LA VAIL, 1972). En los casos que se describen en el presente trabajo hemos utilizado como marcador la *peroxidasa de rábano* (HRP). La HRP es una glicoproteína vegetal de carácter enzimático, la cual es ávidamente captada por las neuronas e incorporada fundamentalmente al compartimento lisosomal de su flujo axonal rápido. De este modo, las neuronas transportan la HRP hacia regiones de la célula situadas lejos del lugar de captación, fundamentalmente en sentido *retrógrado*, hacia el soma. El transporte de HRP desde la región inyectada proporciona sobre todo, por tanto, información sobre las conexiones aferentes a esa región. Una pequeña fracción de HRP se transporta también en sentido *anterógrado* o centrífugo, en dirección a las terminales axónicas o dendríticas. Este transporte anterógrado se potencia enormemente mediante la conjugación de la HRP con *aglutinina de germen de trigo* (WGA), una lectina vegetal enzimáticamente inerte (GONATAS, HARPER, MIZUTANI y GONATAS, 1979). El complejo HRP-WGA, se transporta tanto retrógrada como anterógradamente, y aporta así información tanto sobre las conexiones aferentes como las eferentes de la región inyectada.

La glía posee receptores para glicoproteínas que la dotan de una avidez por la WGA y otras macromoléculas (toxinas, virus), muchas veces mayor que las neuronas. Por esta razón, en la técnica de la HRP-WGA la glía de la zona de inyección tiende a internalizar la molécula inyectada, de modo que solo en las zonas centrales del depósito, donde se dan unas concentraciones de HRP-WGA muy altas, los sitios de unión de la glía para WGA se saturan y queda lectina libre susceptible de ser captada por las neuronas (STEINDLER y COOPER, 1986). Antes de conocerse estos fenómenos de la biología molecular de la HRP-WGA, diversos estudios neuroanatómicos, de modo empírico habían concluido también que la captación y transporte tienen lugar fundamentalmente en el centro del depósito del trazador (MESULAM, 1982). Por este motivo, en nuestros experimentos distinguimos siempre

entre las zonas afectadas por el centro de la inyección, y el halo periférico de difusión local, considerando que la zona que transporta el enzima es fundamentalmente la primera.

La cantidad de enzima captado y transportado es minúscula, e indetectable por sí misma, pero puede revelarse mediante la adición de ligandos radiactivos o fluorescentes o bien mediante detección inmunohistoquímica. El medio mas utilizado en los laboratorios de Neuroanatomía y que hemos empleado nosotros, consiste en aprovechar las poderosas propiedades enzimáticas de la HRP para producir un producto de reacción visible.

Las técnicas de transporte requieren por tanto, en primer lugar una intervención para depositar la sustancia trazadora, tras la cual se ha de dejar transcurrir un tiempo de supervivencia durante el cual se verifica la captación y el transporte a distancia. Este último depende del tipo de trazador empleado (ya que las diferentes sustancias trazadoras se incorporan a fracciones de diferente velocidad en el flujo axónico) y de la longitud de la vía nerviosa que se pretende estudiar. Para la HRP-WGA suele ser óptima una supervivencia de alrededor de 48 horas, e igual ocurre con el Fluoro-Gold. Este fue el tiempo de supervivencia empleado en todos nuestros experimentos (TABLA Nº 2). En periodos superiores a las 70 horas empieza a detectarse una disminución significativa de la actividad enzimática de la HRP-WGA y pueden darse fenómenos de transporte transináptico (MESULAM, 1982) que comprometan la interpretación de los resultados.

## **2.2. CIRUGIA.**

Previamente a la cirugía se procede a calcular el cero con cada unas de las torres estereotáxicas. Dichas torres están provistas de micropipetas de vidrio afiladas en un sistema de calentamiento y tracción automático. Mediante fractura bajo control microscópico ampliamos el calibre de la punta hasta obtener un diámetro interno de 30 micras.

Anestesiarnos profundamente al animal con pentobarbital sódico (Nembutal, Abbott; 30 mgr./ Kgr. I.P.), y sujetamos firmemente su cabeza en el aparato estereotáxico (David Kopf Instr.). Se rasuró y desinfectó la piel con una solución antiséptica. Se practicó con bisturí una incisión cutánea y aponeurótica longitudinal, desde la protuberancia occipital externa hasta la región frontal. Densinsertamos las musculaturas temporales, desperiostizamos y, a continuación practicamos una craniotomía con ayuda de una fresa manual para evitar posibles lesiones corticales por sobrecalentamiento de la calota. El tamaño y situación de la apertura tuvo que ser ampliada en algunas ocasiones con ayuda de una pinza gubia dependiendo de la localización de la inyección o inyecciones.

Antes de abrir la duramadre se procedió a preparar la solución de trazador a inyectar. En el caso del Fluoro-Gold, éste ya se encuentra previamente diluído al 8% en solución salina fisiológica y conservado en frigorífico. La HRP-WGA se prepara al 10% en el mismo vehículo. Se introdujo la punta de la micropipeta en un pocillo conteniendo aceite mineral y la conectamos a una bomba de vacío. El líquido aspirado formó una columna de unos centímetros, de modo que el menisco de la misma quedara visible fuera del encéfalo una vez insertada en éste la micropipeta. A continuación se sumergió la punta en nuevos pocillos con las soluciones de trazadores correspondientes según el caso, y se aspiró una pequeña cantidad mediante el sistema de vacío.

Abrimos la duramadre, rasgamos la piamadre, e introdujimos la pipeta fijada a la torre estereotáxica en el encéfalo del animal, colocando su punta en las coordenadas predeterminadas mediante las referencias del atlas estereotáxico de EMMERS y AKERT (1963). De este modo se mantiene la pipeta en el lugar de la inyección durante 5 ó 10 minutos. Posteriormente y con ayuda de un microscopio quirúrgico Zeiss, dotado con un ocular provisto de una escala graduada se procede a efectuar la inyección mediante una bomba neumática.

Generalmente se inyecta una pequeña cantidad cada vez (alrededor de 20 nanolitros), esperando unos 5 ó 10 minutos. Una vez completado el depósito se sube

la micropipeta un milímetro con el fin de minimizar la posibilidad de contaminación en el trayecto recorrido por ésta, y se vuelven a esperar otros 5-10 minutos antes de retirarla y cerrar la herida.

Procuramos evitar la aparición de movimientos en masa del encéfalo por efecto de una respiración agitada o de la tos en el momento de la inyección, añadiendo para ello, en caso necesario, una dosis adicional de anestésico.

En cada caso se realizaron inyecciones únicas o múltiples (TABLA Nº 1). En el caso de inyecciones en la cabeza del núcleo caudado se utilizó siempre un abordaje vertical del mismo, atravesando la corteza cerebral, sustancia blanca, cuerpo calloso y ventrículo lateral correspondiente. En las inyecciones realizadas en el putamen, sobre todo en las que afectaban a la porción rostral del mismo, se empleó un abordaje oblicuo de 45°, con objeto de evitar la posibilidad de contaminación de la cabeza del núcleo caudado suprayacente.

Finalizadas las inyecciones, se procedió a cerrar la herida mediante sutura continua, reponiendo previamente las musculaturas temporales.

Durante el postoperatorio el animal se rehidrató convenientemente mediante la infusión subcutánea de solución salina fisiológica. También se procuró prevenir las fases locales de la infección con una cobertura antibiótica por vía intramuscular. La anestesia barbitúrica deprime intensamente la termorregulación de los animales, por lo que durante el postoperatorio se les mantuvo junto a una fuente de calor.

Trascurrido el tiempo de supervivencia perfundimos a los animales y cortamos sus encéfalos siguiendo los protocolos que a continuación se explican.

### **2.3. PERFUSION.**

Administramos intraperitonealmente a los animales una dosis letal de pentobarbital sódico (70 mgr./Kgr.). Tras una amplia incisión de la piel sobre la línea alba, abrimos la pared abdominal. Seccionamos el diafragma transversalmente y la parrilla costal siguiendo la línea axilar anterior para evitar los vasos internos. Levantamos el peto



esterno-costal. Incidiendo y evertiendo el pericardio, descubrimos el corazón y la salida de los grandes vasos. Se introduce una cánula rígida hasta el infundíbulo aórtico y la fijamos en esa posición. Comenzamos a bombear las soluciones de perfusión e inmediatamente se procedió a clampar la aorta descendente para fijar exclusivamente la mitad superior del cuerpo, y a abrir ampliamente la aurícula derecha para facilitar la evacuación de fluido.

La perfusión, realizada en su totalidad a temperatura corporal, comienza con 200 cc. de solución salina fisiológica heparinizada para retirar la sangre del árbol vascular y evitar la coagulación. A continuación se pasó a una solución fijadora (1000 ml), consistente en 4% paraformaldehído/0'9% solución salina/5% sacarosa en buffer fosfato 0'1 M a pH fisiológico (7'4). La solución fijadora se eliminó del árbol vascular perfundiendo al animal con 1 litro de la misma solución desprovista de fijador.

Finalizada la perfusión, decapitamos al animal y montamos la cabeza en el aparato estereotáxico. Expusimos el encéfalo abriendo la calota craneana con una pinza gubia y lo cortamos en dos bloques por medio de una hoja de bisturí acoplada al soporte estereotáxico. Este paso tiene como objetivo el adaptar el plano de corte ulterior con el microtomo al plano estereotáxico frontal, con lo que se facilita enormemente el estudio microscópico. Los dos bloques encefálicos se despegaron de la base craneal liberándolos de la duramadre, del tentorio, así como seccionando los pares craneales. A continuación y hasta cortar al día siguiente se introdujeron de inmediato en una solución lavadora consistente en 20% sacarosa/0'9% salina en buffer fosfato 0'1 M. La alta concentración de azúcar tiene como objetivo el evitar la formación de microcristales de hielo que dislacerían la estructura del tejido, haciendolo inservible para el estudio microscópico.

## 2.4. MICROTOMIA DE LOS BLOQUES ENCEFALICOS Y RECOGIDA DE SERIES HISTOLOGICAS.

Tras haber retirado completamente los restos de piamadre, colocamos el bloque encefálico en un microtomo de congelación. El encéfalo se fijó al soporte de dicho aparato procurando que quedase lo mas perpendicular posible al plano de corte, que en todos los casos fue frontal. Para hacer mas rápida y homogénea la congelación, cubrimos el bloque con nieve carbónica finamente triturada. Con un pequeño punzón practicamos un diminuto orificio en el hemisferio cerebral derecho, para poder reconocerlo despues y orientar adecuadamente los cortes.

La cadencia de corte en todos los experimentos fue de 40 micras de espesor. Los cortes se depositaron en unas cajas especiales divididas en 24 compartimentos, cada uno de los cuales se encuentra lleno de solución buffer fosfato 0'1 M, y servirá para recoger ordenadamente la serie de cortes que se destinarán a un procesamiento determinado. De este modo, los doce primeros se utilizaron para los cortes del bloque encefálico *rostral* (que incluye a los lugares de inyección en el núcleo caudado y/o putamen), mientras en los doce últimos se recogieron los cortes del bloque encefálico *caudal* (que incluye al complejo nigral). En conjunto disponemos pues de doce series de cada bloque. En cada una de ellas, cada corte está separado del precedente por  $(12 \times 40 =) 480$  micras.

En las series del bloque rostral, lo que nos interesa primordialmente es el lugar de la inyección; por tanto utilizaremos el compartimento número 5 para ser procesado con la técnica histoquímica de la *tetrametilbenzidina* (TMB) (MESULAM, 1978), que nos pondrá de manifiesto el lugar de la inyección de la HRP-WGA. El compartimento adyacente, número 6, será procesado de acuerdo a la técnica histoquímica de la *acetilcolinesterasa* (AChE) (GENESER-JENSEN y BLACKSTAD, 1971; GRAYBIEL y RAGSDALE, 1978), para poner de manifiesto la compartimentación estriósómica. Este mismo compartimento, utilizando el microscopio de fluorescencia, nos permitirá observar y dibujar la inyección de Fluoro-Gold (FG), ya que la AChE, a

diferencia de la TMB, no altera la capacidad fluorescente de este trazador (JIMENEZ-CASTELLANOS y GRAYBIEL, 1987b). Los diez compartimentos restantes se mantienen en reserva, caso que falle alguno de los anteriormente utilizados.

En el caso de los doce compartimentos del bloque encefálico caudal, se procesan como sigue:

1.-TMB	4.-TMB	7.-TMB	10.-TMB
2.-AChE	5.-AChE	8.-AChE	11.-AChE
3.-TH	6.-TH	9.-TH	12.-TH

Los compartimentos 3, 6, 9 y 12 se procesan para inmunorreactividad frente a la enzima de síntesis catecolaminérgica, *tirosina hidroxilasa* (TH) (STERNBERGER, 1979; JIMENEZ-CASTELLANOS y GRAYBIEL, 1987a), que nos pondrá de manifiesto los cuerpos neuronales y fibras dopaminérgicos en la sustancia negra.

## **2.5. PROCESAMIENTO DE LOS CORTES.**

Sobre la serie caudal de cortes, se aplicaron las distintas técnicas histológicas cuyos detalles se describen a continuación.

### **2.5.1. Tetrametilbenzidina (TMB).**

La HRP tiene una gran capacidad para escindir peróxido de hidrógeno, dando lugar a agua y oxígeno naciente, siendo éste un poderoso oxidante. Las distintas técnicas histoquímicas para el revelado de la HRP han aportado distintos métodos para detectar la aparición de ese elemento, que indica el lugar donde se encuentra la HRP (LA VAIL y LA VAIL, 1972; LLAMAS y MARTINEZ-MORENO, 1974; MESULAM, 1978; MESULAM y ROSEN, 1979). Uno de ellos utiliza para la



detección de oxígeno naciente la *tetrametilbenzidina*, un cromógeno incoloro en estado reducido, pero que adquiere un color azul oscuro al oxidarse. Sin embargo, la TMB se reduce espontáneamente y se redisuelve rápidamente, de modo que, para fijarla inmediatamente al lugar del tejido donde es oxidada, es necesaria la presencia de una sustancia que actúe como mordiente. Se utiliza para ello el nitroferricianuro sódico.

Los compartimentos procesados con arreglo a esta técnica nos van a poner de manifiesto tanto el lugar de la inyección de HRP-WGA a nivel del estriado, como los cuerpos neuronales y fibras marcados por dicha inyección, en este caso a nivel de la sustancia negra. La técnica empleada es la original de MESULAM (1978) con unas pequeñas modificaciones (JIMENEZ-CASTELLANOS y GRAYBIEL, 1987a).

Se comienza preparando las soluciones de la siguiente manera:

1) *Solución de lavado* (1 parte de acetato buffer pH 3'3/19 partes de agua destilada).

2) *Solución de incubación:*

-Solución A: 185 cc H<sub>2</sub>O d/10 cc. acetato buffer pH 3'3/0'2 gr. de nitroferricianuro sódico.

-Solución B: 0'15 gr. TMB/75 cc. etanol absoluto.

La solución de incubación es bastante inestable, ya que la TMB en su forma oxidada y el nitroferricianuro tienen tal apetencia mutua que la presencia de cualquier agente oxidante provoca una precipitación espontánea y masiva, que llena de artefactos el tejido, haciéndolo poco aprovechable para su estudio. Por este motivo, los recipientes y bandejas necesitan una exquisita limpieza y el agua destilada empleada para la solución de lavado debe ser de la máxima pureza.

Para minimizar la actividad de las peroxidasas endógenas la incubación tiene lugar a temperatura ambiente, en vez de a temperatura corporal. Se inicia utilizando unos vasos de precipitado llenos de buffer fosfato 0'1 M, en los que se introduce una cestilla de metacrilato cuyo suelo es una rejilla de nylon. Este dispositivo permite transferir cómodamente los cortes de una a otra solución. Los cortes de cada compartimento se llevan hasta uno de estos vasos y son colocados en una mesa agitadora. Se realizan tres lavados breves sucesivos con agua destilada, con objeto de que el tejido esté lo mas

limpio posible. A continuación se sumergen los cortes en la *solución de incubación* (39 partes de solución A/1 parte de solución B), y se mantienen en agitación durante veinte minutos para que se impregne bien el tejido. Trascorridos los mismos se añade el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 0'3%. Generalmente se suele hacer una prueba previa para determinar la cantidad idónea para conseguir un buen marcaje y evitar artefactos. Rutinariamente empleamos unas cantidades de 1'2, 1'6, 2 y 2'4 cc. de solución de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 0'3 % por cada 40 cc. de solución de incubación. Se mantienen los cortes en agitación continua durante 30 minutos, pero cambiamos la solución cada 5 minutos ya que hemos comprobado que de este modo se reduce considerablemente la aparición de artefactos.

Completada la incubación, interrumpimos la reacción realizando tres cambios breves con la *solución de lavado* conservada en el frigorífico. A continuación montamos los cortes en portas tratados con gelatina y alumbre de cromo para evitar el despegamiento, y los dejamos secar al aire. El montaje de los cortes ha de hacerse de inmediato ya que el producto de la reacción es relativamente inestable y se redisuelve en pocas horas. Deshidratamos el tejido mediante el paso por alcoholes de gradación creciente (un minuto en cada uno de ellos), aclaramos en xilol durante veinte minutos y cubrimos con Eukitt como adhesivo.

### **2.5.2. Acetilcolinesterasa (AChE).**

La actividad acetilcolinesterásica se halla ampliamente distribuída en los tejidos animales, y en particular, en el sistema nervioso central. Para la realización de esta técnica hemos seguido el protocolo diseñado para el sistema nervioso central por GENESER-JENSEN y BLACKSTAD (1971) con ciertas modificaciones (GRAYBIEL y RAGSDALE, 1978).

Los compartimentos procesados con esta técnica nos van a permitir poner de manifiesto la compartimentación estriósómica a nivel del estriado, así como la

compartimentación histoquímica de la sustancia negra pars compacta (JIMENEZ-CASTELLANOS y GRAYBIEL, 1987b).

La *solución de incubación* se prepara añadiendo a cada 100 cc. de agua destilada los siguientes reactivos:

- Acetylthiocholine iodide (Sigma): 0'100 gr.
- Cloruro de etopropazina (Parsidol): 0'018 gr.
- Glicina: 0'075 gr.
- Sulfato cúprico (SO<sub>4</sub>Cu): 0'050 gr.
- Acetato de sodio: 0'410 gr.

Se disuelve y se ajusta el pH de la solución a 5.

La reacción se inicia transfiriendo los cortes a las cestillas de metacrilato ya mencionadas, que son colocadas sobre una plataforma agitadora para facilitar la circulación del líquido en torno al tejido. Se realiza un breve lavado con agua destilada y a continuación se añade la solución de incubación. Se van haciendo pruebas periódicas, eligiendo un corte que se introduce en una solución de ferricianuro potásico, observándose la marcha de la reacción con ayuda de un microscopio estereoscópico, y se interrumpe cuando se observa la tinción deseada.

La técnica tiene una gran versatilidad, ya que la baja velocidad de la reacción enzimática permite obtener una amplia gama de intensidades de impregnación, dependiendo del tiempo y de las condiciones de fijación del tejido. Generalmente los cortes del estriado tardan menos (media hora) en estar listos que los mesencefálicos (tres horas).

Una vez preparados los cortes se tira la solución de ferricianuro y se efectúan tres breves lavados con solución salina fisiológica, hasta que desaparezca el color amarillo del ferricianuro. A diferencia de la TMB, el montaje de los cortes puede demorarse según interese.

Finalmente los cortes se montan en portas gelatinizados, desecados al aire, deshidratados con alcoholes de gradación creciente, aclarados en xilol y cubiertos con Eukitt.

### **2.5.3. Inmunorreactividad a tirosina hidroxilasa (TH).**

Se utiliza la técnica de *peroxidasa-antiperoxidasa (PAP)*. La antiperoxidasa es producida en conejos que han sido inyectados previamente con HRP (Sigma tipo VI). El complejo PAP se prepara combinando el antisuero específico con HRP, siguiendo el método de STERNBERGER (1979), con algunas modificaciones (JIMENEZ-CASTELLANOS y GRAYBIEL, 1987a). Los anticuerpos frente a la enzima tirosina hidroxilasa (TH) empleados son comerciales (Eugene Tech Co.). Esta inmunorreactividad nos pone de manifiesto los cuerpos neuronales y fibras dopaminérgicos en el complejo nigral.

En resumen los cortes son tratados sucesivamente con una solución de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/metanol, Triton X-100 y suero de carnero normal, para después proceder a utilizar el método PAP. El anticuerpo frente a TH se diluye 1:500 y el tiempo de incubación primaria oscila entre 1 a 3 días.

## **2.6. ANALISIS DE LOS CORTES.**

Dibujamos los cortes en papel con ayuda de un retroproyector, representando mediante un punto cada uno de los cuerpos neuronales marcados por las inyecciones de HRP-WGA. Los cortes procesados para TMB son analizados con un microscopio Leitz Dialux 20, utilizando el campo claro/oscuro y la luz polarizada que produce una intensificación del producto de la reacción de la TMB (ILLING y WASSLE, 1979), ya que este complejo no solo es visible por su color negro azulado, sino que también es intensamente birrefringente.

Adicionalmente también se dibujaron al mismo tamaño los cortes adyacentes procesados para AChE y TH. Trasferimos entonces las neuronas marcadas por el trazador a los dibujos de las secciones de AChE, representando en estas las zonas de la pars compacta detectadas por su relativamente alta o baja actividad acetilcolinesterásica. De este modo se puede comparar el marcaje neuronal en la

substancia negra con la subdivisión histoquímica (AChE) de la misma, así como con la distribución de neuronas y fibras dopaminérgicas (TH). Todo esto se puede hacer con bastante precisión ya que el dibujo inicial incluyó también la posición y forma de los vasos sanguíneos y otros relieves del tejido.

Una vez representados todos los cortes de los distintos compartimentos seleccionamos en cada caso una serie de ellos que sean representativos de los diferentes niveles de la substancia negra pars compacta, con objeto de ilustrar resumidamente cada caso. Estos esquemas se hallan recogidos en el capítulo de **Resultados**.

Para dibujar el lugar de la inyección de HRP-WGA en el estriado se utilizó una técnica similar. Los presumibles lugares de inyección de la HRP-WGA son difíciles de concretar. De acuerdo a JONES y HARTMAN (1978) y MESULAM (1982), consideramos como lugar efectivo, y así lo dibujamos, a una *zona central* (representada en **negro** en los esquemas de las inyecciones) donde el producto de la reacción de TMB es más denso, y una *zona periférica* (que aparece **rallada** en los esquemas de inyecciones) donde el marcaje es menos pronunciado pero lo suficientemente intenso como para oscurecer los detalles celulares. Seleccionamos igualmente en cada caso una serie de niveles que nos servirán para ilustrar el lugar y difusión de la inyección de HRP-WGA.

Para analizar la inyección de Fluoro-Gold (FG) en el estriado, así como el marcaje neuronal retrógrado producido por este trazador en la substancia negra se utiliza el sistema Ploemopak de luz incidente de Leitz, adaptado al microscopio óptico. La fluorescencia provocada por este trazador se pone en evidencia utilizando un filtro de excitación para luz ultravioleta (Ploem A2). La metodología de análisis de los cortes es similar a la anteriormente descrita, si bien dado que la reacción histoquímica de la AChE no destruye la fluorescencia provocada por el FG, el análisis de las neuronas nigrales marcadas por este trazador y la distribución de actividad acetilcolinesterásica en la substancia negra pueden hacerse sobre el mismo corte alternando la iluminación en campo claro con la epifluorescente. Sobre el dibujo de la sección de

acetilcolinesterasa representamos por tanto, en cada caso, las neuronas marcadas por el Fluoro-Gold inyectado.

En el caso de la inyección de FG se dibuja estimando el lugar de la inyección como la zona adyacente al orificio provocado por el trayecto de la micropipeta que muestra una fluorescencia pronunciada (SCHMUED y FALLON, 1986).

De este modo se obtienen en cada caso una serie de dibujos correspondientes al lugar o lugares de la inyección, y otra serie de esquemas correspondientes al marcaje neuronal provocado por la inyección de trazador. Al mismo tiempo, con fines iconográficos, se obtienen fotografías de los cortes que muestran un marcaje más llamativo.

## **RESULTADOS**

## 1. SUBDIVISION HISTOQUIMICA DE LA PARS COMPACTA (GRUPO A9).

Si nos fijamos en el Esquema nº 1, en que quedan dibujados los contornos de los grupos dopaminérgicos mesencefálicos en secciones frontales del complejo nigral procesadas para poner de manifiesto la inmunorreactividad frente a la enzima de síntesis catecolaminérgica tirosina hidroxilasa, el **grupo dopaminérgico mesencefálico A9** rostralmente está constituido por una *banda horizontal* de neuronas y fibras dopaminérgicas densamente agrupadas (ver Figura 1B, SNc) que se extienden mediolateralmente desde los núcleos mamilares hipotalámicos o más caudalmente desde las raíces del tercer par craneal, donde se continúan con el área tegmental ventral o grupo A10, hasta las proximidades del núcleo subtalámico. Dorsalmente al grupo A9 a estos niveles rostrales se pueden detectar un grupo de neuronas dopaminérgicas dispersas, que corresponden a la substancia negra pars mixta (Figura 1B, SNm). De la banda horizontal emergen unas *expansiones digitiformes ventrales* (Figura 1B, F), constituidas por neuronas y fibras dopaminérgicas, que protuyen en la pars reticulata de la substancia negra.

Más caudalmente (ver también Figura 2B) la pars compacta de la **substancia negra** adopta una forma de "Y" con el palo inferior dispuesto medialmente, en continuidad con las neuronas del grupo A10, y los dos palos superiores colocados lateralmente. La pars reticulata de la substancia negra a estos niveles se **coloca** no solo ventralmente, sino que también forma zonas ovaladas características situadas entre ambos brazos de



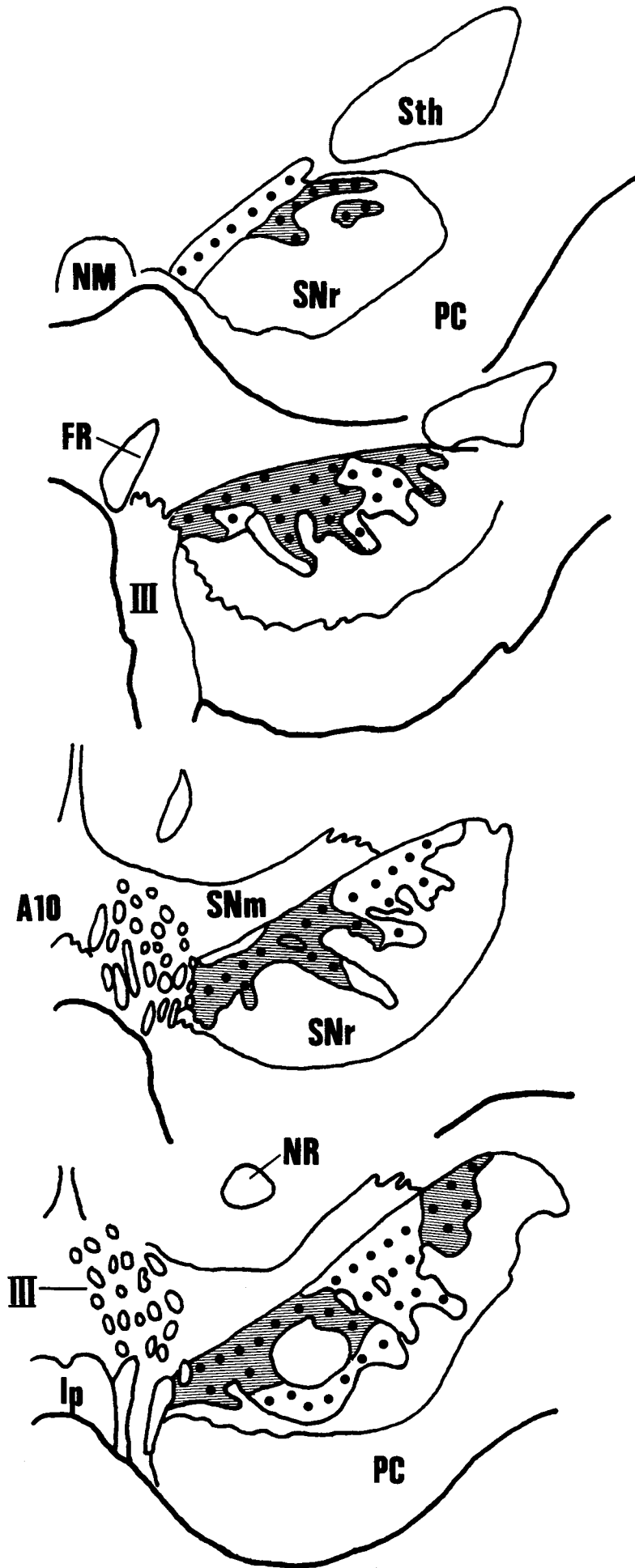
la pars compacta (Figura 2B, SNr). La pars mixta de la substancia negra a estos niveles desaparece y es sustituida por las neuronas del grupo dopaminérgico A8 (Figura 2B, A8) que se entremezclan entre las fibras del lemnisco medial.

Ya mas caudalmente la pars compacta se desplaza lateralmente en el complejo nigral, quedando separada de las neuronas del grupo A8 por las fibras del lemnisco medial.

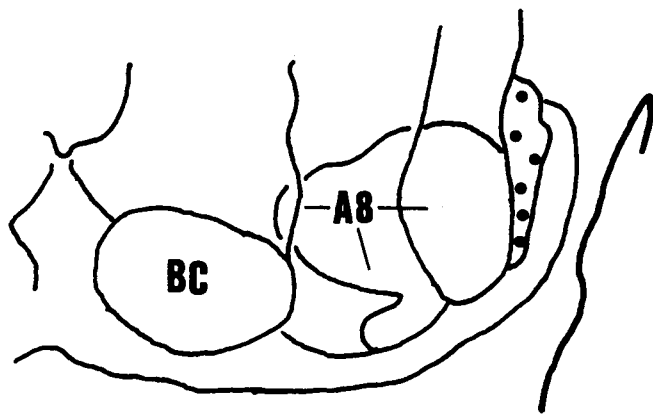
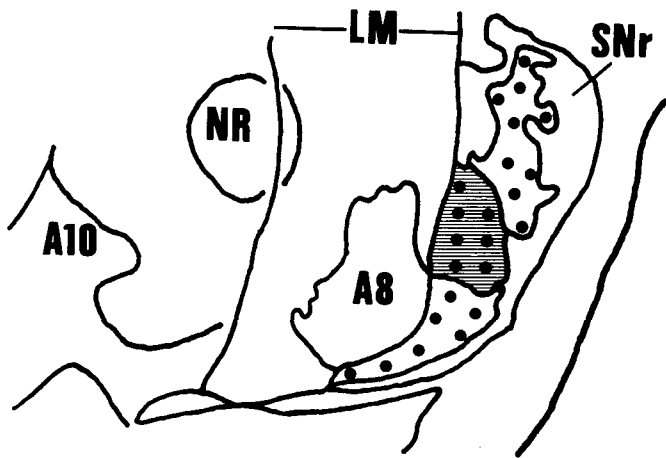
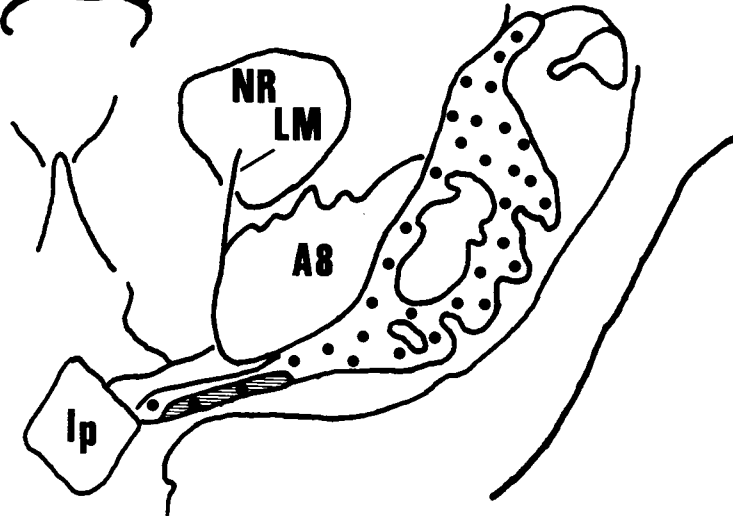
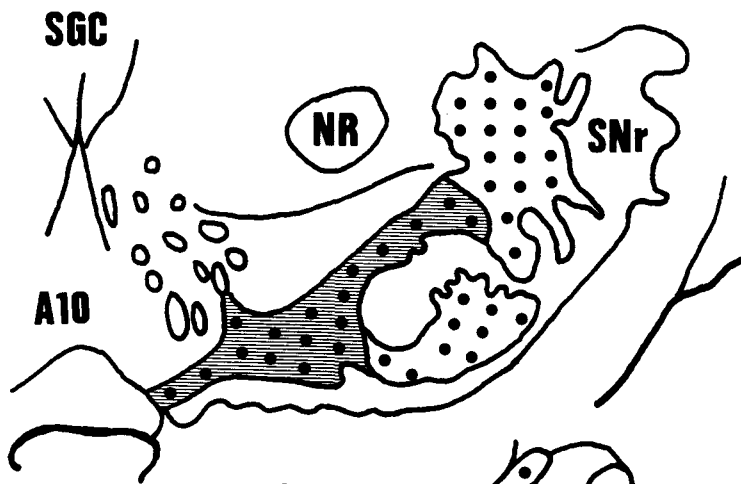
Es interesante destacar que, inmersas en la pars reticulata, se encuentran a todos los niveles neuronas dopaminérgicas aisladas.

**ESQUEMA N° 2.**-En las dos páginas siguientes se muestran dibujos de las mismas secciones frontales del complejo nigral en el mono ardilla representadas en el esquema n° 1, y correspondientes al caso n° 9. Con ayuda de secciones procesadas para poner de manifiesto la inmunorreactividad frente a *tirosina hidroxilasa* se han representado los contornos del grupo dopaminérgico A9, así como también de los grupos A8 y A10. Sobre estos esquemas y con ayuda de una serie adyacente de secciones procesadas mediante la técnica histoquímica de la *acetilcolinesterasa* (AChE) se dibujan en el interior de los límites del grupo A9 (substancia negra pars compacta) las **zonas detectables por su relativamente alto o relativamente bajo contenido** en esta enzima. De este modo dentro de los límites de la pars compacta observamos **zonas de alto contenido** en AChE, tanto en los somas **neuronales** como en el neuropilo (áreas con **punteado negro** y simultáneamente **ralladas**). Frente a ellas observamos otras zonas de bajo contenido enzimático, bien porque éste se encuentra reducido en el neuropilo exclusivamente (áreas **punteadas**) o bien porque se encuentra reducido tanto en el neuropilo como en los somas neuronales (**áreas en blanco**).

**ROSTRAL**



1 mm



**CAUDAL**

1mm

Si comparamos ahora la distribución de inmunorreactividad frente a tirosina hidroxilasa con la distribución de actividad acetilcolinesterásica en el grupo A9, como hemos hecho en el esquema nº 2 y en las Figuras 1 y 2, observamos que dentro de los contornos de la pars compacta de la sustancia negra la actividad AChE no es uniforme.

Hay que hacer constar que la actividad acetilcolinesterásica en la pars reticulata es relativamente alta y uniformemente distribuída. Ello dificulta a veces la detección de zonas similares a nivel de la pars compacta.

En la pars compacta se aprecian zonas caracterizadas por un alto contenido enzimático frente a otras zonas pobres en acetilcolinesterasa, que recuerdan a la organización estriósómica del estriado.

Utilizando un mayor aumento podemos observar que esta heterogeneidad en actividad AChE se debe tanto al neuropilo como a los somas neuronales de la pars compacta de la sustancia negra. Así, detectamos *tres tipos de zonas*. Unas, más oscuras, en que el contenido en acetilcolinesterasa es abundante tanto en las neuronas como en el neuropilo (se representan *ralladas y punteadas* en el esquema nº 2). Otras zonas, más claras, en las que la pobreza en acetilcolinesterasa afecta tanto al neuropilo como a los somas (zonas *blancas* en el esquema nº 2), o bien el neuropilo es pobre y sin embargo inmersos en él se observan cuerpos neuronales ricos en acetilcolinesterasa (zonas *punteadas* en el esquema nº 2).

En los niveles más rostrales de la pars compacta, se observa cómo dentro de la *banda dopaminérgica horizontal* se distinguen zonas ricas y zonas pobres en acetilcolinesterasa. Especialmente las *expansiones digitiformes ventrales* en su mayor parte corresponden a zonas pobres en acetilcolinesterasa, si bien las que ocupan una posición medial ofrecen un aspecto distinto a las situadas más lateralmente. En las primeras el contenido acetilcolinesterásico es relativamente bajo tanto en somas como en el neuropilo mientras en las últimas se observan cuerpos neuronales positivos en el neuropilo, por otro lado pobre en AChE. En algunas expansiones ventrales incluso el

contenido en acetilcolinesterasa es relativamente alto, tanto en el neuropilo como en los cuerpos neuronales.

Cuando la pars compacta adopta la forma de "Y" tumbada, en primera instancia la mitad superior de la pars compacta es rica en actividad enzimática y la mitad inferior pobre, si bien en esta última son ostensibles cuerpos neuronales ricos en AChE, como también ocurre en la porción más lateral de la pars compacta.

Más caudalmente, cuando el núcleo rojo adopta su máxima representación, salvo la zona más medial de la pars compacta que ofrece un alto contenido en acetilcolinesterasa, el resto de la pars compacta de la sustancia negra es pobre en AChE aunque esta pobreza afecta exclusivamente al neuropilo.

En la porción más caudal de la pars compacta, cuando esta ya se encuentra desplazada lateralmente por las fibras del lemnisco medial siguen predominando las zonas pobres en AChE en las que sin embargo abundan los somas neuronales positivos.

## 2. MARCAJE NEURONAL EN EL COMPLEJO NIGRAL.

Para seguir una sistemática en la marcha analítica de los resultados comenzaremos, en cada caso, con la descripción de las inyecciones de trazador realizadas en el núcleo caudado y/o en el putamen. A continuación detallaremos el marcaje neuronal observado en el complejo nigral. En primer lugar se expondrá el marcaje neuronal en el complejo nigral considerado en conjunto, y especificando los grupos A8, A9 (substancia negra, pars compacta, SNc) y A10 (área tegmental ventral de Tsai, ATV). Acto seguido, y centrados ya en la pars compacta de la substancia negra, se describirán los hallazgos en la mitad rostral y en la mitad caudal de esta estructura, teniendo en cuenta ya la relación del marcaje neuronal nigral con la distribución de actividad acetilcolinesterásica (AChE).

Hemos de tener en cuenta que, si bien las zonas con baja actividad acetilcolinesterásica de la substancia negra pars compacta son fácilmente observables, no ocurre lo mismo con la detección de las zonas de alta actividad enzimática en esta estructura, ya que la pars reticulata subyacente también posee un alto contenido en acetilcolinesterasa. Hemos procurado no obstante representar en los esquemas de cada caso las zonas de *alta* (zonas **ralladas**) y *baja* (zonas en **blanco**) actividad AChE de la pars compacta, ayudados por las secciones procesadas para inmunorreactividad frente a tirosina hidroxilasa, que sólo nos marca las zonas que contienen actividad

acetilcolinesterásica de la sustancia negra pars compacta delimitar con bastante precisión los contornos de la pars compacta de la sustancia negra.

Consideramos de modo aleatorio como la mitad rostral de SNc hasta que dejan de ser visibles la porción principal horizontal y las expansiones ventrales digitiformes que protuyen en la pars reticulata subyacente. En la descripción de las inyecciones de trazadores y en la del marcaje neuronal observado nos remitimos a los correspondientes esquemas que ilustran el trabajo.

Describiremos en primer lugar los casos de inyecciones situadas exclusivamente en el *núcleo caudado* (casos 1, 2, 4, 11 y 16), después las realizadas en el *putamen* (casos 3, 6, 7, 9, 13, 14 y 15), y finalmente las inyecciones *mixtas* (casos 10 y 12) y las que afectan a la *cápsula interna* (casos 5 y 8). No se describe el marcaje neuronal observado en el caso nº 4 pues por problemas técnicos no pudo ser detectado.

## **2.1. INYECCIONES EN EL NUCLEO CAUDADO.**

En todos los casos de inyección en la cabeza del núcleo caudado (representadas en el esquema nº 3) se realiza un abordaje vertical con la micropipeta, atravesando la corteza cerebral y sustancia blanca subyacente, el cuerpo calloso y, en la mayoría de los casos, el ventrículo lateral correspondiente.

### **CASO Nº 1 (SMHN-1L).**

**Descripción de la inyección** (ver esquema nº 3).

Tras un abordaje vertical se realiza una única inyección de HRP-WGA en el núcleo caudado del hemisferio izquierdo. La cantidad de trazador inyectada es de 30 nanolitros.

La inyección se localiza en el tercio medio de la cabeza del núcleo caudado, considerado en su extensión rostro-caudal, e igualmente en el tercio medio de la misma estructura, considerado en su dimensión dorso-ventral.



La comparación de las secciones procesadas para TMB para poner de manifiesto el lugar de la inyección de HRP-WGA con secciones adyacentes procesadas para AChE nos permite observar que el área de la inyección afecta a estriomas, pero también a la matriz extraestriósomica.

**Descripción del marcaje neuronal observado en la sustancia negra** (ver esquema nº4).

Se detecta un marcaje neuronal no muy abundante que se dispone en toda la extensión rostro-caudal del complejo nigral. Hay algunas neuronas marcadas a nivel del grupo dopaminérgico A8, situado caudalmente en el complejo nigral. No se encuentran neuronas marcadas en la pars mixta ni en el área tegmental ventral.

En la *mitad rostral* de SNc la mayoría de las neuronas marcadas se observan en la porción principal horizontal de la pars compacta de la sustancia negra. A este nivel ocupan una posición en el tercio medio de la banda, y se hayan situadas más bien una posición ventral. No se observan neuronas marcadas en las expansiones digitiformes ventrales de la misma, pero sí en sus proximidades, sobre todo a nivel de la raíz de las mismas. La gran mayoría de las neuronas marcadas se hayan en áreas en las que no es posible detectar zonas especialmente caracterizadas por su bajo contenido en AChE.

En la *mitad caudal* de la sustancia negra pars compacta las neuronas marcadas siguen ocupando una posición a nivel del tercio medio. Salvo excepciones la gran mayoría de los somas marcados se localizan en zonas de actividad AChE alta o intermedia.

**CASO Nº 2 (SMRN-2L).**

**Descripción de la inyección** (ver esquema nº 3).

Tras un abordaje vertical se realiza una inyección única de HRP-WGA en la porción dorsolateral de la cabeza del núcleo caudado del hemisferio izquierdo, a nivel

de su tercio medio, considerada en dirección rostro-caudal. La cantidad de HRP-WGA inyectada es de 20 nanolitros.

**Marcaje neuronal observado en el complejo nigral** (ver esquema nº 5 y Figura nº 7).

Se observa un marcaje neuronal, no muy abundante, en toda la extensión rostro-caudal de la sustancia negra pars compacta. Las neuronas marcadas forman grupos de límites bastante definidos. Se aprecian algunas neuronas marcadas en el grupo A8, y excepcionalmente en el grupo A10. No se observan neuronas marcadas en la pars mixta.

En la *mitad rostral* de SNc las neuronas marcadas se observan tanto en la porción horizontal principal, donde se corresponden con zonas ricas en actividad acetilcolinesterásica, y también en las expansiones ventrales digitiformes, pobres en este caso en actividad enzimática.

A niveles *más caudales*, donde la tinción acetilcolinesterásica no permite distinguir con tanta nitidez zonas ricas y pobres en actividad enzimática, las neuronas marcadas se localizan a nivel del tercio medio de la sustancia negra considerada mediolateralmente. En la pars compacta las neuronas positivas tienden a situarse ventralmente.

**CASO Nº 11 (SMRHN-2L).**

**Descripción de las inyecciones** (ver esquema nº 3).

Se realizan cuatro penetraciones verticales con la micropipeta cargada de la solución de HRP-WGA en la cabeza del núcleo caudado del hemisferio izquierdo. Los depósitos se efectúan en el tercio rostral (porción lateral) y tercio medio (tanto en la porción dorsolateral como en la porción media y ventral del mismo). El tercio caudal de la cabeza del núcleo caudado parece encontrarse excluido del área de inyección. Se inyecta una cantidad total de 300 nanolitros de solución trazadora.

**Marcaje neuronal observado** (ver esquema nº 6 y Figura nº 8).

Se detecta un abundante marcaje neuronal extendido rostrocaudalmente por todo el complejo nigral. Aparecen algunas neuronas marcadas en el área tegmental ventral, sobre todo caudalmente y también en el grupo dopaminérgico A8. Se aprecia alguna neurona marcada aislada a nivel de la pars mixta.

A nivel de la *mitad rostral* de la pars compacta de la sustancia negra la mayoría de las neuronas se concentran, formando grupos, en la porción horizontal principal correspondiendo en su mayor parte a zonas ricas en actividad AChE. Se observan igualmente algunas neuronas marcadas a nivel de las expansiones digitiformes mediales de la pars compacta.

En la *mitad caudal* de SNc las neuronas marcadas son más abundantes que en la mitad rostral. Estas neuronas tienden a concentrarse medialmente, en zonas ricas en acetilcolinesterasa. A estos niveles existen algunos grupos neuronales claramente situados dentro de los límites de zonas pobres en acetilcolinesterasa, si bien no rellenan completamente estas zonas que, a este nivel, son amplias.

**CASO Nº 16 (SMRHN-3L).****Descripción de las inyecciones** (ver esquema nº 3).

Se realizan cinco penetraciones con la micropipeta cargada con una solución de HRP-WGA en la cabeza del núcleo caudado del hemisferio izquierdo. Los depósitos se efectúan en el tercio rostral (porción medial), tercio medio (porción dorsolateral y ventral) y tercio caudal (porción dorsal) de la cabeza del núcleo caudado. La cantidad total de solución trazadora inyectada fue de 300 nanolitros.

**Marcaje neuronal** (ver esquema nº 7).

Se observa un marcaje neuronal muy abundante a todos los niveles rostrocaudales del complejo nigral. Hay un número moderado de cuerpos neuronales marcados a

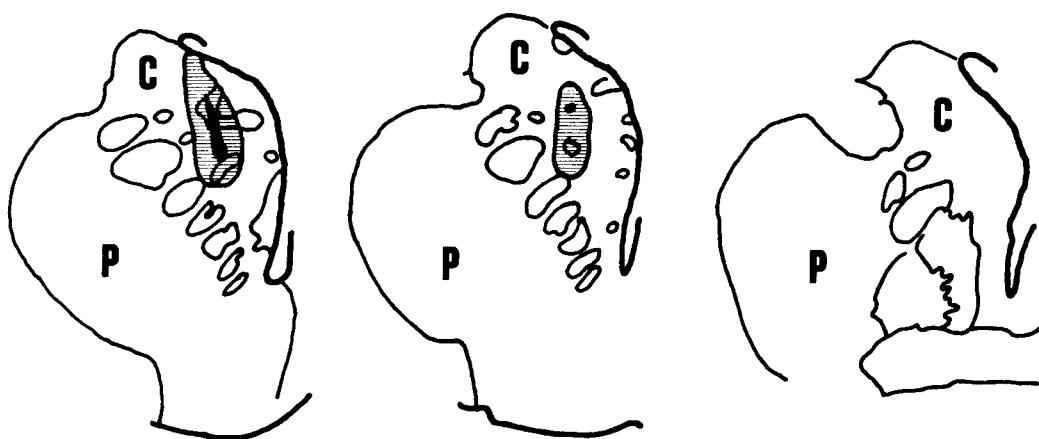
nivel del grupo A10 (porción caudal sobre todo) y también en el grupo A8. Se observan escasas neuronas marcadas a nivel de la pars mixta.

En la *mitad rostral* de la pars compacta de la sustancia negra se observan abundantes neuronas marcadas tanto a nivel de la banda horizontal como de las prolongaciones digitiformes más mediales de SNc. A nivel de la zona horizontal y en toda su extensión, las neuronas tienden a ocupar una posición más bien ventral ocupando zonas tanto ricas como pobres en actividad AChE. A niveles más ventrales se observan neuronas en las prolongaciones digitiformes, pobres en AChE, y también alrededor de las mismas, en zonas que parecen corresponder a la pars reticulata de la sustancia negra.

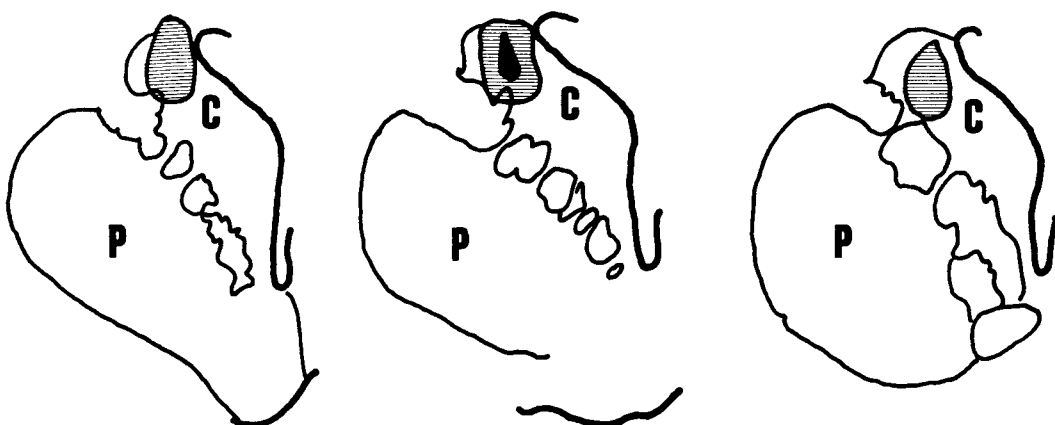
En la *mitad caudal* de la pars compacta el marcaje neuronal está ampliamente extendido en sentido medio-lateral, si bien predomina en los dos tercios mediales. A este nivel las neuronas marcadas, más abundantes que en la mitad rostral de SNc, tienden a eludir las zonas detectables de baja actividad AChE, si bien es posible observar grupos de neuronas marcadas dentro de los límites de estas zonas de baja actividad enzimática.

**ESQUEMA N° 3.**-Resumen de inyecciones de HRP-WGA realizadas en la cabeza del núcleo caudado en cinco animales. En cada caso se representan esquemas de secciones frontales representativas del estriado ordenadas rostro-caudalmente de izquierda a derecha. El presumible lugar efectivo de inyección en cada caso se representa por una zona coloreada en **negro**, que corresponde al centro del depósito, y una zona periférica **rallada**, expresión de la zona de difusión de la inyección. En el caso número 1 en la cabeza del núcleo caudado se han dibujado unas zonas ovaladas que corresponden a estriosomas.

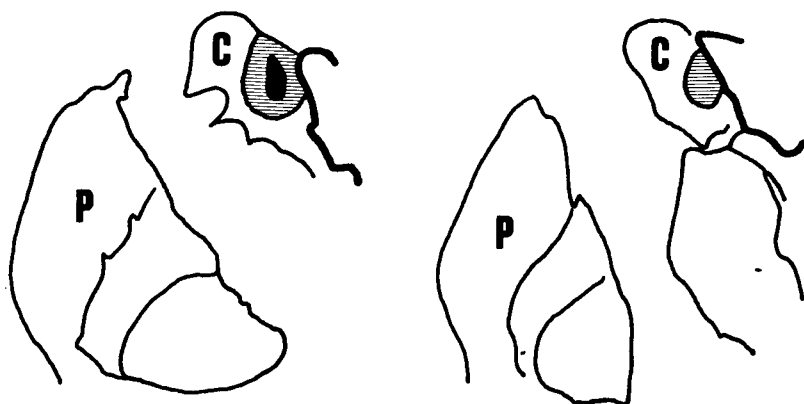
**CASO N° 1**



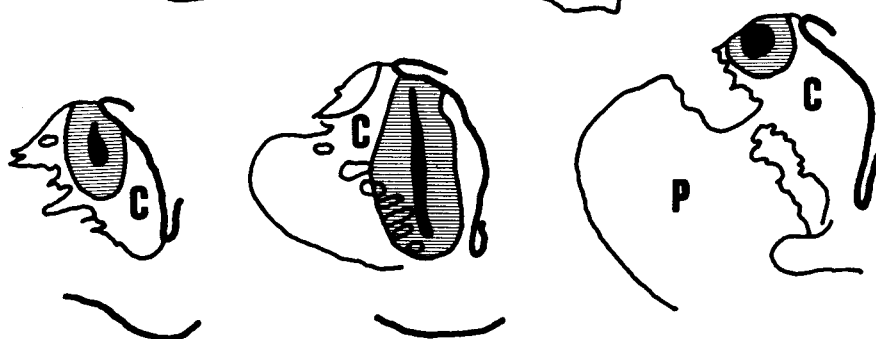
**CASO N° 2**



**CASO N° 4**



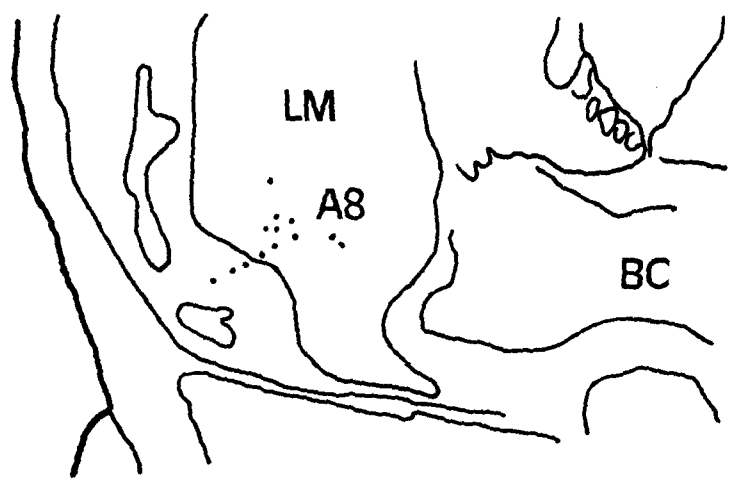
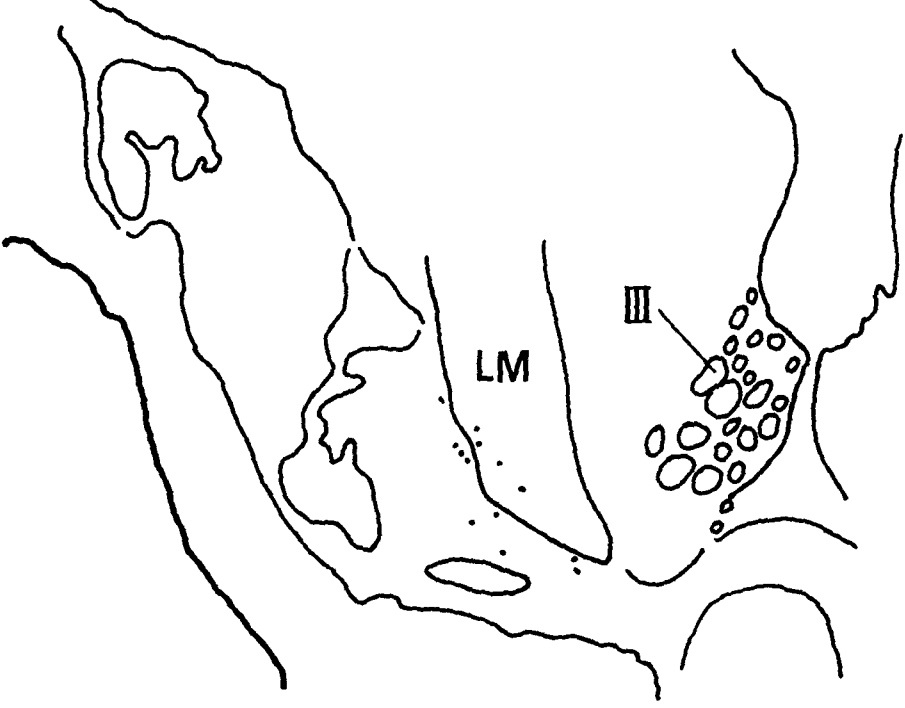
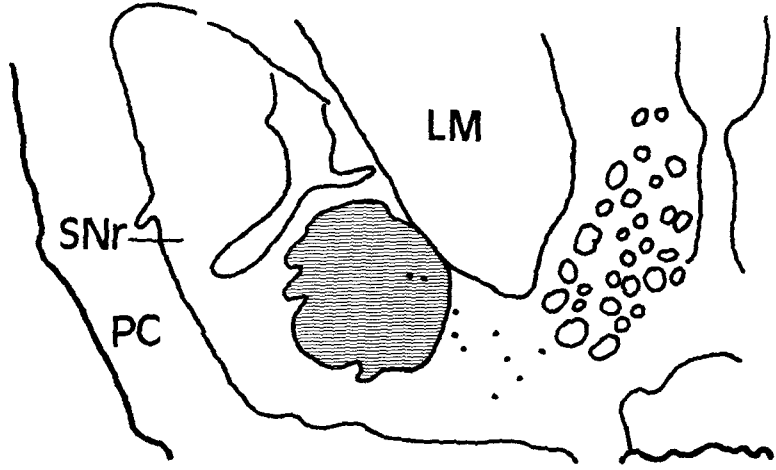
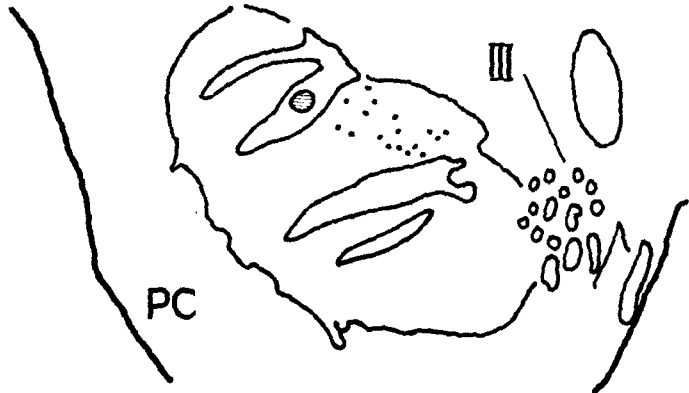
**CASO N° 11**



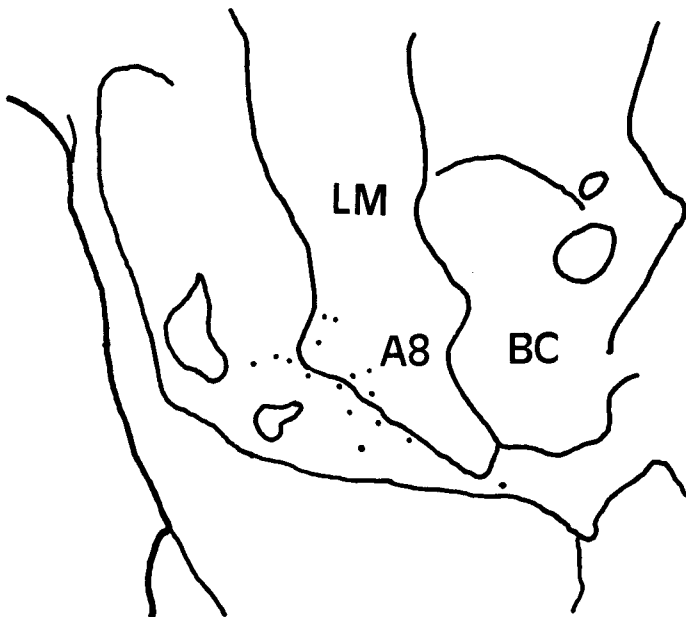
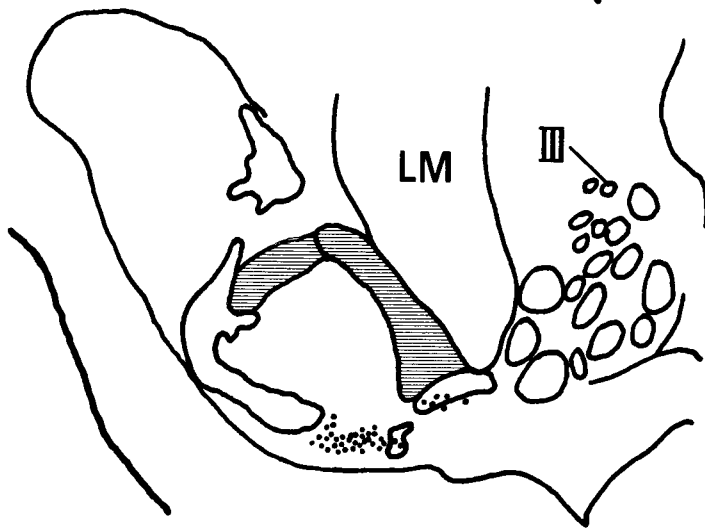
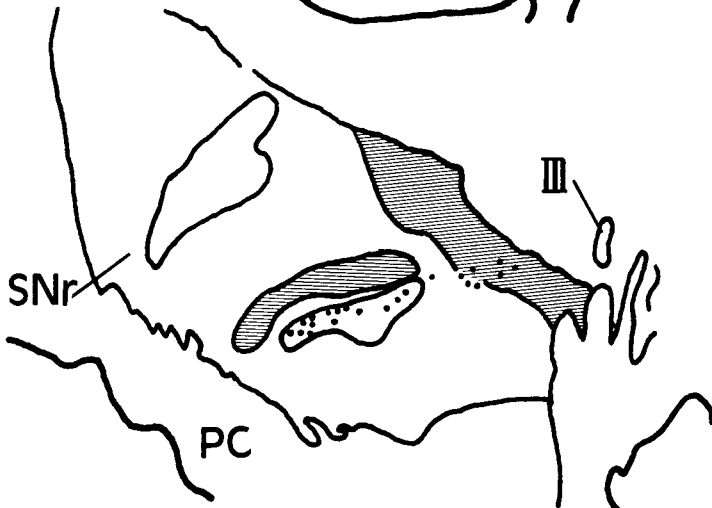
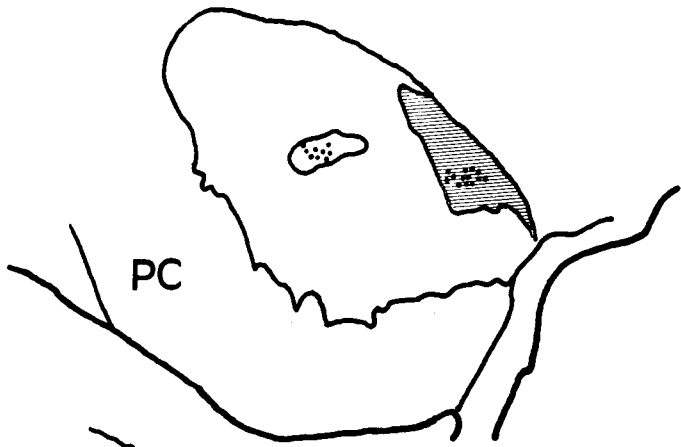
**CASO N° 16**

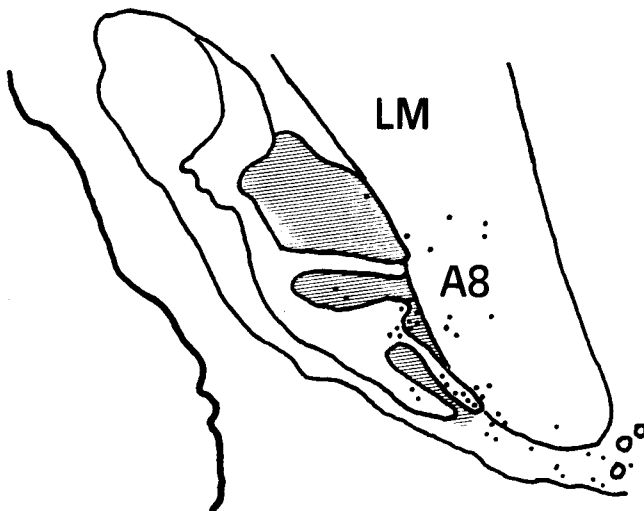
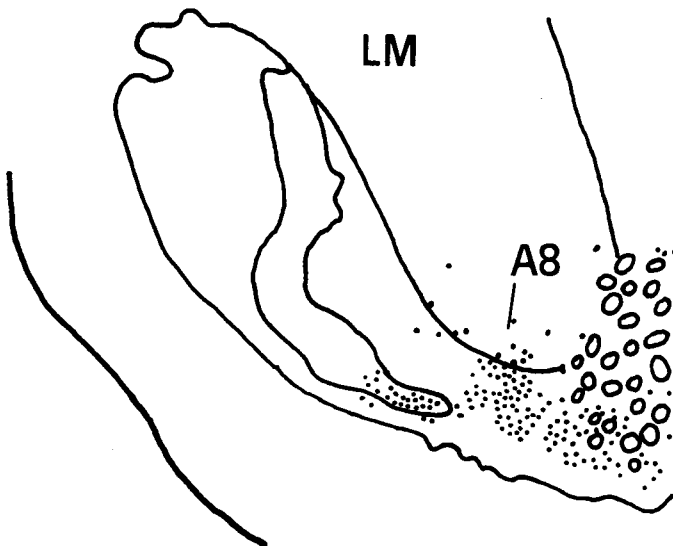
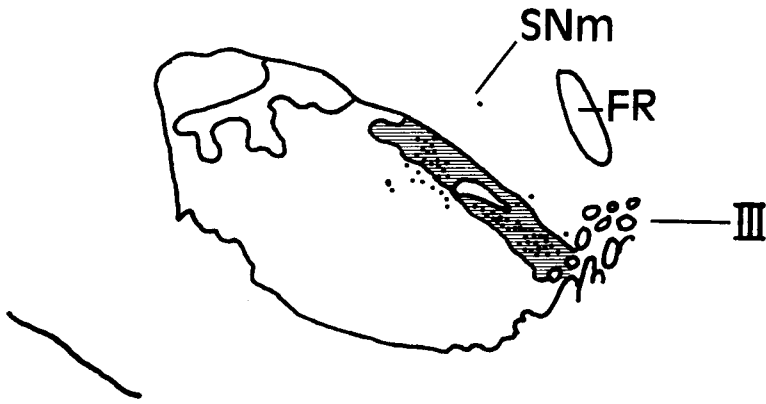
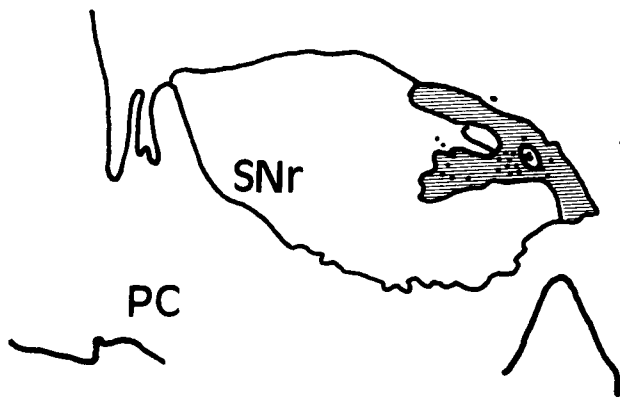


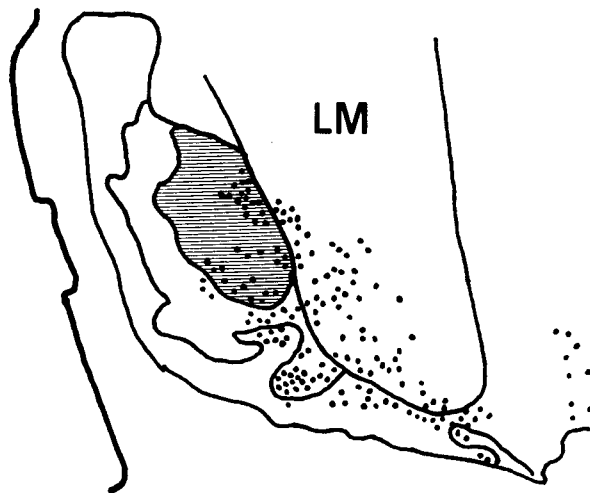
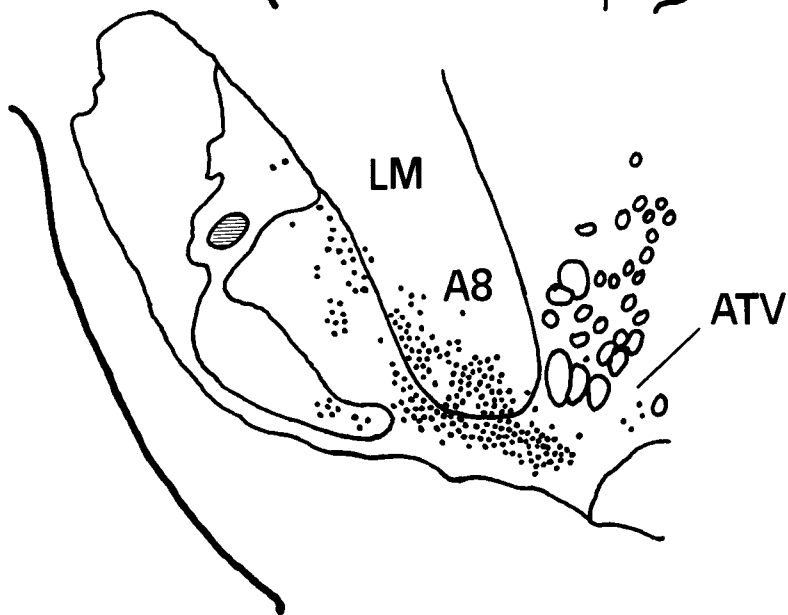
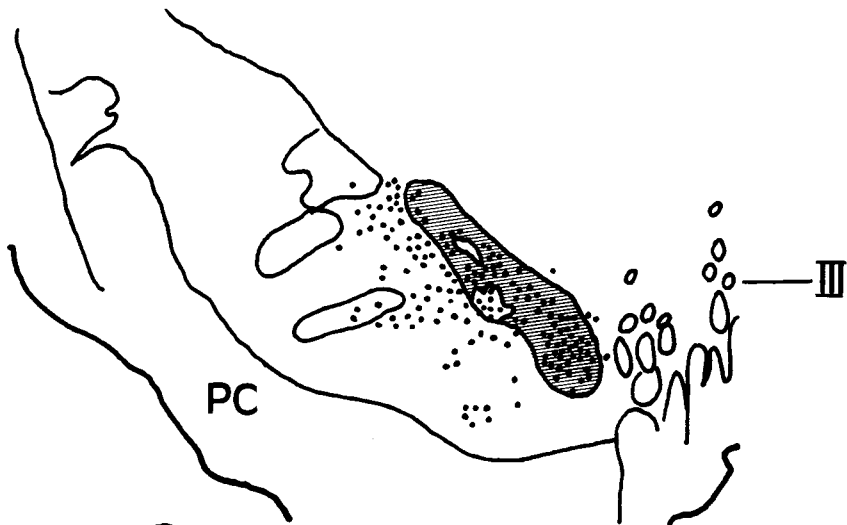
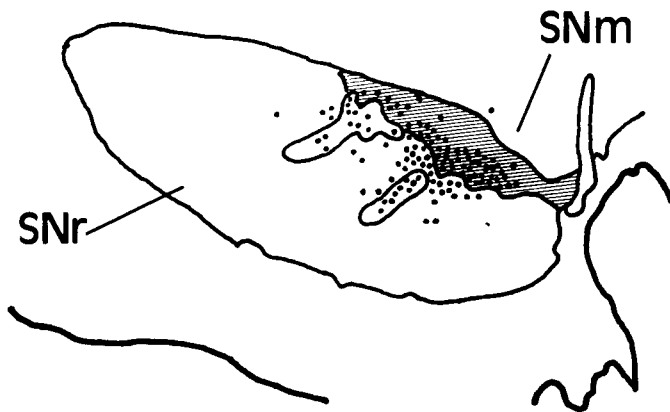
**ESQUEMAS N° 4 a 7.**-En las cuatro páginas siguientes se representan dibujos de secciones frontales del complejo nigral rostro-caudalmente ordenados de arriba a abajo, correspondientes a los casos n° 1, 2, 11 y 16 respectivamente, en los que se realizaron inyecciones de HRP-WGA en la cabeza del núcleo caudado. Cada **punto negro** representa una neurona marcada. Las áreas en **blanco** de la pars compacta corresponden a zonas detectables por su bajo contenido en acetilcolinesterasa frente a las zonas **ralladas**, ricas por contra en esta enzima.











## 2.2. INYECCIONES EN EL PUTAMEN.

En los casos de inyección en el putamen (ver Esquema nº 8) se ha utilizado una doble técnica de abordaje con objeto de evitar el tener que atravesar la cabeza del núcleo caudado y, como consecuencia, la posible contaminación del núcleo por el trazador que puede inducir a una interpretación errónea de resultados.

De este modo, en las inyecciones realizadas en la porción lateral del putamen se ha empleado un *abordaje vertical* ya que aquí el núcleo caudado ocupa una posición más medial que dicha porción del putamen. En los casos en que nos interesaba acceder a las regiones ventromediales del putamen empleamos un abordaje oblicuo, evitando el tener que atravesar con la pipeta la cabeza del núcleo caudado.

### CASO Nº 3 (SMRN-2R).

**Descripción de la inyección** (ver esquema nº 8).

Tras realizar un abordaje vertical del putamen se realiza una única inyección de HRP-WGA en la porción lateral del putamen del hemisferio derecho, a nivel de su tercio medio. La cantidad de trazador inyectada es de 30 nanolitros.

**Marcaje neuronal en el complejo nigral** (ver esquema nº 9).

El marcaje neuronal, discreto, se observa rostrocaudalmente en el complejo nigral. No se observan neuronas marcadas ni en el área tegmental ventral ni en la pars mixta de la sustancia negra. Sí existen algunas neuronas marcadas en cantidad moderada a nivel del grupo A8.

A nivel de la *mitad rostral* de la pars compacta la mayoría de las neuronas marcadas, que forman pequeños grupos, se localizan en la banda horizontal, ocupando mas bien una posición lateral dentro de la misma. Algunas neuronas marcadas son ostensibles a nivel de las expansiones ventrales digitiformes. A nivel de la banda horizontal alguno de los grupos neuronales se localizan nítidamente dentro de los límites de zonas

pobres en AChE, como también ocurre con las neuronas que se observan en las prolongaciones digitiformes.

En la *mitad caudal* de la pars compacta las neuronas marcadas se sitúan en la porción medial correspondiendo a una zona de alta actividad acetilcolinesterásica. Más caudalmente de nuevo son ostensibles grupos neuronales localizados en este caso en zonas pobres en acetilcolinesterasa. Se observan algunas neuronas marcadas en zonas que, presumiblemente, corresponden a la pars reticulata.

### **CASO Nº 6 (SMHN-2L).**

#### **Descripción de la inyección** (ver esquema nº 8).

Tras un abordaje vertical se realiza una única inyección de HRP-WGA en la porción lateral (y rostral) del putamen del hemisferio izquierdo. En sentido rostrocaudal la inyección se localiza en la unión del tercio anterior y medio del putamen. La cantidad de trazador inyectada es de 50 nanolitros.

#### **Descripción del marcaje neuronal observado en el complejo nigral** (ver esquema nº 10).

Se observa un abundante marcaje neuronal en toda la extensión rostro-caudal del complejo nigral. Encontramos algunas neuronas en el área tegmental ventral en cortes caudales así como, aisladamente, en el grupo A8 y en la pars mixta.

Dentro de la pars compacta de la sustancia negra y a nivel de su *mitad rostral*, la mayoría de las neuronas marcadas se encuentran principalmente en la porción horizontal principal. Las neuronas, que forman grupos, se observan tanto dentro como fuera de las zonas pobres en AChE. Existe alguna neurona marcada en las prolongaciones digitiformes pobres en acetilcolinesterasa, especialmente en las situadas más lateralmente.

A niveles *más caudales* de la pars compacta el marcaje tiende a situarse en la mitad medial de esta estructura. De nuevo grupos neuronales son claramente objetivables y

se localizan en zonas pobres, y también en zonas ricas en actividad acetilcolinesterásica.

### **CASO Nº 7 (SMHN-2R).**

#### **Descripción de la inyección** (ver esquema nº 8).

La inyección de HRP-WGA, única, se localiza, tras realizar un abordaje vertical, en los dos tercios superiores de la mitad lateral del putamen del hemisferio derecho, a nivel de su mitad caudal, cuando comienza a hacerse visible el globus pallidus. Se realiza un depósito de 50 nanolitros de solución trazadora.

#### **Descripción del marcaje neuronal observado** (ver esquema nº 11 y Figuras nº 4 y 5).

Se aprecia un marcaje abundante a todos los niveles rostrocaudales nigrales. Se detectan somas marcadas en el área tegmental ventral y en el grupo A8. Prácticamente no se detectan neuronas marcadas en la pars mixta.

En la *mitad rostral* de la pars compacta de la sustancia negra las neuronas marcadas se concentran en la mitad ventral de la banda horizontal principal. Se distinguen grupos muy nítidos de células marcadas, la mayoría de los cuales se corresponden con zonas pobres en acetilcolinesterasa que son especialmente detectables en este caso. No se observan neuronas marcadas a nivel de las prolongaciones ventrales de SNc, pero sí se aprecian algunas células marcadas en zonas de SNc situadas lateralmente a la banda horizontal principal.

En la *mitad caudal* de la pars compacta las neuronas marcadas siguen concentrándose en zonas pobres y en menor grado también en zonas de alta concentración enzimática.

## **CASO Nº 9 (SMHN-3R).**

### **Descripción de la inyección** (ver esquema nº 8).

Tras un abordaje oblícuo de la mitad rostral del putamen del hemisferio derecho se realiza una única penetración con la micropipeta que se va sacando paulatinamente, llevando a cabo tres depósitos de HRP-WGA que afectan a la totalidad de la extensión mediolateral del putamen a estos niveles. La cantidad total de trazador inyectada es de 160 nanolitros.

### **Marcaje neuronal** (ver esquema nº 12).

El marcaje neuronal, abundante, se extiende rostrocaudalmente por todo el complejo nigral. Hay numerosas neuronas marcadas a nivel del área tegmental ventral a todos los niveles, y también hay un marcaje neuronal, discreto, en el grupo A8. Hay neuronas marcadas aisladas en la pars mixta.

En la *mitad rostral* de la pars compacta de la sustancia negra las neuronas marcadas se localizan en su gran mayoría a nivel de la porción horizontal principal. A este nivel ocupan una posición ventral y medial. Algunos grupos de somas marcados coinciden con zonas pobres en AChE, pero otros se localizan en zonas ricas en actividad acetilcolinesterásica. Excepcionalmente se observa alguna neurona marcada a nivel de la porción más dorsal de las expansiones digitiformes.

En la *mitad caudal* de la sustancia negra pars compacta las neuronas marcadas siguen localizándose medialmente, continuándose con las neuronas marcadas del área tegmental ventral. Hay grupos de células marcadas que se corresponden con zonas de baja actividad AChE, pero predominantemente se localizan en zonas ricas en AChE.

### **CASO Nº 13 (SMHN-4R).**

#### **Descripción de la inyección** (ver esquema nº 8).

Se realiza un abordaje vertical del putamen del hemisferio derecho realizando una única inyección en la porción dorsal y lateral del mismo a nivel de su tercio caudal (ver Figura nº 10 C). La cantidad total inyectada fue de 40 nanolitros.

#### **Marcaje neuronal observado** (ver esquema nº 13).

El marcaje neuronal, moderado, se observa en toda la extensión rostrocaudal del complejo nigral. Se detectan algunas neuronas marcadas a nivel de la pars mixta, y caudalmente en el área tegmental ventral y en el grupo A8.

En la *mitad rostral* de la pars compacta las neuronas marcadas, situadas en su mayoría en los dos tercios mediales, forman grupos de bordes definidos, que se localizan típicamente en zonas pobres en acetilcolinesterasa de la banda horizontal. Aparecen igualmente algunas neuronas marcadas en las expansiones ventrales digitiformes, pobres en AChE, de la pars compacta, pero sólo en las que ocupan una posición mas lateral.

*Caudalmente* se observan de nuevo neuronas aisladas en la porción medial de la pars compacta, correspondiendo a una zona rica en AChE, pero sobre todo son de nuevo ostensibles grupos de neuronas marcadas en zonas pobres en acetilcolinesterasa ventrales a nivel del tercio medio de la pars compacta.

### **CASO Nº 14 (SMHN-5L).**

#### **Descripción de la inyección** (ver esquema nº 8).

Se realiza un abordaje doble del putamen del hemisferio izquierdo tratando de realizar una inyección masiva del mismo. En la mitad rostral y tras un abordaje vertical se realiza una inyección centrada en la porción lateral del putamen, a la cual afecta el área de inyección. Utilizando un abordaje oblicuo se realiza una segunda inyección



cuyo centro se sitúa ventralmente al putamen y que afecta a la porción mas ventral y lateral del putamen. Finalmente, y tras dos nuevas penetraciones, ambas verticales se realiza una inyección en la porción lateral de la mitad caudal del putamen. Se inyecta una cantidad total de HRP-WGA de 120 nanolitros.

**Marcaje neuronal** (ver esquema nº 14 y Figuras nº 3 y 9).

El marcaje neuronal, abundante, se extiende rostrocaudalmente por todo el complejo nigral, incluyendo al área tegmental ventral y al grupo A8. Existe igualmente un número moderado de neuronas a nivel de la pars mixta.

En la *mitad rostral* de la pars compacta de la substancia negra las neuronas tienden a ocupar una posición dorsal dentro de la misma. Grupos neuronales claramente marcados alternan con zonas de igual tamaño exentas de marcaje. Las neuronas marcadas a este nivel parecen situarse dentro de los límites de zonas ricas en actividad acetilcolinesterásica. A nivel de las expansiones ventrales de SNc, pobres en acetilcolinesterasa existen algunas neuronas marcadas, con predominio de las zonas situadas lateralmente.

En la *mitad caudal* de la substancia negra pars compacta el marcaje neuronal se concentra medialmente, en zonas ricas en AChE, y también en zonas ventrolaterales, pobres en acetilcolinesterasa.

**CASO Nº 15 (SMHN-5R).**

**Descripción de la inyección** (ver esquema nº 8).

Se realiza una única inyección, tras insertar verticalmente la pipeta, en la mitad rostral del putamen del hemisferio derecho. El centro de la inyección se localiza en el límite ventrolateral del putamen. La cantidad de HRP-WGA inyectada es de 20 nanolitros.

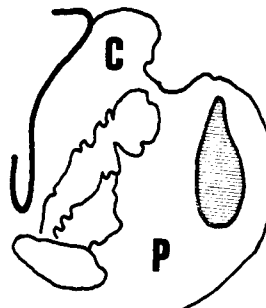
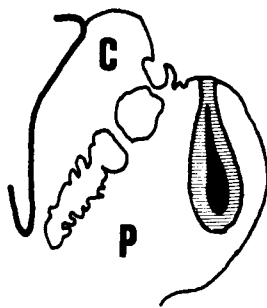
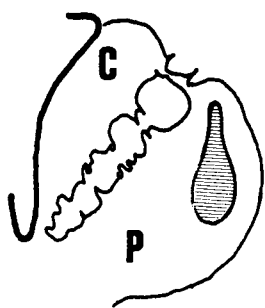
**Marcaje neuronal observado** (ver esquema nº 15).

La mayor parte de las escasas neuronas marcadas se localizan caudalmente a nivel del grupo A8. No se observan neuronas marcadas en el área tegmental ventral ni en la pars mixta.

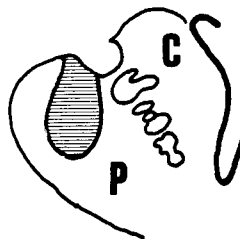
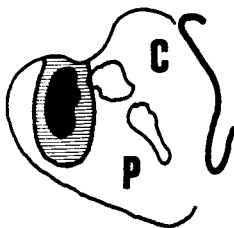
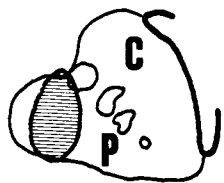
A nivel *rostral* de la pars compacta de la sustancia negra el marcaje neuronal es muy escaso, encontrándose neuronas aisladas en la banda horizontal principal que, casi siempre están dentro de los contornos de zonas ricas en actividad acetilcolinesterásica. A niveles *mas caudales* de la pars compacta el marcaje celular es igualmente muy escaso y las neuronas se sitúan también en zonas de alta actividad enzimática.

**ESQUEMA Nº 8.**-Esquemas que representan los depósitos de HRP-WGA en los siete animales en que se realizaron inyecciones de este trazador en el putamen. En cada caso se dibujan secciones frontales representativas del estriado ordenadas rostro-caudalmente de izquierda a derecha. El área de inyección comprende una zona **negra** correspondiente al centro de los depósitos, y una zona **rallada** de difusión de la HRP-WGA.

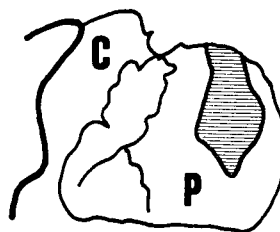
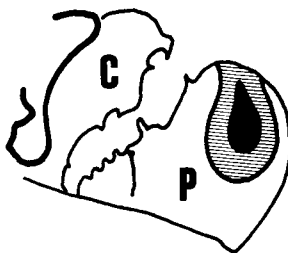
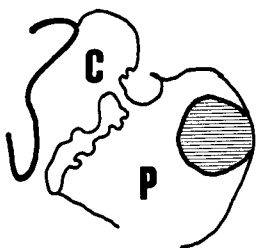
**CASO N°3**



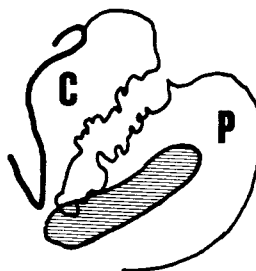
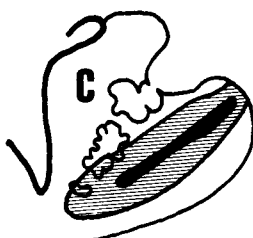
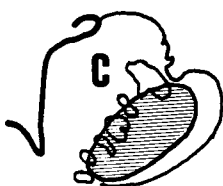
**CASO N°6**



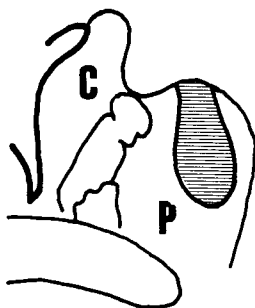
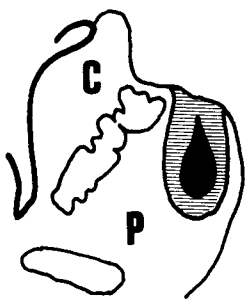
**CASO N°7**



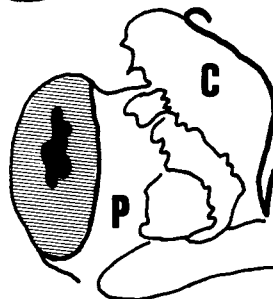
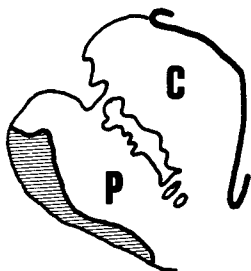
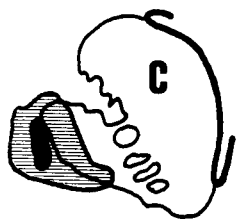
**CASO N°9**



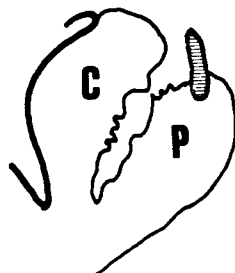
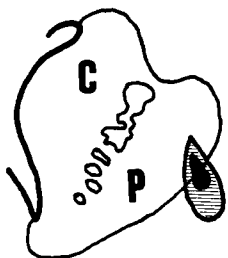
**CASO N°13**



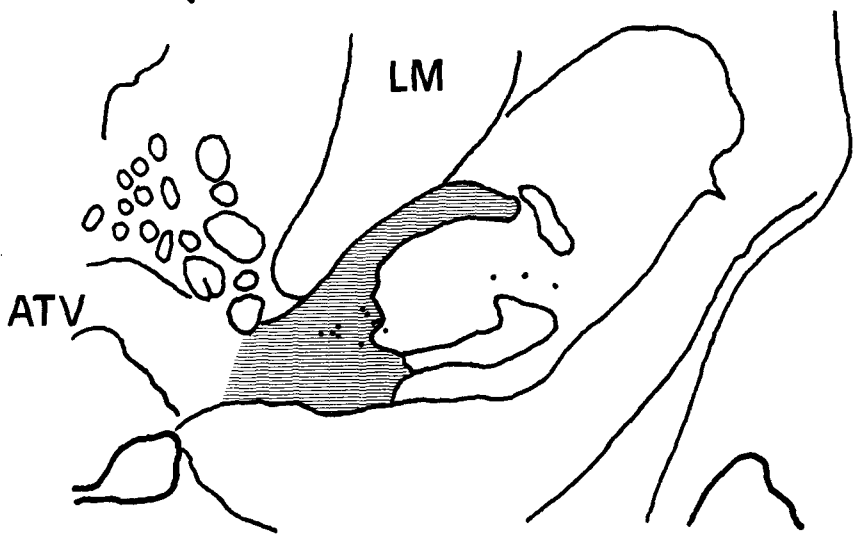
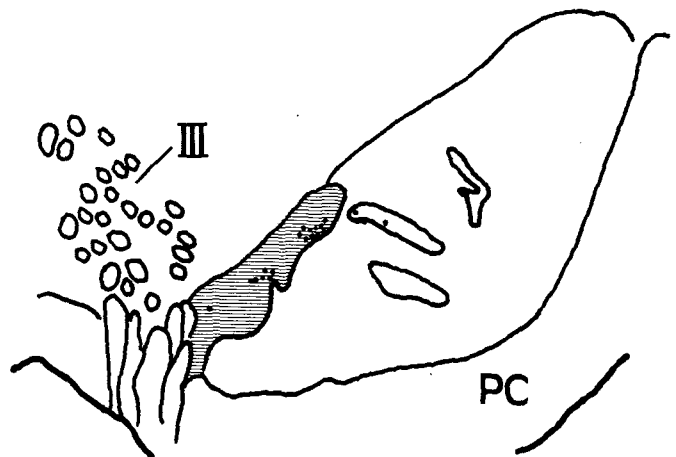
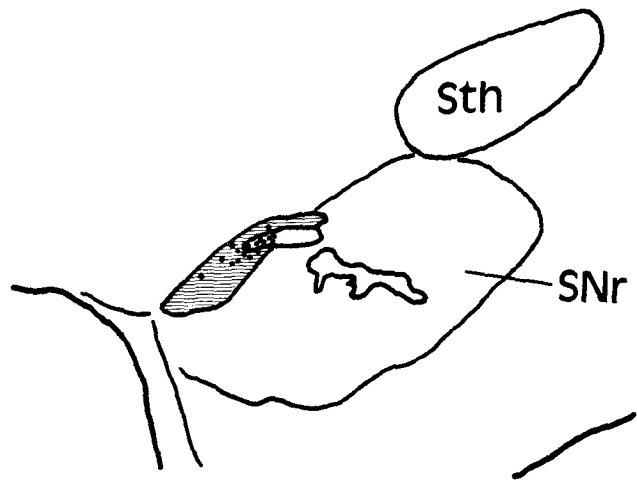
**CASO N°14**

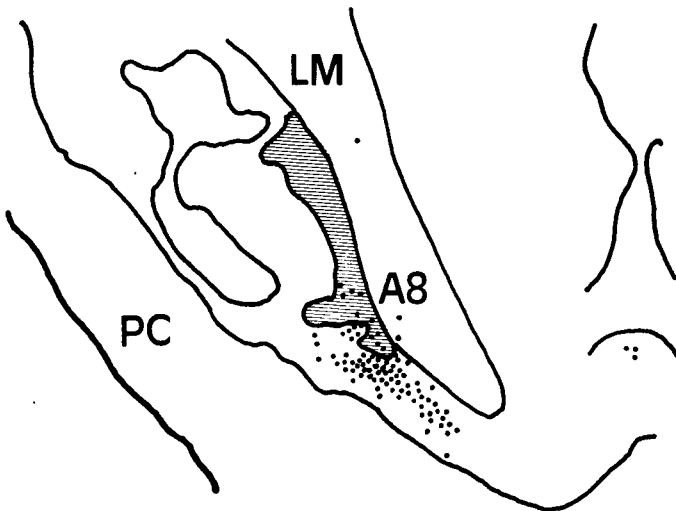
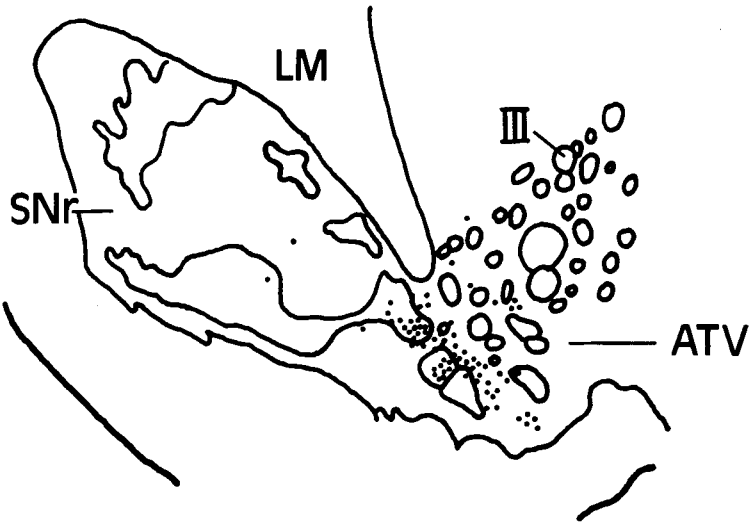
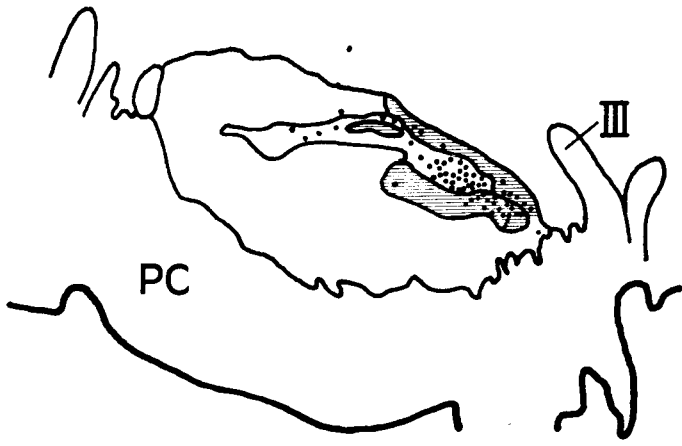


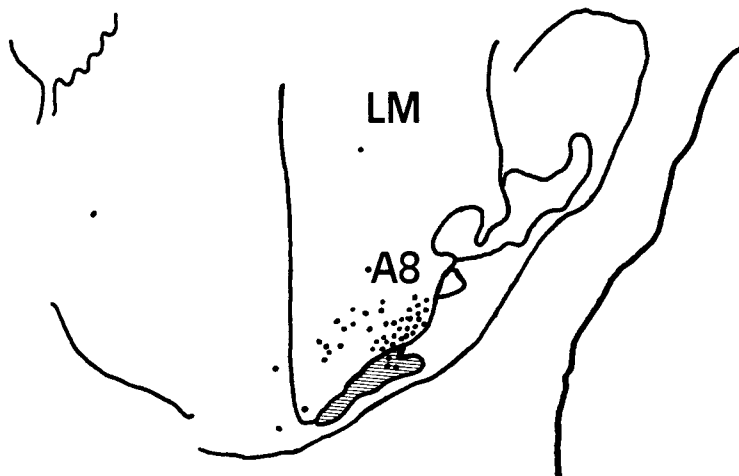
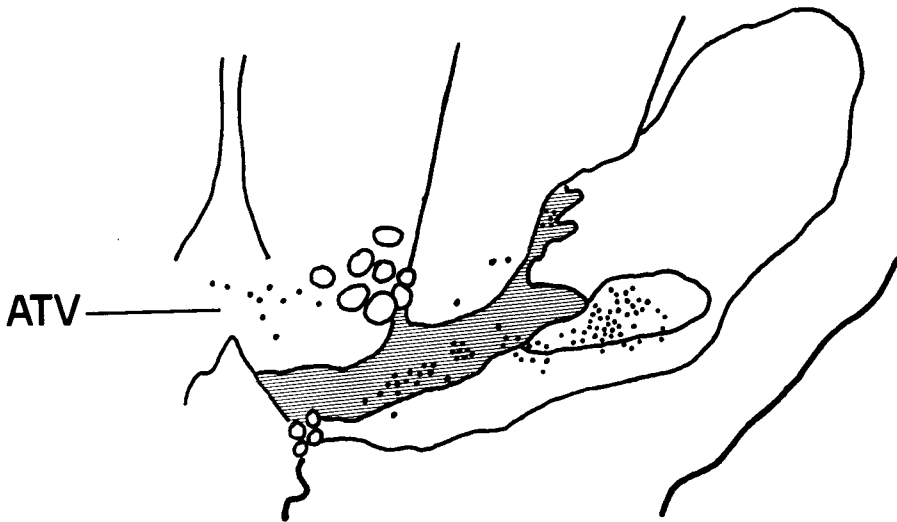
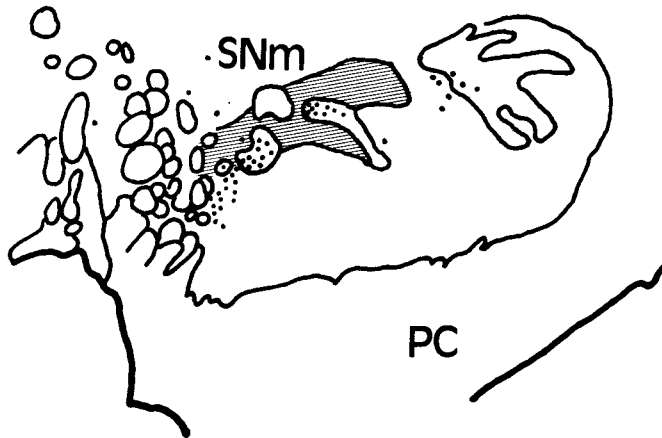
**CASO N°15**



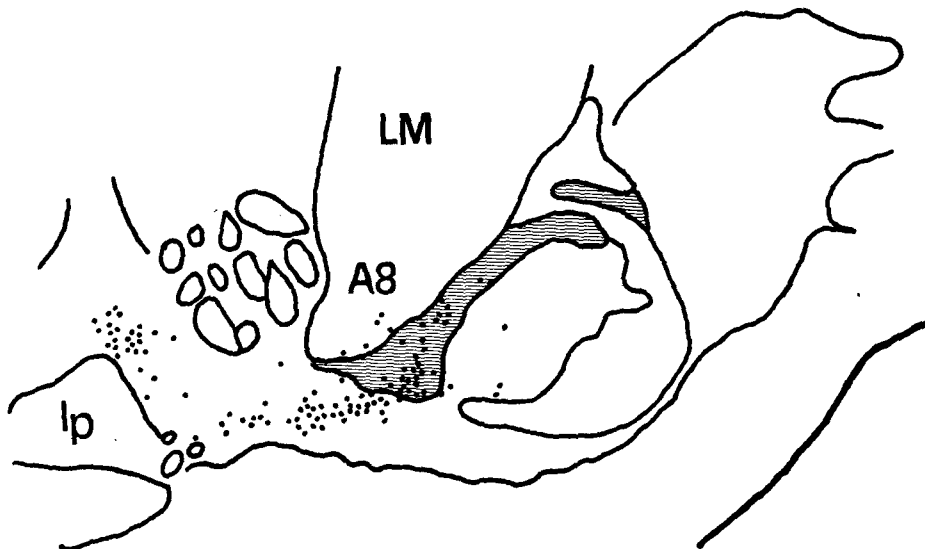
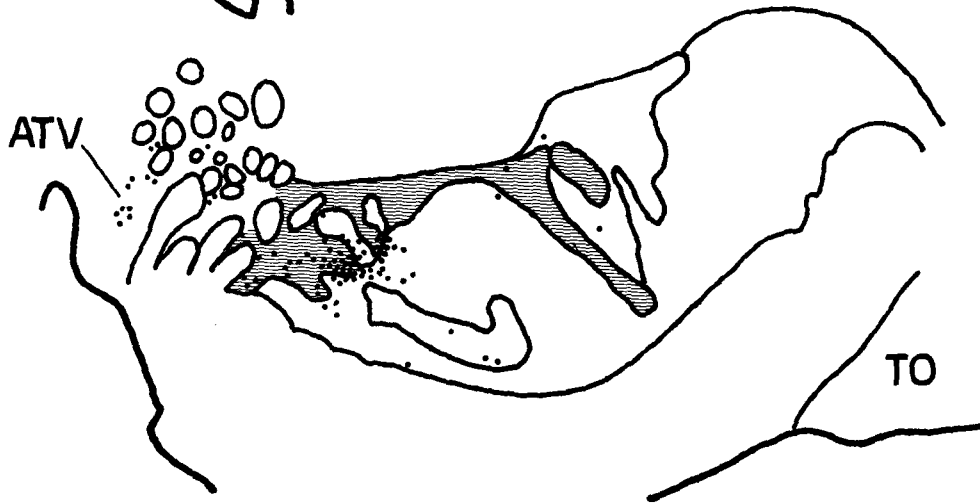
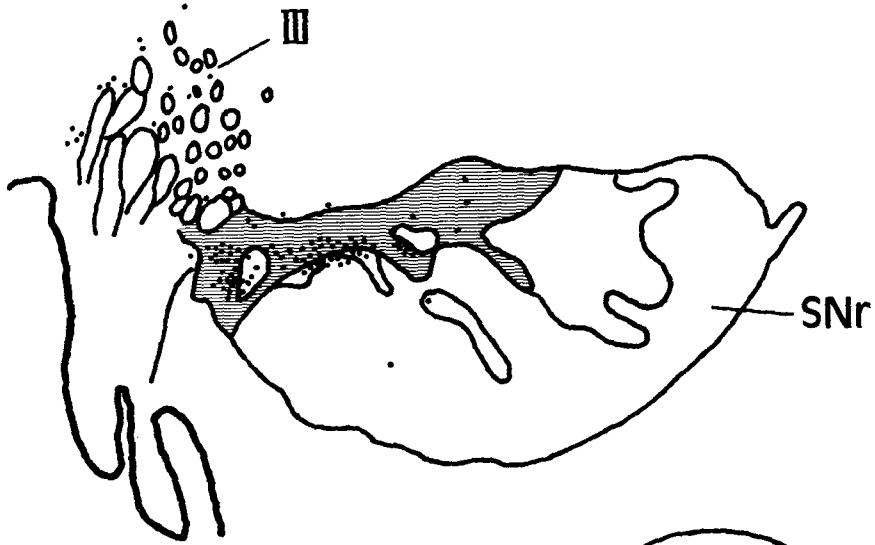
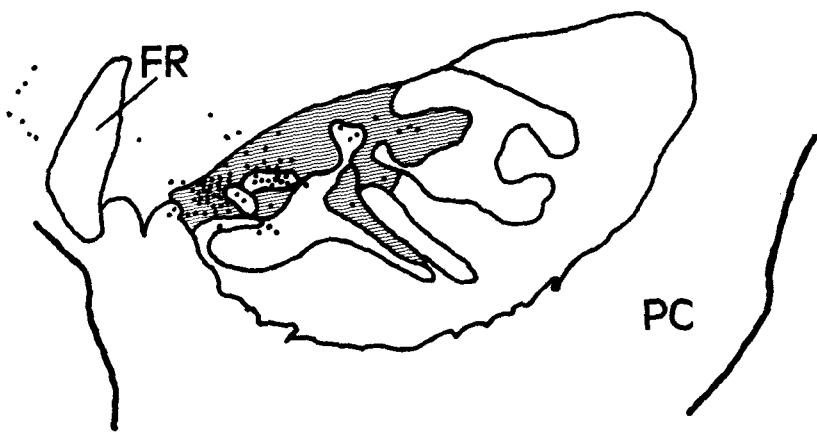
**ESQUEMAS 9 a 15.-**Dibujos de secciones frontales del complejo nigral ordenadas rostro-caudalmente de arriba a abajo en los 7 casos de inyección de HRP-WGA en el putamen. Cada neurona marcada está representada por un **punto negro**. Las zonas en **blanco** y las zonas **ralladas** de la pars compacta corresponden a zonas detectables por su bajo o alto contenido en AChE respectivamente.

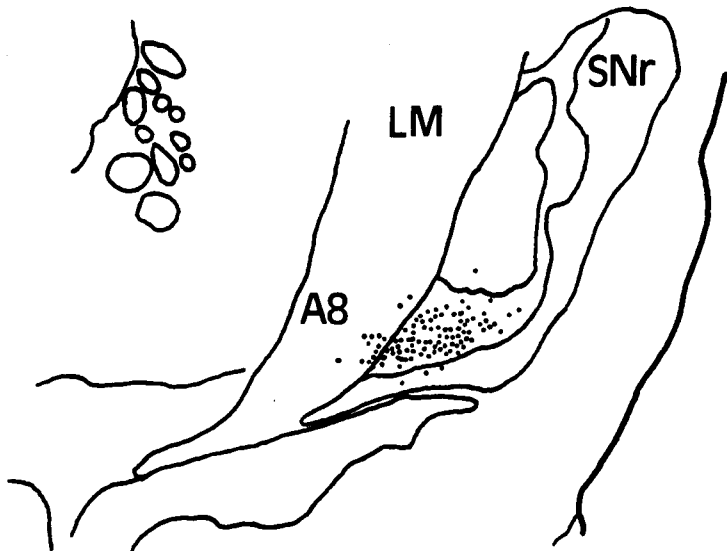
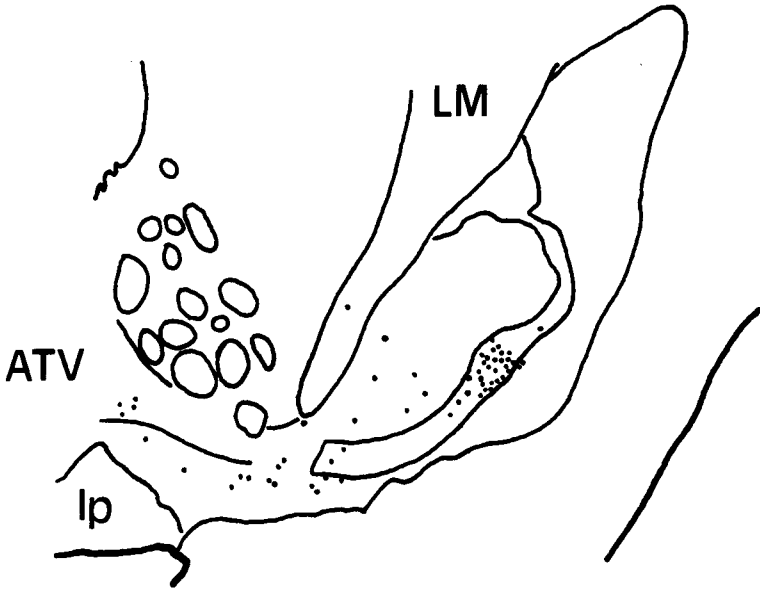
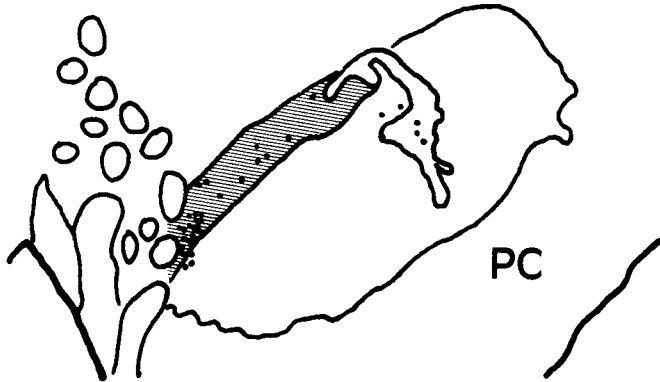
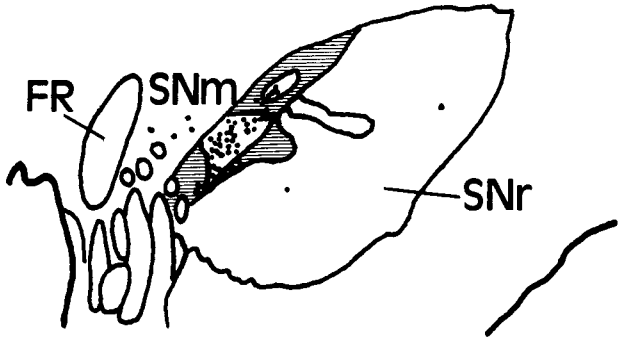


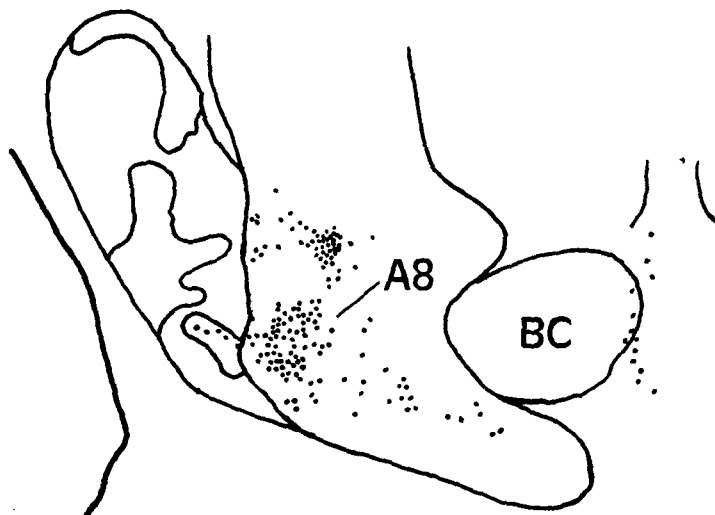
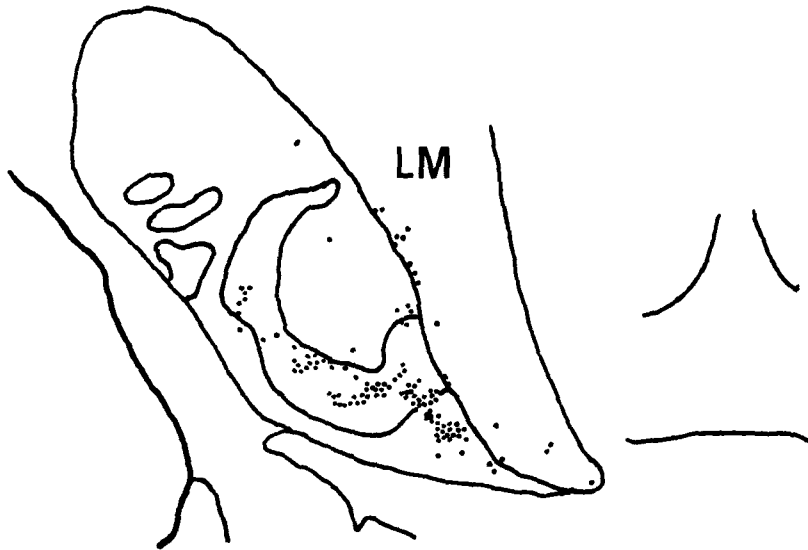
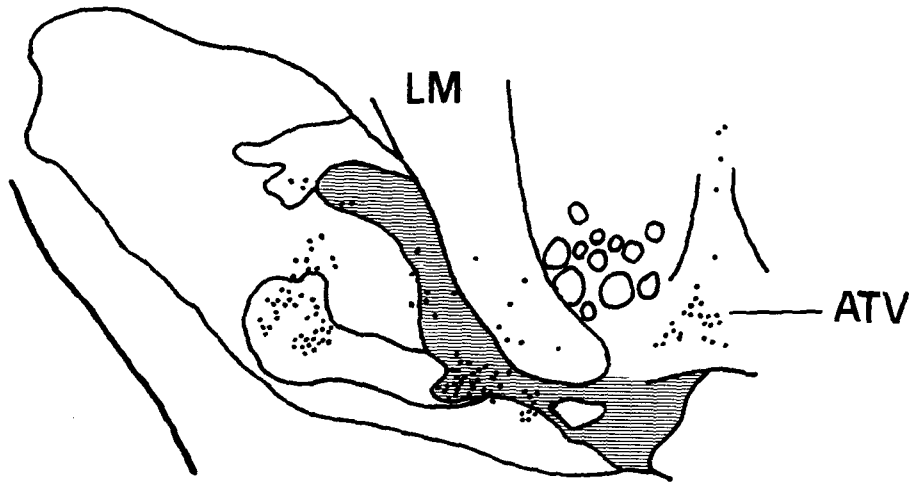
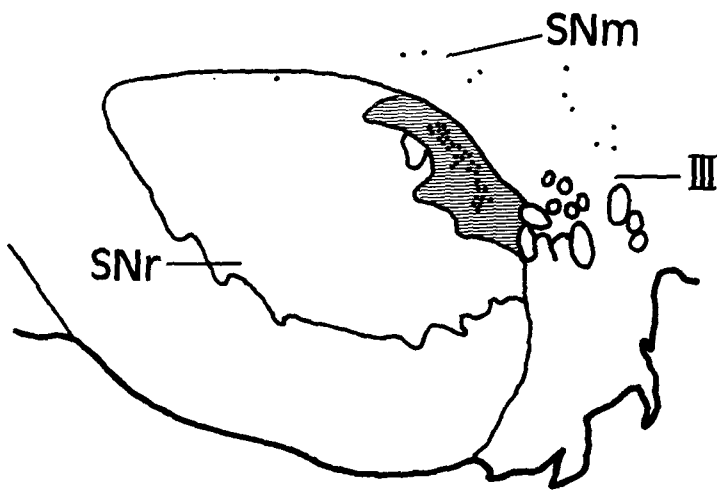


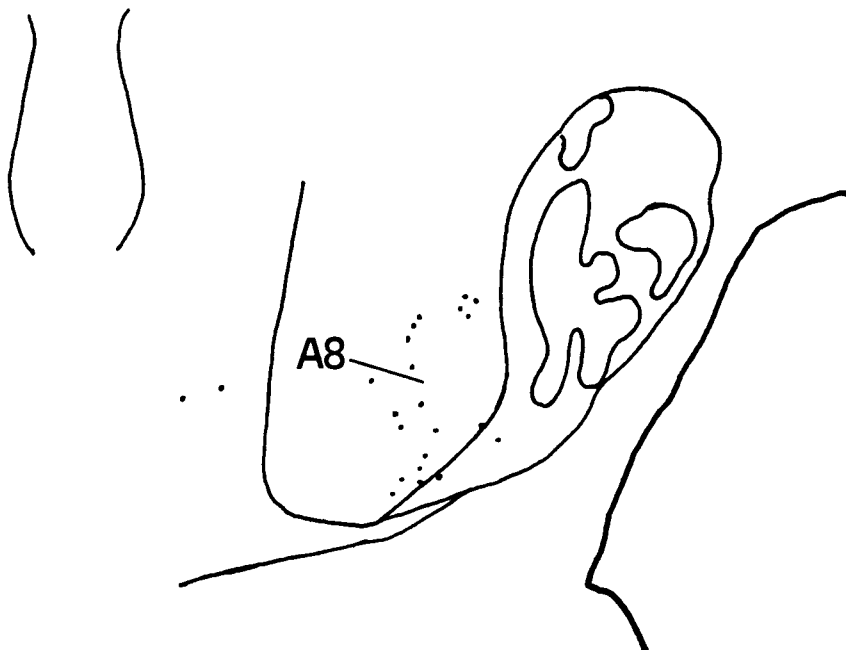
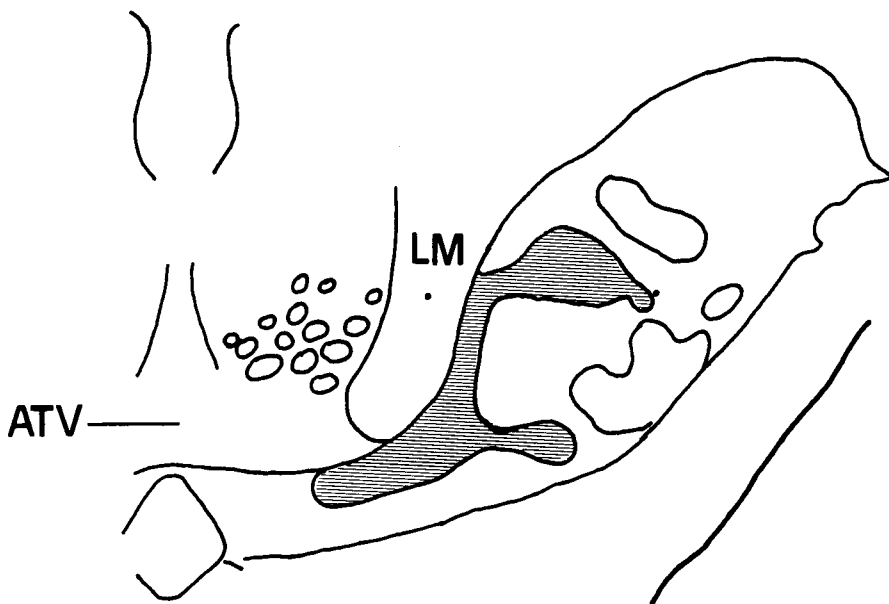
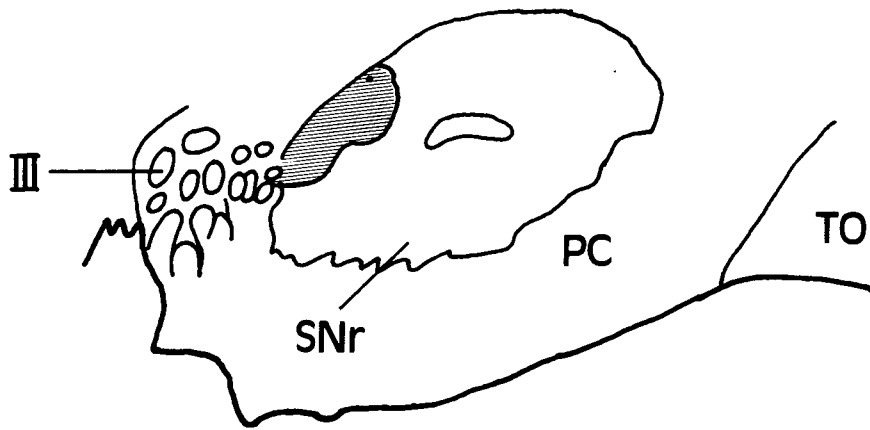












## 2.3. INYECCIONES MIXTAS (NC y Pu).

### CASO Nº 10 (SMRHN-1L).

#### **Descripción de la inyección** (ver esquema nº 16).

En este caso se realizan cuatro inyecciones de Fluoro-Gold (200 nanolitros en total) en la cabeza del núcleo caudado y dos de una solución de HRP-WGA (250 nanolitros en total) en el putamen, ambos del hemisferio izquierdo. En el caso del núcleo caudado los depósitos afectan a la porción medial (2) y dorsolateral del tercio medio del núcleo caudado, y a la porción dorsomedial del tercio caudal del mismo. En las inyecciones putaminales la primera se realiza tras un abordaje oblicuo del núcleo, afectando el área de inyección a la mitad ventrolateral del tercio medio del putamen. La segunda inyección se localiza caudalmente en el putamen y afecta a la mitad dorsolateral de este núcleo. En este último caso se realizó un abordaje vertical.

#### **Marcaje neuronal observado** (ver esquema nº 17 y Figura nº 6).

No se observan neuronas doblemente marcadas por ambos trazadores utilizados. Predominan las neuronas marcadas por la HRP depositada en el putamen. El marcaje neuronal se extiende rostrocaudalmente por todo el complejo nigral incluyendo a los grupos A10, A8 y a la pars mixta. En todas estas estructuras hay un mayor número de neuronas marcadas que proyectan al putamen que al núcleo caudado. Grupos neuronales marcados por uno u otro trazador se interdigitan claramente en algunos niveles. Las neuronas marcadas por la HRP (nigro-putaminales) se localizan dorsalmente a las marcadas por el Fluoro-Gold (nigro-caudadas).

A nivel de la *mitad rostral* de la sustancia negra pars compacta, y concretamente en la banda horizontal principal, las neuronas nigro-putaminales ocupan una posición dorsal situándose tanto dentro como fuera de los límites de las zonas detectables de baja actividad acetilcolinesterásica. Existen neuronas nigrales de proyección al putamen que se marcan por la HRP a nivel de las expansiones ventrales (pobres en

AChE) más laterales de SNc, pero no se observan en las mediales. Las neuronas de proyección al núcleo caudado se sitúan ventralmente a las precedentes a nivel de la banda horizontal principal de SNc. Igualmente hay grupos menos numerosos de neuronas marcadas en las expansiones digitiformes ventrales, principalmente en las que ocupan una posición más medial. En las expansiones ventrales más laterales se observan neuronas marcadas por uno y otro trazador.

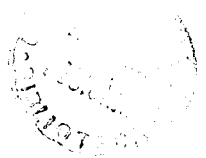
En la *mitad caudal* de la pars compacta las neuronas marcadas que proyectan al putamen siguen siendo mucho más numerosas que las que lo hacen al núcleo caudado. No obstante grupos neuronales netos marcados por uno u otro trazador son claramente delimitables ya que se interdigitan. Medialmente la mayoría de las neuronas marcadas corresponden a neuronas que proyectan al putamen, localizándose en zonas de alto contenido en AChE.

Lateralmente las neuronas marcadas por ambos trazadores tienden a situarse ventralmente correspondiendo a zonas pobres en AChE. Existe una delimitación bastante precisa entre los grupos neuronales de proyección al núcleo caudado y grupos de proyección al putamen.

## **CASO Nº 12 (SMHN-4L).**

**Descripción de la inyección** (ver esquema nº 16 y Figura nº 10A, B y D).

En este caso se realizan inyecciones de HRP-WGA en el núcleo caudado y de Fluoro-Gold en el putamen del hemisferio izquierdo. En la cabeza del núcleo caudado se llevan a cabo cinco depósitos de solución trazadora, empleando en todos los casos un abordaje vertical. En primer término se realiza una inyección en el tercio rostral del núcleo caudado centrada en la mitad dorsal del núcleo. A nivel del tercio medio se realiza un depósito en la porción dorsolateral, otro en la porción media y un tercero en la porción ventral del núcleo caudado. Finalmente se realiza una quinta inyección en la porción dorsal del tercio caudal de la cabeza del núcleo caudado. La cantidad total de HRP-WGA inyectada es de 400 nanolitros.



En el caso del putamen se emplea un abordaje oblicuo estando centrada la inyección en la mitad ventral del tercio medio del núcleo, donde se realizan dos inyecciones que representan un total de 300 nanolitros de solución trazadora.

**Marcaje neuronal observado** (ver esquema nº 18).

El marcaje neuronal es muy abundante y se extiende rostrocaudalmente por todo el complejo nigral, si bien, como en el caso anterior, tampoco se observan neuronas marcadas por ambos trazadores a la vez. El número de neuronas marcadas por la HRP (n. caudado) es superior al de neuronas marcadas por el Fluoro-Gold (putamen). Se aprecian neuronas marcadas por uno u otro trazador, con predominio de las neuronas de proyección al putamen, a nivel de la mitad caudal del área tegmental ventral, y neuronas marcadas en número moderado, principalmente de proyección al núcleo caudado, a nivel del grupo A8. El marcaje neuronal es escaso a nivel de la pars mixta.

A nivel de la *mitad rostral* de la pars compacta de la sustancia negra las neuronas marcadas nigro-putaminales se localizan, como en el caso anterior, dorsalmente a las neuronas de proyección nigro-caudada, estando las primeras prácticamente confinadas en la porción horizontal principal de la pars compacta. Se observan además algunas neuronas marcadas por la HRP-WGA (N. caudado) en las expansiones ventrales pobres en AChE.

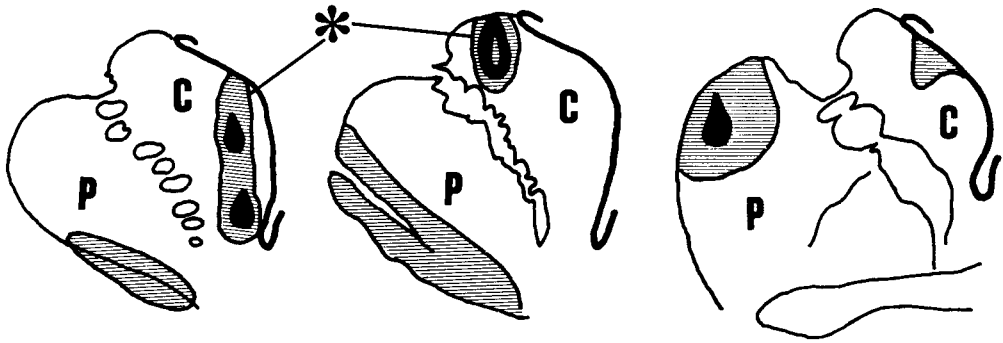
En la *mitad caudal* de la pars compacta de la sustancia negra son ostensibles grupos de neuronas marcadas por uno u otro trazador. Los grupos neuronales de proyección al putamen tienden a ser dorsales respecto a las neuronas marcadas por la inyección en el núcleo caudado. Las neuronas marcadas por la inyección de Fluoro-Gold (putamen) se localizan en su mayor parte en la porción más medial de la pars compacta, en zonas ricas en acetilcolinesterasa. No obstante un grupo de estas neuronas se sitúan lateralmente, correspondiendo a islotes de baja actividad acetilcolinesterásica. Las neuronas nigrales que proyectan al núcleo caudado tienden a situarse en los dos tercios mediales de la pars compacta en zonas ricas en AChE, pero también se observan grupos neuronales marcados en zonas ventrales de la pars

compacta, pobres en AChE. En algunos de estos islotes de baja actividad enzimática coexisten neuronas marcadas por uno y por el otro trazador. La interdigitación de grupos neuronales marcados por uno u otro trazador es muy clara en algunos cortes.

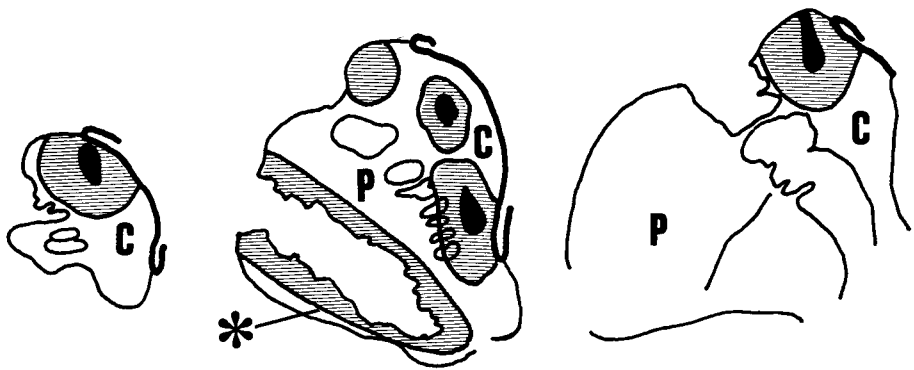


**ESQUEMA N° 16.**-Esquemas que representan secciones frontales del estriado, ordenadas en cada caso rostrocaudalmente de izquierda a derecha, en nuestros casos n° 10 y 12, en que se realizaron inyecciones simultáneas de Fluoro-Gold (\*) y de HRP-WGA, depositando uno de estos trazadores en el núcleo caudado y el otro en el putamen. En las inyecciones de HRP-WGA se dibuja el centro (**negro**) y la zona periférica de difusión (**rallado**) del trazador. El presumible lugar efectivo de las inyecciones de Fluoro-Gold se representa mediante una zona rallada.

# CASO N° 10

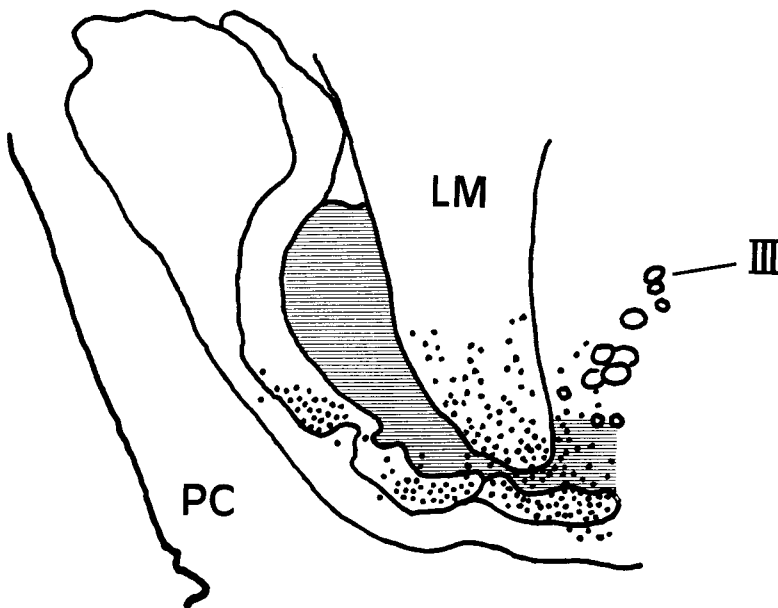
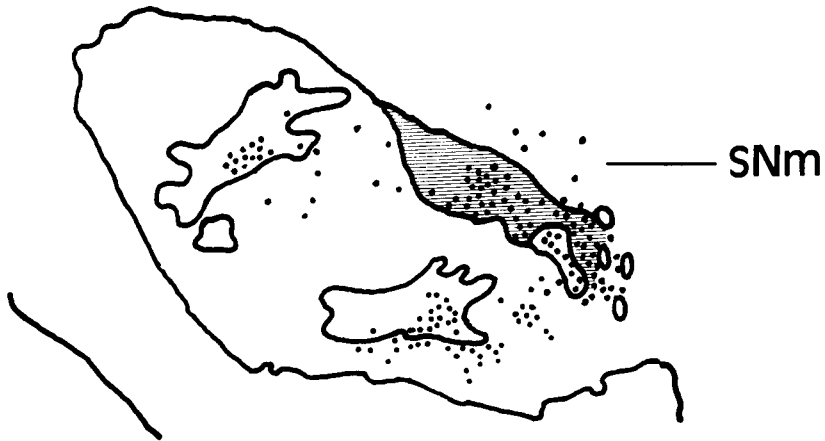
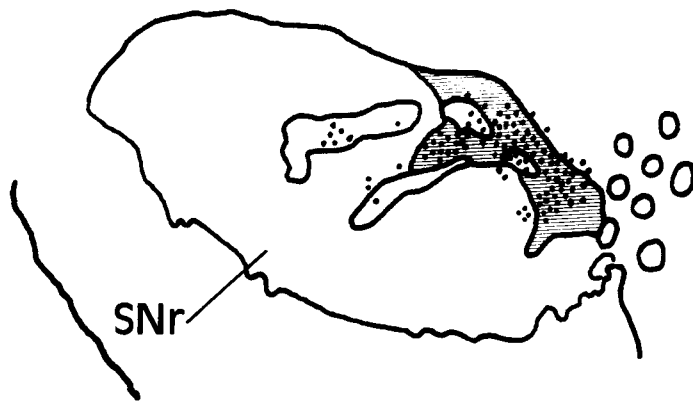


# CASO N° 12



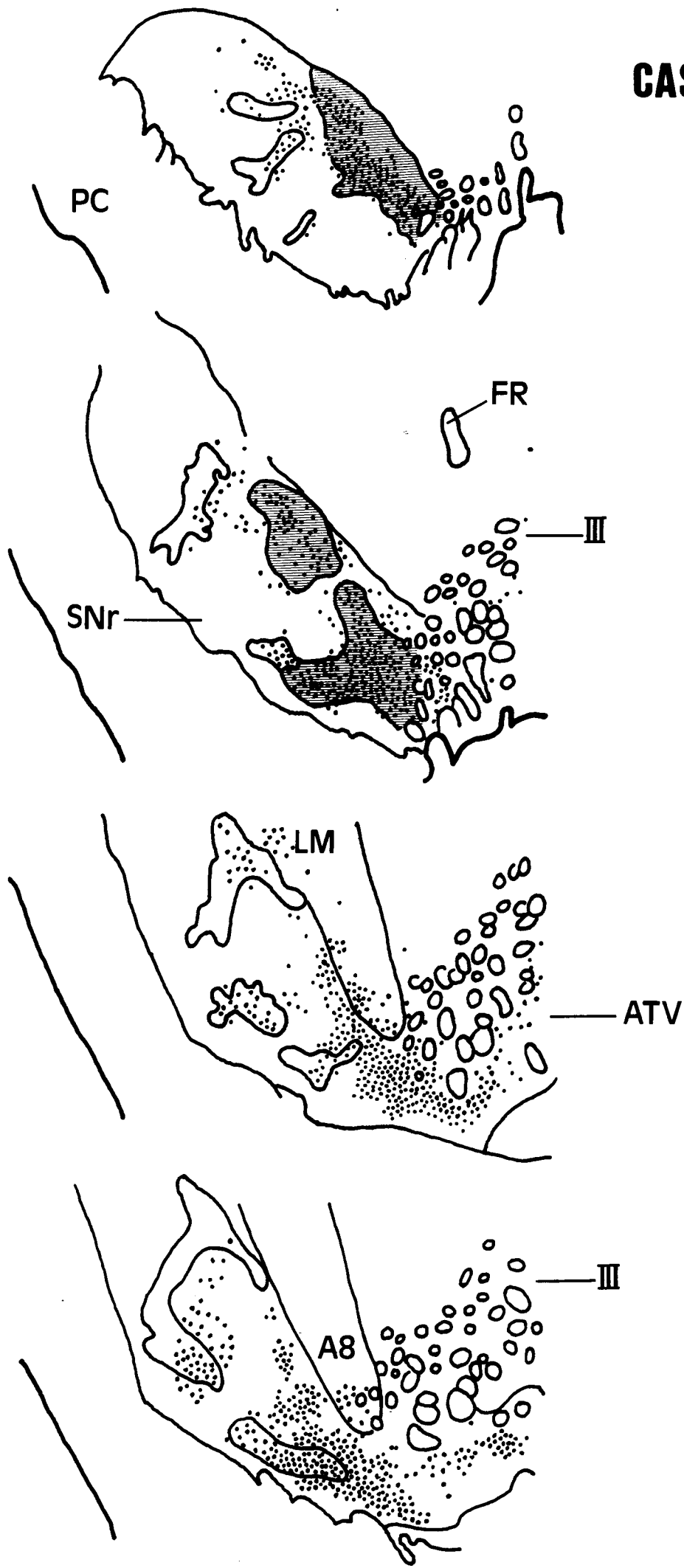
**ESQUEMAS N° 17 y 18.**-Dibujos diagramáticos de secciones frontales del complejo nigral ordenadas rostro-caudalmente de arriba a abajo y correspondientes a los casos n° 10 y 12 en que se realizaron inyecciones de Fluoro-Gold y de HRP-WGA en el núcleo caudado y en el putamen. Como en casos anteriores las áreas en **blanco** y las áreas **ralladas** corresponden a zonas detectables en la pars compacta por su baja o alta actividad acetilcolinesterásica respectivamente. Los **puntos rojos** en ambos casos representan neuronas marcadas por la inyección de trazador efectuada en el putamen, mientras los **puntos negros** representan neuronas que, presumiblemente, proyectan al núcleo caudado.

# CASO N°10



• Pu  
• NC

# CASO N° 12



## 2.4. INYECCIONES EN LA CAPSULA INTERNA.

### CASO Nº 5 (SMRN-4L).

#### **Descripción de la inyección** (ver esquema nº 19).

Se realiza un abordaje vertical a nivel del hemisferio izquierdo, atravesando sucesivamente la corteza, sustancia blanca, cuerpo calloso, ventrículo lateral y núcleo caudado, para centrar la inyección de HRP-WGA en la porción más ventral de la porción oblicua de la cápsula interna, entre el núcleo caudado y el putamen. El área de inyección incluye además de la cápsula interna a las porciones vecinas de núcleo caudado y putamen (a nivel del tercio medio considerado anteroposteriormente) además de los puentes celulares de unión que unen a ambas estructuras. La cantidad total de solución trazadora inyectada en este caso es de 20 nanolitros.

#### **Descripción del marcaje neuronal observado** (ver esquema nº 20).

Se observa un marcaje neuronal moderado en toda la extensión rostrocaudal del complejo nigral. Detectamos neuronas marcadas aisladamente en la mitad caudal del área tegmental ventral, y también en el grupo A8. Se observan neuronas marcadas a nivel de la pars mixta de la sustancia negra, dorsalmente a la pars compacta de la sustancia negra.

A nivel *rostral* de la pars compacta de la sustancia negra la gran mayoría de las, por otra parte, escasas neuronas marcadas se observan a nivel de la porción horizontal principal. Solo se aprecia alguna neurona marcada en las porciones más ventrales de la sustancia negra, pero fuera de los límites de las expansiones digitiformes pobres en acetilcolinesterasa, en zonas que pudieran corresponder a la pars reticulata de la sustancia negra.

A niveles *más caudales* de la sustancia negra pars compacta, cuando ya es ostensible el grupo A8, las neuronas marcadas tienden igualmente a situarse dorsalmente, en zonas ricas o pobres en AChE.

## **CASO Nº 8 (SMHN-3L).**

### **Descripción de la inyección** (ver esquema nº 19).

Tras realizar un abordaje vertical se realizan cuatro penetraciones con la micropipeta para realizar sendos depósitos de una solución de HRP-WGA en el hemisferio izquierdo. A nivel rostral el depósito queda centrado en la porción dorsal de la cápsula interna, entre el núcleo caudado y el putamen. A nivel del tercio medio se realizan dos depósitos. El más dorsal se localiza en la cápsula interna afectando tanto al núcleo caudado como al putamen, y a los puentes de unión entre ambos. El más ventral está centrado en la porción ventral del núcleo caudado, extendiéndose hacia la cápsula interna. En el tercio caudal la inyección está centrada a nivel de la cápsula interna, extendiéndose tanto hacia el núcleo caudado como al putamen. La cantidad total de trazador inyectada es de 200 nanolitros.

### **Descripción del marcaje neuronal** (ver esquema nº 21).

El marcaje neuronal es abundante y se extiende rostrocaudalmente por el complejo nigral, incluyendo a los grupos A10, sobre todo, y A8. Un menor número de neuronas marcadas se observa a nivel de la pars mixta.

En la *mitad rostral* de la pars compacta de la sustancia negra el marcaje neuronal tiende a concentrarse en la banda horizontal principal (especialmente en su porción ventral) donde se observan neuronas marcadas mediolateralmente que se corresponden con zonas pobres o ricas en actividad acetilcolinesterásica. Se detectan algunas neuronas marcadas en la raíz de las expansiones ventrales digitiformes pobres en AChE, especialmente en las que ocupan una posición más medial, e igualmente hay alguna neurona marcada en las expansiones más laterales, siempre en la porción más dorsal de las mismas.

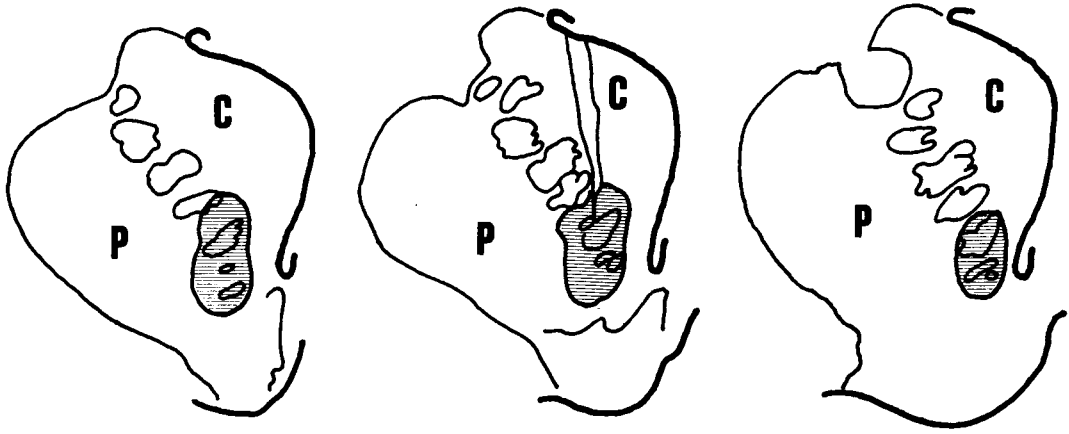
En la *mitad caudal* de SNc el marcaje neuronal tiende a ser dorsal. La mayor parte de las neuronas marcadas a estos niveles se encuentran en zonas de alta actividad

acetilcolinesterásica. Se detectan neuronas marcadas en zonas que, presumiblemente, corresponden a la pars reticulata de la sustancia negra.

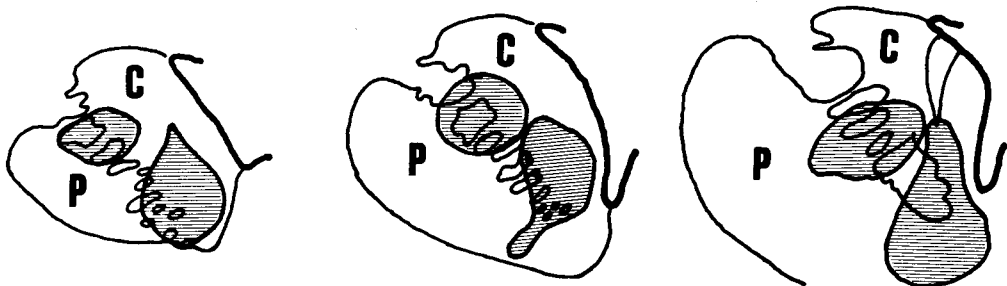


**ESQUEMA N° 19.-**Diagramas representativos de las inyecciones de HRP-WGA efectuadas en dos de nuestros casos (5 y 8) a nivel de la porción oblicua de la cápsula interna y áreas adyacentes del núcleo caudado y putamen. Los esquemas corresponden a secciones frontales del estriado ordenadas rostro-caudalmente de izquierda a derecha. El área efectiva de inyección se representa por medio de una trama rallada.

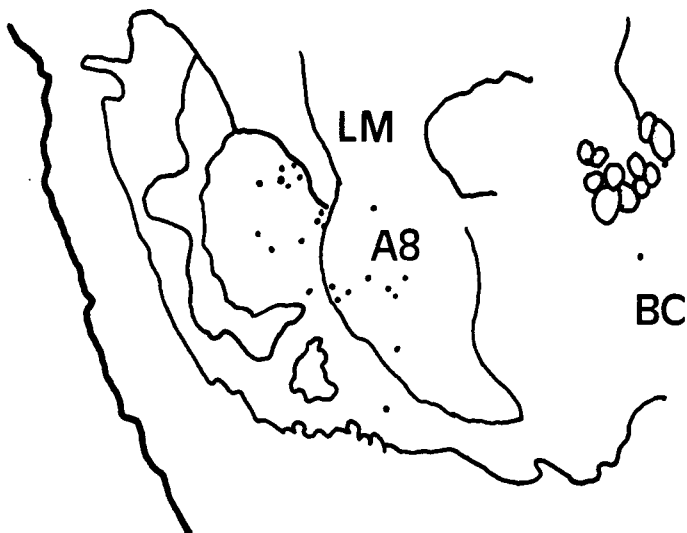
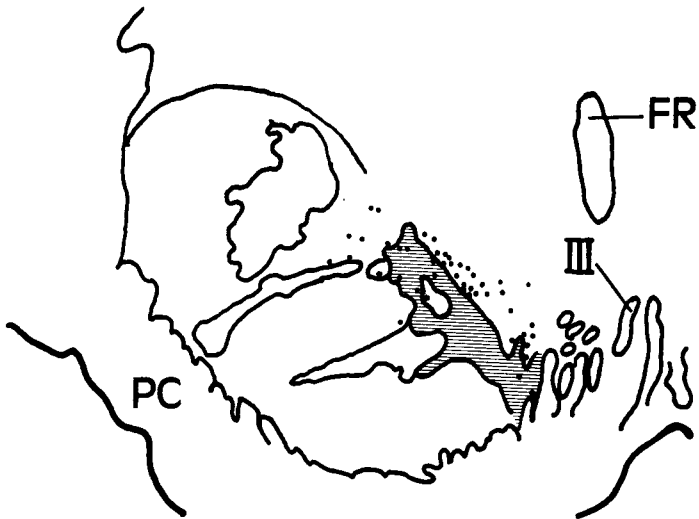
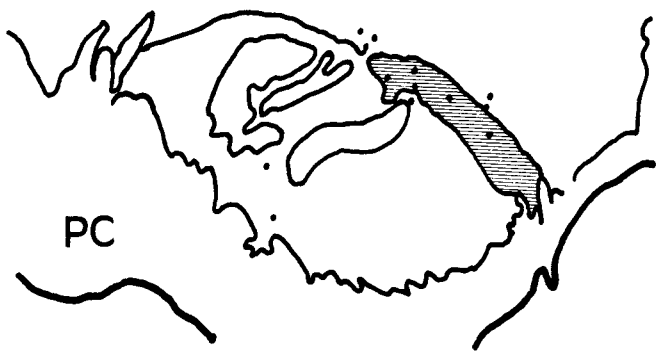
# CASO N° 5

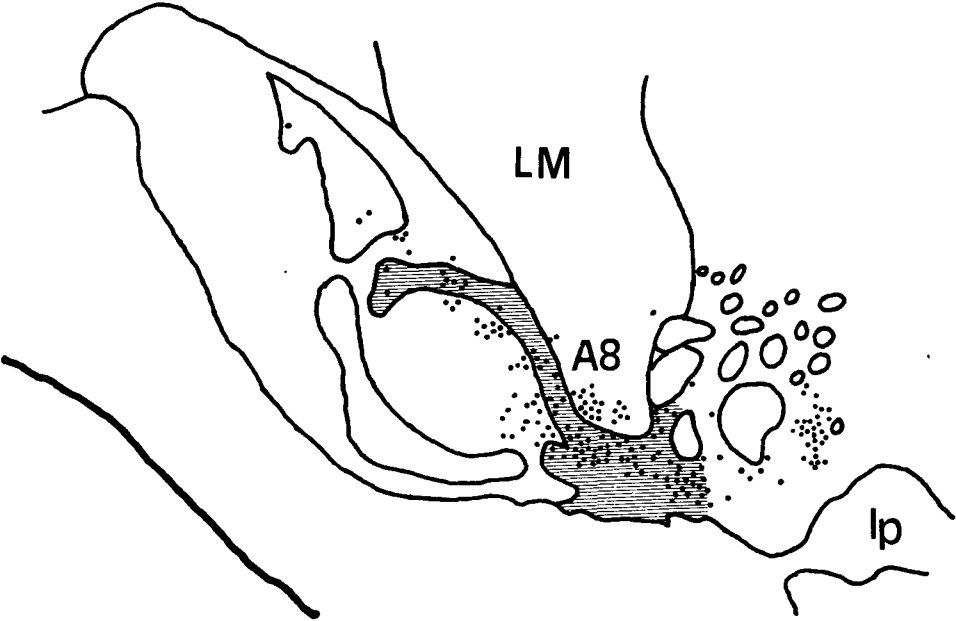
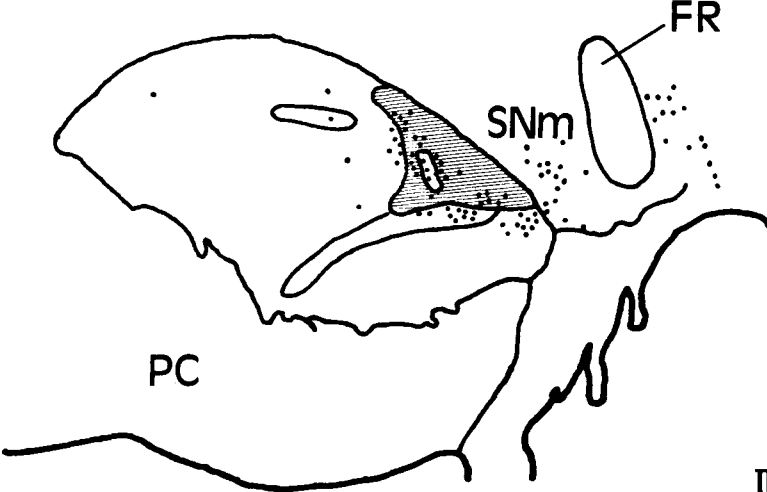


# CASO N° 8



**ESQUEMAS N° 20 y 21.**-Dibujos de secciones frontales del complejo nigral correspondientes a nuestros casos n° 5 y n° 8 que representan el marcaje neuronal provocado por las inyecciones de HRP-WGA efectuadas a nivel de la cápsula interna y áreas adyacentes del estriado. Cada **punto negro** representa una neurona marcada. Las áreas en **blanco** y las **ralladas** de la pars compacta representan zonas detectables por su bajo o alto contenido en AChE, respectivamente.





## **DISCUSSION**

El objetivo principal de nuestro estudio ha sido el análisis del marcaje neuronal retrógrado en el complejo nigral, y más específicamente en la pars compacta de la sustancia negra, tras realizar inyecciones de trazadores grandes o pequeñas en el núcleo caudado y/o en el putamen del mono ardilla (*Saimiri sciureus*). Se ha investigado igualmente si este marcaje neuronal nigral está o no en relación con la subdivisión histoquímica de la pars compacta de la sustancia negra detectada mediante la técnica de la acetilcolinesterasa.

## **1. ORIGEN DE LA ACTIVIDAD ACETILCOLINESTERASICA EN LA SUSTANCIA NEGRA PARS COMPACTA.**

Utilizando la técnica histoquímica de la acetilcolinesterasa (AChE) estudios previos han demostrado tanto en el gato (JIMENEZ-CASTELLANOS y GRAYBIEL, 1987a) como en el mono ardilla (JIMENEZ-CASTELLANOS y GRAYBIEL, 1987b) que la sustancia negra pars compacta presenta una actividad acetilcolinesterásica que en modo alguno es homogénea. En este último trabajo se describen en la mitad rostral de la pars compacta zonas ricas y pobres en AChE, predominando las zonas pobres en las expansiones ventrales digitiformes, mientras en la porción horizontal principal de la pars compacta zonas de diferente actividad acetilcolinesterásica se interdigitan de un modo complejo.

Los hallazgos de nuestro estudio corroboran estos datos, añadiendo por nuestra parte la descripción de la actividad acetilcolinesterásica observada en la mitad caudal del grupo dopaminérgico A9 y precisando que las diferentes zonas de actividad acetilcolinesterásica de la sustancia negra pars compacta parecen deberse tanto a los cuerpos neuronales intrínsecos nigrales y sus prolongaciones como al neuropilo donde ineludiblemente tienen su participación los sistemas de proyección aferente a la sustancia negra. Hemos detectado pues que dentro del grupo dopaminérgico A9 existen zonas oscuras, de una relativamente alta actividad acetilcolinesterásica tanto en los somas como en el neuropilo y, frente a ellas, otros compartimentos mas claros donde no obstante se aprecian cuerpos neuronales que contienen AChE. Finalmente, y con caracter más excepcional, se observan zonas claras en las que la actividad acetilcolinesterásica está ciertamente reducida tanto en el neuropilo como en los cuerpos neuronales. Esta última imagen se observa frecuentemente a nivel de las expansiones ventrales digitiformes de la pars compacta, especialmente en las que ocupan una posición mas medial.

De acuerdo a lo expuesto anteriormente en las zonas nigrales claras, el relativo empobrecimiento en actividad AChE parece deberse a la pérdida de esta enzima a nivel del neuropilo. No obstante y como hemos dicho la mayoría de estas zonas contienen cuerpos neuronales ricos en AChE. En principio se podría pensar que este neuropilo débilmente teñido carece de la inervación acetilcolinesterásica aferente que, por contra, terminaría mas abundantemente en otras zonas de la pars compacta, concretamente en las zonas oscuras que nosotros observamos. En este caso la heterogeneidad de actividad AChE solo estaría indirectamente relacionada con la disposición de las neuronas de proyección nigro-estriada de la pars compacta. No está claro si la proyección estrío-nigral en el mono es acetilcolinesterásica o no (OLIVIER, PARENT, SIMARD y POIRIER, 1970; LEHMAN, FIBIGER y BUTCHER, 1979). Otra posible fuente de fibras acetilcolinesterásicas a la sustancia negra sería el núcleo pedunculopontino del tegmento mesencefálico (MEHLER, 1981; SCARNATI, PROIA, CAMPANA y PACITTI, 1986). No obstante los hallazgos aportados por



SMITH y PARENT (1986) parecen descartar que, al menos las fibras de proyección estrío-nigral sean las responsables de la compartimentación acetilcolinesterásica de la pars compacta de la sustancia negra, toda vez que estos autores sugieren con firmeza que los grupos neuronales nigrales que proyectan independientemente al núcleo caudado o al putamen estarían conectados recíprocamente con sus respectivas zonas de proyección en el estriado.

Otra posible hipótesis sobre la diferente actividad acetilcolinesterásica de la sustancia negra pars compacta sería la liberación selectiva de esta enzima por las propias neuronas nigrales. WESTON y GREENFIELD (1986) han demostrado que existe una liberación intrínseca de AChE en las dendritas de las neuronas de proyección nigro-estriada. De acuerdo a este trabajo la AChE liberada podría quedar secuestrada en regiones concretas del espacio extracelular, y ser la responsable del aspecto que ofrece la sustancia negra al estudiar la actividad acetilcolinesterásica.

En la sustancia negra de la rata la comparación directa en la misma sección de la fluorescencia provocada por el ácido glioxílico (que pone de manifiesto el contenido catecolaminérgico) y la actividad acetilcolinesterásica sugiere que la mayoría de los cuerpos neuronales dopaminérgicos y sus prolongaciones contienen acetilcolinesterasa, si bien el emparejamiento entre uno y otro tipo de neuronas no es perfecto (BUTCHER y MARCHAND, 1978). De acuerdo a estos datos deberíamos encontrar un alto grado de correspondencia entre neuronas AChE positivas y células de proyección nigro-estriada. Además, existen interneuronas nigrales en la rata que contienen acetilcolinesterasa (HENDERSON, 1981). Si, como ocurre en la rata, la co-localización de AChE en neuronas dopaminérgicas existe también en el mono, esto sugeriría que la mayoría de las neuronas AChE positivas de las expansiones ventrales digitiformes pobres en colinesterasa, así como las neuronas acetilcolinesterásicas fuera de las mismas, serían neuronas de proyección nigro-estriada. Sin embargo el contenido en AChE del neuropilo alrededor de estos cuerpos neuronales es, por contra, dramáticamente distinto para los dos tipos de neuronas antes mencionados.

En resumidas cuentas, será preciso investigar aún más para esclarecer la participación que puedan tener las neuronas y las proyecciones aferentes a la pars compacta en la compleja compartimentación histoquímica de esta estructura. En este sentido sugerimos, como paso previo, estudiar la modificación de la actividad acetilcolinesterásica en la sustancia negra, tras lesionar selectivamente las dos principales aferencias a la pars compacta que parecen contener acetilcolinesterasa: el sistema estrío-nigral y el tegmento-nigral.

## **2. PROYECCIONES NIGRO-CAUDADAS Y NIGRO-PUTAMINALES.**

Para comprobar si existían neuronas en el complejo nigral cuyos axones se dicotomizaban, innervando a la vez al núcleo caudado y al putamen procedimos a inyectar dos trazadores distintos, uno en cada una de estas estructuras estriatales. Los resultados obtenidos muestran que, en el mono ardilla estas neuronas no existen. Es decir que las neuronas de la sustancia negra que proyectan al núcleo caudado son distintas a las que lo hacen al putamen, y que además estas dos poblaciones neuronales forman grupos que en muchos niveles se interdigitan claramente. Estos hallazgos concuerdan con los observados por el grupo de Parent en Montreal (PARENT et al., 1983; SMITH y PARENT, 1986), si bien estos autores no emplean mas que un único trazador (HRP-WGA), y por tanto en el mismo caso no pueden comparar si existe doble marcaje neuronal, ni tampoco pueden estudiar la interdigitación de grupos neuronales nigrales que innervan al núcleo caudado y al putamen del mismo hemisferio cerebral.

Si comparamos nuestras observaciones en los casos en que inyectamos los dos trazadores con los esquemas de SMITH y PARENT (1986) teniendo en cuenta que estos autores no utilizan ninguna técnica para poder delimitar la pars compacta de la sustancia negra, nos encontramos con la coincidencia con los mismos en que, a

niveles rostrales de la pars compacta de la sustancia negra las neuronas que proyectan al núcleo caudado ocupan una posición ventral en relación a las que proyectan al putamen. Las primeras ocupan la mitad ventral, aproximadamente, de la banda horizontal principal de SNc, y también están presentes en las expansiones ventrales que se originan en esta zona. Sin embargo en nuestros casos, a diferencia de los hallazgos de los autores mencionados, observamos el marcaje de algunas neuronas nigro-putaminales en las expansiones ventrales que ocupan una posición más lateralizada en la sustancia negra. Coincidimos plenamente con los autores mencionados si analizamos el marcaje en la mitad caudal de la pars compacta. A estos niveles se difumina un poco la relación dorsoventral antes comentada. Se observa una alternancia de grupos neuronales marcados por uno u otro trazador, si bien es característico que son neuronas que proyectan al putamen las que ocupan una posición más medial y a la vez más lateralizada en la pars compacta de la sustancia negra. Las neuronas marcadas por la inyección en el núcleo caudado predominan rostralmente mientras la inyección realizada en el putamen marcó más neuronas en la porción caudal de SNc. Parece, en resumen que existe una perfecta complementariedad entre los grupos nigrales que inervan al núcleo caudado y los que lo hacen al putamen.

Adicionalmente observamos el marcaje neuronal en el área tegmental ventral y en la zona del núcleo retrorubral. En la primera el marcaje neuronal observado se localiza en la porción caudal, existiendo en nuestro dos casos un predominio de neuronas marcadas que proyectan al putamen y éstas neuronas tienden a situarse dorsalmente a las que proyectan al núcleo caudado. El área retrorubral que corresponde en parte al grupo dopaminérgico A8, presenta un marcaje neuronal por ambos trazadores, si bien en el caso 10 las neuronas marcadas que proyectan al putamen son mucho más numerosas que las que lo hacen al núcleo caudado, mientras que en el caso 12 el marcaje neuronal es menos abundante, y prácticamente similar para las neuronas marcadas por uno y otro trazador. En conjunto nuestros hallazgos confirman resultados previos de que el área tegmental ventral inerva preferentemente

al estriado ventral, mientras que el grupo A8 prácticamente contribuye a la innervación de la totalidad del estriado (NAUTA, SMITH, FAULL y DOMESICK, 1978; SWANSON, 1982). El marcaje neuronal observado en la sustancia negra pars mixta en estos casos es escaso, pero predominan claramente las neuronas marcadas por la inyección realizada en el putamen. En ambos casos también se observan neuronas marcadas fuera de los límites de la pars compacta, en zonas que pudieran corresponder a la pars reticulata.

### **3. SUBDIVISIONES DEL ESTRIADO Y COMPARTIMENTACION NIGRAL.**

En principio, los hallazgos realizados sobre la conectividad nigro-estriada y la compartimentación acetilcolinesterásica de la sustancia negra en nuestro estudio sugieren tres hipótesis que no son excluyentes entre sí, para explicar la particular distribución de las neuronas marcadas en la sustancia negra pars compacta.

En primer término, esta compartimentación de neuronas marcadas pudiera reflejar la ya discutida existencia de grupos neuronales nigrales que proyectan respectivamente al núcleo caudado o al putamen (PARENT et al., 1983; SMITH y PARENT, 1986).

En segundo lugar, esta compartimentación pudiera obedecer a criterios estrictamente topográficos en la proyección nigro-estriada.

Finalmente, la compartimentación nigral podría ser la representación local de la subdivisión del estriado, donde se han descrito zonas pobres en AChE (estriosomas) inmersas en una matriz extraestriosómica rica en AChE (GRAYBIEL y RAGSDALE, 1978), o incluso a la subdivisión de esta última zona (MALACH y GRAYBIEL, 1986; JIMENEZ-CASTELLANOS y GRAYBIEL, 1989).

Dado que la existencia de grupos neuronales en la sustancia negra ha sido asociada con subpoblaciones de neuronas que proyectan diferencialmente al núcleo

caudado o al putamen (PARENT et al., 1983; SMITH y PARENT, 1986) sería lógico pensar que la compartimentación acetilcolinesterásica de la sustancia negra estaría relacionada con estos grupos neuronales que proyectan al núcleo caudado o al putamen. Nuestros hallazgos parecen contradecir esta hipótesis.

En primer término, tras realizar inyecciones masivas en el núcleo caudado, sobre todo observamos neuronas marcadas en las expansiones ventrales, pobres en AChE, de la pars compacta, pero en otros casos predominan en el tejido que rodea a estas prolongaciones (ver caso nº 16). Estos hallazgos sugieren que las neuronas que proyectan al núcleo caudado estarían presentes tanto en las prolongaciones digitiformes como fuera de ellas.

En segundo término, también encontramos neuronas marcadas a nivel de estas prolongaciones ventrales, si bien en menor proporción, en los casos de inyección de trazador a nivel del putamen. Por tanto parece que las neuronas de estas expansiones de la pars compacta no parecen estar exclusivamente relacionadas desde el punto de vista de su conectividad con el putamen o con el núcleo caudado. Esta circunstancia se puede observar adicionalmente en otras zonas de la pars compacta donde el grupo de PARENT sólo representa grupos de neuronas que proyectan selectivamente a una u otra estructura estriatal.

Si bien los compartimentos histoquímicos detectados en la sustancia negra no parecen estar exclusivamente relacionados con unidades que proyecten al núcleo caudado o al putamen, indudablemente existen indicios de que las especializaciones regionales del estriado serían importantes para determinar qué compartimentos se marcarían por la inyección de trazador. Parece obvio que el marcaje neuronal en las expansiones ventrales digitiformes, especialmente las más mediales, era prominente en inyecciones en el núcleo caudado, y más concretamente en aquellas que afectaban a la porción dorsal o dorsolateral del mismo (véase caso nº 2). Por contra, en los casos en que esta zona del núcleo caudado no estaba aparentemente afectada por el área de inyección (véase por ejemplo caso nº 1), el marcaje neuronal en las expansiones ventrales de la pars compacta era prácticamente nulo. Es curioso también el marcaje neuronal

observado a nivel de las expansiones ventrales de la pars compacta, en este caso las más laterales, en los casos en que la porción dorsal del putamen estaba incluida en el área de inyección (véanse casos nº 10 y 13). Estos datos sugieren que, si están implicados principios topográficos de conectividad nigro-estriada, todas o una parte de las neuronas de las expansiones ventrales pobres en AChE de la pars compacta, estarían relacionadas con las porciones más dorsales o dorsolaterales del núcleo caudado y porción adyacente del putamen.

Estudios realizados en primates sugieren que estos dos territorios del estriado comparten conexiones aferentes relacionadas desde el punto de vista funcional, por ejemplo proyecciones desde la corteza premotora (KUNZLE, 1987; RAGSDALE y GRAYBIEL, 1984; SELEMON y GOLDMAN-RAKIC, 1985; ALEXANDER, DELONG y STRICK, 1986). Además, la porción dorsolateral del núcleo caudado y putamen también comparten similitudes histoquímicas en el mono. Utilizando la técnica de la butirilcolinesterasa, en el mono ardilla, los estriosomas de estas regiones se marcan muy débilmente en relación a los estriosomas de la zona ventromedial del núcleo caudado.

En conclusión, parece que una base topográfica de la compartimentación de las neuronas de proyección nigro-estriada encajaría con la inversión global de las coordenadas estriatales que gobiernan las proyecciones entre la sustancia negra y el estriado (FALLON y MOORE, 1978; SZABO, 1980). Es preciso puntualizar sin embargo, que a un nivel determinado, las neuronas que proyectan al núcleo caudado se han encontrado predominando en las expansiones ventrales pobres en AChE, y a veces en el tejido nigral circundante. Estas últimas neuronas pudieran corresponder a neuronas de proyección nigro-estriada de la pars reticulata, que representan aproximadamente el 2% de las neuronas que contribuyen a la formación del sistema nigro-estriado en el mono (FRANCOIS et al., 1984). Si esto es así, la distribución compartimental de neuronas a nivel de las expansiones ventrales de la pars compacta no parece obedecer a una inversión dorsoventral de las coordenadas topográficas de

proyección sino que mas bien sería debida a algún otro aspecto de la organización nigro-estriada.

Si consideramos que la técnica de la acetilcolinesterasa puede ser utilizada para demostrar una zona concreta de la substancia negra pars compacta en el gato, que se caracteriza por su relativamente pobre contenido en actividad AChE ("*zona densocelular*"), y que además se caracteriza por constituir el origen principal de la proyección mesoestriada dirigida a los estriosomas, igualmente pobres en AChE del estriado (JIMENEZ-CASTELLANOS y GRAYBIEL, 1987a), podemos plantear una atractiva tercera hipótesis y es que la compartimentación de la substancia negra del mono detectada en preparaciones teñidas por la técnica de la AChE, podría estar relacionada con la subdivisión del estriado en *estriosomas*, pobres en AChE y *matriz extraestriosómica*, rica en actividad acetilcolinesterásica. Sin embargo, los lugares de inyección en alguno de nuestros casos que presumiblemente afectan tanto al compartimento estriosómico como a la matriz extraestriosómica provocaron un marcaje neuronal prácticamente restringido a una de las expansiones ventrales de la pars compacta, pobre en AChE. De modo análogo y en dirección contraria, inyecciones de un trazador anterógrado en la substancia negra del mono ardilla que afectaban tanto a las expansiones ventrales de la substancia negra, pobres en AChE, así como al tejido nigral que las rodea originaron un marcaje fibrilar en el estriado que predominaba a nivel de los estriosomas (FEIGENBAUM-LANGER y GRAYBIEL, 1989). Sin comprobar aún, está también la posibilidad de que los compartimentos histoquímicos de la substancia negra estén relacionados, no con los estriosomas y la matriz extraestriosómica, sino con los compartimentos de neuronas de proyección del estriado identificados recientemente en la matriz extraestriosómica (DESBAN, GAUCHY, KEMEL, BESSON y GLOWINSKI, 1989; JIMENEZ-CASTELLANOS y GRAYBIEL, 1989; GIMENEZ-AMAYA y GRAYBIEL, 1990).

Las neuronas marcadas fuera de los límites de las expansiones ventrales pobres en AChE de la substancia negra en nuestros experimentos podrían también corresponder a una población de neuronas de proyección nigroestriada no-dopaminérgicas, como ha

sido demostrado en la rata (LJUNGDAHL, HOKFELT, GOLDSTEIN y PARK, 1975; GUYENET y AGHAJANIAN, 1978; GUYENET y CRANE, 1981; VAN DER KOOY, COSCINA y HATTORI, 1981; GERFEN, HERKENHAM y THIBAUT, 1987).

#### **4. CONSIDERACIONES FUNCIONALES Y CLINICAS.**

Los circuitos funcionales de los ganglios basales están organizados como un sistema de discretos canales que aparentemente, son capaces de distinguir entre una amplia gama de informaciones aferentes, tanto a nivel regional, como a nivel local o compartamental. Tras efectuar una revisión de la literatura la evidencia existente sugiere que también existe una complejidad comparable en la organización de los grupos dopaminérgicos mesencefálicos. Zonas distintas del complejo nigral en el mono proyectan preferentemente al núcleo caudado y al putamen. Zonas diferentes proyectan preferentemente a los estriosomas y a la matriz extraestriosómica. En el mono ardilla describimos una compartimentación adicional que pudiera estar relacionada con otros aspectos, aún no conocidos en su totalidad, de los campos terminales de proyección nigro-estriada.

En el primer nivel de la organización nigroestriada, la separación entre neuronas de la sustancia negra que proyectan al núcleo caudado y neuronas que proyectan al putamen, es de un interés especial en relación con la evidencia de que en la *enfermedad de Parkinson*, las neuronas que proyectan al putamen serían más vulnerables que las que lo hacen al núcleo caudado (BERNHEIMER, BIRKMAYER, HORNYKIEWICZ, JELLINGER y SEITELBERGER, 1973; KISH, SHANNAH y HORNYKIEWICZ, 1988). Esto encaja con la concepción clásica de que la enfermedad de Parkinson idiopática es una "enfermedad del putamen". Una gran cantidad de datos en el mono, sugieren que el putamen, está más relacionado con



mecanismos sensorimotores y que el núcleo caudado está asociado con tipos de comportamientos complejos y asociativos (KUNZLE, 1975; GOLDMAN y NAUTA, 1977; DELONG y GEORGOPOULOS, 1981; GOLDMAN-RAKIC, 1984; PARENT, BOUCHARD y SMITH, 1984; SMITH y PARENT, 1986).

La significación comportamental de la subdivisión estriosomas-matriz y consecuentemente de los sistemas de proyección nigro-estriada relacionados con estos dos compartimentos, es desconocida. Sin embargo, esta compartimentación parece estar relacionada globalmente con aspectos sensibles y motores. Determinadas cortezas asociativas proyectan principalmente a la matriz extraestriosómica del estriado, y determinadas zonas de la corteza prefrontal e insulotemporal, así como el núcleo basolateral del complejo nuclear amigdalino, proyectan a los estriosomas (RAGSDALE y GRAYBIEL, 1981; DONOGHUE y HERKENHAM, 1986; ALEXANDER, KOLIATSOS, MARTIN, HEDREEN, HAMADA y DELONG, 1988; RAGSDALE y GRAYBIEL, 1988). Esta separación de información que llega al estriado, sugiere que la ordenación estriosómica segregaría mínimamente, a los canales que mas tienen que ver con el procesamiento de información sensorimotora primaria, de los canales asociados con funciones mas cognitivas.

Ya que se sabe que la matriz extraestriosómica recibe además información relacionada con el sistema límbico, por ejemplo desde la circunvolución del cíngulo y partes del complejo nuclear amigdalino, (DONOGHUE y HERKENHAM, 1986; RAGSDALE y GRAYBIEL, 1988) no parece que exista una segregación compartamental absoluta entre funciones sensorimotoras por un lado y "límbicas" por otro. Además en la rata, diferentes capas de la misma zona cortical (ya sea límbica o no), pueden proyectar respectivamente a los estriosomas y a la matriz (GERFEN, 1989). La distinción entre estriosomas y matriz se puede observar, no solo en lo referente a sus aferencias corticales, sino tambien si analizamos los demás sistemas aferentes que se sabe llegan al estriado. Este ordenamiento sugiere, que las aferencias dopaminérgicas nigro-estriadas que inervan selectivamente a los estriosomas y a la matriz extraestriosómica estarían en situación de actuar independientemente, al

menos en parte, como mecanismos moduladores locales sobre canales compartamentales de información que discurren a través del estriado.

El hecho de que diferentes grupos de neuronas constituyan sistemas de proyección mesoestriada a los estriosomas y a la matriz, no solamente sugiere que estos sistemas deben tener un diferente impacto sobre el control del comportamiento, sino que además, plantean la posibilidad de que puedan tener una diferente vulnerabilidad en condiciones patológicas que afecten a las neuronas dopaminérgicas. Si esto es así, existirían nuevas oportunidades terapéuticas basadas en la utilización de drogas con diferentes lugares de acción sobre estos subsistemas, o bien en la reconstrucción de circuitos específicos utilizando trasplantes de determinados tipos neuronales implantados en las regiones lesionadas.

En lo referente a los estudios farmacológicos de los ganglios basales, la diferenciación entre impulsos nigro-estriados dirigidos a los estriosomas y a la matriz, tendría una particular significación funcional. Los marcadores para distintas clases de funciones dopaminérgicas y colinérgicas, incluyendo los lugares de ligamiento de receptores, lugares de captación, y enzimas han demostrado sistemáticamente distribuciones distintas en los estriosomas y en la matriz extraestriosómica (GRAYBIEL y RAGSDALE, 1978; NASTUK y GRAYBIEL, 1985; JOYCE, SAPP y MARSHALL, 1986; LOWENSTEIN, SLESINGER, SINGER, WALKER, CASANOVA, PRICE y COYLE, 1987; FERRANTE y COWALL, 1987; RICHFIELD, YOUNG y PENNEY, 1987; BECKSTEAD, WOOTEN y TRUGMAN, 1988; BESSON, GRAYBIEL y NASTUK, 1988; NASTUK y GRAYBIEL, 1988; GRAYBIEL y MORATALLA, 1989; HIRSCH, GRAYBIEL, HERSH, DUYKAERTS y AGID, 1989; MARSHALL, NAVARRETE y O'DELL, 1989). También se han descrito diferencias en liberación de dopamina dentro y fuera de regiones ricas en tejido estriosómico (KEMEL, DESBAN, GLOWINSKI y GAUCHY, 1989).

Estos hallazgos sugieren que las drogas que actúan sobre la dopamina o la acetilcolina en el estriado, podrían tener diferentes efectos en los estriosomas y en la

matriz extraestriósomica. Existen indicios de que estas distinciones se pueden probar también clínicamente (GRAYBIEL, HIRSH y AGID, 1990). La degeneración inducida por la droga MPTP de las fibras que inervan a la matriz extraestriósomica ha sido detectada en perros tratados de modo agudo con esta droga (WILSON, TURNER, MORROW y HARTMAN, 1987; TURNER, WILSON, MCKENZIE y RICHTAND, 1988). La vulnerabilidad diferencial de las fibras mesoestriadas que terminan en los estriomas, ha sido también observada en el ratón mutante weaver, en el que existe una pérdida dramática de la inervación dopaminérgica del caudoputamen (GRAYBIEL, OHTA y ROFFLER-TARLOV, 1988, 1990). En la enfermedad de Parkinson idiopática, el daño de los grupos neuronales mesencefálicos no es uniforme. Así, el grupo dopaminérgico A8 que proyecta abundantemente a la matriz, es aproximadamente la mitad de vulnerable que la sustancia negra pars compacta considerada en su totalidad (HIRSCH, GRAYBIEL y AGID, 1988). Tanto en la enfermedad de Parkinson como en el parkinsonismo inducido por la MPTP en el mono, las neuronas ventrales de la sustancia negra pars compacta son más vulnerables que las dorsales (HASSLER, 1938; JELLINGER, 1986; GERMAN, MANAYE, SMITH, WOODWARD y SAPER, 1989; GIBB, FEARNLEY y LEES, 1990).

En último término, los efectos de estos sistemas mesoestriados dopaminérgicos son transmitidos a las neuronas de proyección del estriado. También a este nivel aspectos regionales y locales gobiernan a estos sistemas eferentes del estriado. La mayor parte (pero no en su totalidad) de la proyección putáminofugal en el mono está dirigida al globus pallidus, mientras el núcleo caudado proyecta abundantemente (pero no exclusivamente) a la sustancia negra (PARENT ET AL., 1984; GIMENEZ-AMAYA y GRAYBIEL, 1990). La compartimentación estriomas-matriz está reflejada en el destino de las fibras que se originan en cada uno de estos dos compartimentos estriatales. Las neuronas de la matriz proyectan abundantemente al pallidum y a la sustancia negra pars reticulata, conexiones que son distintivamente de carácter sensorimotor (JIMENEZ-CASTELLANOS y GRAYBIEL, 1989). Los estriomas

parecen proyectar relativamente poco al pallidum (GIMENEZ-AMAYA y GRAYBIEL, 1990), siendo su principal proyección a la substancia negra. En la substancia negra el destino de estas fibras es la propia substancia negra pars compacta (en la rata, GERFEN et al., 1987) o las mismas regiones que a su vez proyectan a los estriosomas (en el gato, JIMENEZ-CASTELLANOS y GRAYBIEL, 1987a). Este último hallazgo sugiere que los estriosomas podrían funcionar como un circuito recíproco que controlaría a las neuronas dopaminérgicas de la substancia negra. En consecuencia, la liberación de dopamina en la substancia negra y en el estriado dependería de la coordinación de los subsistemas nigrales y estriatales, que son el reflejo de la subdivisión del estriado en estriosomas y matriz extraestriosómica.

## **BIBLIOGRAFIA**

- Alexander G.E., DeLong M.R. y Strick P.L. (1986)** Parallel organization of functionally segregated circuits linking basal ganglia and cortex. *Ann. Rev. Neurosci.* 9: 357-381.
- Alexander G.E., Killatsos V.E., Martin L.J., Hedreen J., Hamada I. y DeLong M.R. (1988)** Organization of the primate basal ganglia motor circuit: 1. Motor cortex and supplementary motor area project to complementary regions within matrix compartment of putamen. *Soc. Neurosci. Abstr.* 14: 287.
- Anden N.E., Carlsson A., Dahlström A., Fuxe K., Hillarp N.A. y Larsson K. (1964)** Demonstrating and mapping out nigro-neostriatal dopamine neurons. *Life Sci.* 3: 523-530.
- Arsenault M.Y., Parent A., Seguela P. y Descarries L. (1988)** Distribution and morphological characteristics of dopamine-immunoreactive neurons in the midbrain of the squirrel monkey (*Saimiri sciureus*). *J. Comp. Neurol.* 267: 489-506.
- Beckstead R.M. y Frankfurter A. (1982)** The distribution and some morphological features of substantia nigra neurons that project to the thalamus, superior colliculus and pedunculo-pontine nucleus in the monkey. *Neuroscience* 7: 2377-2388.
- Beckstead R.M., Wooten G.F. y Trugman J.M. (1988)** Distribution of D1 and D2 dopamine receptors in the basal ganglia of the cat determined by quantitative autoradiography. *J. Comp. Neurol.* 268: 131-145.
- Bernheimer H., Birkmayer W., Hornykiewicz O., Jellinger K. y Seitelberger F. (1973)** Brain dopamine and the syndromes of Parkinson and Huntington. *J. Neurol. Sciences* 20: 415-455.
- Besson M.J., Graybiel A.M. y Nastuk M.A. (1988)** [<sup>3</sup>H]-SCH23390 binding to D1 dopamine receptors in the basal ganglia of the cat and primate: delineation of striosomal compartments and pallidal and nigral subdivisions. *Neuroscience* 26: 101-119.
- Björklund A. y Lindvall O. (1984)** Dopamine-containing systems in the central nervous system. En "Handbook of clinical neuroanatomy Vol.2. Classical transmitters in the central nervous system". (Eds., Björklund A. y Hokfelt T.). Elsevier, Amsterdam.
- Butcher L.L. y Marchand R. (1978)** Acetylcholinesterase is synthesized and transported by dopamine neurons in the pars compacta of the substantia nigra: functional significance and histochemical correlations on the same brain section. En "Catecholamines: basic and clinical frontiers". (Ed., Usdin L.), pp. 223-240. Pergamon Press, Oxford.
- Cowan W.M., Gottlieb D.I., Hendrickson A.E., Price J.L. y Woolsey T.A. (1972)** The autoradiographic demonstration of axonal connections in the central nervous system. *Brain Res.* 37: 21-51.
- Dahlström A. y Fuxe K. (1964)** Evidence for the existence of monoamine-containing neurons in the central nervous system. I. Demonstration of monoamines in the cell bodies of brain stem neurons. *Acta Physiol. Scand.* 62: 1-55.
- Darnell J., Lodish H. y Baltimore D. (1986)** Molecular cell biology, pp. 1192. Scientific American Books, New York.

**DeLong M.R. y Georgopoulos A.P. (1981)** Motor functions of the basal ganglia. En *APS Handbook of Physiology. The Nervous System*, vol. 2, pp. 1017-1061. Williams and Wilkins, Baltimore.

**Desban M., Gauchy C., Kemel M.L., Besson M.J. y Glowinski J. (1989)** Three-dimensional organization of striosomal compartments and patchy distribution of striatonigral projections in the matrix of the cat caudate nucleus. *Neuroscience* 29: 551-566.

**DiCarlo V., Hubbard J.E. y Plate P. (1973)** Fluorescence histochemistry of monoamine-containing cell bodies in the brain stem of the squirrel monkey, *Saimiri sciureus*. *J. Comp. Neurol.* 152: 347-372.

**Donoghue J.P. y Herkenham M. (1986)** Neostriatal projections from individual cortical fields conform to histochemically distinct striatal compartments in the rat. *Brain Res.* 365: 397-403.

**Emmers R. y Akert K. (1963)** A stereotaxic atlas of the brain of the squirrel monkey (*Saimiri sciureus*). The University of Wisconsin Press, Madison.

**Fallon J.H. y Moore R.Y. (1978)** Catecholamine innervation of the basal forebrain. IV. Topography of the dopamine projection to the basal forebrain and neostriatum. *J.Comp.Neurol.* 180: 545-580.

**Faull R.L.M. y Mehler W.R. (1978)** The cells of origin of nigrotectal, nigrothalamic and nigrostriatal projections in the rat. *Neuroscience* 3: 989-1002.

**Feigenbaum-Langer L. y Graybiel A.M. (1989)** Distinct nigrostriatal projection systems innervate striosomes and matrix in the primate striatum. *Brain res.* 498: 344-350.

**Ferrante D.L. y Kowall N.W. (1987)** Tyrosine hydroxylase-like immunoreactivity is distributed in the matrix compartment of normal and Huntington's disease striatum. *Brain Res.* 416: 141-146.

**François C., Percheron G. y Yelnik J. (1984)** Localization of nigrostriatal, nigrothalamic and nigrotectal neurons in ventricular coordinates in macaques. *Neuroscience* 13: 61-76.

**François C., Percheron G., Yelnik J. y Heyner S. (1985)** A histological atlas of the macaque *Macaca mulatta* substantia nigra in ventricular coordinates. *Brain Res. Bull.* 14: 349-367.

**Garver D.L. y Sladek Jr. J.R. (1975)** Monoamine distribution in primate brain. I. Catecholamine-containing perikarya in the brain stem of *Macaca speciosa*. *J.Comp. Neurol.* 159: 289-304.

**Geneser-Jensen F.A. y Blackstad J.W. (1971)** Distribution of acetylcholinesterase in the hippocampal region of the guinea pig. I. Entorhinal area, parasubiculum, and presubiculum. *Z.Zellforsch.Mikrosk.Anat.* 114: 460-481.

**Gerfen C.R. (1989)** The neostriatal mosaic: striatal patch-matrix organization is related to cortical lamination. *Science* 246: 385-387.

**Gerfen C.R., Herkenham M. y Thibault (1987)** The neostriatal mosaic II. Patch- and matrix-directed mesostriatal dopaminergic and non-dopaminergic systems. *J. Neurosci.* 7: 3915-3934.

- German D.C., Manaye K., Smith W.K., Woodward D.J. y Saper C.B. (1990)** Midbrain dopaminergic cell loss in Parkinson's disease: computer visualization. *Ann. Neurol.* 26: 507-514.
- Gibb W.R.G., Fearnley J.M. y Lees A.J. (1990)** The anatomy and pigmentation of the human substantia nigra in relation to selective neuronal vulnerability. Ninth Intl. Symposium on Parkinson's Disease, Jerusalem (en prensa).
- Giménez-Amaya J.M. y Graybiel A.M. (1990)** Compartmental origins of the striatopallidal projection in the primate. *Neuroscience* (en prensa).
- Goldman P.S. y Nauta W.J.H. (1977)** An intricately patterned prefronto-caudate projection in the rhesus monkey. *J.Comp. Neurol.* 177: 369-386.
- Goldman-Rakic P.S. (1984)** Modular organization of prefrontal cortex. *Trends in Neurosci.* 7: 419-424.
- Gonatas N.K., Harper C., Mizutani T. y Gonatas J.O. (1979)** Superior sensitivity of conjugates of horseradish peroxidase with wheat germ agglutinin for studies of retrograde axonal transport. *J. Histochem. Cytochem.* 27: 728-734.
- Graybiel A.M. y Elde R.P. (1983)** Somatostatin-like immunoreactivity characterizes neurons of the nucleus reticularis thalami in the cat and monkey. *J. Neurosci.* 3: 1308-1321.
- Graybiel A.M., Hirsch E.C. y Agid Y.A. (1990)** The nigrostriatal system in Parkinson's disease. *Proceedings from the Ninth Intl. Symposium on Parkinson's Disease, Jerusalem* (en prensa).
- Graybiel A.M. y Moratalla R. (1989)** Dopamine uptake sites in the striatum are distributed differentially in striosome and matrix compartments. *Proc. Natl. Acad. Sci.(U.S.A.)* 86: 9020-9024.
- Graybiel A.M., Ohta K. y Roffler-Tarlov S. (1988)** Toward a genetic analysis of the striosomal system: patterns of nigrostriatal loss in mutant weaver mouse. *Soc. Neurosci. Abstr.* 14: 1066.
- Graybiel A.M., Ohta K. y Roffler-Tarlov S. (1990)** Patterns of cell and fiber vulnerability in the mesostriatal system of mutant mouse weaver: I. Gradients and compartments. *J. Neurosci.* (en prensa).
- Graybiel A.M. y Ragsdale Jr. C.W. (1978)** Histochemically distinct compartments in the striatum of human, monkey and cat demonstrated by acetylcholinesterase staining. *Proc. Natl. Acad. Sci.(U.S.A.)* 75: 5723-5726.
- Graybiel A.M. y Ragsdale Jr. C.W. (1979)** Fiber connections of the basal ganglia. *Prog. Brain Res.* 51: 239-283.
- Graybiel A.M. y Ragsdale Jr. C.W. (1983)** Biochemical anatomy of the striatum. En "Chemical neuroanatomy". (Ed., Emsom P.C.), pp. 427-504. Raven Press, New York.
- Guyenet P.G. y Aghajanian G.K. (1978)** Antidromic identification of dopaminergic and other output neurons of the rat substantia nigra. *Brain Res.* 150: 69-84.
- Guyenet P.G. y Crane J.K. (1981)** Non-dopaminergic nigrostriatal pathway. *Brain Res.* 150: 69-84.



- Hanaway J., McConnel J.A. y Netsky M.G. (1970)** Cytoarchitecture of the substantia nigra in the rat. *Am. J. Anat.* 129: 417-438.
- Hassler R. (1938)** Zur Pathologie der Paralysis Agitans und des post-encephalitischen Parkinsonismus. *J. Psychol. Neurol.* 48: 387-476.
- Heimer L. y Wilson R.D. (1975)** The subcortical projections of the allocortex: similarities in the neural associations of the hippocampus, the piriform cortex, and the neocortex. En "Golgi Centennial Symposium. Proceedings". (Ed., Santini M.), pp. 177-193. Raven Press, New York.
- Henderson Z. (1981)** Ultrastructure and acetylcholinesterase content of neurones forming connections between the striatum and substantia nigra of the rat. *J. Comp. Neurol.* 197: 185-196.
- Hirsch E.C., Graybiel A.M. y Agid Y.A. (1988)** Melanized neurons are differentially susceptible to degeneration in Parkinson's disease. *Nature* 334: 345-348.
- Hirsch E.C., Graybiel A.M., Hersh L.B., Duykaerts C. y Agid Y. (1989)** Striosomes and extrastriosomal matrix contain different amounts of immunoreactive-choline acetyltransferase in the human striatum. *Neurosci. Lett.* 96: 145-150.
- Hökfelt T., Skirboll L., Rehfeld J.F., Goldstein M., Markey K. y Dann O. (1980)** A subpopulation of mesencephalic dopamine neurons projecting to limbic areas contains a cholecystochinin-like peptide: evidence from immunohistochemistry combined with retrograde tracing. *Neuroscience* 5: 2093-2124.
- Hökfelt T., Martesson R., Björklund A., Kleinau S. y Goldstein M. (1984)** distributional maps of tyrosine-hydroxylase-immunoreactive neurons in the rat brain. En "Handbook of chemical neuroanatomy, Vol. 2". (Eds., Björklund A. y Hökfelt T.), pp. 277-379. Elsevier, Amsterdam.
- Hubbard J.E. y DiCarlo V. (1974)** Fluorescence histochemistry of monoamine-containing cell bodies in the brain stem of the squirrel monkey *Saimiri sciureus*. *J. Comp. Neurol.* 153: 369-384.
- Illing R.B. y Wassle H. (1979)** Visualization of the HRP reaction product using the polarization microscope. *Neurosci. Lett.* 13: 7-11.
- Jellinger K. (1986)** Pathology of parkinsonism. En "Recent Developments in Parkinson's disease". (Ed., Fahn S.), pp. 33-66. Raven Press, New York.
- Jiménez-Castellanos J. y Graybiel (1987a)** Subdivisions of the dopamine containing A8-A9-A10 complex identified by their differential mesostriatal innervation of striosomes and extrastriosomal matrix. *Neuroscience* 23: 223-242.
- Jiménez-Castellanos J. y Graybiel A.M. (1987b)** Subdivisions of the primate substantia nigra pars compacta detected by acetylcholinesterase histochemistry. *Brain Res.* 437: 349-354.
- Jiménez-Castellanos J. y Graybiel J. (1989)** Compartmental origins of striatal efferent projections in the cat. *Neuroscience* 32: 297-321.
- Jiménez-Castellanos J. y Reinoso-Suárez F. (1985)** Topographical organization of the afferent connections of the principal ventromedial nucleus in the cat. *J. Comp. Neurol.* 236: 297-314.

- Jones E.G. y Hartman B.K. (1978)** Recent advances in neuroanatomical methodology. *Ann.Rev.Neurosci.* 1: 215-296.
- Joyce J.N., Sapp D.W. y Marshall J.F. (1986)** Human striatal dopamine receptors are arranged in compartments. *Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.)* 83: 8002-8006.
- Kemel M.L., Desban M., Glowinski J. y Gauchy C. (1989)** Distinct presynaptic control of dopamine release in striosomal and matrix areas of the cat caudate nucleus. *Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.)* 86: 9006-9010.
- Kish S.J., Shannah K. y Hornykiewicz O. (1988)** Uneven patterns of dopamine loss in the striatum of patients with idiopathic Parkinson's disease. Pathophysiologic and clinical implications. *N. Engl. J. Med.* 318: 876-880.
- Kristensson K. (1970)** Transport of fluorescent protein tracer in peripheral nerves. *Acta Neuropathol. (Berlin)* 16: 293-300.
- Künzle H. (1975)** Bilateral projections from precentral motor cortex to the putamen and other parts of the basal ganglia. *Brain Res.* 88: 195-210.
- Künzle H. (1978)** An autoradiographic analysis of the efferent connections from premotor and adjacent prefrontal regions (areas 6 and 9) in *Macaca fascicularis*. *Brain Behav. Evol.* 15: 185-234.
- La Vail J.H. y La Vail M.M. (1972)** Retrograde axonal transport in the central nervous system. *Science* 176: 1416-1418.
- Lehman J., Fibiger H.C. y Butcher L.L. (1979)** The localization of acetylcholinesterase in the corpus striatum and substantia nigra of the rat following kainic acid lesion of the corpus striatum: a biochemical and histochemical study. *Neuroscience* 4: 217-225.
- Ljungdahl A., Hökfelt T., Goldstein M. y Park D. (1975)** Retrograde peroxidase tracing of neurons combined with transmitter histochemistry. *Brain Res.* 84: 313-319.
- Llamas A. y Martínez-Moreno E. (1974)** Modificaciones al método del transporte axonal retrógrado de la horseradish peroxidase en el sistema nervioso central en el gato adulto. *An. Anat.* 23: 431-443.
- Llamas A. y Reinoso-Suárez F. (1969)** Projections of the substantia nigra and ventral tegmental mesencephalic area. En "Third Symposium on Parkinson's Disease" (ed., Gillingham F.J.), pp. 82-87. Livingstone, Londres.
- Lowenstein P.R., Slesinger P.A., Singer H.S., Walker L.C., Casanova M.F., Price D.L. y Coyle, J.T. (1987)** An autoradiographic study of the development of [ $H^3$ ]hemicholinium-3 binding sites in human and baboon basal ganglia: a marker for the sodium-dependent high-affinity choline uptake system. *Devel. Brain Res.* 34: 291-297.
- Mai J.K., Stephens P.H., Hopf A. y Cuello A.C. (1986)** Substance P in human brain. *Neuroscience* 17: 709-739.
- Malach R. y Graybiel A.M. (1986)** Mosaic architecture of the somatic sensory-recipient sector of the cat's striatum. *J. Neurosci.* 6: 3436-3458.

- Marshall J.F., Navarrete R. y O'dell S.J. (1989)** Striosomal and gradient pattern of dopamine high-affinity and monoamine synaptic vesicle sites in rabbit caudate. *Soc. Neurosci. Abstr.* 15: 906.
- McLean S., Skirboll L.R. y Pert C. (1985)** Comparison of substance P and enkephalin distribution in rat brain: an overview using radioimmunohistochemistry. *Neuroscience* 14: 837-852.
- Mehler W.R. (1981)** The basal ganglia-circa 1982. A review and commentary. *Appl. Neurophysiol.* 44: 261-290.
- Mesulam M.M. (1978)** Tetramethyl benzidine for horseradish peroxidase neurohistochemistry: a non-carcinogenic blue reaction product with superior sensitivity for visualizing neural afferents and efferents. *J.Histochem.Cytochem.* 26: 106-117.
- Mesulam M.M. (1982)** Principles of horseradish peroxidase neurohistochemistry and their applications for tracing neural pathways. Axonal transport, enzyme histochemistry and light microscope analysis. En "Tracing neural pathways with horseradish peroxidase". (Ed., Mesulam M.M.), pp. 1-151. Wiley, Chichester.
- Mesulam M.M. y Rosen D.L. (1979)** Sensitivity in horseradish peroxidase neurohistochemistry: a comparative and qualitative study of nine methods. *J. Histochem. Cytochem.* 27: 763-773.
- Mugnaini E. y Oertel W.H. (1985)** Atlas of the distribution of GABAergic neurons and terminals in the rat CNS as revealed by GAD immunohistochemistry. En "Handbook of chemical neuroanatomy", vol. 4 (Eds., Bjorklund A. y Hökfelt T.), pp. 436-595. Elsevier, Amsterdam.
- Nastuk M.A. y Graybiel A.M. (1985)** Pattern of muscarinic cholinergic binding in the striatum and their relation to dopamine islands and striosomes. *J. Comp. Neurol.* 237: 176-194.
- Nastuk M.A. y Graybiel A.M. (1988)** Autoradiographic localization and biochemical characteristics of M1 and M2 muscarinic binding sites in the striatum of the cat, monkey and human. *J. Neurosci.* 8: 1052-1062.
- Nauta W.J.H., Smith G.P., Faull R.L.M. y Domesick V.B. (1978)** Efferent connections and nigral afferents of the nucleus accumbens septi in the rat. *Neuroscience* 3: 385-401.
- Nobin A. y Björklund A. (1973)** Topography of the monoamine neuron systems in the human brain as revealed in fetuses. *Acta Physiol. Scand.* 388: 1-40.
- Olivier A., Parent A., Simard H. y Poirier L.J. (1970)** Cholinesterasic striatopallidal and striatonigral efferents in the cat and the monkey. *Brain Res.* 18: 273-282.
- Olszewski J. y Baxter D. (1954)** Cytoarchitecture of the human brain stem. Karger, Basel.
- Parent A., Bouchard C. y Smith Y. (1984)** The striatopallidal and striatonigral projections: two distinct fiber systems in primate. *Brain Res.* 303: 385-390.
- Parent A., Mackey A. y DeBellefeuille L. (1983)** The subcortical afferents to caudate nucleus and putamen in primate: a fluorescence retrograde double labeling study. *Neuroscience* 10: 1137-1150

- Poirier L.J., Giguère M. y Marchand R. (1983)** Comparative morphology of the substantia nigra and ventral tegmental area in monkey, cat and rat. *Brain Res. Bull.* 11: 371-397.
- Ragsdale C.W. y Graybiel A.M. (1981)** The fronto-striatal projection in the cat and monkey and its relationship to inhomogeneities established by acetylcholinesterase histochemistry. *Brain res.* 208: 259-266.
- Ragsdale C.W. y Graybiel A.M. (1984)** Further observations on the striosomal organization of frontostriatal projections in cats and monkeys. *Soc. Neurosci. Abstr.* 10: 514.
- Ragsdale C.W. y Graybiel A.M. (1988)** Fibers from the basolateral nucleus of the amygdala selectively innervate striosomes in the caudate nucleus of the cat. *J. Comp. Neurol.* 269: 506-522.
- Richfield E.K., Young A.B. y Penney J.B. (1987)** Comparative distribution of dopamine D1 and D2 receptors in the basal ganglia of turtles, pigeons, rats, cats and monkeys. *J. Comp. Neurol.* 262: 446-463.
- Rioch D. McK. (1929)** Studies on the diencephalon of carnivora. Part II. Certain nuclear configurations and fiber connections of the subthalamus and midbrain of the dog and cat. *J. Comp. Neurol.* 49: 121-153.
- Scarnati E., Proia A., Campana E. y Pacitti, C. (1986)** A microiontophoretic study on the nature of the putative synaptic neurotransmitter involved in the pedunclopontine-substantia nigra pars compacta excitatory pathway of the rat. *Exp. Brain Res.* 62: 470-478.
- Schmued L.C. y Fallon J.H. (1986)** Fluoro-Gold: a new fluorescent retrograde axonal tracer with numerous unique properties. *Brain Res.* 377: 147-154.
- Schnapp B.J. y Reese T.S. (1986)** New developments in understanding rapid axonal transport. *Trends in Neurosci.* 9: 155-162.
- Selemon L.D. y Goldman-Rakic P.S. (1986)** Longitudinal topography and interdigitation of corticostriatal projections in the rhesus monkey. *J. Neurosci.* 5: 776-794.
- Sheetz M.P., Stever E.R. y Schroer T.A. (1989)** The mechanism and regulation of fast axonal transport. *Trends in Neurosci.* 12: 474-478.
- Smith Y. y Parent A. (1986)** Differential connections of caudate nucleus and putamen in the squirrel monkey, *Saimiri sciureus*. *Neuroscience* 18: 347-371.
- Smith Y., Parent A., Seguela P y Descarries L. (1987)** Distribution of GABA-immunoreactive neurons in the basal ganglia of the squirrel monkey (*Saimiri sciureus*). *J. Comp. Neurol.* 259: 50-64.
- Steindler D.A. y Cooper N.G.F. (1986)** Wheat germ agglutinin binding sites in the adult mouse cerebellum. *J. Comp. Neurol.* 249: 170-185.
- Sternberger L.A. (1979)** *Immunocytochemistry*. Wiley, New York.
- Swanson L.W. (1982)** The projections of the ventral tegmental area and adjacent regions: a combined fluorescent retrograde tracer and immunofluorescence study in the rat. *Brain Res. Bull.* 9: 321-353.

**Szabó J. (1980)** Organization of the ascending striatal afferents in monkeys. *J. Comp. Neurol.* 189: 307-321.

**Turner B.H., Wilson J.S., McKenzie J.C. y Richtand N. (1988)** MPTP produces a pattern of nigrostriatal degeneration which coincides with the mosaic organization of the caudate nucleus. *Brain Res.* 473: 60-64.

**Van der Kooy D., Coscina D.V. y Hattori T. (1981)** Is there a non-dopaminergic nigrostriatal pathway?. *Neuroscience* 6: 345-357.

**Weston J. y Greenfield S.A. (1986)** Release of acetylcholinesterase in the rat nigrostriatal pathway: relation to receptor activation and firing rate. *Neuroscience* 17: 1079-1088.

**Wilson J.S., Turner B.H., Morrow G.D. y Hartman P.J. (1987)** MPTP produces a mosaic pattern of degeneration in the caudate nucleus of dog. *Brain Res.* 423: 329-332.

# **RESUMEN**

El análisis de las relaciones funcionales existentes entre las neuronas dopaminérgicas del complejo nigral y el estriado, es esencial para contribuir a esclarecer los puntos de vista actuales sobre cómo el procesamiento de la información que llega y que sale del estriado afecta en último término al control del comportamiento voluntario motor. La sustancia negra pars compacta, que equivale al grupo dopaminérgico mesencefálico A9, constituye junto al grupo A8, el origen principal del sistema nigro-estriado que inerva al núcleo caudado y al putamen. Esta región del complejo nigral, se ha asociado clásicamente a la patogénesis de la enfermedad de Parkinson. En la sustancia negra pars compacta del mono ardilla (*Saimiri sciureus*) y utilizando la técnica de la acetilcolinesterasa (AChE), se ha descrito una compartimentación histoquímica caracterizada por la existencia de un mosaico de zonas de relativamente alta o baja actividad acetilcolinesterásica, que recuerdan a la subdivisión del estriado en estriosomas, pobres en AChE, y matriz extraestriosómica, rica en AChE.

Para tratar de estudiar la posible relación de estos compartimentos nigrales con la distribución de las neuronas de proyección nigro-estriada, realizamos inyecciones de HRP-WGA en el núcleo caudado o en el putamen en un total de 11 animales, en cinco de los cuales se procedió a efectuar depósitos del trazador en ambos hemisferios cerebrales. En dos de los casos se procedió a utilizar un segundo trazador (Fluoro-Gold), realizando inyecciones de uno de ellos en el núcleo caudado y del otro trazador en el putamen del mismo hemisferio, con objeto de comprobar si existen neuronas nigrales que envían colaterales axónicas a ambas estructuras. Utilizando las

correspondientes técnicas se detectó el marcaje neuronal en la sustancia negra provocado por ambos trazadores, y se estudió la localización de las neuronas marcadas en relación con: a) secciones procesadas para poner de manifiesto la inmunorreactividad frente a la enzima de síntesis catecolaminérgica tirosina hidroxilasa, que nos marca los límites de la pars compacta y b) secciones sometidas a la técnica de la acetilcolinesterasa, para objetivar la compartimentación histoquímica de la sustancia negra pars compacta.

Los resultados obtenidos muestran que no se produjo doble marcaje de neuronas en la pars compacta, confirmando hallazgos de otros autores respecto a que en la pars compacta de la sustancia negra existen grupos segregados e interdigitados de neuronas que proyectan respectiva e independientemente al núcleo caudado o al putamen. La existencia de estos grupos neuronales separados nos hizo plantearnos la hipótesis de que esta segregación neuronal fuera la responsable de la compartimentación histoquímica detectada mediante la técnica de la AChE. Desestimamos esta hipótesis al observar cómo en zonas caracterizadas por su bajo contenido enzimático se observaban simultáneamente neuronas de proyección al núcleo caudado y al putamen. Sin olvidar que la compartimentación observable en la pars compacta pudiera deberse a los sistemas de proyecciones aferentes a la sustancia negra (principalmente al estrío-nigral y al tegmento-nigral) o incluso a la liberación de AChE por las dendritas de las neuronas de proyección nigro-estriada o por interneuronas acetilcolinesterásicas de la sustancia negra, barajamos también la hipótesis de que el marcaje neuronal en la sustancia negra obedezca exclusivamente a razones topográficas. La topografía del sistema de proyección nigro-estriado si bien existe obviamente, tampoco explica el porqué si analizamos por ejemplo las expansiones ventrales de la pars compacta que protuyen en la pars reticulata y que se caracterizan por su pobreza relativa en AChE, en unos casos poseen neuronas marcadas en su interior, mientras en otros casos las neuronas marcadas se localizan en las proximidades. Finalmente se plantea la hipótesis, tan atractiva como difícil de demostrar con los datos presentes, de que la compartimentación histoquímica de la



pars compacta de la substancia negra esté relacionada con la subdivisión del estriado en estriosomas-matriz. Si bien en nuestros casos, presumiblemente todas las inyecciones han afectado a ambos compartimentos estriatales por igual, y por tanto sólo con ellos no podemos confirmar o rebatir esta hipótesis, existen sin embargo indicios en la literatura de que esta relación podría darse: 1) en el gato, la principal zona de la pars compacta que proyecta a los estriosomas corresponde asimismo a una zona detectable por su bajo contenido en AChE; 2) inyecciones de un trazador anterógrado depositado en las expansiones ventrales pobres en AChE de la pars compacta del mono ardilla provocaron un marcaje fibrilar predominante a nivel del sistema estriosómico.

Para finalizar se discuten nuestros hallazgos en un contexto funcional destacando la importancia de la existencia de canales de información en los ganglios basales con vistas a posibilidades mas eficaces en el tratamiento de los desórdenes que afectan al sistema extrapiramidal, emitiendo las oportunas conclusiones.

## **CONCLUSIONES**

- 1.** Al analizar el complejo nigral del mono ardilla mediante la técnica de la acetilcolinesterasa, mientras los grupos dopaminérgicos A8 y A10, y la pars reticulata de la sustancia negra muestran una actividad acetilcolinérgica homogénea y relativamente alta, la pars compacta constituye un mosaico de zonas ricas y pobres en actividad enzimática, a nivel del neuropilo y de las somas neuronales. En nuestros casos se detectaron neuronas marcadas de proyección nigro-estriada en todos los compartimentos histoquímicos descritos de la sustancia negra pars compacta.
- 2.** Si bien la metodología empleada no permite confirmarlo, nuestros datos apoyan la existencia de una subpoblación neuronal no dopaminérgica, localizada en la pars reticulata y que contribuiría a la inervación del estriado.
- 3.** Entre la sustancia negra pars compacta y el estriado considerado en conjunto (núcleo caudado y putamen), es evidente una inversión dorsoventral de las coordenadas topográficas de proyección nigro-estriada. Igualmente en determinados niveles, como las expansiones ventrales de la pars compacta, se mantiene la topografía en sentido medio-lateral. La topografía por sí misma sin embargo, no explica la particular distribución de neuronas marcadas en nuestros experimentos en relación con la compartimentación histoquímica de la sustancia negra.
- 4.** Confirmamos la segregación y a veces interdigitación de los grupos neuronales nigrales que proyectan al núcleo caudado y los que proyectan al putamen. Esta misma circunstancia se da también en las neuronas del área tegmental ventral y área retrorubral (grupo dopaminérgico A8).

- 5.** Descartamos que la segregación existente entre grupos neuronales que proyectan al núcleo caudado y grupos de proyección nigro-putaminal sea la responsable exclusiva de la compartimentación histoquímica de la sustancia negra pars compacta. Por otra parte, la segregación neuronal igualmente existe a nivel de los grupos A8 y A10, donde se observa una actividad acetilcolinérgica relativamente alta y homogénea.
- 6.** El área tegmental ventral proyecta en el mono ardilla a la porción ventral del estriado. El grupo A8, como la propia pars compacta de la sustancia negra, contribuye a la inervación de la totalidad del núcleo caudado y putamen.
- 7.** En la sustancia negra pars compacta, sobre todo a nivel rostral, las neuronas de proyección nigro-caudada ocupan una posición ventral respecto a las neuronas que proyectan al putamen.
- 8.** El núcleo caudado parece recibir más proyecciones que el putamen desde las neuronas de la mitad rostral de la sustancia negra pars compacta y viceversa.
- 9.** De acuerdo a las proyecciones que reciben las porciones dorsolaterales o dorsales del núcleo caudado y putamen, apoyamos la tesis de la especialización funcional de estas regiones estriales.
- 10.** Basados en nuestros datos y en la literatura sugerimos que, la compartimentación acetilcolinérgica de la sustancia negra podría estar relacionada con la subdivisión estriosómica del estriado y/o con otro tipo de compartimentación adicional, como la detectada en la matriz extraestriosómica.

**11.** Lo manifestado en el punto anterior no excluye a los sistemas de proyeccion aferente a la substancia negra. La investigacion de estas conexiones, asi como de la liberacion enzimatica por las propias neuronas nigrales contribuirá a dilucidar la participacion de los mismos en la compartimentacion histoquimica de la substancia negra pars compacta.

**12.** La existencia de canales especializados de informacion en los ganglios basales puede tener una importante repercusion en el tratamiento de los desordenes extrapiramidales.

**13.** A nuestro entender, el fluoro-gold es el trazador de eleccion para ser utilizado en conjuncion con la HRP-WGA para estudios de doble marcaje neuronal, ofreciendo esta asociacion grandes ventajas sobre los metodos clasicos de asociacion de dos trazadores fluorescentes. Comparativamente e inyectando la misma cantidad de trazador el fluoro-gold parece marcar un menor numero de neuronas que la HRP-WGA.

**FIGURAS**

**FIGURA Nº 1.** Microfotografías en campo claro de dos secciones frontales adyacentes de la mitad rostral del complejo nigral, correspondientes al caso nº 9. A: acetilcolinesterasa (AChE). B: tirosina hidroxilasa (TH). Obsérvense la zona pobre en AChE de la porción principal horizontal de la pars compacta (\*), así como las expansiones ventrales de la sustancia negra pars compacta caracterizadas por su baja actividad acetilcolinesterásica (F). Barra de calibración = 0'5 mm.

**FIGURA Nº 2.** Microfotografías en campo claro de dos secciones frontales adyacentes de la mitad caudal del complejo nigral, pertenecientes al caso nº 9. A: acetilcolinesterasa (AChE). B: tirosina hidroxilasa (TH). El asterisco muestra una zona de baja actividad enzimática. Barra de calibración = 0'5 mm.

**FIGURA Nº 3.** Microfotografías en campo claro de dos secciones frontales adyacentes del complejo nigral pertenecientes al caso nº 14, en que se realizó una inyección de HRP-WGA en el putamen (ver esquema de inyecciones nº 8). A: acetilcolinesterasa (AChE). B: tetrametilbenzidina (TMB). Obsérvense en B como las neuronas marcadas forman grupos de límites netos, Algunos de estos grupos neuronales se corresponden en A con zonas de bajo contenido AChE (\*), mientras otros corresponden a zonas ricas en actividad enzimática. Son también observables fibras marcadas estrío-nigrales.. Para referencia se han marcado vasos sanguíneos en ambas secciones (v, v'). Barra de calibración = 0'5 mm.

**FIGURA Nº 4.** Microfotografías en campo claro de dos secciones frontales adyacentes de la mitad rostral del complejo nigral en el caso nº 7, en que se realizó una inyección de HRP-WGA en el putamen (ver esquema de inyecciones nº 8 ). A: acetilcolinesterasa (AChE). B: tetrametilbenzidina (TMB). Utilizando las referencias vasculares (V, V', V'') se puede comprobar cómo los grupos de neuronas marcadas en B se corresponden en A con zonas de baja actividad acetilcolinesterásica. Barra de calibración = 0'5 mm.

**FIGURA N<sup>o</sup> 5.** Microfotografías de dos secciones frontales adyacentes de la mitad caudal del complejo nigral correspondientes al caso n<sup>o</sup> 7, el mismo que en la figura anterior. A: acetilcolinesterasa (AChE). B: tetrametilbenzidina. La mayoría de las neuronas marcadas en B (utilizar las referencias vasculares, v, v') corresponden en A a zonas de bajo contenido AChE. Barra de calibración = 0'5 mm.

**FIGURA N<sup>o</sup> 6.** Microfotografías en campo claro que muestran un detalle de la sustancia negra pars compacta en tres secciones frontales adyacentes del caso n<sup>o</sup> 10, en que se realizó una inyección de HRP-WGA en el putamen y de Fluoro-Gold en el núcleo caudado (ver esquema de inyecciones n<sup>o</sup> 16). A: acetilcolinesterasa (AChE). B: tetrametilbenzidina, que muestra el marcaje provocado de la inyección de HRP-WGA realizada en el putamen. C: tirosina hidroxilasa (TH). Las neuronas marcadas tienden a corresponder a una zona rica en AChE. Referencias vasculares (v, v'). Barra de calibración = 0'25 mm.

**FIGURA N<sup>o</sup> 7.** Microfotografías en campo claro de dos secciones frontales adyacentes del complejo nigral correspondientes al caso n<sup>o</sup> 2, en que se realizó una inyección de HRP-WGA en la cabeza del núcleo caudado (ver esquema de inyecciones n<sup>o</sup> 3). A: acetilcolinesterasa (AChE). B: tetrametilbenzidina. El grupo neuronal situado a la derecha en B, próximo a la referencia vascular v, se corresponde en A con una zona de alta actividad AChE, mientras el grupo neuronal marcado de la izquierda de la fotografía en las proximidades del vaso v', estaría situado en una zona de baja actividad enzimática (\*). Barra de calibración = 0'5 mm.

**FIGURA N<sup>o</sup> 8.** Microfotografías en campo claro de dos secciones adyacentes del complejo nigral correspondientes al caso n<sup>o</sup> 11, en que se realizó una inyección de HRP-WGA en la cabeza del núcleo caudado (ver esquema de inyecciones n<sup>o</sup> 3). A: acetilcolinesterasa (AChE). B: tetrametilbenzidina. Las neuronas marcadas en B forman un grupo dorsal, que corresponde en A a una zona de alto contenido AChE,



mientras en grupo neuronal marcado mas ventral en B se corresponde con una zona de relativamente pobre contenido enzimático. v, v': referencias vasculares. Barra de calibración = 0'5 mm.

**FIGURA Nº 9.** Microfotografías en campo claro de secciones procesadas mediante la técnica histoquímica de la tetrametilbenzidina que muestran el marcaje neuronal en diversas zonas del complejo nigral en el caso nº 14, en que se realizaron inyecciones de HRP-WGA en el putamen (ver inyecciones en esquema nº 8). A: substancia negra pars mixta. B: área tegmental ventral. C: grupo mesencefálico A8. Barra de calibración = 50 micras.

**FIGURA Nº 10.** Microfotografías en campo claro de secciones frontales de la cabeza del núcleo caudado (A, B y D, caso nº 12) y putamen (C, caso nº 13), procesadas mediante la técnica de la tetrametilbenzidina para mostrar diversas inyecciones de HRP-WGA. Barra de calibración = 0'5 mm.

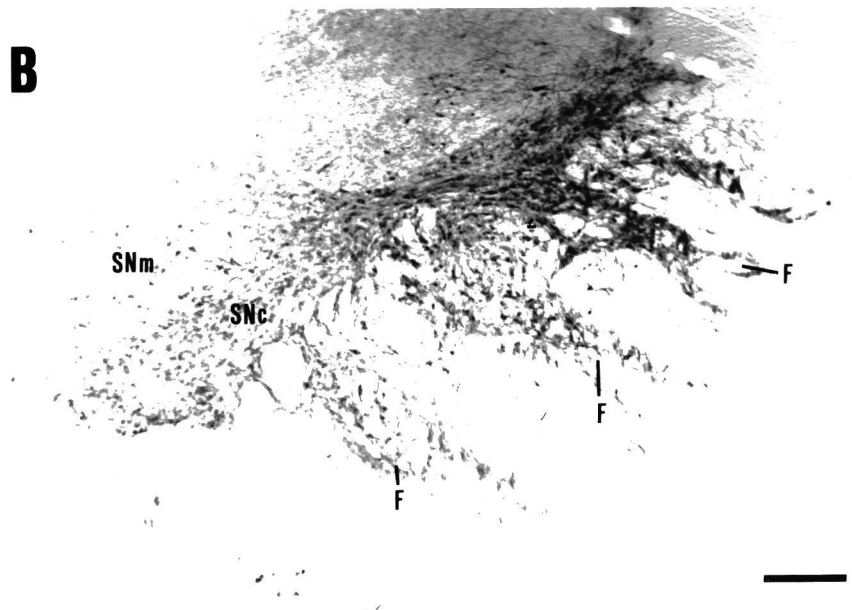
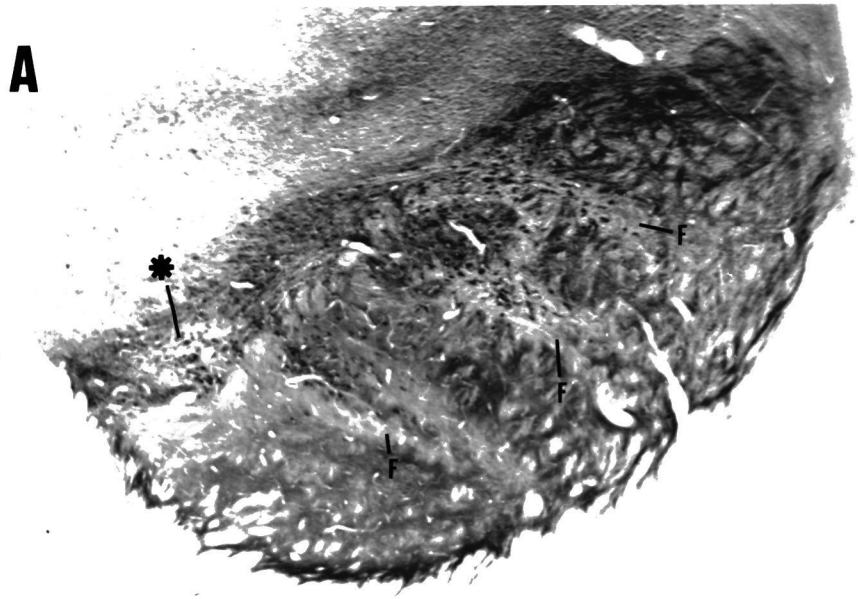


FIGURA N° 1.

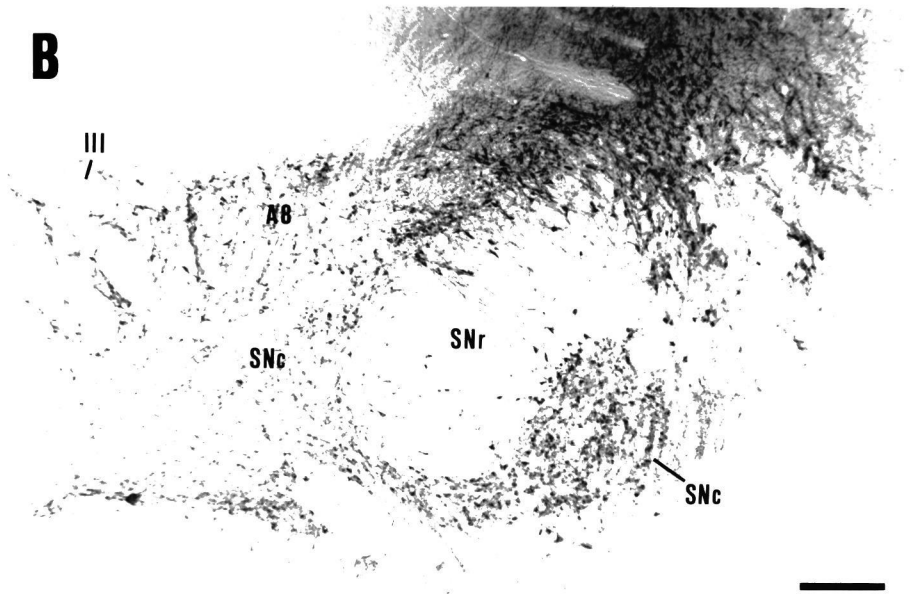
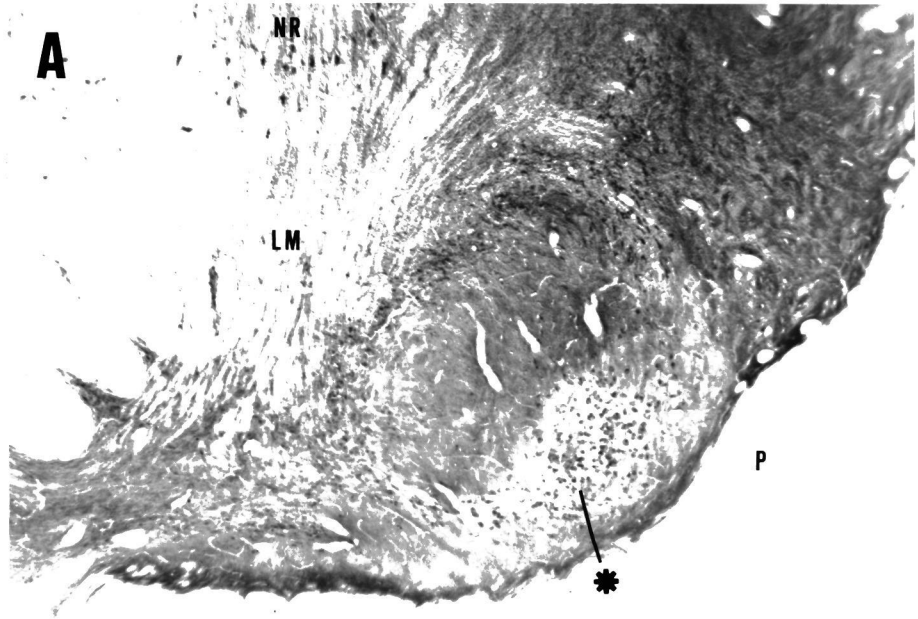


FIGURA N° 2.

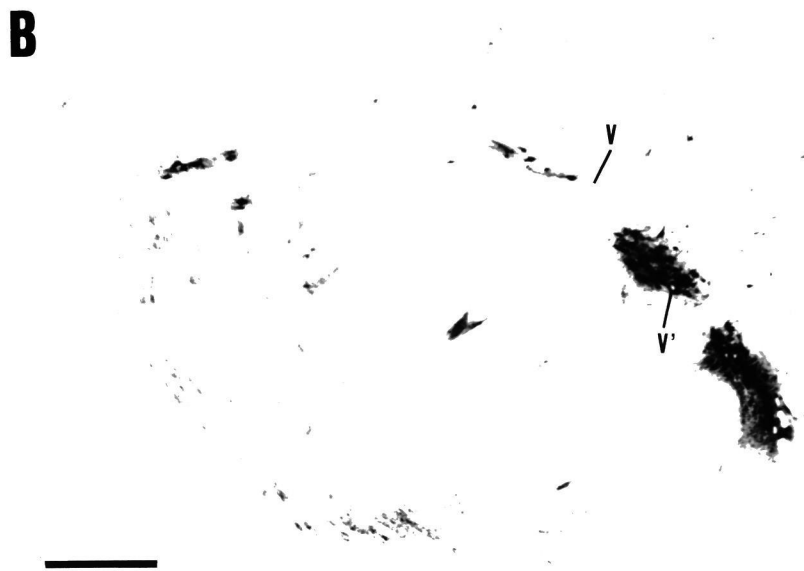
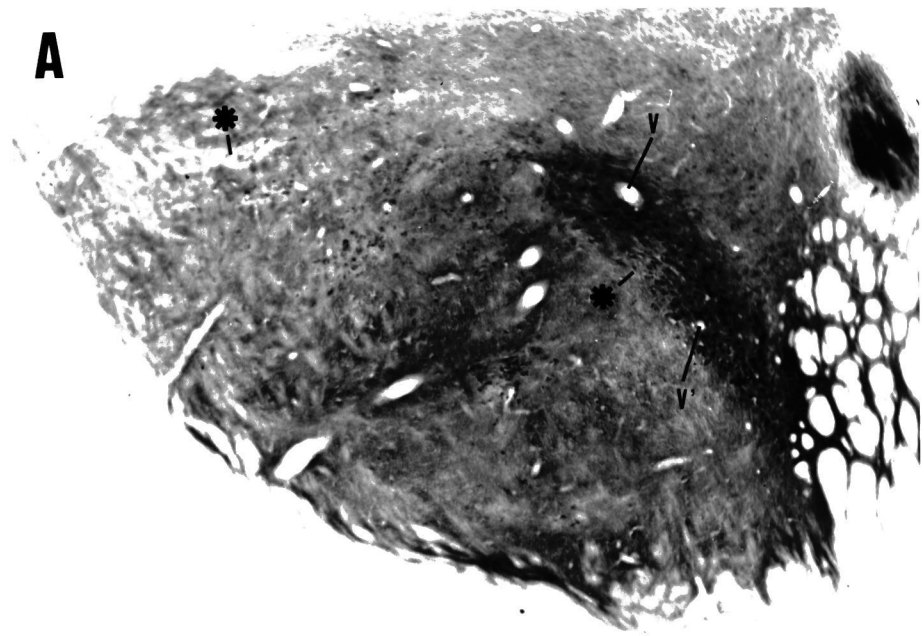


FIGURA N° 3.

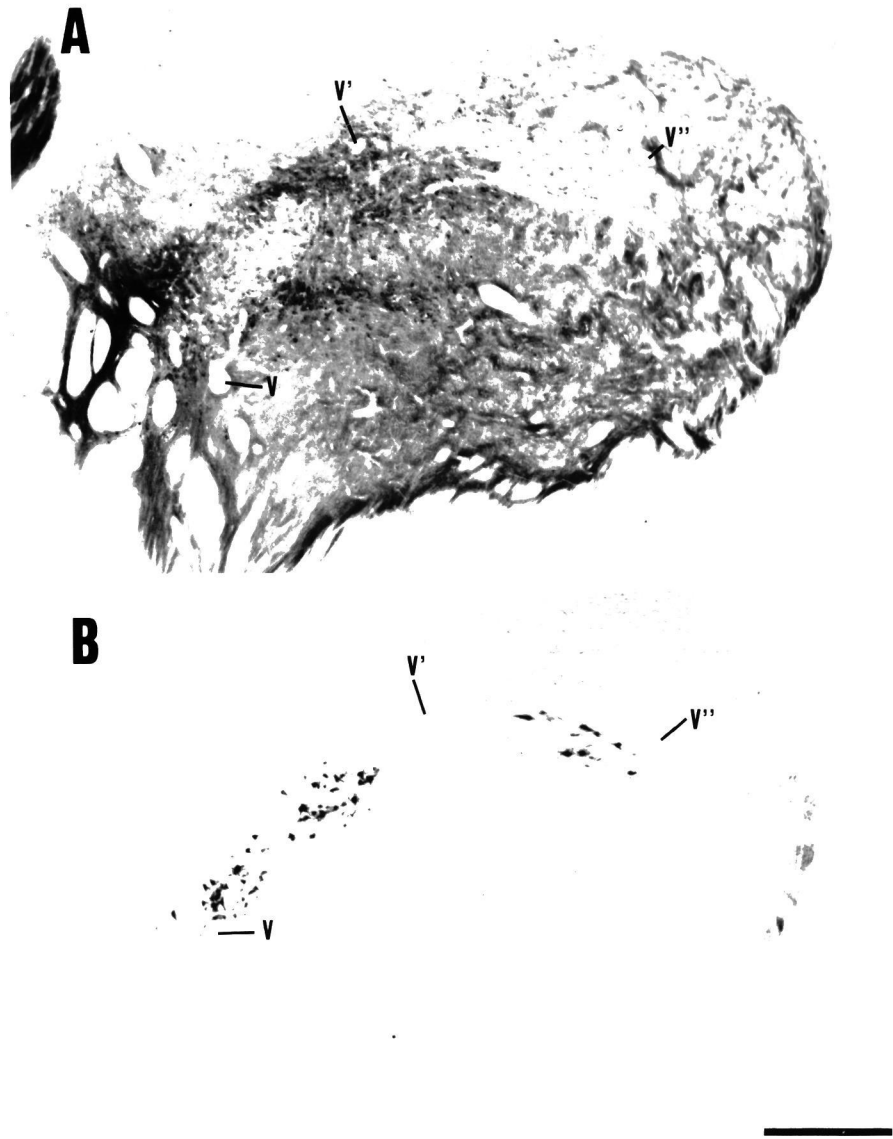


FIGURA N° 4.

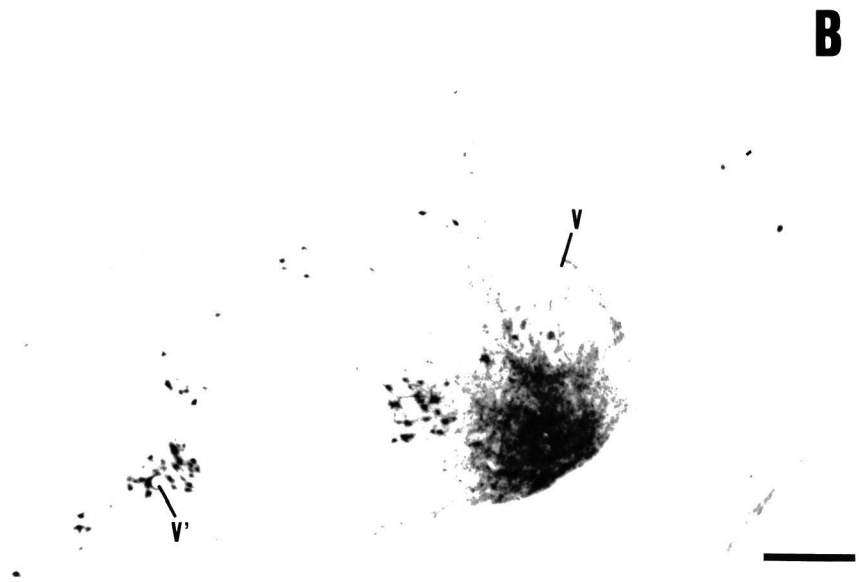
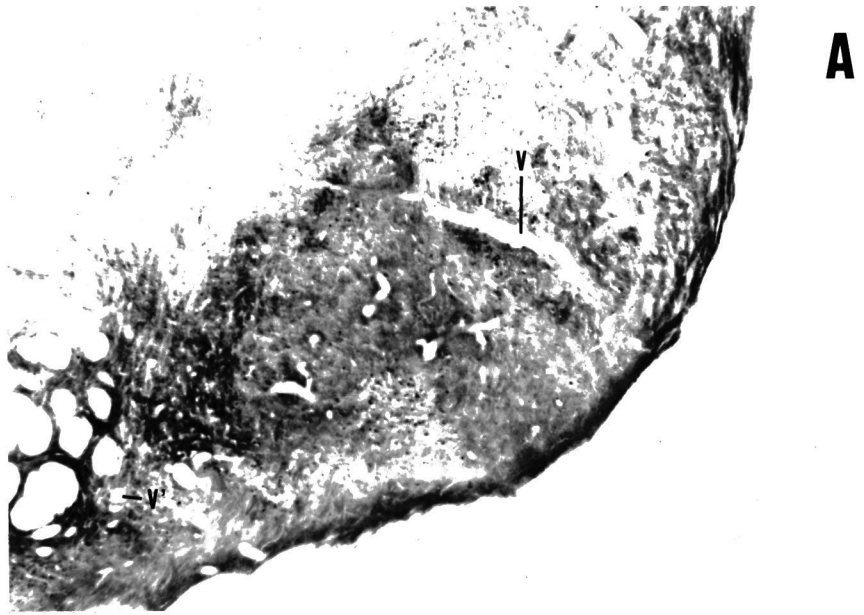


FIGURA N° 5.

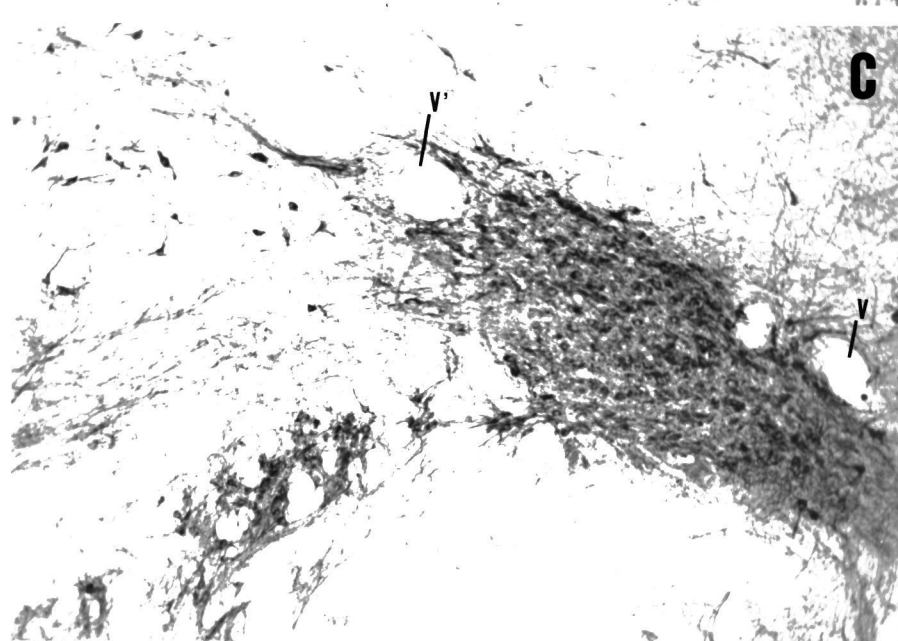
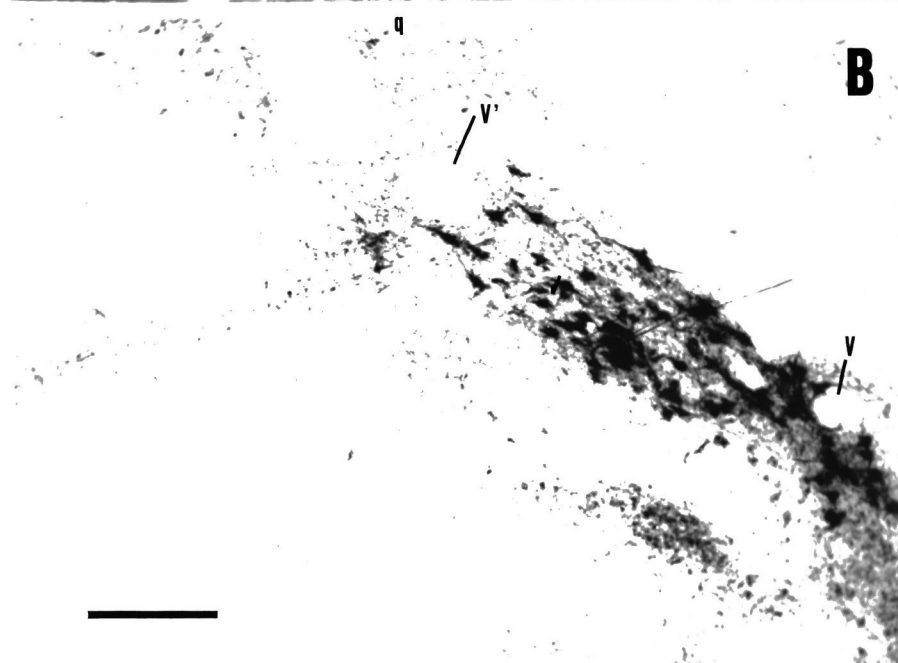
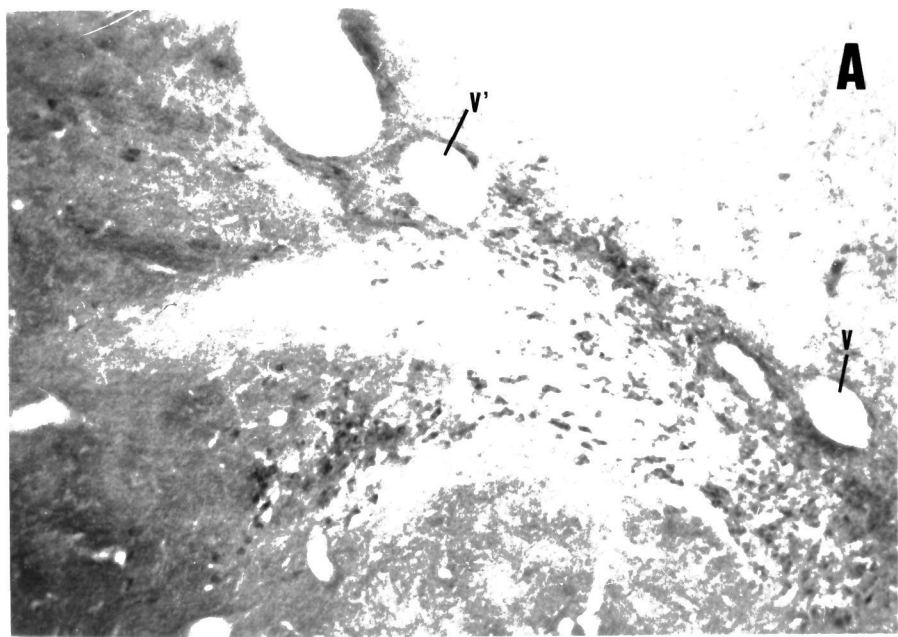
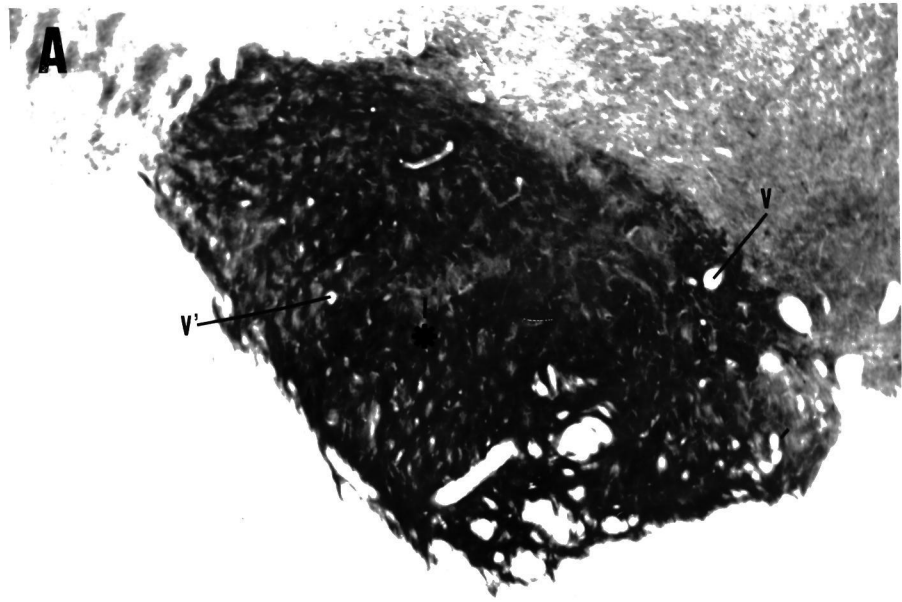


FIGURA N° 6.



**B**

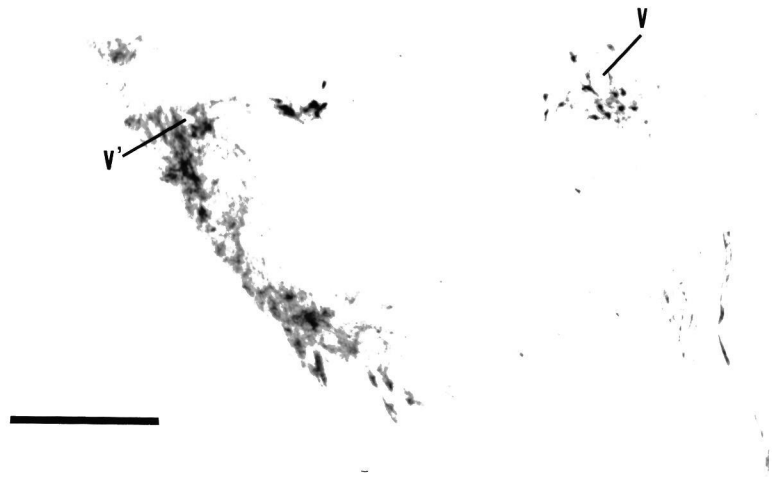


FIGURA N° 7.



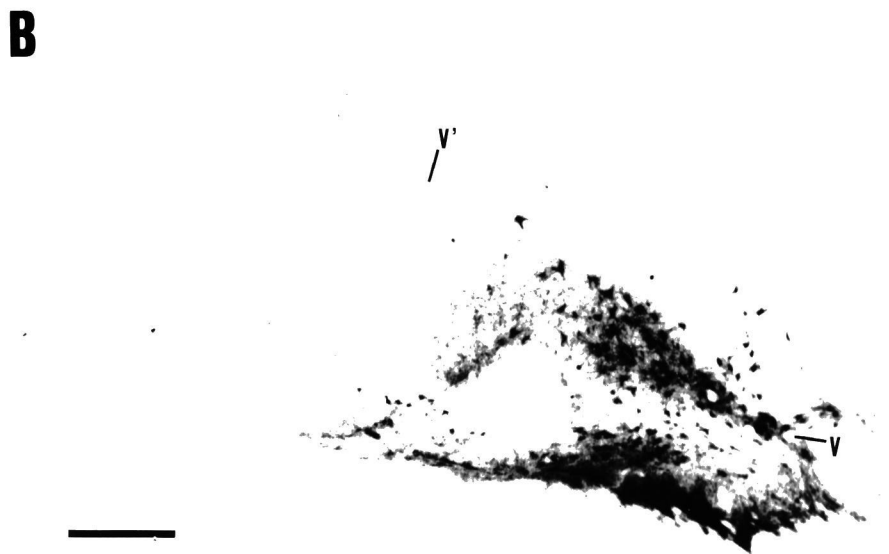
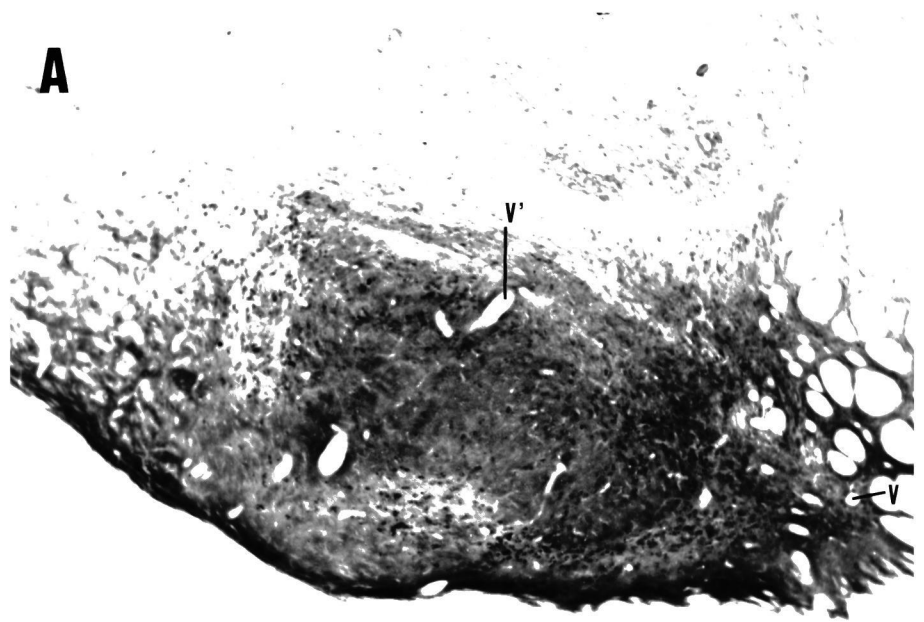


FIGURA N° 8.

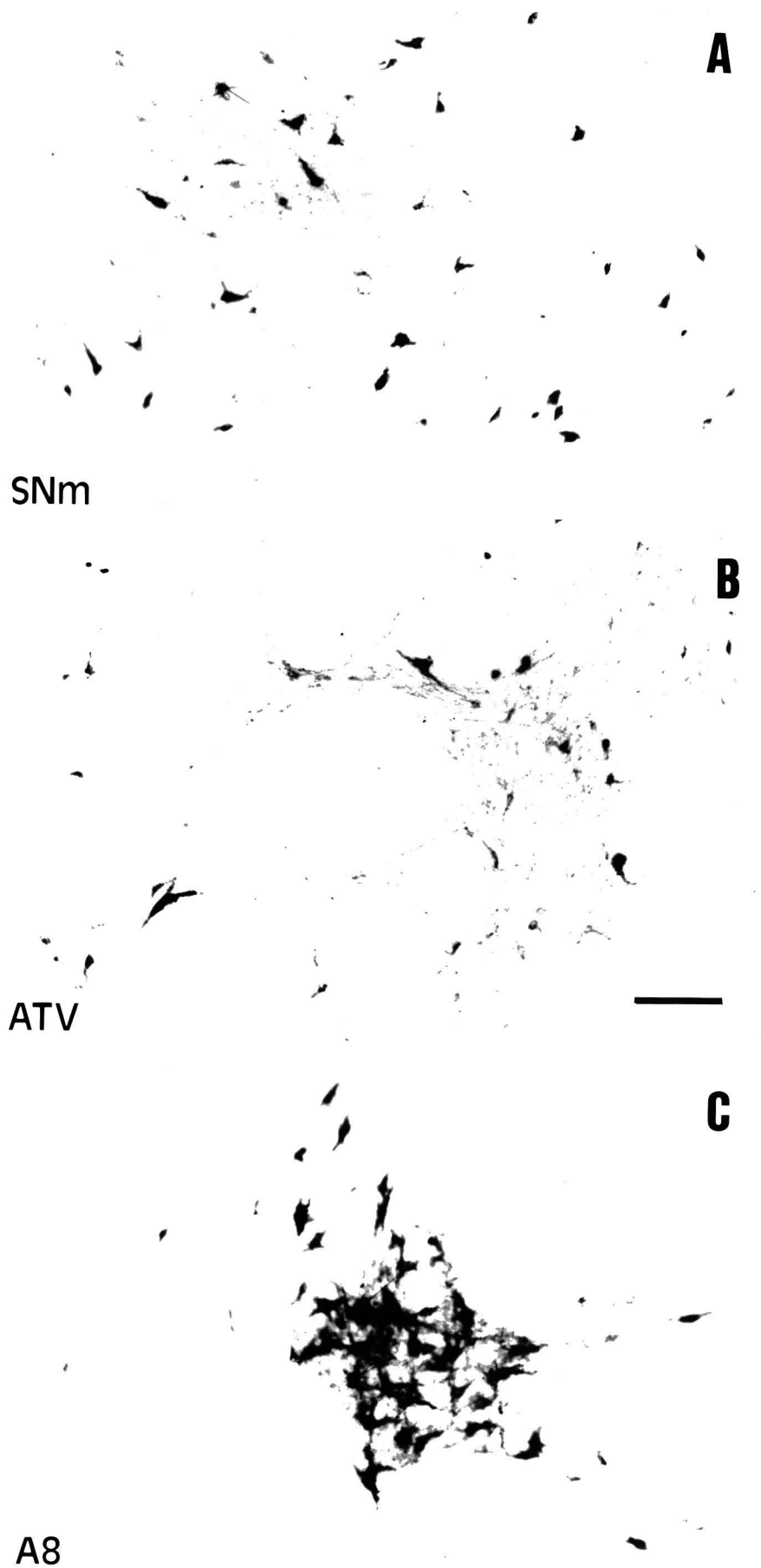


FIGURA N° 9.

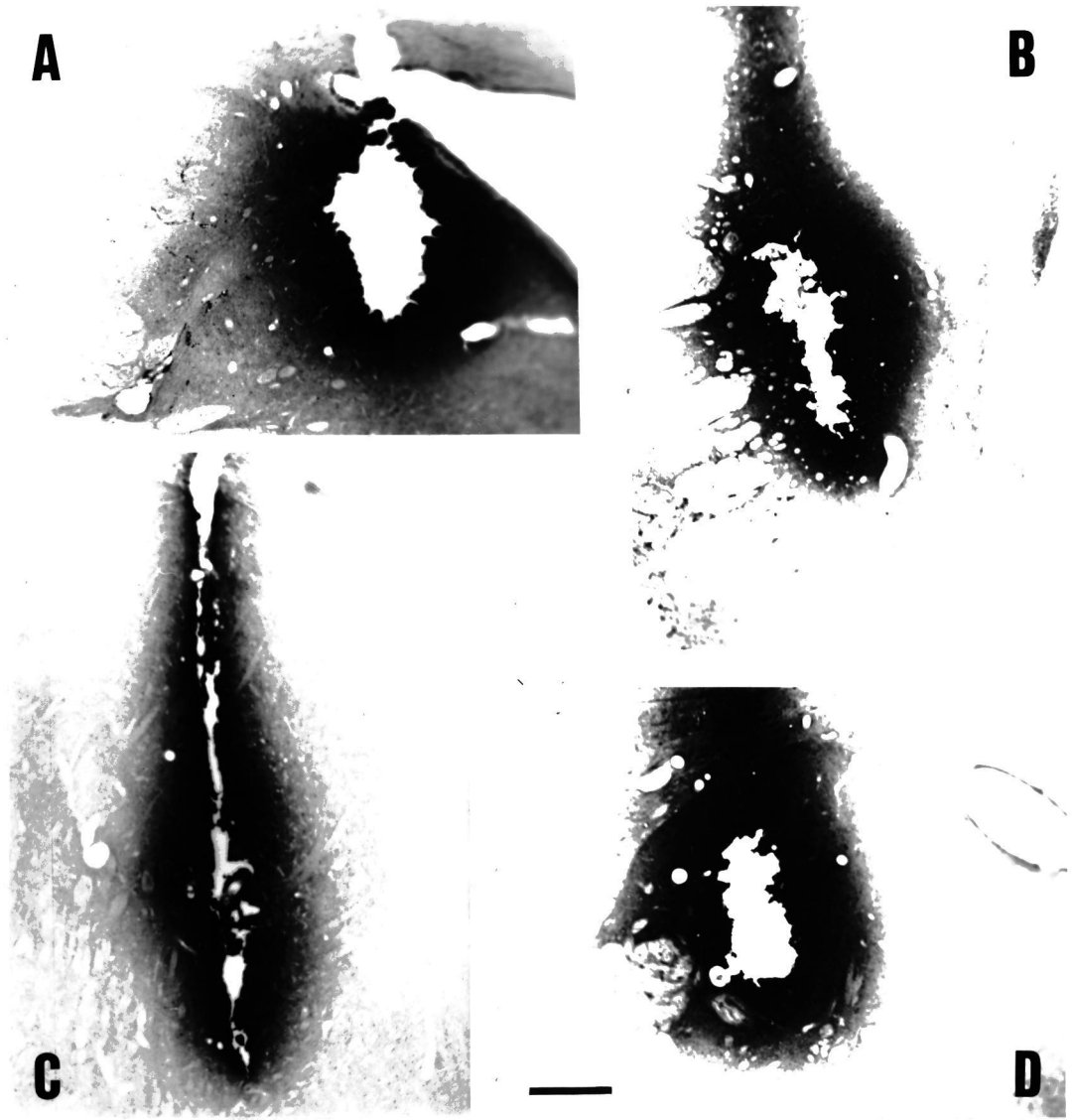


FIGURA Nº 10.

LA SUBSTANCIA NEGRA DEL MONO

AMPARO CARMONA BOND

LA SUBSTANCIA NEGRA PARS COMPACTA DEL MONO  
ARDILLA Y EL SISTEMA NEGRO-ESTRIADO

APTO "CUM LAUDE"  
20 OCTUBRE

90

[Signature]

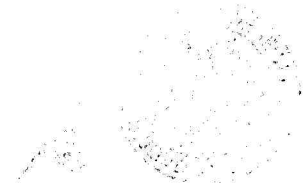
[Signature]

[Signature]

[Signature]

[Signature]

[Signature]



[Faint text below the stamp]