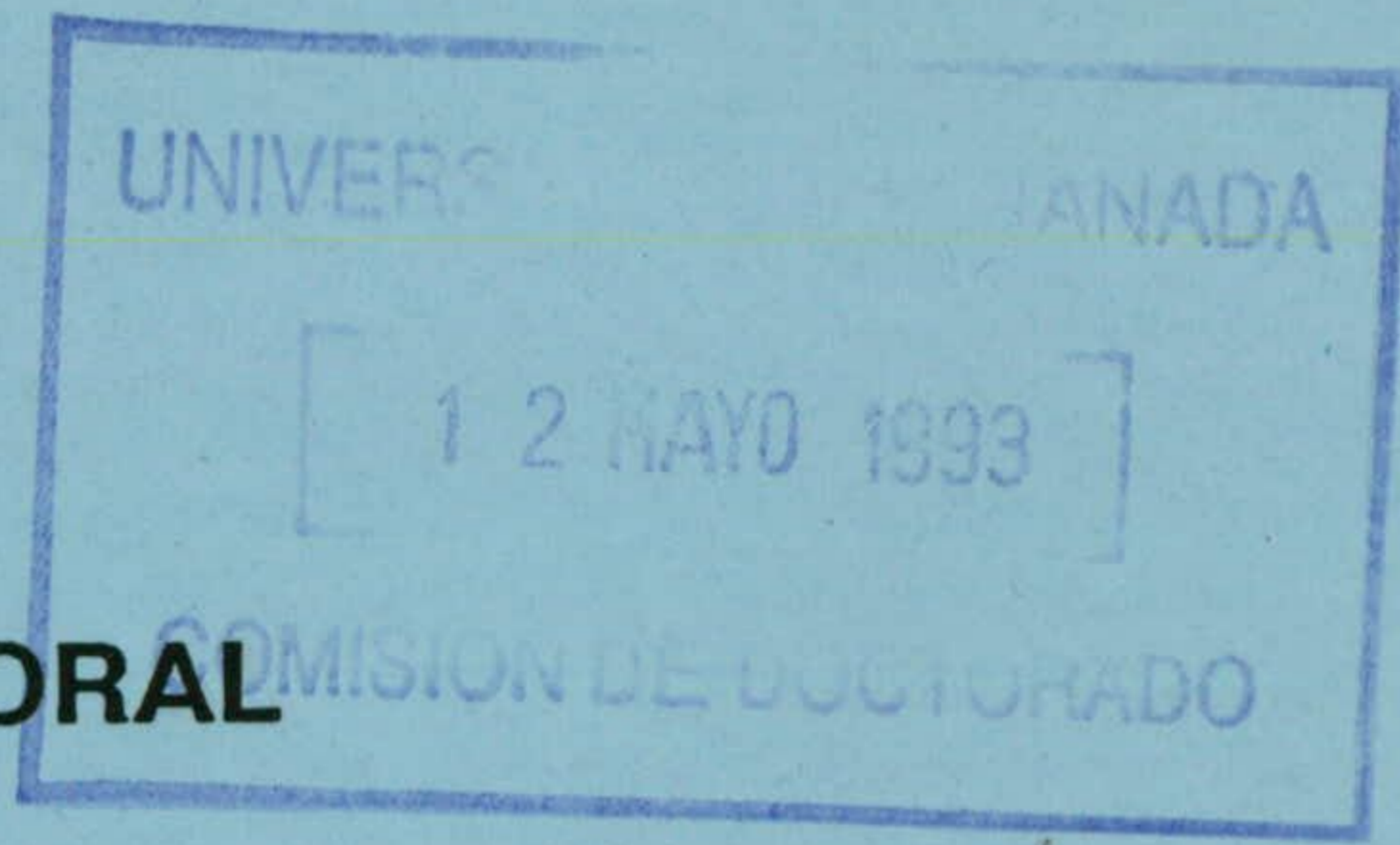


Prov. T. 14/35

T  
14  
100

UNIVERSIDAD DE GRANADA - FACULTAD DE CIENCIAS  
Departamento de Biología Celular



TESIS DOCTORAL

"ALCOHOLISMO Y SITUACION NEURONAL EN EL NUCLEO  
GENICULADO LATERAL DORSAL (NGLd) DEL CONEJO  
(Oryctolagus cuniculus L.). UN ESTUDIO A MICROSCOPIA  
OPTICA Y MICROSCOPIA ELECTRONICA".

RAFAEL LUJAN MIRAS

Mayo, 1993



UNIVERSIDAD DE GRANADA - FACULTAD DE CIENCIAS

Departamento de Biología Celular

**"ALCOHOLISMO Y SITUACION NEURONAL EN EL NUCLEO  
GENICULADO LATERAL DORSAL (NGLd) DEL CONEJO  
(Oryctolagus cuniculus L.). UN ESTUDIO A MICROSCOPIA  
OPTICA Y MICROSCOPIA ELECTRONICA".**

MEMORIA presentada para aspirar al  
grado de DOCTOR en CIENCIAS  
BIOLOGICAS

Granada, Mayo de 1993

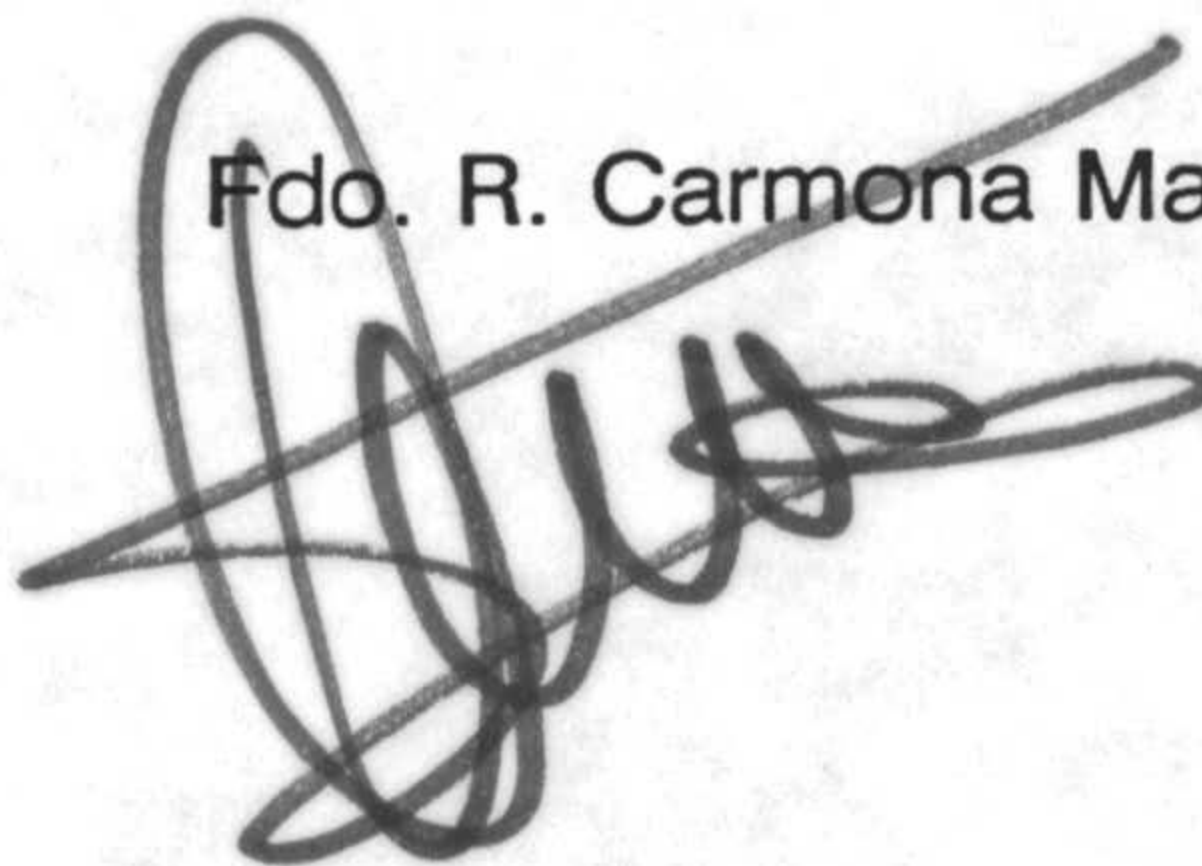
Por Rafael Luján Miras

Los abajo firmantes como Directores de la presente Tesis, certifican que la misma ha sido realizada en el Departamento de Biología Celular de la Universidad de Granada.

Fdo. F. Abadía Fenoll



Fdo. R. Carmona Martos



*A mis padres*

## AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mi más sincero agradecimiento a mis directores de Tesis, los Profesores Drs. Francisco Abadía Fenoll y Ramón Carmona Martos, cuya orientación y ayuda han sido esenciales para que el presente trabajo doctoral haya llegado a buen fin; y en especial al segundo, por la gran confianza que depositó en mi desde un principio, por su paciente labor de docencia, por su amistad e inestimables consejos, y por enseñarme un concepto fundamental: la profesionalidad.

Asímismo, mi mayor gratitud para la Dra. Ruth Calvente Iglesias por su incansable colaboración y por su amistad, creando un excelente ambiente de trabajo.

Quiero destacar la gran talla humana de mis padres, quienes en todo momento me ofrecieron muestras de ánimo y supieron comprenderme. Sin ellos no hubiera sido posible, por lo que les dirijo mi más sincero agradecimiento.

Finalmente, agradezco a cuantas personas del Departamento de Biología Celular, de una u otra forma, me han ayudado en la realización de este estudio.

**INDICE**

I. INTRODUCCION .....	1
II. REVISION BIBLIOGRAFICA .....	5
1. EL ALCOHOL Y SU ACCION A NIVEL DEL S.N.C. DE MAMIFEROS	6
1.1. Alteración del número de células .....	8
1.1.1. Exposición alcohólica prenatal .....	8
1.1.2. Exposición alcohólica perinatal .....	9
1.1.3. Exposición alcohólica postnatal .....	9
a) Diferencias regionales .....	9
b) Concentración de alcohol en sangre .....	11
c) Tamano celular .....	12
1.1.4. Exposición alcohólica crónica en individuos adultos .....	13
1.2. Alteraciones morfológicos .....	15
1.3. Alteración del desarrollo neuronal.....	17
1.4. Alteración de la sinaptogénesis .....	19
1.5. Alteración del sistema neurotransmisor .....	20
1.6. Hipótesis sobre la neurotoxicidad del alcohol .....	22
1.7. Recuperación de los parámetros afectados .....	23
1.8. Las $\beta$ -endorfinas y su papel como marcadores biológicos del alcoholismo .....	25
2. NUCLEO GENICULADO LATERAL .....	28
2.1. El sistema visual de mamíferos .....	28
2.2. Aspectos organizativos del Núcleo geniculado Lateral dorsal .....	30
2.3. Elementos estructurales del NGLd .....	33
2.4. Aferencias y distribuciones sinápticas en el NGLd .....	37
a) Terminales RLP .....	37
b) Terminales RSD .....	38
c) Terminales F .....	38
3. TECNICAS ESTEREOLOGICAS .....	41

3.1. La Estereología .....	41
3.2. Volumen de la estructura contenedora .....	43
3.2.1. Estructura contenedora macroscópica .....	43
3.2.2. Estructura contenedora microscópica .....	44
3.3. Determinación del número de células .....	46
3.4. Los nuevos métodos estereológicos .....	48
3.4.1. El disector .....	49
3.4.2. El fraccionador .....	51
3.4.3. El selector .....	51
3.4.4. El nucleador .....	52
3.4.5. El disector óptico .....	53
3.5. Influencia del proceder técnico en el estudio estereológico .....	53
III. MATERIAL Y METODOS .....	55
1. ASPECTOS PREVIOS A CONSIDERAR .....	56
2. MATERIAL DE ESTUDIO Y PROCEDERES TECNICOS EMPLEADOS	59
2.1. Perfusión .....	59
2.2. Microscopía óptica .....	60
2.2.1. Fijación .....	60
2.2.2. Inclusión .....	61
2.2.3. Corte .....	63
2.2.4. Tinción .....	63
2.2.4.a. Soluciones colorantes .....	64
2.2.4.b. Proceso de tinción .....	64
2.3. Microscopía electrónica .....	66
2.3.1. Fijación de los cilindros .....	66
2.3.2. Inclusión .....	67
2.3.3. Corte .....	68
2.3.4. Tinción .....	69
2.3.4.a. Soluciones colorantes .....	69
2.3.4.b. Proceso de tinción .....	70

3. DESCRIPCION DE LA TECNICA DE OBTENCION DE DIBUJOS. DETERMINACIONES VOLUMETRICAS .....	71
4. DELIMITACION DE LAS ZONAS DE ESTUDIO .....	73
5. METODOLOGIA UTILIZADA PARA EL CALCULO DE VOLUMENES .	77
5.1. Selección de la muestra .....	77
5.2. Estimación de áreas .....	78
5.3. Determinación de volúmenes .....	78
6. DETERMINACION DEL NUMERO DE NEURONAS .....	81
6.1. Unidades muestrales .....	81
6.2. Tamaño de la muestra .....	81
6.3. Estimación del número total de neuronas .....	83
6.4. Corrección de la sobreestimación .....	83
6.5. Estimación del número real de células .....	85
6.6. Cálculo de la densidad neuronal .....	85
7. DETERMINACION DEL VOLUMEN DEL SOMA NEURONAL Y NEUROPILO .....	87
8. CALCULO DEL AREA NEURONAL .....	89
9. ESTADISTICA APLICADA .....	91
IV. OBSERVACIONES .....	92
A. OBSERVACIONES A MICROSCOPIA OPTICA .....	93
1. ASPECTOS SOBRE LA MORFOLOGIA GENERAL Y ORGANIZACION CITOARQUITECTONICA DEL NGLd DEL CONEJO .....	93
a) Secciones horizontales .....	94
b) Secciones frontales .....	94
c) Secciones sagitales .....	95
2. CALCULO DE LOS VOLUMENES EN EL NGLd DEL CONEJO .....	117
2.1. Comparación de valores medios .....	119
3. ESTIMACION DEL NUMERO DE NEURONAS .....	141
3.1. Cálculo de la densidad neuronal .....	141



3.1.1. Corrección de la sobreestimación numérica .....	142
3.1.2. Comparación de valores medios .....	143
3.2. Comparación de valores medios de densidad neuronal .....	144
4. CALCULO DEL VOLUMEN DEL SOMA NEURONAL .....	169
4.1. Comparación de valores medios .....	170
5. DETERMINACION DEL AREA NEURONAL .....	174
5.1. Comparación de valores medios .....	175
B. OBSERVACIONES A MICROSCOPIA ELECTRONICA .....	177
1. OBSERVACIONES EN EL GRUPO CONTROL .....	177
a) Ultraestructura del soma neuronal .....	177
b) Rasgos ultraestructurales del neuropilo .....	179
2. OBSERVACIONES EN EL GRUPO TRATADO CON ALCOHOL .. .....	193
a) Ultraestructura del soma neuronal .....	193
b) Rasgos ultraestructurales del neuropilo .....	194
V. COMENTARIO .....	210
1. CONSIDERACIONES TECNICAS .....	211
2. ASPECTOS SOBRE LA MORFOLOGIA .....	216
3. ESTIMACION DE LOS VOLUMENES .....	218
4. RECUENTOS NEURONALES Y ESTIMACION DE LA DENSIDAD NEURONAL .....	221
5. ESTIMACION DEL VOLUMEN DEL SOMA Y AREA NEURONAL ....	227
6. ALTERACIONES ULTRAESTRUCTURALES CUALITATIVAS A MICROSCOPIA ELECTRONICA .....	232
7. RELACION DEL ALCOHOL Y SITUACION NEURO-BIO-MOLECULAR .....	239
VI. CONCLUSIONES .....	244
VII. BIBLIOGRAFIA .....	249

## I. INTRODUCCION

En la actualidad, se acepta de forma generalizada que el alcohol es el producto más consumido en el campo de la drogadicción, de ahí el que tenga tan alta incidencia social. Cuando nos enfrentamos con el estudio de los efectos del alcohol en el hombre nos encontramos con una serie de factores que podrían producir de manera independiente resultados adversos. Una alternativa viable a este problema es el empleo de animales de experimentación, cuyos resultados pueden ser extrapolados a humanos. La utilización de los modelos animales supone una serie de ventajas entre las que cabe destacar el control que el experimentador puede imponer para aislar y estudiar el impacto de determinadas variables que resultarían muy difícil, sino imposible, de aislar en humanos. Asimismo, facilita el llevar a cabo una evaluación metodológica y más intensa de parámetros de gran interés, así como el estudio de éstos en un periodo más corto de tiempo, que en humanos supondría un intervalo de varios años.

Los estudios experimentales que se vienen realizando hoy en día sobre los efectos del alcohol en el Sistema Nervioso Central de mamíferos coinciden en mostrar pronunciadas alteraciones cerebrales como causa directa del consumo abusivo del producto. Dichas alteraciones han sido detectadas en diversas regiones entre las que cabe destacar el Cerebelo, el Hipocampo, el Córtex Prefrontal, el Córtex Somatosensorial y estructuras diencefálicas, tales como los Cuerpos mamilares, el Núcleo talámico dorsomedial, el Núcleo talámico anterior y la Substantia inmominata. Sin embargo, son muchos los pasos que quedan por dar para llegar a conocer los efectos neurotóxicos en otras muchas áreas de gran interés.

De todos los estudios llevados a cabo en las antedichas regiones nerviosas, los de mayor interés son los referentes al conocimiento de la alteración neurológica sobre el número de células y los que centran su atención en los daños a nivel de la neurotransmisión inducidos por el alcohol tanto en la observación óptica como la ultraestructural. Siguiendo estas pautas, el presente trabajo se encuentra encaminado a estudiar la situación citoarquitectónica neuronal en el Núcleo Geniculado Lateral dorsal (NGLd) del conejo, tras la intoxicación producida por la ingesta prolongada de etanol. El NGLd es el más prominente de los dos núcleos que forman parte del complejo nuclear del Núcleo Geniculado Lateral, constituyendo un eslabón fundamental en la cadena sensible del sistema visual de mamíferos, ya que recibe una gran cantidad de fibras retinales y se proyecta a través de la radiación óptica hasta el córtex cerebral ipsilateral (Wilson y Gragg, 1967). De esta manera, se considera el NGLd como estación de relevo de las vías ópticas y el centro óptico primario desde donde las fibras nerviosas que inician su recorrido en la retina, o estación inicial, van a alcanzar las áreas visuales, o estación final, en diferentes regiones de la corteza cerebral.

La elección del conejo (*Oryctolagus cuniculus*) como animal de experimentación en el presente estudio respondió a que su NGLd muestra una relativa simplicidad estructural próxima a roedores, ya que no es laminado, y, al mismo tiempo, guarda cierto parecido con el de mamíferos más evolucionados, en los que el sentido de la visión se encuentra más desarrollado (Holcombe y Guillery, 1984).

Finalmente, al estudiar las alteraciones que pueda producir el alcohol, si no se recurre a una adecuada metodología en el análisis de parámetros morfométricos, los datos obtenidos son con frecuencia erróneos o insuficientes. El objetivo final de nuestro trabajo se encuentra encaminado a desarrollar y emplear la sistemática estereología apropiada que nos permita establecer la comparación entre los animales sometidos a la acción del

alcohol y los utilizados como control. En este sentido, el primer paso a dar fue el estudio de la densidad neuronal, así como otros parámetros morfométricos, tales como el área neuronal y volumen del soma neuronal, cuyo análisis es conveniente para que la información obtenida sea más correcta y útil, ya que muchos de los estudios de este tipo no profundizan en la obtención de una explicación acerca de las causas de la alteración neuronal. Asimismo, hemos prestado una especial atención a la existencia de neuronas de soma con marcado incremento picnótico, que, como signo de muerte o premuerte, parecen desempeñar un importante papel en los valores de densidad neuronal. Por último, y como complemento a nuestro análisis, hemos realizado algunas observaciones sobre cambios ultraestructurales que tienen lugar en las células tras la ingesta de alcohol, y su posible significado.

## II. REVISION BIBLIOGRAFICA

## **1. EL ALCOHOL Y SU ACCION A NIVEL DEL S.N.C. DE MAMIFEROS**

Hoy por hoy es bien conocido y aceptado de forma general que algunos productos, consumidos de manera abusiva, pueden ejercer un efecto neurotóxico a nivel orgánico, que incluso a dosis bajas pueden producir trastornos del desarrollo y en su caso malformaciones citoarquitectónicas y orgánicas (Vorhees y Fernández, 1986).

Cabe destacar el papel desempeñado por el alcohol entre tales productos, considerado como el más consumido con efectos nocivos para el organismo. Asimismo, queda ampliamente demostrado que su consumo crónico afecta profundamente al desarrollo funcional del Sistema Nervioso Central (S.N.C.) no solo en animales adultos (Tavares y Paula-Barbosa, 1982, 1983, 1984; Tavares y cols., 1983a, b, 1985, 1986a, b; Borges y cols., 1986), sino incluso en fetos y neonatos (West y cols., 1986; Pierce y cols., 1989; Bonthius y West, 1990). Estas anomalías son incluso más marcadas en los descendientes expuestos al alcohol durante el periodo de lactancia (Guerra y Sanchis, 1986).

En este sentido, uno de los problemas de mayor trascendencia y repercusión social es la ingestión habitual del producto de forma crónica, así como los efectos que éste pueda tener durante el embarazo, llegando a producir en los hijos alteraciones físicas del desarrollo y del comportamiento. Estas alteraciones, que en su conjunto reciben el nombre de Síndrome Alcohólico Fetal (S.A.F.) (Jones y Smith, 1973, 1975; Clarren y Smith, 1978; Streissguth, 1978), vienen caracterizadas por determinados rasgos craneofaciales, deficiencias en el crecimiento prenatal y postnatal, disfunciones del S.N.C. y un mayor o menor número de malformaciones (Jones y Smith, 1973; Carlin y Siekevitz, 1983; Streissguth, 1986).

No obstante, es bastante difícil que todos los efectos inducidos por el alcohol mencionados arriba se puedan poner de manifiesto en un mismo feto, ya que existen varios factores que intervienen en el proceso. Entre ellos cabe destacar el papel desempeñado por la susceptibilidad genética (Chernoff, 1980; Webster y cols., 1980; Cassells y cols., 1987), la competencia en el metabolismo del alcohol (Erickson, 1984; Kelly y cols., 1987; Pennington, 1988), tiempo de actuación del mismo (Phillips y Cragg, 1982; West, 1987) y de la ingestión simultánea de drogas adicionales (Bonthius y West, 1989).

Los estudios que sobre alcoholismo experimental se han llevado a cabo sobre estructuras nerviosas se han centrado principalmente en áreas tales como el **Hipocampo**, por su implicación en los procesos de aprendizaje y memoria (Isaacson y Pribram, 1975; Seiffert, 1983), y también el **Cerebelo**. En menor medida, también se disponen de datos sobre estructuras corticales cerebrales y diencefálicas.

Desde un punto de vista neuroanatómico-funcional y de comportamiento, el deterioro mental que tiene lugar en humanos alcohólicos y los descendientes con S.A.F., hace necesario el desarrollo de experiencias animales para tratar de averiguar cómo afecta el alcohol a las distintas regiones del S.N.C. y conocer aquellas que se ven más seriamente alteradas. A partir de estos estudios en animales, muy frecuentemente se llevan a cabo extrapolaciones de los resultados obtenidos a humanos. Para ello es esencial comparar los periodos relativos de desarrollo de cada especie en relación con el tiempo que dura la ingesta de alcohol. En este sentido, todas las especies de mamíferos presentan un desarrollo cerebral que pasa por las mismas etapas, aunque el tiempo de duración de las mismas en relación con el momento del nacimiento puede llegar a ser muy diferente (Dobbing y Sands, 1973, 1979). Las etapas en que se divide la gestación humana, utilizada como punto de referencia para establecer comparaciones, son tres. Cada una de dichas etapas tienen su equivalencia con cada uno de los tres trimestres que



dura el embarazo. Así, el primer trimestre se corresponde con el periodo de embriogénesis y organogénesis, mientras que el segundo y tercer trimestre es el periodo de fetogénesis, implicado en la diferenciación orgánica y crecimiento corporal.

Existe una gran variabilidad en lo relativo a los efectos inducidos por el alcohol en el S.N.C.. Algunos de los más llamativos son los que a continuación se comentan.

### **1.1. Alteración del número de células**

De todas las alteraciones que se han descrito, una de las más extensamente comprobadas es la que hace referencia al número de células, tanto neuronas como células gliales. Dependiendo del momento en el que se administra el alcohol (prenatal, perinatal, postnatal o crónicamente a individuos adultos), la alteración neuronal va a ser diferente, ya que la neurogénesis puede tener lugar en momentos previos o posteriores al nacimiento.

#### **1.1.1. Exposición alcohólica prenatal**

A este respecto, estudios desarrollados en el Hipocampo dorsal de rata mostraron que la droga reduce de forma permanente el número de células piramidales, sin llegar a producir alteraciones en el crecimiento físico individual de las mismas. Sin embargo, el número de células granulares del Girus Dendado no se vio afectado, ya que el 85% de estas neuronas se originan postnatalmente, mientras que la neurogénesis de las primeras se completa antes del nacimiento (Altman y Bayer, 1975; Rodier, 1977; Volk, 1977; Barnes y Walker, 1981).

Otra de las regiones afectadas por la acción del etanol es el neocortex. Así, según Miller (1989), se observa un comportamiento diferencial en sus

dos zonas germinativas: zona ventricular y subventricular. En la primera, la proliferación neuronal se vio inhibida, con la subsiguientemente reducción en el número de neuronas, mientras que en la segunda, dicha proliferación celular fue paradójicamente estimulada, dando lugar a un significativo incremento neuronal (Miller, 1989). Asimismo, se ha podido observar una reducción de neuronas y células gliales pertenecientes al Córtex somatosensorial (Miller y Potempa, 1990).

### **1.1.2. Exposición alcohólica perinatal**

La información disponible acerca de la administración **perinatal** es menos abundante, aunque el efecto sobre el número de células es el mismo. Así, estudios desarrollados en el Cerebelo de rata demuestran una severa pérdida de células de Purkinje (Volk y cols., 1981; Phillips y Gragg, 1982).

### **1.1.3. Exposición alcohólica postnatal**

La administración **postnatal** es el campo sobre el que existe una mayor documentación. En este sentido, cuando estamos interesados en realizar estudios sobre las alteraciones inducidas por la droga ingerida postnatalmente, hay que tener en cuenta la existencia de una vulnerabilidad asociada a la pérdida neuronal (Pierce y cols., 1989; Bonthius y West, 1990). Dicha vulnerabilidad va a depender de varios factores entre los que son de destacar las diferencias regionales, la concentración de alcohol en sangre y el tamaño celular.

#### **a) Diferencias regionales**

La vulnerabilidad inducida por el efecto del alcohol viene influenciada por la región que estemos considerando, pero incluso dentro de una misma estructura nerviosa se pueden detectar diferencias cuantitativas. Por todo ello

se puede hablar de vulnerabilidad regional y diferencial, respectivamente.

Un ejemplo de vulnerabilidad regional la podemos observar entre el Cerebelo, el Hipocampo y el Girus Dentado, dado que la exposición alcohólica afecta de forma diferente a cada una de dichas zonas. En efecto, para un mismo animal y una misma concentración de alcohol en sangre, las células de Purkinje y granulares del Cerebelo muestran una marcada reducción, mientras que las células piramidales del Hipocampo o las granulares del Girus Dentado no reflejan el mismo tipo de respuesta (Bonthius y West, 1990, 1991a).

Este tipo de vulnerabilidad también se puede observar en el Bulbo Olfatorio. En esta área nerviosa, las células mitrales y granulares sufren una reducción significativa como consecuencia de la exposición al alcohol, aunque varios días después de la administración del producto tan sólo las mitrales quedan reducidas de forma permanente (Bonthius y West, 1991b).

El segundo tipo de vulnerabilidad (vulnerabilidad diferencial) se puede observar en el caso del Cerebelo e Hipocampo. En el primero, las neuronas de Purkinje y las de los granos no se afectan por igual tras la administración de alcohol. Así, las primeras son las más seriamente alteradas, presentándose una mayor pérdida neuronal (Pierce y cols., 1989; Bonthius y West, 1990). Incluso para las propias células de Purkinje, el efecto es distinto según el lóbulo cerebelar que se considere (Pierce y cols., 1989; Bonthius y West, 1991a). Finalmente, en el Hipocampo se puede comprobar una pérdida significativa de células piramidales en la región CA1, mientras que el resto de regiones (CA2, CA3 y CA4) no se vieron afectadas por la acción del alcohol (Bonthius y West, 1990, 1991a).

## **b) Concentración de alcohol en sangre**

La concentración de alcohol en sangre es un factor crítico a la hora de producir los efectos de este producto a nivel neurocitoarquitectónico (Pierce y West, 1986; Bonthius y West, 1988; Bonthius y cols., 1988). La importancia que desempeña este factor sobre la alteración del número de células queda demostrada por las experiencias llevadas a cabo por Bonthius y West (1990 y 1991a). Estos autores consideraron varios modelos de ingesta de alcohol (soluciones alcohólicas de distinto porcentaje) administradas en diferentes dosis diarias, lo que dio lugar a diferentes concentraciones de alcohol en sangre. Siguiendo este proceder, pudieron comprobar el hecho de que una dosis pequeña pueda ser más nociva para el desarrollo del S.N.C. que una dosis más grande, siempre y cuando la primera se consuma de forma tal que produzca una concentración en sangre más alta que la segunda (Bonthius y West, 1990, 1991a).

Existe un amplio rango de concentraciones de alcohol en sangre que es utilizado por los autores en sus estudios experimentales de los efectos del alcohol sobre el S.N.C.. Sin embargo, aquellos dedicados a la determinación de cambios cuantitativos en las poblaciones neuronales, muestran unas concentraciones extremas que oscilan entre los 30 mg/dl y los 380 mg/dl.

En el Hipocampo, se pone de manifiesto un efecto diferencial de las distintas concentraciones de alcohol en sangre. De esta manera, con concentraciones de 380 mg/dl se detecta una reducción media del 16% de neuronas en la región CA4, no viéndose afectadas las regiones CA1 y CA3. No obstante, empleando concentraciones algo más bajas (360 mg/dl), sólo se observa una disminución significativa en la región CA1 (Bonthius y West, 1990).

En el Girus Dentado, contrariamente a lo que cabría esperar, una alta

concentración de alcohol en sangre (380 mg/dl) produjo un incremento medio del 10% de células (West y cols., 1986). Al menos de forma aparente, no se produjo disminución en el número de células ya que éstas no han completado aún su etapa proliferativa (Schlessinger y cols., 1975). El antedicho incremento podría ser debido a un aumento en la tasa de migración celular o bien a una aceleración en la génesis de neuronas granulares desde una población celular secundaria (West y cols., 1986). Sin embargo, utilizando concentraciones de alcohol en sangre más bajas (ejemplo, 362 mg/dl) no se encuentra ningún tipo de respuesta en el número de células granulares en la misma zona nerviosa (Bonthius y West, 1990).

En el Cerebelo, concentraciones de alcohol en sangre de 362 y 191 mg/dl fueron suficientes para producir una disminución significativa en el número de células de Purkinje y de neuronas granulares (Bonthius y West, 1990), reducción neuronal que resulta además permanente (Bonthius y West, 1991a).

Para finalizar, niveles de alcohol en sangre inferiores a los considerados arriba, parecen no ejercer su efecto a nivel del número de neuronas de Purkinje en el Cerebelo de neonatos, aunque sí se observa una reducción en el espesor de la capa de los granos (Bauer-Moffett y Altman, 1977; Borges y Lewis, 1983b). La antedicha reducción podría deberse a un incremento en la tasa de muerte celular o a una disminución en la migración de células desde la capa granular externa, que actúa como precursor de proliferación (Borges y Lewis, 1983a). También habría que tener en cuenta un posible un menor desarrollo de los apéndices neuronales.

### **c) Tamaño celular**

Estudios desarrollados recientemente apuntan la posibilidad de que si la muerte celular inducida por el alcohol se debe a un incremento en la

concentración de calcio intracelular, las grandes neuronas serían más vulnerables que las más pequeñas (Michaelis y Michaelis, 1986).

En el Cerebelo, las neuronas más grandes son las células de Purkinje, mientras que las más pequeñas son las neuronas granulares. Por su parte, en el Hipocampo, las mayores son las células piramidales y las menores las granulares. Tras la acción del alcohol, se comprueba que tanto las células de Purkinje como las células piramidales sufren una gran reducción en cuanto a número de neuronas que en el caso de las células granulares. A partir de estas experiencias Pierce y cols. (1989) concluyeron que las neuronas más pequeñas son menos vulnerables que las grandes.

#### **1.1.4. Exposición alcohólica crónica en individuos adultos**

Además en fetos y neonatos, la alteración del número de células producida como consecuencia de la acción del alcohol también puede tener lugar en animales adultos tras un **consumo abusivo** y continuado del producto. Así, el consumo crónico da lugar a una reducción de la densidad neuronal en varias regiones entre las que cabe citar el Hipocampo, tanto regiones CA1, CA2, CA3 y CA4 como Girus Dentado (Walker y cols., 1980; Lescaudron y Verna, 1985; Cadete-Leite y cols., 1988a, 1988b), Cerebelo (Tavares y Paula-Barbosa, 1982), Córtex prefrontal (Cadete-Leite y cols., 1990b) y estructuras diencefálicas tales como los cuerpos mamilares, núcleo talámico dorsomedial, núcleo talámico anterior y sustancia innominata (Lescaudron y cols., 1984; Beracochea y cols., 1987).

Al igual que ocurría para el caso de la exposición postnatal, también existen varios factores que determinan la vulnerabilidad asociada a la pérdida neuronal. Así, se ha podido detectar una **vulnerabilidad diferencial** en los cuerpos mamilares, dado que las distintas zonas en las que se divide (parte anterior, media y posterior) presentan una pérdida celular diferente, siendo

más pronunciada en la parte posterior (30.1%) que en la media (22.4%) y anterior (8.3%).

Otro de los factores que influyen es el **tamaño neuronal**, ya que estudios desarrollados por Harper y Kril (1989) en el **Córtex frontal** de humanos han puesto de manifiesto que las grandes neuronas de esta región se ven más afectadas cuantitativamente que las pequeñas, con lo que se sugiere la mayor vulnerabilidad de las primeras.

También hay que tener presente el papel que pueda desempeñar el **tiempo de exposición al alcohol**. Así, en el **Córtex prefrontal** de rata, se observa que tras seis meses de exposición a la droga no se producen cambios cuantitativos, aunque después de 12 meses se detecta una reducción del 28% (Cadete-Leite y cols., 1990b).

Para los tres primeros tipos de exposición alcohólica comentados, la alteración de la citoarquitectura no es debida necesariamente a la muerte celular, sino que incluso podría venir motivada por interferencias con los procesos de generación neuronal (Dreosti y cols., 1981; Miller, 1988) o bien a la migración celular (Clarren y cols., 1978; Miller, 1986).

Por otra parte, independientemente de la administración empleada, parece ser que toda pérdida neuronal lleva asociada una disminución en el espesor de las capas en las que se encuentren. Así al menos se apunta en todas las capas corticales del Cerebelo (Bauer-Moffett y Altman, 1977; Phillips y Cragg, 1982), capa granular del Girus dentado (Cadete-Leite y cols., 1988c), capas corticales prelímbicas I-III (Cadete-Leite y cols., 1990b), área 3 del **Córtex Somatosensorial** (Miller y Potempa, 1990) y capas granular interna, plexiforme externa y glomerular del **Bulbo Olfatorio** (Nyquist-Battie y Gochee, 1985).

Finalmente, el alcohol no sólo produce una alteración en el número de neuronas, sino que también afecta a las células gliales. Así, durante el periodo de rápido crecimiento se puede observar una reducción en el número de oligodendrocitos en el nervio óptico de rata (Phillips y Krueger, 1990). Sin embargo, estos mismos autores comprueban que esa reducción no es permanente, ya que se produce una recuperación con la edad. No obstante, en el Córtex frontal de humanos alcohólicos crónicos se produce un incremento en el número de células gliales, debido muy posiblemente a un proceso de gliosis (Harper y Kril, 1989).

## **1.2. Alteraciones morfológicas**

Aunque la pérdida neuronal es uno de los efectos inducidos por el alcohol más llamativos y aparentes, su acción también se ejerce a otros niveles neuroanatómicos. Así, los estudios experimentales a nivel del S.N.C. de roedores han mostrado que los árboles dendríticos están marcadamente alterados siguiendo un consumo abusivo de alcohol (Riley, 1977; Riley y Walker, 1978; Pentney, 1982; Tavares y cols., 1983a, b; Cadete-Leite y cols., 1988c; Durand y cols., 1989). No obstante, el patrón y la extensión de esas alteraciones difieren según la región nerviosa y el tipo celular estudiado.

Dicha alteración da lugar a una disminución de la longitud dendrítica, y de forma general una reducción de la extensión y ramificaciones de los árboles dendríticos, así como un retraso en la maduración y densidad de las espinas dendríticas (Hammer y Scheibel, 1981; Davies y Smith, 1981; McMullen y cols., 1984; Fabregues y cols., 1985; Ferrer y cols., 1986; Smith y cols., 1986; Ferrer y Galofré, 1987; Galofré y cols., 1987; Pentney y Quigley, 1987).

Se ha podido comprobar que la edad del animal en el momento del tratamiento es un factor crucial en la determinación de la vulnerabilidad



dendrítica al daño inducido por el alcohol (Pentney, 1982). Asimismo, parece probable la existencia de una vulnerabilidad regional al encontrarnos con regiones nerviosas, como el Córtex Prelímbico, que no se ven afectadas ni cualitativa ni cuantitativamente (Cadete-Leite y cols., 1990b).

También cabe reseñar una reducción del diámetro nuclear. Estudios desarrollados en los cuerpos mamilares de ratones sometidos a un consumo crónico, demuestran que dicha reducción acompaña a la pérdida neuronal. Además, el diámetro nuclear es menor allí donde la pérdida de células es más pronunciada (Lescaudron y cols., 1984). Sin embargo, en zonas nerviosas como el Hipocampo, Cerebelo o Girus dentado, no se detectan cambios (Lescaudron y Verna, 1985; West y cols., 1986; Bonthius y West, 1990).

En las neuronas granulares del Cerebelo y en algunas neuronas del Córtex, lo que se observa es una reducción en el área de los perfiles neuronales, motivada por diferencias en el tamaño y en la forma de sus somas (Bauer-Moffett y Altman, 1977; Borges y Lewis, 1983a; Smith y cols., 1986; Harper y Kril, 1989). Asimismo, en el área 3 del Córtex Somatosensorial, se produce una reducción del tamaño de los cuerpos celulares (Miller y Potempa, 1990), así como una disminución de la razón área del cuerpo celular/neuropilo. De esta forma, se deduce un incremento del neuropilo en aquellas zonas corticales sometidas a la acción del alcohol.

Desde el punto de vista ultraestructural también parece confirmarse alteraciones inducidas por el alcohol. Así, cuando las células de Purkinje del Cerebelo se exponen prenatalmente al alcohol, se produce una reducción del Retículo Endoplasmático rugoso y su distribución en pequeños fragmentos cercanos al núcleo, así como una reducción del Aparato de Golgi, número de mitocondrias y de polirribosomas (Spohr y Stoltenburg-Didinger, 1985; Mohamed y cols., 1987). Igualmente se observa, en las dendritas de esas

mismas células una disminución en el número de microtúbulos (Smith y Davies, 1990).

Otro de los cambios provocados por el alcohol es el que da lugar a una disminución significativa en el número de poros nucleares por unidad de volumen celular y en el número total de poros por núcleo, como se pone de manifiesto en las células piramidales del Hipocampo (Andrade y cols., 1988). Además, en las neuronas del Córtex parietal se puede detectar la presencia de inclusiones intranucleares (Volk y Maletz, 1985).

También se han descrito alteraciones en el sistema lisosomal, como se demuestra en las neuronas cerebelares (Tavares y Paula-Barbosa, 1983; Tavares y cols., 1985), en las células piramidales del Hipocampo (Borges y cols., 1986) y en el Córtex Prefrontal de rata (Cadete-Leite y cols., 1988a). En estas zonas, los lisosomas primarios de los animales alcoholizados se transforman más tempranamente en gránulos residuales de lipofucsina, dando lugar a un aumento de su tamaño, número y complejidad.

Para finalizar, las células gliales que se encuentran en las proximidades de las células de Purkinje y células piramidales CA1 del Hipocampo, sufren un aumento de los procesos gliales, lo que da lugar a un incremento en la cantidad de glia total (Popova y Shchekalina, 1980; Smith y Davies, 1990). Dado el papel estructural y metabólico que desempeñan las células gliales, se piensa que las alteraciones inducidas por el alcohol a este nivel contribuyen al daño cerebral y producen las disfunciones nerviosas características del Síndrome Alcohólico Fetal (Smith y Davies, 1990).

### **1.3. Alteración del desarrollo neuronal**

El efecto del alcohol también da lugar a un desarrollo anormal de las neuronas; efecto que se lleva a cabo a nivel de la madurez celular. A este

respecto, la exposición prenatal da lugar a un retraso en la diferenciación y maduración de las células de Purkinje (Volk y cols., 1981; Mohamed y cols., 1987). Esto se debe a que la neurogénesis de estas células se completa antes del nacimiento, mientras que su diferenciación y maduración habría de tener lugar postnatalmente (Altman, 1969, 1972).

En el vermis del Cerebelo, la exposición postnatal determina diferencias en el estado de maduración de las neuronas de Purkinje, lo que provoca que dichas células presenten distinta morfología (Altman, 1969, 1972; Bonthius y West, 1990). En este sentido, Bonthius y West (1990) observan que aquellas células que presentan una maduración normal poseen un gran soma con un núcleo bastante prominente, mientras que aquellas otras inmaduras disponen de soma irregular con un núcleo polimórfico y periférico. Esta inmadurez también viene marcada por la existencia de conos citoplasmáticos de crecimiento (Bonthius y West, 1990).

Estos últimos autores describen que las células de Purkinje se segregan en el vermis cerebelar de acuerdo con el tamaño y la forma, y, por consiguiente, según el estado de maduración. Bauer-Moffett y Altman (1975, 1977) establecieron la hipótesis según la cual las células de Purkinje que se encuentran en un estado de diferenciación más avanzado son más vulnerables al daño producido por el alcohol que aquellas otras menos diferenciadas. Esta idea es reforzada por los trabajos de Bonthius y West (1990 y 1991a), en los que se pone de manifiesto una mayor pérdida celular permanente en aquellas zonas donde las células de Purkinje fueron más maduras en el momento de la exposición alcohólica, que en aquellas otras menos diferenciadas.

Por otra parte, el alcohol también tiene un importante efecto sobre la maduración de las células gliales. Al menos así lo confirman los estudios desarrollados por Phillips y Krueger (1990), a nivel de los oligodendrocitos, en

los que se detecta un retraso. Esta alteración del estado de madurez podría estar relacionada con un retraso en la formación de la mielina en los axones del nervio óptico (Phillips, 1989). Estudios desarrollados por Samorajski y col. (1986) vienen a confirmar la existencia de esta hipomielinización, aunque consideran que es debida a sucesos regresivos tales como la muerte celular y la eliminación de las sinápsis.

También hay que tener presente la influencia que pueda tener el alcohol sobre la migración celular (Kornguth y cols., 1979; Borges y Lewis, 1983b). Se ha observado que la exposición alcohólica prenatal produce un enlentecimiento en el proceso de migración de las células granulares del Cerebelo (Kornguth y cols., 1979). En humanos, tras el consumo materno de alcohol, se produce una migración desordenada de neuronas y células gliales en el cerebro (Clarren y Smith, 1978), así como una disposición heterogénea en el Córtex cerebral (Ferrer y Galofré, 1987).

Se ha apuntado la posibilidad de que este proceso de migración celular sea el responsable de la reducción final de los elementos constituyentes de las poblaciones celulares e incluso de su incremento (Borges y Lewis, 1983a; West y cols., 1986). Se considera que dicha alteración viene motivada por una disminución en los niveles de tiroxina (Kornguth y cols., 1979), aunque también se ha sugerido lo contrario (Borges y Lewis, 1981).

#### **1.4. Alteración de la sinaptogénesis**

El efecto del alcohol a nivel de la sinaptogénesis parece ser variable. Así, la administración perinatal del alcohol puso de manifiesto un retraso de la sinaptogénesis en el Cerebelo. Por el contrario, en otras zonas se pone de manifiesto una mínima o ninguna influencia sobre dicho parámetro (Burns y cols., 1984; Druse y cols., 1986; Hoff, 1988), aunque sí parece llevar consigo un retraso en el turnover sináptico, tal y como se ha observado en el Girus

Dentado, donde se puede apreciar una alteración de las sinapsis complejas y contactos sinápticos múltiples (Hoff, 1988).

El turnover sináptico, que es el principal agente que contribuye al mantenimiento de la homeostasis del S.N.C., consiste en una remodelación sináptica y desconexión de contactos ya existentes para ser reemplazados por otros y en otro lugar (Nieto-Sampedro y cols., 1982). Así, este proceso podría proporcionar el mecanismo por el que el S.N.C. llevaría a cabo un ajuste de sus circuitos en respuesta a las necesidades de adaptación y supervivencia impuesta por los animales (Hoff, 1988).

Por su parte, en el Hipocampo, el consumo crónico de alcohol produce una disminución de la densidad numérica de las sinapsis entre las fibras musgosas y las células piramidales CA3, tras 18 meses de exposición (Cadete-Leite y cols., 1989). Los contactos sinápticos presentan una apariencia normal, aunque se observa un incremento significativo en el porcentaje de la zona de plasmalema ocupado por las condensaciones postsinápticas de las fibras musgosas.

El Córtex Prefrontal también revela cambios en la organización estructural, ya que acompañando a la reducción en el número de neuronas se observa un incremento en la densidad numérica de las sinapsis e incluso de la relación sinapsis/neurona. Esta relación es más elevada cuanto mayor es el periodo de exposición al alcohol (Cadete-Leite y cols., 1990b).

### **1.5. Alteración del sistema neurotransmisor**

Los ensayos neuroquímicos experimentales en el Síndrome Alcohólico Fetal han mostrado alteraciones en varios sistemas neurotransmisores durante el desarrollo del S.N.C. (Branchey y Friedhoff, 1973; Thadani y cols., 1977; Detering y cols., 1980; Slotkin y cols., 1980), como es el caso del sistema

Dopaminérgico, GABAérgico, Noradrenérgico y Serotoninérgico.

El sistema Dopaminérgico parece ser particularmente vulnerable durante el periodo prenatal (Lucchi y cols., 1983), produciendo una hipofunción de dicho sistema. De esta forma, por la acción del alcohol a nivel de los receptores de Dopamina, podría mediar el efecto de la droga sobre la hipotermia (Hoffman y Tobakoff, 1977) y el sistema extrapiramidal.

Por otro lado, el sistema GABAérgico muestra una sensibilidad diferente. Al menos así lo confirman los estudios realizados sobre el consumo materno de alcohol durante la gestación y lactancia, en los que los niveles de GABA son muy diferentes según la región del cerebro que se considere. Así, mientras que en el Tálamo, Cerebelo e Hipocampo presentan una importante disminución en dichos niveles, en el Colículo Superior, Córtex Occipital, Córtex Temporal e Hipotálamo no se detectan cambios. Sin embargo, en el Córtex Frontal, Colículo Anterior y Bulbo Olfatorio se demuestra un considerable aumento (Ledig y cols., 1988). Parece ser que estas modificaciones podrían estar relacionadas con variaciones en la actividad  $ATP_{asa}$  involucrada en el transporte de neurotransmisores a través de la membrana neuronal, y por tanto asociado con los trastornos propios del Síndrome Alcohólico Fetal (Ledig y cols., 1988).

El sistema Noradrenérgico también resulta vulnerable al etanol, con efectos diferentes a nivel de sus receptores. Así, los receptores  $\alpha$  sufren muy pocas modificaciones en términos de afinidad por su ligando (Ciofalo, 1979; Lynch y Littleton, 1983). Por el contrario, los receptores  $\beta$  sufren una alteración más marcada, reduciéndose su número y la afinidad por el ligando (Saito y cols., 1986).

Finalmente, el alcohol también afecta al sistema Serotoninérgico, que al igual que en casos anteriores da lugar a un hipofuncionamiento de dicho

sistema (Murphy y cols., 1982; Lumeng y cols., 1986).

### **1.6. Hipótesis sobre la neurotoxicidad del alcohol**

Los mecanismos que son la base de la neurotoxicidad ejercida por el alcohol están aún poco comprendidos. Sin embargo, se han establecido varias hipótesis para intentar explicarlo. Una de ellas fue la propuesta por Cadete-Leite y cols. (1988a) basándose en sus propios resultados. Consideraron que las alteraciones inducidas por el alcohol podrían estar estrechamente relacionadas con cambios en la actividad del sistema lisosomal neuronal (Seil y cols., 1977; Freund, 1979; Chweh y Leslie, 1980; García y cols., 1981), como ocurre con el parénquima hepático bajo idénticas circunstancias (Mezey y cols., 1976, 1980; García y cols., 1981). Esta opinión queda soportada por la demostración de un depósito prematuro y progresivo de lipofucsina en las neuronas del Cerebelo y en las células piramidales del Hipocampo, así como cambios morfológicos cuantificables en los cuerpos multivesiculares de éstas últimas células (Tavares y Paula-Barbosa, 1983; Tavares y cols., 1985; Borges y cols., 1986; Paula-Barbosa y cols., 1986).

Otra hipótesis está basada en una inhibición de la biosíntesis de proteínas, como consideran Rawat (1975) en fetos y neonatos, y Tewari y cols. (1980) en adultos. Estos autores sugieren que el efecto neurotóxico del alcohol podría ser el resultado de cambios en los procesos de transcripción del ARN y de su metabolización ulterior. Estos procesos alterados determinan como consecuencia una síntesis protéica reducida (Tewari y Noble, 1971, 1979; Noble y Tewari, 1975; Tewari y cols., 1980, 1981). Goldman y cols. (1973) añadieron que también se debía a alteraciones en el flujo sanguíneo cerebral que conducía a una isquemia crónica.

Se pudo comprobar en condiciones patológicas y experimentales que los cambios en el metabolismo del ARN, síntesis de proteínas e isquemia

crónica, interferían en la integridad morfofuncional de la membrana nuclear y con el número de poros nucleares.

Por su parte, Kornguth y cols. (1979) también consideraron la alteración de la síntesis de proteínas como factor neurotóxico, aunque sugirieron que dicha síntesis vendría afectada por una reducción en la concentración de tiroxina en suero inducida por el etanol, con lo que subsecuentemente se alteraría la maduración neuronal y sus síntesis posteriores.

### **1.7. Recuperación de los parámetros afectados**

Aun cuando la acción del alcohol da lugar a efectos aparentes y llamativos, no siempre éstos resultan permanentes, sino que en muchos casos se pueden invertir tales efectos dando lugar a la consiguiente recuperación.

En lo referente al número de neuronas, la respuesta a su recuperación parece desigual. Así, se ha podido poner de manifiesto la existencia de una relativa recuperación del número de células granulares del Bulbo Olfatorio después de varios días del cese de la administración del alcohol, aunque sin llegar a alcanzar los niveles normales (Bonthius y West, 1991b). Este hecho parece deberse a que la producción de células granulares del Bulbo Olfatorio puede continuar durante la vida de adulto del animal (Rosselli-Austin y Altman, 1979; Bayer, 1983; Kaplan y cols., 1985). Por tanto, en términos de neurogénesis, la población de células granulares del Bulbo Olfatorio tiene un periodo más largo en el que poder recuperar sus parámetros que otras neuronas con un periodo de neurogénesis menor. Sin embargo, parece que no es esto lo que ocurre en el caso de las células granulares hipocampales y neuronas corticales prelímbicas de roedores. En ambos casos, después de dejar recuperarse varios meses animales sometidos a un consumo abusivo



de alcohol, no sólo no aumenta el número de neuronas, sino que incluso se observa una pérdida celular aún mayor (Cadete-Leite y cols., 1988b, 1990b). Esto sugiere que los mecanismos que son la base de la degeneración neuronal inducida por el alcohol continúan actuando, según algunos autores, después de su retirada, contribuyendo a producir profundas alteraciones en la estructura nerviosa (Cadete-Leite y cols., 1988b).

Para el caso del árbol dendrítico, parece existir una variabilidad en lo referente a su recuperación posterior. En este sentido, en las células piramidales hipocampales se encuentra un árbol basal disminuido que muestra una recuperación en términos de frecuencia de ramificación basal proximal y número de espinas dendríticas en zonas apicales secundarias y dendritas basales (McMullen y cols., 1984; Ferrer y cols., 1988). En las neuronas piramidales del Córtex Somatosensorial se encuentra también una recuperación de las espinas dendríticas dañadas (Galofré y cols., 1987).

En el caso de las células granulares del Hipocampo, también parece producirse una recuperación de la longitud dendrítica hasta niveles normales, como mecanismo compensatorio a su incremento observado durante la administración del alcohol.

Por contra, las neuronas piramidales prefrontales no mostraron signos de recuperación, ya que el número de dendritas basales, número de segmentos dendríticos y longitud dendrítica total, sufrió una reducción en los animales recuperados. Ello parece deberse a un empobrecimiento adicional de la arborización dendrítica tras el cese del consumo crónico de alcohol (Cadete-Leite y cols., 1990a).

Finalmente, las sinápsis tampoco mostraron ningún signo de recuperación en número. En este sentido, en las capas corticales prelímbicas I-III de los animales recuperados se detectó un número de sinapsis mayor que

en los alcoholizados, así como un incremento en la relación sinapsis/neurona (Cadete-Leite y cols., 1990b).

### **1.8. Las $\beta$ -endorfinas y su papel como marcadores biológicos del alcoholismo**

El estudio de los opioides endógenos, su localización y función, se ha hecho cada vez más predominante en las investigaciones sobre la adicción alcohólica (Cox, 1986; Schwartz, 1986). Dentro de este sistema opioide destacan por su gran importancia las  $\beta$ -endorfinas, cuya distribución en el sistema nervioso central se localiza principalmente en un grupo celular hipotalámico de la zona tuberal con proyecciones ascendentes largas al septum ventral, al núcleo accumbens y al núcleo paraventricular del tálamo. Fibras descendentes de este sistema endorfínico penetran en el tronco encefálico y llegan a la sustancia gris periacueductal, al locu coeruleus y a la formación reticular (Bloom y cols., 1978; Watson y cols., 1978; Enna y Yamamura, 1980).

La función de las  $\beta$ -endorfinas, además de actuar como neurotransmisores y/o neuromoduladores en el hipotálamo, es la de actuar como hormona circulante. Resulta liberada, con toda probabilidad, a partir de la glándula pituitaria, donde aparece en cantidades abundantes. Además, el líquido cefalorraquídeo contiene también  $\beta$ -endorfina, la cual puede modular la actividad nerviosa en grupos de neuronas accesibles (McLoughlin y cols., 1981).

Desde el descubrimiento de los opioides endógenos y de sus receptores, son muchos los autores que han investigado la relación entre el sistema de péptidos opioides y el alcohol. A partir de tales estudios se ha sugerido que el alcohol podría ejercer alguno de sus efectos a través del sistema opioideo, lo cual podría explicar los procesos de dependencia

alcohólica. Aunque existen algunas discrepancias, la mayoría de los autores piensan que el mecanismo de interferencia del alcohol con la antedicha vía endógena consiste en la formación de sustancias similares a la morfina (conocidas como Tetrahydroisoquinolonas ó TIQs) procedentes de la unión entre el acetaldehído y la dopamina (neurotransmisor, con altos niveles en sujetos alcohólicos).

Dentro de los antedichos estudios sobre la relación entre el consumo crónico de alcohol y los péptidos opioides, habría que destacar aquellos en los que se ha puesto de manifiesto un descenso en las concentraciones plasmáticas de  $\beta$ -endorfinas en sujetos alcohólicos (Aguirre y cols., 1990, 1991; Rico Irles y Gil Extremera, 1990). Parece ser que este descenso de  $\beta$ -endorfinas podría deberse a un efecto del alcohol sobre los niveles del ARNm que codifica el péptido opioideo, niveles que se ven reducidos tras exposición crónica (Topel, 1988).

El descenso de  $\beta$ -endorfina nos hace pensar en la posibilidad de que en individuos alcohólicos crónicos los niveles del opioide endógeno estuvieran bajos en condiciones basales, lo cual predispondría a estos individuos al alcoholismo (Rico Irles y Gil Extremera, 1990). La importancia de estos datos radica en el hecho de poder encontrarnos frente a un auténtico *marcador biológico* de los grupos de riesgo del alcoholismo. En este sentido, si se demuestra que los hijos de alcohólicos crónicos muestran también bajos niveles de  $\beta$ -endorfina, podríamos predecir los grupos de riesgo expuestos al alcoholismo con mayor probabilidad que el resto de la población que no ingiere alcohol (Rico Irles y Gil Extremera, 1990). A este respecto, experiencias llevadas a cabo con animales de laboratorio parecen confirmar las ideas anteriores. Tales estudios demuestran que los niveles de  $\beta$ -endorfina en la glándula pituitaria de ratas expuestas prenatalmente a alcohol es significativamente más baja que en el caso de los animales control.

Por consiguiente, de confirmarse esta hipótesis indicaría la presencia de un factor genético inductor de respuestas neuroquímicas que podrían ser utilizadas como potenciales marcadores diagnósticos o factores de predicción y supondría un enorme salto adelante en los esfuerzos por combatir la enfermedad alcohólica.

## 2. EL NUCLEO GENICULADO LATERAL

### 2.1. El Sistema Visual de mamíferos

El Sistema Visual de mamíferos está constituido por tres centros básicos: **la retina** (estación inicial), **el cuerpo geniculado lateral** (estación de relevo) y **la corteza visual** (estación final). Estas estructuras nerviosas son dobles, apareciendo representadas tanto en el hemisferio derecho y como en el izquierdo.

En la retina nos encontramos las células fotorreceptoras (conos y bastones), que son las que previa excitación fótica van a originar los impulsos nerviosos. Estos fotorreceptores conectan con otros tipos neuronales (células bipolares) hasta llegar finalmente a las células ganglionares, donde empiezan las vías nerviosas ópticas, ya que sus axones se reúnen para constituir el nervio óptico.

Los nervios ópticos van a sufrir un cruce parcial en la base anterior del diencefalo, constituyendo lo que se conoce como quiasma óptico. El antedicho cruce no afecta por igual a todas las fibras nerviosas que forman parte del nervio, sino que unas se van a ver afectadas en mayor grado que otras. De esta manera, se ha comprobado que las fibras de las mitades nasales son las más involucradas en el cruzamiento.

Constituido ya el quiasma, el conjunto de fibras encaminadas hacia el cuerpo geniculado lateral se denomina tracto óptico. Las fibras cruzadas y no cruzadas de los tractos ópticos llegan a distintas zonas del NGLd homolateral, donde establecerán conexiones sinápticas con las distintas neuronas que forman parte de él.

Por consiguiente, las células ganglionares del lado derecho de cada

ojo, que reciben las imágenes de la zona izquierda del campo visual, proyectan sus axones hacia el Núcleo Geniculado Lateral del hemisferio lateral derecho; por su parte, las células ganglionares del lado izquierdo, lo hacen al del hemisferio de su mismo lado.

El NGL está constituido por dos porciones: la dorsal (NGLd) y la ventral (NGLv). Ambas porciones no parecen cumplir la misma función primordial (Holcombe y Guillery, 1984), ya que si bien el primero está exclusivamente relacionado con las vías ópticas, el segundo, aunque también forma parte del proceso visual, se encuentra mayoritariamente implicado en el control motor.

De cada uno de los dos NGLd, las llamadas células de relevo de dichos núcleos van a originar un haz fibroso genículo-cortical o radiación óptica (Gratiolet, 1854), por donde discurren los axones de las neuronas. Dicho haz de fibras va a transmitir la información hasta la corteza cerebral visual. Las fibras van a establecer a ese nivel conexiones con las células corticales, que constituyen los centros de procesamiento. Cada núcleo se proyecta sobre las áreas visuales homolaterales (Minkowski, 1913; Putnam, 1926; Waller y Barris, 1937; Wilson y Cragg, 1967).

Tanto las proyecciones que desde la retina se dirigen hacia el NGL como las que salen de éste y finalizan en la corteza visual, se encuentran topográficamente organizadas. En el primer caso, estudios realizados en gato demuestran que los axones del ojo derecho terminan en células de la capa central del núcleo, mientras que los del ojo izquierdo lo hacen en capas situadas por encima o por debajo de la capa central (Shatz, 1988). En el segundo caso, las partes anterior y posterior del NGL se proyectan, respectivamente, sobre las regiones anterior y posterior del área visual.

Por otra parte, las evidencias parecen apuntar al hecho de que cada punto del campo visual corresponde a una línea en el NGLd y que un área

pequeña se corresponde con un volumen columnar. Este concepto fue introducido por Bishop y cols. (1962) mediante estudios electrofisiológicos en el gato. Observaron que estimulando eléctricamente pequeñas regiones de la retina se activaban "columnas celulares" en el NGLd. Bishop y cols. utilizaron el concepto de "líneas de proyección" para hacer referencia a las líneas geniculares de igual representación de puntos del campo visual. Más tarde, anatómicamente y fisiológicamente, se confirmó la existencia de esas "líneas de proyección" en el conejo (Rose y Malis, 1965) y en la mayoría de los mamíferos (Kaas y cols., 1973).

## **2.2. Aspectos organizativos del Núcleo Genuculado Lateral dorsal**

El NGLd establece conexiones con otros centros. Para demostrar este hecho, así como el que el NGLd es la estación de relevo fundamental del Sistema Visual de mamíferos, se han utilizado diferentes tipos de técnicas entre las que cabe destacar la de degeneración, autorradiografía y la de inmunofluorescencia, y más recientemente el marcaje con Peroxidasa de rábano picante (HRP).

En lo relativo a las relaciones entre el NGLd y la corteza visual, el empleo de métodos de degeneración y marcaje con HRP o isótopos radiactivos ha puesto de manifiesto la existencia de una vía genículo-cortical (Polyak, 1957; Rose y Malis, 1964; Lund y cols., 1974; Giolli y cols., 1978; Sefton y cols., 1981; Towns y cols., 1982), y de una proyección desde el Córtex hacia el NGLd (Montero y Guillery, 1968; Hölander, 1970, 1972, 1974; Guillery, 1966, 1971; Szentágothai, 1973; Rosenquist y cols., 1974; Hamori y cols., 1974). La vía genículo-cortical, siguiendo la pauta de proyección retino-geniculada, se proyecta tópicamente en la corteza visual. Se ha sugerido incluso que las proyecciones córtico-geniculadas también se organizan de tal forma que cada punto de la corteza visual envía fibras al lugar desde el que recibe aferencias, aunque no se disponen aún de datos concluyentes que

evidencien esta interconexión recíproca punto a punto (Beresford, 1962; Garey y cols., 1968; Holänder y Martínez-Millán, 1975). No obstante, sí se ha podido comprobar el hecho de que la vía cortico-geniculada ejerce una inhibición de tipo "feed-back" sobre el núcleo diencefálico.

El NGLd se organiza en láminas. Dicha laminación resulta aparente en determinados mamíferos, mientras que en otros casos (roedores) la apariencia del núcleo resulta homogénea (sin laminación). En el gato, por ejemplo, se ha descrito una laminación constituida por cuatro capas denominadas como A, A1, C y C1 (Guillery, 1970). Las capas A y A1 tienen una apariencia similar y están constituidas por células de diverso tamaño, pero mientras que la capa A recibe aferencias contralaterales, la A1 lo hace de aferencias ipsilaterales. Por su parte, las capas C y C1 también reciben aferencias retinales contralaterales e ipsilaterales, pero mientras que la lámina C está formada por neuronas grandes y recibe fibras retino-geniculares relativamente gruesas, la C1 está constituida por neuronas pequeñas y recibe fibras también más pequeñas.

En primates, las láminas aparecen numeradas, de 1 a 6, desde la parte ventral hasta la dorsal. En este caso, mientras que las láminas 1 y 2 están constituidas por células grandes (magnocelulares), las 3-6 presentan células pequeñas (parvocelulares). Una organización similar es característica del hombre (Kahle y cols., 1977).

Por lo que respecta al NGLd del conejo, su estructura resulta de una obvia simplificación cuando realizamos una comparación con los casos anteriores. En efecto, se trata de un núcleo no laminado que recibe impulsos ópticos casi exclusivamente (90-95%) desde el ojo contralateral (Giolli y Guthrie, 1969; Sanderson, 1975). Aún no existiendo laminación, la utilización de técnicas de tinción como el Nissl, permite establecer una subdivisión del NGLd en dos sectores ( $\alpha$  y  $\beta$ ) (Rose y Malis, 1965), que difieren en la



aparición citoarquitectónica y en la naturaleza de la reacción retrógrada producida por lesiones en el córtex visual primario.

El sector  $\alpha$  es subdividido en dos porciones: una porción externa ( $\alpha_E$ ) de células relativamente pequeñas y empaquetadas, y una porción interna ( $\alpha_I$ ) de células más grandes y espaciadas (Holcombe y Guillery, 1984). El sector  $\alpha$  rodea lateral y posteriormente un campo fibroso, que contiene grandes neuronas espaciadas y que se conoce como sector  $\beta$ . Schober y cols. (1985) opinan que en el conejo, el sector  $\beta$  se constituye debido a que las fibras de la radiación óptica atraviesan la zona.

La aplicación de técnicas de degeneración y autorradiografía permiten conocer la distribución de las proyecciones retino-geniculadas en el NGLd del conejo, poniendo de manifiesto que la mayor parte del sector  $\alpha$  recibe aferencias desde el ojo contralateral. Las aferencias ipsilaterales tienden a concentrarse en la región posteromedial, justamente entre los sectores  $\alpha_E$  y  $\alpha_I$ , donde forman una zona de aspecto oval o cuneiforme.

Debido a la dificultad de identificar el sector  $\beta$  (Rose y Malis, 1965) en secciones frontales y sagitales, y la gran cantidad de fibras que lo atraviesan, se hace complicado el observar si este sector recibe aferencias desde la retina y si éstas son cruzadas o no. Giolli y Guthrie (1969) fueron capaces de trazar fibras retinogeniculadas que degeneraban en el sector  $\alpha$ , pero no en el  $\beta$ , lo que nos viene a indicar que este último sector no recibe "inputs" retinales directos. Este hecho podría ser utilizado como base para rechazar el que sea considerado como una parte de relevo primario desde la retina hasta el Córtex. Sin embargo, utilizando autorradiografía, Sanderson (1975) y Takahashi y cols. (1977), tras inyección monoocular de aminoácidos radiactivos, encontraron un cierto nivel de marcaje en el sector  $\beta$ , aunque resultaba mucho más bajo que el existente en el  $\alpha$ . Esto permitió concluir que ambos sectores recibían una entrada retinal y que podrían ser considerados

como dos partes distintas de un mismo relevo geniculado. No obstante, conviene aclarar que el transporte transneuronal podría producir un marcaje por difusión en zonas que no reciben una entrada directa desde la fuente primaria marcada (Grafstein y Laureno, 1973; Wiesel y cols., 1974). Posteriormente, la HRP y el microscópio electrónico muestran axones retinogeniculados en el sector  $\alpha$ , pero no en el  $\beta$  (Guillery y cols., 1988).

### **2.3. Elementos estructurales del NGLd**

Desde el pasado siglo, en el que Ramón y Cajal describe la morfología de las células nerviosas del NGLd del conejo, se dispone de las primeras informaciones acerca de los elementos estructurales del núcleo talámico. Ya en el presente siglo, Tello (1904) diferencia tres tipos de neuronas según su tamaño, tras la aplicación de los métodos de Golgi y Nissl en el núcleo del gato y del conejo. Asimismo, también advierte que cada uno de esos tipos celulares muestra una forma distinta. Actualmente, los conocimientos existentes permiten afirmar que los elementos estructurales que forman parte del NGLd son similares en todos los mamíferos.

Empleando los métodos de Nissl y Golgi-Cox, Taboada (1927) observa que las neuronas exhiben una forma variable, considerando que ello se debe a la distinta orientación que presentan y que todas ellas podrían constituir un único tipo. Sin embargo, trabajos desarrollados con posterioridad parecen confirmar que en el NGLd de mamíferos se pueden distinguir al menos dos poblaciones celulares. Su catalogación se hace en función de las características funcionales y morfológicas, tales como la velocidad de reacción, tamaño celular, distribución en el núcleo talámico, particularidades de los procesos dendríticos, características de los axones, etc.

Son muchas las clasificaciones que se han realizado en el NGLd de mamíferos, como las de Grossman y cols. (1973), Rafols y Valverde (1973),

Schober y Brauer (1973) o las de Guillery (1966, 1971). En el caso del conejo, animal utilizado en el presente trabajo, el método de Golgi permite establecer una clasificación de las neuronas en tres tipos: dos de relevo y uno de interneuronas (Caballero y cols., 1986).

Las neuronas de relevo tálamo-cortical del tipo 1 del conejo aparecen distribuidas por las regiones intermedias y más mediales del núcleo. El pericarion de estas células presenta una forma apiramidada o elipsoidal, con tamaños más grandes en las regiones más mediales. Su árbol dendrítico se expande en un radio de 135  $\mu\text{m}$  y siguiendo el modelo planar descrito por Ramón-Moliner (1962). Presentan 4 ó 5 dendritas principales de superficie generalmente lisa. Estas dendritas se ramifican en 3 ó 4 de segundo orden de superficie rugosa y con apéndices aislados y cónicos o tallos lobulados. A su vez, estas dendritas divergen en 2 ó 3 de tercer orden con apéndices cónicos. El modelo de ramificación dendrítica es *en penacho*, característica habitual de las neuronas de relevo tálamo-cortical (Ramón-Moliner, 1962).

El significado de los distintos tipos de apéndices que aparecen en estas neuronas fue aportado por Wong-Riley (1972) y Lund y Cunningham (1972), quienes consideran que los apéndices dendríticos aislados por un tallo lobulado en su extremo, constituirían lugares de terminación de los axones de las células ganglionares de la retina, que también podrían terminar en los agrupamientos varicosos próximos a los puntos de ramificación de las dendritas. Por lo que respecta a los apéndices cónicos presentes en los segmentos terminales de las dendritas de tercer orden, serían sitios de terminación de las fibras de proyección córtico-genicular (Guillery, 1969; Lund y Cunningham, 1972).

Las neuronas de relevo tálamo-cortical del tipo 2 se distribuyen principalmente en las regiones externas del sector  $\alpha$ . Su árbol dendrítico, al igual que las tipo 1, se expande según el modelo planar, y es más profuso,

aunque de menor extensión. Presenta 4 ó 5 dendritas principales de superficie lisa, de cuyos troncos surgen 2, 3 ó 4 dendritas de segundo orden, pudiendo ramificarse de nuevo. En los lugares próximos a los puntos de ramificación de las dendritas aparecen agrupamientos de apéndices característicos. En el conejo, las neuronas de tipo 2 son menos abundantes que las de tipo 1, aunque en primates se describe la situación contraria (Wong-Riley, 1972).

El papel que desempeñan los agrupamientos de apéndices característicos de las neuronas del tipo 2 parece ser el de elementos postsinápticos primarios de asociaciones sinápticas complejas. Estas últimas fueron descritas por primera vez por Szentágothai (1963), a las que denominó glomérulos, por su similitud con los existentes a nivel de los complejos sinápticos cerebelares.

Las interneuronas o neuronas del tipo 3 presentan un pericarion esferoidal del cual parten 6 ú 8 dendritas principales de superficie lisa, que divergen en 2 ó 3 de segundo orden. Son habitualmente largas si no se ramifican, aunque pueden hacerlo en otras de tercer orden. En su conjunto, el árbol dendrítico se expande radialmente entre los 125  $\mu\text{m}$  y los 160  $\mu\text{m}$ . Estas neuronas intrínsecas del núcleo geniculado se caracterizan por la presencia de apéndices dendríticos relativamente grandes y de forma muy variada, que aparecen en las dendritas de segundo y tercer orden. Algunas de estas neuronas presentan un segmento inicial axónico que se origina a partir de tronco dendrítico.

Desde el punto de vista fisiológico las neuronas del NGLd se pueden clasificar en dos grupos: células "P" (principales) o de relevo tálamo-cortical y células "I" o interneuronas (Bishop y cols., 1953; Sakakura, 1968; Famiglietti y Peters, 1972; Cleland y cols., 1976; Ogawa y cols., 1981).

Las células P proyectan mayoritariamente al al área 17 y 18 del córtex

estriado. Pueden dividirse a su vez en células "Y" ó de excitación rápida, y células "X" ó de excitación lenta, en función del tipo de respuesta que muestren ante la estimulación eléctrica (Fukuda y cols., 1973; Stone y Dreher, 1973; Fukuda y Sugitani, 1974; Derrington y Fuchs, 1979; So y Shapley, 1979, 1981).

Se puede distinguir un tercer tipo de célula principal con un umbral de estimulación más bajo que el de las "X" e "Y". Estas células, denominadas tipo "W", se identificaron en un principio en la lámina C y C1 del gato y más tarde en otros mamíferos (Wilson y Stone, 1975; Wilson y cols., 1976; Stanford y cols., 1981; Sur y cols., 1981; Sur y Sherman, 1982).

Las células "I" o interneuronas, con axones intrínsecos, cumplen la función de regular el NGLd, inhibiendo a las células de relevo cuando de produce una sobrecarga de estimulación. Se ha intentado establecer una clasificación de estas células en función del tipo de respuesta ante la excitación eléctrica. En este sentido, los estudios de Sherman y Friedlander (1988) muestran que desde el punto de vista fisiológico, las propiedades de las interneuronas son similares a las que presentan las células de relevo X. En base a ello, dichos autores afirman que las interneuronas están directamente inervadas por axones retinogeniculados X. Sin embargo, hasta la fecha no se dispone de evidencias que confirmen la existencia de la vía Y.

Existe una gran discrepancia por lo que respecta al porcentaje ocupado por los dos tipos celulares del núcleo. Por lo general, parece darse un predominio de células de relevo sobre interneuronas. Los estudios de Sherman y Friedlander (1988) en la lámina A del gato, parecen confirmar alrededor de un 25% de interneuronas y un 75% de neuronas de relevo.

## **2.4. Aferencias y distribuciones sinápticas en el NGLd**

Un paso previo para conocer la fisiología del NGL es el de determinar el origen de sus aferencias, los lugares de terminación de las mismas, así como las conexiones interneuronales que se establecen dentro del núcleo. En lo referente a las aferencias, existe un doble origen: axones de células ganglionares retinales y axones corticales de las áreas 17 y 18 (córtex visual).

La parte final de las aferencias forman los terminales sinápticos, que son los que van a realizar múltiples contactos. En el NGLd se han establecido tres tipos de terminales: RLP, RSD y F.

### **a) Terminales RLP**

Los RLP o terminales retinales se originan a partir de las células ganglionares retinales. Se trata de terminales relativamente grandes (2-4  $\mu\text{m}$ ), de contorno bastante irregular y que contienen numerosas vesículas redondas, entre las que se encuentran esparcidas unas pocas más grandes de centro denso a los electrones. En el interior del terminal aparecen varias mitocondrias (de 3 a 10 por perfil) con una matriz de baja densidad electrónica (Guillery, 1969; Wong-Riley, 1972; Rafols y Valverde, 1973; Szentágothai, 1973; Hajdu y cols., 1982; Carmona y cols., 1990b). Estos RLP establecen contactos sinápticos asimétricos con dos tipos de procesos: (1) dendritas de células de relevo, identificables por la presencia de ribosomas, y (2) dendritas presinápticas de interneuronas ó F2, que contienen vesículas sinápticas pleomórficas y carecen de ribosomas (Famiglietti y Peters, 1972; Fitzpatrick y cols., 1984; Hamos y cols., 1985; Montero, 1986). Todos los terminales RLP son exclusivamente presinápticos (Le Vay, 1971; Wong-Riley, 1972). Asimismo, entre los terminales RLP y las dendritas, además de los propios contactos sinápticos, es frecuente observar otro tipo de contactos denominados filamentosos (Colonnier y Guillery, 1964), que carecen de todo

significado sináptico (Carmona y cols., 1990b). Se trata de zonas de 1  $\mu\text{m}$  de longitud, con un material denso a los electrones entre las membranas pre- y postsinápticas, que se observan próximas a los lugares donde se establecen los contactos sinápticos.

La aplicación de HRP en el tracto óptico de rata, puso de manifiesto, por transporte anterogrado, dos tipos de axones retinales (Brauer y cols., 1988): 1) Axones tipo 2a, que aparecen en el tercio caudal del NGLd, con un origen a partir de células ganglionares retinales de clase I; y 2) Axones tipo 2b, que aparecen en los dos tercios rostrales y proceden de las células ganglionares de clase II y III. Ambos tipos de axones retinales se diferencian en el tamaño de sus botones, así como en el número de botones por arborización axonal en las zonas ramificadas terminales.

#### **b) Terminales RSD**

Los RSD o terminales corticales tienen su origen mayoritario en las áreas corticales (Robson, 1983). Se trata de terminales relativamente pequeños que presentan vesículas sinápticas esféricas, estrechamente empaquetadas, que ocupan la mayor parte del terminal. Suelen carecer de mitocondrias, aunque cuando aparecen tienden a mostrar una matriz densa a los electrones. Los terminales RSD establecen contactos asimétricos casi exclusivamente con dendritas, aunque en unos pocos casos también lo hacen con perfiles F (Guillery, 1969; Le Vay, 1971; Wong-Riley, 1972; Rafols y Valverde, 1973; Szentágothai, 1973; Lieberman y Webster, 1974; Wilson y Hendrickson, 1981; Carmona y cols., 1990b).

#### **c) Terminales F**

Los terminales F son perfiles presinápticos de tamaño intermedio entre los RLP y RSD. Contienen vesículas pleomórficas y el GABA es el principal

neurotransmisor que liberan (Le Vay y Ferster, 1979; Fitzpatrick y cols., 1984; Montero y Zempel, 1985; Montero, 1989). Es posible reconocer dos tipos distintos de perfiles F: los F1 y los F2 (Guillery, 1969; Le Vay, 1971; Wong-Riley, 1972; Ralston y Chow, 1973; Szentágothai, 1973; Hajdu y cols., 1982).

Los perfiles F1 son terminales axónicos de interneuronas (Guillery, 1969; Famiglietti y Peters, 1972; Ralston y Chow, 1973; Szentágothai, 1973). Se caracterizan por: 1) presentar vesículas ovaladas que ocupan la mayor parte del perfil; 2) aparecer en asociación con mitocondrias de matriz relativamente densa; y 3) observar en su interior unas pocas cisternas de REL y microtúbulos. Todos ellos son considerados como terminales presinápticos.

Por su parte, los perfiles F2 tienen su origen en los apéndices dendríticos de las interneuronas (Le Vay, 1971; Famiglietti y Peters, 1972; Rafols y Valverde, 1973; Ralston y Chow, 1973; Lieberman y Webster, 1974; Hajdu y cols., 1982). Presentan vesículas pleomórficas que no suelen llenar todo el terminal y que aparecen rodeadas por una matriz citoplasmática más clara y carente en la mayoría de los casos de mitocondrias, aunque pueden existir cisternas de REI. En cuanto a su relación con el resto de perfiles neuronales, pueden ser presinápticos con dendritas o bien postsinápticos con terminales RLP, RSD, F1 y F2.

Tanto en los perfiles F2 como en los F1 se pudieron observar algunas vesículas de centro denso y una zona periférica más clara (Contamina y cols., 1988).

En cuanto al sector  $\beta$ , se sabe que carece de terminales retinales, y que contiene otros que se denominan RLD. Los terminales RLD son relativamente grandes, contienen vesículas esféricas que establecen contactos sinápticos de tipo asimétrico con dendritas de tamaño intermedio o grande (Guillery y cols., 1988) y difieren de los retinales por presentar



mitocondrias con una matriz densa a los electrones. En el gato se ha demostrado que los terminales RLD corresponden a colaterales axónicas de neuronas de relevo (Ide, 1982; Guillery y cols., 1988), sin embargo en el conejo se desconoce su origen.

Por lo que se refiere a las distribuciones sinápticas en el NGL, un aspecto de gran interés es la relación establecen los terminales RLP y los perfiles postsinápticos con los que contacta (dendritas de células de relevo y F2). Los RLP pueden establecer contactos con un único perfil dendrítico o bien estar rodeados por varios perfiles axónicos y dendríticos, formando estructuras polisinápticas encapsuladas denominadas *glomérulos* (Szentágothai, 1963; Rapisardi y Miles, 1984). Se trata de zonas libres de todo citoplasma astrocítico en su interior, que normalmente aparecen rodeados por procesos gliales. La morfología que presentan estos glomérulos en el conejo es bastante variada. Nos podemos encontrar desde zonas altamente complejas formadas por muchos perfiles y con un terminal RLP como elemento predominante, hasta glomérulos formados por un solo terminal RLP, un solo perfil F2 y una dendrita (normalmente el elemento principal). En esta relación triádica, el terminal F2 es postsináptico a un RLP y presináptico, en una unión simétrica, a una dendrita de célula de relevo. Esta dendrita es al mismo tiempo postsináptica con el anterior terminal RLP (Colonnier y Guillery, 1964; Hamori y cols., 1974; Guillery y cols., 1988).

### **3. METODOLOGIA ESTEREOLOGICA**

#### **3.1. La Estereología**

La Estereología y su particular atención al análisis de imagen representan no sólo un nuevo instrumento fiable y necesario para la obtención de datos, sino también el conjunto de métodos actuales que permiten una nueva forma de ver e interpretar los perfiles de los objetos que constituyen nuestra fase de interés. Efectivamente, siempre que estamos interesados en interpretar una imagen microscópica nos enfrentamos con la dificultad de pasar desde lo que nos ofrece una imagen plana bidimensional hasta su realidad tridimensional. Nuestra primera intención es interpretar cualquier imagen plana como una proyección, aunque en la mayoría de los casos con ello se incurra en error. Si de lo que se trata es de obtener información de una estructura y de sus distintas fases constituyentes, el problema que se plantea es aún más complejo.

La problemática que se nos plantea es la correcta interpretación de secciones planas obtenidas a partir de una estructura. Dicha problemática queda encuadrada dentro del campo de la Estereología.

Como definición de Estereología podemos decir que se trata de una ciencia reciente que utiliza una serie de técnicas, medios y métodos, fundamentalmente geométrico-estadísticos, y cuya finalidad es la de obtener información tridimensional de objetos que ofrecen difícil acceso, a partir de imágenes bidimensionales (Williams, 1977).

Dentro de lo que la Estereología, existen algunos conceptos de uso frecuente, que vamos a introducir a continuación. Así, cuando hablamos de **estructura**, se entiende por tal algo que está constituido de partes independientes y que presentan un patrón de organización definido. Esas

partes constituyentes de la estructura reciben el nombre de **componentes**. Por otra parte, al agregado de componentes de naturaleza idéntica se le llama **fase**. Si los componentes son elementos discretos separables se habla de **objetos** o **partículas**. Finalmente, la **sección** viene definida como el resultado de la intersección entre un plano y una estructura, mientras que el **perfil** es la imagen bidimensional que de ella se obtiene.

En un sentido estadístico, los métodos estereológicos deben de cumplir dos características: ser **insegados** (que los resultados no se desvíen de forma sistemática del valor verdadero) y **fiables** desde la técnica y observación (con escasa variabilidad después de transcurrir un intervalo moderado de tiempo). Williams (1977) clasifica los métodos estereológicos en dos grupos: métodos de reconstrucción y métodos estrictamente matemáticos. Los primeros tienen su base en el empleo de secciones seriadas, mientras que los segundos son métodos que tienen su fundamento en la aplicación de las matemáticas. No obstante, empleando una visión menos restrictiva, se puede decir que en la práctica son una mezcla de ambos procedimientos, puesto que, realmente, lo que se hace es reconstruir la dimensión que se nos escapa (la tercera) y empleamos las fórmulas matemáticas.

Como característica adicional de los métodos de los que se sirve la Estereología, las mediciones se obtienen habitualmente como medidas relativas. Esto quiere decir que se trata de una relación de al menos dos juegos de mediciones: uno relativo a los componentes y otro a la estructura.

Cuando realizamos un estudio estereológico, podemos centrar nuestra atención en la estructura o en el objeto. En determinadas ocasiones nos interesa caracterizar tridimensionalmente la estructura en sí misma mediante la estimación de los parámetros de estructura. Otras veces, nuestro interés se centrará solamente en los objetos contenidos en la estructura, recurriendo

a los parámetros de objetos. El interés por determinar estos parámetros fue impulsado por el desarrollo de la Estereología cuantitativa o conjunto de métodos puramente matemáticos (Underwood, 1970).

### **3.2. Volumen de la estructura contenedora**

La forma de proceder al cálculo del volumen de la estructura contenedora es diferente según sea macroscópica o microscópica.

#### **3.2.1. Estructura contenedora macroscópica**

El método más simple para medir el volumen de una estructura macroscópica es el **principio de Arquímedes o desplazamiento de agua**. Se trata de llenar una probeta con agua o una solución tampón hasta un determinado nivel ( $V_1$ ), sumergimos el órgano y obtenemos  $V_0$  como la diferencia existente entre el nuevo volumen  $V_2$  del fluido y el volumen original.

$$V_0 = V_2 - V_1$$

Para órganos grandes se emplea el método alternativo del **desbordamiento**, consistente en llenar un vaso de agua hasta que rebosa la primera gota, sumergimos el órgano y lo sacamos. A continuación, se completa el vaso y anotamos el volumen de líquido necesario para que rebosa nuevamente la primera gota.

Un método con el que se consigue una mayor precisión es el de **inmersión de Scherle** (1970). Consiste en colocar sobre una balanza un recipiente con un volumen determinado de tampón o solución salina isotónica al que se le toma su peso. A continuación, se sumerge completamente la

estructura u órgano, con el debido cuidado de que no toque la pared del recipiente ni el fondo, y se pesa de nuevo. La diferencia entre este último peso y el primero nos da el peso del fluido desplazado. Si además se conoce el peso específico del fluido, el volumen de la estructura se obtiene por

$$V_0 = \frac{W_0}{g}$$

donde  $V_0$  es el volumen ocupado por el órgano;  $W_0$  es el peso del fluido desplazado por el órgano; y "g" es el peso específico de la solución salina isotónica.

Dado que el peso específico de la solución salina isotónica es de 1.0048 (valor por aproximación de 1), se puede despreñar "g" y establecemos el valor del volumen como  $V_0 = W_0$ .

### **3.2.2. Estructura contenedora microscópica**

En muchos casos resulta imposible aplicar cualquiera de los métodos anteriormente descritos dado el pequeño tamaño de las estructuras referenciales de interés o bien debido a su difícil aislamiento. Para calcular el volumen de estas estructuras se recurre al método de Cavalieri. Este autor demostró que el volumen de cualquier objeto se puede estimar a partir de secciones paralelas separadas por una distancia conocida (t), sumando las áreas (a) de todas las secciones y multiplicando este valor por t.

$$V_{(objeto)} = t \times \sum a_{(perfiles)}$$

Delesse (1847) fue el primero en abordar el problema de la determinación del volumen de un sólido, utilizando para ello el método de Cavalieri. Lo que hizo fue seccionar sólidos de formas irregulares en series de cortes de grosor conocido, medir el área de esos cortes y multiplicarla por su grosor. A continuación, la suma de estos resultados parciales le permitía obtener el volumen de los sólidos problema.

Rosiwal (1898) utilizó el método de integración lineal para el cálculo de volúmenes, consistente en la obtención de una imagen por la proyección de un corte, sobre la que se coloca una plantilla transparente que presenta una serie de líneas de muestreo dibujadas. A continuación, se mide la longitud de los segmentos incluidos en el perfil del corte. Dicha longitud se relaciona con un valor determinado de área para el corte en cuestión. Finalmente, por el método de Cavalieri se obtiene el volumen.

Asímismo, se puede estimar el volumen de una estructura mediante el recuento de puntos aleatorios, como demostraron Thomson (1930) y Glagolev (1933). Para ello colocamos una plantilla de puntos. Como cada punto lleva asociado un área, en función del número de puntos incluidos en el perfil del corte, se la relaciona con un área para el corte considerado.

Unos métodos más exactos que los vistos hasta ahora son los de planimetría, consistentes en determinar la superficie de los cortes histológicos mediante el planímetro. El primer paso que hay que dar para conseguirlo es dibujar sobre un papel el contorno de las secciones histológicas de la estructura en cuestión. Para ello nos podemos servir de la ayuda de :

- a) La imagen ofrecida por fotografías aumentadas de las secciones que queremos valorar.
- b) La cámara clara.

- c) La proyección de las secciones histológicas con aumentos suficientes.
- d) Los procesadores semiautomáticos de imagen.
- e) Los procesadores automáticos de imagen.

### **3.3. Determinación del número de células**

Durante los últimos años se han utilizado gran variedad de métodos dirigidos a determinar la densidad neuronal en las diferentes regiones del sistema nervioso. Tales métodos han variado históricamente desde los consistentes en el recuento de neuronas a partir de fotografías aumentadas de secciones histológicas (Von Economo y Koskinas, 1925; Bouman, 1928), el recuento en cámaras hemocitométricas partiendo de homogenados de tejido (Heller y Elliot, 1954), el empleo de microfotómetros que tiene en cuenta la densidad óptica de los cortes histológicos teñidos (Ryzen, 1956), hasta el uso de los analizadores de imagen.

Los métodos más exactos son aquellos que llevan a cabo el recuento directamente sobre la imagen proporcionada por el microscopio. Existen dos técnicas de recuento directo:

- a) *Técnica de proyección.* Se trata de proyectar la imagen de una sección histológica sobre una pantalla subdividida en cuadrados de un área determinada. Los recuentos neuronales se realizan sobre cada uno de los cuadrados (Bianchi, 1942; Sullivan y cols., 1958; Escobar y cols., 1968).
- b) *Técnicas micrométrico-oculares.* Es la técnica de recuento directo más utilizada y consiste en la utilización de una retícula

interpuesta en el ocular del microscopio. Con esta técnica los recuentos se llevan a cabo mediante observación directa en el microscopio, determinando el número de neuronas contenidas en la retícula y calculando la superficie de la retícula. Si además conocemos el grosor del corte, podemos establecer el número de neuronas por unidad de volumen (Königsmark, 1970; Haug, 1970, 1972).

Muchas veces nos encontramos con el problema de que el número de elementos que constituyen una estructura es tan elevado que se nos hace muy difícil el poder contarlos. Ello lo solventamos eligiendo una muestra representativa sobre la que poder llevar a cabo los recuentos. Por lo general, se considera que una muestra refleja la composición del material cuando tiene un coeficiente de variación no superior al 10-20% o cuando el intervalo de confianza al 95% no excede del 20% de su media.

La muestra elegida como representativa está constituida por paralelepípedos repartidos por todo el material de estudio. La distribución de los paralelepípedos se puede hacer de varias maneras. En base a ello, distinguimos tres tipos de muestreo:

a) *Muestreo simple al azar*. Las cuadrículas se sitúan de forma independiente por medio de números aleatorios.

b) *Muestreo sistemático*. Los paralelepípedos se espaciarán de una forma más o menos regular para evitar que queden muy próximos o incluso puedan superponerse. De esta manera, la muestra aparece bastante dispersa.

c) *Muestreo aleatorio estratificado*. El material se divide en estratos y cada uno de ellos se estudia de forma independiente,



aplicando en cada caso un muestreo simple aleatorio o sistemático según proceda.

En otro orden de cosas, la precisión de los métodos de recuento depende de dos factores de gran importancia:

1) *Grosor del corte*. Se suelen emplear cortes de hasta 25  $\mu\text{m}$ , aunque pueden ser más gruesos dependiendo de las características del material. Sin embargo, aún en estos casos se produce una sobreestimación del número real de partículas debido al grosor de la sección y al tamaño de la unidad de recuento (Efecto Holmes).

2) *Unidad de recuento*. En el tejido nervioso se pueden utilizar tres elementos neuronales de recuento: el soma, el núcleo y el nucléolo. Así, dado que cada neurona presenta un soma y un solo núcleo, podrían tomarse como representativos de la totalidad de la neurona. Sin embargo, resulta bastante más ventajoso el utilizar el nucléolo, ya que se reduce el error de la sobreestimación debido a su menor diámetro (Haug, 1967; Königsmark, 1970).

### **3.4. Los nuevos métodos estereológicos**

Para finalizar este apartado, hemos de hacer referencia a una serie de métodos estereológicos que se están desarrollando en la actualidad y cuyo objetivo primordial es simplificar los recuentos de partículas y, al mismo tiempo, hacerlos más fiables.

De momento, esta nueva metodología que está surgiendo plantea muchas dificultades a la hora de su aplicación a casos reales, pero

probablemente en los próximos años termine por imponerse a los métodos tradicionales. Entre estos nuevos métodos cabe citar el caso del disector, el fraccionador, el selector, el nucleador y el disector óptico.

### **3.4.1. El disector**

Este método fue sugerido por Sterio (1984) a partir de las ideas desarrolladas por Miller y Carlton (1895). El uso del disector requiere dos secciones histológicas paralelas: una sección de referencia y una sección de observación, separadas ambas por una distancia  $h$ , que debe de ser menor que la altura del elemento más pequeño recontado. De las dos secciones existentes, el recuento del número de partículas tan sólo se lleva a cabo en la de referencia.

La estimación del número total de partículas ( $N$ ) se realiza aplicando la expresión:

$$N = \bar{Q} \times \frac{V_{ref}}{h \times a}$$

donde  $\bar{Q}$  es el número de partículas identificadas en la sección de referencia;  $V_{ref}$  es el volumen del espécimen estudiado;  $h$  es la distancia que separa las secciones de referencia y de observación; y  $a$  es el área de la cuadrícula de muestreo.

Entre las ventajas que introduce este método estadístico cabe citar:

- 1) No es necesario tener en cuenta los problemas que de forma habitual están relacionados con el espesor de la sección, tal como el efecto Holmes.

$$est v = \left(\frac{\pi}{3}\right) \times \overline{l_0^3}$$

donde  $\pi/3$  es el coeficiente empleado en la estimación del volumen, y  $\overline{l_0^3}$  es la media de los cubos de las longitudes de intersección.

También nos permite estimar la densidad de volumen ( $V_v$ ) de la partícula en el espacio de referencia:

$$V_v = \frac{P_{(par)}}{P_{(ref)}}$$

donde  $P_{(par)}$  es el número de puntos contados que caen en todos los perfiles de las diferentes partículas, y  $P_{(ref)}$  el número de puntos que caen en el espacio de referencia.

Asímismo, la determinación de la densidad numérica se puede llevar a cabo por la aplicación de la expresión:

$$N_v = V_v \times \overline{V_N}$$

donde  $V_v$  es la densidad de volumen (fracción de volumen de la partícula ocupada por una fase concreta), y  $\overline{V_N}$  es el volumen medio de las partículas consideradas.

Si conocemos el volumen del espacio de referencia ( $V_{(ref)}$ ) el número de partículas se deduce directamente a partir de:

2) La estimación del número de partículas es independiente de la orientación que presenten.

### **3.4.2. El fraccionador**

Este estimador numérico fue descrito por Gundersen (1986), basándose para ello en las descripciones del disector. La idea básica del fraccionador es considerar una estructura entera (p.e. el cerebelo), donde queremos determinar el número de partículas que lo integran (p.e. las neuronas de Purkinje).

El primer paso a dar consiste en dividir el órgano de forma aleatoria en un número conocido de partes sobre las que se estima el número de partículas que lo constituyen. El siguiente paso consistiría en seccionar seriadamente cada una de dichas partes. A continuación, se escoge una fracción conocida del total de secciones consideradas, muestreadas de forma aleatoria, con sus respectivas secciones de observación. Finalmente, se procedería a efectuar el recuento del número de células presentes en cada una de las secciones muestreadas.

La eficacia en la aplicación del fraccionador va a depender de la homogeneidad de la densidad de las partículas en el espacio de referencia, de cualquier variación aleatoria en el tamaño de las piezas y del número de piezas que son muestreadas (Gundersen, 1986).

### **3.4.3. El selector**

Este método estereológico fue descrito por vez primera por Cruz-Orive (1987), y se trata en realidad de la combinación de dos principios: el disector y el principio de intersección punto-muestra. La estimación del volumen de una partícula se puede llevar a cabo aplicando la siguiente expresión:

$$est N = N_v \times V_{(ref)} =$$

$$= \left( \frac{V_v}{V_N} \right) \times V_{(ref)}$$

Entre las ventajas que presenta el selector cabe citar el hecho de que no es necesario conocer el espesor de las secciones, así como el que no se ve afectado por la retracción del espacio de referencia.

#### 3.4.4. El nucleador

Se trata de una nueva metodología estereológica que nos permite obtener una estimación insesgada del volumen medio de los objetos ( $v_N$ ) con la simple realización de intersecciones isotrópicas por medio de puntos de muestreo arbitrarios (Gundersen, 1988; Jensen y Gundersen, 1989). Si se muestrean  $n$  partículas, la estimación sería:

$$\overline{v_N} = \left( \frac{4\pi}{3} \right) \times \overline{l_n^3}$$

donde  $(4\pi/3)$  es el coeficiente empleado en la estimación del volumen, y  $\overline{l_n^3}$  es la media de los cubos de las longitudes de intersección.

El principio del nucleador tiene la dificultad de que sólo es aplicable al estudio de partículas que son fáciles de seleccionar como resultado de presentar alguna porción claramente distinguible. Este es el caso de los folículos ováricos o el de las cápsulas de Bowman con su ovillo globular de capilares ó glomérulo (Gundersen, 1988).

#### **3.4.5. El disector óptico**

Este método de recuento directo, considerado como el más eficaz disponible hasta la fecha actual, fue propuesto por Howard y cols. (1985). Deriva de una regla de recuento de partículas descrito por Gundersen (1977) para un espacio bidimensional, y adaptado a un espacio tridimensional. En la práctica, el disector óptico combina el principio del disector y el uso del confocal (una nueva técnica de microscopía óptica).

En el microscopio ordinario, la preparación histológica es iluminada de manera uniforme por el haz de luz, mientras que para el caso del confocal la iluminación se centra en un sólo punto de la muestra. Con posterioridad, una vez que la imagen es completamente explorada por el haz luminoso, va a ser reconstruida por medio del ordenador.

Entre las principales ventajas que introduce destaca el hecho de que nos permite mejorar la resolución de los microscopios ópticos tradicionales, así como el que evita los problemas relacionados con los procedimientos histológicos.

#### **3.5. Influencia del proceder técnico en el estudio estereológico**

Este capítulo finaliza con la mención de la importancia de la preparación de un material biológico a la hora de llevar a cabo estudios estereológicos. En este sentido, hay que evitar todo cambio en las dimensiones de los elementos tisulares ó, cuanto menos, cuantificar dicho cambio.

Las técnicas de fijación que se utilizan para microscopía óptica originan una retracción del tejido objeto de estudio (Stowell, 1941). Estos cambios en las dimensiones resultan difíciles de calcular y controlar, con lo

que se ha de intentar reducir tales variaciones al máximo posible empleando soluciones tamponadas de fijadores y el ajuste de la osmolaridad (Barnard, 1976; Mathieu y cols., 1978).

La deshidratación e inclusión también deben ser cuidadosamente escogidas y controladas. Se ha podido demostrar, por ejemplo, una dilatación de las células cuando la deshidratación se empieza con etanol de menos de 70°.

Finalmente, la cuchilla utilizada para seccionar el material debe de ser lo suficientemente buena como para evitar la compresión. Incluso, el papel de fotografía que se emplee puede experimentar una retracción motivada por los líquidos de revelado, dando lugar a una imagen distorsionada.

### **III. MATERIAL Y METODOS**



## **1. ASPECTOS PREVIOS A CONSIDERAR**

El primer paso dado para llevar a cabo el presente estudio fue programar y montar las experiencias que iban a permitirnos el desarrollar nuestro trabajo. Los animales de experimentación empleados fueron 12 conejos (*Oryctolagus cuniculus L.*) de la raza New Zealand, procedentes de la colonia de los Servicios Técnicos de la Universidad de Granada. Después del destete, los animales se alimentaron con pienso completo hasta los dos meses de edad, momento que sirvió como punto de partida para iniciar la experiencia.

Para llevar a cabo la programación del experimento hubo que tener en cuenta una serie de cuestiones metodológicas implicadas en el desarrollo de los modelos animales para el estudio de los efectos del consumo crónico de alcohol. Entre todas ellas cabe reseñar las siguientes:

- 1) **Elección del modelo animal.** La elección, en nuestro caso, del conejo responde a la simplicidad de su NGLd.
- 2) **Métodos de administración.** De los varios métodos existentes, nos inclinamos por el de administración del alcohol en el agua de bebida.
- 3) **Nutrición.** También hubo que tener en cuenta que las calorías que aporta el alcohol no tienen ningún valor nutricional. Aunque dichas calorías pueden satisfacer las necesidades calóricas corporales, el consumo de alcohol podría derivar en una desnutrición. Por esta razón, además de la solución alcohólica, los conejos fueron alimentados *ad libitum* con una dieta adecuada.

Los animales fueron mantenidos en jaulas individuales y debidamente aseados de manera regular por el personal laborante de los Servicios

Técnicos de la Universidad de Granada. Además, los conejos se mantuvieron bajo condiciones controladas de temperatura y humedad.

Nuestro principal objetivo era el realizar un adecuado estudio estereológico del NGLd del conejo, bajo condiciones normales e inducidas por el consumo crónico de alcohol. Para ello, los animales se dividieron en dos grupos, que se trataron como sigue:

- a) Un primer grupo de seis conejos al que se le administró etanol en el agua de bebida, al 30% en volumen, endulzada con sacarina sódica.
- b) Un segundo grupo de seis animales en el que se sustituyó el etanol por una solución azucarada isocalórica.

El porcentaje de la solución azucarada en el agua de bebida se calculó teniendo en cuenta que el valor calórico de 1 g de etanol equivale a 7 Kcal, mientras que el de 1 g de azúcar equivale a 4 Kcal. El uso de botellas calibradas nos permitió medir el consumo diario de las soluciones para los animales de ambos grupos, consumo que fue de alrededor de los 250 ml. La elección de este procedimiento de consumo voluntario con el que obtener conejos alcoholizados se debió a que estudios previos pusieron de manifiesto que los animales respondieron bien a la administración de etanol en el agua de bebida. Otros sistemas probados, como la administración mediante intubación esofágica o la inyección intraperitoneal se desecharon por el stress que se le produce al animal y por ser bastante laboriosas. Asimismo, se probó la administración de etanol en la dieta líquida, que proporciona también buenos resultados, pero que resulta más laborioso.

Para conseguir acostumbrar los animales a la solución alcohólica, se sometieron a un periodo de adaptación de dos a tres semanas durante las cuales se incrementó gradualmente la concentración de etanol, comenzando

con una solución al 5% en volumen y finalizando con la concentración deseada del 30%. Con esta última concentración del 30% en volumen, los conejos se mantuvieron durante los seis meses que duró la experiencia. Transcurrido este periodo de tiempo, los animales tratados con alcohol y los control se sacrificaron y se procesaron tal y como se expone en las siguientes secciones de este capítulo.

El consumo medio diario de etanol durante los seis meses del periodo experimental fue de 20 g/Kg de peso corporal; consumo similar al utilizado por otros autores (Lescaudron y cols., 1984; Beracochea y cols., 1987).

## **2.- MATERIAL DE ESTUDIO Y PROCEDERES TECNICOS EMPLEADOS**

Una vez programadas y montadas las experiencias y transcurridos los seis meses de exposición alcohólica, procedimos al sacrificio de los conejos, con objeto de obtener los NGLd, nuestro material de estudio. Dichos NGLd se procesaron hasta la consecución de secciones histológicas seriadas para microscopía óptica y electrónica.

El proceder técnico empleado en el procesamiento del material hasta la consecución de las secciones seriadas fue el que a continuación detallamos.

### **2.1. Perfusión**

Los conejos fueron perfundidos vía arteria carótida. Un paso previo fue la administración por vía intravenosa, a través de la vena marginal de la oreja, de 1 c.c. de Heparina al 5% (de función anticoagulante) y de 2 c.c. de dihidroergotoxina (de función vasodilatadora).

Después de dejar transcurrir varios minutos con objeto de que las soluciones hicieran su efecto, se procedió a anestésiar a los animales con una solución de Uretano al 20% en agua destilada, utilizando un volumen de 6 c.c. por cada Kg de peso corporal.

Seguidamente, se procedió a la perfusión propiamente dicha. Para ello, en primer lugar se hicieron pasar de 400 a 500 c.c. de una solución lavadora (solución salina al 0.9%) a la que previamente se le añadió 1 c.c. de dihidroergotoxina (Dihydergot) y 1 c.c. de Heparina, seguidos de 400 a 500 c.c. de una solución fijadora mezcla de Paraformaldehido al 2% y Glutaraldehido al 2.5%, a partes iguales. El flujo de perfusión, regulable por un sistema de goteo, fue de 60 gotas por minuto; la presión de perfusión,

controlada en todo momento mediante un manómetro acoplado al sistema, se mantuvo entre 100 y 110 mmHg. Los líquidos se perfundieron a una temperatura de 37° C.

Finalizada la perfusión, se extrajeron los encéfalos y de ellos se disecó el diencéfalo, del que se aisló en un bloque la porción que contenía los Núcleos Genuculados Laterales. Dicho material se procedió a procesarlo tanto a microscopía óptica como electrónica.

## **2.2. Microscopía óptica**

En este caso, se procesó el material según el método de Klüver-Barrera (Klüver y Barrera, 1953). Tras un lavado de las piezas con solución salina al 0.9%, se mantuvieron durante 5 días en formol salino al 10%.

Los pasos que se han seguido en el procesamiento del tejido nervioso fueron los que a continuación se exponen.

### **2.2.1. Fijación**

La fijación de los bloques que contenían los NGLd que iban a ser tratados por el antedicho método de Klüver-Barrera, requirió el empleo de tres fijadores diferentes, según el siguiente protocolo:

- 1) **Formol salino** al 10%, durante 5 días.
- 2) **A.F.A.** (Alcohol-Formol-Acético), durante 6 horas.
- 3) **CARNOY** (Alcohol-Cloroformo-Acético), durante 12 horas.

La solución fijadora de CARNOY se cambió por una nueva cada seis horas, dado que además de fijar también cumple una función de deshidratación.

Los pasos seguidos a la hora de preparar las tres soluciones anteriores, así como los componentes que las forman se detallan a continuación:

#### Formol salino al 10%

- NaCl ..... 9 g
- Completar hasta 1 L con formol al 10%

El formol al 10% se prepara a partir de formol comercial (solución al 40%). Antes de su utilización se neutraliza con carbonato magnésico ( $MgCO_3$ ). El pH final de la solución debe de estar comprendido entre  $7 \pm 1$ .

#### A.F.A.

- Formol (40%) ..... 5%
- Acido acético ..... 5%
- Etanol 70° ..... 90%

#### CARNOY

- Etanol 100° ..... 60%
- Cloroformo ..... 30%
- Acido acético ..... 10%

### 2.2.2. Inclusión

Concluida la fijación se procedió al lavado, durante 2 horas, de los bloques de tejido cerebral en una solución saturada de Carbonato de calcio en alcohol absoluto. Dicho lavado, que constituye un paso previo a la

inclusión, tiene como función principal eliminar la acidez producida por las soluciones fijadoras en el tejido.

La inclusión de los bloques que contenían los NGLd, llevada a cabo en parafina (Paraplast), siguió el siguiente programa:

- 1) Cuatro pasos consecutivos por Etanol 100°, de 6 horas cada uno de ellos. Los dos últimos pasos (tercero y cuarto) se realizan en presencia de Sulfato de cobre anhidro para eliminar el exceso de agua.
- 2) Un paso por una solución mezcla de Etanol 100°-Benzol (1:1, v/v).
- 3) Tres pasos consecutivos por Benzol, de 2 horas cada uno de ellos. El último paso se inicia a temperatura ambiente. Cuando reste una hora, el frasco que contiene el Benzol y el material se introduce en la estufa a 60° C. De este forma, el tejido va a ir alcanzando gradualmente la andicha temperatura, evitando con ello que se produzcan daños por efecto de un cambio brusco de temperatura.
- 4) Un paso por una mezcla de Benzol-Parafina (1:1, v/v) a 60° C de temperatura, durante una hora.
- 5) Tres pasos por parafina (60° C), durante doce horas cada uno de ellos.
- 6) Confección del bloque. Para ello se incluye el tejido en parafina y se deja enfriar. En el momento de la inclusión es muy importante que el bloque de material quede perfectamente orientado.

### **2.2.3. Corte**

Antes de proceder al corte en sí es aconsejable pegar los bloques de parafina a pequeños tacos de madera. A continuación, se tallan en tronco de pirámide de base trapezoidal, para finalmente pasar a la consecución seriada de cortes histológicos de 10  $\mu\text{m}$  de grosor mediante la utilización de un microtomo de parafina.

Los diversos bloques de material utilizados por el método de Klüver-Barrera fueron seccionados en tres direcciones: frontal y horizontal (con los que obtenemos los perfiles máximos de las neuronas, y tras las mediciones, los resultados cuantitativos equiparables (Droogleever Fortuyn, 1964; Carmona y cols., 1990a), y sagital.

Tras la consecución de los cortes seriados, se iban depositando ordenadamente en un baño de agua de agua destilada a 45° C para su estiramiento. A continuación, los cortes se recogían mediante portaobjetos y con la ayuda de un pincel. Para ello, era necesario que previamente se depositara y extendiera sobre el portaobjetos una gota de albúmina glicerizada de Mayer que asegurara la adhesión de los cortes.

Asímismo, con objeto de conseguir una correcta ordenación de los cortes y de los portaobjetos, se iba anotando sobre estos últimos con un lápiz de diamante el número de orden correspondiente.

### **2.2.4. Tinción**

Finalizada la consecución del corte seriado y tras ordenarlos debidamente en los portaobjetos, se procedió a la desparafinación de los cortes dando tres pasos consecutivos por Xilol. Este paso previo, junto con la tinción ulterior, se llevó a cabo en batería, utilizando canastillas de vidrio



y cristalizadores de Schiefferdecker, donde se colocan las distintas soluciones que nos van a permitir llevar a cabo el proceso de tinción.

Las soluciones colorantes y el proceso de tinción empleados durante esta fase son los que a continuación se especifican.

#### **2.2.4.a. Soluciones colorantes**

##### **Solución A**

- Luxol Fast Blue ..... 1 g.
- Etanol 95º ..... 1000 c.c.
- Acido acético (10%) ..... 5 c.c.

##### **Solución B**

- Cresil-Violeta ..... 1 g.
- Agua destilada ..... 1000 c.c.

Antes de utilizar esta segunda solución se adicionan unas 5 gotas de ácido acético al 10% por cada 30 c.c. de solución y, seguidamente, se filtra.

#### **2.2.4.b. Proceso de tinción**

Para llevar a cabo la tinción de los cortes seriados se siguieron los siguientes pasos:

- 1) Desparafinar los cortes. Dar varios pasos consecutivos por Xilol, de 10 minutos cada uno de ellos.
- 2) Inmersión de los cortes en una mezcla de Etanol 100º-Xilol (1:1, v/v), y, a continuación, en Etanol 95º, durante 5 ó 10 minutos.
- 3) Teñir durante 16 a 24 horas en la solución A, a una

temperatura de 55/60° C.

- 4) Sumergir los cortes en Etanol 95° y quitar el exceso de colorante.
- 5) Aclarar en agua destilada, durante 2 minutos.
- 6) Comenzar la diferenciación con rápida inmersión de los cortes en una solución de Carbonato de litio al 0.05%.
- 7) Continuar la diferenciación en Etanol 70° hasta que se pueda distinguir la sustancia gris y blanca.
- 8) Lavar en agua destilada.
- 9) Terminar la diferenciación con un breve aclarado en la solución de Carbonato de litio. Seguidamente, se dan varios cambios de Etanol 70° hasta que el azul verdoso de la sustancia blanca contraste netamente con la sustancia gris incolora.
- 10) Aclarar rápidamente en agua destilada.
- 11) Mantener las preparaciones sumergidas durante 6 minutos en la solución B, precalentando dicha solución a 55/60° C antes de usar.
- 12) Diferenciar en Etanol 95°. Dar varios cambios.
- 13) Deshidratar en Etanol absoluto dando varios cambios. Es aconsejable que el último de los pasos se realice en presencia de Sulfato de cobre anhidro con objeto de eliminar el exceso de agua que pueda existir.
- 14) Aclarar en Xilol, dando al menos dos cambios.
- 15) Montar (Eukit).

La utilización de esta técnica nos permite obtener una coloración de las vainas de mielina en azul o azul verdoso, debida al Luxol Fast Blue. El núcleo y los grumos de Nissl de las células nerviosas quedan teñidas de un color violeta o rosado por el Cresil-Violeta.

### **2.3. Microscopía electrónica**

Una vez concluida la perfusión, se extrajeron los encéfalos y se disecó el diencéfalo de los mismos, que se mantuvo durante 2 horas más en el mismo fijador utilizado durante la perfusión, a 4° C. Después se procedió a la extracción de cilindros de tejido nervioso de los Núcleos Genuculados Laterales. Para ello se utilizó una aguja hipodérmica sin bisel y de punta afilada. La aguja se colocó en la zona del diencéfalo que nos interesaba (NGLd), y que con una ligera presión se atravesaba completamente. Dado que el cilindro de tejido nervioso se quedaba en el interior de la aguja, con ayuda de una jeringa se inyectó solución fijadora para obtenerlos finalmente.

#### **2.3.1. Fijación de los cilindros**

Finalizada la extracción de los cilindros y previamente seccionados en varios trozos pequeños, se procedió a una fijación en Glutaraldehído al 3% en Tampón cacodilato 0.1 M a pH 7.4, a una temperatura de 4° C durante 2 horas.

Una vez concluida esta fase, se prosiguió con un lavado del material en el mismo Tampón durante 1 hora, renovándolo cada 10 minutos. Después, los cilindros permanecieron lavándose en Tampón durante una noche (10-12 horas).

Finalmente, se procedió a una post-fijación en osmio al 2% en Tampón cacodilato, durante 2 horas, llevándose a cabo la primera hora a temperatura de 4° C y la segunda hora a temperatura ambiente.

La preparación y composición de las distintas soluciones utilizadas durante la fijación del material se detallan a continuación.

### Tampón Cacodilato 0.1 M

- Cacodilato sódico ..... 11 g.
- Agua destilada ..... 500 c.c.
- Clorhídrico ..... 1.725 g.

Para ajustar la osmolaridad se añade además:

- NaCl ..... 0.250 g.
- Sacarosa ..... 8.558 g.

El pH de la solución final debe de ser de  $7.5 \pm 0.1$ .

El Glutaraldehido al 3% se prepara a partir de Glutaraldehido comercial (25%).

### **2.3.2. Inclusión**

Una vez concluida la fijación y post-fijación se procede al lavado del material, durante 2 horas, en Tampón cacodilato, dando cambios cada 15 minutos.

La inclusión del tejido nervioso se llevó a cabo en resina de Spurr. Dicha resina está formada por 4 componentes, que se mezclaron en las siguientes proporciones para obtener bloques de la dureza adecuada:

- ERL 4206 ..... 10.0 g.
- DER 736 ..... 6.0 g.
- NSA ..... 26.0 g.
- S-1 ..... 0.4 g.

Ha de prestarse una especial atención al componente S-1, ya que al tratarse del componente acelerador, un exceso del mismo podría modificar

las características de la resina en cuanto a su dureza.

El programa seguido hasta la consecución de los bloques de resina es el siguiente:

- 1) Acetona 30%, 30 minutos.
- 2) Acetona 50%, 30 minutos.
- 3) Acetona 70%, 30 minutos.
- 4) Acetato de Uranilo 2% en acetona de 70%, 8 horas.
- 5) Acetona 90%, 30 minutos.
- 6) Acetona 100%, 30 minutos.
- 7) Acetona 100% con Sulfato de cobre, 30 minutos.
- 8) Oxido de propileno, 30 minutos.
- 9) Oxido de propileno : Resina (3:1), 1 hora.
- 10) Oxido de propileno : Resina (1:1), 1 hora.
- 11) Oxido de propileno : Resina (1:3), 1 hora.
- 12) Resina pura, 12 horas.
- 13) Polimerización a 60° C, 16-18 horas.

### **2.3.3. Corte**

Concluido el proceso de polimerización y obtenidos los bloques de resina con el material incluido, se procede al tallado de los mismos con la ayuda de un piramitomo (11800 PYRAMITOME de LKB Bromma), y, a continuación, se procede a la obtención de cortes ultrafinos de entre 90-60 nanometros en un ultramicrotomo (ULTRACUT E de Reichert-Jung). Un paso previo aconsejable suele ser la consecución de cortes semifinos con la ayuda del piramitomo, o con el propio ultramicrotomo, para la visualización de la zona que estamos cortando y para conocer el estado del tejido cerebral.

Después de conseguir los cortes histológicos del espesor deseado y previo reagrupamiento con la ayuda de una pestaña, se recogieron en rejillas de cobre.

#### **2.3.4. Tinción**

El proceso de tinción y las soluciones colorantes que se utilizaron se especifican a continuación:

##### **2.3.4.a. Soluciones colorantes**

###### **Citrato de Plomo**

- Nitrato de plomo ..... 1.33 g.
- Citrato sódico ..... 1.76 g.
- Agua destilada hervida ..... 30 c.c.

Una vez adicionados, se deja disolver durante 30 minutos agitando cada 5.

- Hidróxido sódico 1N ..... 6.5 c.c.
- Completar hasta 50 c.c. con agua destilada.

Se agita suavemente la mezcla hasta conseguir que la solución quede totalmente transparente. El pH final debe de ser de  $12 \pm 0.1$  para que la solución pueda tener.

###### **Acetato de Uranilo**

- Acetato de uranilo ..... 2 g.
- Agua destilada ..... 1000 c.c.

El pH de la solución debe de estar comprendido entre 4 y 5.

#### **2.3.4.b. Proceso de tinción**

El proceso de tinción de las rejillas con los cortes a ellas adheridas fue el siguiente:

- 1) Un paso por Acetato de uranilo, durante 30 minutos.
- 2) Lavar dando tres pasos consecutivos por agua destilada, durante 20 segundos cada uno de ellos.
- 3) Dejar secar las rejillas al calor del flexo.
- 4) Un paso por Citrato de plomo, durante 20 minutos.
- 5) Lavar en agua bidestilada dando tres pasos consecutivos, durante 1 minuto cada uno de ellos.
- 6) Dejar secar.

### **3. DESCRIPCION DE LA TECNICA DE OBTENCION DE DIBUJOS.** **DETERMINACIONES VOLUMETRICAS**

Finalizada la consecución de las series de material pertenecientes a los Núcleos Genuculados Laterales procesados con el método de Klüver-Barrera para su observación a Microscopía Óptica, se procedió a la selección de las muestras sobre las que se obtuvieron los dibujos a partir de los que se llevaron a cabo las determinaciones volumétricas. Este proceder se siguió en los animales tratados con alcohol y en los utilizados como control.

Seleccionados los cortes, de cada uno de ellos se trazó el contorno del NGLd, se dibujó también el del diencéfalo, algunos otros detalles anatómicos visibles, así como el contorno de los capilares sanguíneos. De esta manera se consigue que los cortes queden alineados unos con respecto a otros, lo cual resulta imprescindible para la finalidad de los dibujos: delimitación de las zonas de estudio en los cortes integrantes de las series.

Todos los dibujos se hicieron en hojas de papel vegetal, utilizando para ello una cámara clara y con la ayuda del objetivo de 2.5X. El primer paso a dar en la consecución de los dibujos fue el de trazar en las antedichas hojas de papel vegetal, los ejes ortogonales que nos iban a permitir poder alinear los cortes, fijando una de estas hojas en el tablero de dibujo, lo que nos sirvió de referencia para dibujar toda la serie.

El siguiente paso consiste en proyectar con la cámara clara el primero de los cortes que constituye la muestra en el que aparece NGLd, y encuadrarlo con respecto al sistema de ejes de coordenadas dibujados con anterioridad en la hoja. Seguidamente, se fija una segunda hoja al tablero de dibujo haciendo coincidir sus ejes con los existentes en la primera. Finalizada esta operación, se procede a dibujar el corte incluyendo el perfil del Núcleo Genuculado Lateral de que se trate, así como todos los detalles anatómicos



que nos permitan la adecuada alineación de los dibujos. Este proceder se continúa con la proyección del siguiente corte haciéndolo coincidir lo más fielmente posible con el dibujo previamente realizado, utilizando los detalles anatómicos consignados en el dibujo para que los contornos del NGLd se ajusten de forma precisa. Seguidamente, se retira la hoja sobre la que se realizó el primer dibujo, se coloca una distinta haciendo coincidir sus ejes con los de la hoja que nos sirve de referencia y se dibuja el contorno del nuevo corte. Esta operación se repite tantas veces como cortes integren la muestra.

Concluida la consecución del dibujo, resulta recomendable que en cada una de las hojas de dibujo se realice la oportuna identificación, consignando el número de referencia del conejo de que se trate, el tratamiento (control o alcohol), si el NGLd dibujado es el derecho o el izquierdo, el número de orden dentro del total de los cortes que forman la serie, así como la distancia en micras al corte anterior y con respecto al primer corte de la serie.

#### **4. DELIMITACION DE LAS ZONAS DE ESTUDIO**

Antes de proceder a la delimitación en sí de las zonas de estudio hubo que tener presente que el primer paso a dar para poder llevar a cabo valoraciones de tipo cuantitativo es la obtención de una clara imagen cualitativa (Haug, 1972). En otras palabras, es necesario realizar una precisa delimitación de la zona a valorar, que en nuestro caso resultó ser el NGLd del conejo.

Paso previo a las valoraciones de tipo cuantitativo fue el estudio de los caracteres morfológicos del NGLd del conejo, donde el empleo del método de Klüver-Barrera para la microscopía óptica resultó de una gran importancia. La realización de tales estudios nos permitieron poder determinar con exactitud los sectores  $\alpha_E$ ,  $\alpha_I$  y  $\beta$ , descritos por Holcombe y Guillery (1984).

Cada uno de los antedichos sectores presentan características propias que permiten la distinción entre ellos, con lo que su delimitación requirió exhaustivo análisis morfológico del NGLd. En este sentido, el  $\alpha_E$  es un sector que se caracteriza por la presencia de poca abundancia de fibras y por la existencia de células relativamente empaquetadas. Por su parte, el sector  $\alpha_I$  presenta una mayor abundancia de fibras y células más espaciadas. Finalmente, el sector  $\beta$  constituye un campo fibroso que contiene grandes neuronas muy espaciadas.

Además de la clásica división del NGLd en los tres sectores  $\alpha_E$ ,  $\alpha_I$  y  $\beta$ , resultó conveniente subdividir los dos sectores mayoritarios ( $\alpha_E$  y  $\alpha_I$ ) en varias zonas de estudio. El sector  $\beta$  se estudió globalmente debido a su pequeño tamaño, que viene a representar aproximadamente el 10% del NGLd.

La subdivisión de los distintos sectores constituyentes en zonas de estudio se mantuvo en el análisis de todos los parámetros que sobre el

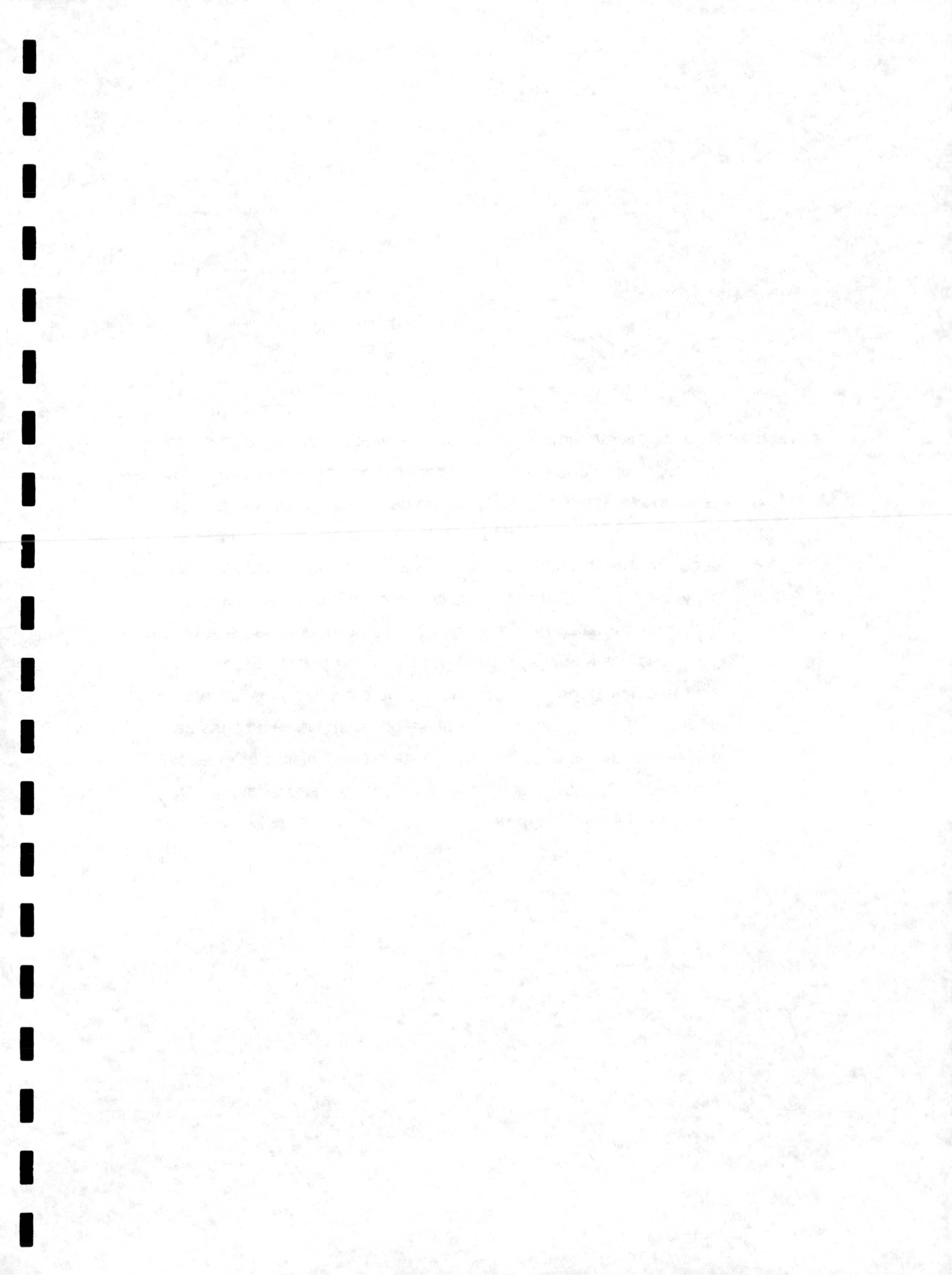
núcleo diencefálico y sus neuronas se llevaron a cabo.

Tal subdivisión en zonas se realizó una vez finalizada la consecución de los dibujos correspondientes a cada una de las series, y después del remarcaje de los contornos del NGLd, así como de la correcta situación topográfica de los sectores en los dibujos. El criterio empleado en esta acotación, representado en la **Figura 1**, fue el de dividir la proyección del sector  $\alpha$  en el eje Y en tres partes iguales mediante dos planos perpendiculares a dicho eje. Con este proceder conseguimos distinguir las zonas Superior (S), Media (M) e Inferior (I) (Carmona y cols., 1990a).

Por consiguiente, las seis zonas de estudio del NGLd que puso de manifiesto este procedimiento fueron: Sector  $\alpha_E$  Superior, Sector  $\alpha_E$  Medio, Sector  $\alpha_E$  Inferior, Sector  $\alpha_I$  Superior, Sector  $\alpha_I$  Medio y Sector  $\alpha_I$  Inferior, más el Sector  $\beta$ .

Para aquellos núcleos geniculados que habían sido seccionados según la dirección de corte horizontal, la delimitación de las zonas se logró tras conocer el número total de cortes que integraban el NGLd. Este número lo dividíamos en tres partes iguales, correspondiéndose cada una de dichas partes con una de las tres zonas (Superior, Media e Inferior).

En aquellos casos en los que los núcleos geniculados fueron seccionados frontal o sagitalmente, la delimitación de las zonas requirió el superponer los contornos de todos los NGLd sobre la misma hoja, en la que con anterioridad habíamos dibujado dos ejes perpendiculares. Obteníamos de esta manera una representación pseudotridimensional del NGLd, finalizada la cual, y después de obtener la proyección del núcleo en el eje Y, se procedió a dividir la longitud total del mismo en tres partes iguales.



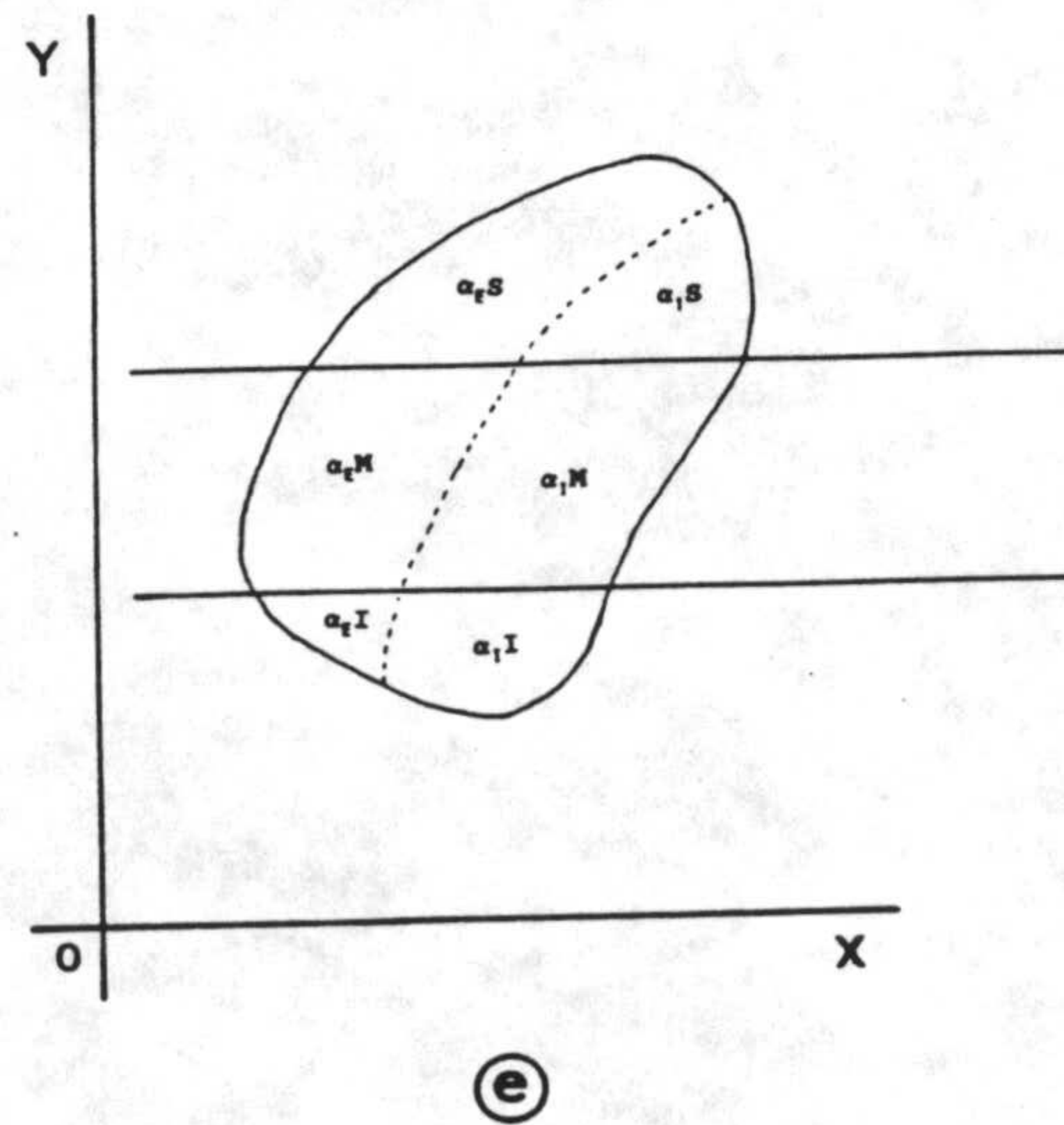
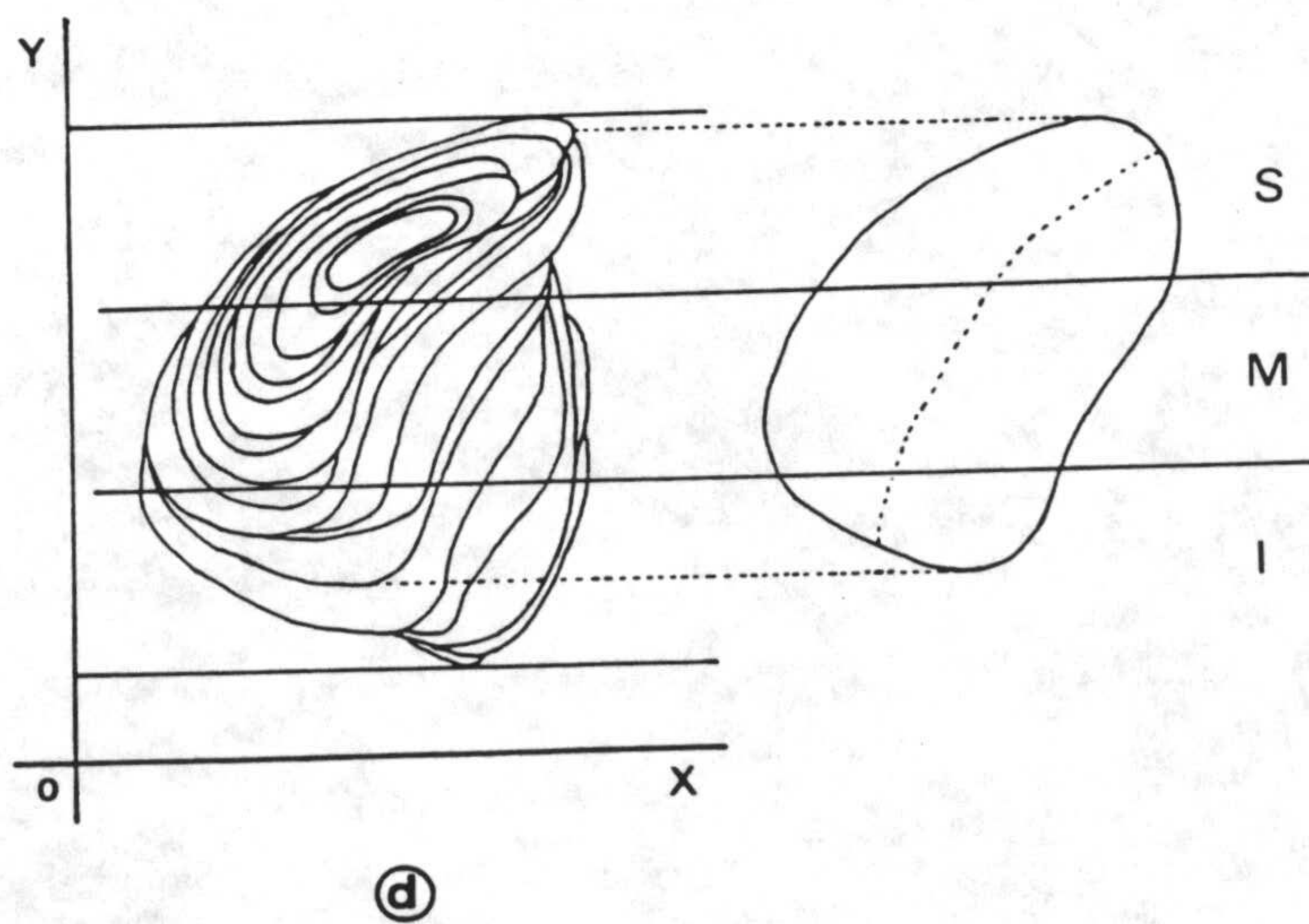
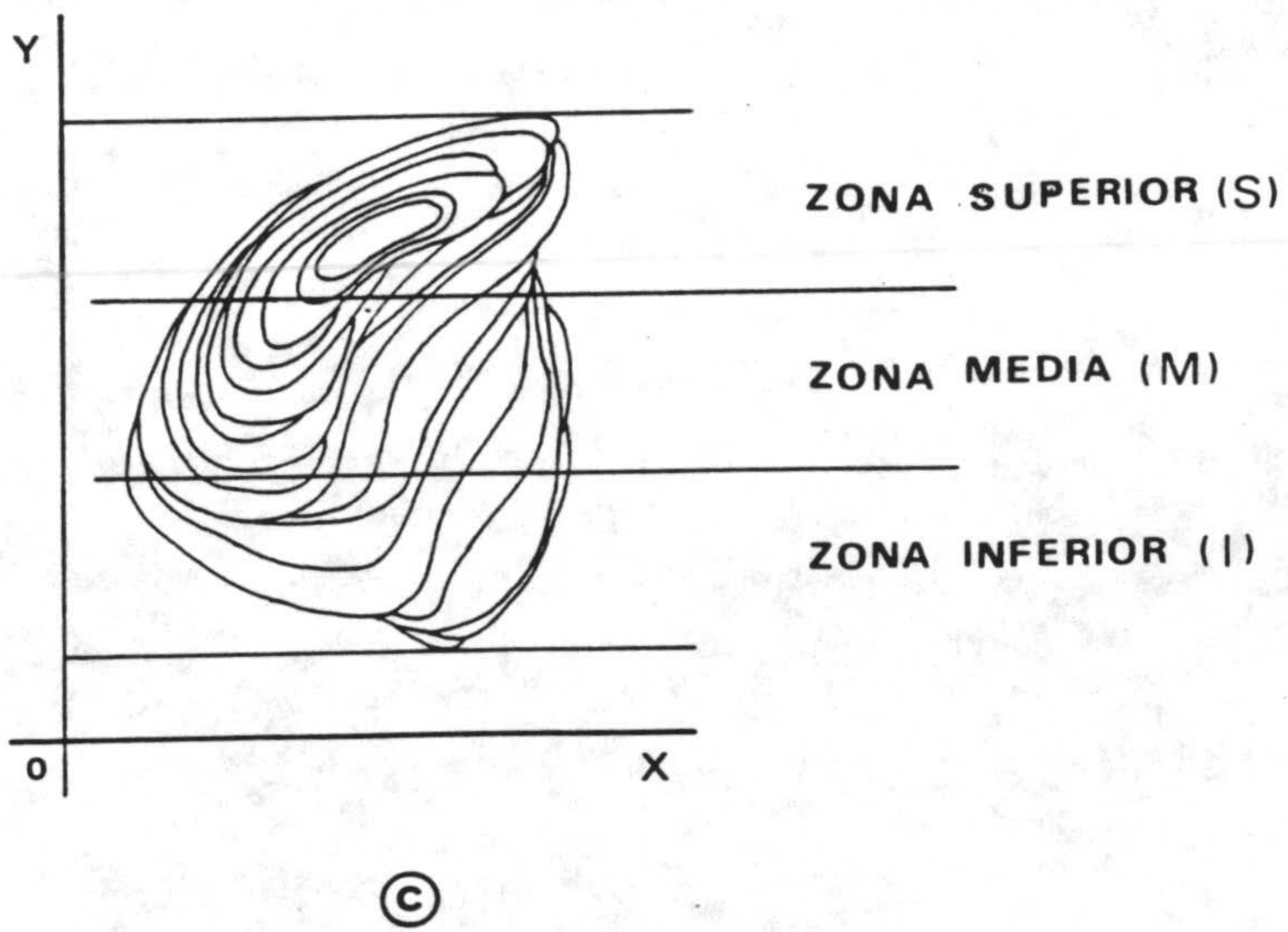
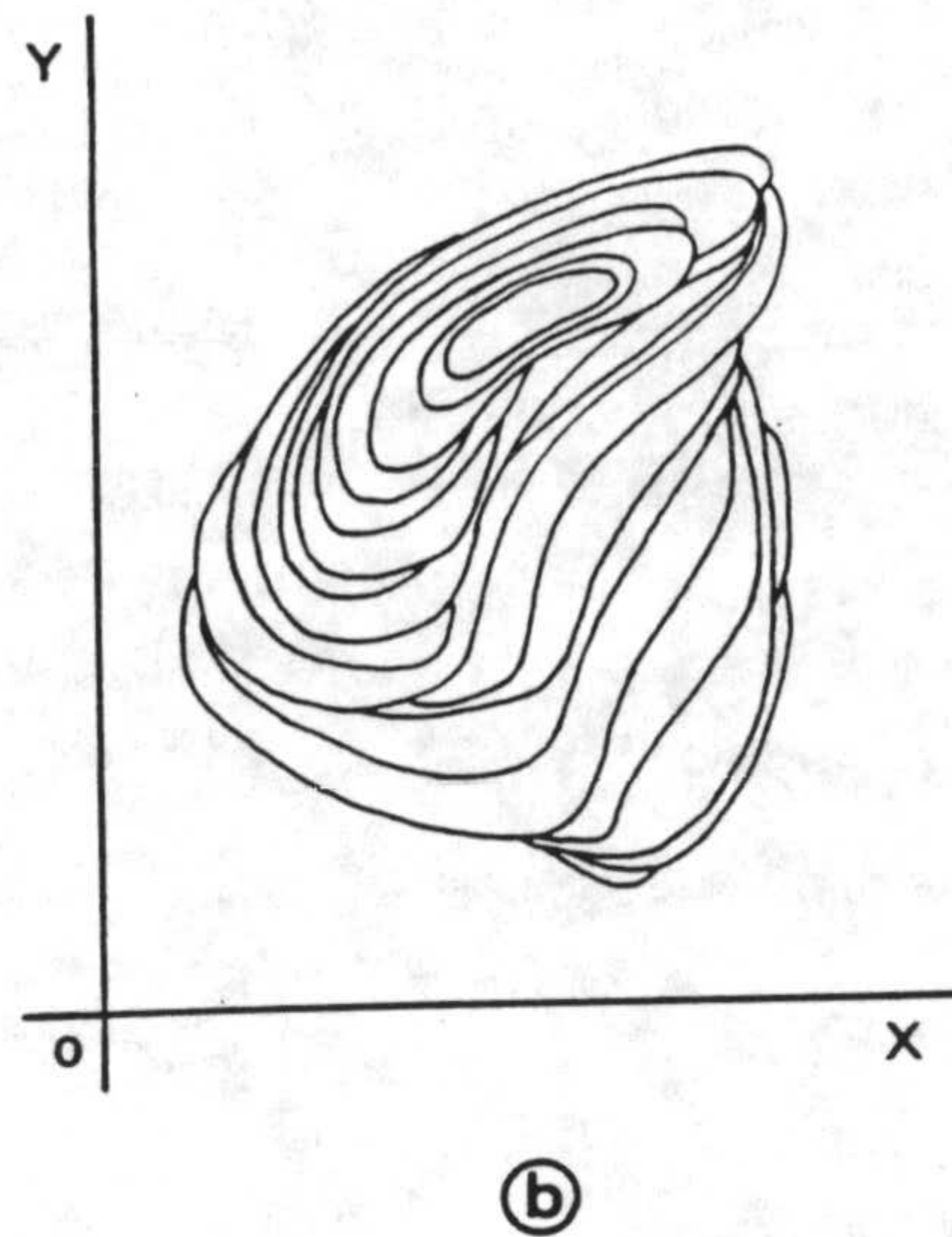
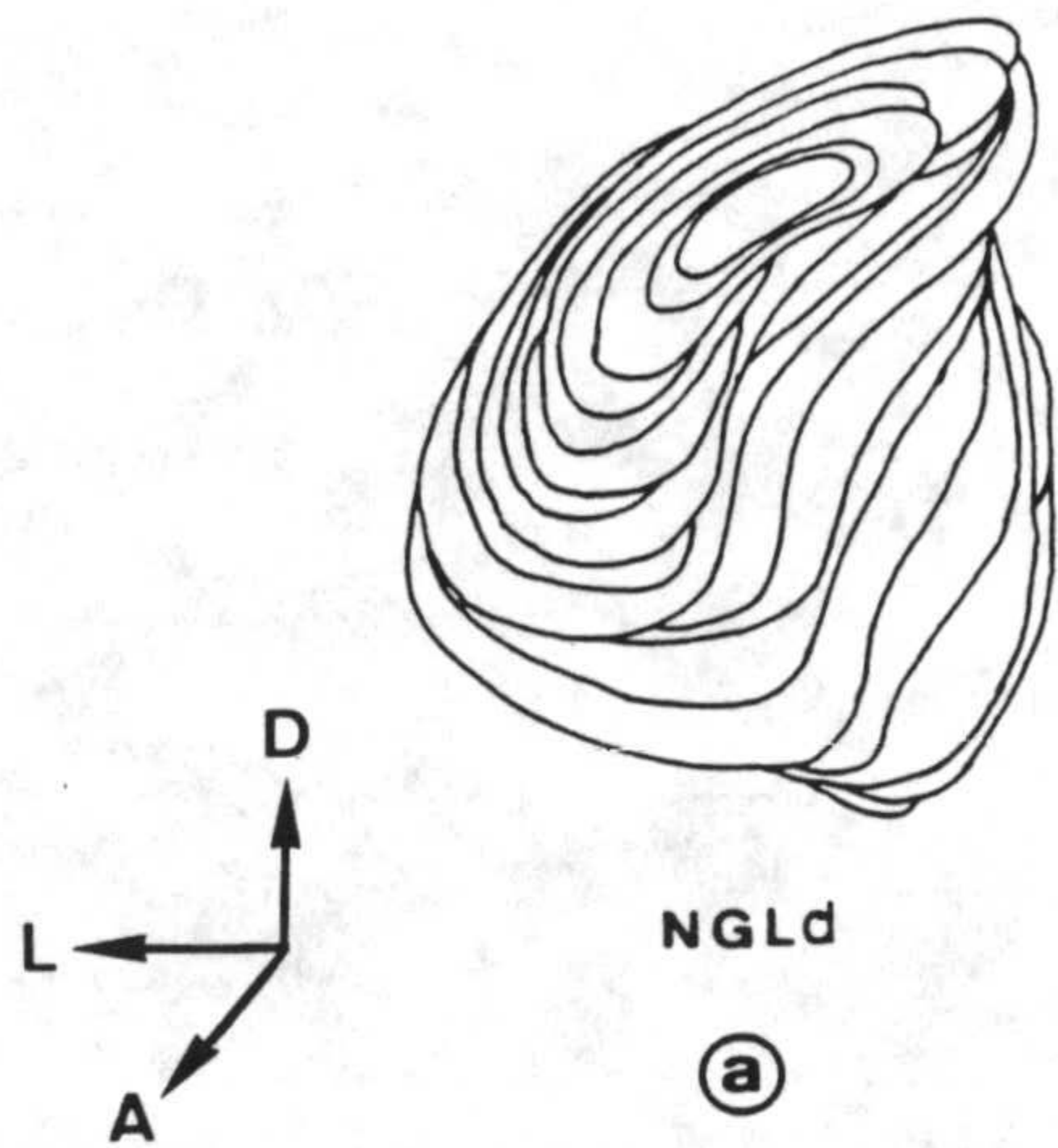


Figura 1

## **5. METODOLOGIA UTILIZADA PARA EL CALCULO DE VOLUMENES**

Antes de proceder al estudio de las determinaciones cuantitativas en las distintas zonas de estudio consideradas, fue necesario llevar a cabo el cálculo de volúmenes contenedores en dichas zonas. Para conseguirlo, se tuvo que tener en cuenta el programa que detallamos en los siguientes puntos.

### **5.1. Selección de la muestra**

La elección de la muestra representativa sobre la que poder determinar los volúmenes de las diferentes zonas de estudio se llevó a cabo una vez finalizado el proceso de corte de cada uno de los NGLd mediante el microtomo de parafina y obtenidas la totalidad de las secciones posibles. Tales secciones fueron procesadas con el método de Klüver-Barrera para microscopía óptica, y de ellas se obtuvieron los dibujos sobre los que se realizaron las pertinentes medidas.

La muestra del total de secciones existentes puede quedar representada incluyendo tan sólo el 20% del conjunto global de los cortes, tal y como han puesto de manifiesto los estudios desarrollados por Carmona y cols. (1987) sobre la estructura citoarquitectónica del NGLd del conejo. En definitiva, vendríamos a escoger uno de cada 5 cortes, cada uno de los cuales constituiría una serie.

Obtenidas las series correspondientes, el siguiente paso fue proceder a la elección en la primera de ellas de un corte de manera aleatoria. El número de orden del corte elegido se mantuvo en las demás series, sirviéndonos para componer la muestra. En este sentido, a modo de ejemplo, si el corte obtenido al azar fuese el 1, la muestra estaría integrada por los cortes 1, 6, 11, 16, 21, ....

## **5.2. Estimación de áreas**

El cálculo de volúmenes de cada una de las zonas de estudio requirió un paso previo consistente en determinar el área correspondiente en cada uno de los cortes constituyentes de la muestra. La valoración de tales áreas se realizó con un analizador semiautomático de imagen IBAS-Kontron mediante la utilización del programa "XY". Este programa, además de permitirnos obtener medidas de otros parámetros, nos ofrece la posibilidad de introducir diversos factores numéricos que facilitan la realización de las operaciones.

En primer lugar fue necesario repasar, con la pluma eléctrica y sobre el tablero digitalizador, el contorno de las distintas zonas de estudio en los dibujos de los cortes que fueron seleccionados con anterioridad. Finalmente, introduciendo el valor de la distancia del corte empleado al anterior de la serie y sumando todas las áreas parciales, obtenemos el volumen definitivo para cada zona de estudio.

Todos los datos fueron almacenados en un fichero adecuado al que poder acceder posteriormente para su procesamiento. Dado que en cada NGLd se distinguieron siete zonas de estudio, y éstas a su vez aparecían en todos los cortes constituyentes, se utilizaron canales de datos distintos para cada caso.

## **5.3. Determinación de volúmenes**

Una vez concluido el almacenamiento de los datos, procedimos a identificar y localizar un subprograma del "XY" que nos permitiera acceder al nuevo fichero establecido y de esta forma poder realizar los cálculos que nos facilitarían la obtención de los volúmenes de cada una de las zonas objeto de estudio de los distintos NGLd. Dado que tanto el sector  $\alpha_E$  como  $\alpha_I$  fueron

divididos en tres zonas (Superior, Media e Inferior), el volumen de estos sectores vendría dado por la suma de todas sus zonas. Así, para el sector  $\alpha_E$ :

$$\alpha_E = \alpha_{ES} + \alpha_{EM} + \alpha_{EI} \Rightarrow V(\alpha_E) = V(\alpha_{ES}) + V(\alpha_{EM}) + V(\alpha_{EI})$$

y para el sector  $\alpha_I$ :

$$\alpha_I = \alpha_{IS} + \alpha_{IM} + \alpha_{II} \Rightarrow V(\alpha_I) = V(\alpha_{IS}) + V(\alpha_{IM}) + V(\alpha_{II})$$

Como estos dos sectores constituyen en su conjunto el sector  $\alpha$ , su volumen vendría representado como la suma de sus volúmenes parciales:

$$\alpha = \alpha_E + \alpha_I \Rightarrow V(\alpha) = V(\alpha_E) + V(\alpha_I)$$

Los volúmenes que calculamos ( $V_c$ ) según este procedimiento son diferentes a los que realmente nos podemos encontrar en el tejido cerebral *in vivo*. Ello es debido a que el material nervioso va a sufrir una cierta retracción como consecuencia de los procedimientos técnicos empleados en histología. La expresión que nos permite el cálculo del volumen real ( $V_R$ ) es la siguiente:

$$V_R = \frac{100 \times V_c}{100 - R_v}$$

donde  $V_c$  es el volumen calculado (con retracción);  $R_v$  es la retracción sufrida por el material expresada en tanto por ciento; y  $V_R$  es el volumen real (sin retracción).

En nuestro estudio hemos tenido presente la posible retracción tisular que pueda haber sufrido el material objeto de estudio. Para ello, seguimos el



proceder de Navascués y cols. (1979), según el cual:

$$R_v = 100 \times \left[ 1 - \left( \frac{S_2}{S_1} \right)^3 \right]$$

en donde  $R_v$  es la retracción en volumen;  $S_2$  la longitud, área o volumen final después de realizados los procedimientos técnicos; y  $S_1$  la longitud, área o volumen inicial en el tejido *in vivo*.

La determinación de la retracción en volumen de nuestro material de estudio requirió en primer lugar la extracción del encéfalo y la obtención del bloque correspondiente al diencéfalo. A continuación, se fotografía el plano de sección anterior y se calcula su superficie ( $S_1$ ). Seguidamente, se llevan a cabo los procedimientos técnicos histológicos y se determina la superficie del primer corte obtenido. Finalmente, se aplica la fórmula de Navascués y cols. (1979), que nos ofrece la retracción en volumen (expresada en tanto por ciento del volumen inicial en el bloque no retraído).

La aplicación de esta fórmula nos permitió observar cómo los valores obtenidos no ofrecían variación al comparar los animales control con los tratados con alcohol.

## **6. DETERMINACION DEL NUMERO DE NEURONAS**

Tras proceder al cálculo de los volúmenes contenedores de las distintas zonas de estudio, pudimos abordar las valoraciones de tipo cuantitativo. El programa seguido para su cálculo fue el que a continuación se muestra:

### **6.1. Unidades muestrales**

Los recuentos neuronales se llevaron a cabo por observación microscópica sobre las zonas que fueron reseñadas en cada uno de los cortes elegidos de forma aleatoria para ser sometidos a estudio, con un objetivo de 40X y mediante la utilización de una retícula ocular.

La unidad de recuento empleada fue un paralelepípedo de  $200 \mu\text{m} \times 200 \mu\text{m} \times 10 \mu\text{m}$  (ó espesor del corte), es decir un volumen de  $4 \times 10^5 \mu\text{m}^3$ .

La elección de los cortes sobre los que se llevaron a cabo los recuentos neuronales se realizó mediante un muestreo sistemático con principio aleatorio. Para la elección de los paralelepípedos unidad dentro de cada corte de la muestra se empleó un muestreo aleatorio ponderado.

Como unidad de recuento recurrimos al nucléolo neuronal, ya que se trata de una estructura habitual en la mayoría de las células y claramente distinguible. Para evitar posibles efectos de sobreestimación, de todos los nucléolos cortados por las cuatro líneas de la retícula ocular sólo se contaron los que lo hacían en la superior o en la izquierda.

### **6.2. Tamaño de la muestra**

Un primer paso a dar antes de determinar el tamaño de la muestra, ó

número de paralelepípedos sobre los que llevar a cabo el recuento neuronal, fue conocer el tamaño de la población, ó número total de paralelepípedos que forman parte de la zona que sometemos a estudio. Conociendo el volumen estimado para cada zona y el volumen del paralelepípedo unidad, el número de paralelepípedos que constituyen la población (N) viene expresado como

$$N = \frac{\text{Volumen de la zona}}{\text{Volumen del paralelepípedo unidad}}$$

Como valor de N se toma el número entero más próximo al obtenido por la fórmula anterior, evitando con ello el uso de decimales.

Conocido el valor de N, el siguiente paso consistió en establecer el número de paralelepípedos que era necesario escoger en cada zona para que el número de neuronas contenido fuera representativo de la población. La aplicación de la fórmula de Azorín Poch (1972) nos permitió conocer dicho número.

$$n = \frac{N \times K^2 \times s^2}{N \times e^2 + K^2 \times s^2}$$

donde "n", es el tamaño de la muestra; N, el tamaño de la población; K, la desviación para un nivel de significación dado (en nuestro caso, para un nivel de significación del 95%,  $K = 1.96$ ); "e", el error absoluto que se quiera conseguir (en nuestro caso un 5% de la media); y  $s^2$ , la cuasivarianza de la población.

Procederíamos de la siguiente manera: llevamos a cabo varios

recuentos y obtenemos el valor medio de neuronas y el de  $s^2$ . Calculando el 5% del valor medio de neuronas obtenemos el valor de "e". Estos valores los sustituiríamos en la fórmula de Azorín Poch, obteniendo así el número de paralelepípedos que deberíamos de contar para que la muestra fuese representativa.

### **6.3. Estimación del número total de neuronas**

El valor del número total de neuronas ( $X_t$ ) existentes en cada zona de estudio viene expresado como el producto de N, ó número total de paralelepípedos, y el número medio de neuronas recontadas por paralelepípedo ( $\bar{x}$ )

$$X_t = N \times \bar{x}$$

Al igual que hacíamos anteriormente con N, como valor de  $X_t$  tomamos el número entero más próximo al obtenido con la fórmula, para no trabajar con decimales.

### **6.4. Corrección de la sobreestimación**

Como consecuencia del grosor finito de los cortes se puede producir una sobreestimación del número real de células, con lo que a la hora de llevar a cabo los recuentos neuronales hay que tenerla muy presente, ya que en muchos casos resulta significativa. Esta sobreestimación es una relación directa entre el diámetro de la unidad de recuento y el grosor del corte, de manera que cuanto mayor es el diámetro de la unidad de recuento y/o menor el espesor del corte más alto es este efecto, y más bajo en caso contrario.

La unidad de recuento utilizada en el presente estudio fue el nucléolo

neuronal. El diámetro medio del nucléolo se obtuvo midiendo un número representativo de los mismos con la ayuda de un micrómetro ocular.

Existen varias fórmulas que nos permiten llevar a cabo las oportunas correcciones sobre los recuentos de perfiles realizados a nivel de las secciones. De entre estas fórmulas cabe citar la de Agdthur (1941), Floderus (1944) o Abercrombie (1946), aplicables siempre y cuando la unidad de recuento sea mayor que el grosor del corte, tal y como es nuestro caso.

De las tres fórmulas anteriores, nos hemos inclinado por la utilización de la de Floderus, ya que estudios previos (Calvente, 1985; Carmona, 1987) confirman que es la más fiable para las condiciones de nuestro trabajo y con un menor porcentaje de error.

La expresión que define a la fórmula de Floderus es la siguiente:

$$N_a = n_a \times \frac{t}{t + D - 2K}$$

en donde:

$N_a$  = número real de nucléolos.

$n_a$  = número de nucléolos contados mediante el recuento.

$t$  = grosor del corte.

$D$  = diámetro nucleolar medio.

$K$  ( ó "h" ) = valor calculado a partir del radio ( $r$ ) más pequeño observado y del radio medio nucleolar, según la relación establecida por Marrable (1962)

$$h = R - (R^2 - r^2)^{\frac{1}{2}}$$

Así pues, en la fórmula de Floderus podemos considerar a efectos prácticos como "factor de corrección" (f) la parte de la fórmula que modifica a "n<sub>a</sub>", esto es:

$$f = \frac{t}{t + D - 2K}$$

### **6.5. Estimación del número real de células**

Conocido el número total de neuronas (X<sub>t</sub>) y el factor de corrección (f) calculado para la sobreestimación, el número real de neuronas (X<sub>r</sub>) resulta de multiplicar ambos parámetros:

$$X_r = X_t \times f$$

### **6.6. Cálculo de la densidad neuronal**

Los recuentos neuronales realizados en cada zona de estudio nos han permitido obtener finalmente el número medio de neuronas por 10<sup>6</sup> μm<sup>3</sup>. Para el cálculo de esta densidad neuronal en cada una de las zonas de estudio sólo tenemos que dividir el número real de neuronas por el volumen real de dichas zonas

$$\delta = \frac{X_r}{V_R}$$

No obstante, dado que los volúmenes de las correspondientes zonas vienen expresados en  $\text{mm}^3$ , mientras que la densidad lo hace en  $10^6 \mu\text{m}^3$ , resulta imprescindible el modificar tal expresión para obtener finalmente la siguiente:

$$\delta = \frac{X_I}{10^3 \times V_R}$$

## 7. DETERMINACION DEL VOLUMEN DEL SOMA NEURONAL Y NEUROPILO

El cálculo del volumen del soma neuronal coincidió en sus primeras etapas con las seguidas en la determinación del número de neuronas. Al igual que en dicho caso, el primero de los pasos consistió en delimitar la unidad volumétrica de recuento, que resultó ser un paralelepípedo de  $200\ \mu\text{m} \times 200\ \mu\text{m}$  (tamaño de la retícula ocular)  $\times 10\ \mu\text{m}$  (espesor del corte).

La elección de los cortes sobre los que se realizaron los recuentos neuronales que nos permitieron calcular el volumen del soma neuronal, se llevó a cabo mediante un muestreo sistemático con principio aleatorio. Para la elección de las unidades volumétricas dentro de cada corte de la muestra se utilizó en su caso un muestreo aleatorio ponderado.

La obtención de los volúmenes de la fase soma neuronal se realizó empleando una retícula ocular de puntos (la distancia entre cada dos puntos de la retícula fue de  $20\ \mu\text{m}$ ), mediante la cual se procedió a contabilizar los puntos contenidos en la fase soma neuronal. La cuantificación fue realizada mediante observación microscópica con un objetivo de 40X. Conociendo el número de puntos correspondientes a la fase soma neuronal y el número de puntos totales de la retícula, es posible estimar el volumen neuronal total, tal y como ya emplearon Thomson (1930), Glagolev (1933), Weibel (1980) y Gundersen (1988), entre otros. Este procedimiento se empleó tanto para el estudio de las neuronas de apariencia normal como para las de soma y núcleo heteropícnótico.

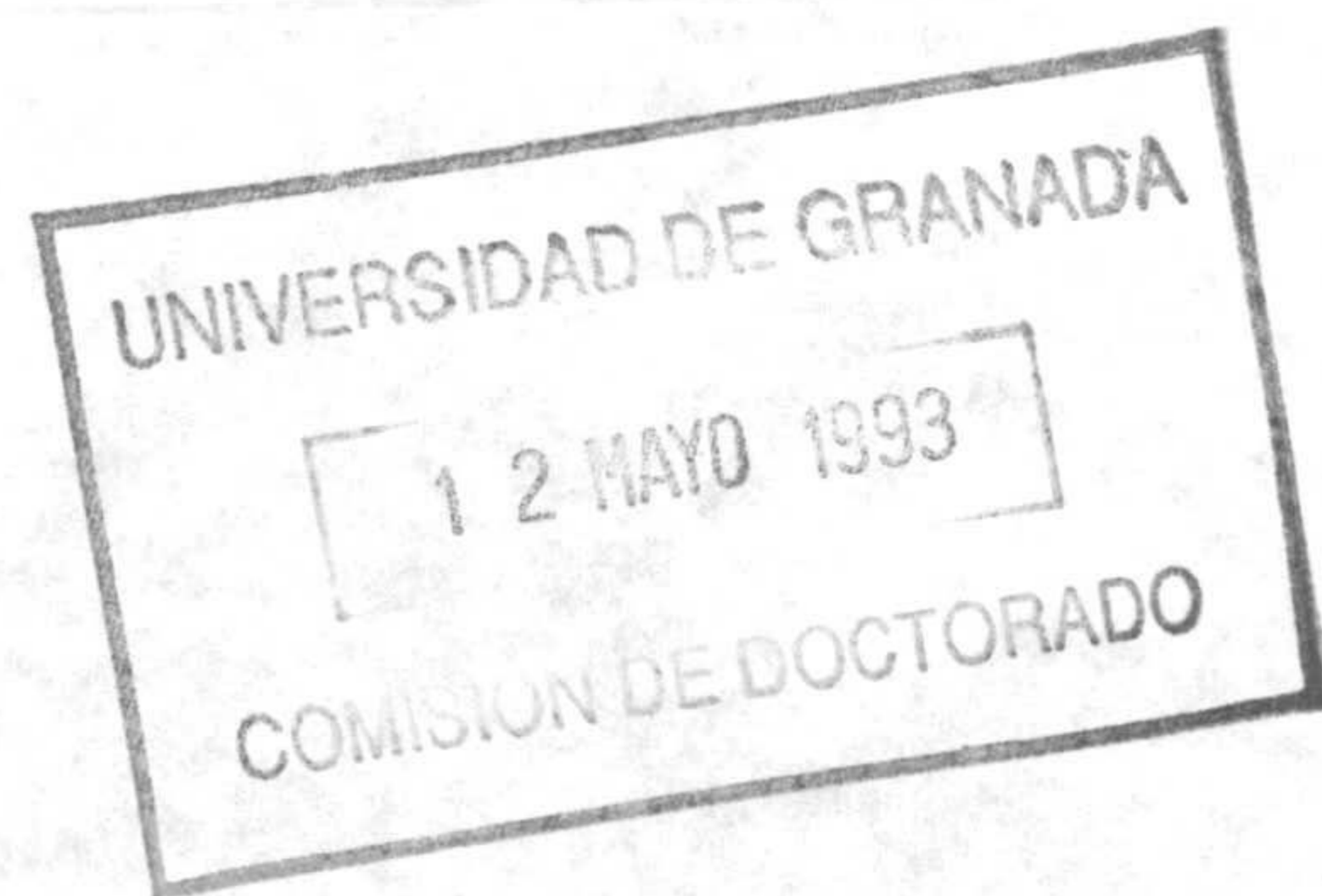
Asímismo, como en casos anteriormente descritos, se aplicó la fórmula de Azorín Poch con objeto de conocer si el número de unidades volumétricas utilizadas en cada zona de estudio era representativo con



respecto al total de la población.

Finalmente, el cálculo del volumen del soma neuronal también nos permitió conocer el del neuropilo, ya que este último viene definido como todo aquello que no es soma neuronal (Von Economo y Koskinas, 1925). Por consiguiente, conociendo el volumen ocupado por el soma neuronal podremos determinar el del neuropilo según la fórmula que a continuación se detalla:

$$V_{NEUROPILO} = V_T - V_{SOMA NEURONAL}$$



## **8. CALCULO DEL AREA NEURONAL**

De los tres sectores considerados en el NGLd del conejo ( $\alpha_E$ ,  $\alpha_I$  y  $\beta$ ), el cálculo del área de las neuronas pertenecientes a dicho núcleo talámico tan sólo se realizó en el sector  $\alpha_E$ , por resultar más interesante en lo referente a su constitución neuronal.

La manera de proceder a dicho cálculo fue, básicamente, la de elegir un número representativo de perfiles neuronales, que se estima en alrededor de 250, contenidos en paralelepípedos de recuento, sobre los que poder calcular su área. Por consiguiente, procedimos a la elección de dichos perfiles de forma aleatoria y ponderada en el sector  $\alpha_E$ , tanto en los animales tratados con alcohol como en los utilizados como control. Una vez seleccionados, se procedió a dibujar el contorno neuronal con la ayuda de la cámara clara y mediante la utilización de un objetivo 100X y una retícula ocular cuadrículada. Del conjunto de perfiles neuronales contenidos en el campo de visión, sólo se dibujaron aquellos que estaban completamente integradas en la retícula y los que eran cortadas por los bordes izquierdo y superior. De esta manera, evitamos el problema de la sobreestimación.

En cada una de las hojas sobre las que se dibujó el contorno de las neuronas, también se procedió a anotar el valor de  $Q_A$  (número de perfiles dibujados que aparecían en la sección), el número de orden del portaobjetos y el de la sección.

El siguiente de los pasos, con la ayuda de un analizador semiautomático de imágenes IBAS-Kontron, fue proceder al cálculo del área de las neuronas. Esta metodología supuso repasar sobre el tablero digitalizador los contornos de los perfiles neuronales mediante la pluma eléctrica. Después de identificar el fichero adecuado, se fueron almacenando los valores obtenidos, utilizando en cada caso un fichero distinto para cada

NGLd estudiado.

Finalmente, un aspecto a tener en cuenta fue la orientación que puedan presentar las neuronas en el tejido nervioso, ya que la existencia de la misma podría originar diferencias en los valores del área neuronal, disminuyendo la fiabilidad en las comparaciones.

Los estudios desarrollados por Carmona (1987) pusieron de manifiesto que el área media de las neuronas seccionadas según una dirección de corte frontal no difería significativamente de la correspondiente a neuronas seccionadas horizontalmente. No obstante, cuando cualquiera de esos dos tipos de secciones se comparaba con cortes sagitales, los valores del área media de las neuronas mostraron diferencias que resultaron ser significativas. Con todo ello, a la hora de establecer comparaciones entre las áreas medias de los somas neuronales en los dos grupos considerados (alcohol y control), de las tres orientaciones en que fueron seccionados los bloques que contenían los NGLd, sólo utilizamos la horizontal y la frontal.

## **9. ESTADISTICA APLICADA**

Esta sección la dedicamos a la presentación de los métodos estadísticos utilizados en el tratamiento de los valores medios calculados para los recuentos, además de otros parámetros que hemos venido empleando en el desarrollo del presente trabajo y que nos han servido para el estudio de las poblaciones neuronales tratadas con alcohol y control en el NGLd del conejo. Básicamente, los métodos estadísticos empleados son que a continuación detallamos:

- 1) Contraste de la homogeneidad de las varianzas mediante el estadígrafo F de Snedecor, para un intervalo de confianza del 95%.
- 2) Contraste de diferencias entre medias (con un nivel de significación de 0.05) mediante el test t-Student. Este test se empleó para aquellos casos en los que F no resultó significativo (varianzas iguales), y mediante el test de Cochran para aquellos otros casos en las diferencias ser diferentes de manera significativa.

**IV. OBSERVACIONES**

## **A. OBSERVACIONES A MICROSCOPIA OPTICA**

### **1. ASPECTOS SOBRE LA MORFOLOGIA GENERAL Y ORGANIZACION CITOARQUITECTONICA DEL NGLd DEL CONEJO**

El NGLd es la porción dorsal del complejo del NGL del tálamo del conejo. Además del NGLd, el complejo del NGL comprende una porción ventral o NGLv, y una lámina de células y neuropilo denominada lámina medular (Winkler y Potter, 1911), lámina medular interganglionar (Gerhard, 1968) o lámina intergenicular (Hickey y Spear, 1976; Gonzalo y cols., 1985), que separa el NGL dorsal del ventral.

La lámina intergenicular y el NGLv son, por tanto, los límites ventrales del NGLd, que además se encuentra envuelto lateral y dorsalmente por el tracto óptico y está limitado oralmente por el núcleo anterior del tálamo, que también delimita al NGLd, junto con el pulvinar, en la región medial. Por su parte, el Núcleo Genuculado Medial del tálamo constituye el límite caudal del NGLd.

En el caso del conejo, el NGLd carece de laminación aparente. No obstante, pueden delimitarse dos regiones,  $\alpha$  y  $\beta$ , con la técnica de Klüver-Barrera.

Los NGLd obtenidos de los 12 conejos empleados en nuestro trabajo fueron seccionados según las orientaciones de corte horizontal, frontal y sagital. Desde un punto de vista histológico, tanto para el tratamiento con alcohol como para los núcleos control, la morfología que mostraron los NGLd cortados según cada orientación fue la misma.

### a) Secciones horizontales

En secciones horizontales, el sector  $\alpha$  tiene forma de media luna y constituye la mayor parte del núcleo (**Figura 2**). Rodea lateral y posteriormente al sector  $\beta$ , que constituye un campo fibroso que contiene neuronas grandes y muy espaciadas.

El sector  $\alpha$  puede subdividirse a su vez en dos zonas: sector  $\alpha$  externo ( $\alpha_E$ ) y sector  $\alpha$  interno ( $\alpha_I$ ). El sector  $\alpha_E$  constituye la zona más externa y en ella se pueden observar fibras poco abundantes y células con un relativo empaquetamiento. Por lo que respecta al sector  $\alpha_I$ , éste constituye la zona más interna y está integrado por una mayor cantidad de fibras y células más espaciadas entre sí.

Si los cortes horizontales se realizan hacia el final del segundo tercio, podemos observar como el perfil del NGLd va perdiendo esa forma de media luna y se va haciendo cada vez más redondeado (**Figura 3**). Al mismo tiempo, comienzan a aparecer perfiles del NGLv en posición antero-lateral con respecto al NGLd. A partir de este momento, los perfiles del NGLd van reduciéndose, siendo ocupados por los del NGLv, que se van haciendo progresivamente más grandes.

### b) Secciones frontales

En las primeras secciones frontales del diencefalo en las que aparece el NGLd, éste presenta una forma ovalada al principio y está ligeramente curvado hacia fuera (**Figura 4**); pero a medida que nos vamos aproximando a la parte media, se puede observar cómo el núcleo va ocupando progresivamente la región medial, donde finalmente aparece el sector  $\beta$  (**Figura 5**). Dicho sector presenta a este nivel medio su máxima extensión. A partir de aquí, se va reduciendo el sector  $\beta$  hasta que finalmente desaparece.

En este tipo de secciones se pueden apreciar bien las relaciones entre el NGLd y el NGLv, los cuales se encuentran imbricados en, aproximadamente, un tercio de su altura.

### c) Secciones sagitales

En secciones sagitales, el NGLd es lanceolado en su tercio más lateral, dirigiendo su punta hacia la región ventro-caudal. A este nivel, la totalidad del núcleo está constituido por el sector  $\alpha$  (Figura 6). Cuando el nivel de corte se acerca hacia la mitad latero-medial, se alarga y se dobla hacia delante para envolver al sector  $\beta$  en posición caudal y dorsal (Figura 7).

Un aspecto a reseñar fue el hecho de que las secciones horizontales y sagitales del NGLd, procesados mediante el método de Klüver-Barrera, nos proporcionaron imágenes histológicas concluyentes en lo referente a la relación estructural existente entre el sector  $\alpha$  y  $\beta$ . En este sentido, el sector  $\alpha$  constituye una envuelta que rodea al sector  $\beta$ . Este último puede considerarse como la región por donde salen las proyecciones del NGLd y por donde entran aquellas otras procedentes de la corteza visual (cortico-geniculares).

Otro de los factores que varía en función de la orientación de corte es la forma de las neuronas observadas en las preparaciones microscópicas procesadas con el método de Klüver-Barrera. En efecto, en secciones horizontales, las neuronas suelen tener una forma predominantemente fusiforme, mientras que en secciones frontales y sagitales predominan las formas redondeadas. Esto es debido a la particular orientación de las células de este núcleo talámico, cuyo eje mayor se encuentra preferentemente dirigido hacia la región antero medial del núcleo, hacia donde se encuentra el sector  $\beta$ .



Finalmente, el empleo del método de Klüver-Barrera también nos permitió poner de manifiesto en el sector  $\alpha$  y  $\beta$  del NGLd de los conejos tratados con alcohol, neuronas intensamente teñidas por el colorante empleado en la tinción (cresil-violeta), que hemos denominado como de apariencia heteropicnótica. Por regla general, estas neuronas suelen tener una forma bastante heterogénea, con una superficie irregular o rugosa (**Figura 8**). En la mayoría de los casos se trata de células más pequeñas que el resto de las que integran el NGLd y que se encuentran distribuidas de forma irregular por todo el sector  $\alpha$ , y circunstancialmente en el sector  $\beta$ . También es frecuente el poder observarlas formando agrupaciones localizadas en determinadas zonas del Núcleo (**Figura 9**). Existen otros casos de neuronas en los que su distinción como heteropicnóticas no parece tan clara, presentando características intermedias entre las normales (**Figura 10**) y las anteriormente descritas (**Figura 11**).

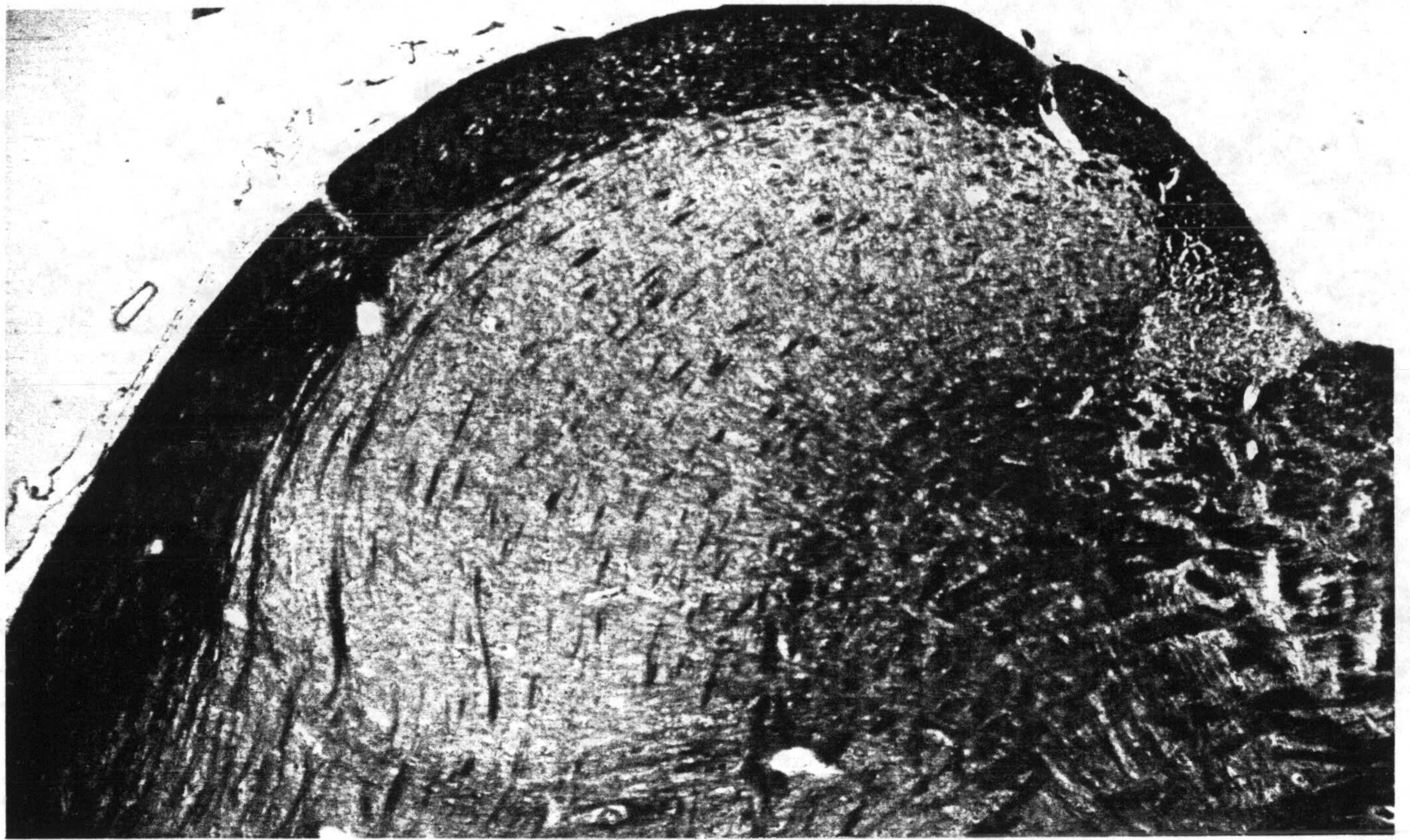


Figura 2a

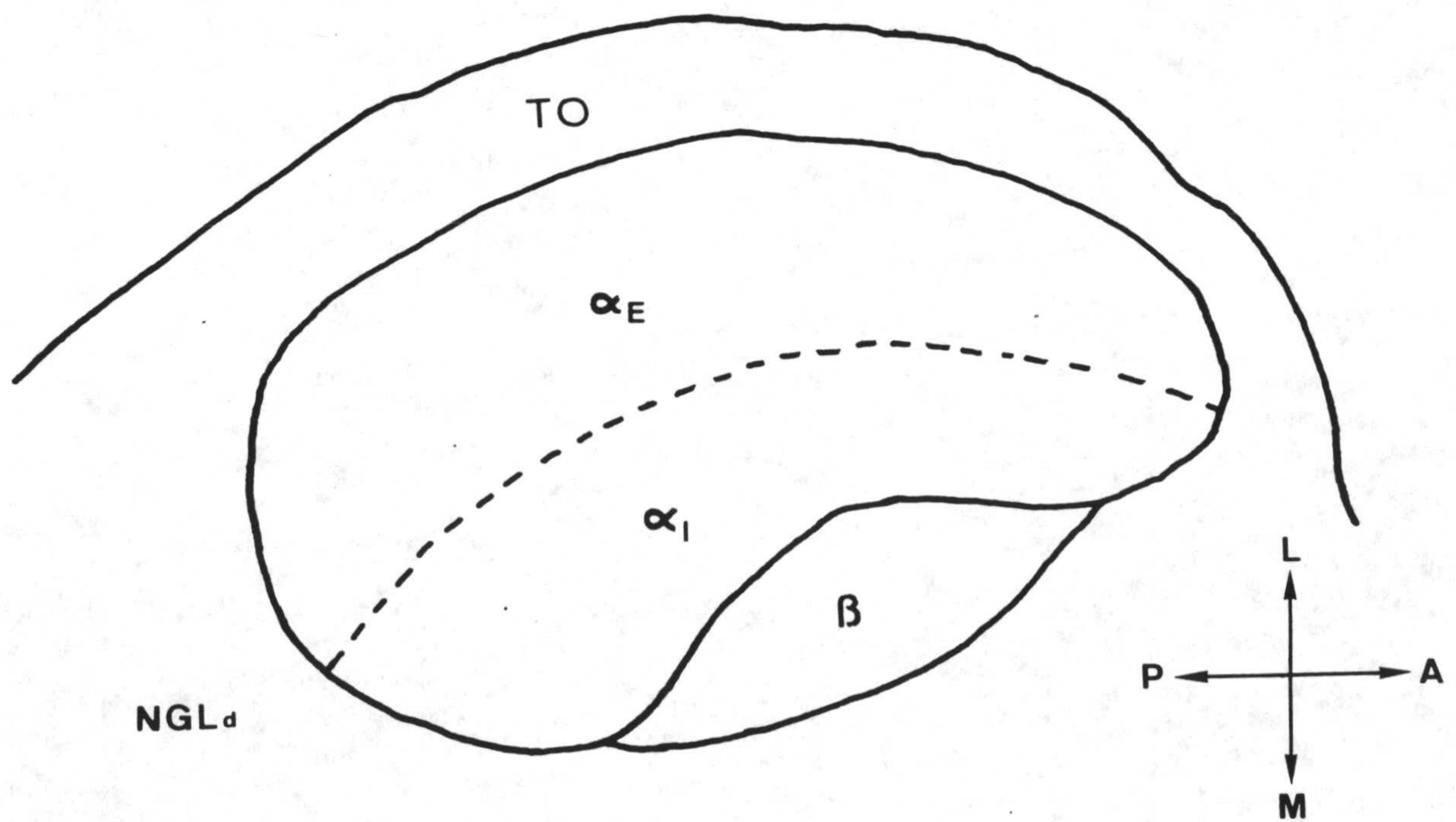


Figura 2b

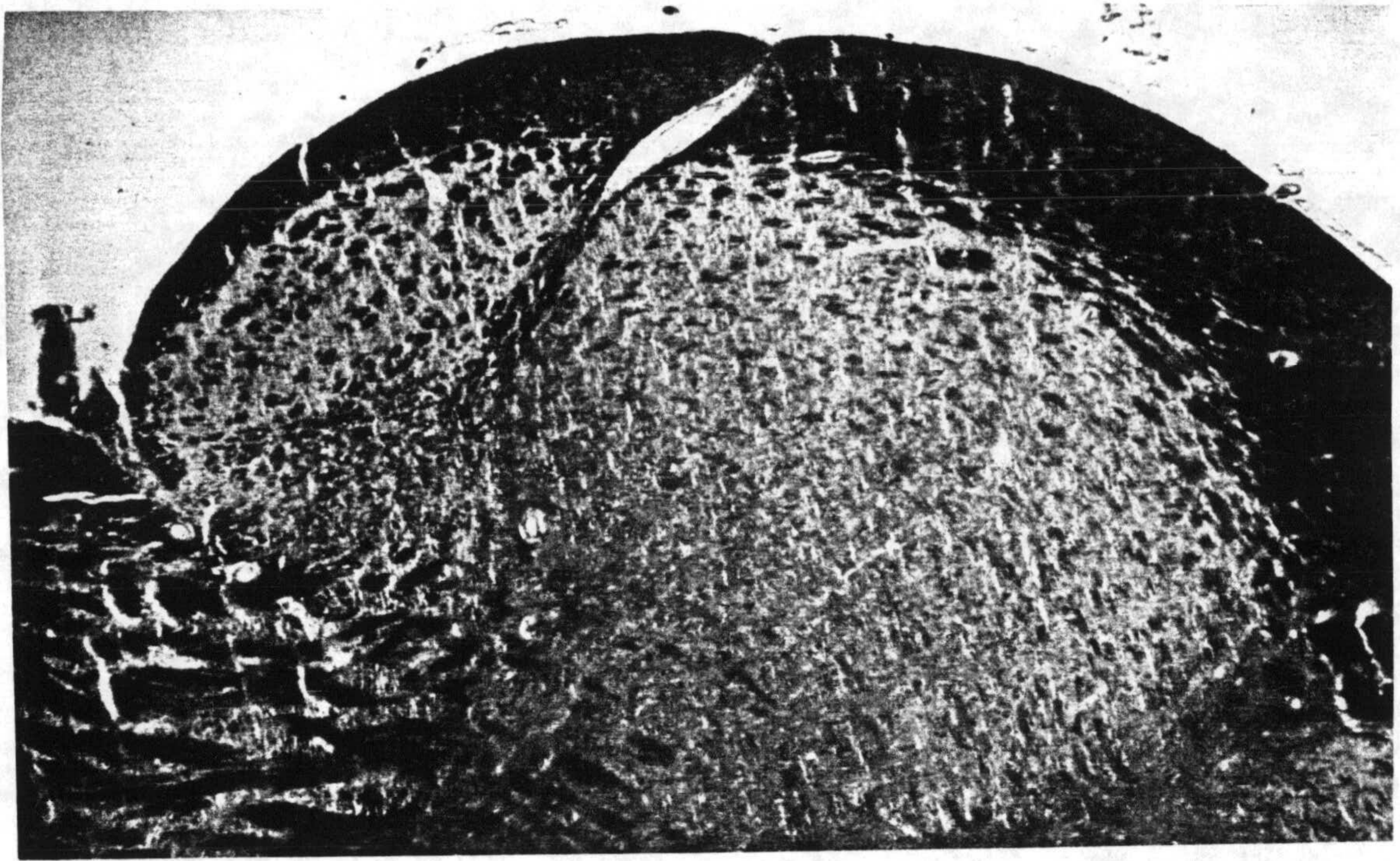


Figura 3a

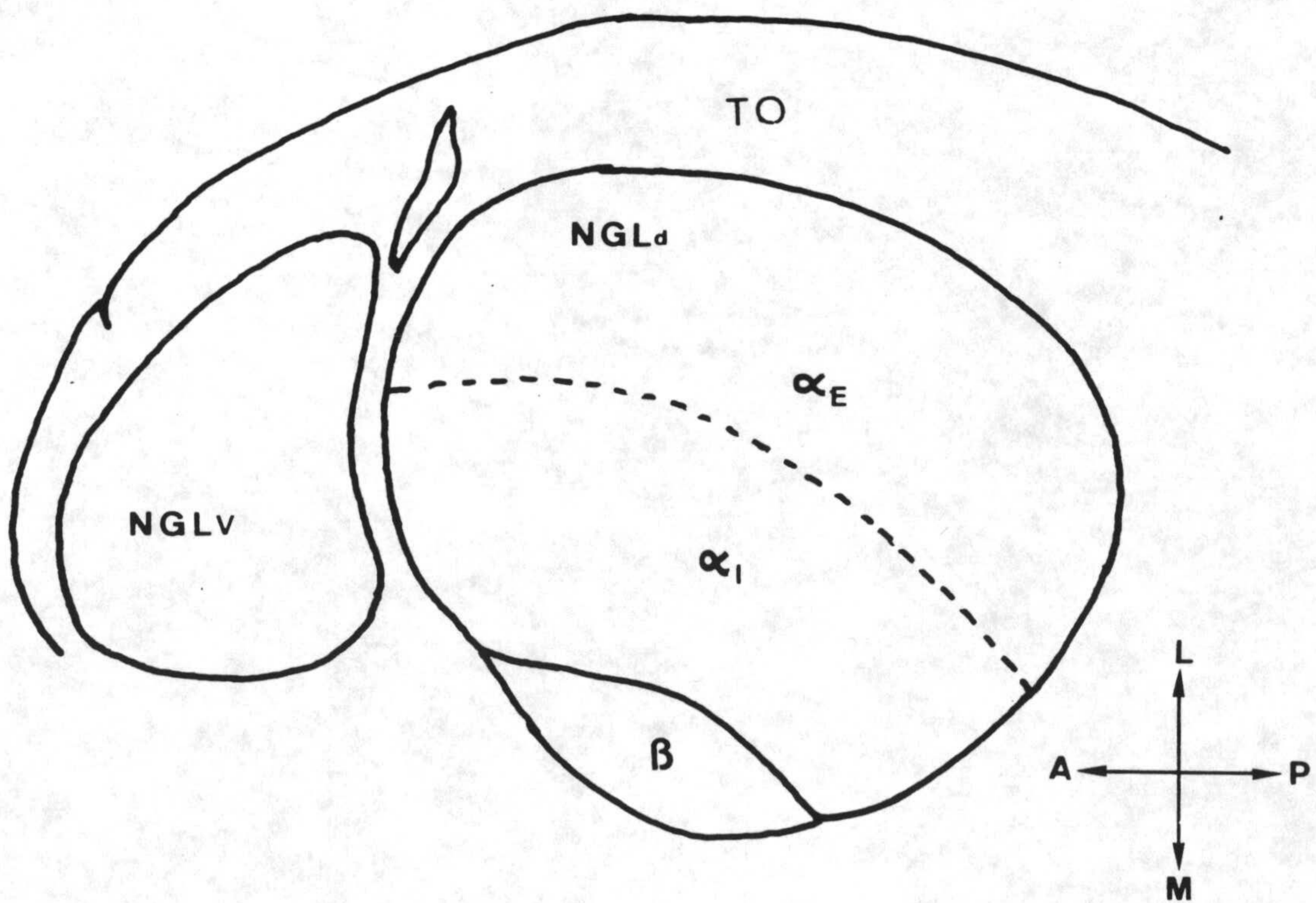


Figura 3b



Figura 4a

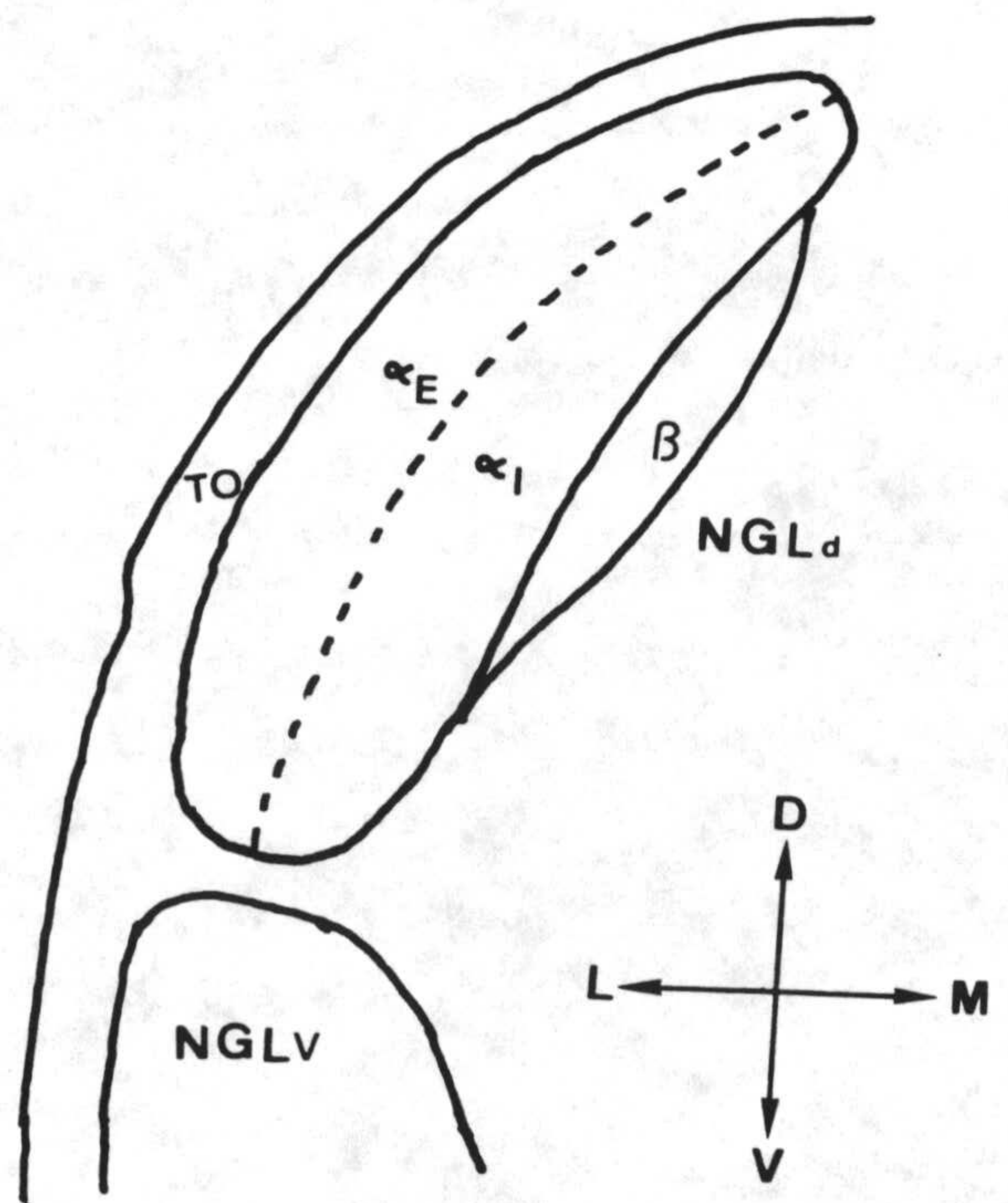


Figura 4b



Figura 5a

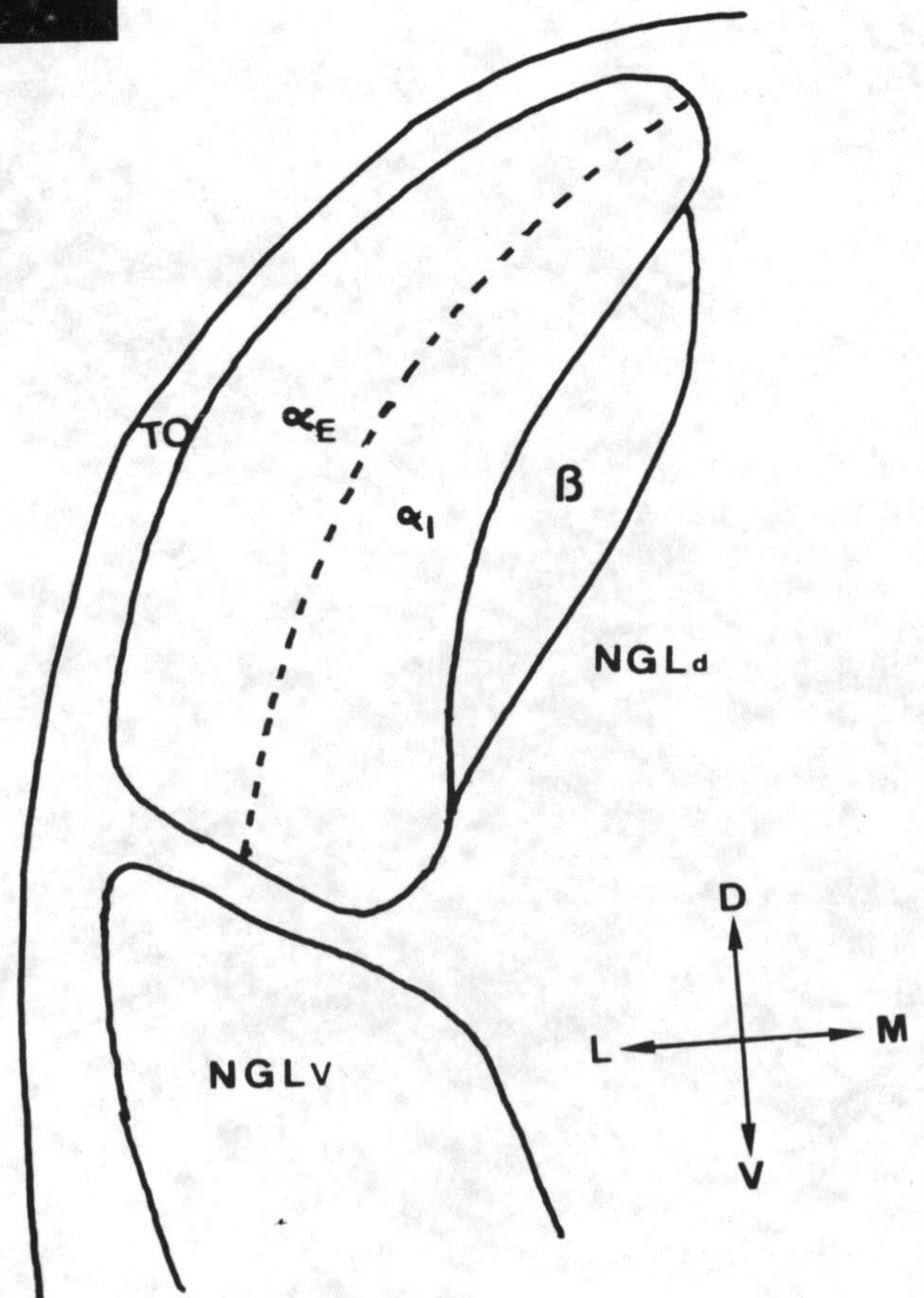


Figura 5b

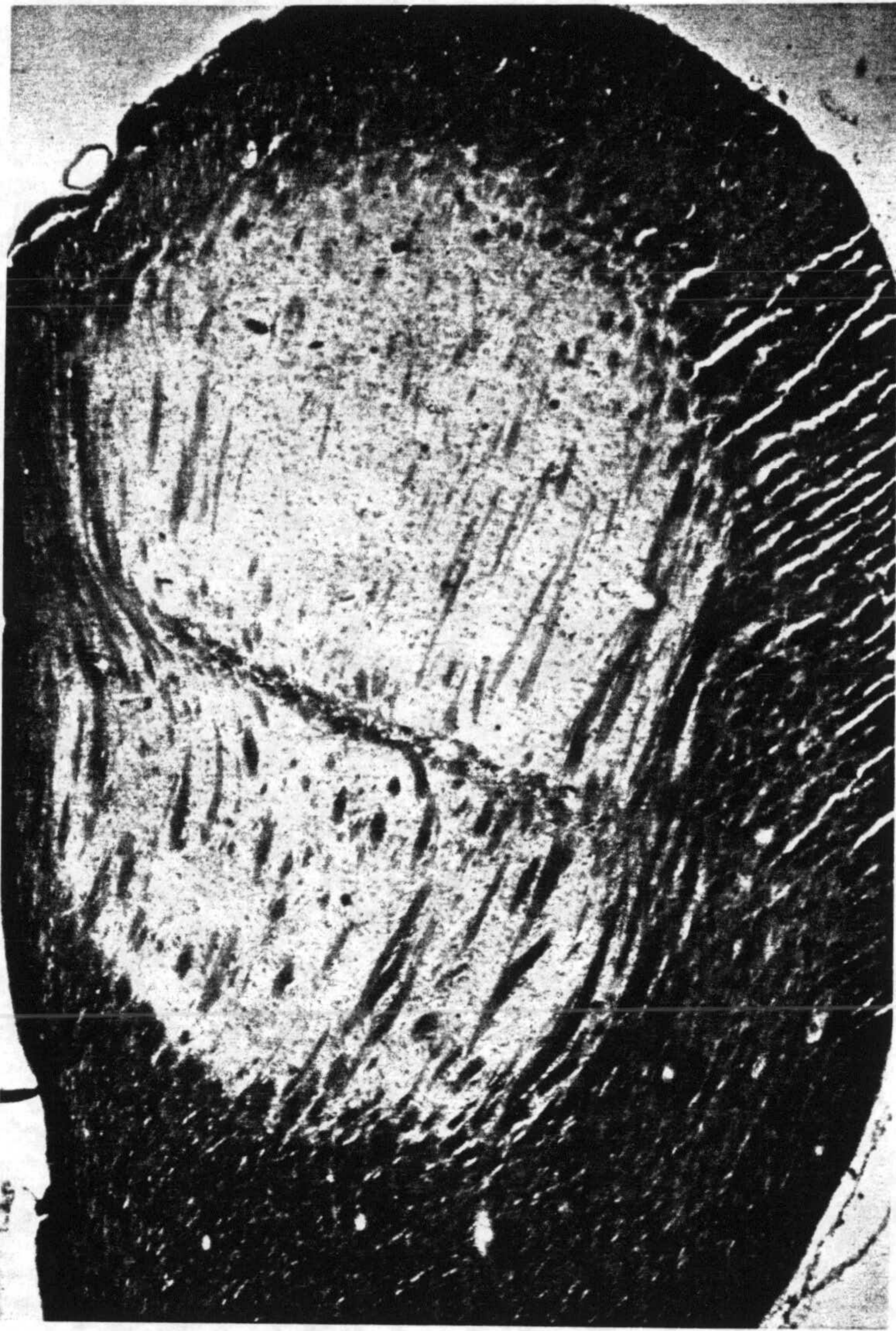
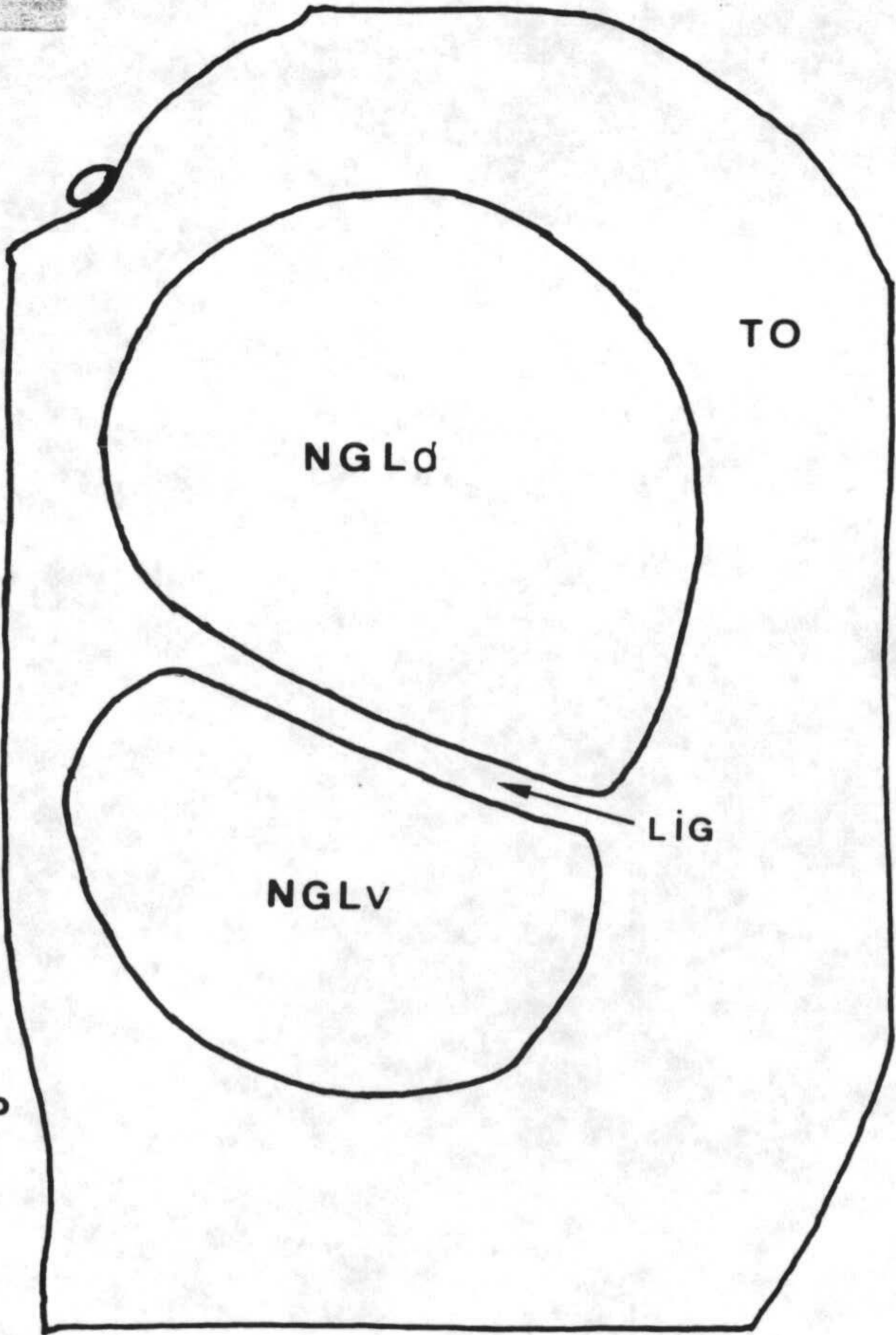
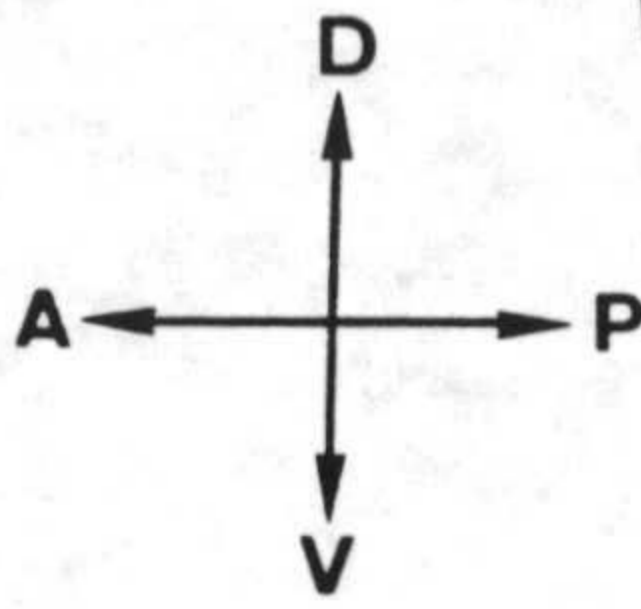


Figura 6a

Figura 6b



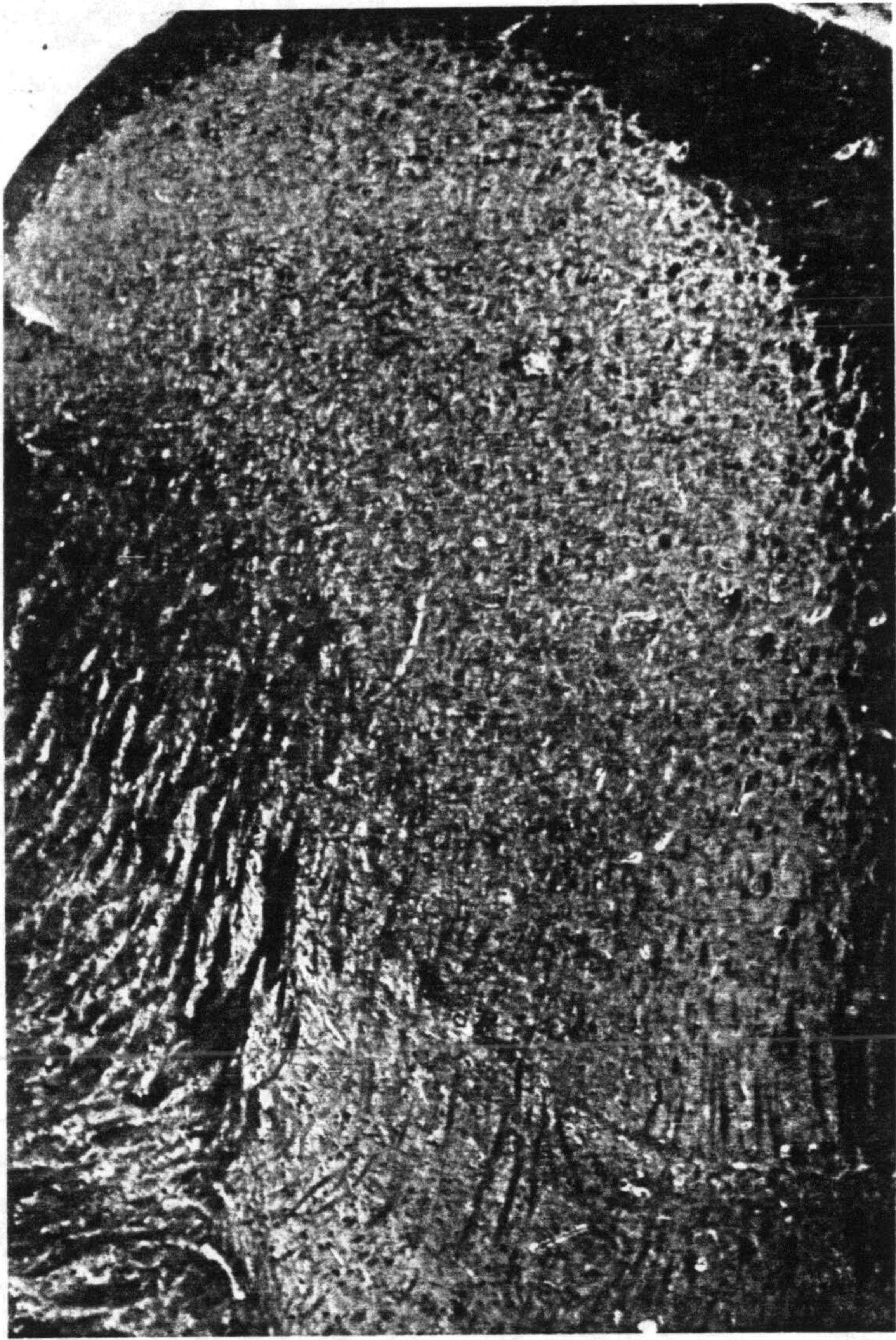


Figura 7a

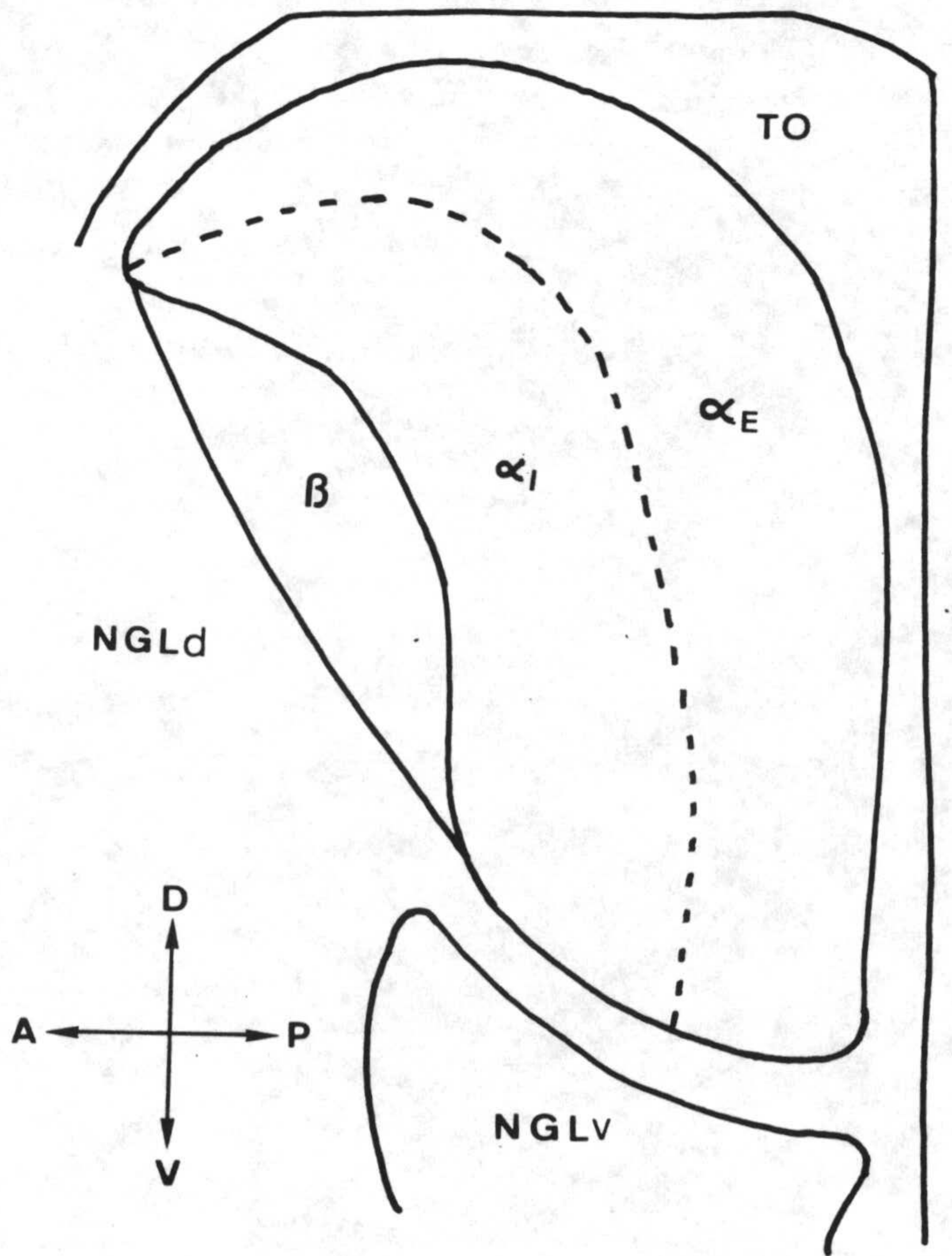


Figura 7b

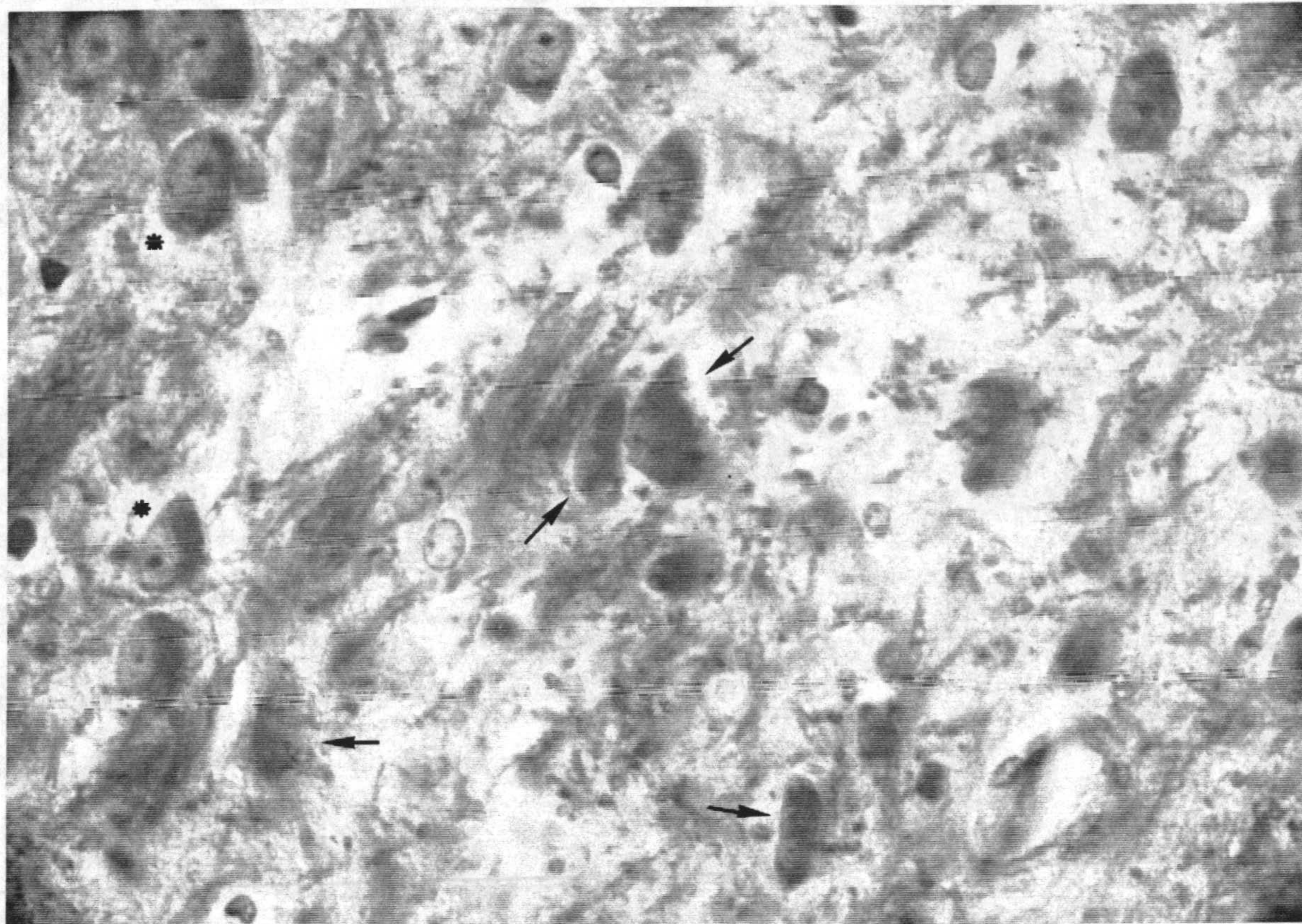


Figura 8

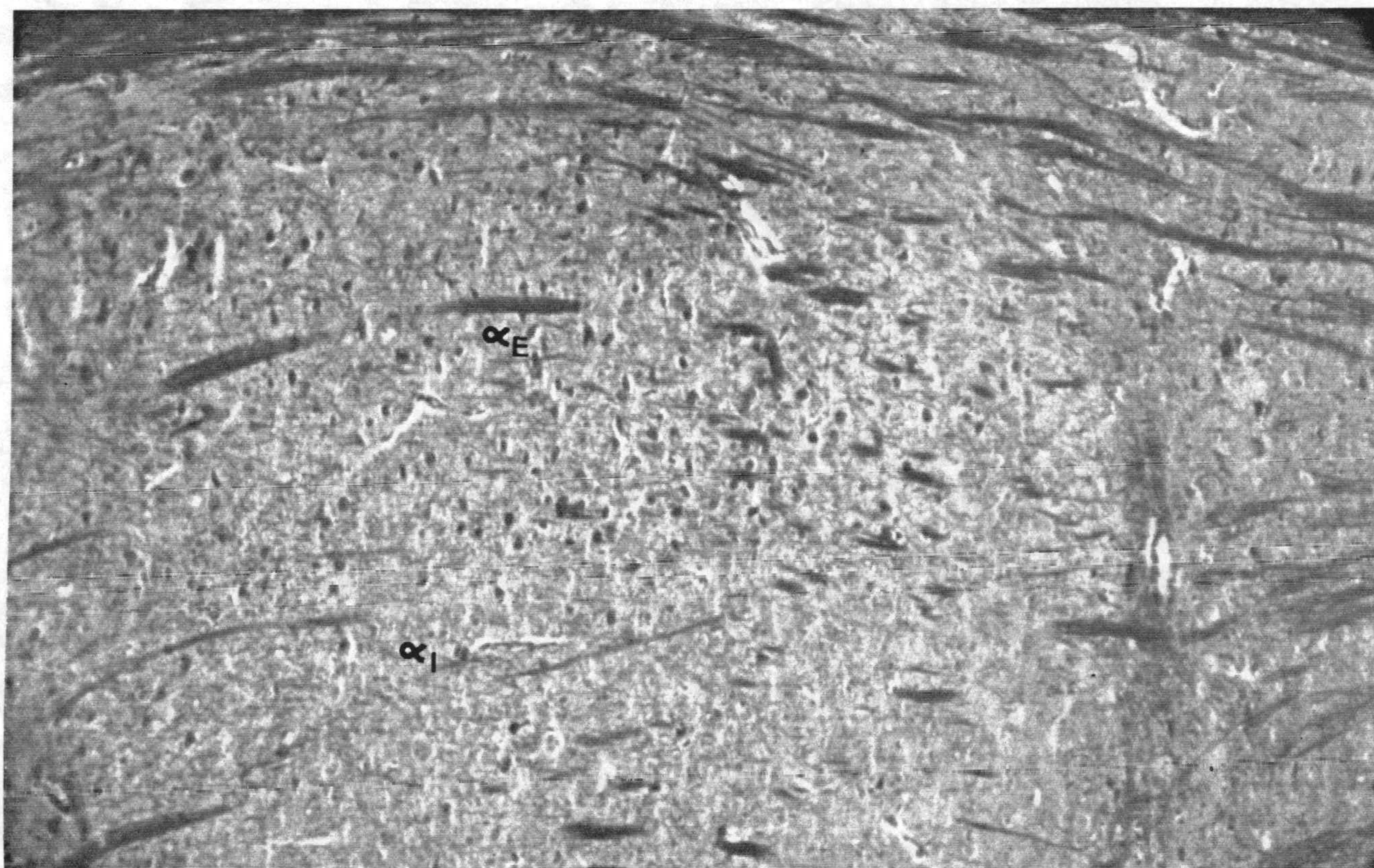


Figura 9



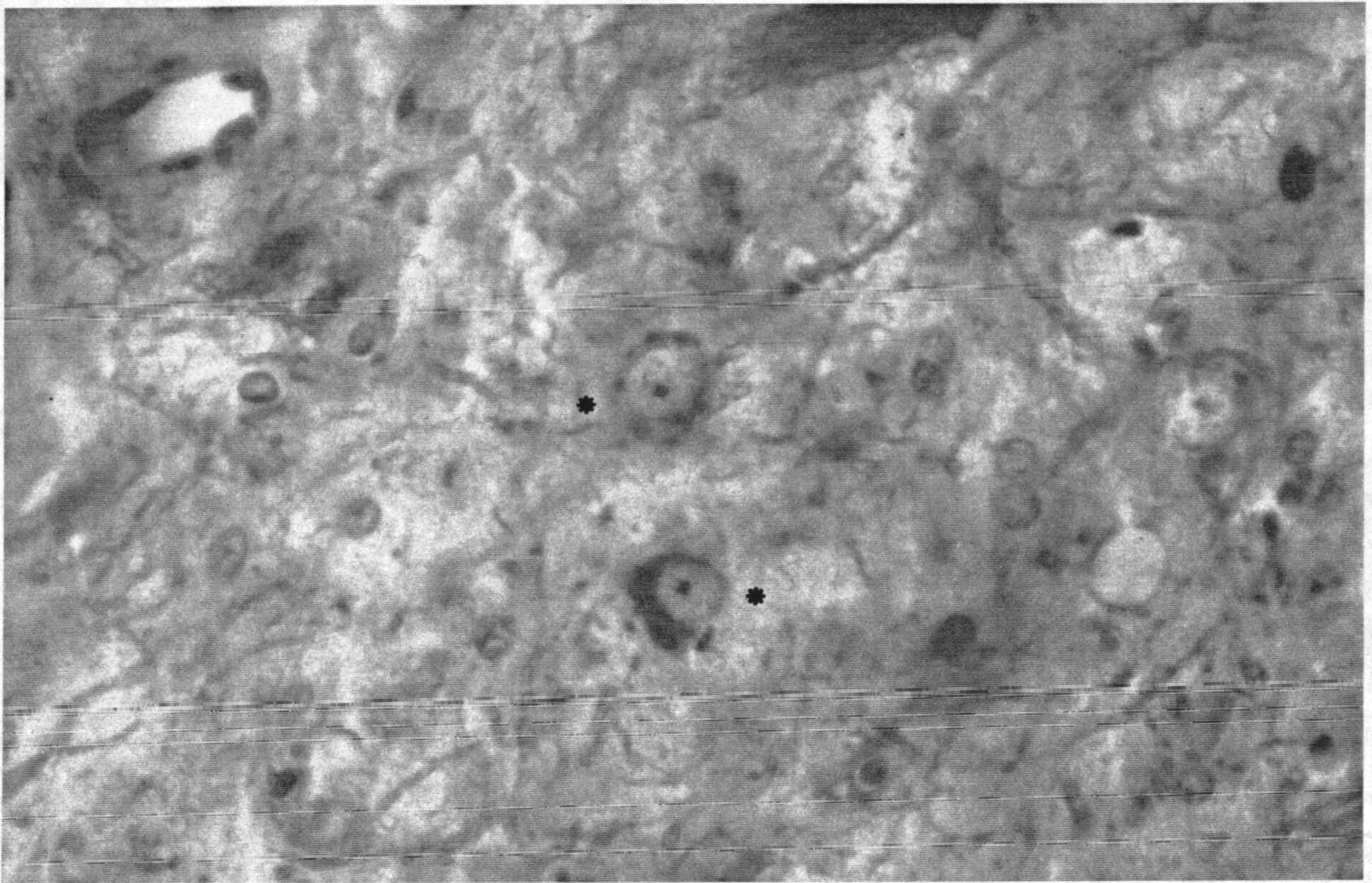


Figura 10

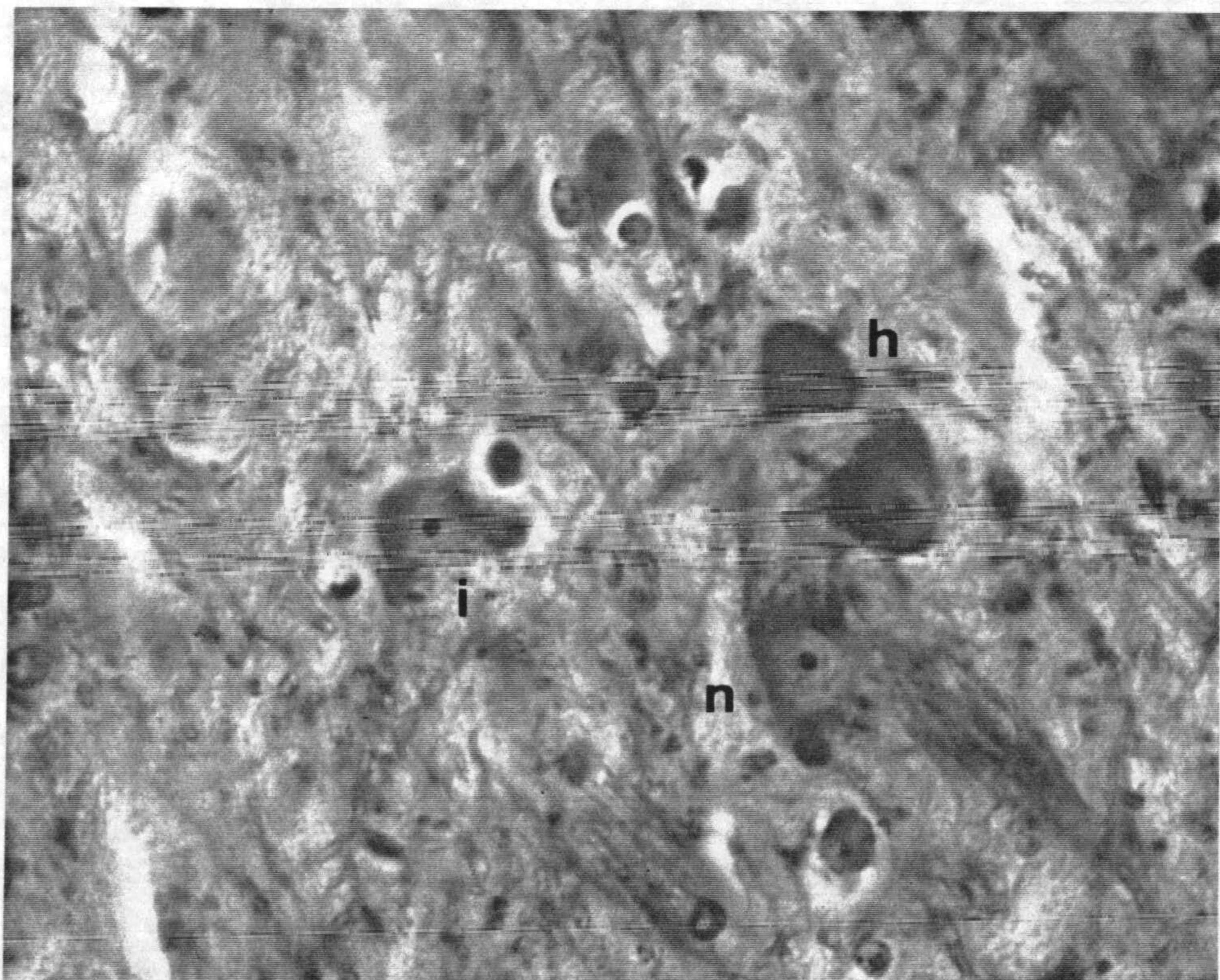


Figura 11

## 2. CALCULO DE LOS VOLUMENES EN EL NGLd DEL CONEJO

Como paso previo a las determinaciones volumétricas, hubo que proceder primeramente a una delimitación de las zonas de estudio sobre las que se llevaron a cabo las valoraciones, tal y como hemos descrito con más detalle en el correspondiente capítulo de Material y Métodos. Más tarde, tras localizar e identificar el programa "XY", empleamos el analizador semiautomático de imágenes IBAS-Kontron, con el que se procedió al cálculo de las áreas correspondientes. Estas últimas, multiplicadas por el espesor del corte, nos permitieron obtener las determinaciones de los volúmenes propiamente dichos.

Antes de proceder a cualquier valoración cuantitativa, siguiente paso tras el cálculo de volúmenes, conviene tener presente la posible retracción tisular que pueda haber sufrido el material objeto de estudio por razón de la técnica empleada. Para ello, se realizó un estudio siguiendo el proceder de Navascués y cols. (1979) (descrito en secciones previas), en un análisis que determinó la situación de los volúmenes considerados globalmente (sin distinción de fases). Se pudo comprobar que el material ofrecía un volumen que resultó ser aproximadamente un 36.5% mayor que el obtenido tras las tinciones. Este porcentaje fue el que se aplicó en todos los casos.

Cuando se efectúa la corrección sobre los valores de los volúmenes calculados para compensar los efectos de la retracción, se obtienen los valores reales. Este verdadero valor de los distintos volúmenes en el tejido fresco lo podemos estimar mediante la expresión:

$$V_R = \frac{(100 \times V_C)}{(100 - R_V)}$$

donde  $R_V$  es la retracción en volumen del tejido nervioso expresada en tanto

por ciento;  $V_C$  el volumen calculado (con retracción); y  $V_R$  el volumen real del tejido (sin retracción).

Todos los valores relativos a los volúmenes aparecen representados en tablas, donde se recogen en cuatro columnas. En la primera de ellas (ZONA) se ofrece el nombre de la zona de estudio sometida a análisis. La segunda ( $V_{\text{CALCULADO}}$ ) muestra los valores de los volúmenes calculados, sin considerar el efecto provocado por la retracción. En la tercera ( $V_{\text{REAL}}$ ) figuran los volúmenes obtenidos después de compensar los efectos motivados por la retracción, es decir los volúmenes que nos encontramos realmente en el tejido *in vivo* antes de someterlo a los procedimientos técnicos. Finalmente, en la cuarta columna (PORCENTAJE) se detallan los tantos por ciento en volumen correspondiente a cada zona de estudio en relación con el sector considerado en cada uno de los casos.

Estas tablas vienen designadas como VOLUMENES ALCOHOL 1 hasta VOLUMENES ALCOHOL 6, para el caso de los animales que han sido sometidos al tratamiento experimental con alcohol, y VOLUMENES CONTROL 1 hasta VOLUMENES CONTROL 6, para el caso de los conejos empleados como control.

Por lo que respecta a los datos aportados por estas tablas, y más concretamente por la columna correspondiente a PORCENTAJES, podemos observar, para aquellos animales tratados con alcohol, cómo el sector  $\alpha$  ocupa unos volúmenes extremos cuyos porcentajes oscilan entre el 90.17% y el 91.48% del volumen total ocupado por el NGLd. Los porcentajes restantes (8.58 % y 9.83%) se corresponden con el del volumen que ocupa el sector  $\beta$ .

Asímismo, de los datos ofrecidos en las tablas se desprende cómo dentro del sector  $\alpha$  existe un predominio del sector  $\alpha_E$  sobre el sector  $\alpha_I$ , con un porcentaje en volumen cuyos rangos oscilan entre 55.81% y el 61.20% del

total del sector  $\alpha$ .

Por su parte, en lo referente a los conejos control, podemos apreciar que el volumen ocupado por el sector  $\alpha$  oscila entre un porcentaje del 89.70% y el 90.45% del volumen total del núcleo talámico. El sector  $\beta$  ocuparía los volúmenes restantes, con porcentajes entre 9.55% y 10.30%.

Además, como ocurría con anterioridad, para el caso de los animales control, el sector  $\alpha_E$  es mayoritario dentro del sector  $\alpha$ , ya que presenta unos volúmenes que oscilan entre el 58.97% y el 60.43% de su volumen total, por los 39.57% y 41.03% del sector  $\alpha_I$ .

Finalmente, en las tablas VOLUMENES MEDIOS ALCOHOL y VOLUMENES MEDIOS CONTROL, se exponen, respectivamente, los volúmenes (calculados y reales) y porcentajes medios para cada zona del NGLd de los conejos tratados de forma experimental con alcohol y los utilizados como control.

Los volúmenes medios, expresados en tanto por ciento, ocupados por el sector  $\alpha$  ( $\alpha_E$  y  $\alpha_I$ ), aparecen representados gráficamente en la **Figura 12**. De manera más global, el volumen medio del NGLd, con sus dos sectores  $\alpha$  y  $\beta$ , queda reflejado en la **Figura 13**.

### **2.1. Comparación de valores medios**

El establecimiento de comparaciones entre los valores medios pertenecientes a los animales tratados de forma experimental con etanol y a los control, nos permitió investigar la posible existencia, ó la ausencia, de diferencias significativas en el volumen total del NGLd, en el volumen de sus dos sectores constituyentes ( $\alpha$  y  $\beta$ ), así como en el volumen ocupado por los sectores  $\alpha_E$  y  $\alpha_I$ . A este objeto, se utilizó en primer lugar el estadígrafo F de

Snedecor, con el que llevamos a cabo un análisis de la varianza. La aplicación de este análisis estadístico puso de manifiesto la ausencia de diferencias significativas entre las distintas varianzas. Este hecho hizo que, a continuación, pudiéramos recurrir al empleo del test de Student de comparación de medias, que nos permitió contrastar los valores de los volúmenes, con un nivel de significación de 0,05.

La comparación de los volúmenes medios, tanto en valores relativos como en porcentajes, entre los animales control y aquellos otros tratados con alcohol, nos permitió apreciar la ausencia de diferencias significativas ( $P < 0,05$ ) entre los volúmenes ocupados por los sectores  $\alpha_E$  y  $\alpha_I$ , volúmenes ocupados por los sectores  $\alpha$  y  $\beta$ , así como en el volumen total de los distintos núcleos talámicos.

## VOLUMENES ALCOHOL 1

ZONA	V <sub>CALCULADO</sub>	V <sub>REAL</sub>	PORCENTAJE
------	------------------------	-------------------	------------

$\alpha_E$	SUPERIOR	1,062749	1,673620	42,35
	MEDIA	1,145776	1,804372	45,66
	INFERIOR	0,300728	0,473587	11,99
	<b>TOTAL</b>	2,509253	3,951579	100

$\alpha_I$	SUPERIOR	0,599872	0,944680	30,20
	MEDIA	1,034711	1,629466	52,09
	INFERIOR	0,351847	0,554090	17,71
	<b>TOTAL</b>	1,986430	3,128236	100

SECTOR	$\alpha_E$ TOTAL	2,509253	3,951579	55,81
	$\alpha_I$ TOTAL	1,986430	3,128236	44,19
	<b><math>\alpha</math> TOTAL</b>	4,495683	7,079816	100

SECTOR	$\alpha$	4,495683	7,079816	91,42
	$\beta$	0,421873	0,664367	8,58
V <sub>TOTAL</sub> NGLd		4,917556	7,744183	100

† Todos los valores referentes a los volúmenes se expresan en mm<sup>3</sup>

Volúmenes (calculados y reales) y porcentajes estimados por sectores y zonas:  
ALCOHOL 1.

## VOLUMENES ALCOHOL 2

ZONA	V <sub>CALCULADO</sub>	V <sub>REAL</sub>	PORCENTAJE
------	------------------------	-------------------	------------

$\alpha_E$	SUPERIOR	0,924468	1,455855	39,89
	MEDIA	1,083452	1,706224	46,75
	INFERIOR	0,309624	0,487597	13,36
	<b>TOTAL</b>	<b>2,317544</b>	<b>3,649676</b>	<b>100</b>

$\alpha_I$	SUPERIOR	0,442902	0,697483	29,21
	MEDIA	0,769965	1,212543	50,78
	SUPERIOR	0,303407	0,477806	20,01
	<b>TOTAL</b>	<b>1,516276</b>	<b>2,387836</b>	<b>100</b>

SECTOR	$\alpha_E$ TOTAL	2,317544	3,649676	60,45
	$\alpha_I$ TOTAL	1,516276	2,387836	39,55
	<b><math>\alpha</math> TOTAL</b>	<b>3,833820</b>	<b>6,037512</b>	<b>100</b>

SECTOR	$\alpha$	3,833820	6,037512	90,17
	$\beta$	0,417949	0,658187	9,83
<b>V<sub>TOTAL</sub> NGLd</b>		<b>4,251769</b>	<b>6,695699</b>	<b>100</b>

† Todos los valores referentes a los volúmenes se expresan en mm<sup>3</sup>

Volúmenes (calculados y reales) y porcentajes estimados por sectores y zonas:  
ALCOHOL 2.

### VOLUMENES ALCOHOL 3

ZONA	V <sub>CALCULADO</sub>	V <sub>REAL</sub>	PORCENTAJE
------	------------------------	-------------------	------------

$\alpha_E$	SUPERIOR	0,666588	1,049745	36,35
	MEDIA	0,996534	1,569345	52,30
	INFERIOR	0,208194	0,327864	11,35
	<b>TOTAL</b>	1,871316	2,946954	100

$\alpha_I$	SUPERIOR	0,364759	0,574424	29,64
	MEDIA	0,614306	0,967411	49,91
	SUPERIOR	0,251736	0,396435	20,45
	<b>TOTAL</b>	1,230801	1,938269	100

SECTOR	$\alpha_E$ TOTAL	1,871316	2,946954	60,32
	$\alpha_I$ TOTAL	1,230801	1,938269	39,68
	<b><math>\alpha</math> TOTAL</b>	3,102117	4,885224	100

SECTOR	$\alpha$	3,102117	4,885224	90,71
	$\beta$	0,317632	0,500208	9,29
<b>V<sub>TOTAL</sub> NGLd</b>		3,419749	5,385431	100

† Todos los valores referentes a los volúmenes se expresan en mm<sup>3</sup>

Volúmenes (calculados y reales) y porcentajes estimados por sectores y zonas:  
ALCOHOL 3.



## VOLUMENES ALCOHOL 4

ZONA	V <sub>CALCULADO</sub>	V <sub>REAL</sub>	PORCENTAJE
------	------------------------	-------------------	------------

$\alpha_E$	SUPERIOR	0,803172	1,264838	37,47
	MEDIA	1,077112	1,696239	50,25
	INFERIOR	0,263223	0,414524	12,28
	<b>TOTAL</b>	2,143507	3,375602	100

$\alpha_I$	SUPERIOR	0,406555	0,640244	29,92
	MEDIA	0,693194	1,091644	51,01
	SUPERIOR	0,259101	0,408033	19,07
	<b>TOTAL</b>	1,358850	2,139921	100

SECTOR	$\alpha_E$ TOTAL	2,143507	3,375602	61,20
	$\alpha_I$ TOTAL	1,358805	2,139921	38,80
	<b><math>\alpha</math> TOTAL</b>	3,502357	5,515523	100

SECTOR	$\alpha$	3,502357	5,515523	90,37
	$\beta$	0,373218	0,587745	9,63
V <sub>TOTAL</sub> NGLd		3,875575	6,103268	100

† Todos los valores referentes a los volúmenes se expresan en mm<sup>3</sup>

Volúmenes (calculados y reales) y porcentajes estimados por sectores y zonas:  
ALCOHOL 4.

## VOLUMENES ALCOHOL 5

ZONA		$V_{\text{CALCULADO}}$	$V_{\text{REAL}}$	PORCENTAJE
$\alpha_E$	SUPERIOR	0,769323	1,211532	39,32
	MEDIA	0,967954	1,524337	49,47
	INFERIOR	0,219375	0,345472	11,21
	<b>TOTAL</b>	1,956652	3,081342	100
$\alpha_I$	SUPERIOR	0,369205	0,581425	29,71
	MEDIA	0,657846	1,035978	52,93
	SUPERIOR	0,215776	0,339805	17,36
	<b>TOTAL</b>	1,242827	1,957208	100
SECTOR	$\alpha_E$ TOTAL	1,956652	3,081342	61,15
	$\alpha_I$ TOTAL	1,242827	1,957208	38,85
	<b><math>\alpha</math> TOTAL</b>	3,199479	5,038550	100
SECTOR	$\alpha$	3,199479	5,038550	90,51
	$\beta$	0,335547	0,528420	9,41
$V_{\text{TOTAL}} \text{ NGLd}$		3,535026	5,598466	100

† Todos los valores referentes a los volúmenes se expresan en  $\text{mm}^3$

Volúmenes (calculados y reales) y porcentajes estimados por sectores y zonas:  
ALCOHOL 5.

## VOLUMENES ALCOHOL 6

ZONA		V <sub>CALCULADO</sub>	V <sub>REAL</sub>	PORCENTAJE
$\alpha_E$	SUPERIOR	1,112964	1,752699	40,53
	MEDIA	1,274443	2,006997	46,41
	INFERIOR	0,358920	0,565228	13,06
	<b>TOTAL</b>	<b>2,746327</b>	<b>4,324924</b>	<b>100</b>
$\alpha_I$	SUPERIOR	0,585571	0,922159	27,70
	MEDIA	1,042393	1,641564	49,30
	SUPERIOR	0,386222	0,608224	23,00
	<b>TOTAL</b>	<b>2,114186</b>	<b>3,329427</b>	<b>100</b>
SECTOR	$\alpha_E$ TOTAL	2,746327	4,324924	56,50
	$\alpha_I$ TOTAL	2,114186	3,329427	43,50
	<b><math>\alpha</math> TOTAL</b>	<b>4,860513</b>	<b>7,654351</b>	<b>100</b>
SECTOR	$\alpha$	4,860513	7,654351	91,48
	$\beta$	0,452893	0,713217	8,52
<b>V<sub>TOTAL</sub> NGLd</b>		<b>5,313406</b>	<b>8,367568</b>	<b>100</b>

† Todos los valores referentes a los volúmenes se expresan en mm<sup>3</sup>

Volúmenes (calculados y reales) y porcentajes estimados por sectores y zonas:  
ALCOHOL 6.

## VOLUMENES CONTROL 1

ZONA		$V_{\text{CALCULADO}}$	$V_{\text{REAL}}$	PORCENTAJE
$\alpha_E$	SUPERIOR	0,856923	1,349485	34,61
	MEDIA	1,175329	1,850912	47,47
	INFERIOR	0,443688	0,698721	17,92
	<b>TOTAL</b>	<b>2,475940</b>	<b>3,899118</b>	<b>100</b>
$\alpha_I$	SUPERIOR	0,518642	0,816759	31,99
	MEDIA	0,826520	1,301606	50,98
	SUPERIOR	0,276101	0,434805	17,03
	<b>TOTAL</b>	<b>1,621263</b>	<b>2,553170</b>	<b>100</b>
SECTOR	$\alpha_E$ TOTAL	2,475940	3,899118	60,43
	$\alpha_I$ TOTAL	1,621263	2,553170	39,57
	<b>TOTAL</b>	<b>4,097203</b>	<b>6,452288</b>	<b>100</b>
SECTOR	$\alpha$	4,097203	6,452288	90,45
	$\beta$	0,432596	0,681253	9,55
$V_{\text{TOTAL}} \text{ NGLd}$		4,529799	7,133542	100

† Todos los valores referentes a los volúmenes se expresan en  $\text{mm}^3$

Volúmenes (calculados y reales) y porcentajes estimados por sectores y zonas:  
CONTROL 1.

## VOLUMENES CONTROL 2

ZONA	V <sub>CALCULADO</sub>	V <sub>REAL</sub>	PORCENTAJE
------	------------------------	-------------------	------------

$\alpha_E$	SUPERIOR	0,926421	1,458931	37,33
	MEDIA	1,113542	1,753609	44,87
	INFERIOR	0,441744	0,695660	17,80
	<b>TOTAL</b>	<b>2,481707</b>	<b>3,908200</b>	<b>100</b>

$\alpha_I$	SUPERIOR	0,548858	0,864343	32,13
	MEDIA	0,863858	1,360406	50,57
	SUPERIOR	0,295526	0,465395	17,30
	<b>TOTAL</b>	<b>1,708243</b>	<b>2,690146</b>	<b>100</b>

SECTOR	$\alpha_E$ TOTAL	2,481707	3,908200	59,23
	$\alpha_I$ TOTAL	1,708243	2,690146	40,77
	<b>TOTAL</b>	<b>4,189950</b>	<b>6,598346</b>	<b>100</b>

SECTOR	$\alpha$	4,189950	6,598346	90,17
	$\beta$	0,456773	0,719327	9,83
<b>V<sub>TOTAL</sub> NGLd</b>		<b>4,646723</b>	<b>7,317674</b>	<b>100</b>

† Todos los valores referentes a los volúmenes se expresan en mm<sup>3</sup>

Volúmenes (calculados y reales) y porcentajes estimados por sectores y zonas:  
CONTROL 2.

### VOLUMENES CONTROL 3

ZONA	V <sub>CALCULADO</sub>	V <sub>REAL</sub>	PORCENTAJE
------	------------------------	-------------------	------------

$\alpha_E$	SUPERIOR	0,993884	1,565172	38,75
	MEDIA	1,122897	1,768342	43,78
	SUPERIOR	0,448081	0,705639	17,47
	<b>TOTAL</b>	2,564862	4,039153	100

$\alpha_I$	SUPERIOR	0,586435	0,923520	33,41
	MEDIA	0,880794	1,387077	50,18
	SUPERIOR	0,288040	0,453606	15,41
	<b>TOTAL</b>	1,755269	2,764203	100

SECTOR	$\alpha_E$ TOTAL	2,564862	4,039153	59,37
	$\alpha_I$ TOTAL	1,755269	2,764203	40,63
	<b>TOTAL</b>	4,320131	6,803356	100

SECTOR	$\alpha$	4,320131	6,803356	90,29
	$\beta$	0,464597	0,731649	9,71
V <sub>TOTAL</sub> NGLd		4,784728	7,535005	100

† Todos los valores referentes a los volúmenes se expresan en mm<sup>3</sup>

Volúmenes (calculados y reales) y porcentajes estimados por sectores y zonas:  
CONTROL 3.

## VOLUMENES CONTROL 4

ZONA	V <sub>CALCULADO</sub>	V <sub>REAL</sub>	PORCENTAJE
------	------------------------	-------------------	------------

$\alpha_E$	SUPERIOR	0,941569	1,482786	35,96
	MEDIA	1,227234	1,932652	46,87
	INFERIOR	0,449576	0,707994	17,17
	<b>TOTAL</b>	<b>2,618379</b>	<b>4,123431</b>	<b>100</b>

$\alpha_I$	SUPERIOR	0,545780	0,859496	31,41
	MEDIA	0,887740	1,398016	51,09
	SUPERIOR	0,304080	0,478866	17,50
	<b>TOTAL</b>	<b>1,737600</b>	<b>2,736378</b>	<b>100</b>

SECTOR	$\alpha_E$ TOTAL	2,618379	4,123431	60,11
	$\alpha_I$ TOTAL	1,737600	2,736378	39,89
	<b>TOTAL</b>	<b>4,355979</b>	<b>6,859809</b>	<b>100</b>

SECTOR	$\alpha$	4,355979	6,859809	89,91
	$\beta$	0,488842	0,769830	10,09
V <sub>TOTAL</sub> NGLd		4,844821	7,629639	100

† Todos los valores referentes a los volúmenes se expresan en mm<sup>3</sup>

Volúmenes (calculados y reales) y porcentajes estimados por sectores y zonas:  
CONTROL 4.

## VOLUMENES CONTROL 5

ZONA		$V_{\text{CALCULADO}}$	$V_{\text{REAL}}$	PORCENTAJE
$\alpha_E$	SUPERIOR	0,932958	1,469225	35,01
	MEDIA	1,242078	1,956028	46,62
	INFERIOR	0,489225	0,770433	18,37
	<b>TOTAL</b>	<b>2,664261</b>	<b>4,195687</b>	<b>100</b>
$\alpha_I$	SUPERIOR	0,542020	0,853575	30,99
	MEDIA	0,901793	1,420146	51,56
	SUPERIOR	0,305203	0,480635	17,45
	<b>TOTAL</b>	<b>1,749016</b>	<b>2,754356</b>	<b>100</b>
SECTOR	$\alpha_E$ TOTAL	2,664261	4,195687	58,97
	$\alpha_I$ TOTAL	1,749016	2,754356	41,03
	<b>TOTAL</b>	<b>4,413277</b>	<b>6,950042</b>	<b>100</b>
SECTOR	$\alpha$	4,413277	6,950042	89,70
	$\beta$	0,506945	0,798338	10,30
$V_{\text{TOTAL}} \text{ NGLd}$		4,920222	7,873161	100

† Todos los valores referentes a los volúmenes se expresan en  $\text{mm}^3$

Volúmenes (calculados y reales) y porcentajes estimados por sectores y zonas:  
CONTROL 5.



## VOLUMENES CONTROL 6

ZONA	V <sub>CALCULADO</sub>	V <sub>REAL</sub>	PORCENTAJE
------	------------------------	-------------------	------------

$\alpha_E$	SUPERIOR	0,921214	1,450773	36,05
	MEDIA	1,166019	1,836250	45,63
	INFERIOR	0,468145	0,737236	18,32
	<b>TOTAL</b>	<b>2,555379</b>	<b>4,024219</b>	<b>100</b>

$\alpha_I$	SUPERIOR	0,563084	0,886746	32,44
	MEDIA	0,871009	1,371668	50,18
	SUPERIOR	0,301677	0,475082	17,38
	<b>TOTAL</b>	<b>1,735770</b>	<b>2,733496</b>	<b>100</b>

SECTOR	$\alpha_E$ TOTAL	2,555379	4,024219	59,55
	$\alpha_I$ TOTAL	1,735770	2,733496	40,45
	<b>TOTAL</b>	<b>4,291149</b>	<b>6,757715</b>	<b>100</b>

SECTOR	$\alpha$	4,291149	6,757715	90,03
	$\beta$	0,475205	0,748374	9,97
V <sub>TOTAL</sub> NGLd		4,766354	7,506069	100

† Todos los valores referentes a los volúmenes se expresan en mm<sup>3</sup>

Volúmenes (calculados y reales) y porcentajes estimados por sectores y zonas:  
CONTROL 6.

## VOLUMENES ALCOHOL MEDIAS

ZONA	V <sub>CALCULADO</sub>	V <sub>REAL</sub>	PORCENTAJE	
$\alpha_E$	SUPERIOR	0,889877 ± 0,065140	1,401381 ± 0,102583	39,32 ± 0,80
	MEDIA	1,090878 ± 0,041152	1,717919 ± 0,064806	48,47 ± 1,16
	SUPERIOR	0,276677 ± 0,021462	0,435712 ± 0,033799	12,21 ± 0,33
	<b>TOTAL</b>	<b>2,257433</b> ± 0,124563	<b>3,555013</b> ± 0,196163	<b>100</b>
$\alpha_I$	SUPERIOR	0,461477 ± 0,039364	0,726736 ± 0,061990	29,40 ± 0,33
	MEDIA	0,802069 ± 0,070871	1,263101 ± 0,111608	51,00 ± 0,50
	SUPERIOR	0,294681 ± 0,024187	0,464065 ± 0,038089	19,60 ± 0,78
	<b>TOTAL</b>	<b>1,574895</b> ± 0,143273	<b>2,480149</b> ± 0,225626	<b>100</b>

† Todos los valores referentes a los volúmenes se expresan en mm<sup>3</sup>

Volúmenes (calculados y reales) y porcentajes medios estimados por sectores y zonas. Intervalo de confianza (valor medio ± 1.96 SE) del 95%.

## VOLUMENES ALCOHOL MEDIAS (Cont.)

ZONA		$V_{\text{CALCULADO}}$	$V_{\text{REAL}}$	PORCENTAJE
SECTOR	$\alpha_E$ TOTAL	2,257433 $\pm 0,124563$	3,555013 $\pm 0,196163$	59,24 $\pm 0,90$
	$\alpha_I$ TOTAL	1,574895 $\pm 0,143273$	2,480149 $\pm 0,225626$	40,76 $\pm 0,90$
	<b>TOTAL</b>	3,832328 $\pm 0,265612$	6,035163 $\pm 0,418287$	100
SECTOR	$\alpha$	3,832328 $\pm 0,265612$	6,035163 $\pm 0,418287$	90,78 $\pm 0,20$
	$\beta$	0,386519 $\pm 0,019835$	0,608691 $\pm 0,031237$	9,22 $\pm 0,20$
$V_{\text{TOTAL}} \text{ NGLd}$		4,218847 $\pm 0,284377$	6,649102 $\pm 0,445756$	100

† Todos los valores referentes a los volúmenes se expresan en  $\text{mm}^3$

Volúmenes (calculados y reales) y porcentajes medios estimados por sectores y zonas. Intervalo de confianza (valor medio  $\pm 1.96 \text{ SE}$ ) del 95%.

## VOLUMENES CONTROL MEDIAS

ZONA	V <sub>CALCULADO</sub>	V <sub>REAL</sub>	PORCENTAJE
------	------------------------	-------------------	------------

$\alpha_E$	SUPERIOR	0,928833 $\pm 0,016368$	1,462729 $\pm 0,025777$	36,28 $\pm 0,57$
	MEDIA	1,174516 $\pm 0,019578$	1,849632 $\pm 0,030832$	45,87 $\pm 0,51$
	SUPERIOR	0,456743 $\pm 0,006886$	0,719280 $\pm 0,010844$	17,84 $\pm 0,18$
	<b>TOTAL</b>	2,560088 $\pm 0,027648$	4,031635 $\pm 0,043540$	100

$\alpha_I$	SUPERIOR	0,550803 $\pm 0,008434$	0,867406 $\pm 0,013282$	32,06 $\pm 0,31$
	MEDIA	0,871952 $\pm 0,009644$	1,373153 $\pm 0,015188$	50,76 $\pm 0,20$
	SUPERIOR	0,295104 $\pm 0,004206$	0,464731 $\pm 0,006624$	17,01 $\pm 0,30$
	<b>TOTAL</b>	1,717860 $\pm 0,018637$	2,705291 $\pm 0,029349$	100

† Todos los valores referentes a los volúmenes se expresan en mm<sup>3</sup>

Volúmenes (calculados y reales) y porcentajes medios estimados por sectores y zonas. Intervalo de confianza (valor medio  $\pm 1.96$  SE) del 95%.

## VOLUMENES CONTROL MEDIAS (Cont.)

ZONA	V <sub>CALCULADO</sub>	V <sub>REAL</sub>	PORCENTAJE
------	------------------------	-------------------	------------

SECTOR	$\alpha_E$ TOTAL	2,560088 $\pm 0,027648$	4,031635 $\pm 0,043540$	59,61 $\pm 0,21$
	$\alpha_I$ TOTAL	1,717860 $\pm 0,018637$	2,705291 $\pm 0,029349$	40,39 $\pm 0,21$
	<b>TOTAL</b>	4,277948 $\pm 0,043066$	6,736926 $\pm 0,067821$	100

SECTOR	$\alpha$	4,277948 $\pm 0,043066$	6,736926 $\pm 0,067821$	90,09 $\pm 0,10$
	$\beta$	0,470818 $\pm 0,009643$	0,741458 $\pm 0,015183$	9,91 $\pm 0,10$
<b>V<sub>TOTAL</sub> NGLd</b>		4,748774 $\pm 0,052330$	7,499182 $\pm 0,094992$	100

† Todos los valores referentes a los volúmenes se expresan en mm<sup>3</sup>

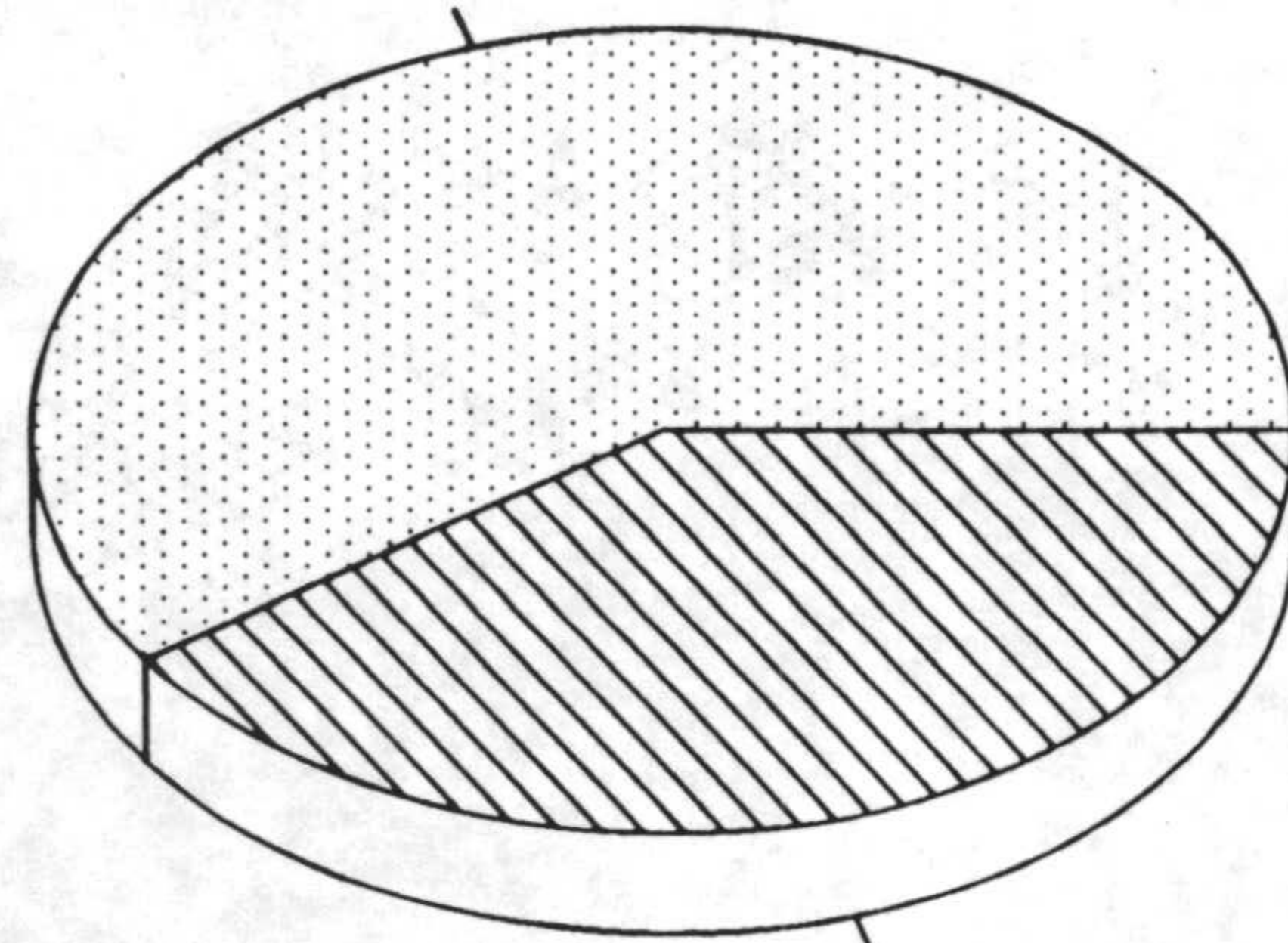
Volúmenes (calculados y reales) y porcentajes medios estimados por sectores y zonas. Intervalo de confianza (valor medio  $\pm 1.96$  SE) del 95%.

# VOLUMENES MEDIOS

## Sector Alfa

---

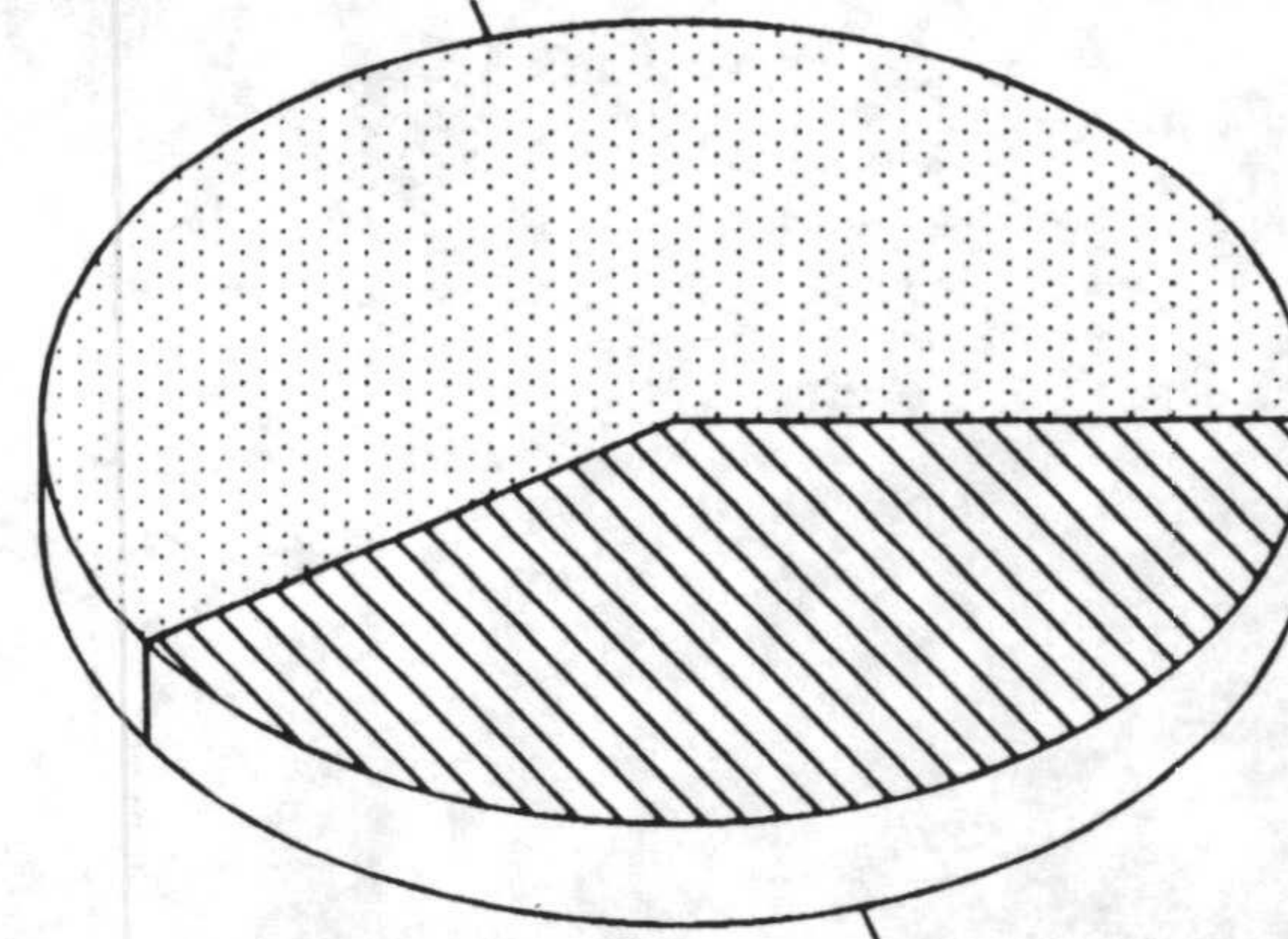
Alfa Externo  
60%



Alfa Interno  
40%

CONTROL

Alfa Externo  
59%



Alfa Interno  
41%

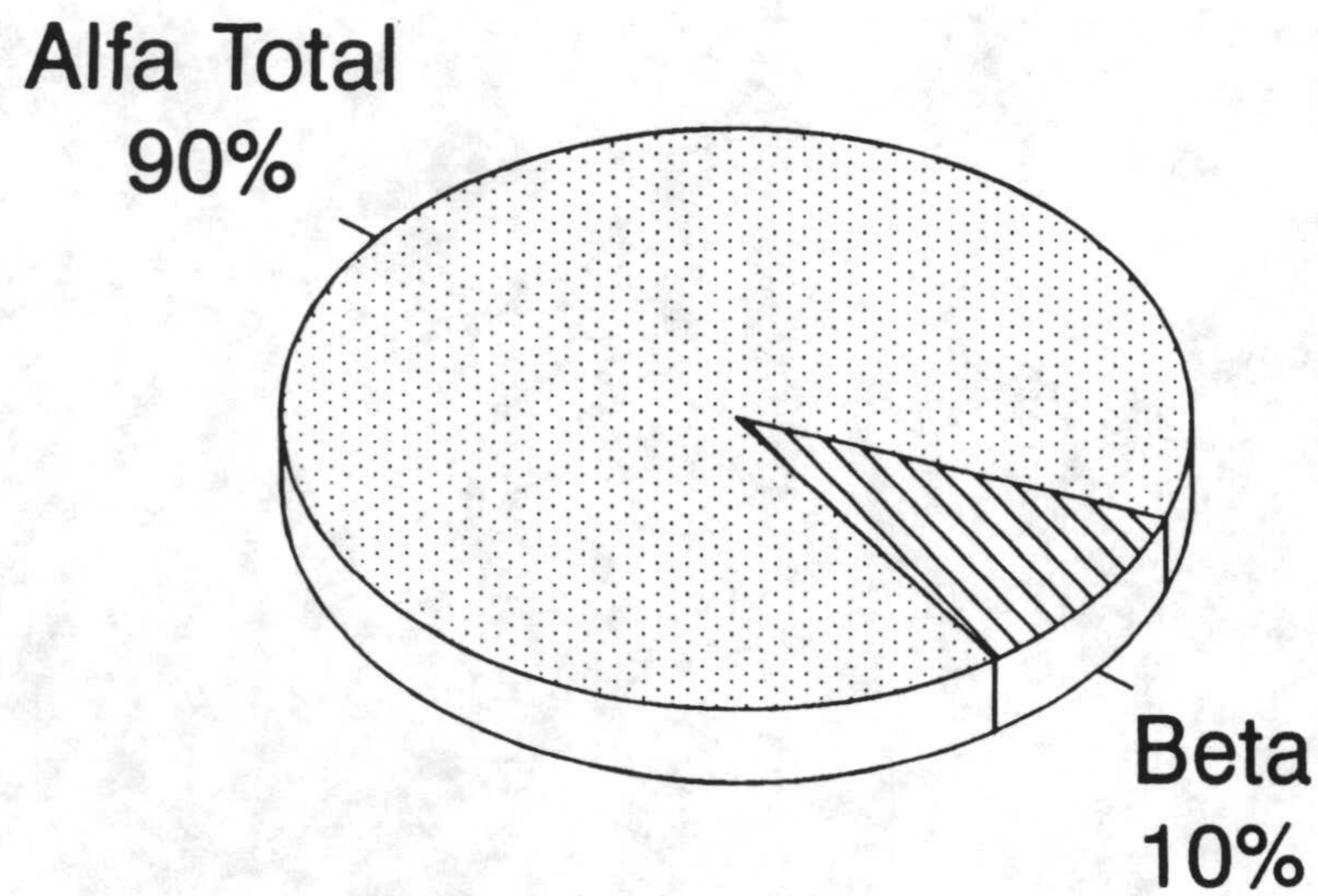
ALCOHOL

Figura 12

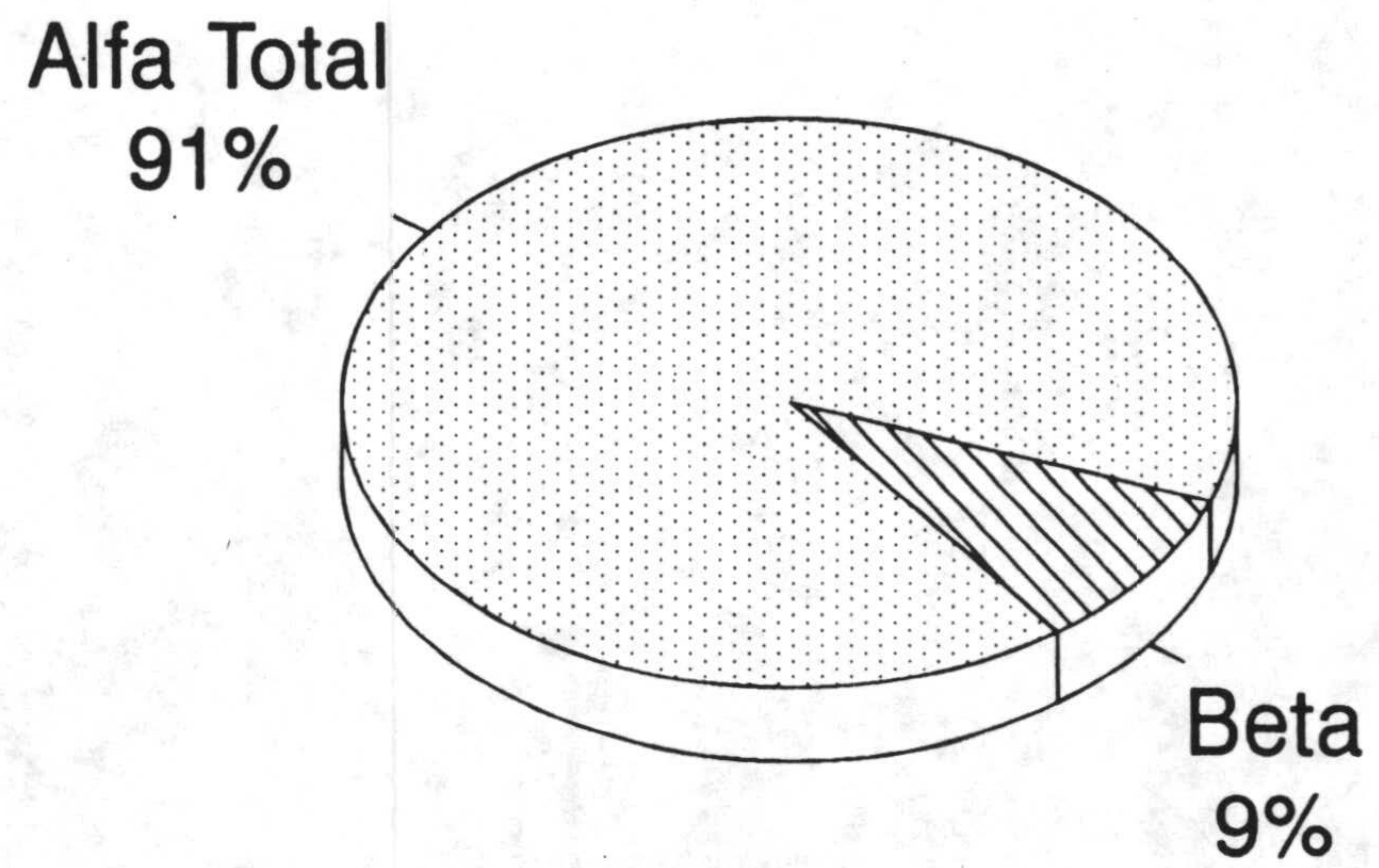
# VOLUMENES MEDIOS

## Sectores Alfa y Beta

---



CONTROL



ALCOHOL

Figura 13

### **3. ESTIMACION DEL NUMERO DE NEURONAS**

Finalizada la determinación de los volúmenes ocupados por cada zona de estudio de los distintos NGLd, se procedió a dar el siguiente paso consistente en la realización de los recuentos neuronales sobre cada una de dichas zonas, tal y como hemos expuesto anteriormente en las secciones de Material y Métodos correspondientes.

#### **3.1. Cálculo de la densidad neuronal**

A modo de recordatorio, la densidad neuronal se calculó mediante observación microscópica con un objetivo de 40X, empleando una retícula ocular y utilizando el nucléolo como unidad de recuento. Las determinaciones se llevaron a cabo en campos de análisis de un área de  $4 \times 10^4 \mu\text{m}^2$ , con lo cual y teniendo en cuenta el grosor medio del corte ( $t = 9.96 \mu\text{m} \pm 0.40 \mu\text{m}$ ; valor utilizado por aproximación de  $10 \mu\text{m}$ ), resultaron paralelepípedos de recuento de  $4 \times 10^5 \mu\text{m}^3$ . Para cada zona analizada, el número total de paralelepípedos estudiados se calculó según el procedimiento en el que:

$$N = \frac{V_T}{a \times t} = \frac{\text{Volumen de la zona}}{\text{Volumen del paralelepípedo unidad}}$$

siendo N el número total de paralelepípedos de recuento;  $V_T$  el volumen total para cada zona analizada; "a" el área del campo de análisis; y "t" el grosor medio del corte.

Conocido el valor de N, podemos determinar el número de paralelepípedos (n) necesario para que los valores obtenidos tras los recuentos fueran representativos del total de los integrantes en la zona correspondiente. La cantidad de paralelepípedos (n) que han de componer la muestra, donde se han de realizar los recuentos, se calculó mediante la



fórmula de Azorín Poch (1972). En dicha fórmula aparece N (número total de paralelepípedos), una constante (K) que representa la desviación para un nivel de significación dado, la varianza de la población ( $s^2$ ) y el error máximo admisible (e) para lo que se estima como número total de neuronas, y que se puede obtener a partir de la media de la población (x) en cada caso.

### **3.1.1. Corrección de la sobreestimación numérica**

Antes de proceder al cálculo de la densidad neuronal, como resultado del grosor finito de las secciones empleadas, se puede incurrir en una sobreestimación del número real de células, dado que en la mayoría de los casos resulta significativa.

Tal y como hemos expuesto con anterioridad en secciones de Material y Métodos, existen varias fórmulas correctoras que tienen por objeto el evitar la sobreestimación en el número de neuronas a la hora de llevar a cabo los correspondientes recuentos. La aplicación de estas fórmulas nos permiten poder calcular el número real de neuronas con bastante aproximación. De todas ellas nos inclinamos por la elección de la fórmula de Floderus por ser la más fiable.

$$N_a = \frac{n_a \times t}{t + D - 2K}$$

Tras medir los diámetros de los nucléolos y comprobar mediante la fórmula de Azorín Poch que el número que se sometió a análisis era representativo de la población (estimado en 350 nucléolos), pudimos observar la existencia de un perfil de tamaño mínimo (r) por debajo del cual no hemos sido capaces de distinguir ningún otro. Una vez conocido el radio de dicho perfil y el radio medio (R) calculado para el nucléolo, fuimos capaces de hallar el valor de K ó h. En el cuadro NUCLEOLO VALORES MEDIOS se adjuntan

estos datos, para cada uno de los dos grupos experimentales sometidos a estudio. Aparte de las filas con los valores de R y de r, se ofrece el número de nucléolos recontados, además de una última fila donde se consigna el diámetro medio nucleolar ( $\bar{D}$ ).

De esta tabla se desprende que el valor de R resulta muy semejante en los dos grupos considerados, siendo de 1.206  $\mu\text{m}$  para el caso de los animales tratados con alcohol, y de 1.193  $\mu\text{m}$  para los conejos control. Asimismo, "r" resultó muy semejante en ambos casos, con un valor de 0.698  $\mu\text{m}$  para los alcohol y 0.650  $\mu\text{m}$  para los control. Finalmente, el valor de  $\bar{D}$  fue de 2.415  $\mu\text{m}$  para los animales tratados con la droga, y de 2.385  $\mu\text{m}$  para los animales control.

En la fórmula de Floderus, el cociente que multiplica al número de nucléolos contados mediante recuento ( $n_a$ ) es lo que se conoce como factor de corrección (f).

$$f = \frac{t}{t + D - 2k}$$

En nuestro caso, tanto para los animales sometidos a la acción del alcohol como para los control, el valor de "f" resultó ser de 0.83.

### 3.1.2. Comparación de valores medios

Después de aplicar el estadígrafo F de Snedecor y comprobar la ausencia de diferencias significativas entre las varianzas de los diámetros nucleolares, se procedió a utilizar la t-Student. Asimismo, este test estadístico nos permitió observar la no existencia de diferencias significativas ( $P < 0,05$ ) entre los diámetros nucleolares medios de los dos grupos experimentales.

### 3.2. Comparación de valores medios de densidad neuronal

En las tablas designadas como RECUELTOS ALCOHOL 1 a RECUELTOS ALCOHOL 6, aparecen representadas las densidades neuronales correspondientes a los NGLd de aquellos animales tratados con etanol. En las denominadas como RECUELTOS CONTROL 1 a RECUELTOS CONTROL 6 aparecen los valores correspondientes a los animales control.

Las tablas anteriormente descritas están constituidas por seis columnas. En la primera (ZONA) detallamos las zonas de estudio. La segunda (Nº medio de neuronas/paral.) corresponde al número medio de neuronas recontadas por paralelepípedo. En la tercera (Nº total de paralelepípedos ó N) se presenta el número total de paralelepípedos de cada zona de estudio. La cuarta ofrece el número total de neuronas ( $X_t$ ), obtenido al multiplicar el número medio de neuronas por paralelepípedo por N ó número total de paralelepípedos. La quinta representa el número real de neuronas ( $X_r$ ) existente en cada zona, que se obtiene después de efectuada la corrección debida a la sobreestimación ( $f = 0,83$ ). Por último, en la sexta columna se presentan los valores de densidad media expresados en número de células por cada  $10^6 \mu^3$ .

En la tabla RECUELTOS MEDIOS se reflejan y resumen los valores medios de densidad neuronal para los dos grupos experimentales estudiados (alcohol y control) y para cada uno de los sectores y zonas consideradas para su análisis. Estos valores aparecen representados de forma gráfica en la **Figura 14**. Por su parte, en la **Figura 15** se representa la densidad neuronal en el sector  $\alpha_E$ ,  $\alpha_I$  y  $\beta$ , considerados globalmente.

Resulta interesante reseñar algunas evidencias que se desprenden de las tablas anteriormente descritas. En ellas se puede apreciar que independientemente de que consideremos los animales tratados

experimentalmente con alcohol o los control, existe una apreciable diferencia de densidad entre los sectores  $\alpha_E$ ,  $\alpha_I$  y  $\beta$ , que constituyen el NGLd del conejo. Así, para los geniculados control, la densidad neuronal más alta se observa en el sector  $\alpha_E$ , con unos valores que oscilan alrededor de 27 neuronas/ $10^6 \mu\text{m}^3$ , siendo inferior en el sector  $\alpha_I$ , donde están en torno a 19 neuronas/ $10^6 \mu\text{m}^3$ . La densidad neuronal más baja se pudo observar en el sector  $\beta$ , donde el rango se sitúa hacia las 9 neuronas/ $10^6 \mu\text{m}^3$ .

Para el caso de los geniculados sometidos a la acción del alcohol, la densidad neuronal es de unas 24 neuronas/ $10^6 \mu\text{m}^3$  en el sector  $\alpha_E$ ; de unas 16 neuronas/ $10^6 \mu\text{m}^3$  en el sector  $\alpha_I$ ; y de 7 neuronas/ $10^6 \mu\text{m}^3$  en el sector  $\beta$ .

Además, dentro del sector  $\alpha_E$  Total de los conejos tratados con alcohol y de los control, se aprecia en todos los casos estudiados (salvo en dos de ellos) que la zona inferior ofrece valores de densidad neuronal más bajos que la superior y que la media. Esta circunstancia también se cumple para el caso del sector  $\alpha_I$ .

Obtenidos los datos de densidad neuronal, se procedió a llevar a cabo el análisis estadístico consistente en la comparación por zonas de los valores medios de dicho parámetro para los animales tratados con la droga y los control. Para ello, se utilizó en primer lugar el estadígrafo F de Snedecor para estudiar la varianza. Tras observar que éstas eran significativamente iguales, se utilizó la t-Student (nivel de significación del 0,05), con la que poder contrastar el número medio de neuronas.

Los resultados obtenidos para el test de Student en cada comparación se exponen en el cuadro RECUENTOS TEST. Podemos observar cómo la densidad neuronal media en los geniculados sometidos a la acción del alcohol es significativamente más baja ( $P < 0.05$ ) en todas las zonas comparadas, con

la única excepción del sector  $\alpha_E$  *INFERIOR*. En este caso, los valores medios de densidad neuronal resultaron iguales (sin diferencias significativas).

En otro orden de cosas, cuando se llevan a cabo determinaciones de tipo cuantitativo en una estructura de considerable volumen, es conveniente realizar una subdivisión en unidades menores de dicha estructura para así poder conocer la existencia de una posible heterogeneidad dentro de la misma. Por consiguiente, resulta también interesante estudiar posibles cambios de densidad neuronal obtenidos en las diferentes zonas (Superior, Media e Inferior) dentro de los sectores  $\alpha_E$  y  $\alpha_I$  pertenecientes a los dos grupos experimentales considerados (alcohol y control). Para comprobar la existencia de diferencias significativas, se contrastaron dos a dos los valores de las distintas zonas de estudio.

Para el caso de los geniculados tratados con alcohol, tal como podemos observar en la Tabla (TEST ALCOHOL), el sector  $\alpha_E$  muestra una cierta heterogeneidad, donde tan sólo existen diferencias significativas ( $P < 0,05$ ) entre la zona Inferior y Superior, pero no entre la Media con la Superior ni la Media con la Inferior. Asimismo, nuestro estudio hemos de hacerlo extensivo al sector  $\alpha_I$ , el cual muestra una completa heterogeneidad, ya que hemos encontrado mayores valores de densidad neuronal en la porción dorsal (zona Superior) desde donde van disminuyendo hacia la ventral (zona Inferior).

Por su parte, para el caso de los geniculados utilizados como control, pudimos comprobar una auténtica heterogeneidad en el sector  $\alpha_E$  (Tabla TEST CONTROL), ya que las tres zonas en las que fue dividido difieren significativamente entre sí ( $P < 0,05$ ), encontrándose las densidades más altas en la zona Superior y las más bajas en la Inferior. Por consiguiente, podemos afirmar que la densidad neuronal del sector  $\alpha_E$  disminuye de manera progresiva desde la zona Superior hasta la Inferior, tendencia que ha sido

descrita por nosotros en otros trabajos que utilizan también el NGLd del conejo (Carmona y cols., 1987). El análisis llevado a cabo sobre el sector  $\alpha_1$  mostró una auténtica heterogeneidad como en el caso del sector  $\alpha_E$ .

## NUCLEOLO VALORES MEDIOS

PARAMETRO	CONTROL	ALCOHOL
Nº de nucléolos	350	350
R ( $\mu\text{m}$ )	1,193	1,206
r ( $\mu\text{m}$ )	0,650	0,698
$\bar{D}$ ( $\mu\text{m}$ )	2,385	2,415

Número de nucléolos recontados, valor del radio medio (R), radio del perfil más pequeño (r) discriminado y diámetro medio ( $\bar{D}$ ), para el caso de las neuronas pertenecientes a los animales control y sometidos a la acción del alcohol.

## RECUENTOS ALCOHOL 1

ZONA	Nº medio de neuronas/paral.	Nº total de paralelep. (N)	Nº total de neuronas ( $X_t$ )	Nº real de neuronas ( $X_r$ )	Densidad media células/ $10^6 \mu^3$
------	-----------------------------	----------------------------	--------------------------------	-------------------------------	--------------------------------------

$\alpha_E$ SUPERIOR	17,611 $\pm 0,819$	2659	46828 $\pm 2178$	38867 $\pm 1808$	23,223 $\pm 1,080$
$\alpha_E$ MEDIA	17,398 $\pm 0,601$	2864	49828 $\pm 1721$	41357 $\pm 1428$	22,920 $\pm 0,791$
$\alpha_E$ INFERIOR	16,444 $\pm 0,809$	752	12366 $\pm 608$	10264 $\pm 505$	21,673 $\pm 1,066$

$\alpha_I$ SUPERIOR	14,900 $\pm 0,712$	1500	22350 $\pm 1068$	18550 $\pm 886$	19,636 $\pm 0,938$
$\alpha_I$ MEDIA	13,237 $\pm 0,628$	2587	34244 $\pm 1625$	28423 $\pm 1349$	17,443 $\pm 0,828$
$\alpha_I$ INFERIOR	10,903 $\pm 0,589$	880	9595 $\pm 518$	7964 $\pm 430$	14,373 $\pm 0,776$

$\alpha_E$ TOTAL	17,151 $\pm 0,455$	6275	107623 $\pm 2855$	89327 $\pm 2370$	22,605 $\pm 0,600$
$\alpha_I$ TOTAL	13,013 $\pm 0,482$	4967	64636 $\pm 2394$	53648 $\pm 1987$	17,150 $\pm 0,635$
Sector $\beta$	5,236 $\pm 0,271$	1055	5524 $\pm 286$	4585 $\pm 237$	6,901 $\pm 0,357$

Valores estimados para el NGLd tratado con alcohol: ALCOHOL 1.  
Intervalo de confianza (valor medio  $\pm 1.96$  SE) del 95%.



## RECUEENTOS ALCOHOL 2

ZONA	Nº medio de neuronas/paral.	Nº total de paralelep. (N)	Nº total de neuronas ( $X_t$ )	Nº real de neuronas ( $X_r$ )	Densidad media células/ $10^6 \mu^3$
------	-----------------------------	----------------------------	--------------------------------	-------------------------------	--------------------------------------

$\alpha_E$ SUPERIOR	19,171 $\pm 0,933$	2311	44304 $\pm 2156$	36772 $\pm 1789$	25,258 $\pm 1,229$
$\alpha_E$ MEDIA	18,494 $\pm 0,455$	2709	50100 $\pm 1323$	41583 $\pm 1098$	24,371 $\pm 0,644$
$\alpha_E$ INFERIOR	17,444 $\pm 0,811$	774	13502 $\pm 628$	11207 $\pm 521$	22,984 $\pm 1,068$

$\alpha_I$ SUPERIOR	13,799 $\pm 0,546$	1107	15275 $\pm 604$	12678 $\pm 501$	18,198 $\pm 0,718$
$\alpha_I$ MEDIA	11,700 $\pm 0,591$	1925	22522 $\pm 1138$	18693 $\pm 945$	15,416 $\pm 0,779$
$\alpha_I$ INFERIOR	10,777 $\pm 0,527$	759	8180 $\pm 400$	6789 $\pm 332$	14,209 $\pm 0,695$

$\alpha_E$ TOTAL	18,469 $\pm 0,473$	5794	107009 $\pm 2741$	88817 $\pm 2275$	24,336 $\pm 0,623$
$\alpha_I$ TOTAL	12,092 $\pm 0,422$	3791	45841 $\pm 1600$	38048 $\pm 1328$	15,934 $\pm 0,556$
Sector $\beta$	5,409 $\pm 0,257$	1045	5652 $\pm 269$	4691 $\pm 223$	7,127 $\pm 0,339$

Valores estimados para el NGLd tratado con alcohol: ALCOHOL 2.  
Intervalo de confianza (valor medio  $\pm 1.96$  SE) del 95%.

### RECUENTOS ALCOHOL 3

ZONA	Nº medio de neuronas/paral.	Nº total de paralelep. (N)	Nº total de neuronas ( $X_t$ )	Nº real de neuronas ( $X_r$ )	Densidad media células/ $10^6 \mu^3$
------	-----------------------------	----------------------------	--------------------------------	-------------------------------	--------------------------------------

$\alpha_E$ SUPERIOR	19,188 $\pm 0,939$	1666	31967 $\pm 1564$	26533 $\pm 1298$	25,276 $\pm 1,236$
$\alpha_E$ MEDIA	18,775 $\pm 0,865$	2491	46769 $\pm 2155$	38818 $\pm 1789$	24,735 $\pm 1,140$
$\alpha_E$ INFERIOR	17,880 $\pm 0,841$	521	9315 $\pm 438$	7731 $\pm 364$	23,580 $\pm 1,110$

$\alpha_I$ SUPERIOR	14,479 $\pm 0,757$	912	13205 $\pm 690$	10960 $\pm 573$	19,080 $\pm 0,997$
$\alpha_I$ MEDIA	12,361 $\pm 0,552$	1536	18986 $\pm 848$	15758 $\pm 704$	16,289 $\pm 0,728$
$\alpha_I$ INFERIOR	10,689 $\pm 0,533$	629	6723 $\pm 335$	5580 $\pm 278$	14,075 $\pm 0,701$

$\alpha_E$ TOTAL	18,948 $\pm 0,505$	4678	88639 $\pm 2362$	73570 $\pm 1960$	24,965 $\pm 0,665$
$\alpha_I$ TOTAL	12,510 $\pm 0,418$	3077	38493 $\pm 1286$	31949 $\pm 1067$	16,483 $\pm 0,550$
Sector $\beta$	5,379 $\pm 0,265$	794	4271 $\pm 210$	3673 $\pm 174$	7,343 $\pm 0,348$

Valores estimados para el NGLd tratado con alcohol: ALCOHOL 3.  
Intervalo de confianza (valor medio  $\pm 1.96$  SE) del 95%.

## RECUENTOS ALCOHOL 4

ZONA	Nº medio de neuronas/paral.	Nº total de paralelep. (N)	Nº total de neuronas ( $X_t$ )	Nº real de neuronas ( $X_r$ )	Densidad media células/ $10^6 \mu^3$
------	-----------------------------	----------------------------	--------------------------------	-------------------------------	--------------------------------------

$\alpha_E$ SUPERIOR	18,889 $\pm 0,917$	2008	37929 $\pm 1841$	31481 $\pm 1528$	24,899 $\pm 1,456$
$\alpha_E$ MEDIA	18,593 $\pm 0,879$	2693	50071 $\pm 2367$	41559 $\pm 1965$	24,501 $\pm 1,252$
$\alpha_E$ INFERIOR	18,191 $\pm 0,792$	658	11970 $\pm 521$	9935 $\pm 432$	23,967 $\pm 1,318$

$\alpha_I$ SUPERIOR	13,123 $\pm 0,430$	1016	13333 $\pm 437$	11066 $\pm 363$	17,284 $\pm 0,567$
$\alpha_I$ MEDIA	11,522 $\pm 0,555$	1733	19968 $\pm 962$	16573 $\pm 798$	15,182 $\pm 0,731$
$\alpha_I$ INFERIOR	10,688 $\pm 0,505$	648	6926 $\pm 327$	5749 $\pm 271$	14,890 $\pm 0,664$

$\alpha_E$ TOTAL	18,558 $\pm 0,511$	5359	99452 $\pm 2738$	82545 $\pm 2273$	24,453 $\pm 0,673$
$\alpha_I$ TOTAL	11,778 $\pm 0,375$	3397	40010 $\pm 1274$	33208 $\pm 1057$	15,518 $\pm 0,494$
Sector $\beta$	5,373 $\pm 0,234$	933	5032 $\pm 218$	4177 $\pm 181$	7,107 $\pm 0,308$

Valores estimados para el NGLd tratado con alcohol: ALCOHOL 4.  
Intervalo de confianza (valor medio  $\pm 1.96$  SE) del 95%.

## RECUENTOS ALCOHOL 5

ZONA	Nº medio de neuronas/paral.	Nº total de paralelep. (N)	Nº total de neuronas ( $X_t$ )	Nº real de neuronas ( $X_r$ )	Densidad media células/ $10^6 \mu^3$
------	-----------------------------	----------------------------	--------------------------------	-------------------------------	--------------------------------------

$\alpha_E$ SUPERIOR	18,901 $\pm 0,777$	1923	36347 $\pm 1494$	30168 $\pm 1240$	24,901 $\pm 1,023$
$\alpha_E$ MEDIA	19,101 $\pm 0,480$	2420	46224 $\pm 1162$	38366 $\pm 964$	25,169 $\pm 0,632$
$\alpha_E$ INFERIOR	18,123 $\pm 0,782$	548	9931 $\pm 429$	8243 $\pm 356$	23,860 $\pm 1,030$

$\alpha_I$ SUPERIOR	13,899 $\pm 0,727$	923	12829 $\pm 671$	10648 $\pm 557$	18,314 $\pm 0,958$
$\alpha_I$ MEDIA	12,600 $\pm 0,627$	1645	20727 $\pm 1031$	17203 $\pm 856$	16,606 $\pm 0,826$
$\alpha_I$ INFERIOR	10,762 $\pm 0,521$	539	5801 $\pm 281$	4815 $\pm 233$	14,170 $\pm 0,686$

$\alpha_E$ TOTAL	18,788 $\pm 0,513$	4891	91892 $\pm 2509$	76270 $\pm 2082$	24,752 $\pm 0,676$
$\alpha_I$ TOTAL	12,420 $\pm 0,430$	3107	38589 $\pm 1336$	32029 $\pm 1109$	16,365 $\pm 0,567$
Sector $\beta$	5,333 $\pm 0,269$	839	4474 $\pm 226$	3713 $\pm 188$	7,027 $\pm 0,356$

Valores estimados para el NGLd tratado con alcohol: ALCOHOL 5.  
Intervalo de confianza (valor medio  $\pm 1.96$  SE) del 95%.

## RECUENTOS ALCOHOL 6

ZONA	Nº medio de neuronas/paral.	Nº total de paralelep. (N)	Nº total de neuronas ( $X_t$ )	Nº real de neuronas ( $X_r$ )	Densidad media células/ $10^6 \mu^3$
------	-----------------------------	----------------------------	--------------------------------	-------------------------------	--------------------------------------

$\alpha_E$ SUPERIOR	18,315 $\pm 0,933$	2782	50952 $\pm 2596$	42290 $\pm 2155$	24,128 $\pm 1,230$
$\alpha_E$ MEDIA	17,391 $\pm 0,827$	3186	55408 $\pm 2635$	45989 $\pm 2187$	22,914 $\pm 1,090$
$\alpha_E$ INFERIOR	16,700 $\pm 0,824$	897	14980 $\pm 739$	12433 $\pm 613$	21,996 $\pm 1,085$

$\alpha_I$ SUPERIOR	14,705 $\pm 0,721$	1464	21528 $\pm 1056$	17868 $\pm 876$	19,376 $\pm 0,950$
$\alpha_I$ MEDIA	12,982 $\pm 0,647$	2606	33831 $\pm 1686$	28080 $\pm 1399$	17,106 $\pm 0,852$
$\alpha_I$ INFERIOR	10,513 $\pm 0,538$	966	10156 $\pm 520$	8429 $\pm 432$	13,858 $\pm 0,710$

$\alpha_E$ TOTAL	17,469 $\pm 0,487$	6865	119925 $\pm 3343$	99538 $\pm 2775$	23,015 $\pm 0,641$
$\alpha_I$ TOTAL	12,800 $\pm 0,509$	5036	64461 $\pm 2563$	53503 $\pm 2127$	16,070 $\pm 0,639$
Sector $\beta$	5,345 $\pm 0,270$	1132	6051 $\pm 306$	5022 $\pm 254$	7,041 $\pm 0,356$

Valores estimados para el NGLd tratado con alcohol: ALCOHOL 6.  
Intervalo de confianza (valor medio  $\pm 1.96$  SE) del 95%.

## RECUENTOS CONTROL 1

ZONA	Nº medio de neuronas/paral.	Nº total de paralelep. (N)	Nº total de neuronas ( $X_t$ )	Nº real de neuronas ( $X_r$ )	Densidad media células/ $10^6 \mu^3$
------	-----------------------------	----------------------------	--------------------------------	-------------------------------	--------------------------------------

$\alpha_E$ SUPERIOR	22,459 $\pm 0,998$	2142	48107 $\pm 2138$	39929 $\pm 1775$	29,588 $\pm 1,315$
$\alpha_E$ MEDIA	21,660 $\pm 1,197$	2938	63637 $\pm 3517$	52819 $\pm 2919$	28,537 $\pm 1,577$
$\alpha_E$ INFERIOR	18,155 $\pm 0,888$	1109	20134 $\pm 985$	16711 $\pm 818$	23,917 $\pm 1,171$

$\alpha_I$ SUPERIOR	16,219 $\pm 0,744$	1297	21036 $\pm 965$	17460 $\pm 801$	21,377 $\pm 0,981$
$\alpha_I$ MEDIA	15,111 $\pm 0,600$	2066	31219 $\pm 1240$	25912 $\pm 1029$	19,908 $\pm 0,791$
$\alpha_I$ INFERIOR	13,195 $\pm 0,655$	690	9105 $\pm 452$	7557 $\pm 375$	17,380 $\pm 0,862$

$\alpha_E$ TOTAL	20,758 $\pm 0,822$	6189	128471 $\pm 5087$	106631 $\pm 4222$	27,347 $\pm 1,083$
$\alpha_I$ TOTAL	14,856 $\pm 0,477$	4053	60211 $\pm 1933$	49975 $\pm 1604$	19,574 $\pm 0,628$
Sector $\beta$	6,903 $\pm 0,367$	1081	7462 $\pm 397$	6193 $\pm 330$	9,091 $\pm 0,484$

Valores estimados para el NGLd control: CONTROL 1.  
Intervalo de confianza (valor medio  $\pm 1.96$  SE) del 95%.

## RECUENTOS CONTROL 2

ZONA	Nº medio de neuronas/paral.	Nº total de paralelep. (N)	Nº total de neuronas ( $X_t$ )	Nº real de neuronas ( $X_r$ )	Densidad media células/ $10^6 \mu^3$
------	-----------------------------	----------------------------	--------------------------------	-------------------------------	--------------------------------------

$\alpha_E$ SUPERIOR	22,430 $\pm 0,975$	2316	51948 $\pm 2258$	43117 $\pm 1874$	29,554 $\pm 1,284$
$\alpha_E$ MEDIA	21,461 $\pm 1,027$	2784	59747 $\pm 2859$	49590 $\pm 2373$	28,279 $\pm 1,353$
$\alpha_E$ INFERIOR	18,019 $\pm 0,762$	1104	19893 $\pm 841$	16511 $\pm 698$	23,734 $\pm 1,003$

$\alpha_I$ SUPERIOR	15,721 $\pm 0,736$	1372	21569 $\pm 1010$	17,902 $\pm 838$	20,712 $\pm 0,969$
$\alpha_I$ MEDIA	14,855 $\pm 0,892$	2160	32087 $\pm 1927$	26632 $\pm 1599$	19,577 $\pm 1,175$
$\alpha_I$ INFERIOR	13,038 $\pm 0,775$	739	9635 $\pm 573$	7997 $\pm 476$	17,183 $\pm 1,023$

$\alpha_E$ TOTAL	20,896 $\pm 0,764$	6204	129639 $\pm 4740$	107600 $\pm 3934$	27,532 $\pm 1,007$
$\alpha_I$ TOTAL	14,638 $\pm 0,659$	4271	62519 $\pm 2815$	51891 $\pm 2336$	19,289 $\pm 0,868$
Sector $\beta$	6,991 $\pm 0,532$	1142	7984 $\pm 608$	6627 $\pm 505$	9,213 $\pm 0,702$

Valores estimados para el NGLd control: CONTROL 2.  
Intervalo de confianza (valor medio  $\pm 1.96$  SE) del 95%.

### RECUENTOS CONTROL 3

ZONA	Nº medio de neuronas/paral.	Nº total de paralelep. (N)	Nº total de neuronas ( $X_t$ )	Nº real de neuronas ( $X_r$ )	Densidad media células/ $10^6 \mu^3$
------	-----------------------------	----------------------------	--------------------------------	-------------------------------	--------------------------------------

$\alpha_E$ SUPERIOR	22,452 $\pm 0,943$	2485	55793 $\pm 2343$	46308 $\pm 1945$	29,587 $\pm 1,243$
$\alpha_E$ MEDIA	21,169 $\pm 0,710$	2807	59421 $\pm 1993$	49319 $\pm 1654$	27,890 $\pm 0,935$
$\alpha_E$ INFERIOR	17,818 $\pm 0,600$	1120	19956 $\pm 672$	16563 $\pm 558$	23,472 $\pm 0,791$

$\alpha_I$ SUPERIOR	15,571 $\pm 0,784$	1466	22827 $\pm 1149$	18946 $\pm 954$	20,515 $\pm 1,033$
$\alpha_I$ MEDIA	14,817 $\pm 0,918$	2202	32627 $\pm 2021$	27080 $\pm 1677$	19,523 $\pm 1,209$
$\alpha_I$ INFERIOR	12,806 $\pm 0,655$	720	9220 $\pm 472$	7653 $\pm 392$	16,871 $\pm 0,864$

$\alpha_E$ TOTAL	20,900 $\pm 0,666$	6412	134011 $\pm 4270$	111229 $\pm 3544$	27,538 $\pm 0,877$
$\alpha_I$ TOTAL	14,318 $\pm 0,569$	4388	62827 $\pm 2497$	52146 $\pm 2072$	18,865 $\pm 0,750$
Sector $\beta$	6,801 $\pm 0,357$	1161	7896 $\pm 414$	6554 $\pm 344$	8,958 $\pm 0,470$

Valores estimados para el NGLd control: CONTROL 3.  
Intervalo de confianza (valor medio  $\pm 1.96$  SE) del 95%.



## RECUENTOS CONTROL 4

ZONA	Nº medio de neuronas/paral.	Nº total de paralelep. (N)	Nº total de neuronas ( $X_t$ )	Nº real de neuronas ( $X_r$ )	Densidad media células/ $10^6 \mu^3$
------	-----------------------------	----------------------------	--------------------------------	-------------------------------	--------------------------------------

$\alpha_E$ SUPERIOR	22,481 $\pm 1,029$	2354	52920 $\pm 2422$	43924 $\pm 2010$	29,623 $\pm 1,356$
$\alpha_E$ MEDIA	21,437 $\pm 1,112$	3068	65769 $\pm 3412$	54588 $\pm 2832$	28,245 $\pm 1,465$
$\alpha_E$ INFERIOR	17,956 $\pm 0,703$	1124	20183 $\pm 790$	16752 $\pm 656$	23,661 $\pm 0,927$

$\alpha_I$ SUPERIOR	15,588 $\pm 0,811$	1364	21262 $\pm 1106$	17647 $\pm 918$	20,532 $\pm 1,068$
$\alpha_I$ MEDIA	14,923 $\pm 0,913$	2219	33114 $\pm 2026$	27485 $\pm 1682$	19,660 $\pm 1,203$
$\alpha_I$ INFERIOR	12,877 $\pm 0,725$	760	9787 $\pm 551$	8123 $\pm 457$	16,963 $\pm 0,954$

$\alpha_E$ TOTAL	20,689 $\pm 0,755$	6546	135430 $\pm 4942$	112407 $\pm 4102$	27,261 $\pm 0,995$
$\alpha_I$ TOTAL	14,463 $\pm 0,736$	4343	62813 $\pm 3196$	52135 $\pm 2653$	19,053 $\pm 0,970$
Sector $\beta$	7,144 $\pm 0,557$	1222	8730 $\pm 681$	7246 $\pm 565$	9,412 $\pm 0,734$

Valores estimados para el NGLd control: CONTROL 4.  
Intervalo de confianza (valor medio  $\pm 1.96$  SE) del 95%.

## RECUENTOS CONTROL 5

ZONA	Nº medio de neuronas/paral.	Nº total de paralelep. (N)	Nº total de neuronas ( $X_t$ )	Nº real de neuronas ( $X_r$ )	Densidad media células/ $10^6 \mu^3$
------	-----------------------------	----------------------------	--------------------------------	-------------------------------	--------------------------------------

$\alpha_E$ SUPERIOR	22,101 $\pm 1,067$	2332	51540 $\pm 2488$	42778 $\pm 2065$	29,116 $\pm 1,405$
$\alpha_E$ MEDIA	21,349 $\pm 1,243$	3105	66289 $\pm 3860$	55020 $\pm 3204$	28,128 $\pm 1,638$
$\alpha_E$ INFERIOR	18,100 $\pm 0,699$	1223	22136 $\pm 855$	18373 $\pm 710$	23,848 $\pm 0,922$

$\alpha_I$ SUPERIOR	15,517 $\pm 0,725$	1355	21026 $\pm 982$	17452 $\pm 815$	20,446 $\pm 0,955$
$\alpha_I$ MEDIA	14,711 $\pm 0,688$	2254	33159 $\pm 1551$	27522 $\pm 1287$	19,380 $\pm 0,906$
$\alpha_I$ INFERIOR	12,977 $\pm 0,669$	763	9901 $\pm 510$	8218 $\pm 423$	17,098 $\pm 0,880$

$\alpha_E$ TOTAL	20,703 $\pm 0,704$	6660	137882 $\pm 4689$	114442 $\pm 3892$	27,276 $\pm 0,928$
$\alpha_I$ TOTAL	14,410 $\pm 0,522$	4372	63001 $\pm 2282$	52291 $\pm 1894$	18,985 $\pm 0,688$
Sector $\beta$	6,725 $\pm 0,377$	1267	8521 $\pm 478$	7072 $\pm 397$	8,858 $\pm 0,497$

Valores estimados para el NGLd control: CONTROL 5.  
Intervalo de confianza (valor medio  $\pm 1.96$  SE) del 95%.

## RECUENTOS CONTROL 6

ZONA	Nº medio de neuronas/paral.	Nº total de paralelep. (N)	Nº total de neuronas ( $X_t$ )	Nº real de neuronas ( $X_r$ )	Densidad media células/ $10^6 \mu^3$
------	-----------------------------	----------------------------	--------------------------------	-------------------------------	--------------------------------------

$\alpha_E$ SUPERIOR	22,397 $\pm 0,938$	2303	51580 $\pm 2160$	42811 $\pm 1793$	29,509 $\pm 1,236$
$\alpha_E$ MEDIA	21,253 $\pm 0,822$	2915	61952 $\pm 2396$	51420 $\pm 1989$	28,003 $\pm 1,083$
$\alpha_E$ INFERIOR	17,825 $\pm 0,666$	1170	20855 $\pm 779$	17310 $\pm 647$	23,480 $\pm 0,878$

$\alpha_I$ SUPERIOR	15,682 $\pm 0,725$	1408	22080 $\pm 1021$	18326 $\pm 847$	20,667 $\pm 0,955$
$\alpha_I$ MEDIA	14,833 $\pm 0,881$	2178	32306 $\pm 1919$	26814 $\pm 1593$	19,548 $\pm 1,161$
$\alpha_I$ INFERIOR	12,936 $\pm 0,654$	754	9754 $\pm 493$	8096 $\pm 409$	17,041 $\pm 0,861$

$\alpha_E$ TOTAL	20,757 $\pm 0,780$	6388	132596 $\pm 4983$	110055 $\pm 4136$	27,348 $\pm 1,028$
$\alpha_I$ TOTAL	14,484 $\pm 0,599$	4340	62861 $\pm 2600$	52175 $\pm 2158$	19,087 $\pm 0,789$
Sector $\beta$	7,001 $\pm 0,445$	1188	8317 $\pm 529$	6903 $\pm 439$	9,224 $\pm 0,587$

Valores estimados para el NGLd control: CONTROL 6.  
Intervalo de confianza (valor medio  $\pm 1.96$  SE) del 95%.

## RECUENTOS MEDIOS

ZONA	CONTROL Neuronas/ $10^6 \mu^3$	ALCOHOL Neuronas/ $10^6 \mu^3$
$\alpha_E$ SUPERIOR	29,496 $\pm 0,071$	24,612 $\pm 0,297$
$\alpha_E$ MEDIA	28,180 $\pm 0,085$	24,102 $\pm 0,357$
$\alpha_E$ INFERIOR	23,685 $\pm 0,075$	23,010 $\pm 0,364$
$\alpha_I$ SUPERIOR	20,708 $\pm 0,128$	18,648 $\pm 0,328$
$\alpha_I$ MEDIA	19,599 $\pm 0,072$	16,340 $\pm 0,336$
$\alpha_I$ INFERIOR	17,089 $\pm 0,073$	14,262 $\pm 0,131$
$\alpha_E$ TOTAL	27,384 $\pm 0,050$	24,021 $\pm 0,362$
$\alpha_I$ TOTAL	19,142 $\pm 0,103$	16,253 $\pm 0,207$
SECTOR $\beta$	9,126 $\pm 0,082$	7,091 $\pm 0,055$

Valores de densidad neuronal media (expresada en número de neuronas/ $10^6 \mu^3$ ) para los diferentes NGLd tratados con alcohol y control, por sectores y zonas de estudio. Intervalo de confianza (valor medio  $\pm 1.96$  SE) del 95%.

# DENSIDAD NEURONAL MEDIA

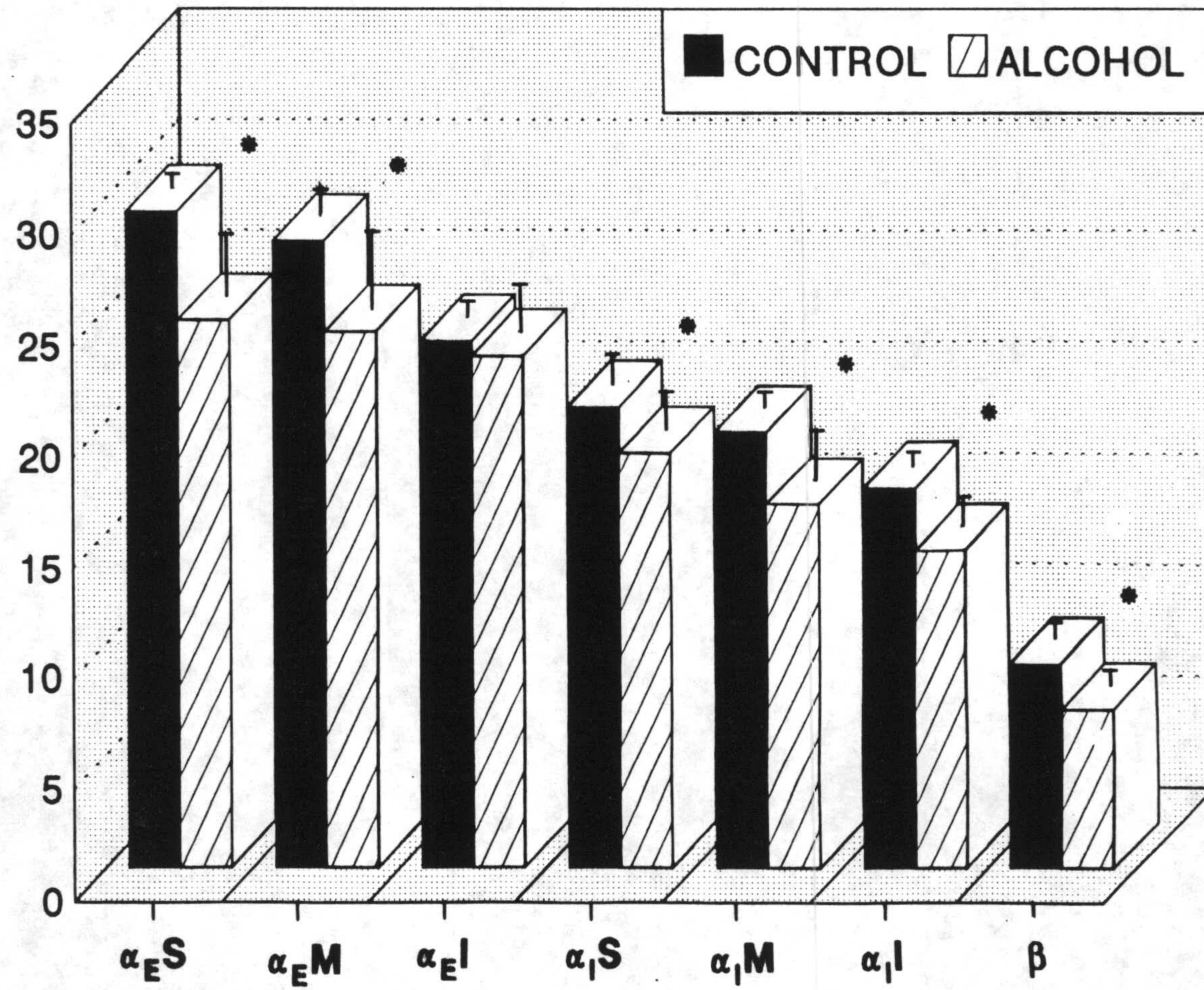


Figura 14

# DENSIDAD NEURONAL MEDIA

## Sectores Alfa y Beta

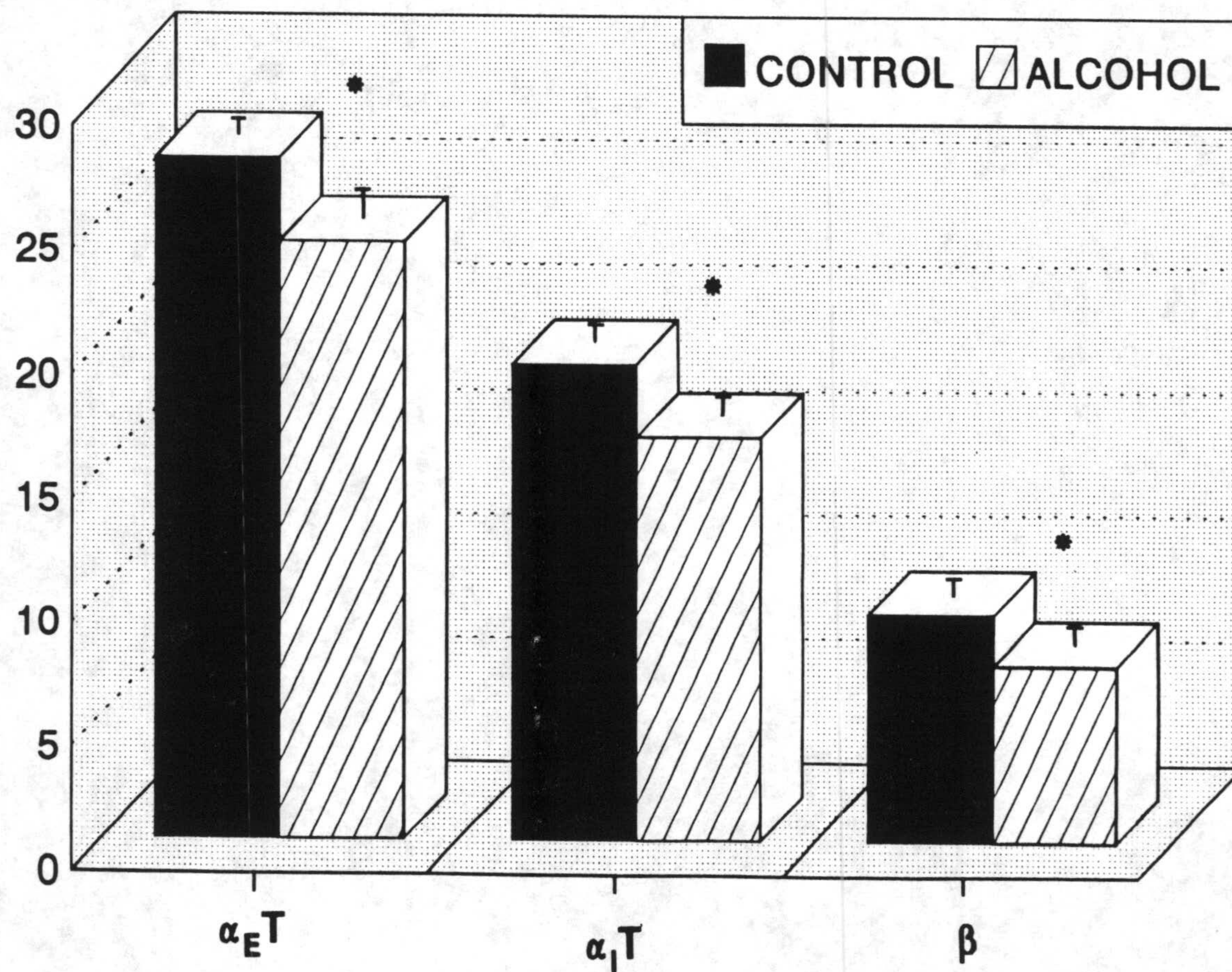


Figura 15

## RECUENTOS TEST

ZONA	Valor de $t_d$
$\alpha_E$ SUPERIOR	14,59 <sup>†</sup>
$\alpha_E$ MEDIA	10,15 <sup>†</sup>
$\alpha_E$ INFERIOR	1,66
$\alpha_I$ SUPERIOR	5,35 <sup>†</sup>
$\alpha_I$ MEDIA	8,68 <sup>†</sup>
$\alpha_I$ INFERIOR	17,58 <sup>†</sup>
$\alpha_E$ TOTAL	8,40 <sup>†</sup>
$\alpha_I$ TOTAL	11,58 <sup>†</sup>
Sector $\beta$	20,12 <sup>†</sup>

Valores de  $t_d$  resultantes de la aplicación del test de Student para el caso de la densidad neuronal de los animales sometidos a la acción del alcohol y de los animales control. El signo (†) representa la existencia de diferencias significativas entre los valores que se comparan.

## TEST CONTROL

		$\alpha_E$		
		SUPERIOR	MEDIO	INFERIOR
$\alpha_E$	SUPERIOR	----	10,86 <sup>†</sup>	53,66 <sup>†</sup>
	MEDIO	10,86 <sup>†</sup>	----	37,51 <sup>†</sup>
	INFERIOR	53,66 <sup>†</sup>	37,51 <sup>†</sup>	----

		$\alpha_I$		
		SUPERIOR	MEDIO	INFERIOR
$\alpha_I$	SUPERIOR	----	7,05 <sup>†</sup>	22,96 <sup>†</sup>
	MEDIO	7,05 <sup>†</sup>	----	24,49 <sup>†</sup>
	INFERIOR	22,96 <sup>†</sup>	24,49 <sup>†</sup>	----

Valores correspondientes a  $t_d$  obtenidos después de efectuar la comparación de densidad neuronal media para cada zona de estudio de los sectores  $\alpha_E$  y  $\alpha_I$  de los animales control. La existencia de diferencias significativas se expresa por †.



## TEST ALCOHOL

		$\alpha_E$		
		SUPERIOR	MEDIO	INFERIOR
$\alpha_E$	SUPERIOR	----	1,00	3,11 <sup>†</sup>
	MEDIO	1,00	----	1,95
	INFERIOR	3,11 <sup>†</sup>	1,95	----

		$\alpha_I$		
		SUPERIOR	MEDIO	INFERIOR
$\alpha_I$	SUPERIOR	----	4,49 <sup>†</sup>	11,34 <sup>†</sup>
	MEDIO	4,49 <sup>†</sup>	----	5,93 <sup>†</sup>
	INFERIOR	11,34 <sup>†</sup>	5,93 <sup>†</sup>	----

Valores correspondientes a  $t_d$  obtenidos después de efectuar la comparación de densidad neuronal media para cada zona de estudio de los sectores  $\alpha_E$  y  $\alpha_I$  de los animales tratados con alcohol. La existencia de diferencias significativas se expresa por †.

#### 4. CALCULO DEL VOLUMEN DEL SOMA NEURONAL

El cálculo del volumen del soma neuronal supuso el empleo de pasos similares, por lo que a metodología se refiere, a los que se utilizaron en la determinación del número de neuronas, explicados con más detalle en las secciones correspondientes de Material y Métodos.

En la determinación del volumen del soma neuronal, realizado tanto para aquellas neuronas con soma de apariencia normal como para las de apariencia heteropictórica, se utilizó una retícula ocular de puntos, y en la que se procedió a contar todo punto que quedaba contenido en la fase soma neuronal (independientemente de que los perfiles neuronales presenten o no nucléolo). Dichos puntos llevan asociada un área determinada, equivalente al área que determinan, y, por tanto, la relación resulta equiparable con su volumen. Por consiguiente, si conocemos el número de puntos que quedan integrados en la fase soma neuronal, podremos conocer el volumen ocupado por el mismo:

$$\frac{A_t}{a} = \frac{V_t}{v}$$

El volumen del neuropilo se puede calcular fácilmente a partir del volumen del soma neuronal:

$$V_{NEUROPILO} = V_T - V_{SOMA NEURONAL}$$

donde  $V_T$  representa el volumen del espacio total contenedor, que viene a ser la suma entre el volumen ocupado por el soma de las neuronas y el del neuropilo.

Las tablas VOLUMENES SOMA ALCOHOL y VOLUMENES SOMA CONTROL ofrecen el porcentaje de volumen correspondiente al soma neuronal con imagen de normalidad (VSt), para cada zona de estudio, tanto en los animales alcoholizados como en los control. Se puede observar que los valores son, en todos los casos, más altos en los animales control que en los alcoholizados.

Ante los valores expuestos en dichas tablas, y por la influencia que tiene en el estudio, también se consideró de interés analizar el porcentaje de volumen ocupado por los somas de las neuronas con imagen de heteropicnosis somática positiva (VSh).

Asimismo, las tablas reflejan una tercera columna ( $VSt/VSh*100$ ) donde se ofrece el porcentaje de volumen de los somas heteropicnóticos con respecto al volumen total ocupado por los somas neuronales con apariencia de normalidad. Los valores de este parámetro resultaron, en todas las zonas estudiadas, más altos en los conejos sometidos a la acción del alcohol que aquellos otros control.

#### **4.1. Comparación de valores medios**

Para averiguar la existencia o ausencia de diferencias significativas en el volumen del soma neuronal y del neuropilo entre el tratamiento con alcohol y el control, se procedió al análisis estadístico. Como en casos anteriores, se utilizó en primer lugar el estadígrafo F de Snedecor para analizar la varianza. Tras comprobar que dicha varianza era similar en ambos casos, se empleó el test de Student para comparar el volumen medio del soma neuronal (VSt) y el volumen medio de los somas heteropicnóticos (VSh), por zonas y por grupo experimental estudiado.

Para el primer parámetro (VSt), con un nivel de significación del 95%

( $P < 0,05$ ), se evidenció la existencia de diferencias significativas en todas las zonas de estudio, entre los dos grupos experimentales considerados, siendo más altos estos valores en los conejos control.

Por lo que respecta al segundo parámetro (VSh), como posible signo de premuerte celular, presenta unos valores significativamente ( $P < 0,05$ ) más altos en las diferentes zonas del NGLd de los animales tratados con alcohol, salvo con la única excepción de la zona  $\alpha_E$  Inferior, donde los valores resultaron iguales.

Finalmente, para el último de los parámetros que se ofrecen en las tablas ( $VSt/VSh \cdot 100$ ), es decir el porcentaje del volumen del soma heteropicnótico con respecto al volumen total ocupado por los somas neuronales normales, se puso de manifiesto la existencia de diferencias significativas en las distintas zonas de estudio a excepción de la zona inferior del sector  $\alpha_E$ .

## VOLUMENES SOMA CONTROL

ZONA	VSt	VSh	(VSt/VSt)*100
$\alpha_E$ SUPERIOR	9,46 $\pm 0,47$	0,11 $\pm 0,08$	1,16
$\alpha_E$ MEDIA	10,12 $\pm 0,51$	0,12 $\pm 0,08$	1,19
$\alpha_E$ INFERIOR	7,68 $\pm 0,35$	0,08 $\pm 0,08$	1,04
$\alpha_I$ SUPERIOR	7,01 $\pm 0,33$	0,03 $\pm 0,08$	0,43
$\alpha_I$ MEDIA	8,95 $\pm 0,43$	0,05 $\pm 0,04$	0,56
$\alpha_I$ INFERIOR	8,65 $\pm 0,39$	0,10 $\pm 0,08$	1,16
Sector $\beta$	2,61 $\pm 0,29$	0,02 $\pm 0,04$	0,77

Porcentaje del volumen medio ocupado por los somas neuronales de neuronas normales (VSt) y heteropicnóticas (VSh), y porcentaje del volumen de somas heteropicnóticas con respecto al volumen total ocupado por los somas neuronales normales, para cada zona de estudio del sector  $\alpha$  y  $\beta$  del NGLd de los animales control. Intervalo de confianza (valor medio  $\pm 1.96$  SE) del 95%.

## VOLUMENES SOMA ALCOHOL

ZONA	VSt	VSh	(VSt/VSt)*100
$\alpha_E$ SUPERIOR	6,89 $\pm 0,29$	0,72 $\pm 0,11$	10,45
$\alpha_E$ MEDIA	7,04 $\pm 0,35$	0,49 $\pm 0,10$	6,96
$\alpha_E$ INFERIOR	6,59 $\pm 0,31$	0,12 $\pm 0,06$	1,82
$\alpha_I$ SUPERIOR	6,06 $\pm 0,35$	0,34 $\pm 0,08$	5,61
$\alpha_I$ MEDIA	7,15 $\pm 0,37$	0,39 $\pm 0,10$	5,45
$\alpha_I$ INFERIOR	7,37 $\pm 0,31$	0,37 $\pm 0,10$	5,02
Sector $\beta$	1,77 $\pm 0,16$	0,11 $\pm 0,04$	6,22

Porcentaje del volumen medio ocupado por los somas neuronales de neuronas normales (VSt) y heteropicnóticas (VSh), y porcentaje del volumen de somas heteropicnóticos con respecto al volumen total ocupado por los somas neuronales normales, para cada zona de estudio del sector  $\alpha$  y  $\beta$  del NGLd de los animales tratados con alcohol. Intervalo de confianza (valor medio  $\pm 1.96$  SE) del 95%.

## **5. DETERMINACION DEL AREA NEURONAL**

El procedimiento seguido para el análisis de este parámetro fue el elegir un número representativo de perfiles neuronales, estimado en alrededor de unos 250, contenidos en paralelepípedos de recuento, y elegidos de forma aleatoria y ponderada en las zonas de estudio. Al igual que para el caso de los recuentos, de todos los perfiles neuronales que aparecían en el campo de visión del microscopio, únicamente se consideraron aquellos que quedaban integrados en el interior de la retícula, así como los que eran cortados por los bordes superior e izquierdo de la misma.

El siguiente paso consistió en dibujar los perfiles neuronales con la cámara clara, hasta obtener la totalidad de los 250 dibujos que formaban parte de la muestra. El criterio seguido en la consecución de tales dibujos fue el de considerar no sólo aquellos perfiles neuronales que presentaban nucléolo, sino también los que carecían del mismo, así como cualquier perfil de soma neuronal identificable como tal, contenidos también en los paralelepípedos de recuento.

A continuación, se procedió a repasar los antedichos perfiles con una pluma eléctrica sobre un tablero digitalizador de un analizador semiautomático de imagen. Los datos obtenidos iban siendo almacenados en un fichero adecuado sobre el que acceder con posterioridad para su análisis final.

Los valores medios referentes al área de las neuronas sometidas a la acción del alcohol y la de las neuronas control, se ofrecen en la table AREA NEURONAL, donde podemos apreciar cómo el área media de las primeras (animales alcoholizados) resulta sustancialmente menor ( $120.647 \pm 6.113 \mu\text{m}^2$ ) que el de las segundas, empleadas como control ( $132.978 \pm 6.552 \mu\text{m}^2$ ).

### **5.1.Comparación de valores medios**

Tal y como hemos procedido para el caso de la totalidad de los parámetros considerados con anterioridad, a la hora de aplicar los métodos estadísticos, se analizó la varianza mediante el estadígrafo F de Snedecor. Después de comprobar que éstas eran iguales, se aplicó el test de Student con objeto de comparar los valores medios del área neuronal. Como resultado final de la utilización de este test estadístico, se puso de manifiesto la existencia de diferencias significativas ( $P < 0,05$ ) entre los valores considerados, con áreas neuronales más altas para el grupo control que para el caso del grupo tratado con la droga.



## AREA NEURONAL

PARAMETRO	CONTROL	ALCOHOL
Area media ( $\mu\text{m}^2$ )	132,978 $\pm$ 6,552	120,647 $\pm$ 6,113

Valor correspondiente al área neuronal media de las células pertenecientes a los geniculados control y sometidos a la acción del alcohol.  
Intervalo de confianza (valor medio  $\pm$  1.96 SE) del 95%.

## **B. OBSERVACIONES A MICROSCOPIA ELECTRONICA**

Una vez realizado el análisis estereológico a microscopía óptica, veamos a continuación las observaciones realizadas a nivel de microscopía electrónica, en relación con las alteraciones inducidas por el alcohol sobre el NGLd del conejo. Las descripciones ultraestructurales, llevadas a cabo en el grupo control y en el grupo tratado con alcohol, se centran tanto sobre el soma neuronal como sobre el neuropilo.

### **1. OBSERVACIONES EN EL GRUPO CONTROL**

#### **a) Ultraestructura del soma neuronal**

En primer lugar, en lo referente a la ultraestructura del soma de las neuronas de relevo del NGLd del conejo, éste se caracteriza por presentar un retículo endoplasmático rugoso desarrollado y dividido en un gran número de fragmentos. Estos fragmentos de retículo, que a microscopía óptica se muestran como elementos intensamente basofílicos debido a la presencia de ácidos nucleicos, se conocen con el nombre de grumos de Nissl.

El retículo endoplasmático que constituye los grumos de Nissl está formado por una serie de cisternas paralelas dispuestas de modo ordenado, en cuya superficie externa aparecen ribosomas adosados. Además, en el espacio existente entre las cisternas encontramos gran cantidad de polirribosomas libres (**Figura 16**).

En las imágenes estudiadas correspondientes al grupo control, se puede apreciar cómo los distintos grumos de Nissl no muestran unos límites definidos, sino que en la mayoría de los casos se observan unas delgadas cisternas hasta el grumo vecino que determina una expansión del retículo a lo largo de toda la célula.

En cuanto al Aparato de Golgi de estas neuronas del núcleo diencefálico, también muestra un gran desarrollo, con abundantes dictiosomas distribuidos a nivel perinuclear. Estos dictiosomas presentan la típica disposición en sáculos apilados, cuyos extremos aparecen dilatados, y rodeados por gran cantidad de vesículas de tamaño variable (**Figura 16 y 17**).

En las neuronas de los animales control también nos encontramos con los componentes de la familia de los lisosomas. Los lisosomas primarios de contenido finamente granular y relativamente homogéneo suelen mostrar una relativa abundancia. Sin embargo, los cuerpos multivesiculares y los gránulos de lipofuscina se encuentran en baja proporción. Los cuerpos multivesiculares aparecen como estructuras esféricas limitadas por una membrana, que contienen un número variable de vesículas esféricas y ovaladas, así como otras inclusiones entre las que se reconocen filamentos, gránulos y estructuras membranosas. La matriz en la que están incluidas las vesículas y las inclusiones suele ser de baja densidad a los electrones. Aunque los cuerpos multivesiculares pueden aparecer tanto en el pericarion como en las dendritas y axones, se observan con mayor frecuencia en asociación con el Aparato de Golgi.

En cuanto a los gránulos de lipofuscina, se caracterizan por estar rellenos de una mezcla heterogénea de cuerpos densos, pudiendo observarse en ocasiones una o dos zonas de aspecto vacuolado y localización periférica en su interior.

Por lo que respecta a las mitocondrias, éstas suelen ser bastante variables en cuanto al tamaño y forma, aunque en las neuronas del núcleo suelen predominar las de aspecto granular y las que tienen forma de bastón (**Figura 16**). Estas mitocondrias se distribuyen por el pericarion de forma homogénea. La matriz de estos orgánulos, que es moderadamente densa a

los electrones, contiene muy pocos gránulos osmiófilos.

Otro de los elementos llamativos del citoplasma son los microtúbulos, que junto con los neurofilamentos ocupan la mayor parte del hialoplasma.

Por lo que respecta al núcleo, éste suele ser bastante grande y eucromático, con una superficie lisa o ligeramente indendada, y localizado en una posición algo excéntrica (**Figura 16**). La envoltura nuclear presenta una membrana interna de contorno liso y una externa ondulada en la que se aprecian numerosos poros nucleares y sobre la que se pueden observar ribosomas adosados.

En el interior del núcleo nos encontramos con un nucléolo prominente situado en posición central y de aspecto reticulado. En ocasiones es frecuente observar grumos de heterocromatina perinucleolar (**Figura 16**).

Finalmente, hemos de indicar que si bien las características de los somas neuronales de las interneuronas del NGLd son similares desde el punto de vista cualitativo a las de las células de relevo, se pueden establecer diferencias en base a que el citoplasma de éstas últimas suele ser escaso, con muy pocos orgánulos citoplasmáticos, pocas cisternas del retículo endoplasmático rugoso y mitocondrias extremadamente pequeñas.

#### **b) Rasgos ultraestructurales del neuropilo**

Por lo que respecta a los elementos terminales existentes en el neuropilo del NGLd del conejo, se pueden establecer tres tipos de terminales: RLP (originados a partir de los axones de células ganglionares de la retina), RSD (que son terminales axónicos procedentes de las áreas corticales) y F

(cuyo origen son las propias interneuronas). Los terminales de tipo F se dividen a su vez en dos categorías: F1 (terminales axónicos de interneuronas) y F2 (originados a partir de apéndices dendríticos de interneuronas).

Los RLP o terminales retinales son los de mayor tamaño que podemos observar en el neuropilo. Suelen mostrar contornos irregulares, y su interior se caracteriza por presentar gran cantidad de vesículas sinápticas redondeadas, entre las que se localizan algunas de centro denso, y varias mitocondrias con una matriz de baja densidad a los electrones (**Figura 18, 19, 20 y 21**).

Los RSD o terminales corticales presentan un tamaño relativamente pequeño, mostrando una morfología peculiar a modo de capuchón, ya que envuelve como tal al elemento con el que establece contacto sináptico. En su interior nos encontramos con un gran número de vesículas sinápticas redondeadas, muy empaquetadas, que ocupan la mayor parte del terminal. Por regla general, no suelen aparecer mitocondrias, aunque cuando lo hacen, éstas presentan una matriz de alta densidad electrónica (**Figura 19 y 20**).

Los terminales F1 presentan un tamaño intermedio, en cuyo interior se observan varias cisternas de retículo endoplasmático liso, microtúbulos y algunas mitocondrias de una matriz moderadamente densa. El resto del terminal aparece ocupado por gran cantidad de vesículas sinápticas ovaladas (**Figura 20**).

Los terminales F2 también suelen presentar un tamaño intermedio, con alguna que otra cisterna de retículo endoplasmático liso, aunque a diferencia de los F1 suele carecer de mitocondrias y muestran una menor proporción de vesículas sinápticas ovaladas (**Figura 18 y 21**).

En lo referente a los contactos sinápticos que establecen los distintos

tipos de terminales estudiados, los RLP los hacen con dendritas convencionales, las cuales se pueden identificar por la presencia de polirribosomas libres, y con terminales F2, por medio de contactos sinápticos de tipo asimétrico (**Figura 20 y 21**). Además de estos contactos sinápticos, entre los RLP y las dendritas suelen aparecer contactos semejantes a desmosomas (contactos filamentosos), cuya misión es la de asegurar la unión de los elementos que entran en contacto. Asociados a estos contactos carentes de significado sináptico es frecuente observar, en el lado dendrítico, varias mitocondrias alineadas. Entre el contacto filamentoso y el perfil mitocondrial también aparece un material amorfo y denso a los electrones, así como unas pocas cisternas del retículo endoplasmático. Cuando aparecen los contactos filamentosos entre el terminal y la dendrita, la sinapsis se establece en bulbos dendríticos próximos al contacto filamentoso (**Figura 20**).

Los terminales RSD se observan con frecuencia estableciendo contactos sinápticos de tipo asimétrico con dendritas, pudiéndose encontrar numerosos contactos de este tipo sobre una misma dendrita. En menor proporción también se observan contactos entre los terminales RSD y terminales F. Dentro de estos últimos, los F1 son exclusivamente presinápticos con otros terminales, mientras que los F2 se muestran presinápticos con dendritas y postsinápticos con RLP, RSD y terminales procedentes de interneuronas (F1 y F2).

También es de destacar la relación que se establece entre los terminales RLP con dendritas y otros elementos de contacto, los cuales aparecen rodeados por numerosas láminas gliales, y que se conocen como glomérulos (**Figura 21**). En los glomérulos más sencillos, suele aparecer un terminal RLP (como elemento predominante), una dendrita de célula de relevo tálamo-cortical y un terminal F2. En esta unidad triádica, el terminal RLP es presináptico a la dendrita y al terminal F2. Por su parte, este último es

presináptico a la dendrita (**Figura 21**).

Finalmente, otro elemento del neuropilo destacable en las imágenes ofrecidas por la microscopía electrónica son las fibras nerviosas, las cuales aparecen rodeadas por gran número de láminas de mielina y mostrando un aspecto de tractos de diámetro uniforme con un cilindroeje compacto repleto de neurofilamentos (**Figura 18, 19 y 20**).

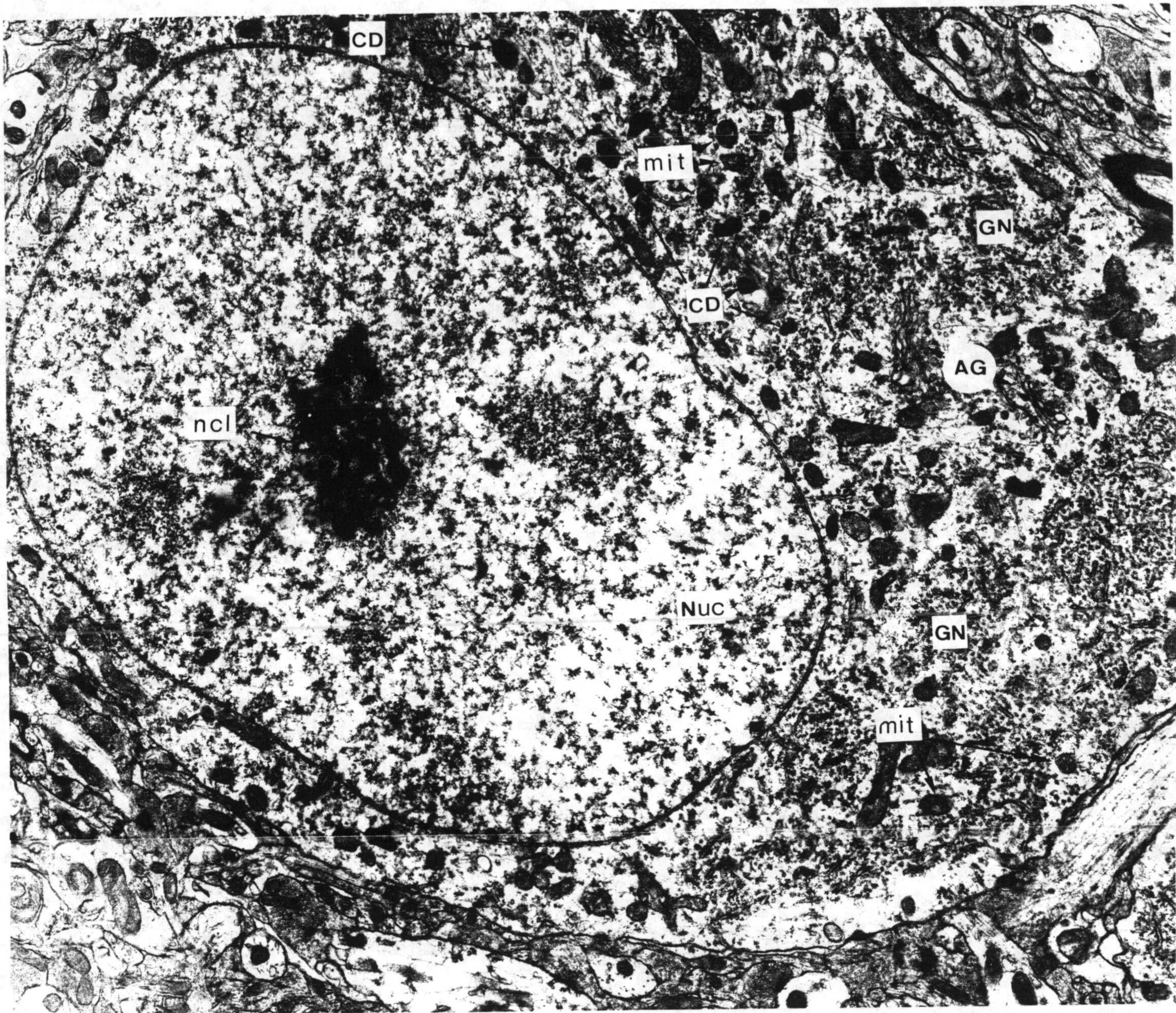


Figura 16



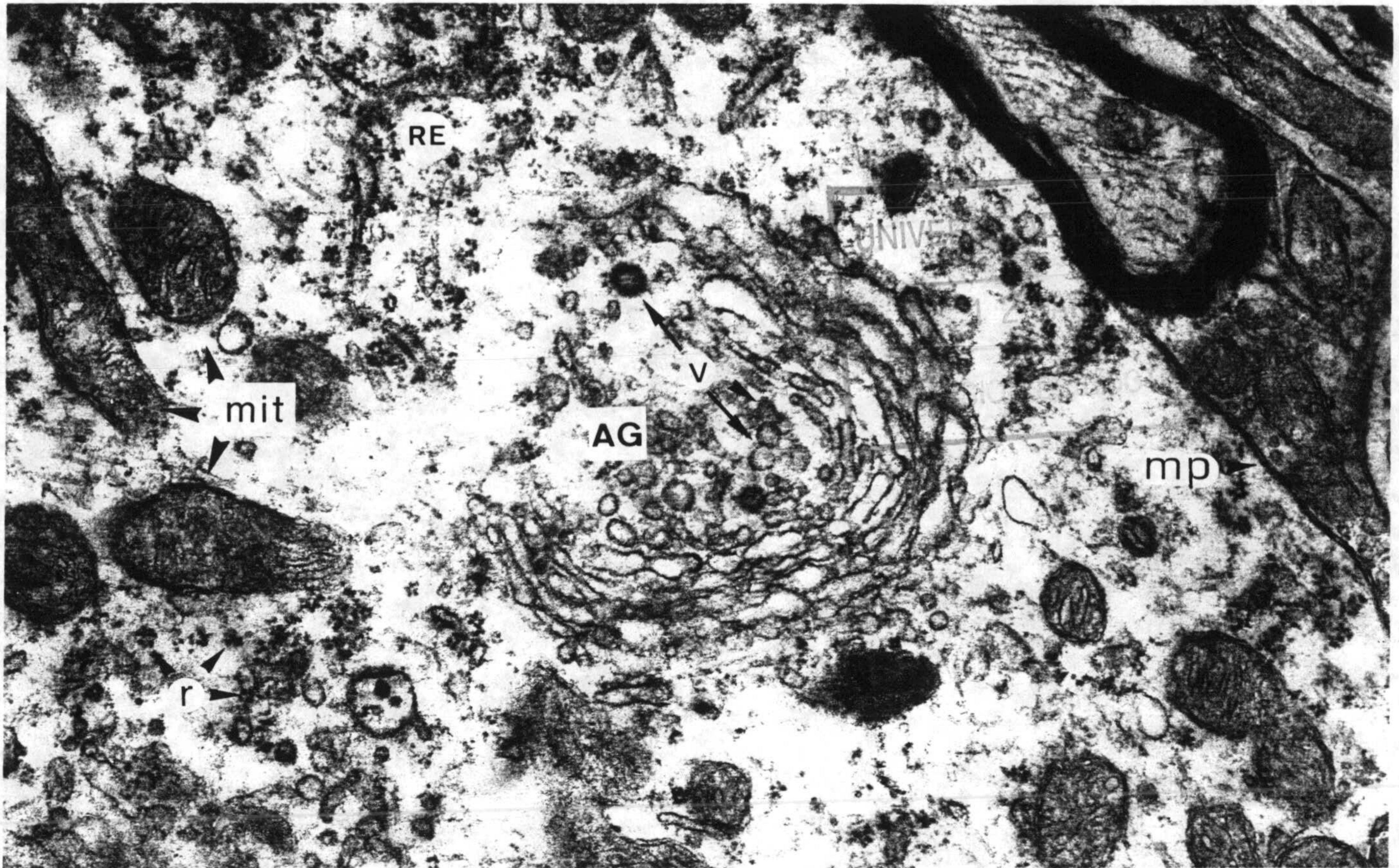


Figura 17



Figura 18

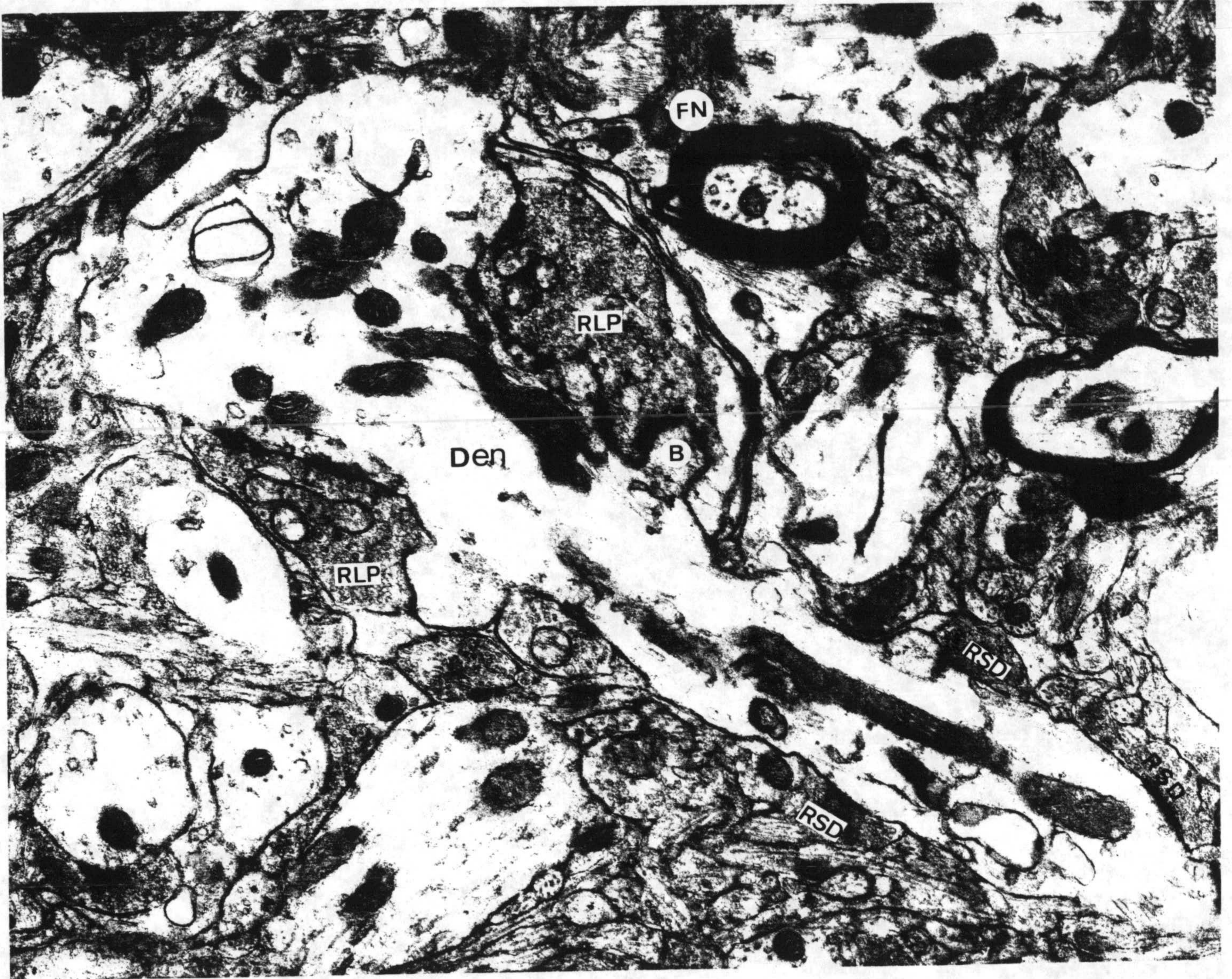


Figura 19

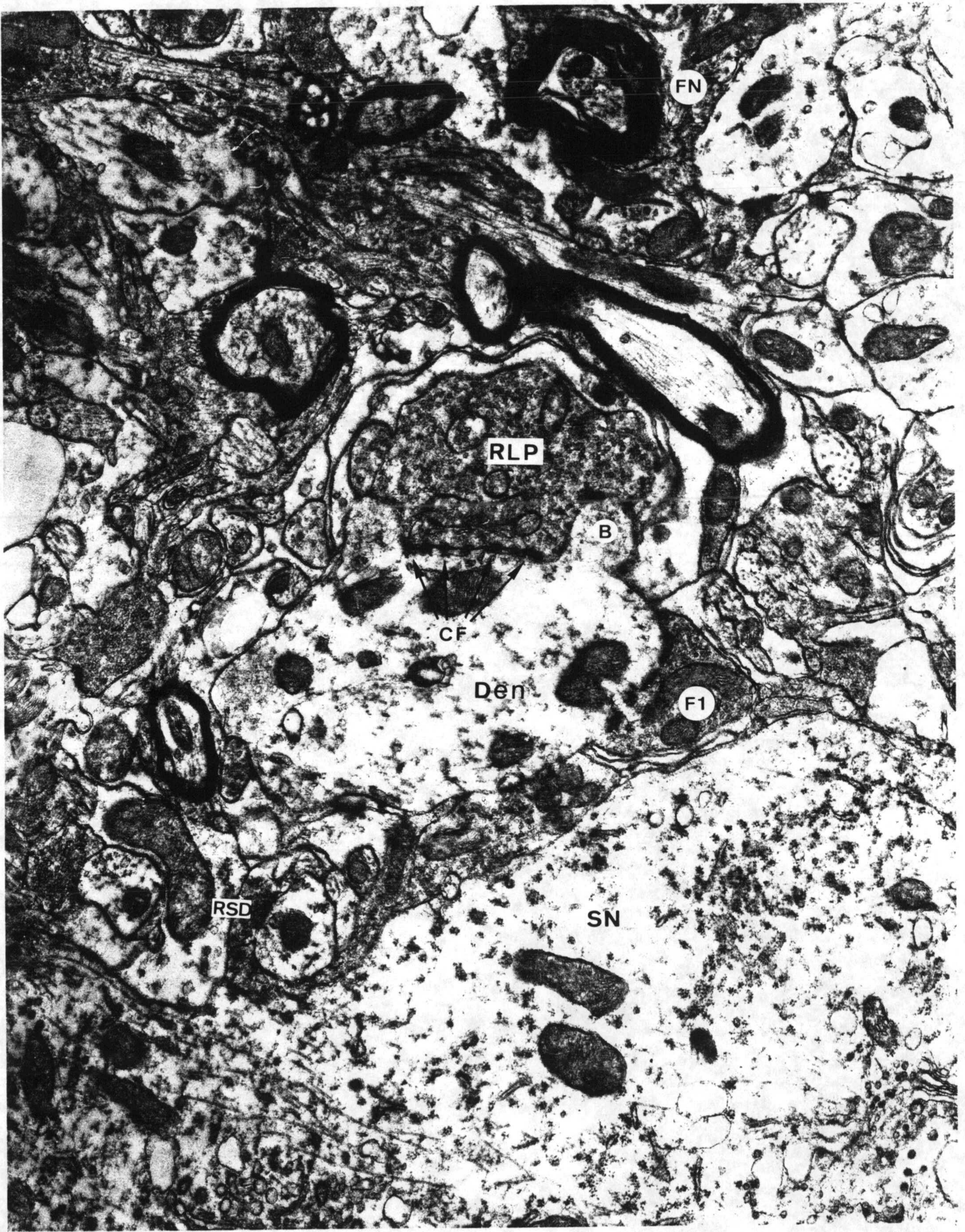


Figura 20



Figura 21

## **2. OBSERVACIONES EN EL GRUPO TRATADO CON ALCOHOL**

En las observaciones llevadas a cabo sobre el material procedente de animales sometidos a la acción del alcohol se puede apreciar que los seis meses que duró el periodo de experimentación de los conejos produjo alteraciones ultraestructurales tanto a nivel del soma neuronal como en el neuropilo adyacente.

### **a) Ultraestructura del soma neuronal**

Por lo que se refiere a las alteraciones inducidas por el alcohol a nivel del soma neuronal, éstas son cualitativamente similares tanto en las células de relevo tálamo-cortical como en las interneuronas.

Las alteraciones más significativas aparecen en el citoplasma de las neuronas, donde un rasgo a destacar es el incremento en el número de cuerpos densos (**Figura 22, 23 y 24**). Algunos de estos cuerpos presentan un aspecto lisosómico, pudiendo corresponder a gránulos de lipofuscina o a autofagosomas; otros podrían corresponder a procesos de transformación de orgánulos, como mitocondrias, en un avanzado estado de degeneración. La mayoría de estos cuerpos densos presentan una forma irregular y suelen mostrar un interior con un contenido granular homogéneo, con un centro claro a los electrones y la presencia de varias lamelas de aspecto membranoso (**Figura 24**).

Pertenecientes también a la familia de los lisosomas, se puede apreciar un mayor número de cuerpos multivesiculares, con una distribución próxima al Aparato de Golgi y en las proximidades de los troncos dendríticos (**Figura 22**).

Por lo que respecta al retículo endoplasmático rugoso, se observa una

reducción del mismo. En este caso, los grumos de Nissl forman pequeños fragmentos que quedan en una posición cercana al núcleo. Dentro de los grumos de Nissl se aprecia una disminución en la proporción de cisternas, las cuales tienden a presentar un menor tamaño. Asimismo, se aprecia una reducción en la cantidad de polirribosomas libres (**Figura 22 y 24**).

También hay que destacar un predominio de retículo endoplasmático liso con respecto a la situación control. Este retículo, de tipo vesicular, muestra una relativa abundancia y aparece distribuido por todo el citoplasma de las neuronas del geniculado (**Figura 22 y 24**).

Otro de los orgánulos citoplasmáticos que muestran diferencias con respecto a la situación control es al Aparato de Golgi (**Figura 24**). En este sentido, se pueden observar dictiosomas menos desarrollados, con un menor número de sáculos, los cuales son de menor tamaño que los de la situación control, y en muchos casos, aparecen más dilatados. Su localización, como en el caso de las neuronas control, sigue siendo perinuclear, aunque se observa una tendencia hacia posiciones más periféricas.

En lo referente a las mitocondrias, se observa un predominio de formas alargadas e irregulares sobre las granulares y abastionadas (**Figura 22, 23 y 24**).

Por lo que respecta al núcleo celular, no hemos apreciado diferencias, al menos de forma aparente. Tan sólo mencionar que el nucléolo, con características y configuración similares al de las neuronas control, ofrece posiciones algo más excéntricas en el núcleo.

#### **b) Rasgos ultraestructurales del neuropilo**

En primer lugar, por lo que respecta a las dendritas de las neuronas de

relevo, hemos observado la existencia de perfiles que se encuentran en proceso de degeneración (**Figura 25 y 26**). En otros casos, dichas dendritas también muestran en su interior mitocondrias aisladas, de matriz electrodensa, y que se encuentran rodeadas por membranas procedentes, probablemente, del retículo endoplasmático liso (**Figura 25**). En el interior de algunos terminales F2 ó dendritas presinápticas de interneurona, encontramos una situación similar, ya que aparecen grupos de mitocondrias rodeadas por membranas de retículo endoplasmático liso (**Figura 26**).

En lo referente a las formaciones glomerulares, tampoco hemos observado cambios con respecto a la situación control, y las imágenes obtenidas nos proporcionan la típica disposición de una dendrita central, como elemento principal, rodeada por el resto de procesos que forman parte de estos complejos (**Figura 27**).

Otros elementos del neuropilo que muestran diferencias en los animales tratados con alcohol son las fibras nerviosas. En este sentido son habituales en nuestro material las deformaciones de las cubiertas mielínicas, con dislaceración de las láminas más internas y una oclusión o alteración que desorganiza el axoplasma (**Figura 28**). Asimismo, también es posible apreciar una menor proporción de láminas de mielina rodeando al axón (**Figura 29**).

Finalmente, con respecto a la glia, las imágenes obtenidas a partir de los animales tratados con alcohol evidencian un considerable incremento de láminas gliales (**Figura 30**), así como un notable aumento de gliofilamentos en el citoplasma de los astrocitos (**Figura 31**).

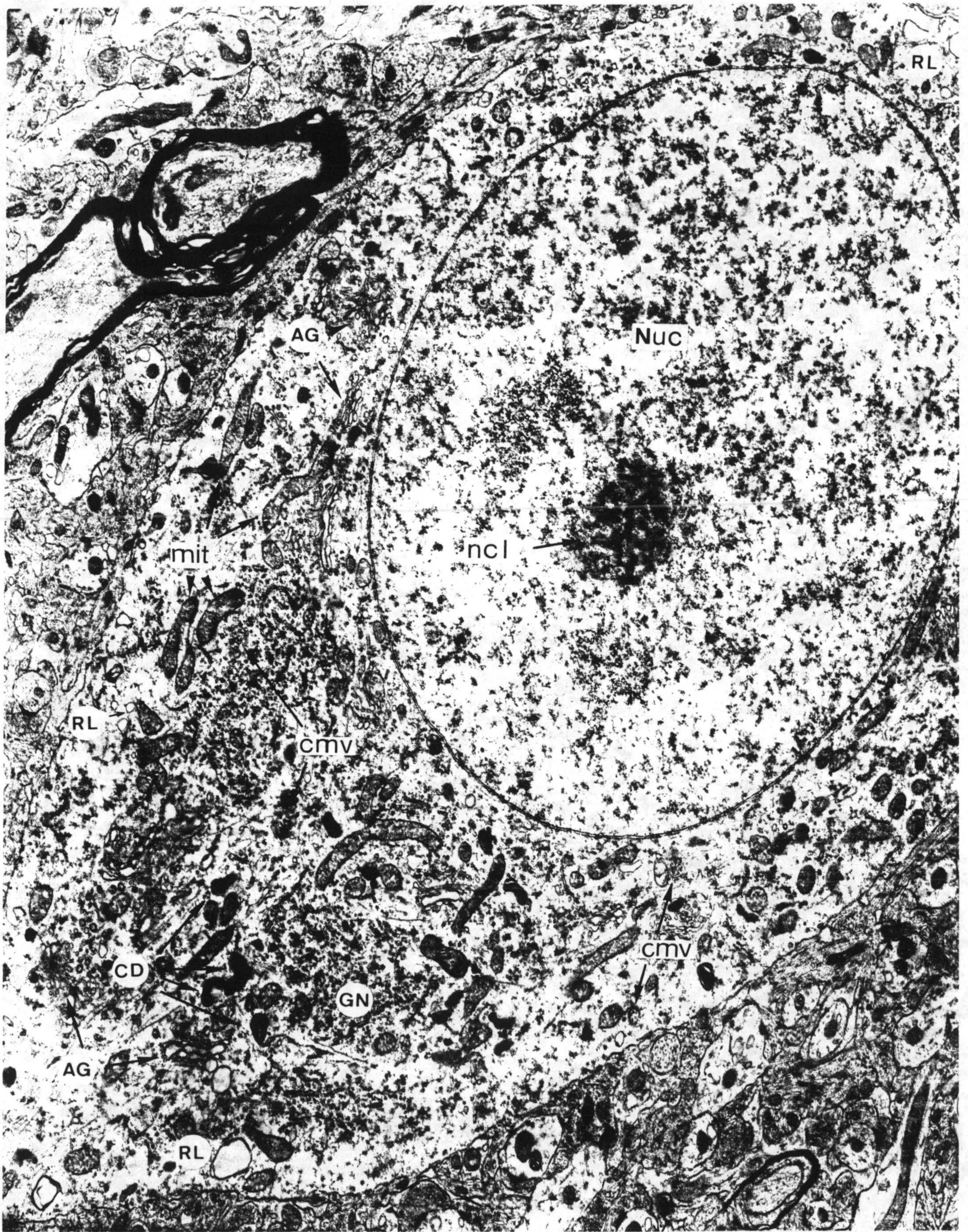


Figura 22



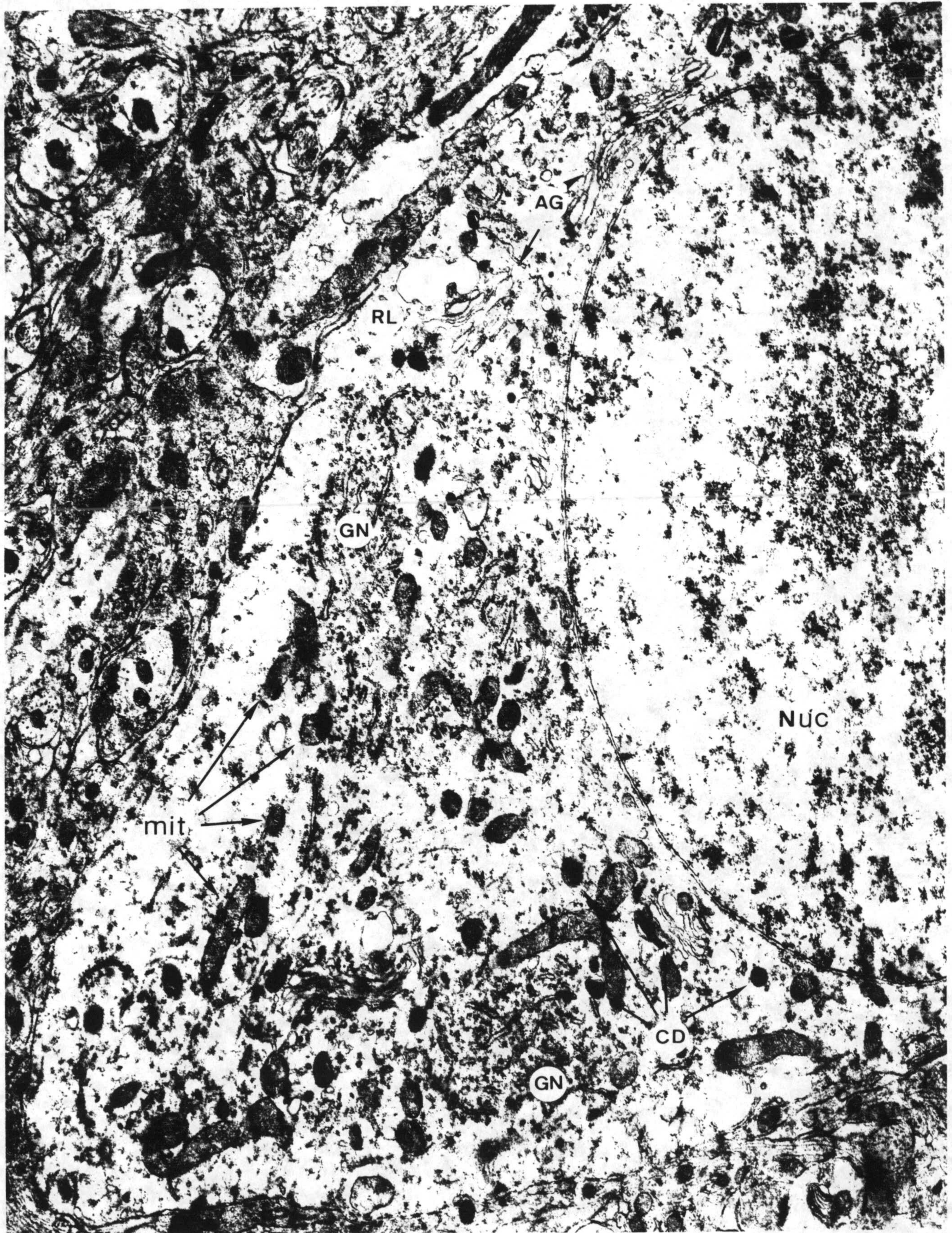


Figura 23

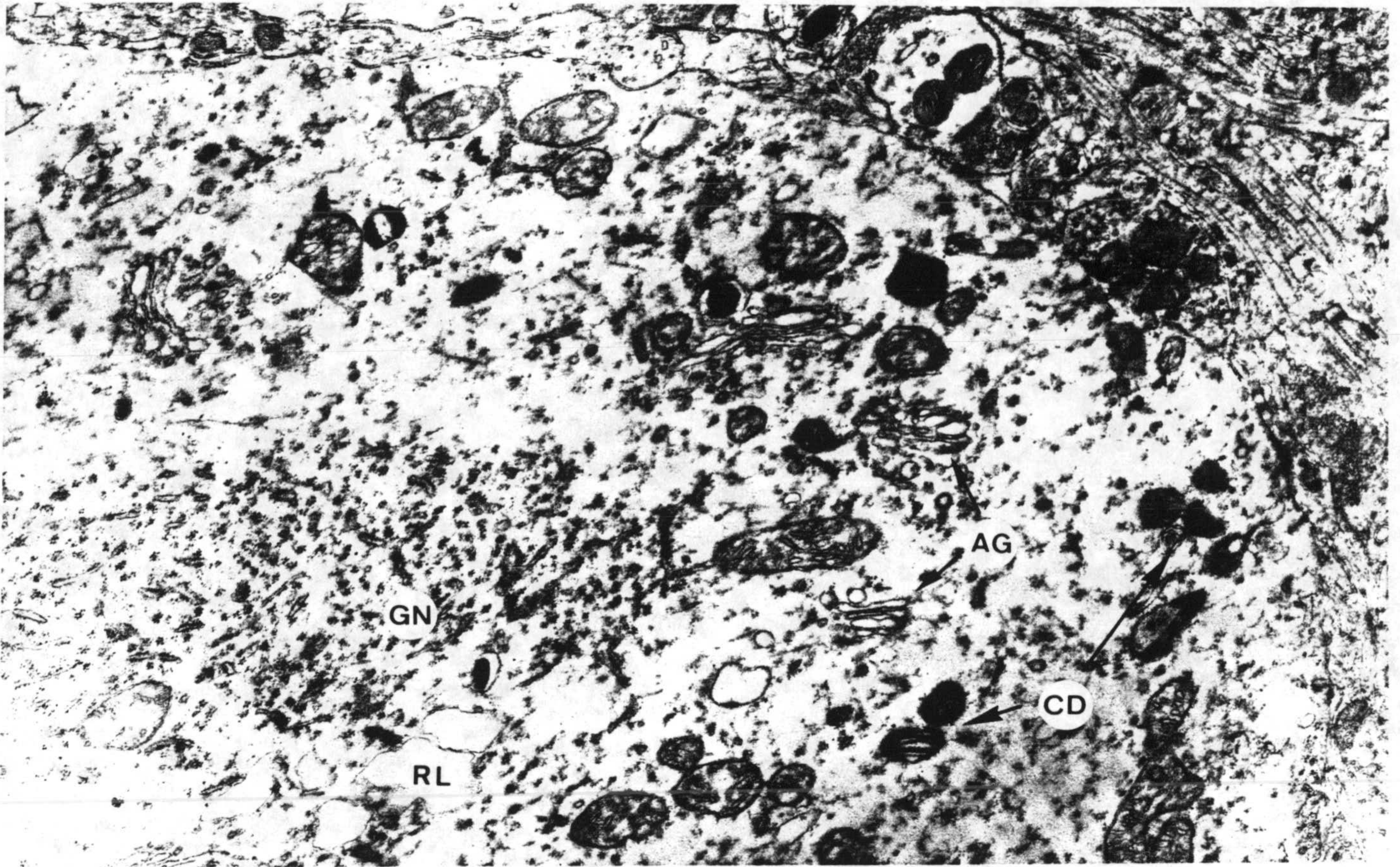


Figura 24

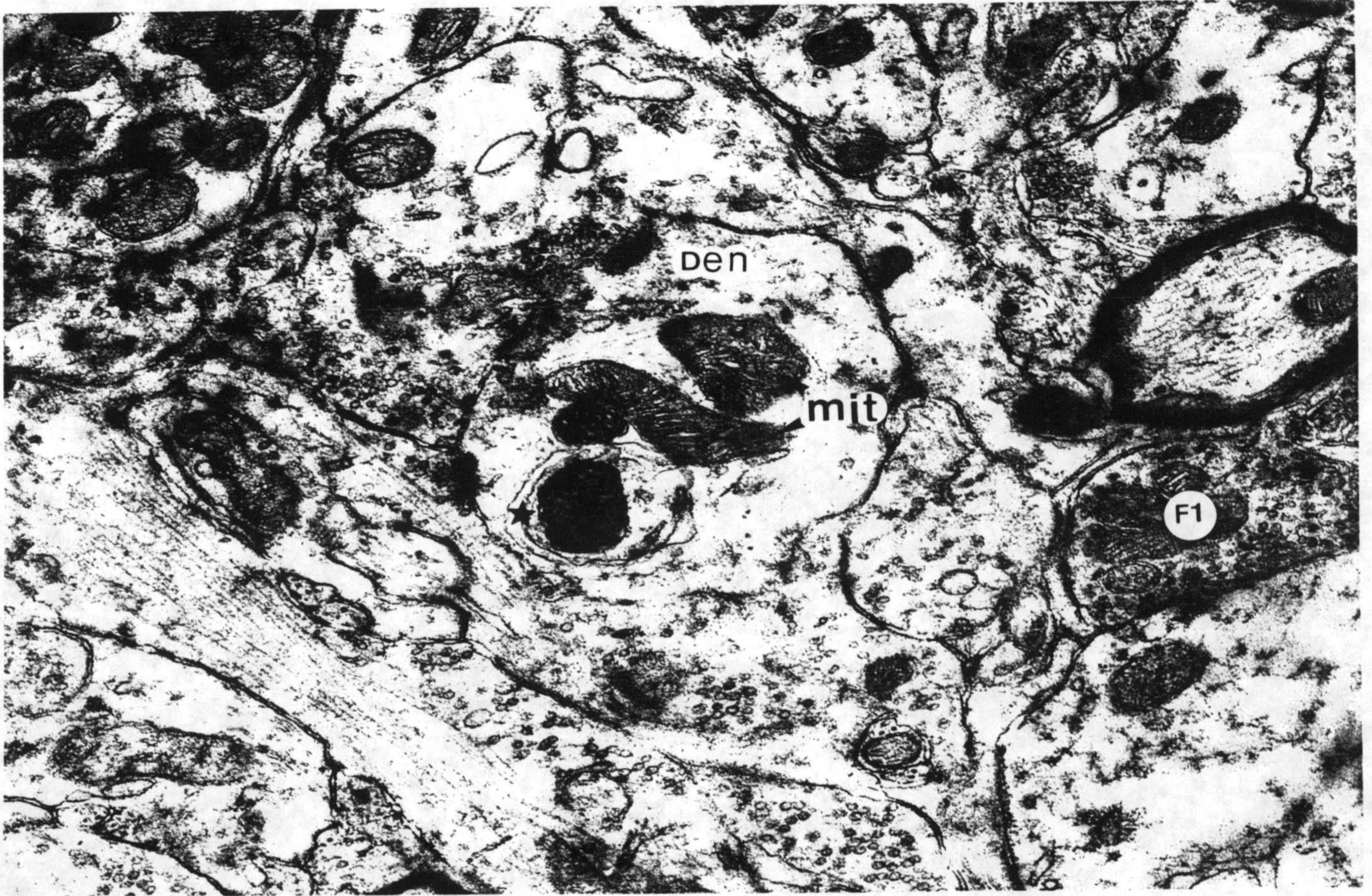


Figura 25

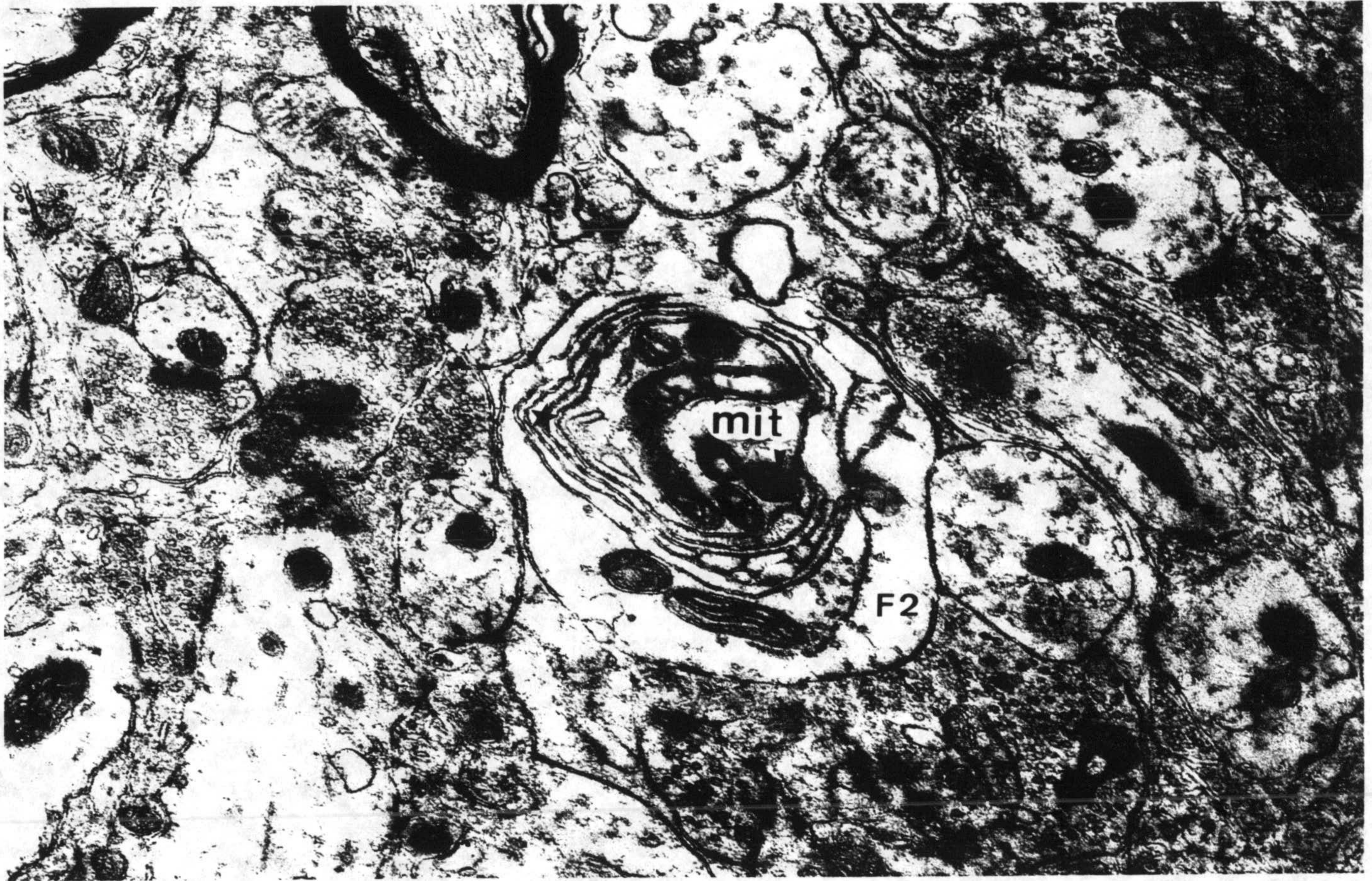


Figura 26

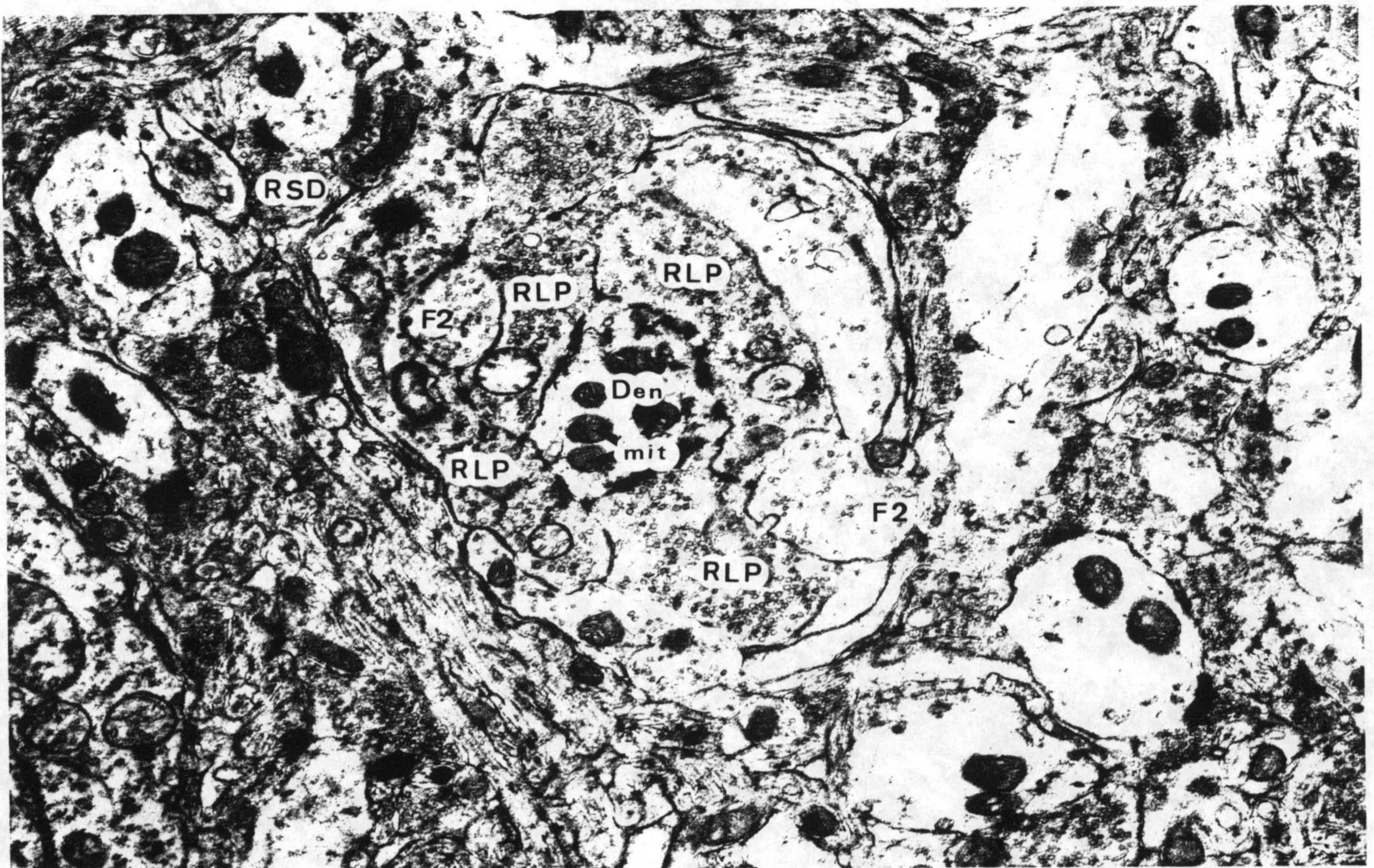


Figura 27

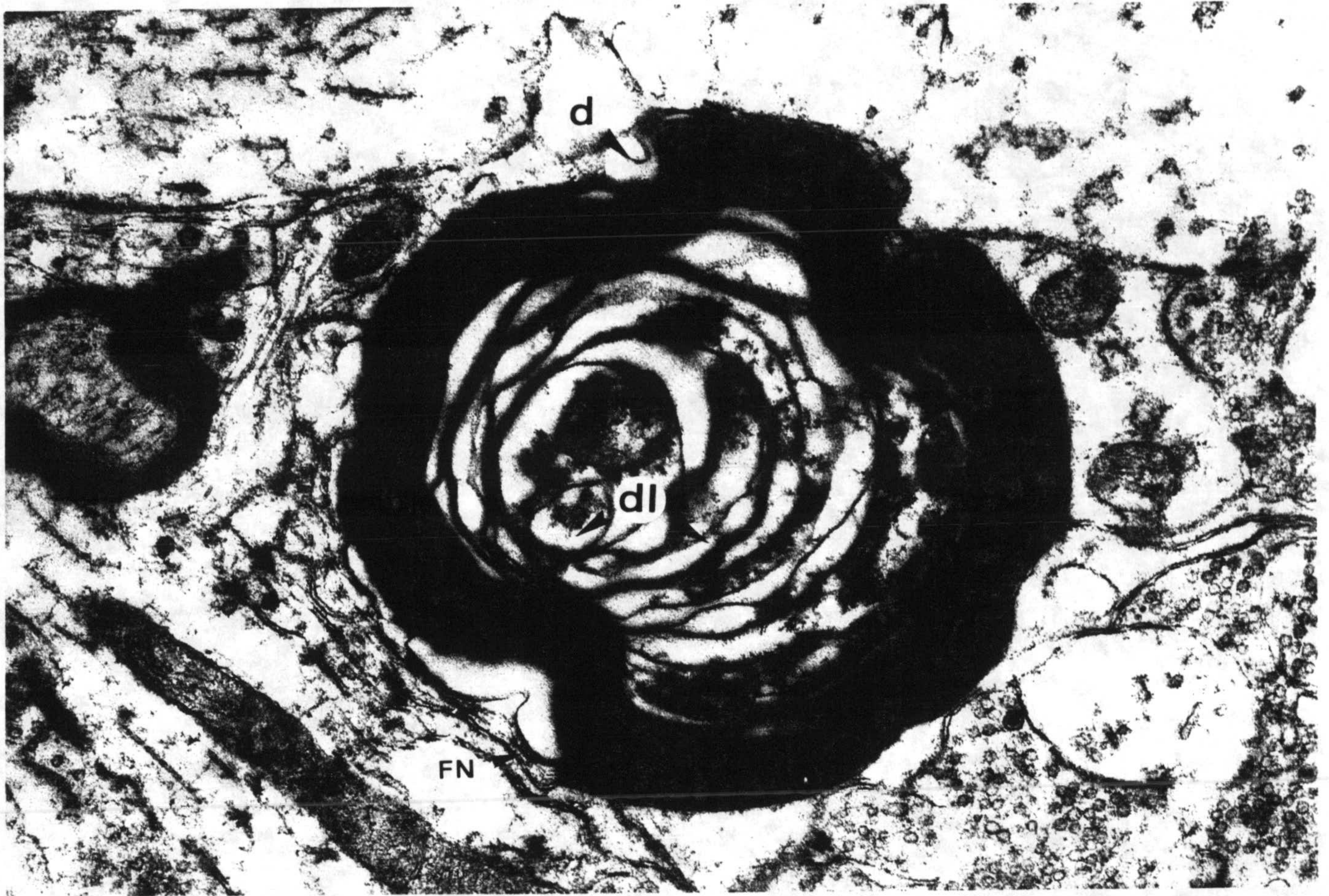


Figura 28

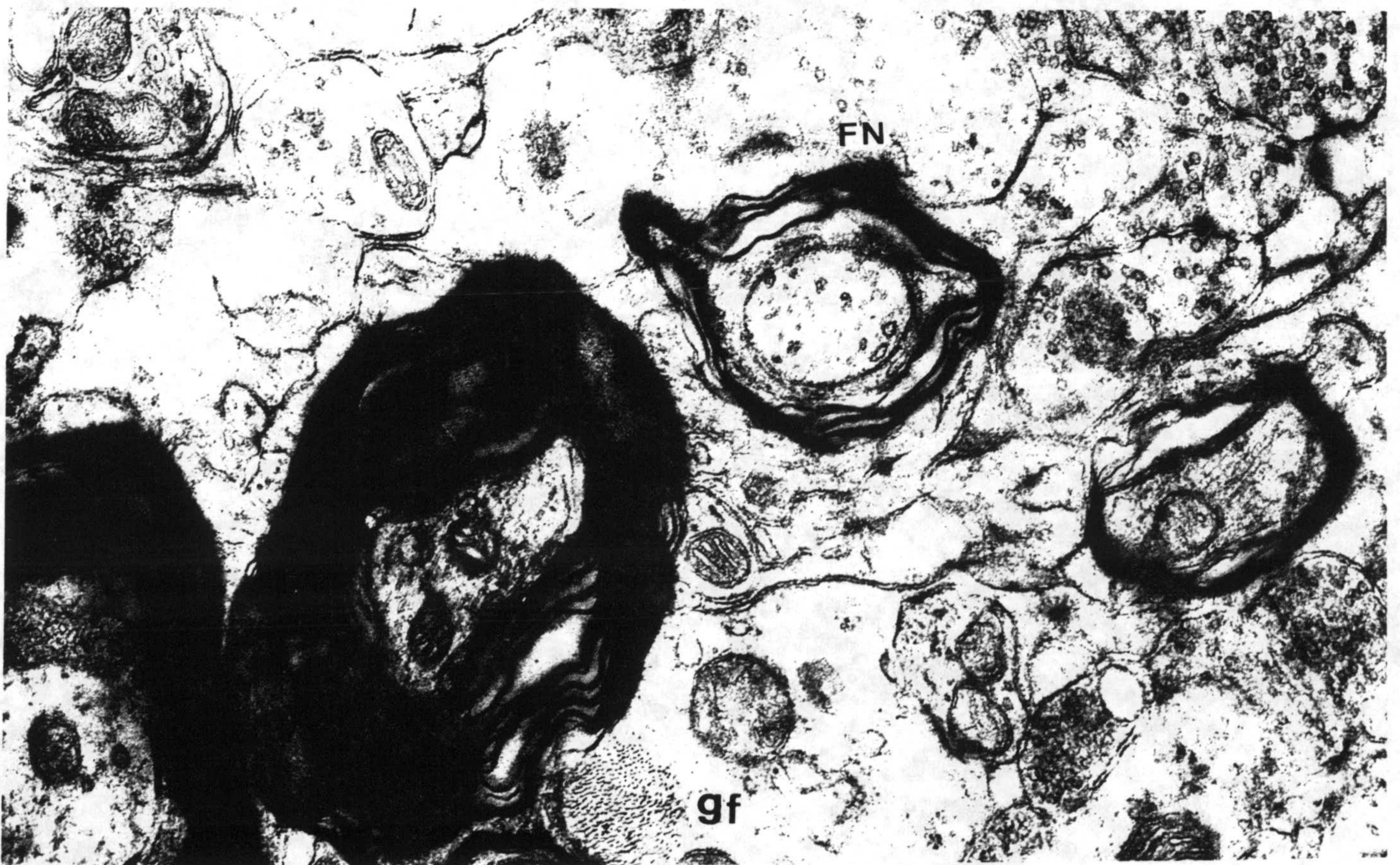


Figura 29

UNIVERSIDAD DE GRANADA  
12 MAYO 1993  
COMISION DE DOCTORADO



Figura 30

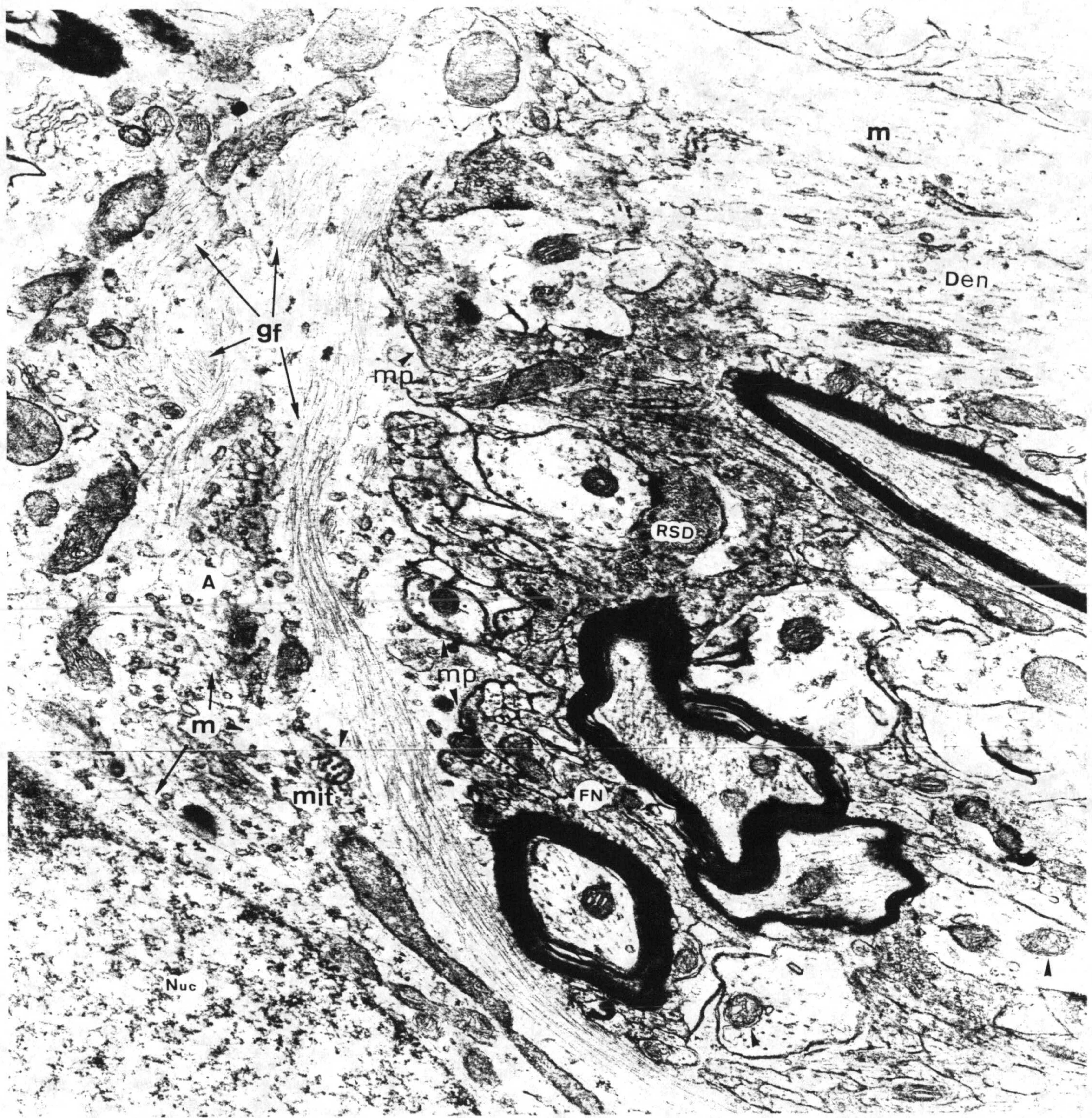


Figura 31

**V. COMENTARIO**

## **1. CONSIDERACIONES TECNICAS**

El primer paso a dar fue la puesta a punto, en los casos requeridos, de aquellos procedimientos técnicos utilizados durante el desarrollo de los estudios llevados a cabo sobre los NGLd de los distintos conejos (*Oryctolagus cuniculus L.*) empleados como control o sometidos de forma experimental a la acción del etanol. Esto se hizo extensivo tanto para los estudios de Microscopía Óptica como para los de Microscopía Electrónica. En todo caso, los procedimientos técnicos estuvieron siempre en consonancia con los fines propuestos para el presente trabajo.

En primer lugar, fue necesario poner a punto la técnica empleada en la administración de alcohol a los animales. Tal y como hemos expuesto con anterioridad, de todos los métodos probados (intubación, inyección intraperitoneal, consumo en la dieta y consumo voluntario), finalmente nos decidimos por aquel en el que el alcohol se administraba a los animales y a que, al mismo tiempo, nos permitía determinar de un modo muy aproximado la cantidad de alcohol ingerido. En la puesta a punto de esta técnica de administración de alcohol resultó muy conveniente emplear concentraciones crecientes de alcohol, desde muy diluido (5% en volumen), durante los primeros días, hasta alcanzar la concentración deseada para la experiencia (30% en volumen), tras dos semanas de ingesta. De este modo, el alcohol era mejor tolerado por los animales que desde el principio de la experiencia se les administraba una concentración del 30%.

Además, la elección de método de administración sobre los anteriormente citados, algo más laboriosos, supuso evitar condiciones estresantes para los animales, las cuales se ha podido comprobar que, independientemente del tratamiento alcohólico, pueden producir alteraciones del sistema nervioso central (Abel y Riley, 1986; West, 1986). Por tanto, resulta de gran importancia conseguir condiciones no traumáticas para asegurarnos



de que los daños encontrados sean producidos únicamente por la acción del alcohol.

En lo referente al procesamiento de los conejos, nos inclinamos por la utilización de la perfusión vía carotídea por resultar más directa y efectiva para nuestro objeto final que la técnica habitual vía aorta, a través del corazón, o que la simple inyección del fijador por vía arterial. Así, la técnica de perfusión vía arterias carótidas permite mantener vivo al animal en todo momento, bajo anestesia general con Uretano, hasta que se produce la entrada de fijador en el cerebro, hecho éste muy conveniente si tenemos en cuenta la sensibilidad del tejido nervioso a los estados de anoxia prolongada. Además, esta técnica de perfusión introduce las ventajas de no tener que someter el animal a una respiración asistida y la de hacer llegar al cerebro casi todo el fijador empleado en el proceder. Contrariamente, en la perfusión vía intracardíaca, tan sólo de un 5% a un 10% del fijador utilizado llega hasta el tejido cerebral.

Por lo que se refiere a las técnicas destinadas a las observaciones de Microscopía Óptica, conviene reseñar el empleo selectivo del método de Klüver-Barrera para la realización de los estudios de tipo cuantitativo. La utilización de esta técnica de tinción respondió no sólo a que las vainas de mielina se tiñen por el Luxol Fast Blue (una ftalocianina de cobre con estructura química en cadena cerrada), sino que incluso en la misma preparación, y por tinción combinada con cresil violeta (técnica de Nissl), lo hacen las células nerviosas y sus núcleos. En efecto, la difusión progresiva del Luxol Fast Blue desde la solución alcohólica hasta las vainas de mielina tiñe las sustancias lipoides de éstas últimas. El cresil violeta pone de manifiesto los núcleos de las células nerviosas, donde destaca intensamente el nucléolo, y los grumos de Nissl de las neuronas. Este comportamiento en la tinción responde a la presencia de ácidos ribonucleicos en la composición de las estructuras teñidas. Este colorante básico se deposita en los radicales

ácidos de los ácidos nucleicos como consecuencia de fuerzas electropolares. Debido a todas estas particularidades y la buena distinción de los límites del pericarion neuronal, la determinación de sus medidas resulta más fácil y correcta.

La técnica de Klüver-Barrera determina, como resultado final, fibras nerviosas de un color verde-azulado, así como grumos de Nissl y nucléolos de un color violáceo o rosado. Además, los núcleos de las células gliales aparecen teñidas en diversos tonos azules, destacando en ellos pequeños grumos irregulares de heterocromatina. Por otra parte, la aplicación de esta técnica nos permite obtener preparaciones histológicas en las que podemos observar una perfecta delimitación del NGLd, lo que nos permite llevar a cabo las oportunas descripciones topográficas e histológicas.

Otro de los aspectos técnicos a tener en cuenta fue el grosor del corte empleado. Cuando se realizan estudios de tipo cuantitativo, existe la tendencia generalizada de obtener cortes lo más gruesos posibles, con objeto de seccionar el mínimo número de estructuras empleadas como unidad de recuento, con lo que reducimos la posibilidad de errores de estimación. Al mismo tiempo, las determinaciones citomorfométricas también requieren cortes gruesos, ya que de esta manera conseguimos un mayor número de neuronas no seccionadas y que ofrecen su máximo perfil sobre el plano de corte. No obstante, los cortes demasiado gruesos también presentan inconvenientes, ya que en ellos aumenta la dificultad de realizar los recuentos debido a la superposición de imágenes celulares. Además, los perfiles nucleolares resultan desvirtuados dado que lo que realmente estamos considerando es la proyección del perfil máximo de cada célula en el plano de corte. Todas estas consideraciones nos han llevado a obtener en nuestro material cortes de 10  $\mu\text{m}$  de espesor, que coincide con el utilizado por gran parte de los investigadores que llevan a cabo recuentos neuronales en el cerebro, que oscila alrededor de 15  $\mu\text{m}$ , aunque a pesar de todo, en la

literatura encontramos autores que han empleado cortes de hasta 50  $\mu\text{m}$  (ver p.e. Chow, 1951).

En lo relativo al elemento empleado como unidad de recuento, en nuestro caso se tomó el nucléolo, debido a que su pequeño tamaño disminuye la posibilidad de seccionarlo, con lo que se reduce el error en la sobreestimación del número de perfiles producido por efecto del corte. El nucléolo, como unidad de recuento, ha sido ampliamente utilizado desde que autores como Königsmark (1970) y Haug (1967, 1970, 1972) demostraron su utilidad, por encima de otras estructuras celulares, en estudios de densidad celular y sobre todo para los realizados en tejido nervioso.

Un factor importante a tener en cuenta fue el de la retracción. En efecto, como resultado de la aplicación de los procedimientos técnicos, se va a producir una reducción en el volumen de las estructuras de estudio (en nuestro caso el NGLd). Resulta interesante el poder cuantificar esta retracción para ajustar los valores calculados a los reales que aparecen *in vivo*, ya que de este modo podremos comparar los resultados obtenidos con los presentados por otros autores, siempre y cuando ellos también hayan calculado el valor de la retracción en su material.

La retracción sufrida por un determinado material va a depender de factores tales como el animal empleado, del tejido sometido a estudio y de la técnica utilizada. En nuestro caso, para el tejido nervioso del conejo sometido a la técnica de Klüver-Barrera, mediante el método de Navascués y cols. (1979) hemos obtenido una retracción de un 36,5%.

Si ponemos los máximos cuidados para que nuestros materiales objeto de estudio, al ser sometidos a procesos similares, ofrezcan modificaciones iguales o equivalentes, la retracción obtenida debe de tener muy escasa influencia a la hora de ofrecer comparación de los valores. Así, los cambios

existentes no van a influir en las conclusiones comparativas y sí acaso en valoraciones absolutas con los resultados aportados por otros autores.

Finalmente, en el análisis de la estructura del núcleo diencefálico, hemos llevado a cabo secciones en tres direcciones diferentes: horizontal, frontal y sagital. La importancia de esta manera de proceder radica en que cualquier consideración sobre la forma o el tamaño de los elementos que se estudian hace imprescindible la utilización de varios planos de sección, ya que en caso contrario se podría hablar de diferencias morfológicas donde en realidad no existen o viceversa (Droogleever y Fortuyn, 1964).

Esta consideración de muestrear de forma aleatoria en varias direcciones es con frecuencia obviada por muchos de los investigadores, que utilizan sólo secciones obtenidas a partir de una única dirección de corte. En base a esto, creemos que la realización de cualquier análisis estereológico fiable requiere varias orientaciones que de un modo aleatorio se lleven a cabo sobre el material.

## **2. ASPECTOS SOBRE LA MORFOLOGIA**

Siempre que estemos interesados en la realización de un estudio estereológico, tal y como expuso Haug (1972), el primer paso a dar es la obtención de una clara imagen cualitativa de la zona objeto de estudio: el NGLd del conejo, en nuestro caso. Esto nos viene a indicar que antes de llevar a cabo cualquier determinación cuantitativa, se requiere que previamente realicemos un detallado análisis morfológico de la zona. Ello nos permite localizar y delimitar exactamente el núcleo diencefálico objeto de nuestro estudio (NGLd) y sus sectores constituyentes. Dicho procedimiento se siguió tanto para los animales tratados con alcohol como para los control.

Desde el punto de vista morfológico, resulta importante poner de manifiesto la existencia de tres sectores constituyentes y distinguibles en el NGLd del conejo: el sector alfa externo ( $\alpha_E$ ), el sector alfa interno ( $\alpha_I$ ) y el sector beta ( $\beta$ ). Estas observaciones coinciden con las apreciaciones morfológicas realizadas por Rose y Malis (1965) y por Holcombe y Guillery (1984).

La morfología macroscópica de los distintos sectores considerados y del NGLd en su conjunto no se ve alterada como consecuencia de la exposición al alcohol tras los seis meses que duró la experiencia. Es posible que el conjunto de fibras que envuelve al NGLd constituya un obstáculo insalvable para que la acción del alcohol se traduzca en una alteración de la morfología por causas de edema, no obstante serían de considerar las alteraciones de la mielina.

Por tanto, también resulta posible que un cambio de la morfología vaya directamente asociada con cambios en los volúmenes del NGLd y/o de sus sectores constituyentes. En este sentido, tal y como se comentará más adelante, un periodo más prolongado de administración alcohólica podría

alterar el balance existente entre el agua y las sales, dando lugar a cambios volumétricos y, por tanto, morfológicos de las estructuras estudiadas.

Llegados a este punto del comentario, nos encontramos en la condición de proceder a los estudios estereológicos, comenzando por lo referente a la determinación de los diferentes volúmenes (global y por sectores) y la estimación de la densidad neuronal, para finalmente tratar el tamaño de las neuronas, estudiando parámetros como el volumen del soma neuronal y el área neuronal.

### 3. ESTIMACION DE LOS VOLUMENES

Los valores relativos al volumen de los sectores constituyentes del NGLd ( $\alpha_E$ ,  $\alpha_I$  y  $\beta$ ) confirman las apreciaciones morfológicas de autores como Rose y Malis (1965) y Holcombe y Guillery (1984), y los datos aportados más recientemente por Carmona y cols. (1987), de que el sector  $\alpha_E$  es mayor que el sector  $\alpha_I$  y que el sector  $\beta$ , que resulta el más pequeño de los tres. La aplicación del correspondiente test estadístico no estableció diferencias significativas entre el grupo experimental tratado con alcohol y el respectivo grupo control en lo referente al volumen ocupado por dichos sectores.

El presente estudio confirma las impresiones de los antedichos autores, dado que en el tratamiento con etanol se obtiene un volumen para el sector  $\alpha$  cuyo porcentaje oscila alrededor del 91% con respecto al total del NGLd, equivaliendo el porcentaje restante (alrededor del 9%) al del sector  $\beta$ . Tal y como mencionamos con anterioridad, el sector  $\alpha_E$  resulta el mayoritario del sector  $\alpha$ , con un porcentaje de aproximadamente un 59%. El porcentaje restante equivale al volumen ocupado por el sector  $\alpha_I$ . Por su parte, en el grupo utilizado como control, el volumen del sector  $\alpha$  presenta un porcentaje que oscila alrededor del 90%, con un sector  $\alpha_E$  cuyo porcentaje es de un 60%, correspondiendo el porcentaje restante al del sector  $\alpha_I$ .

Un aspecto de interés es el estudio del volumen del sector  $\alpha_E$  y  $\alpha_I$  por zonas (Superior, Media e Inferior). Así, si consideramos los geniculados sometidos a la acción del alcohol, podemos comprobar que en los antedichos sectores, el porcentaje en volumen es mayor en la zona Media que en la Superior, y ambos mayores que en la Inferior. En efecto, en el sector  $\alpha_E$  el porcentaje de la zona Superior es de un 39%; de un 48% para la zona Media; y de un 12% para la Inferior. Por lo que respecta al sector  $\alpha_I$ , dichos porcentajes oscilan alrededor del 29%; del 51%; y del 20%, respectivamente.

Asímismo, tal y como ocurre en la situación anterior, los geniculados utilizados como control muestran volúmenes con porcentajes de participación diferentes en función de la zona de estudio, siendo mayor en la Media y menor en la Superior e Inferior. En este caso, el porcentaje en volumen del sector  $\alpha_E$  es de un 36% para la zona Superior; de un 46% para la Media; y de un 18% para la Inferior. En el sector  $\alpha_I$ , tales porcentajes oscilan alrededor del 32%; del 50%; y del 17%, respectivamente.

Tal y como se puede apreciar, el tratamiento experimental a la acción del alcohol no determina ninguna alteración significativa del volumen global del núcleo diencefálico ni de sus sectores constituyentes. Estos datos coinciden con aquellos otros desarrollados por Castañeyra-Perdomo y cols. (1991) a nivel del Area Postrema, órgano implicado en los procesos vomitivos y en la regulación del peso corporal, en el sentido de que su volumen global no se afecta por la ingesta crónica de alcohol. Como se comentará con posterioridad en la sección correspondiente, dichos autores describen una reducción del tamaño de las neuronas constituyentes, de manera análoga a nuestro caso y a los cambios inducidos por el alcohol en Hipocampo y Cerebelo.

Son muchos los estudios que ponen de manifiesto una reducción del volumen inducida por el alcohol, como los llevados a cabo en cerebro (Diaz y Samson, 1980; Burns y cols., 1986; Lopez-Tejero y cols., 1986) y cerebelo e hipocampo (Walker y cols., 1980; Borges y Lewis, 1982; Tavares y Paula-Barbosa, 1982; McMullen y cols., 1984; Tavares y Paula-Barbosa, 1984; Burns y cols., 1986). No obstante, después de comprobar la ausencia de diferencias significativas entre los dos grupos experimentales considerados en lo referente a los valores de los volúmenes, los resultados obtenidos muestran que no es éste uno de los efectos del alcohol en el Núcleo, ya que no modifica los porcentajes de las distintas zonas. Esto podría venir motivado por el hecho de verse impedida la salida de agua, posiblemente por la barrera que



constituye el estar rodeado por gran cantidad de fibras (tracto óptico, lámina intergenicular y fibras de proyección genículoestriada).

Por otro lado, también es posible que el tiempo de exposición al alcohol haya sido insuficiente para alterar estos parámetros, tal y como Cadete-Leite y cols. (1989a, b) han puesto de manifiesto en estudios similares, aunque no lo haya sido para modificar el de la densidad o el volumen neuronal, como posteriormente se comentará. En este sentido, varios autores describen una disminución del volumen de estructuras nerviosas después de periodos de exposición alcohólica más prolongados (Walker y cols., 1980; Tavares y Paula-Barbosa, 1982; McMullen y cols., 1984; Tavares y Paula-Barbosa, 1984). Por tanto, nos movemos en periodos de tiempo que pueden ser límite para detectar alteraciones que dependan del tratamiento empleado y no de otras modificaciones derivadas del funcionamiento general. A este respecto, serán experiencias posteriores en las que el tiempo de exposición sea más prolongado las que nos podrían proporcionar una respuesta complementaria y más amplia.

En relación con esta última consideración, decir que se ha puesto de manifiesto una relación directa entre el consumo crónico de alcohol y el balance entre el agua y las sales, y la hipertensión (Lian, 1915; Beevers, 1977). En base a ello, pensamos que el hecho de que en nuestro estudio no se produca una alteración del volumen global del NGLd ni de sus sectores constituyentes podría deberse a la antedicha asociación. Pudiera ocurrir que los seis meses de exposición alcohólica sean insuficientes para producir una acción directa sobre el balance existente entre el agua y las sales, y, de este modo, no verse modificado el volumen del núcleo.

En definitiva, la no obtención de diferencias anatómicas generales, en nuestro caso, pone de manifiesto la falta de influencias sobre la estructura general del órgano tras estudiar la acción de la droga.

#### 4. RECuentos NEURONALES Y ESTIMACION DE LA DENSIDAD NEURONAL

Como ya ha sido descrito en secciones previas, el cálculo de la densidad neuronal en los distintos sectores ( $\alpha_E$ ,  $\alpha_I$  y  $\beta$ ) y zonas (Superior, Media e Inferior) de los distintos geniculados considerados, tanto los tratados con alcohol como los control, hizo imprescindible la realización de una serie de recuentos (por medio del nucléolo), para lo cual se hizo uso de una unidad volumétrica de recuento de dimensiones concretas con objeto de obtener un número de ellas lo suficientemente representativo.

La fórmula de Azorín Poch (1972) nos permitió analizar el número de paralelepípedos elegidos como componentes de las muestras para que éstas fueran representativas. Este análisis mostró que dicho número fue más o menos similar, sin grandes variaciones, en todas las zonas y sectores objetos de estudio. De forma general, se comprueba el hecho de que cuanto menor es el número de neuronas contenido en cada paralelepípedo, mayor es el número de éstos que se necesita elegir para componer una muestra que sea representativa del total de la población.

El hecho de que en el sector  $\beta$  nos encontremos con un menor número de neuronas resulta evidente, ya que en él tiene lugar una prevalencia de fibras, que desde el NGLd van a alcanzar la corteza visual (Rose y Malis, 1965; Schober y cols., 1985), sobre el número de neuronas existentes.

En el presente estudio, la aplicación de métodos estadísticos nos permite poner de manifiesto, tanto en los geniculados tratados con alcohol como en los control, varias zonas de densidad celular diferente. Los valores de densidad neuronal obtenidos están en concordancia con los aportados por Carmona y cols. (1987) en lo relativo al hecho de que el sector  $\alpha_E$ , considerado globalmente, presenta una densidad neuronal mayor que el

sector  $\alpha_1$  y que el sector  $\beta$ . En efecto, lo podemos comprobar en el grupo tratado con alcohol, donde la densidad neuronal del sector  $\alpha_E$  es de  $24.021 \pm 0,362$  neuronas/ $10^6 \mu\text{m}^3$ ; en el sector  $\alpha_1$  es de  $16.253 \pm 0,207$  neuronas/ $10^6 \mu\text{m}^3$ ; y en el sector  $\beta$  de  $7.091 \pm 0,055$  neuronas/ $10^6 \mu\text{m}^3$ . Por su parte, en la situación control, la densidad neuronal es de  $27.387 \pm 0.395$  neuronas/ $10^6 \mu\text{m}^3$  en el sector  $\alpha_E$ ; de  $19.142 \pm 0.279$  neuronas/ $10^6 \mu\text{m}^3$  en el  $\alpha_1$ ; y de  $9.126 \pm 0.190$  neuronas/ $10^6 \mu\text{m}^3$  en el  $\beta$ . Independientemente de la diferencia en el número de neuronas entre los dos grupos experimentales tras la acción del alcohol, como causa que pueda explicar el comportamiento de la densidad neuronal en los tres sectores constituyentes del NGLd, se propone que al ser menor el volumen del núcleo diencefálico según nos dirigimos desde el sector  $\alpha_E$  hasta el  $\beta$ , proporcionalmente se produce un aumento de la cantidad de fibras que lo van a atravesar y que entran en el núcleo por el sector  $\alpha_E$ , se internan en él por el  $\alpha_1$  y finalmente atravesando, vienen prácticamente a constituir, el sector  $\beta$  (en su camino hacia la corteza visual). Ello determina un menor valor del espacio disponible para los somas neuronales, lo que dará lugar a valores inferiores de la densidad neuronal en estas zonas (aún en condiciones normales).

Las anteriores consideraciones han de ser tenidas en cuenta al establecer valoraciones porque la literatura existente acerca de los efectos del alcohol sobre la densidad neuronal es bastante abundante al respecto, pero la mayoría de tales estudios no pasan de ser simples apreciaciones de carácter general, sin la aplicación de una adecuada metodología estereológica. En cualquier caso, se pone de manifiesto, de manera general, una reducción del número de neuronas, tal y como ocurre en Hipocampo, Cerebelo, Córtex Prefrontal, Córtex Somatosensorial, Bulbo Olfatorio o estructuras diencefálicas.

En nuestro estudio, tras efectuar la correspondiente comparación de medias y teniendo en cuenta las anteriores consideraciones, de los datos

ofrecidos al estudiar la densidad neuronal pasados los seis meses de consumo de etanol, se aprecia una disminución significativa de tal densidad entre el grupo experimental tratado con alcohol y el grupo control. Dicha reducción se ha observado en la mayor parte de los sectores ( $\alpha_E$ ,  $\alpha_I$  y  $\beta$ ) y zonas estudiadas (Superior, Media e Inferior), salvo en la zona Inferior del sector  $\alpha_E$ , donde los valores no resultaron significativamente diferentes.

La existencia de diferencias significativas en la mayoría de las zonas sometidas a estudio de los animales tratados con alcohol con respecto a los control puede responder a que se trate de zonas con una vulnerabilidad diferencial para cada sector, tal y como otros autores han puesto de manifiesto en cerebelo e hipocampo (Pierce y cols. 1989; Bonthius y West, 1990; Bonthius y West, 1991a). Esta vulnerabilidad diferencial podría estar directamente relacionada con la variedad de los tipos neuronales existentes en el NGLd del conejo. En este sentido, estudios desarrollados por Carmona y cols. (1990a) acerca de la citoarquitectura del núcleo diencefálico, establecen tres categorías neuronales conocidas como t1 (neuronas de relevo de un tamaño de 27-35  $\mu\text{m}$ ), t2 (neuronas de relevo de unas 22  $\mu\text{m}$ ) y t3 (interneuronas de alrededor de 18  $\mu\text{m}$ ).

Los antedichos estudios han mostrado que la zona inferior del sector  $\alpha_E$  resulta peculiar por presentar una mayor proporción de interneuronas, que además son las de menor tamaño, y un menor porcentaje de neuronas de relevo t1, que son las más grandes. Por su parte, en el resto de zonas del sector  $\alpha$  existe un predominio de neuronas grandes (t1 y t2) sobre las más pequeñas (t3).

Considerando, por consiguiente, que el NGLd del conejo está constituido por poblaciones celulares diferentes (interneuronas y células de relevo), que además presentan diferentes tamaños celulares, nos haría pensar en un posible efecto del alcohol en función del estado de maduración

y/o del tamaño de las neuronas constituyentes.

El daño celular inducido por el alcohol dependiendo del estado de maduración ha sido sugerido por autores como Bauer-Moffet y Altman (1975 y 1977) y por Bonthius y West (1990), tras administración postnatal de la droga. Las observaciones de dichos autores, realizadas en Cerebelo, pusieron de manifiesto que las células de Purkinje en un estado de diferenciación más avanzado son más vulnerables al daño inducido por el alcohol sobre la pérdida neuronal, que aquellas otras menos diferenciadas. Sin embargo, esta idea de que el alcohol altere el número de células del NGLd en función del estado de maduración no parece cumplirse en nuestro caso, dado que el producto se administró una vez concluido el periodo de diferenciación y maduración del cerebro. Además, estudios llevados a cabo por Weber y cols. (1986) sobre la neurogénesis de las interneuronas y células de relevo, no mostraron evidencias de que ambos tipos celulares se diferencien en periodos de tiempo diferentes. Por tanto, no parece que sea este el elemento sobre el que ejerce su efecto el alcohol.

Por lo que respecta al segundo de los factores, esto es el tamaño neuronal inicial, los pocos estudios que se han realizado al respecto resaltan su importancia a la hora de que el alcohol pueda ejercer sus efectos sobre la densidad neuronal. Este hecho se ha podido observar en la exposición alcohólica postnatal (Pierce y cols., 1989) y en la exposición alcohólica crónica de individuos adultos (Harper y Kril, 1989). Dichos autores afirman que las neuronas grandes son más susceptibles que las pequeñas al daño inducido por la droga. Bajo situaciones de hipoxia se han aportado datos análogos por parte de Jorgesen y Diemer (1982), quienes encuentran cómo las células piramidales de la región CA1 del Hipocampo y las de Purkinje del Cerebelo resultan ser las más afectadas. Por todo ello, sugerimos que las células de relevo del NGLd, que son las más grandes, son más susceptibles al daño inducido por el alcohol que las más pequeñas (interneuronas), con

lo que las alteraciones de densidad neuronal ocurren en proporción a los tamaños que existan en cada sector estudiado. Dado que en el sector  $\alpha_E$  Inferior del NGLd existe una mayor proporción de interneuronas sobre células de relevo, resulta menos vulnerable a la acción del alcohol y no se altera en igual consideración su densidad neuronal, mientras que el predominio de neuronas mayores en el resto del núcleo, más susceptibles, determina la existencia de diferencias significativas en cuanto a densidad neuronal.

Hay quien sugiere (Jorgesen y Diemer, 1982) que esta susceptibilidad más alta de las neuronas más grandes es debida a la presencia de neurotransmisores aminoácidos excitatorios (glutamato y aspartato), lo cual es contrario a la situación de las interneuronas, cuyo neurotransmisor principal es el GABA. Se trata pues de un carácter opuesto que coincide con diferencias en la reacción entre las neuronas grandes (excitatorias) y las pequeñas (inhibitorias), tipo interneuronas.

Por otra parte, pudiera ocurrir que el hecho de que la zona Inferior del sector  $\alpha_E$  no muestre alteración de la densidad neuronal sea debido a la existencia de una disminución en la proporción de vasos sanguíneos que lo irrigen. De esta manera, se produciría una carencia en la cantidad de alcohol que llega a la antedicha zona con respecto a las restantes, y por tanto se ve menos afectada. Ahora bien, para poder confirmar esta hipótesis se requiere un estudio morfométrico adicional de los vasos sanguíneos y de la barrera hematoencefálica a estos niveles.

También se ha demostrado que el alcohol ejerce un efecto directo sobre los vasos sanguíneos, dando lugar a una vasoconstricción (Potter y Beevers, 1984). Es posible que esta vasoconstricción resulte más patente en el sector  $\alpha_E$  que en el resto del núcleo, de modo que, como en el caso anterior, la cantidad de alcohol que alcanza la susodicha zona sea menor, y, por tanto, el efecto a nivel neuronal sea menos importante.

Finalmente, también proponemos como posible que la alteración producida por el alcohol sobre el número de células se deba, en mayor o menor medida, a la proyección de las neuronas. En este sentido, las células de relevo presentan axones con proyección hasta el Córtex Visual, mientras que las interneuronas, debido a su carácter intrínseco, disponen de axones que terminan localmente en el propio NGL (Guillery, 1966; Hamos y cols., 1985). Tal y como hemos comentado con anterioridad, el sector  $\alpha_E$  Inferior se caracteriza por una mayor proporción de interneuronas, y por consiguiente disminuye la proporción de neuronas que proyectan al Córtex Visual, de manera que sería a través de dicha proyección que se produciría el daño celular.

Asímismo, también sugerimos la posibilidad de que la vulnerabilidad diferencial en cuanto a la densidad neuronal del NGLd del conejo sea debida a un tiempo de exposición al alcohol insuficiente para alterar dicho parámetro en la zona Inferior del conocido sector. Es posible que sea necesario un periodo más prolongado de exposición para dar lugar a una reducción permanente y significativa en dicha zona tan peculiar, de modo similar a como se ha puesto de manifiesto en estudios similares (Cadete-Leite y cols., 1989a, b). Por tanto, nos encontramos en tiempo límite para detectar alteraciones que dependan tan sólo del tratamiento empleado, en lugar de factores como los anteriormente discutidos (ej. tamaño celular). El conocimiento de este hecho requerirá nuevas experiencias que nos aporten respuestas complementarias y más amplias.

## **5. ESTIMACION DEL VOLUMEN DEL SOMA Y AREA NEURONAL**

El estudio a Microscopía Óptica acerca de los efectos del alcohol sobre el NGLd del conejo finaliza con el análisis de dos parámetros más: el volumen del soma neuronal y el área neuronal. Las determinaciones del volumen del soma neuronal se centraron en las distintas zonas de estudio en que fueron divididos los sectores  $\alpha_E$  y  $\alpha_I$ , para los dos grupos experimentales (alcohol y control) considerados en el presente trabajo.

El análisis del volumen del soma neuronal se llevó a cabo tanto sobre las células normales como sobre las que presentaron apariencia de anormalidad. Efectivamente, la utilización del microscopio óptico puso de manifiesto la existencia de neuronas más intensamente teñidas por el colorante empleado (Violeta de cresilo). Estas neuronas, que hemos catalogado como picnóticas, eran mucho más abundantes en los geniculados tratados con alcohol que en los controles.

El hecho de que no sólo apareciesen neuronas de soma picnótico en el NGLd de los animales tratados con alcohol, sino también en el de los control, aunque en proporción muy baja, puede deberse a que se trate de neuronas muertas o en situación de muerte inminente. En el caso de los control respondería a una situación de muerte natural por la edad o pérdida de su funcionalidad, mientras que para el caso de los geniculados alcoholizados sería el resultado de una muerte o premuerte inducida por efecto del producto.

Para estudiar el significado que pudieran ofrecer las células picnóticas, analizamos el volumen de su soma neuronal en los dos grupos considerados en nuestro estudio.

La comparación de los valores correspondientes al volumen del soma



neuronal de las células normales puso de manifiesto diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) entre el tratamiento con alcohol y la situación control, encontrando volumen celular mayor para estos últimos en todas las zonas de estudio. Asimismo, al aplicar los test estadísticos al volumen del soma de las células de apariencia picnótica, pudimos comprobar la existencia de valores significativamente menores ( $P < 0.05$ ) en casi todas las zonas de estudio de los geniculados tratados con alcohol, salvo en la zona Inferior del sector  $\alpha_E$ , donde los valores no difirieron de los controles.

Estos datos referentes al volumen del soma neuronal confirman la existencia de esa zona tan peculiar en el sector  $\alpha$  y refuerzan la idea de que esa resistencia a la acción del alcohol pueda estar directamente relacionada con el tamaño neuronal, ya que al existir una mayor proporción de neuronas de pequeño tamaño se van a ver menos afectadas. De este modo, el parámetro objeto de estudio no va a diferir en los dos grupos experimentales.

Como dato adicional y para evitar sesgos originados por la orientación del corte, hicimos junto al cálculo del volumen del soma neuronal el análisis del área neuronal y confirmar así su relación directa con aquel. La variación del valor en los perfiles, sobre todo si se hace desde las tres direcciones del espacio, confirma con más seguridad las variaciones, aunque los valores sean sólo en porcentaje y, por tanto, no absolutos. Al comparar los valores medios correspondientes al área de los perfiles neuronales de las células sometidas a la acción del alcohol y aquellas control, pudimos comprobar una reducción significativa de dicho parámetro tras los tratamientos. Así, acompañando a la disminución del volumen del soma neuronal se produce reducción del área de los perfiles de las neuronas. Por consiguiente, podemos afirmar que el alcohol determina una alteración del tamaño neuronal, tal y como otros autores han encontrado en otras regiones del Sistema Nervioso Central (Harper y Kril, 1989; Kril y Harper, 1989; Miller y Potempa, 1990; Castañeyra-Perdomo y cols., 1991).

A la hora de explicar la reducción del tamaño neuronal es de considerar que no parecen existir evidencias de posibles alteraciones en el metabolismo nuclear (Phillips y Cragg, 1983), opinión que coincide con el hecho de no haber encontrado diferencias en el diámetro nucleolar de las células de los geniculados tratados con alcohol y los control. Por tanto, la reducción del tamaño podríamos explicarla en base a un efecto atrófico (Carlen y cols., 1981; 1984; Torvik y Torp, 1986) que determina una retracción citoplasmática de las neuronas ocurrida por una pérdida de agua *in vivo* o durante el proceso técnico (*post mortem*). En este sentido, podría influir un posible edema del neuropilo, aunque ya dijimos que no hemos detectado retracción en el volumen global del NGLd. Todo ello representa una situación necesaria que se escapa de los límites de nuestro trabajo actual y que se analizará en estudios posteriores, ya que habría que tratar por separado el neuropilo, las zonas fasciculares y el volumen de los somas neuronales.

También resulta posible que el menor tamaño neuronal pueda responder a una disminución funcional, de manera que como consecuencia de la exposición alcohólica crónica quedaría alterado el funcionamiento normal de las células. No obstante, la confirmación de esta idea requeriría estudios fisiológicos y bioquímicos complementarios que escapan a nuestro plan de trabajo.

Teniendo en cuenta todas estas consideraciones y retomando el tema de la densidad neuronal, pensamos que la variación en el número de neuronas podría estar motivada no por una disminución real de dicho número, sino por la existencia de neuronas muertas o en situación de premuerte, cuyo menor tamaño influye en el número recontado. Estas neuronas se corresponden con las anteriormente descritas de soma picnótico, caracterizadas por presentar una forma bastante irregular, contornos rugosos y, por lo general, menor tamaño del resto de las que integran el NGLd. En estas circunstancias se hace difícil, con la tinción empleada, observar en

muchas de ellas el nucléolo. Ello determina el que la mayor parte de tales neuronas no fueran contabilizadas o estadísticamente lo fueran en menor grado durante el proceso de recuento y, por lo tanto, se producirá una disminución del número por unidad de volumen estudiada, es decir reducción de la densidad neuronal.

Para finalizar, un comentario sobre las neuronas de aspecto picnótico en relación con la situación presentada por animales que han sido sometidos a hipoxia (Rischke y Krieglstein, 1991; Gionet y cols., 1991). El problema sería considerar si los daños inducidos por la administración crónica de alcohol podrían ser análogos a los que aparecen después del episodio hipóxico, tal y como tiene lugar tras la exposición alcohólica prenatal (Michaelis, 1990). En este sentido, la vasoconstricción producida por la acción del alcohol puede determinar una reducción de nutrientes y oxígeno que llegan al NGLd, dando lugar a procesos hipóxicos e isquémicos. Así, las imágenes que ofrecen las neuronas de animales sometidos a procesos de isquemia o de hipoxia por obstrucción arterial presentan las mismas características (Gionet y cols., 1991; Rischke y Krieglstein, 1991; Halsey y cols., 1991) que las de apariencia picnótica observadas en nuestro estudio.

Zivin y Choi (1991) apuntan a que el proceso de daño neuronal se debe en gran medida a la liberación de glutamato. Ello da lugar a una activación, entre otros, de los receptores NMDA de las neuronas, determinando una entrada al citoplasma de  $Ca^{2+}$  extracelular, el cual activa una serie de enzimas (nucleasas, proteasas y fosfolipasas) que originan radicales libres responsables del daño en la membrana celular y cuya continuación produce la muerte de la célula. Estas consideraciones podrían verse repetidas en las células picnóticas como consecuencia del tratamiento con alcohol y en las que se da una correlación entre tamaños, receptibilidad neuronal y tipo de neurotransmisor, que cuando es excitatorio (Glutamato) se corresponde con una mayor tamaño de las células y cuando es inhibitor

(GABA) se corresponde con neuronas más pequeñas. Estas últimas se encuentran repartidas con mayor frecuencia en la zona Inferior del sector  $\alpha_E$  que en las otras dos zonas de dicho sector.

De esta manera, la menor vulnerabilidad de la antedicha zona, en lo referente al volumen del soma neuronal, guarda un paralelismo directo con los datos observados para la densidad neuronal, ya que la menor proporción de células de relevo se correlaciona con un menor número de neuronas de soma picnótico, lo que apoya la idea que hemos venido apuntando. Así, las células de relevo, de un mayor tamaño que las interneuronas, contienen neurotransmisores aminoácidos excitatorios, con lo que la acción del alcohol desencadenaría todo el mecanismo de daño celular propuesto. No obstante, dada la prevalencia de neuronas locales, el número de imágenes de picnosis en situación alcohólica no difirió de la control.

## **6. ALTERACIONES ULTRAESTRUCTURALES A MICROSCOPIA ELECTRONICA**

Las imágenes y datos aportados por el presente estudio revelan alteraciones ultraestructurales en las neuronas pertenecientes al sector  $\alpha$  del NGLd de conejos adultos expuestos a la acción del alcohol. Estas alteraciones suponen cambios en la organización de varios orgánulos celulares y en los componentes dendríticos, axonales y sinápticos del neuropilo.

Entre los cambios en la organización y morfología de los orgánulos citoplasmáticos cabe reseñar el producido a nivel del sistema lisosomal neuronal tras el consumo prolongado de alcohol. Los seis meses de duración del experimento produjeron un incremento de cuerpos densos. Algunos de estos cuerpos densos podrían ser el resultado de alteraciones cualitativas de tipo transicional hacia lisosomas secundarios y/o gránulos de lipofucsina, al igual que han puesto de manifiesto extensos estudios llevados a cabo por otros autores (Tavares y Paula-Barbosa, 1983; Volk y Maletz, 1985; Tavares y cols., 1985; Borges y cols., 1986; Paula-Barbosa y cols., 1986; Cadete-Leite y cols., 1988a), y similares a los cambios morfológicos observados en el cerebro durante el envejecimiento (Sohal y Wolfe, 1986; Paula-Barbosa y cols., 1991; Brandao y cols., 1992). No obstante, Smith y Davies (1990) no encuentran dicha proliferación de cuerpos densos en estudios de alcoholización perinatal. Es posible que este hecho sea debido al empleo de períodos de administración alcohólica más prolongados (de 6 a 12 meses), o bien que dichos efectos sólo se pongan de manifiesto en animales adultos, una vez que el cerebro ha completado su maduración. En este sentido, se podría pensar que el alcohol promueve o acelera los procesos degenerativos relacionados con el envejecimiento.

Los cambios en el sistema lisosomal también afectan a los cuerpos multivesiculares, los cuales son más abundantes en el citoplasma de las

neuronas tratadas con alcohol. Esta afirmación se encuentra en consonancia con los trabajos de Cadete-Leite y cols. (1988a), aunque estos autores observan un incremento en la proporción de cuerpos multivesiculares gigantes, los cuales no hemos llegado a observar en nuestro material de estudio. Este hecho puede ser debido a las diferentes características de la región nerviosa estudiada en cada caso.

Los estudios llevados a cabo por Cadete-Leite y cols. (1988a) han podido comprobar que la alteración del sistema lisosomal es un proceso irreversible, ya que después de un período de recuperación en el que cesa la administración de alcohol, el número de lisosomas no sólo no disminuye, sino que incluso sigue incrementándose.

Las características degenerativas encontradas en el sistema lisosomal de nuestro material nos hacen pensar que una vez que deja de actuar el alcohol no se van a conseguir niveles de normalidad, aunque su confirmación requeriría realizar nuevas experiencias en las que se tuvieran en cuenta períodos de tiempo mayores post-tratamiento en los que los animales puedan recuperarse de la acción del producto.

Otro de los efectos del alcohol a nivel ultraestructural determina una reducción del retículo endoplasmático rugoso, lo cual ha sido también descrito en el cerebelo, hipocampo y córtex cerebral en estudios que emplean administración prenatal, perinatal y postnatal de etanol (Lanning, 1980; Volk, 1984; Mohamed y cols., 1987; Smith y Davies, 1990). Dicha reducción del retículo se traduce en una menor abundancia de grumos de Nissl, los cuales aparecen en forma de pequeños fragmentos, como ocurre de modo general bajo condiciones nocivas para la célula, en un proceso conocido con el nombre de cromatolisis (Nissl, 1892).

Junto con la alteración del retículo endoplasmático rugoso, se produce

una reducción en el número de polirribosomas. Este hecho parece estar ampliamente demostrado no sólo en animales adultos (Karwacka, 1980b), como en el caso que nos ocupa, sino incluso en individuos neonatos (Volk y cols., 1981; Smith y Davies, 1990). Esta modificación en el contenido de polirribosomas y en la distribución del retículo endoplasmático rugoso sugiere interferencias entre la acción del alcohol y la síntesis de proteínas en estas neuronas del NGLd. Dicha alteración de la síntesis protéica ha sido estudiada por Rawat (1975) en el cerebro fetal y de neonatos, y por Tewari y cols. (1978) en el cerebro de individuos adultos. Otros estudios han mostrado que el alcohol interfiere con la maquinaria que sintetiza proteínas, muy posiblemente a nivel de los ribosomas (Rawat, 1976).

De modo general, bajo condiciones normales, la tasa de síntesis protéica es considerablemente alta en las neuronas. La mayor parte de las proteínas sintetizadas por las neuronas se dedican al mantenimiento y renovación celular, con especial atención a los orgánulos citoplasmáticos. En condiciones patológicas inducidas por el alcohol, la reducción en el retículo endoplasmático rugoso determinaría una disminución de su capacidad de síntesis protéica. Dicha alteración modificaría la tasa de renovación celular (de alrededor de un tercio del contenido protéico al día en condiciones normales), lo cual podría proporcionarnos el mecanismo general para explicar los cambios inducidos por el alcohol en el tejido cerebral, tal como los cambios degenerativos encontrados y su posible continuación hasta dar lugar a la muerte neuronal.

En cuanto a la observación de una mayor presencia de retículo endoplasmático liso en las neuronas tratadas con alcohol, si bien otros autores (Karwacka, 1980a) también la ponen de manifiesto bajo condiciones similares en otras regiones nerviosas, otros investigadores (Smith y Davies, 1990) encuentran la situación contraria, aunque en su caso se trata de una administración perinatal, y no en animales adultos. Estas diferencias pueden

ser debidas simplemente al distinto momento en el que se administra el alcohol, que da lugar a una reducción del retículo en células indiferenciadas y a un incremento en las maduras. En cualquier caso, es posible que el aumento de retículo liso encontrado en nuestro caso y en el de otros autores responda a un intento por detoxificar el etanol, como ocurre en los hepatocitos bajo circunstancias similares.

Otra de las modificaciones que podrían estar inducidas por el alcohol en el citoplasma de las neuronas del NGLd, se produce a nivel de las mitocondrias, las cuales muestran una morfología más alargada, tal y como también encontraron Beskid y cols. (1978) y Karwacka (1980a,b) en situaciones similares. Este cambio de forma podría ser el paso previo hasta determinar, finalmente, procesos degenerativos más profundos como los observados en los perfiles dendríticos, que posteriormente serán comentados. En cualquier caso, estos cambios podrían ser el resultado de alteraciones en el transporte iónico o bien ser una consecuencia de la influencia tóxica del etanol sobre el proceso de respiración celular.

Finalmente, el Aparato de Golgi muestra un aspecto más primitivo, con dictiosomas más pequeños y menos desarrollados. Una reducción similar ha sido descrita en las células de Purkinje después de someterlas a la acción prenatal del alcohol (Mohamed y cols., 1987). Dicha reducción es paralela y puede estar relacionada con la disminución ya comentada de polirribosomas y de retículo endoplasmático rugoso, lo cual disminuiría su necesidad de acción y posibilita menos biosíntesis como respuesta a una disminución funcional.

En líneas generales, los autores que describen las distintas alteraciones en la ultraestructura neuronal tras una exposición alcohólica prenatal, perinatal y/o postnatal, argumentan que éstas son debidas a un retraso en la diferenciación y maduración de las células. Sin embargo, dado



que en nuestro caso hemos considerado animales adultos, las neuronas se encuentran completamente diferenciadas y maduras. Por tanto, el hecho de encontrar la misma clase de efectos a pesar del tipo de exposición alcohólica empleada, nos indica que la acción del producto no sólo se ejerce antes de que las neuronas completen el proceso de diferenciación y de maduración, sino que incluso la alteración celular prosigue una vez que la célula ha finalizado dichos procesos.

Todas las alteraciones celulares, comentadas con anterioridad, inducidas por la ingestión prolongada de alcohol, nos indican en su conjunto que el producto ejerce un profundo efecto en el citoplasma de las neuronas, pudiendo determinar un estado funcional deficitario, cuya continuación puede dar lugar a la muerte de las neuronas. Estos cambios cualitativos ultraestructurales se observan por igual en las células de relevo y en las interneuronas. En estas últimas, las alteraciones son menos aparentes dado que presentan un citoplasma más escaso y una menor proporción de orgánulos citoplasmáticos. Estas observaciones están en relación directa con los datos aportados por la microscopía óptica, según la cual tratábamos la posibilidad de que las interneuronas, debido a su menor tamaño, fuesen menos vulnerables a la acción del alcohol. En este sentido, la microscopía electrónica pone de manifiesto una mayor alteración de las células de relevo, cuyo extremo de máximo daño podría equivaler a las neuronas heteropicnóticas encontradas en la microscopía óptica.

Es posible que esta mayor vulnerabilidad de las células de relevo pueda ser debida al documentado efecto del alcohol a nivel de las membranas neuronales, las cuales ven alterada su fluidez. Ello produciría cambios en el transporte iónico, en la actividad enzimática y en la actividad receptora. Esta combinación de sucesos determinarían un funcionamiento neuronal deficitario que se irían traduciendo en las alteraciones morfológicas que hemos ido comentando. Entre los cambios en la actividad receptora

destacan la de los canales de calcio dependientes de voltaje y la de los receptores NMDA, cuya alteración supondría la cascada de sucesos celulares descrita con anterioridad, que da lugar a la muerte de la neurona.

En otro orden de cosas, a nivel del neuropilo, en los perfiles dendríticos es posible observar procesos de degeneración consistentes en mitocondrias rodeadas por varias membranas de retículo endoplasmático liso, como claro signo de alteración producida por el alcohol. Todas estas alteraciones estarían en concordancia con las variaciones en el metabolismo de la *monoamino oxidasa* (enzima que se localiza en la membrana externa de las mitocondrias que oxida las aminas, procedentes de la descarboxilación de aminoácidos, a los correspondientes aldehídos) que se sabe aparecen en el alcoholismo.

Por otra parte, el alcohol también determina modificaciones aparentes a nivel de los axones mielinizados que encontramos en el NGLd del conejo. Entre tales modificaciones se observa una reducción en el espesor de la mielina, de modo similar a como describen otros autores (Lancaster y cols., 1984; Samorajski y cols., 1986; Phillips, 1989; Phillips y Krueger, 1990; Phillips y cols., 1991), aunque en fetos y neonatos, argumentando como posible causa un retraso en la adquisición y maduración de la mielina y de las células que la producen (oligodendrocitos). Sin embargo, el que hayamos podido observar el mismo efecto en animales adultos nos indica que la alteración continúa después de que las células gliales responsables de la mielina hayan completado su proceso de maduración.

Una desmielinización semejante es la que se describe como consecuencia de los procesos de envejecimiento, por lo que una vez más hay que considerar el posible papel del alcohol en la promoción de todas aquellas alteraciones que aparecerán como resultado de la senescencia.

También, en los axones mielinizados hemos observado una dislaceración de las láminas de mielina más internas, pudiendo dar lugar a una distorsión que desorganiza el axoplasma. Este hecho claramente degenerativo puede determinar cambios en la velocidad de propagación de los impulsos nerviosos o bien, al verse afectado el axón, un funcionamiento anormal de este último. En definitiva, todas estas alteraciones en la mielina de animales adultos podrían contribuir a explicar algunas de las disfunciones neurológicas y visuales que aparecen asociadas con la exposición alcohólica.

Finalmente, la administración prolongada de alcohol no sólo determina alteraciones en las neuronas, sino incluso en las células gliales, dando lugar a una gliosis. Dicha gliosis comprende un incremento en la proporción de gliofilamentos y un aumento de procesos gliales. Estos últimos se pueden observar a nivel de los glomérulos existentes en el neuropilo, donde se aprecia un incremento en el número de láminas gliales que rodean a los elementos sinápticos del neuropilo intraglomerular. Este incremento también ha sido descrito por otros autores (Tavares y Paula-Barbosa, 1984) en un estudio de similares características sobre los glomérulos cerebelosos, así como tras exposición alcohólica perinatal (Smith y Davies, 1990).

Dado el importante papel estructural y metabólico que juegan las células gliales, las alteraciones observadas, al contribuir a aumentar el daño producido por el alcohol en el NGLd del conejo, tendrían su traducción en fenómenos funcionales de la transmisión nerviosa.

En resumen, la exposición alcohólica crónica de animales adultos determina alteraciones ultraestructurales cualitativas a nivel del soma neuronal y del neuropilo adyacente, que hacen conveniente una prolongación de las experiencias en periodos de tiempo que permitan ocasionar daños de mayor entidad en el núcleo diencefálico, e incluso incremento que aumente el número de elementos con muerte neuronal.

## **7. RELACION DEL ALCOHOL Y SITUACION NEURO-BIO-MOLECULAR**

Se conoce aún de forma poco clara cuál es el mecanismo o los elementos responsables de la neurotoxicidad alcohólica. Sí se sabe que tras la ingestión alcohólica, el etanol se metaboliza mediante la acción de la Alcohol Deshidrogenasa, la cual lo transforma en acetaldehído con el concurso del NAD, para posteriormente ser metabolizado hasta acetato por medio de la enzima Aldehído Deshidrogenasa. El acetaldehído atraviesa la barrera hematoencefálica e interacciona con neurotransmisores del sistema nervioso central dando lugar a metabolitos que actúan como falsos neurotransmisores, los cuales son considerados como responsables, en parte, del efecto del alcohol sobre la conducta y sobre niveles neuroanatómicos. Por consiguiente, parte de las alteraciones tóxicas o daños neuronales producidas por el etanol podrían ser debidas a la acción de su principal metabolito (acetaldehído), así como al incremento en el índice NADH/NAD.

Existen varios niveles de actuación del etanol que podrían ser considerados como los mecanismos potenciales que explicarían los cambios observados en las neuronas tras exposición alcohólica. En primer lugar, destacan los efectos del etanol sobre la estructura de las membranas biológicas, sobre la actividad de los transportadores, canales iónicos y receptores de membrana, así como sobre enzimas y otros sucesos relacionados con las membranas neuronales. La segunda acción que hay que considerar hace referencia a la inhibición de la síntesis de proteínas tras ingesta prolongada de alcohol. La tercera posibilidad está relacionada con los cambios circulatorios producidos por el etanol; cambios que pueden dar lugar a daños hipóxicos, cuya gravedad va a depender de las características moleculares de neurotransmisión en una región dada del cerebro.

Con respecto al primer punto, son muchos los autores que consideran que los sucesos de toxicidad y cambios metabólicos que tienen lugar tras

exposición de las neuronas al alcohol se debe a alteraciones físicas y químicas que ocurren dentro de la estructura y función de la membrana plasmática, así como de las membranas sinápticas y de los orgánulos celulares. En ellas se produce una alteración de la composición lipoprotéica de la membrana. A partir de aquí surgió lo que hoy se conoce como hipótesis de la membrana neuronal, según la cual el etanol actuaría directamente sobre los microdominios de membrana, los lípidos y las proteínas.

Por lo que respecta a los lípidos, se produce un incremento en los niveles de colesterol y una disminución en los niveles de ácidos grasos insaturados asociados con la fracción fosfolipídica. Asimismo, alguno de los lípidos de la membrana plasmática actúan como precursores de las prostaglandinas (PG), de modo que al verse alterado el metabolismo lipídico, especialmente la disminución en la síntesis de ácido araquidónico, produce cambios en el metabolismo y liberación de PGs, lo cual podría explicar la subsecuente reducción de los productos de la ruta de la ciclooxigenasa.

Sobre las proteínas de membrana, el alcohol provoca una alteración de sustancias ionóforas, enzimas (p.e. Monoamina oxidasa, ATPasa, Adenilciclase) y gran variedad de receptores de membrana (p.e. catecolaminérgicos, muscarínicos u opiáceos). La alteración de la Adenilciclase tiene una gran importancia, ya que está implicada en varios aspectos de la función neuronal, tales como cambios en la permeabilidad de la membrana, regulación de enzimas implicados en la biosíntesis de neurotransmisores, así como otras funciones receptoras. Asimismo, la alteración producida a nivel de los receptores de membrana podría ser la responsable de la apertura de canales de  $\text{Ca}^{2+}$ . Esto hace que el calcio incremente su concentración intracelular, activando con ello los enzimas responsables de la producción de radicales libres, responsables de la desorganización y rotura de la membrana celular. Estas alteraciones sufridas

por la membrana plasmática pueden estar relacionadas con las características de irregularidad que muestran las células heteropícnóticas encontradas en nuestro estudio a microscopía óptica, y, como afirman algunos autores, dan lugar a la muerte de la neurona.

Asímismo, las alteraciones inducidas por el alcohol sobre los lípidos de membrana y sobre la porción protéica de la misma, especialmente sobre los transportadores de sustancias y enzimas como la Monoamina oxidasa, así como sobre la síntesis de ARN mitocondrial, podrían ser las responsables de los cambios ultraestructurales observados en las mitocondrias de las neuronas de NGLd, cuyo grado máximo de alteración se podría corresponder con los procesos degenerativos que comprenden mitocondrias, que también hemos encontrado.

Las modificaciones del metabolismo lipídico y protéico también parecen ser los responsables de la desmielinización de los axones mielinizados que hemos encontrado en el NGLd.

El segundo nivel de actuación del etanol se produce sobre la síntesis de proteínas. Desde el punto de vista de muchos autores, estas alteraciones podrían explicar por sí los cambios que tienen lugar en el tejido nervioso, entre los que sobresale la deplección en la función e incluso la muerte neuronal. Esta síntesis de proteínas reducida se debe a interferencias del alcohol sobre el metabolismo del ARN (especialmente el ARNt), así como sobre su transporte a través de la membrana nuclear hasta el citoplasma; a interferencias con la incorporación de aminoácidos, como la valina; a interferencias sobre la maquinaria que sintetiza las proteínas, es decir los ribosomas; y a alteraciones en la cantidad de polirribosomas libres y unidos a membrana, y en la proporción de retículo endoplasmático rugoso, rasgos estos últimos que hemos podido encontrar en nuestro material a microscopía electrónica.

Un tercer nivel de actuación del alcohol, que podría ser más propiamente considerado como un mecanismo indirecto de toxicidad, se produce como consecuencia de cambios circulatorios que conducen a daños celulares hipóxicos dentro del cerebro. En este sentido, se sabe que el alcohol produce una vasoconstricción a nivel de los vasos sanguíneos del sistema nervioso central. Esta vasoconstricción determina una menor disponibilidad de glucosa y otros compuestos energéticos por parte de las células nerviosas, lo cual se traduce en una actividad funcional deficitaria. En efecto, la utilización de energía se centra sobre la actividad de la ATPasa de  $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ . Dado que ésta se encuentra alterada, la producción de actividad eléctrica, el tráfico de impulsos nerviosos y la restauración de los potenciales de membrana neuronal, también se ven modificados. Además, la vasoconstricción da lugar también a una menor disponibilidad de oxígeno, lo cual se traduce en alteraciones fisiológicas. En aquellas neuronas que contienen aminoácidos excitatorios, como las células de relevo del NGLd, la falta de oxígeno produciría una liberación de tales aminoácidos, los cuales activarían receptores que determinarían un incremento en la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$ , lo que finalmente daría lugar a la muerte neuronal, como hemos comentado con anterioridad. Este mecanismo ha sido el sugerido por nosotros como el responsable de que las células de relevo del núcleo diencefálico puedan verse más seriamente alteradas desde el punto de vista cuantitativo y cualitativo.

En cualquier caso, es posible que la acción tóxica del alcohol no se ejerza de modo individual sobre estos niveles de actuación, sino que el mecanismo íntimo de neurotoxicidad sea una combinación de los tres niveles que hemos comentado.

Finalmente, el etanol también determina cambios en la actividad hormonal y neurotransmisora del organismo. Muchos investigadores piensan que esta alteración de las hormonas circulantes y de sus centros de

biosíntesis podría actuar como un mecanismo indirecto de toxicidad, a través de los sucesos moleculares y/o bioquímicos que hemos ido comentando. Pero además de los efectos que de por sí puedan ejercer a nivel del sistema nervioso central, la importancia de alguno de estos compuestos radica, como ya hemos dicho, en la posibilidad de encontrarnos frente a marcadores biológicos del alcoholismo, como es el caso de las  $\beta$ -endorfinas. Al menos así lo apuntan las investigaciones encabezadas por los Dres. Rico Irlés y del Arbol Navarro (ej. Rico Irlés y Gil Extremera, 1986; Aguirre y cols., 1990; Aguirre y cols., 1991), quienes han encontrado un descenso en los niveles de  $\beta$ -endorfinas en alcohólicos crónicos. Si este descenso se correlaciona con el correspondiente a nivel de los hijos de alcohólicos, nos encontraríamos frente a un auténtico marcador diagnóstico que supondría un enorme salto adelante en los esfuerzos por combatir la enfermedad alcohólica.



## VI. CONCLUSIONES

En la presente tesis doctoral hemos realizado, en el S.N.C. del conejo, un estudio morfométrico y estereológico a nivel de microscopía óptica y electrónica de transmisión. El análisis realizado mediante el empleo de una adecuada metodología estereológica, se llevó a cabo en el NGLd del animal tras la administración continuada del alcohol y en condiciones normales. Las conclusiones de esta tesis doctoral, resumen de las afirmaciones que hemos ido describiendo a lo largo de estas páginas, son las que a continuación enumeramos:

- 1ª) El análisis estereológico aplicado a estudios de alcoholismo experimental ha aportado datos que suponen una información sobre el comportamiento celular que resultan de considerable valor a añadir o mejorar los obtenidos con la utilización de otros procedimientos.
- 2ª) El estudio morfométrico y de análisis de imagen de las alteraciones producidas por la ingesta de alcohol resulta de utilidad para determinar el tipo y grado de modificación que se está produciendo. Con ello se abre paso a investigaciones futuras.
- 3ª) La técnica de administración de alcohol utilizada en el presente estudio supone un sistema de ingesta eficaz que evita el problema de condiciones extresantes para el animal, una situación que, para el caso de otros métodos, es menos fiable.
- 4ª) El análisis del volumen total del NGLd ha permitido comprobar que el alcohol no determina una retracción directa del órgano. No obstante, queda por estudiar la incidencia en los valores hallados de cada fase de los elementos estructurales componentes y la influencia relativa en los valores finales.

- 5.) Los tres sectores ( $\alpha_E$ ,  $\alpha_I$  y  $\beta$ ) que componen el NGLd del conejo no ven modificadas sus relaciones porcentuales volumétricas como resultado del tratamiento experimental bajo la acción del etanol.
- 6.) Del estudio realizado sobre los recuentos neuronales se desprende que la administración de alcohol de modo medianamente prolongado determina una reducción de la densidad neuronal de aquellas neuronas cuyas imágenes ofrecen perfiles de normalidad. Únicamente, la zona inferior del sector  $\alpha_E$ , cuya citoarquitectura resulta diferente a la del resto del sector, no se ve afectada por esta reducción. Con todo ello sugerimos que este modo diferencial de responder a la acción del alcohol podría deberse al menor tamaño de sus neuronas constituyentes, lo cual ofrece un paralelismo con los datos aportados por la literatura especializada sobre el tema.
- 7.) El análisis del volumen del soma neuronal ha mostrado que la administración continuada de alcohol determina una reducción en los valores de dicho parámetro, y consecuentemente un incremento del volumen del neuropilo.
- 8.) Los valores obtenidos para el volumen del soma neuronal ocupado por las neuronas heteropictóicas son significativamente mayores en los animales tratados con alcohol que en los control, en todas las zonas analizadas, salvo para el caso de la zona inferior del sector  $\alpha_E$ . Este hecho refuerza nuestra hipótesis de que el modo diferencial de responder a la acción del alcohol podría deberse al tamaño de las neuronas que en la zona inferior son más pequeñas que en el resto del NGLd del conejo.

- 9ª) El estudio del área media de los perfiles neuronales entre el grupo experimental y el control permite concluir que el alcohol reduce significativamente el tamaño medio de las neuronas.
- 10ª) El análisis realizado a microscopía electrónica a nivel del soma neuronal pone de manifiesto que la exposición alcohólica determina la alteración cualitativa de la mayoría de sus componentes, entre los que cabe destacar el caso de los polirribosomas, el retículo endoplasmático, el Aparato de Golgi y el Sistema lisosomal.
- 11ª) Las imágenes ofrecidas por la microscopía electrónica muestran cómo la acción del alcohol determina una reducción del contenido polirribosómico global en las células del NGLd, que junto con la observada reducción de la fracción correspondiente al retículo endoplasmático rugoso, podría indicar la existencia de una alteración en la síntesis de proteínas. Dicha alteración podría constituir uno de los mecanismos responsables del daño neuronal encontrado.
- 12ª) Las neuronas de los geniculados muestran un apreciable incremento en el contenido de retículo endoplasmático liso, como posible respuesta a la puesta en marcha de procesos de detoxificación del producto.
- 13ª) Tras la intoxicación alcohólica, el análisis ultraestructural del soma neuronal muestra un Aparato de Golgi menos desarrollado, con dictiosomas más pequeños, posibilitando con ello una menor capacidad biosintética, y contribuyendo, por tanto, a los procesos de daño celular.

- 14<sup>a</sup>) El estudio a microscopía electrónica pone igualmente de manifiesto un incremento de los cuerpos densos pertenecientes al sistema lisosomal, como expresión de la acción degenerativa del etanol; situación semejante a la observada en los procesos de envejecimiento.
- 15<sup>a</sup>) La ultraestructura del neuropilo del NGLd del conejo se ve alterada tras administración de alcohol, mostrando procesos degenerativos o autofagosómicos en los perfiles dendríticos, desmielinización y dislaceración de los axones mielinizados y gliosis astrocitaria. Estas alteraciones, junto con las descritas para el soma neuronal, podrían constituir los pasos previos de aquellas neuronas que se ven más afectadas (heteropicnóticas), que termina con la muerte de las mismas.
- 16<sup>a</sup>) Las alteraciones encontradas en los orgánulos citoplasmáticos en los análisis realizadas a microscopía electrónica justifican buena parte de las dificultades funcionales detectadas por la intoxicación alcohólica y su influencia a nivel del S.N.C.. En este sentido, la relación entre las  $\beta$ -endorfinas y la situación neuronal de los núcleos neuronales afectados resulta sugestiva para futuros estudios.
- 17<sup>a</sup>) Por último, tanto las modificaciones momentáneas producidas a nivel de la neurotransmisión como las derivadas de la variación de la constitución de las membranas celulares explican el disparo de trastornos metabólicos y ofrece rutas para análisis futuros ópticos y electrónicos de carácter enzimático.

## VII. BIBLIOGRAFIA

**ABEL, E.L. & RILEY, E.P.** (1986). Studies of prenatal alcohol exposure: Methodological considerations. In: "Alcohol and Brain Development" (West, J.R. ed.). pp. 105-119. Oxford University Press, New York.

**ABERCROMBIE, M.** (1946). Estimation of nuclear population from microtomic sections. *Anat. Rec.* 94, 239-247.

**AGDUHR, E.** (1941). A contribution to the technique of determining the number of nerve cells per volume unit of tissue. *Anat. Rec.* 80, 191-202.

**AGUIRRE, J.C.; DEL ARBOL, J.L; RAYA, J.; RUIZ-REQUENA, M.E. & RICO IRLES, J.** (1990). Plasma  $\beta$ -endorphin levels in chronic alcoholics. *Alcohol* 7, 409-412.

**AGUIRRE, J.C.; DEL ARBOL, J.L; RAYA, J.; RUIZ-REQUENA, M.E. & RICO IRLES, J.** (1991). Derivados de la pro-opiomelanocortina (ACTH y  $\beta$ -endorfina) en alcohólicos crónicos. *An. Med. Intern. (Madrid)* 8 (5), 228-232.

**ALTMAN, J.** (1969). Autoradiographic and histological studies of postnatal neurogenesis. III. Dating the time of production and onset of differentiation of cerebellar microneurons in rats. *J. Comp. Neurol.* 136, 269-294.

**ALTMAN, J.** (1972). Postnatal development of the cerebellar cortex in the rat. II. Phases in the maturation of Purkinje cells and of the molecular layer. *J. Comp. Neurol.* 145, 399-464.

**ALTMAN, J. & BAYER, S.** (1975). Postnatal development of the hippocampal dentate gyrus under normal and experimental conditions. In: "The Hippocampus" (Isaacson, R.L. and Pribam, K.H. eds.). Vol 1. pp. 95-122. Plenum Press, New York.

**ANDRADE, J.P.; CADETE-LEITE, A.; PAULA-BARBOSA, M.M.; VOLK, B. & TAVARES, M.A.** (1988). Long-term alcohol consumption reduces the number of neuronal nuclear pores. A morphometric study undertaken in CA3 Hippocampal Pyramids of rats. *Alcohol Clin. Exp. Res.* 12(2), 286-289.

**AZORIN POCH, F.** (1972). "Curso de muestreo y aplicaciones". Ed. Aguilar. Madrid.

**BARNARD, T.** (1976). An empirical relationship for the formulation of glutaraldehyde-based fixatives, based on measurements of cell volume change. *J. Ultrastruct. Res.* 54, 478-486.

**BARNES, D.E. & WALKER, D.W.** (1981). Prenatal ethanol exposure permanently reduces the number of pyramidal neurons in rat Hippocampus. *Dev. Brain Res.* 1, 333-340.

**BAUER-MOFFETT, C. & ALTMAN, J.** (1975). Ethanol induced reductions in cerebellar growth of infant rats. *Exp. Neurol.* 48, 378-382.

**BAUER-MOFFETT, C. & ALTMAN, J.** (1977). The effect of ethanol chronically administered to preweanling rats on cerebellar development: A morphological study. *Brain Res.* 119, 249-268.

**BAYER, S.A.** (1983). <sup>3</sup>[H]-Thymidine-radiographic studies of neurogenesis in the rat olfactory bulb. *Exp. Brain Res.* 50, 329-340.

**BEEVERS, D.G.** (1977). Alcohol and hypertension. *Lancet* 2, 114-115.

**BERACOCHEA, D.; LESCAUDRON, L.; VERNA, A. & JAFFARD, R.** (1987). Neuroanatomical effects of chronic ethanol consumption on dorsomedial and anterior thalamic nuclei and on substantia innominata in mice. *Neurosci. Lett.*



73, 81-84.

**BERESFORD, W.A.** (1962). A Nauta and galloctanin study of the cortico-lateral geniculate projection in the cat and monkey. *J. Hirnforsch.* 5, 210-228.

**BESKID, M.; KOELICHEN, A. & KWIATKOWSKA, J.** (1978). Ultrastructural evaluation of rat brain cortical neurons in the course of joint ethanol and pyrazole administration. *Neuropat. Pol.* 16, 361-373.

**BIANCHI, L.** (1942). Qualche considerazione sui metodi per il conteggio delle cellule nervose. *Anat. Anz.* 92, 233-240.

**BISHOP, P.O.; JEREMY, D. & MCLEOD, J.G.** (1953). Phenomenon of repetitive firing in the lateral geniculate nucleus of cat. *J. Neurophysiol.* 16, 437-447.

**BISHOP, P.O.; KOZAK, W.; LEVICK, W.R. & VAKKUR, G.S.** (1962). The determination of the visual field on to the lateral geniculate nucleus in the cat. *J. Physiol.* 163, 503-539.

**BLOOM, F.E.; SEGAL, D.; LING, N. & GUILLEMIN, M.** (1978). *Science* 194, 630-632.

**BONTHIUS, D.J. & WEST, J.R.** (1988). Blood alcohol concentration and microencephaly: A dose-response study in the neonatal rat. *Teratol.* 37, 223-231.

**BONTHIUS, D.J. & WEST, J.R.** (1989). Aspirin augments alcohol in restricting brain growth in the neonatal rat. *Neurobehav. Toxicol. Teratol.* 11, 135-143.

**BONTHIUS, D.J. & WEST, J.R.** (1990). Alcohol-induced neuronal loss in

developing rats: Increased brain damage with binge exposure. *Alcohol Clin. Exp. Res.* 14(1), 107-118.

**BONTHIUS, D.J. & WEST, J.R.** (1991a). Permanent neuronal deficits in rats exposed to alcohol during the brain growth spurt. *Teratol.* 44, 147-163.

**BONTHIUS, D.J. & WEST, J.R.** (1991b). Acute and long-term neuronal deficits in the rat olfactory bulb following alcohol exposure during the brain growth spurt. *Neurotoxicol. Teratol.* 13, 611-619.

**BONTHIUS, D.J.; GOODLETT, C.R. & WEST, J.R.** (1988). Blood alcohol concentration and severity of microencephaly in neonatal rats depend on the pattern of alcohol administration. *Alcohol* 5, 209-214.

**BORGES, S. & LEWIS, P.D.** (1981). Effects of alcohol on the developing nervous system. *Trends. Neurosci.* 4, 13-15.

**BORGES, S. & LEWIS, P.D.** (1982). A study of alcohol effects on the brain during gestation and lactation. *Teratology* 25, 283-289.

**BORGES, S. & LEWIS, P.D.** (1983a). The effect of ethanol on the cellular composition of the cerebellum. *Neuropath. Appl. Neurobiol.* 9, 53-60.

**BORGES, S. & LEWIS, P.D.** (1983b). Effects of ethanol on postnatal cell acquisition in the rat cerebellum. *Brain Res.* 271, 388-391.

**BORGES, M.M.; PAULA-BARBOSA, M.M. & VOLK, B.** (1986). Chronic alcohol consumption induces lipofuscin deposition in the rat Hippocampus. *Neurobehav. Aging* 7, 347-355.

**BOUMAN, K.H.** (1928). Die pathologische Anatomie des Zentralnervensystems

bei Schizophrenie. *Psychiat. Neurol. Bl. (Amst.)* 32, 517-539.

**BRANCHEY, L. & FRIEDHOFF, A.J.** (1973). The influence of ethanol administered to pregnant rats on tyrosine hydroxylase activity of their offspring. *Psychopharmacologia* 32, 151-156.

**BRANDAO, F.; CADETE-LEITE, A. & PAULA-BARBOSA, M.M.** (1992). Morphological brain changes induced by alcohol and aging. Effects of piracetam during withdrawal following long-term alcohol consumption. *Int. Acad. Biomed. Drug Res.* 2, 63-68.

**BRAUER, K.; SCHOBER, W.; WINKELMANN, E. & GAREY, L.J.** (1988). Topographic differences in retinal axons in the dorsal lateral geniculate nucleus of the rat: A quantitative reexamination using anterograde transport of horseradish peroxidase. *Exp. Brain Res.* 69, 481-488.

**BURNS, E.M.; KRUCKEBERG, T.W.; STIBLER, H.; CERVEN, E. & BORG, S.** (1984). The effects of ethanol exposure during the brain growth spurt in rats. *Teratology* 29, 251-258.

**CABALLERO, J.L.; OSTOS, M.V. & ABADIA-FENOLL, F.** (1986). Neuron types and organisations of the rabbit dorsal lateral geniculate nucleus. *J. Anat.* 148, 169-182.

**CADETE-LEITE, A.; ALVES, M.C. & TAVARES, M.A.** (1988a). Lysosomal abnormalities in the pyramidal cells of the rat medial prefrontal cortex after chronic alcohol consumption and withdrawal. *J. Submicrosc. Cytol. Pathol.* 20(1), 115-122.

**CADETE-LEITE, A.; TAVARES, M.A. & PAULA-BARBOSA, M.M.** (1988b). Alcohol withdrawal does not impede hippocampal granule cell progressive loss

in chronic alcohol-fed rats. *Neurosci. Lett.* 86, 45-50.

**CADETE-LEITE, A.; TAVARES, M.A.; UYLINGS, H.B.M. & PAULA-BARBOSA, M.M.** (1988c). Granule cell loss and dendritic regrowth in the hippocampal dentate gyrus of the rat after chronic alcohol consumption. *Brain Res.* 473, 1-14.

**CADETE-LEITE, A.; TAVARES, M.A.; PACHECO, M.M.; VOLK, B. & PAULA-BARBOSA, M.M.** (1989). Hippocampal mossy fiber-CA3 synapses after chronic alcohol consumption and withdrawal. *Alcohol* 6, 303-310.

**CADETE-LEITE, A.; ALVES, M.C.; PAULA-BARBOSA, M.M.; UYLINGS, H.B.M. & TAVARES, M.A.** (1990a). Quantitative analysis of basal dendrites of frontal pyramidal cells after chronic alcohol consumption and withdrawal in the adult rat. *Alcohol & Alcoholism* 25(5), 467-475.

**CADETE-LEITE, A.; ALVES, M.C.; TAVARES, M.A. & PAULA-BARBOSA, M.M.** (1990b). Effects of chronic alcohol intake and withdrawal on the prefrontal neurons and synapses. *Alcohol* 7, 145-152.

**CALVENTE, R.** (1985). Estudio estereológico de la distribución mitótica en el desarrollo de la retina de *Gallus domesticus*. Tesis doctoral. Univ. Granada.

**CARLEN, P.L.; WILKINSON, D.A.; WORTZAM, G. & HOLGATE, R.** (1984). Partially reversible cerebral atrophy and functional improvement in abstinent alcoholics. *Can. J. Neurol. Sci.* 11, 441-446.

**CARLEN, P.L.; WILKINSON, D.A.; WORTZAM, G.; HOLGATE, R.; CORDINGLEY, J.; LEE, M.A.; HUSZAR, L.; MODDEL, G.; SUNGH, R.; KIRALY, L. & RANKIN, J.G.** (1981). Cerebral atrophy and functional deficits in alcoholics without clinically apparent liver disease. *Neurology* 31, 377-385.

**CARLIN, R.K. & SIEKEVITZ, P.** (1983). Plasticity in the central nervous system: do synapses divide ?. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80, 3517-3521.

**CARMONA, R.** (1987). Análisis morfométrico de poblaciones: un estudio cuantitativo de las neuronas del NGLd del tálamo del conejo (*Oryctolagus cuniculus*). Tesis doctoral. Univ. Granada.

**CARMONA, R.; CALVENTE, R.; ABADIA MOLINA, F. & ABADIA FENOLL, F.** (1987). Neuronal density in the different zones of the rabbit dLGN. *Acta Stereol.* 6(3), 515-520.

**CARMONA, R.; ABADIA-MOLINA, F.; CALVENTE, R. & ABADIA-FENOLL, F.** (1990a). Cytoarchitecture of the dorsal lateral geniculate nucleus in the rabbit. *Histol. Histopathol.* 5, 7-15.

**CARMONA, R.; CALVENTE, R.; ABADIA-MOLINA, F. & ABADIA-FENOLL, F.** (1990b). Morphometry and frequency of afferent synaptic terminals in the rabbit dorsal lateral geniculate nucleus. *Anat. Rec.*, 228, 327-338.

**CASTAÑEIRA-PERDOMO, A.; PEREZ-DELGADO, M.M.; CARMONA-CALERO, E.; PEREZ-GONZALEZ, H.; GONZALEZ-HERNANDEZ, T. & FERRES-TORRES, R.** (1991). Alcohol effects on the morphometric development of the subfornical organ and area postrema of the albino mouse. *Alcohol* 8, 65-70.

**CASSELLS, B.; WAINWRIGHT, P. & BLOM, K.** (1987). Heredity and alcohol-induced brain anomalies: Effects of alcohol on anomalous prenatal development of the corpus callosum and anterior commissure in BALB/C and G57BL/6 mice. *Exp. Neurol* 95, 587-604.

**CHERNOFF, G.F.** (1980). The fetal alcohol syndrome in mice: Maternal

variables. *Teratology* 22, 71-75.

**CHOW, K.L.** (1951). Numerical estimates of the auditory central nervous system of the rhesus monkey. *J. Comp. Neurol.* 95, 159-175.

**CHWEW, A.Y. & LESLIE, S.W.** (1980). Effects of acute and chronic administration of ethanol on rat brain arylsulphatase A y B. *Life Sci.* 27, 1777-1782.

**CIOFALO, F.R.** (1979). Chronic alcohol ingestion and  $\alpha$ -adrenergic receptor characteristics. *Proc. Nest. Pharmac. Sco.* 22, 367-369.

**CLARREN, S.K. & SMITH, D.W.** (1978). The fetal alcohol syndrome. *New Engl. J. Med.* 298, 1063-1067.

**CLARREN, S.K.; ALVORD, E.C.; SUMI, S.M.; STREISSGUTH, A.P. & SMITH, D.W.** (1978). Brain malformations related to prenatal exposure to ethanol. *J. Pediatr.* 92, 64-67.

**CLELAND, B.G.; LEVICK, W.R.; MORSTYN, R. & WARNER, H.G.** (1976). Lateral geniculate relay of slowly conducting retinal afferents to cat visual cortex. *J. Physiol.* 255, 299-320.

**COLONNIER, M. & GUILLERY, R.W.** (1964). Synaptic organization in lateral geniculate nucleus of the monkey. *Z. Zellforschmikrosk. Anat.* 62, 333-355.

**CONTAMINA, P.; ARIÑO, M.P.; PARRA, P. & MARTINEZ MILLAN, L.** (1988). Dense cored vesicles in presynaptic profiles of the rabbit dorsal lateral geniculate nucleus. *Histol. Hitopathol.* 3, 361-366.

**COX, B.M.** (1986). Peptides biosynthesis. *Alcohol Drug Res.* 6, 85-86.

**CRUZ-ORIVE, L.M.** (1987). Stereology: Historical notes and recent evolution. *Acta Stereol.* 6 (Suppl. II), 43-56.

**DAVIES, D.L. & SMITH, D.E.** (1981). A Golgi study of mouse hippocampal CA1 pyramidal neurons following perinatal ethanol exposure. *Neurosci. Lett.* 26, 49-54.

**DELESSE, M.A.** (1847). Procédé mécanique pour déterminer la composition des roches. *Ann. Mines.* 13, 379-388.

**DERRINGTON, A.M. & FUCHS, A.F.** (1979). Spatial and temporal properties of X- and Y- cells in the cat lateral geniculate nucleus. *J. Physiol. (Lond.)* 293, 347-364.

**DETERING, N.; COLLINS, R.N.; HAWKINS, R.L.; OZAND, P.T. & KARAHASAN, A.** (1980). Comparative effects to ethanol and malnutrition on the development of catecholamine neurosis: Changes in neurotransmitter levels. *J. Neurochem.* 34, 1587-1593.

**DIAZ, J. & SAMSON, H.H.** (1980). Impaired brain growth in neonatal rat pups exposed to ethanol. *Science* 208, 751-753.

**DOBBING, J. & SANDS, J.** (1973). Quantitative growth and development of the human brain. *Arch. Dis. Child.* 48, 757-767.

**DOBBING, J. & SANDS, J.** (1979). Comparative aspects of the brain growth spurt. *Early Hum. Dev.* 3, 79-83.

**DREOSTI, I.E.; BALLARD, F.J.; BELLING, G.B.; RECORD, I.R.; MANUEL, S.J. & HETZEL, B.S.** (1981). The effect of ethanol and acetaldehyde on DNA synthesis in growing cells and on fetal development in the rat. *Alcohol. Clin.*

*Exp. Res.* 5, 357-362.

**DROOGLEEVER FORTUYN, J.** (1964). Geometrical properties of the neurons in general and of the lateral geniculate body of the rabbit in particular. *Progress Brain Res.* 6, 113-125.

**DRUSE, M.J.; RATHBUN, W.E.; McNULTY, J.A. & NYQUIST-BATTIE, C.** (1986). Maternal alcohol consumption: Lack of effect on synaptogenesis in layer II of the motor cortex in 19-day-old rat offspring. *Exp. Neurol.* 94, 497-508.

**DURAND, D.; SAINT-CYR, J.A.; GUREVICH, N. & CARLEN, P.L.** (1989). Ethanol-induced dendritic alterations in hippocampal granule cells. *Brain Res.* 477, 373-377.

**ENNA, S.J. & YAMAMURA, H.I.** (eds.) (1980). Amino Acids, Peptides, and Benzodiazepines. In: "Receptors and recognition", Series B. Vol 9 (I). Chapman and Hall, London and New York.

**ERICKSON, C.K.** (1984). Ethanol clearance in mice inbred rat strains. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 8, 491-494.

**ESCOBAR, A.; SAMPEDRO, E.D. & DOW, R.S.** (1968). Quantitative data on the inferior olivary nucleus in man, cat, and vampire bat. *J. Comp. Neurol.* 132, 397-404.

**FABREGUES, I.; FERRER, I.; GAIRI, J.M.; CAHUANA, A. & GINER, P.** (1985). Effects of prenatal exposure to ethanol on the maturation of the pyramidal neurons in the cerebral cortex of the guinea-pig: A quantitative Golgi study. *Neuropathl. Appl. Neurobiol.* 11, 291-298.



**FAMIGLIETTI, E.V. & PETERS, A.** (1972). The synaptic glomerulus and the intrinsic neuron in the dorsal lateral geniculate nucleus of the cat. *J. Comp. Neurol.* 144, 285-334.

**FERRER, I. & GALOFRE, E.** (1987). Dendritic spine anomalies in fetal alcohol syndrome. *Neuropediatrics* 18, 161-163.

**FERRER, I.; FABREGUES, I.; RAIRIZ, J. & GALOFRE, E.** (1986). Decreased numbers of dendritic spines on cortical pyramidal neurons in human chronic alcoholism. *Neurosci. Lett.* 69, 115-119.

**FERRER, I.; GALOFRE, E.; LOPEZ-TEJERO, D. & LLOBERA, M.** (1988). Morphological recovery of hippocampal pyramidal neurons in the adult rat exposed in utero to ethanol. *Toxicology* 48, 191-197.

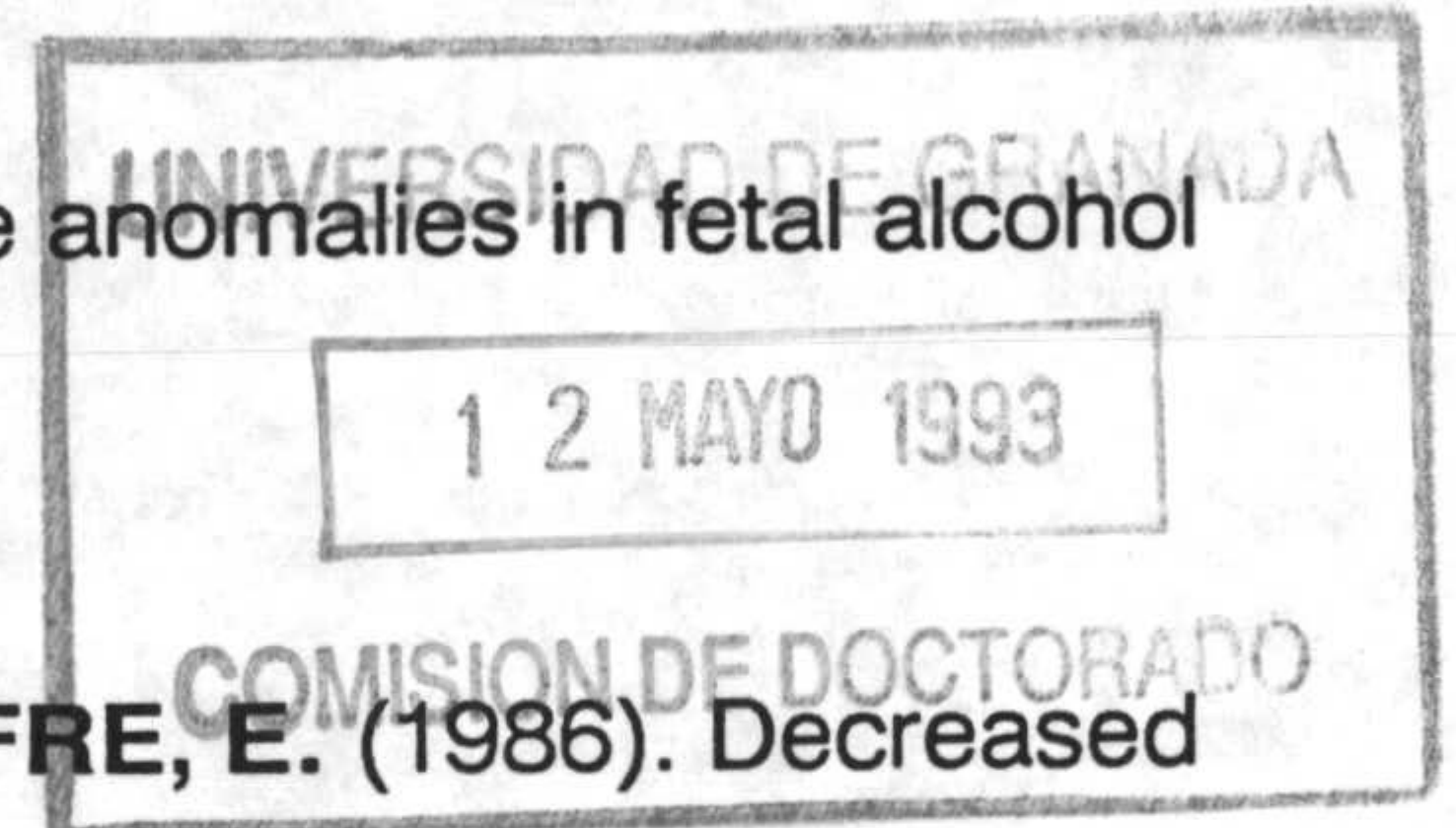
**FITZPATRICK, M.J.; PENNY, G.R. & SCHMECHEL, D.E.** (1984). Glutamic acid decarboxylase-immunoreactive neurons and terminals in the lateral geniculate nucleus of the cat. *J. Neurosci.* 4, 1809-1829.

**FLODERUS, S.** (1944). "Untersuchungen über den Bau der menschlichen hypophyse mit besonderer berücksichtigung der quantitativen mikromorphologischen verhältnisse". Kopenhagen: Munksgaard.

**FREUND, G.** (1979). The effects of chronic alcohol and vitamin E consumption on aging pigments and learning performance in mice. *Life Sci.* 24, 145-152.

**FUKUDA, Y.; SUGITANI, M. & IWAMA, K.** (1973). Flash evoked responses of two types of principal cells of the rat lateral geniculate body. *Brain Res.* 57, 208-212.

**FUKUDA, Y. & SUGITANI, M.** (1974). Cortical projections of two types of



principal cells of the rat lateral geniculate body. *Brain Res.* 67, 157-161.

**GALOFRE, E.; FERRER, I.; FABREGUES, I. & LOPEZ-TEJERO, D.** (1987). Effects of prenatal ethanol exposure on dendritic spines of layer V pyramidal neurons in the somatosensory cortex of the rat. *J. Neurolog. Sci.* 81, 185-195.

**GARCIA, M.V.; PEREZ-GONZALEZ, M.M. & CABEZAS, J.A.** (1981). Enzyme activities in liver and brain fractions from alcoholic and control rats. *Int. J. Biochem.* 13, 179-186.

**GAREY, L.J.; JONES, E.G. & POWELL, T.P.S.** (1968). Interrelationship of striate and extrastriate cortex with the primary relay sites of the visual pathway. *J. Neurol. Neurosurg Psychiat.* 31, 189-222.

**GERHARD, L.** (1968). "Atlas des mittel und zwischenhirns des kaninchens". Berlin, Springer.

**GIANOULAKIS, C.** (1987). Effect of prenatal exposure to ethanol on body growth and the pituitary  $\beta$ -endorphin. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 11 (6), 567-573.

**GIOLLI, R.A. & GUTHRIE, M.D.** (1969). The primary optic projections in the rabbit. An experimental degeneration study. *J. Comp. Neurol.* 136, 99-126.

**GIOLLI, R.A.; TOWNS, L.C.; TAKAHASHI, T.T.; KARAMANLIDIS, A.N. & WILLIAMS, D.D.** (1978). An autoradiographic study of the projections of visual cortical area 1 to the thalamus, pretectum and superior colliculus of the rabbit. *J. Comp. Neurol.* 180, 743-752.

**GIONET, T.X.; THOMAS, J.D.; WARNER, D.S.; GOODLETT, C.R.; WASSERMAN, E.A. & WEST, J.R.** (1991). Forebrain ischemia induces selective behavioral impairments associated with hippocampal injury in rats.

*Stroke* 22, 1040-1047.

**GLAGOLEV, A.A.** (1933). On the geometrical methods of quantitative mineralogic analysis of rocks. *Trans. Inst. Econ. Min. (U.S.S.R.)*, 59.

**GOLDMAN, H.; SAPIRSTEIN, L.A.; MURPHY, S. & MOORE, J.C.** (1973). Alcohol and regional blood flow in brains of mice. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 144, 983-988.

**GONZALO, A.; ARZYMANOW, B.J. & LIEBERMAN, A.R.** (1985). Proyecciones ópticas primarias en el conejo. Estudio mediante el marcaje anterógrado con peroxidasa de rabano. *Revista española de fisiología*, 41, 161-170.

**GRAFSTEIN, B. & LAUREANO, R.** (1973). Transport of radioactivity from eye to visual cortex in the mouse. *Expl. Neurol.* 39, 44-57.

**GRATIOLET, P.** (1854). "Mémoire sur les plis cérébraux de l'homme et des primates". A. Bertrand, Paris, 1854.

**GROSSMAN, A.; LIEBERMAN, A.R. & WEBSTER, K.E.** (1973). A Golgi study of the rat dorsal lateral geniculate nucleus. *J. Comp. Neurol.* 150, 441-466.

**GUERRI, C. & SANCHIS, R.** (1986). Alcohol and acetaldehyde in rat's milk following ethanol administration. *Life Sci.* 38, 1543-1556.

**GUILLERY, R.W.** (1966). A study of Golgi preparations from the dorsal lateral geniculate nucleus of the adult cat. *J. Comp. Neurol.* 128, 21-50.

**GUILLERY, R.W.** (1969). The organization of synaptic interconnections in the laminae of the dorsal lateral geniculate nucleus of the cat. *Z. Zellforsch.* 96, 1-38.

**GUILLERY, R.W.** (1970). The laminar distribution of retinal fibers in the dorsal lateral geniculate nucleus of the cat. A new interpretation. *J. Comp. Neurol.* 138, 339-368.

**GUILLERY, R.W.** (1971). Patterns of synaptic interconnections in the dorsal lateral geniculate nucleus of cat and monkey: A brief review. *Vision Res.* 3, 211-227.

**GUILLERY, R.W.; CRABTREE, J.W. & SYMONDS, L.L.** (1988). The  $\beta$  sector rabbit's dorsal lateral geniculate nucleus. *Proc. R. Soc. Lond. B* 233, 17-32.

**GUNDERSEN, H.J.G.** (1977). Notes on the estimation of the numerical density of arbitrary profiles: The edge effect. *J. Microsc.* 111, 219-223.

**GUNDERSEN, H.J.G.** (1986). Stereology of arbitrary particles. A review of unbiased number and size estimators and the presentation of some new ones, in memory of William R. Thompson. *J. Microsc.* 143, 3-45.

**GUNDERSEN, H.J.G.** (1988). The nucleator. *J. Microsc.* 151, 3-21.

**HAJDU, F.; HASSLER, R. & SOMOGYI, G.** (1982). Neuronal and synaptic organization of the lateral geniculate nucleus of the tree shrew, *Tupaia glis*. *Cell tissue Res.* 224, 207-223.

**HALSEY, J.H.; CONGER, K.A.; GARCIA, J.H. & SARVARY, E.** (1991). The contribution of reoxygenation to ischemic brain damage. *J. Cereb. Blood Flow Metabol.* 11, 994-1000.

**HAMMER, R.P. & SCHEIBEL, A.B.** (1981). Morphologic evidence for a delay of neuronal maturation in fetal alcohol exposure. *Exp. Neurol.* 74, 587-596.

**HAMORI, J.T.; PASIK, T.; PASIK, P. & SZENTAGOTHAI, J.** (1974). Triadic synaptic arrangements and their possible significance in the lateral geniculate of the monkey. *Brain Res.* 80, 379-393.

**HAMOS, J.E.; VAN HORN, S.C.; RACZKOWSKI, D.; UHLRICH, D.J. & SHERMAN, S.M.** (1985). Synaptic connectivity of a local circuit neurone in the lateral geniculate nucleus of the cat. *Nature (London)* 317, 618-621.

**HARPER, C. & KRIL, J.** (1989). Patterns of neuronal loss in the cerebral cortex in chronic alcoholic patients. *J. Neurolog. Sci.* 92, 81-89.

**HAUG, H.** (1967). Probleme und methoden der strukturzählung im schniltpräparat. In: "Quantitative methods in morphology" (E.R. Weibel and H. Elias, eds.) pp. 57-78. Springer Verlag, Berlin-Heidelberg-New York.

**HAUG, H.** (1970). Der makroskopische aufbau des grosshirns. *Ergebn. Anat. Entwickl. Gesch.* 43, 4.

**HAUG, H.** (1972). Stereological methods in the analysis of neuronal parameters in the central nervous system. *J. Microscopy* 95, 165-180.

**HELLER, I.H. & ELLIOT, K.A.C.** (1954). Deoxyribonucleic acid content and cell density in brain and human brain tumors. *Canad. J. Biochem. Physiol.* 32, 584-592.

**HICKEY, T.L. & SPEAR, P.D.** (1976). Retinogeniculate projections in hooded and albino rats: An autoradiographic study. *Exp. Brain Res.* 24, 523-529.

**HOFF, S.F.** (1988). Synaptogenesis in the hippocampal dentate gyrus: Effects of *in utero* ethanol exposure. *Brain Res. Bull.* 21, 47-54.

**HOFFMAN, P.L. & TABAKOFF, B.** (1977). Alterations in dopamine receptor sensitivity by chronic ethanol treatment. *Nature* 268, 551-553.

**HOLCOMBE, V. & GUILLERY, R.W.** (1984). The organization of retinal maps within the dorsal and ventral lateral geniculate nuclei of the rabbit. *J. Comp. Neurol.* 225, 469-491.

**HOLLÄNDER, H.** (1970). The projections from the visual cortex to the lateral geniculate body (LGB): An experimental study with silver impregnation methods in the cat. *Exp. Brain Res.* 10, 219-235.

**HOLLÄNDER, H.** (1972). Autoradiographic evidence for a projection from the striate cortex to the dorsal part of the lateral geniculate nucleus in the cat. *Brain Res.* 41, 464-469.

**HOLLÄNDER, H.** (1974). Projections from the striate cortex to the diencephalon in the squirrel monkey *Saimiri sciureus*. A light microscopic radioautographic study. *J. Comp. Neurol.* 155, 425-440.

**HOLLÄNDER, H. & MARTINEZ MILLAN, L.** (1975). Autoradiographic evidence from topographically organized projection from the striate cortex to the lateral geniculate nucleus in the rhesus monkey. *Brain Res.* 100, 407-411.

**HOWARD, V.; REID, S.; BADDELEY, A. & BOYDE, A.** (1985). Unbiased estimation of particle density in the tandem scanning reflected light microscope. *J. Microsc.* 138, 203-212.

**IDE, L.S.** (1982). The fine structure of the perigeniculate nucleus of the cat. *J. Comp. Neurol.* 210, 317-334.

**ISAACSON, R.L. & PRIBRAM, K.H.** (1975). "The Hippocampus". New York:

Plenum Press.

**JENSEN, E.B. & GUNDERSEN, H.J.G.** (1989). Fundamental stereological formulae based on isotropically oriented probes through fixed points with applications to particle analysis. *J. Microsc.* 153, 249-267.

**JONES, K.L. & SMITH, D.W.** (1973). Recognition of the fetal alcohol syndrome in early infancy. *Lancet* 2, 999-1001.

**JONES, K.L. & SMITH, D.W.** (1975). The fetal alcohol syndrome. *Teratology* 12, 1-10.

**JORGESEN, M.B. & DIEMER, N.H.** (1982). Selective neuron loss after cerebral ischemia in the rat: Possible role of transmitter glutamate. *Acta Neurolog. Scand.* 66, 536-546.

**KAAS, J.H.; GUILLERY, R.W. & ALLMAN J.M.** (1973). Discontinuities in the dorsal lateral geniculate nucleus corresponding to the optic disc: a comparative study. *J. Comp. Neurol.* 147, 163-179.

**KHALE, W.; LEONHARDT, H. & PLATZER, W.** (1977). "Atlas de anatomía. Tomo III: Sistema nervioso y órganos de los sentidos". pp. 302-311. Ed. Omega, Barcelona.

**KAPLAN, M.S.; McNELLY, N.A. & HINDS, J.W.** (1985). Population dynamics of adult-formed granule neurons of the rat olfactory bulb. *J. Comp. Neurol.* 239, 117-125.

**KARWACKA, H.** (1980a). Ultrastructural and biochemical studies of the brain and other organs in rats after chronic ethanol administration. I. Electron microscopic investigations of the morphological elements of the blood-brain

barrier in the rat after ethanol intoxication. *Exp. Pathol.* 18, 118-126.

**KARWACKA, H.** (1980b). Ultrastructural and biochemical studies of the brain and other organs in rats after chronic ethanol administration. II. Electron microscopic studies of rat brain after chronic ethanol administration. *Exp. Pathol.* 18, 127-135.

**KELLY, S.J.; BONTHIUS, D.J. & WEST, J.R.** (1987). Developmental changes in alcohol pharmacokinetics in rats. *Alcohol Clin. Exp. Res.* 11, 281-286.

**KLÜVER, H. & BARRERA, E.** (1953). A method for the combined staining of cells and fibers in the nervous system. *J. Neuropath.* 12, 400-403.

**KRIL, J.J. & HARPER, C.G.** (1989). Neuronal counts from four cortical regions of alcoholic brains. *Acta Neuropath.* 79, 200-204.

**KONIGSMARK, B.W.** (1970). Methods for the counting of neurons. In: "Contemporary Research Methods in Neuroanatomy". (W.J. Nauta y S.O.E. Ebbesson, eds.). Springer Verlag, New York, pp. 315-340.

**KORNGUTH, S.E.; RUTLEDGE, J.J.; SUNDERLAND, E.; SIEGAL, F.; CARLSON, I.; SMOLLENS, S.; JUHL, U. & YOUNG, B.** (1979). Impeded cerebellar development and reduced serum thyroxine levels associated with fetal alcohol intoxication. *Brain Res.* 177, 347-360.

**LANCASTER, F.; PHILLIPS, S.; PATSALOS, P.N. & WIGGINS, R.C.** (1984). Brain myelination in the offspring of ethanol-treated rats: *in vitro* versus lactational exposure by crossfostering offspring of control, paired and ethanol treated dams. *Brain Res.* 309, 209-216.

**LANNING, J.C.** (1980). Effects of ethanol on human fetal cerebral cortex *in*



*vitro. Anat. Rec.* 196, 242.

**LE VAY, S.** (1971). On the neurons and synapses of the lateral geniculate nucleus of the monkey and the effects of eye enucleation. *Z. Zellforsch.* 113, 227-244.

**LE VAY, S. & FERSTER, D.** (1979). Proportion of interneurons in the cat's lateral geniculate nucleus. *Brain Res.* 164, 304-308.

**LEDIG, M.; CIESIELSKI, L.; SIMLER, S.; LORENTZ, J.G. & MANDEL, P.** (1988). Effect of pre- and postnatal alcohol consumption on GABA levels of various brain regions in the rat offspring. *Alcohol Alcohol.* 23, 63-67.

**LESCAUDRON, L.; BERACOCHEA, D.; VERNA, A. & JAFFARD, R.** (1984). Chronic ethanol consumption induces neuronal loss in mammillary bodies of the mouse: A quantitative analysis. *Neurosci. Lett.* 50, 151-155.

**LESCAUDRON, L. & VERNA, A.** (1985). Effects of chronic ethanol consumption on pyramidal neurons of the mouse dorsal and ventral hippocampus: A quantitative analysis. *Exp. Brain Res.* 58, 362-367.

**LIAN, C.** (1915). L'alcoholism cause d'hypertension arterielle. *Bull. Acad. Natl. Med. (Paris)* 74, 525-528.

**LIEBERMAN, A.R. & WEBSTER, K.E.** (1974). Aspects of the synaptic organization of intrinsic neurons in the dorsal lateral geniculate nucleus. An ultrastructural study of the normal and of the experimentally deafferented nucleus in the rat. *J. Neurocytol.* 3, 677-710.

**LOPEZ-TEJERO, D.; FERRER, I.; LLOBERA, M. & HERRERA, E.** (1986). Effects of prenatal ethanol exposure on physical growth, sensory reflex

maturation and brain development in the rat. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* 12, 251-260.

**LUCCHI, L.; COVELLI, V.; PETKOV, V.V.; SPANO, P.F. & TRABUCCHI, M.** (1983). Effects of ethanol, given during pregnancy on the offspring dopaminergic system. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 19, 567-570.

**LUMENG, L.; WONG, D.T.; THREJKELD, P.G.; REID, L.R. & LI, T.K.** (1986). Neuronal receptors of alcohol-preferring (P) and non-preferring (NP) rats. *Alcohol Alcohol.* 21, A 109.

**LUND, R.D. & CUNNINGHAM, T.J.** (1972). Aspects of synaptic and laminar organization of the mammalian lateral geniculate body. *Invest. Ophthalm.* 11, 291-301.

**LUND, R.D.; LUND, J.S. & WISE, R.P.** (1974). The organization of the retinal projection to the dorsal lateral geniculate nucleus in pigmented and albino rats. *J. Comp. Neurol.* 158, 383-404.

**LYNCH, M.A. & LITTLETON, J.M.** (1983). Possible association of alcohol tolerance with increased synaptic  $Ca^{2+}$  sensitivity. *Nature* 303, 175-176.

**MARRABLE,, A.W.** (1962). The counting of cells and nuclei in microtome sections. *Quart. J. Micr. Sci.* 103, 331-347.

**MATHIEU, O.; CLAASSEN, H. & WEIBEL, E.R.** (1978). Differential effect of glutaraldehyde and buffer osmolarity on cell dimensions. A study on lung tissue. *J. Ultrastruct. Res.* 63, 20-34.

**MCLOUGHLIN, L.; LOWRY, P.J.; RATTER, S.J.; HOPE, J.; BESSER, G.M. & REES, L.H.** (1981). *Neuroendocrinol.* 32, 209-212.

**MCMULLEN, P.A.; SAINT-CYR, J.A. & CARLEN, P.L.** (1984). Morphological alterations in rat CA1 hippocampal pyramidal cell dendrites resulting from chronic ethanol consumption and withdrawal. *J. Comp. Neurol.* 225, 111-118.

**MEZEY, E.; POTTER, J.J. & AMMON, R.A.** (1976). Effect of ethanol administration on the activity of hepatic lysosomal enzymes. *Biochem. Pharmacol.* 25, 2663-2667.

**MEZEY, E.; POTTER, J.J.; SLUSSER, R.J.; BRANDES, D.; ROMERO, J.; TAMURA, T. & HALSTED, C.H.** (1980). Effect of ethanol feeding on hepatic lysosomes in the monkey. *Lab. Invest.* 43, 88-93.

**MICHAELIS, E.K.** (1990). Fetal alcohol exposure: Cellular toxicity and molecular events involved in toxicity. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 14 (6), 819-826.

**MICHAELIS, E.K. & MICHAELIS, M.L.** (1986). Molecular events underlying the effects of ethanol on the developing central nervous system. In: "Alcohol and Brain Development" (West, J.R. ed.). pp. 277-309. Oxford University Press, New York.

**MILLER, M.W.** (1986). Effects of alcohol on the generation and migration of cerebral cortical neurons. *Science* 233, 1308-1311.

**MILLER, M.W.** (1988). Effect of prenatal exposure to ethanol on the development on cerebral cortex. I. Neuronal generation. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 12, 440-449.

**MILLER, M.W.** (1989). Effects of prenatal exposure to ethanol on neocortical development: II. Cell proliferation in the ventricular and subventricular zones of the rat. *J. Comp. Neurol.* 287, 326-338.

**MILLER, M.W. & POTEPA, G.** (1990). Numbers of neurons and glia in mature rat somatosensory cortex: Effects of prenatal exposure to ethanol. *J. Comp. Neurol.* 293, 92-102.

**MILLER, W.S. & CARLTON, E.P.** (1985). The relation of the cortex of the cats kidney to the volume of the kidney, and an estimation of the number of glomeruli. *Trans. Wisconsin Acad. Sci.* 10, 525-538.

**MINKOWSKI, M.** (1913). Experimentelle untersuchungen über die beziehungen der grosshirnrinde und der netzhaut zu den primären optischen zentren. Besonders zum corpus geniculatum externum. *Arb. Hirnanat. Inst. Zürich* 7, 255-362.

**MOHAMED, S.A.; NATHANIEL, E.J.; NATHANIEL, D.R. & SNELL, L.** (1987). Altered Purkinje cell maturation in rats exposed prenatally to ethanol. I. Cytology. *Exp. Neurol.* 97, 35-52.

**MONTERO, V.M.** (1986). Localization of gamma-aminobutyric acid (GABA) in tipe 3 cells and demonstration of their source to F2 terminals in the cat lateral geniculate nucleus: A Golgi-electron microscopic GABA-immunocytochemical study. *J. Comp. Neurol.* 264, 228-245.

**MONTERO, V.M.** (1989). The GABA-immunoreactive neurons in the interlaminar regions of the cat lateral geniculate nucleus: Light and electron microscopic observations. *Exp. Brain Res.* 75, 497-512.

**MONTERO, V.M. & GUILLERY, R.W.** (1968). Degeneration in the dorsal lateral geniculate nucleus of the rat following interruption of the retinal or cortical connections. *J. Comp. Neurol.* 134, 211-242.

**MONTERO, V.M. & ZEMPEL, J.** (1985). Evidence for two types of GABA-

containing interneurons in the A-laminae of the cat lateral geniculate nucleus: A double-label HRP and GABA-immunocytochemical study. *Exp. Brain Res.* 60, 603-609.

**MURPHY, J.M.; McBRIDE, W.J.; LUMENG, L. & LI, T.K.** (1982). Regional brain levels of monoamines in alcohol-preferring and non-preferring lines of rats. *Pharmac. Biochem. Behav.* 16, 145-149.

**NAVASCUES, J.; ALMENDROS, A. & ABADIA-FENOLL, F.** (1979). Descripción de un método para la valoración de la retracción tisular. *Morfol. Norm. Patol. Sec. A* 3, 107-114.

**NIETO-SAMPEDRO, M.; HOFF, S.F. & COTMAN, C.W.** (1982). Perforated postsynaptic densities: Probable intermediates in synapse turnover. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79, 5718-5722.

**NISSL, F.** (1892). Über die Veränderungen der Ganglienzellen am Facialiskern des Kaninchens nach Ausreissung der Nerven. *Allg. Z. Psychiatr.* 48, 197-198.

**NOBLE, E.P. & TEWARI, S.** (1975). Ethanol and brain ribosomes. *Fed. Proc* 34, 1942-1947.

**NYQUIST-BATTIE, C. & GOCHEE, A.** (1985). Alterations in the development of the main olfactory bulb of the mouse after ethanol exposure. *Int. J. Dev. Neurosci.* 3, 211-222.

**OGAWA, T.; ITO, S. & KATO, H.** (1981). P- cells and I- cells in vitro slices of the lateral geniculate nucleus of the cat. *J. Exp. Med. (Tohoku)* 130, 359-368.

**PAULA-BARBOSA, M.M.; BORGES, M.M.; CADETE-LEITE, A. & TAVARES, M.A.** (1986). Giant multivesicular bodies in the rat hippocampal pyramidal cells

after chronic alcohol consumption. *Neurosci. Lett.* 64, 345-349.

**PAULA-BARBOSA, M.M.; BRANDAO, F.; PINHO, M.C.; ANDRADE, J.P.; MADEIRA, M.D. & CADETE-LEITE, A.** (1991). The effects of piracetam on lipofuscin of the rat cerebellar and hippocampal neurons after long-term alcohol treatment and withdrawal: A quantitative study. *Alcohol Clin. Exp. Res.* 15 (5), 834-838.

**PENNINGTON, S.M.** (1988). Alcohol metabolism and fetal hypoplasia in chick brain. *Alcohol* 5, 91-94.

**PENTNEY, R.J.** (1982). Quantitative analysis of ethanol on Purkinje cell dendritic tree. *Brain Res.* 249, 397-401.

**PENTNEY, R.J. & QUIGLEY, P.J.** (1987). Morphometric parameters of Purkinje dendritic networks after ethanol treatment during aging. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 11 (6), 536-540.

**PHILLIPS, D.E.** (1989). Effects of limited postnatal ethanol exposure on the development of myelin and nerve fibers in rat optic nerve. *Exp. Neurol.* 103, 90-100.

**PHILLIPS, D.E. & KRUEGER, S.K.** (1990). Effects of postnatal ethanol exposure on glial cell development in rat optic nerve. *Exp. Neurol.* 107, 97-105.

**PHILLIPS, D.E.; KRUEGER, S.K. & RYDQUIST, J.E.** (1991). Short- and long-term effects of combined pre- and postnatal ethanol exposure (three trimester equivalency) on the development of myelin and axons in rat optic nerve. *Int. J. Devl. Neurosci.* 9 (6), 631-647.

**PHILLIPS, S.C. & CRAGG, B.G.** (1982). A change in susceptibility of rat

cerebellar Purkinje cells to damage by alcohol during fetal, neonatal and adult life. *Neurophatol. Appl. Neurobiol.* 8, 441-454.

**PHILLIPS, S.C. & CRAGG, B.G.** (1983). Chronic consumption of alcohol by adult mice: Effect on hippocampal cells and synapses. *Exp. Neurol.* 80, 218-226.

**PIERCE, D.R.; GOODLETT, C.R. & WEST, J.R.** (1989). Differential Neuronal loss following early postnatal alcohol exposure. *Teratology* 40, 113-126.

**POLYAK, S.** (1957). "The vertebrate visual system". University of Chicago Press, Chicago, 1957.

**POPOVA, E.M. & SHCHEKALINA, G.A.** (1980). Vliyaniy alkogolya na glial'nyye kletki (Effect of alcohol on glial cells). *Zhurnal Neuropatologii I Psikhatrii* 80, 539-544.

**POTTER, J.F. & BEEVERS, D.G.** (1984). The possible mechanisms of alcohol associated hypertension. *Ann. Clin. Res.* 16, 97-102.

**PUTNAM, T.J.** (1926). Studies on the central visual system. II. A comparative study of the form of the geniculo-striate visual system of mammals. *Arch. Neurol. Psychiat.* 16, 285-299.

**RAFOLS, J.A. & VALVERDE, F.** (1973). The structure of the dorsal lateral geniculate nucleus in the mouse. A Golgi and electron microscopy study. *J. Comp. Neurol.* 150, 303-332.

**RALSTON, H.J. & CHOW, K.L.** (1973). Synaptic reorganization in the degenerating lateral geniculate nucleus of the rabbit. *J. Comp. Neurol.* 147, 321-350.

**RAMON-MOLINER, E.** (1962). An attempt at classifying nerve cells on the basis of their dendritic patterns. *J. Comp. Neurol.* 119, 211-227.

**RAPISARDI, S. & MILES, T.P.** (1984). Synaptology of retinal terminals in the dLGN of the cat. *J. Comp. Neurol.* 223, 515-534.

**RAWAT, A.K.** (1975). Ribosomal protein synthesis in the fetal and neonatal rat brain as influenced by maternal ethanol consumption. *Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol.* 12, 723-732.

**RAWAT, A.K.** (1976). Effect of maternal ethanol consumption on foetal and neonatal rat hepatic protein synthesis. *Biochem. J.* 160, 653-661.

**RICO IRLES, J. & GIL EXTREMERA** (1986). Alcoholismo crónico en andalucía oriental. Epidemiología y detección precoz. *Premio Reyes Católicos de la Caja General de Ahorros de Granada.*

**RILEY, J.N.** (1977). Alterations in dendritic morphology following chronic alcohol consumption. *PhD Thesis, University of Florida, USA.*

**RILEY, J.N. & WALKER, D.W.** (1978). Morphological alterations in hippocampus after long-term alcohol consumption in mice. *Science* 201, 646-648.

**RISCHKE, R. & KRIEGLSTEIN, J.** (1991). Protective effect of vinpocentine against brain damage caused by ischemia. *Jap. J. Pharmacol.* 56, 349-356.

**ROBSON, J.A.** (1983). The morphology of corticofugal axons to the dorsal lateral geniculate nucleus in the cat. *J. Comp. Neurol.* 216, 89-103.

**RODIER, P.N.** (1977). Correlations between prenatally-induced alterations in



CNS cell populations and postnatal function. *Teratology* 16, 235-246.

**ROSE, J.E. & MALIS, L.I.** (1964). Geniculo-striate connections in the rabbit. I. Retrograde changes in the DLGB after destruction of cells in various layers of the striate region. *J. Comp. Neurol.* 125, 95-120.

**ROSE, J.E. & MALIS, L.I.** (1965). Geniculo-striate connections in the rabbit. II. Cytoarchitectonic structure of the striate region and of the dorsal lateral geniculate body: Organization of the geniculo-striate projections. *J. Comp. Neurol.* 125, 121-140.

**ROSENQUIST, A.C.; EDWARDS, S.B. & PALMER, L.S.** (1974). An autoradiographic study of the projections of the dorsal lateral geniculate nucleus and the posterior nucleus in the cat. *Brain Res.* 80, 71-93.

**ROSIWAL, A.** (1898). Ueber geometrische Gesteinsanalysen. *Verh. K. K. Geol. Reichsanst. Wien.* 6, 143-175.

**ROSSELLI-AUSTIN, L. & ALTMAN, J.** (1979). The postnatal development of the main olfactory bulb of the rat. *J. Dev. Physiol.* 1, 295-313.

**RYZEN, M.** (1956). A microphotometric method of cell enumeration within the cerebral cortex of man. *J. Comp. Neurol.* 104, 233-245.

**SAITO, T.; LEE, J.; VALVERIUS, P.; HOFFMAN, P.L. & TABAKOFF, B.** (1986). Cerebral cortical beta-adrenergic receptor function after chronic ethanol ingestion. *Alcohol Alcohol.* 21, A 289.

**SAKAKURA, H.** (1968). Spontaneous and evoked unitary activities of cat lateral geniculate neurons in sleep and wakefulness. *J. Physiol. (Jap.)* 18, 23-42.

**SAMORAJSKI, T.; LANCASTER, F. & WIGGINS, R.C.** (1986). Fetal ethanol exposure: A morphometric analysis of myelination in the optic nerve. *Devl. Neurosci.* 4(4), 369-374.

**SANDERSON, K.J.** (1975). Retinogeniculate projections in the rabbit of the albino allelomorphic series. *J. Comp. Neurol.* 159, 15-28.

**SCHERLE, W.** (1970). A simple method for volumetry of organs in quantitative stereology. *Mikroskopie* 26, 57.

**SCHLESSINGER, A.R.; COWAN, W.M. & GOTTLIEB, D.T.** (1975). An autoradiographic study of the time of origin and the pattern of granule cell migration in the dentate gyrus of the rat. *J. Comp. Neurol.* 159, 149-176.

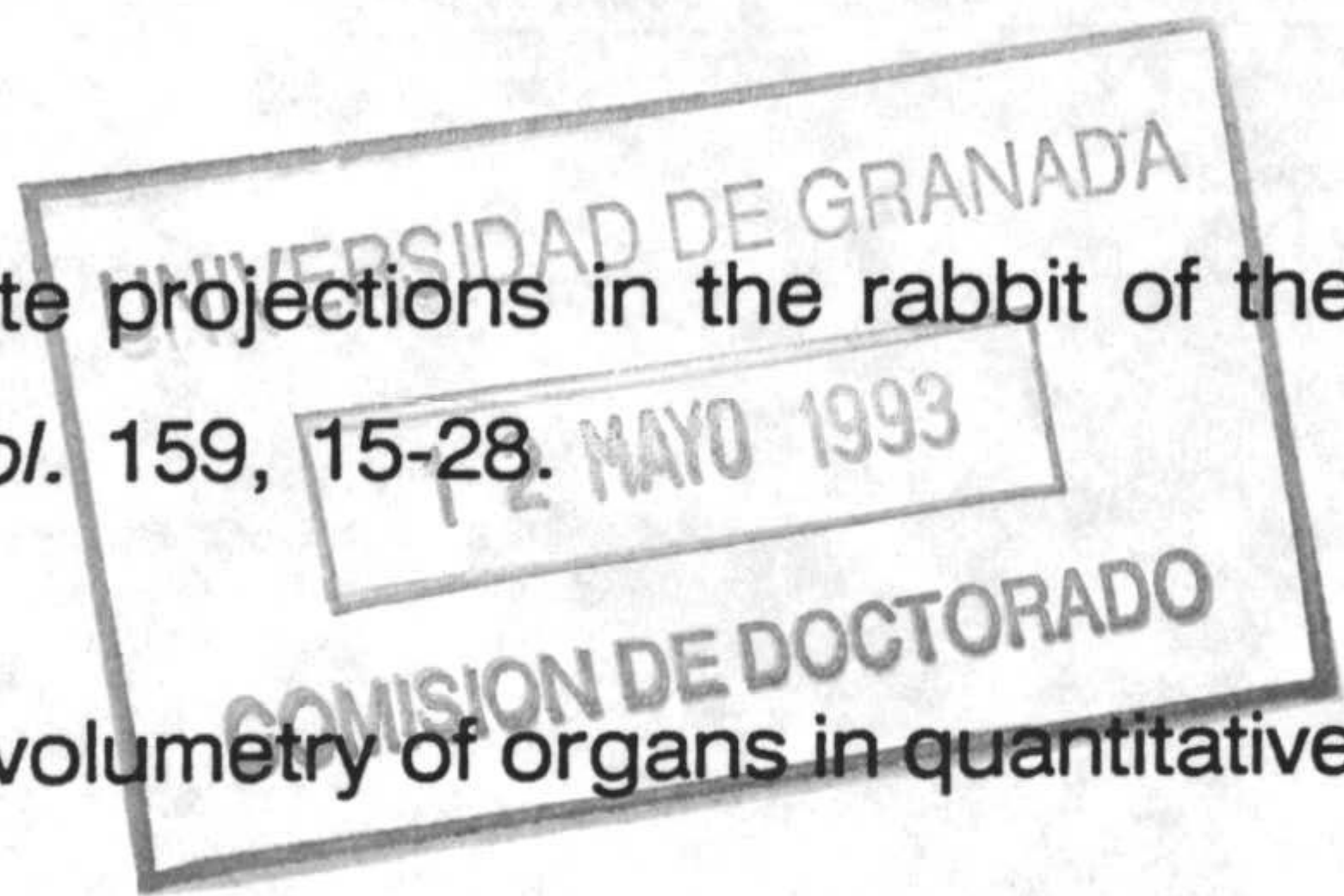
**SCHOBBER, W. & BRAUER, K.** (1973). Qualitative und quantitative untersuchungen am corpus geniculatum laterale (Cgl) der laborratte. II. Quantitative untersuchungen an den neurontypen des Cgl. *J. Hirnforsch.* 14, 463-471.

**SCHOBBER, W.; WERNER, L. & BRAUER, K.** (1985). Das corpus geniculatum laterale des meerschweincheus *Cavia aperea f. domestica*. Seine gliederung unter berücksichtigung der retinalen afferentierung. *J. Hirnforsch.* 26, 73-84.

**SCHWARTZ, J.** (1986). Molecular biological approaches. *Alcohol Drug Res.* 6, 81-83.

**SEFTON, A.J.; MACKAY-SIM, A.; BAUR, L.A. & COTTEE, L.J.** (1981). Cortical projections to visual centers in the rat: An HRP study. *Brain Res.* 215, 1-13.

**SEIFFERT, W.** (ed.) (1983). "Neurobiology of the Hippocampus". Academic



Press, New York.

**SEIL, F.J.; LEIMAN, A.L.; HERMAN, M.M. & FISH, R.A.** (1977). Direct effect of ethanol on central nervous system cultures: An electrophysiological and morphological study. *Exp. Neurol.* 55, 390-404.

**SHATZ, C.J.** (1988). The role of function in the prenatal development of retinogeniculate connections. In: "Cellular Thalamic Mechanisms" (Bentivoglio, M. and Spreafico, R. eds.). Elsevier Science Publishers, Amsterdam.

**SHERMAN, S.M. & FRIEDLANDER, M.J.** (1988). Identification of X versus Y properties for interneurons in the A-laminae of the cat's lateral geniculate nucleus. *Exp. Brain Res.* 73, 384-392.

**SLOTKIN, T.W.; SCHANBERG, S.M. & KUHN, C.M.** (1980). Synaptic development in brains of rats exposed perinatally to ethanol. *Experientia* 36, 1005-1007.

**SMITH, D.E.; FOUNDAS, A. & CANALE, J.** (1986). Effect of perinatally administered ethanol on the development of the cerebellar granule cell. *Exp. Neurol.* 92, 491-501.

**SMITH, D.E. & DAVIES, D.L.** (1990). Effect of perinatal administration of ethanol on the CA1 pyramidal cell of the hippocampus and Purkinje cell of the cerebellum: An ultrastructural survey. *J. Neurocytol.* 19, 708-717.

**SO, Y.T. & SHAPLEY, R.M.** (1979). Spatial properties of X and Y cells in the lateral geniculate nucleus of the cat and conduction velocities of their inputs. *Exp. Brain Res.* 36, 533-550.

**SO, Y.T. & SHAPLEY, R.M.** (1981). Spatial tuning of cells in and around

lateral geniculate nucleus of the cat: X and Y relay cells and perigeniculate interneurons. *J. Neurophysiol.* 45, 107-120.

**SOHAL, R.S. & WOLFE, L.S.** (1986). Lipofuscin: Characteristics and significance. In: "Aging of the brain and Alzheimer's disease" (Swaab, D.F.; Fliers, E.; Mirmiran, M.; Van Gool, W.A. and Van Haaren, F. eds.). pp. 171-183. Progress in Brain Research, Vol 70. Elsevier Science Publishers, Amsterdam.

**SPOHR, H-L. & STOLTENBURG-DIDINGER, G.** (1985). Morphological aspects of experimental alcohol fetopathy: Purkinje cell development and synaptic maturation in wistar rats exposed to alcohol pre- and postnatally. *Alc. Devl. Brain* 10, 109-124.

**STANFORD, L.R.; FRIEDLANDER, M.J. & SHERMAN, S.M.** (1981). Morphology of physiologically identified W- cells in the C laminae of the cat's lateral geniculate nucleus. *J. Neurosci.* 1, 578-584.

**STERIO, D.C.** (1984). Estimating number, mean sizes and variations in size of particles in 3-D specimens using disectors. *J. Microsc.* 134, 127-136.

**STREISSGUTH, A.P.** (1978). Fetal alcohol syndrome: An epidemiological perspective. *Am. J. Epidemiol.* 107, 467-478.

**STREISSGUTH, A.P.** (1986). The behavioral teratology of alcohol: Performance, behavioral, and intellectual deficits in prenatally exposed children. In: "Alcohol and Brain Development" (West, J.R. ed.). pp. 3-44. New York, Oxford University Press, New York.

**STOWELL, R.E.** (1941). Effects on tissue volume of various methods of fixation, dehydration, and embedding. *Stain. Technol.* 16, 67-83.

**STONE, J. & DREHER, B.** (1973). Projection of X- and Y- cell the cat's lateral geniculate nucleus to areas 17 and 18 of visual cortex. *J. Neurophysiol.* 36, 551-567.

**SULLIVAN, P.R.; KUTEN, J.; ATKINSON, M.S.; ANGEVINE, J.B. & YAKOVLEV, P.L.** (1958). Cell count in the lateral geniculate nucleus of man. *Neurol.* 8, 566-567.

**SUR, M.; STANFORD, L.R. & SHERMAN, S.M.** (1981). W- cells in the C laminae of the cat's lateral geniculate nucleus: Contrast sensitivity and other response measures. *Soc. Neurosci. (Abstr.)* 7, 25.

**SUR, M. & SHERMAN, S.M.** (1982). Linear and nonlinear W- cells in C laminae of the cat's lateral geniculate nucleus. *J. Neurophysiol.* 47, 869-884.

**SZENTAGOTHAI, J.** (1963). The structure of the synapse in the lateral geniculate body. *Acta Anat.* 55, 166-185.

**SZENTAGOTHAI, J.** (1973). Neuronal and synaptic architecture of the lateral geniculate nucleus. *Handb. Senso. Physiol.* VII/3, 141-176.

**TABOADA, R.P.** (1927). Note sur la structure du corps genouillé externe. *Trab. Lab. Invest. Biol. Univ. Madrid* 25, 319-329.

**TAKAHASHI, E.S.; HICKEY, T.L. & OYSTER, C.W.** (1977). Retinogeniculate projections in the rabbit: an autoradiographic study. *J. Comp. Neurol.* 175, 1-12.

**TANAKA, H.; ARIMA, M. & SUZUKI, N.** (1981). The fetal alcohol syndrome in Japan. *Brain & Development* 3, 305-311.

**TAVARES, M.A. & PAULA-BARBOSA, M.M.** (1982). Alcohol-induced granule cell loss in the cerebellar cortex of the adult rat. *Exp. Neurol.* 78, 574-582.

**TAVARES, M.A. & PAULA-BARBOSA, M.M.** (1983). Lipofuscin granules in Purkinje cells after long-term alcohol consumption. *Alcohol. Clin: Exp. Res.* 7, 302-306.

**TAVARES, M.A. & PAULA-BARBOSA, M.M.** (1984). Remodeling of the cerebellar glomeruli after long-term alcohol consumption in the adult rat. *Brain Res.* 309, 217-226.

**TAVARES, M.A.; PAULA-BARBOSA, M.M. & GRAY, E.G.** (1983a). Dendritic spine plasticity and chronic alcoholism in rats. *Neurosci. Lett.* 42, 235-238.

**TAVARES, M.A.; PAULA-BARBOSA, M.M. & GRAY, E.G.** (1983b). A morphometric Golgi analysis of the Purkinje cell dendritic tree after long-term alcohol consumption in the adult rat. *J. Neurocytol.* 12, 939-948.

**TAVARES, M.A.; PAULA-BARBOSA, M.M. & CADETE-LEITE, A.** (1986a). Morphological evidence of climbing fiber plasticity after long-term alcohol consumption. *Neurobehav. Toxicol. Teratol.* 8, 481-485.

**TAVARES, M.A.; PAULA-BARBOSA, M.M. & VOLK, B.** (1986b). Chronic alcohol consumption induces plastic changes in granule cell synaptic boutons of the rat cerebellar cortex. *J. Submicrosc. Cytol.* 18, 725-730.

**TAVARES, M.A.; PAULA-BARBOSA, M.M.; BARROCA, H. & VOLK, B.** (1985). Lipofuscin granules in cerebellar interneurons after long-term alcohol consumption in the adult rat. *Anat. Embryol.* 171, 61-69.

**TELLO, F.** (1904). Disposición macroscópica y estructura del cuerpo

geniculado externo. *Trab. Lab. Invest. Biol. Univ. Madrid* 3, 39-62.

**TEWARI, S. & NOBLE, E.P.** (1971). Ethanol and brain protein synthesis. *Brain Res.* 26, 469-474.

**TEWARI, S. & NOBLE, E.P.** (1979). Effects of ethanol on cerebral protein and ribonucleic acid synthesis. In: Majchrowicz, E.; Noble, E.P. (eds.). "Biochemistry and Pharmacology of Ethanol". Vol 1. New York and London, Plenum Press. pp. 541-548.

**TEWARI, S.; MURRAY, S. & NOBLE, P.** (1978). Studies on the effects of chronic ethanol ingestion on the properties of rat brain ribosomes. *J. Neurosci.* 3, 375-389.

**TEWARI, S.; SWEENEY, F.M. & FLEMING, E.W.** (1980). Ethanol-induced changes in properties of rat brain ribosomes. *Neurochem. Res.* 5, 1025-1035.

**TEWARI, S.; STEWART, R. & FLEMING, E.W.** (1981). Ethanol induced changes in the transpeptidation reaction on brain ribosomes. *Res. Commun. Substance Abuse* 2, 93-96.

**THADANI, P.V.; LAU, C.; SLOTKIN, T.A. & SCHANBERG, S.M.** (1977). Effects of maternal ethanol ingestion on amine uptake into synaptosomes of fetal and neonatal rat brain. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 200, 292-297.

**THOMSON, E.** (1930). Quantitative microscopic analysis. *J. Geol.* 38, 193.

**TOPEL, H.** (1988). Beta-endorphin genetics in the etiology of alcoholism. *Alcohol* 5, 159-165.

**TORVIK, A. & TORP, S.** (1986). The prevalence of alcoholic cerebellar

atrophy. A morphometric and histological study of an autopsy material. *J. Neurol. Sci.* 75, 43-51.

**TWONS, L.C.; BURTON, S.L.; KIMBERLY, C.J. & FETTERMAN, M.R.** (1982). Projections of the dorsal lateral geniculate and lateral posterior nuclei to visual cortex in the rabbit. *J. Comp. Neurol.* 210, 87-98.

**UNDERWOOD, E.E.** (1970). "Quantitative Stereology". Addison-Wesley, Reading, Mass.

**VOLK, B.** (1977). Delayed cerebellar histogenesis in the "embryofetal alcohol syndrome". *Acta Neuropath. (Ber)* 39, 157-163.

**VOLK, B.** (1984). Cerebellar histogenesis and synaptic maturation following pre- and postnatal alcohol administration. *Acta Neuropath.* 63, 57-65.

**VOLK, B. & MALETZ, J.** (1985). Nuclear inclusions following chronic ethanol administration: An electron-microscopic investigation of the rat parietal cortex. *Acta Neuropath. (Ber)* 67, 170-173.

**VOLK, B.; MALETZ, J.; TIEDMANN, M.; MALL, G.; KLEIN, C. & HERLET, H.H.** (1981). Impaired maturation of Purkinje cells in the fetal alcohol syndrome of the rat -light and electron microscopic investigations. *Acta Neuropath. (Ber)* 54, 19-30.

**VON ECONOMO, C.F. & KOSKINAS, G.N.** (1925). "Die cytoarchitektonik der hirnrinde des erwachsenen menschen". Wien U. Berlin, Springer.

**VORHEES, C.N. & FERNANDEZ, K.** (1986). Effects of short term prenatal alcohol exposure on maze activity and olfactory orientation performance. *Neurobehav. Toxicol. Teratol.* 8, 23-29.



- WALKER, D.W.; BARNES, D.E; ZORNETZER, S.F.; HUNTER, B.E. & KUBANIS, P.** (1980). Neuronal loss in hippocampus induced by prolonged ethanol consumption in rats. *Science* 209, 711-713.
- WALLER, W.H. & BARRIS, R.W.** (1937). Relationship of thalamic nuclei to the cerebral cortex in the cat. *J. Comp. Neurol.* 67, 317-339.
- WATSON, S.J.; AKIL, A.; RICHARD, C.W. & BARCHAS, J.D.** (1978). *Nature* 275, 226-228.
- WEBER, A.J.; KALIL, R.E. & HICKEY, T.L.** (1986). Genesis of interneurons in the dorsal Lateral Geniculate Nucleus of the cat. *J. Comp. Neurol.* 252, 385-391.
- WEBSTER, W.S.; WALSH, D.A.; LIPSON, A.H. & MCEWEN, S.E.** (1980). Teratogenesis after acute alcohol exposure in inbred and outbred mice. *Neurobehav. Toxicol. Teratol.* 2, 227-234.
- WEIBEL, E.R.** (1980). "Stereological Methods". Vol. 2. Theoretical Foundations. Academic Press, New York.
- WEST, J.R.** (ed.) (1986). "Alcohol and Brain development". Oxford University Press, New York.
- WEST, J.R.** (1987). Fetal alcohol-induced brain damage and the problem of determining temporal vulnerability: A review. *Alcohol Drug Res.* 7, 423-441.
- WEST, J.R.; HAMRE, K.M. & CASSELL, M.D.** (1986). Effects of ethanol exposure during the third trimester equivalent on neuron number in rat Hippocampus and Dentate Gyrus. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 10(2), 190-197.

**WIESEL, T.N.; HUBEL, D.H. & LAM, D.M.K.** (1974). Autoradiographic demonstration of ocular-dominance columns in the monkey striate cortex of transneuronal transport. *Brain Res.* 79, 273-279.

**WILLIAMS, M.A.** (1977). "Quantitative Methods in Biology". (A.M. Glauert, ed.). pp. 5-83. North-Holland Publishing Co. Amsterdam.

**WILSON, M.E. & CRAGG, B.C.** (1967). Projections from the lateral geniculate nucleus in the cat and monkey. *J. Anat.* 101, 677-692.

**WILSON, P.D. & STONE, J.** (1975). Evidence of W- cell input to the cat's visual cortex via the laminae of the lateral geniculate nucleus. *Brain Res.* 92, 472-478.

**WILSON, P.D.; ROWE, M.H. & STONE, J.** (1976). Properties of relay cells in the cat's lateral geniculate nucleus. A comparison of W- cells with X- and Y- cells. *J. Neurophysiol.* 39, 1193-1209.

**WILSON, J.R. & HENDRICKSON, A.E.** (1981). Neuronal and synaptic structure of the dorsal lateral geniculate nucleus in normal and monocularly deprived Macaca monkeys. *J. Comp. Neurol.* 197, 517-539.

**WINKLER, C. & POTTER, A.** (eds.) (1911). "An anatomical guide to experimental researches in the rabbit's brain". Verluys, Amsterdam.

**WONG-RILEY, M.T.T.** (1972). Neuronal and synaptic organization of the normal dorsal lateral geniculate nucleus of the squirrel monkey, *Saimiri sciureus*. *J. Comp. Neurol.* 144, 25-60.

**ZIVIN, J.A. & CHOI, D.W.** (1991). Stroke therapy. *Scient. Amer.* 265, 56-63.

UNIVERSIDAD DE GRANADA

1 2 MAYO 1993

COMISION DE DOCTORADO