



Departamento de Medicina

*Facultad de Medicina
Universidad Complutense*

28040 Madrid

DR. D. CARLOS PEREZAGUA CLAMAGIRAND, DIRECTOR DEL DEPARTAMENTO DE MEDICINA DE LA FACULTAD DE MEDICINA. U.C.M.

INFORMA: Que este Departamento no tiene ningún inconveniente en que Dña. Carmen Caro Narrillos, presente su Tesis Doctoral titulada: "CROMOGRAMINA EN LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER", bajo la dirección del Profesor Dr. D. Amador Schluller Pérez, para proceder a su lectura y defensa ante Tribunal y, de esta manera, poder optar al Grado de Doctor.

Lo que firmo en Madrid a trece de Julio de mil novecientos noventa y dos.

EL DIRECTOR,

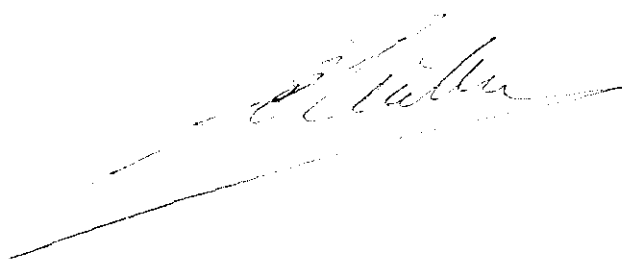


Fdo.: Prof. Dr. Carlos Perezagua Clamagirand

HAGO CONSTAR, como Director de la Tesis Doctoral realizada por D^a. CARMEN CARO NARRILLOS y titulada "Distribución de las proteínas Cromogranina A y Calbindina y de los Péptidos Somatostatina, Colecistoquinina y Sustancia P, en cerebros con Enfermedad de Alzheimer" que el trabajo efectuado lo ha sido de forma personal en todas las partes que constituyen la tesis y que revisada de forma adecuada reúne las condiciones necesarias desde el punto de vista científico para ser leída y defendida.

Madrid doce de Julio de 1992

El Director de la Tesis

A handwritten signature in dark ink, appearing to read 'A. Schüller', with a long horizontal stroke extending to the left.

Firmado : A.Schüller Pérez

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE

FACULTAD DE MEDICINA

DEPARTAMENTO DE MEDICINA

Prof. Dr. C. Perezagua Clamagirand

CROMOGRANINA EN LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER

Trabajo presentado por

CARMEN CARO NARRILLOS

para optar al Grado de Doctor.

DIRECTOR:

Prof. Dr. A. SCHÜLLER PEREZ

MADRID, Septiembre de 1992

*A Alberto pilar fundamental de esta tesis,
y a mis padres*

AGRADECIMIENTOS

Al Profesor D. AMADOR SCHÜLLER PEREZ, quién con su forma de sentir, enseñar y practicar la Medicina me sirvió de caluroso estímulo durante mis años de estudiante, e hizo que me orientase a la especialidad de Medicina Interna. Sin su apoyo incondicional y colaboración este trabajo no se habría realizado.

Al Doctor DAVID MUÑOZ, por aceptarme en su Servicio de Neuropatología del Hospital Universitario de Saskatoon (Canadá), por introducirme en el mundo de la Neuropatología y sembrar en mí la semilla de la curiosidad por lo desconocido, y por dedicarme muchas horas de su tiempo durante mi estancia en Canadá y tras mi vuelta a España.

A DEBORAH SHULL, técnico del laboratorio de Neuropatología de la Universidad de Saskatchewan, por la paciencia que demostró al enseñarme las técnicas de inmunocitoquímica.

Al Departamento de Patología del Hospital Universitario de la Universidad de Saskatchewan, por las facilidades brindadas, y en especial a R. Van den BEUKEN por la ayuda fotográfica.

Al Doctor FELIX OTERUELO, y a su esposa PILAR, por su apoyo durante mi estancia en Saskatoon.

Al Dr. JOSE LUIS OTERO PORTELA, Jefe de Servicio de Medicina Interna del Hospital Montecelo (Pontevedra), a mis compañeros del Servicio, y a la Dirección del Hospital porque posibilitaron mi ausencia para realizar este trabajo.

Al Dr. ANTONIO BLANCO, perteneciente al Servicio de Medicina Preventiva del Hospital Montecelo, por la ayuda prestada en la parte estadística.

A los Dres. AURELIO VELASCO, ROSA PARDAVILA, RAUL CASARIEGO, JOSE MARIA DE LIS y MARIA ISABEL FERNANDEZ RODRIGUEZ, por la ayuda prestada.

Al Dr. GUILLERMO RAMOS CERVIÑO, por la aguda supervisión del manuscrito.

Por último, agradecer al F.I.S.S. la Beca que me concedió para realizar este trabajo en Saskatoon (Canadá).

I N D I C E

1.- JUSTIFICACION	7
2.- INTRODUCCION A LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER	10
2.1.- Recuerdo Histórico	11
2.2.- Epidemiología	13
2.3.- Cambios microscópicos en la EA	19
2.4.- Bioquímica de las lesiones.....	23
2.5.- Patogenia	27
2.6.- Distribución de las lesiones	29
2.7.- Fisiopatología.	31
2.8.- Diagnóstico	32
3.- PEPTIDOS	36
3.1.- Somatostatina	38
3.2.- Sustancia P	41
3.3.- Colecistoquinina	42
3.4.- Cromogranina A	44
3.5.- Calbindina	47

4.-	ANATOMIA DE LA AMIGDALA Y CORTEZA ENTORRINAL	49
5.-	OBJETIVOS DE LA TESIS	68
6.-	MATERIAL Y METODOS	71
7.-	RESULTADOS	82
8.-	DISCUSION	147
9.-	CONCLUSIONES	163
10.-	BIBLIOGRAFIA	165

JUSTIFICACION

Pocas veces en la historia de la medicina reciente una oscura enfermedad ha llamado tan rápidamente la atención a los profanos y a la comunidad biomédica como la Enfermedad de Alzheimer. Este interés ha surgido de dos avances fundamentales. El primero ha sido el aumento de la expectativa de vida que se ha producido en este siglo, incrementando la porción de población que está expuesta a enfermedades degenerativas cerebrales que se presentan en edades avanzadas. El segundo ha venido dado por el desarrollo gradual de la reinterpretación de las bases patológicas de la demencia senil común.

En las próximas décadas se verán afectadas un mayor número de personas por esta enfermedad, debido no solamente al aumento de la expectativa de vida sino que también a la explosión demográfica ocurrida después de la segunda guerra mundial⁽¹⁾. Si el coste anual que generó esta enfermedad en Estados Unidos en el año 1.983 fue estimado en 18.000 dólares por paciente⁽²⁾, podemos deducir que en los próximos años el coste económico global que se generará será enorme, por no hablar del drama humano y social, y de las implicaciones que tiene esta enfermedad para los pacientes y para su entorno familiar.

La causa de esta enfermedad es desconocida y los mayores esfuerzos en investigación, actualmente, se dirigen a identificar los mecanismos patogénicos.

Se sabe que múltiples neurotransmisores se localizan en las neuritas dilatadas que acompañan a los depósitos amiloides en las placas seniles, lo cual constituye la característica patológica de la enfermedad. La demostración de una proteína ácida llamada Cromogranina A en el hipocampo humano con un patrón muy específico⁽³⁾, que intracelularmente actúa como una proteína captadora de calcio y extracelularmente como un neurotransmisor, y su gran profusión en las neuritas de las placas seniles⁽⁴⁾ en comparación con otros neurotransmisores, nos llevó a pensar que podría tener un papel importante en la Enfermedad de Alzheimer.

Dada la importancia de la amígdala y de la corteza entorrinal como lugares de conexión de fibras que van al hipocampo a través de la vía perforante y al neocortex, lugares fundamentales de

asentamiento de las lesiones en la Enfermedad de Alzheimer, es por lo que he escogido estas dos regiones para estudiar el posible papel de la Cromogranina A y su similitud o diferencia con otra proteína captadora de calcio (Calbindina) y con otros neurotransmisores (Somatostatina, Sustancia P y Colecistoquinina), en un intento de hacer una aportación al conocimiento de la Enfermedad de Alzheimer y sus posibles implicaciones etiopatogénicas, que una vez que se conozcan conducirán a impedir que la enfermedad progrese, a prevenir su aparición o a retrasar el daño y la muerte celular.

INTRODUCCION
A LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER

2.1.- RECUERDO HISTORICO

En 1.907 Alois Alzheimer describió los hallazgos clínicos y neuropatológicos en una mujer de 51 años cuyos síntomas comenzaron con pérdida de memoria y desorientación. Posteriormente presentó depresión y alucinaciones, y en menos de 5 años demencia profunda y muerte. El cerebro estaba atrofiado y la corteza cerebral contenía millares de lesiones. Utilizando el método de impregnación de plata (Bielchowsky) vió distorsión y acumulación de neurofibrillas⁽⁵⁾. Desde entonces se describieron casos con clínica similar, llegándose a decir que la esencia neuropatológica de la enfermedad estaba en la asociación de atrofia cortical generalizada con la presencia de muchas placas argirófilas y de neuronas con cambios neurofibrilares. Más tarde se describió la presencia de degeneración granulovacuolar de las células piramidales del hipocampo⁽⁶⁾ y la presencia de amiloide en las placas seniles⁽⁷⁾, postulándose que el núcleo de la placa senil consistía en un nódulo de amiloide de estructura esferocristalina, prácticamente isotrópica, que se volvía claramente birrefringente tras el tratamiento con Lugol y más aún con rojo Congo. Posteriormente se afirmó que la degeneración neurofibrilar de Alzheimer no era más que una infiltración amiloidea de las células ganglionares y que no todas las placas seniles contenían necesariamente amiloide, puesto que no todas tenían núcleo⁽⁸⁾. Otra característica de la Enfermedad de Alzheimer que se añadió fue la presencia de angiopatía cerebral amiloidea⁽⁹⁾.

Así, la Enfermedad de Alzheimer se describió como una polioencefalopatía degenerativa de etiología y patogénesis desconocida, que morfológicamente aparecía como una atrofia cortical con muchos ovillos neurofibrilares y placas seniles demostrados con tinciones de plata, con birrefringencia tras rojo Congo⁽⁸⁾ y fluorescencia tras tratamiento con tioflavina⁽¹⁰⁾. Estos cambios ocurrían en el isocortex y allocortex de ambos hemisferios y en la sustancia gris subcortical.

Hasta 1.955 en que Roth⁽¹¹⁾ demostró que los cambios mentales podrían ser debidos a enfermedades "funcionales" y "orgánicas", no empezó la era moderna del conocimiento de la Enfermedad de Alzheimer y demencia. En los años sesenta Terry⁽¹²⁾ y Kidd⁽¹³⁾ demostraron que los cambios ultraestructurales en los cerebros de ancianos con demencia tipo Alzheimer y los de la demencia presenil eran idénticos. En 1.968 Blessed⁽¹⁴⁾ publicó un estudio prospectivo en ancia-

nos, donde correlacionó el estado mental en vida con los cambios en el cerebro que detectó en la autopsia. Estos hallazgos, así como los de Terry⁽¹²⁾ llevaron al reconocimiento de la Enfermedad de Alzheimer como una entidad única, y a considerarla como un problema importante de salud pública⁽¹⁵⁾.

Si bien la Enfermedad de Alzheimer puede aparecer precozmente, alrededor de los 40 años, lo más frecuente es que haga eclosión mediada la sexta década de la vida.

Convencionalmente se aplicaba el término de Enfermedad de Alzheimer cuando los cambios ocurrían antes de los 65 años, etiquetándose de “Demencia Senil tipo Alzheimer” (DSTA) a los que se originaban después de esta edad.

Este primitivo concepto en la actualidad ha sido modificado aceptándose por la inmensa mayoría que es el proceso mórbido, y no la edad de comienzo, el que debe definir la enfermedad hablándose así de Demencia tipo Alzheimer (DTA). No faltan voces disidentes que consideran necesario matizar la Enfermedad de Alzheimer atendiendo a la edad de aparición de los síntomas en dos subtipos: Precoz y tardío⁽¹⁶⁻¹⁸⁾.

2.2.- EPIDEMIOLOGIA

La ausencia de un marcador biológico que cualifique la demencia tipo Alzheimer y la inseguridad de su diagnóstico clínico hacen difícil la investigación epidemiológica.

En personas mayores con estadios precoces los síntomas son difíciles de distinguir de los normales del envejecimiento, mientras que en estadios finales, la Enfermedad de Alzheimer puede ser confundida con otras demencias y enfermedades mentales. Por tanto, el diagnóstico clínico de Enfermedad de Alzheimer no puede confirmarse hasta que se demuestren las lesiones histológicas características, resultando por ello el diagnóstico clínico erróneo en el 10-15% de los casos⁽¹⁹⁾. Como la mayoría de los estudios epidemiológicos se basan en un diagnóstico clínico de presunción⁽²⁰⁾, y la metodología utilizada en los estudios es diferente, es difícil comparar los distintos datos existentes en diversos países, careciendo así de datos fiables sobre la incidencia y prevalencia de la demencia tipo Alzheimer⁽²¹⁾.

EPIDEMIOLOGIA DESCRIPTIVA

La epidemiología descriptiva aporta datos de la distribución de la enfermedad en tres categorías: Temporales, espaciales (diferencias geográficas) y personales (diferencia en edad y sexo). La frecuencia de la enfermedad se expresa en términos de índices epidemiológicos tales como mortalidad, prevalencia e incidencia⁽²⁰⁾.

Mortalidad

Los datos de mortalidad por Enfermedad de Alzheimer no pueden ser obtenidos de los certificados de defunción de una manera fiable, ya que la mayor parte de las veces no figura la Enfermedad de Alzheimer como causa fundamental ni última del fallecimiento. A pesar de estas limitaciones, las tasas de mortalidad por "demencia presenil y senil" en Estados Unidos, en los años 70, fueron del 1,2 por 100.000 en el grupo de edad de 60-65 años y del 11,6 en el grupo de los mayores de 85 años⁽²²⁾.

Prevalencia e incidencia

Por lo general se ha estimado que la prevalencia de la demencia severa atribuida a la Enfermedad de Alzheimer estaba entre el 1% y el 6%^(20,23-25), pero en la actualidad puede ser más elevada⁽²⁶⁾. La Enfermedad de Alzheimer es, con mucho, la mayor causa de demencia en Estados Unidos, su incidencia y prevalencia aumenta con la edad^(23,24,27-30), al menos hasta la novena década^(31,32), y en los Estados Unidos se considera que puede ser la cuarta causa de muerte⁽³³⁾.

En Canadá, en un estudio de 1.978⁽³⁴⁾, al menos 300.000 personas sufrían pérdida de las funciones cognoscitivas superiores y unas 17.000 de ellas morían cada año. La Enfermedad de Alzheimer era la demencia orgánica más frecuente de la senectud, llegando a ser el 80% de todas las demencias.

En España los datos demográficos actuales indican que el 12% de la población es mayor de 65 años, lo que supone 4,5 millones de personas⁽³⁵⁾. Este grupo de edad previsiblemente experimentará un aumento progresivo y en el próximo decenio superará los 6 millones, lo que equivale a decir que el 15% de la población española rebasará los 65 años.

En nuestro país la información epidemiológica sobre la demencia senil es limitada⁽³⁶⁻³⁸⁾. En un estudio sobre prevalencia de demencia, sin diferenciar demencia tipo Alzheimer de otros tipos de demencia, realizado en Madrid entre los años 1.960 y 1.976, se encontró una prevalencia mayor del 10% en personas que rebasaban los 65 años⁽³⁸⁾. Por un estudio basado en historias clínicas del Servicio de Neurología del Hospital 12 de Octubre en Madrid, sabemos que se diagnosticaron un 2,6% de demencias entre 1.974 y 1.979, de las cuales el 26,5% correspondían a Enfermedad de Alzheimer, alcanzando el 33,3% en el diagnóstico definitivo⁽³⁹⁾. Recientemente se han realizado otros estudios epidemiológicos en Cantabria, Aragón y Galicia, estando pendientes de confirmación diagnóstica sus conclusiones finales⁽⁴⁰⁾. Asumiendo que la prevalencia de demencia senil en España es similar a la de otros países occidentales (1,5-6,5%), actualmente existirían unos 150.000 a 200.000 pacientes con posible Enfermedad de Alzheimer⁽⁴¹⁾.

La incidencia de la Enfermedad de Alzheimer está alrededor del 0,1% en las edades comprendidas entre los 60 y 65 años, incrementándose hasta el 47% en la población mayor de 85 años⁽⁴²⁾.

En resumen: Podemos concluir que la edad es el mayor condicionante de la prevalencia de la DTA, que ésta es baja antes de los 60 años (menor de 20 casos por 100.000 habitantes) y se eleva de forma exponencial a partir de dicha edad, superando el 20% a partir de los 80 años. La incidencia de DTA también aumenta de forma exponencial con la edad.

EPIDEMIOLOGIA ANALITICA

La epidemiología analítica estudia fundamentalmente los factores de riesgo con el fin de establecer hipótesis de las causas de la enfermedad.

Factores de riesgo

a) EDAD: La edad avanzada es el único factor claro de riesgo. Es bien notoria la asociación entre Enfermedad de Alzheimer y envejecimiento. La prevalencia de la Enfermedad de Alzheimer se duplica cada 4,5 años.

b) FACTORES GENETICOS: Se postularon al encontrarse que entre un 10% y un 15%⁽⁴³⁾ de los pacientes con Enfermedad de Alzheimer tenían antecedentes familiares de haber padecido demencia, esta asociación aumenta al 40% según otros autores⁽²⁰⁾. La mayoría de los estudios muestran un mayor riesgo de padecer demencia entre los familiares de pacientes con Enfermedad de Alzheimer cuando ésta comienza antes de los 70 años^(44,45). En hermanos gemelos de enfermos, en los que los síntomas aparecieron antes de los 70 años y en los que se comprobó histológicamente la alteración, el riesgo de sufrir la enfermedad fue del 45% a los 84 años, y solo un 10% de estos presentaron síntomas antes de los 70 años⁽⁴⁶⁾. La aparente mayor incidencia de demencia en parientes de enfermos con enfermedad precoz, podría ser debida a que los parientes de los pacientes con enfermedad tardía morirían antes de desarrollar la enfermedad⁽⁴⁷⁾. Otros⁽⁴⁸⁾, han encontrado el mismo riesgo de padecer la enfermedad para los parientes de enfermos, independientemente de que sean jóvenes o mayores. Así, se llegó a pensar que un porcentaje de pacientes con Enfermedad de Alzheimer tendrían la enfermedad debido a un gen transmitido de forma auto-

sómica dominante con penetrancia dependiente de la edad⁽⁴⁸⁾, mientras que otros con muchos miembros afectados serían indistinguibles clínicamente y de causa no genética.

Recientemente se ha encontrado una mutación del gen de la proteína precursora del amiloide en dos parientes que sufrían Enfermedad de Alzheimer familiar^(49,50).

c) SÍNDROME DE DOWN Y EDAD DE LOS PADRES: Algunos autores han descrito mayor asociación entre Enfermedad de Alzheimer y Síndrome de Down⁽⁴⁴⁾, aunque otros no lo han confirmado⁽²⁰⁾.

La gran incidencia de cambios neuropatológicos semejantes a los de la Enfermedad de Alzheimer en pacientes con Síndrome de Down fallecidos después de los 40 años, llevó a considerar que un gen en el cromosoma 21 podría estar relacionado con la patogénesis de la Enfermedad de Alzheimer. Estudios con marcadores de DNA⁽⁵¹⁾ han indicado que aunque el gen para la Enfermedad de Alzheimer familiar está en el cromosoma 21, no está localizado en la región 21q22 asociada con el síndrome de Down.

Basándose en el mayor riesgo de padecer Síndrome de Down con el incremento de la edad materna, algunos han investigado la edad de la madre al nacimiento del hijo como posible factor de riesgo de Enfermedad de Alzheimer, señalándose un incremento de la edad materna en los pacientes con Enfermedad de Alzheimer versus controles^(45,52-54). También se ha investigado la edad del padre y el orden de nacimiento con relación a los hermanos, no aportando datos concluyentes.

d) SEXO: La Enfermedad de Alzheimer es más frecuente entre mujeres⁽²⁰⁾. En diferentes series predominaba en el sexo femenino a razón de 2 mujeres/1 hombre⁽⁵⁵⁾.

e) ANTECEDENTES DE TRAUMATISMO CRANEAL: En la encefalopatía de los boxeadores (traumatismo craneal repetido) o demencia pugilística, se han descrito lesiones semejantes a los ovillos neurofibrilares de la Enfermedad de Alzheimer⁽⁵⁶⁾. El mecanismo por el cual el traumatismo puede contribuir al desarrollo de estos ovillos es incierto, habiéndose supuesto que los traumatismos reiterados ocasionarían la ruptura de la barrera hematoencefálica, desencadenándose respuestas inmunes contra el componente neurofibrilar de la célula nerviosa⁽⁵⁷⁾. Así, mientras que para unos autores el traumatismo craneal sería un factor de riesgo, puesto que encontraron que el antecedente de traumatismo craneoencefálico severo era cuatro veces más

frecuente en las personas con Enfermedad de Alzheimer que en los controles⁽⁵⁸⁾, en cambio para otros no habría una asociación convincente entre el traumatismo craneal y la Enfermedad de Alzheimer⁽⁴⁵⁾.

f) ALTERACIONES TIROIDEAS: Se describió la asociación entre enfermedad tiroidea y Enfermedad de Alzheimer⁽⁴⁶⁾, no comprobándose este extremo en otros estudios⁽⁴⁵⁾.

g) NEUROTOXINAS: Basándose en los hallazgos de un incremento de aluminio en los cerebros de los pacientes con Enfermedad de Alzheimer y de la capacidad de las sales de aluminio para inducir ovillos neurofibrilares y déficits cognoscitivos en especies susceptibles, se dijo que el aluminio estaba implicado en la Demencia tipo Alzheimer^(59,60). Hoy en día los investigadores están de acuerdo en que la concentración de aluminio en el cerebro se incrementa durante el envejecimiento normal^(61,62). Teniendo en cuenta la edad, un grupo canadiense encontró un incremento adicional de aluminio en los cerebros de las personas que padecían la Enfermedad de Alzheimer⁽⁶¹⁾, que no fue corroborado por investigadores de Kentucky⁽⁶²⁾. La explicación que se dió a esta discrepancia fue que en Canadá se utilizaba el aluminio para procesar el agua y, por lo tanto, se produciría una acumulación secundaria de aluminio en los cerebros de los pacientes con Enfermedad de Alzheimer que hubiesen estado expuestos al aluminio del agua de bebida⁽⁶³⁾. Sin embargo, no hay evidencia que fuentes exógenas de aluminio, tales como antiácidos de aluminio, antitranspirantes o incluso las grandes cantidades utilizadas en la diálisis renal, incrementen el riesgo de padecer la Enfermedad de Alzheimer⁽⁶³⁾. Por otra parte, hay ahora la evidencia que el aluminio está presente en los ovillos neurofibrilares de la Enfermedad de Alzheimer⁽⁶⁴⁾, si bien se ha comunicado que los ovillos neurofibrilares inducidos por el aluminio son diferentes de los encontrados en la Enfermedad de Alzheimer⁽⁶⁵⁾.

Otro neurotóxico implicado ha sido el calcio. Como en la Enfermedad de Alzheimer hay una alteración en la homeostasis del calcio más acusada que la que aparece en el envejecimiento normal⁽⁶⁶⁾, y se ha encontrado un aumento del calcio unido a los fibroblastos de la piel de estos pacientes, es por lo que se pensó que el calcio podría jugar algún papel en la enfermedad.

h) DEFECTOS ENZIMATICOS: Se pensó que la muerte neuronal podría ser debida a una alteración de las enzimas que intervienen en la síntesis proteica, lo que conduciría a un error metabólico y muerte celular. La anomalía podría ser un defecto enzimático estructural o una

influencia indirecta de la cantidad de Zn disponible. Puesto que el Zn forma parte de todas o de la mayoría de las enzimas que intervienen en la replicación del DNA, una incapacidad, en relación con la edad, para incorporar Zn a las enzimas sintetizadas podría conducir a una cascada de errores que conducirían a un caos metabólico y muerte celular⁽⁶⁷⁾.

i) AGENTES INFECCIOSOS: La demostración de transmisibilidad del Creutzfeldt-Jacob y el Kuru hizo pensar en la posibilidad de que otras demencias estuvieran relacionadas con infecciones virales, sugiriéndose el posible papel etiológico del herpes simple⁽⁶⁸⁾, pero todos los intentos en encontrar un agente transmisible han fallado.

j) EDUCACION: La relación de la Enfermedad de Alzheimer con el nivel de educación es controvertida. Así, en un estudio reciente se ha señalado que la prevalencia de demencia es mayor en las personas sin educación o con un bajo nivel educativo⁽⁶⁹⁾, mientras que en otro estudio posterior no se observó diferencia⁽⁷⁰⁾.

k) En casos esporádicos de DTA se ha visto una asociación con el alotipo C4B2 del complemento, así como falta de asociación con otros marcadores del Complejo Mayor de Histocompatibilidad, sugiriendo que el C4B2 podría estar implicado directamente en la patogénesis, aumentando la susceptibilidad al daño producido por un agente primario⁽⁷¹⁾.

l) Otros factores de riesgo señalados, como consumo de tabaco⁽⁵⁸⁾, alcohol⁽⁵⁸⁾, intervenciones quirúrgicas, anestesia, etc. no han presentado ninguna asociación sustancial y constante con la Enfermedad de Alzheimer.

2.3.- CAMBIOS MICROSCOPICOS EN LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER

Las dos lesiones neuronales principales que sirven de diagnóstico en la Enfermedad de Alzheimer son los ovillos neurofibrilares intracelulares y las placas seniles extracelulares. Otros cambios, también característicos, de esta enfermedad son: Angiopatía congofílica, degeneración granulovacuolar, cuerpos de Hirano y pérdida neuronal.

I.- OVILLOS NEUROFIBRILARES: Están formados por una masa de fibrillas entrelazadas, no rodeadas por membrana. Ocupan preferentemente el citoplasma perinuclear del cuerpo neuronal, adquiriendo forma de llama en las neuronas corticales y de ovillo en las neuronas subcorticales. Se tiñen intensamente por los métodos de plata (tinciones de Bielchowski, Bodian, etc.). Con microscopio electrónico se ha visto que los ovillos están formados por fibras que presentan constricciones periódicas cada 80 nm⁽⁷²⁾. Estas fibrillas se componen de dos filamentos entrelazados en una doble hélice y no se encuentran en las neuronas normales⁽⁷³⁾. En cortes longitudinales miden 20-22 nm en el punto más ancho y 10 nm en el estrecho⁽⁷²⁾. En cortes transversales tienen 15-20 nm de ancho⁽⁷²⁾. Estas fibras, que son el punto clave ultraestructural de la demencia tipo Alzheimer, han recibido el nombre de filamentos pareados helicoidales (PHF). Los ovillos neurofibrilares persisten tras la muerte de la neurona que los contiene, apareciendo libres en el neuropilo como "ovillos lápida" (tombstone tangles).

Los ovillos neurofibrilares pueden encontrarse en viejos normales y en otras demencias, incluyendo el complejo Parkinson-demencia de Guam, Parkinson/Esclerosis Lateral Amiotrófica, demencia pugilística, Parkinson postencefálico y en algunos casos de panencefalitis esclerosante subaguda.

II.-PLACAS SENILES: En los cortes histológicos aparecen como zonas circulares de disrupción del neuropilo, con un diámetro de 50 a 150 nm⁽⁷⁴⁾, visualizándose bien con tioflavina S o con tin-

ciones de plata. Las placas seniles, en su forma madura, están constituidas por una corona de neuritas anormales rodeando a un núcleo central que contiene amiloide^(12,73,75) y material inorgánico, tal como silicato de aluminio, y por células.

NEURITAS ANORMALES: Son procesos neuronales no mielinizados (axones y dendritas), moderadamente distendidos, que contienen filamentos pareados helicoidales⁽⁷⁶⁾, numerosos lisosomas y cuerpos densos que son mitocondrias degeneradas e indican degeneración de la neurita, en relación con lesión proximal de la neurona⁽⁷⁷⁾. En las neuritas anormales de las placas seniles predominan los axones⁽⁷⁸⁾. La presencia de axones y dendritas son la demostración de la existencia de una gran abundancia de conexiones sinápticas. Además de las neuritas organizadas en grupos que forman las placas seniles, hay otro grupo de neuritas, llamadas fibras rizadas o filamentos del neuropilo (curly fibers or neuropil threads), que aparecen como procesos elongados esparcidos por el neuropilo^(79,80).

AMILOIDE: Esta sustancia se demuestra por la tinción de Rojo Congo en luz visible y tras polarización o bien con tioflavina S en microscopia ultravioleta. En microscopia electrónica aparece como acúmulos desordenados de fibrillas cortas, semejando un haz de heno, siendo indistinguible por su apariencia de otras formas de amiloide fuera del sistema nervioso central, sea amiloide A como amiloide L.

CELULAS: Algunas células de la placa contienen fibrillas de amiloide rodeado por una membrana y, menos frecuentemente, aparecen células que contienen grandes cantidades de amiloide no rodeado por una membrana⁽⁷²⁾. Además, frecuentemente hay astrocitos, microglía y macrófagos⁽⁸¹⁾. El macrófago es rico en ribosomas y contiene varias clases de inclusiones lipídicas, la mayoría de las cuales parecen lipofucsina, pero algunas son laminadas, lo que sugiere la presencia de fosfolípidos⁽⁷²⁾.

La combinación de dos de los tres constituyentes principales de la placa senil es lo que determinó en microscopia óptica tres clases de placas⁽⁷²⁾. Posteriormente, la microscopia electrónica aportó más información hasta entonces no visible con la citada microscopia óptica. La clase más frecuente de las placas seniles era la placa clásica, típica o madura, constituida por un

núcleo central de amiloide rodeado de una corona de neuritas anormales⁽⁷²⁾. La placa primitiva o inmadura es llamada así porque con el microscopio óptico se ven acúmulos de neuritas anormales, no demostrándose amiloide con las tinciones mencionadas anteriormente, pero con el microscopio electrónico se hace patente que tienen vestigios de amiloide entre las neuritas⁽⁷²⁾. La placa amorfa o amiloidea se ve de forma esporádica y está compuesta exclusivamente de un núcleo grande de amiloide, e incluso en microscopia electrónica apenas son evidentes las neuritas o las células⁽⁷²⁾.

Recientemente se ha descrito otro tipo de placa en la que se observan depósitos amorfos de proteína beta-amiloide en forma no fibrilar ("preamiloide"), a la que se denominó "PLACA DIFUSA". Estos depósitos granulares se han encontrado en la corteza cerebral y en otras regiones cerebrales en las que no hay neuritas anormales ni células gliales reactivas, las cuales están rodeando al amiloide en las placas clásicas⁽⁸²⁻⁸⁴⁾. Estas placas difusas, que no son detectadas con las tinciones convencionales para el amiloide (Rojo Congo y tioflavina), de hecho son mucho más abundantes que las placas clásicas y parece que afectan grandes áreas de la corteza cerebral.

Más recientemente se ha encontrado un nuevo tipo de lesión, en la que los agregados de neuritas anormales están centrados por un ovillo neurofibrilar extracelular en vez de por depósitos de amiloide. Esta nueva lesión ha sido denominada "OVILLO NEUROFIBRILAR ASOCIADO A CONGLOMERADOS NEURITICOS (TANCs)"⁽⁸⁵⁾.

III.-ANGIOPATIA CONGOFILICA: Se denomina así a la presencia de depósitos de amiloide en la capa media de las pequeñas arterias y arteriolas de la corteza cerebral y de las meninges que la cubren. Se demuestra con la tinción de rojo Congo, de ahí su nombre. La angiopatía congofílica, en enfermos con o sin Enfermedad de Alzheimer, se asocia a hemorragias localizadas en la periferia del cerebro, preferentemente en los lóbulos occipitales lo que contrasta con las hemorragias hipertensivas que se localizan en los ganglios basales.

IV.-DEGENERACION GRANULOVACUOLAR: Es un cambio citoplásmico de numerosas neuronas del hipocampo y la amígdala en la Enfermedad de Alzheimer. El citoplasma presenta una o

múltiples vacuolas esféricas de 3 a 5 micras de diámetro, centradas por un gránulo, que con el microscopio electrónico aparece como un material denso amorfo.

V.-CUERPOS DE HIRANO: Son estructuras ovoideas, intensamente eosinofílicas, de subestructura estriada, situadas en el neurópilo hipocampal, indentando con frecuencia los somas neuronales. Tienen forma de aguja de 30 micras de longitud. Con microscopio electrónico se ve que están formadas por fibrillas paralelas con aspecto laminar⁽⁸⁶⁾.

VI.-PERDIDA NEURONAL: En la Enfermedad de Alzheimer hay una pérdida neuronal en el hipocampo, particularmente en el sector CA1 y en el prosúbiculo. También, en la corteza, se ha demostrado una desaparición de alrededor del 30 % de las neuronas, afectando principalmente a las medianas y grandes⁽⁸⁷⁾.

Recientemente, en la Enfermedad de Alzheimer, se ha encontrado una pérdida marcada de sinapsis en el neocortex de asociación⁽⁸⁸⁻⁹⁰⁾.

2.4.- BIOQUIMICA DE LAS LESIONES DE LA EA

El estudio de la composición bioquímica de las células y de las lesiones morfológicas se realiza con técnicas de inmunocitoquímica e hibridación *in situ*.

El citoesqueleto de las neuronas tiene una importancia especial, ya que mantiene la forma celular y compartimentaliza los diversos elementos de la matriz citoplasmática. También está implicado en la translocación de los constituyentes intracelulares. El citoesqueleto está compuesto por tres elementos: Filamentos intermedios (neurofilamentos), microtúbulos y microfilamentos⁽⁹¹⁾. Los dos últimos son comunes a todas las células nucleadas, mientras que las proteínas que constituyen los neurofilamentos son específicas del tipo celular. Estos tres tipos de filamentos son cuantitativamente importantes en las neuronas, estando organizados de forma característica en los axones, donde representan la vía lenta del flujo axoplásmico⁽⁹¹⁾. Los neurofilamentos están constituidos por tres proteínas distintas (NFP). Los microtúbulos tienen un núcleo de tubulina y varias proteínas asociadas, destacando dos de alto peso molecular, MAP 1 y MAP 2, y un grupo de fosfoproteínas de 50.000 a 70.000 daltons, a las que colectivamente se les denomina tau. Los microfilamentos están compuestos básicamente de actina, con un gran número de proteínas asociadas.

OVILLOS NEUROFIBRILARES

Con técnicas de bioquímica se vio que los constituyentes de los ovillos neurofibrilares, los filamentos pareados helicoidales, son insolubles en todos los solventes ordinarios de proteínas y resistentes a la proteólisis⁽⁹²⁾, lo que explica el por qué los ovillos persisten en el tejido tras la muerte de la neurona que los contiene. Además, permitió aislar filamentos pareados helicoidales y preparar anticuerpos contra los mismos, los cuales decoran selectivamente los ovillos y ciertas neuritas en las placas, pero no el amiloide de estas últimas. Bioquímicamente la composición de los filamentos pareados helicoidales es distinta de la del amiloide de las placas⁽⁹³⁾. Posteriormente, en los ovillos neurofibrilares se encontraron componentes del citoesqueleto neuronal: Proteí-

nas de neurofilamentos⁽⁹⁴⁾ y las proteínas asociadas a microtúbulos MAP 2⁽⁹⁵⁾ y tau⁽⁹⁶⁾. Esta última es el componente de los ovillos neurofibrilares cuantitativamente más importante. Todos los componentes del citoesqueleto neuronal están anormalmente fosforilados en los ovillos neurofibrilares. Mientras que normalmente la forma fosforilada de estas proteínas se localiza exclusivamente en el axón, en la Enfermedad de Alzheimer⁽⁹⁴⁾ se produce una dislocación de proteínas fosforiladas al soma neuronal. Otros componentes de los ovillos son el péptido ubiquitina⁽⁹⁷⁾ y la proteína A68 definida por el anticuerpo ALZ 50⁽⁹⁸⁾. Los anticuerpos anti tau⁽⁹⁹⁾ y ALZ 50 han demostrado una lesión característica de la Enfermedad de Alzheimer, consistente en un sinnúmero de procesos finos anormales, extendidos por todo el neurópilo cortical. La gran cantidad de estos procesos explicaría el que las proteínas anormales pudieran encontrarse en el líquido cefalorraquídeo de la Enfermedad de Alzheimer y no en otras demencias.

PLACAS SENILES

A nivel bioquímico deben considerarse tres aspectos en las placas seniles. El primero es la presencia de filamentos pareados helicoidales en ciertas neuritas⁽⁷⁷⁾. El segundo es el amiloide y el tercero los neurotransmisores.

Para los filamentos pareados helicoidales sirve lo anteriormente dicho sobre ellos al describir los ovillos neurofibrilares.

El amiloide de las placas seniles está constituido por una proteína de 4.000 daltons, de aproximadamente 40 aminoácidos, denominada proteína beta-amiloide o A4, la cual por un proceso proteolítico deriva de una mucho mayor, la proteína precursora del beta-amiloide (PreA4), situada normalmente en la membrana de neuronas y otras células⁽¹⁰⁰⁾, siendo posible que sea la proteína central de un proteoglicano⁽¹⁰¹⁾. El gen que codifica la PreA4 está localizado en el cromosoma 21^(100,102,103). En la actualidad se han determinado cuatro RNA mensajeros que codifican otras tantas proteínas precursoras, formadas por 695, 714, 751 y 770 aminoácidos respectivamente^(100,104,105). Las tres últimas contienen un inhibidor de proteasas tipo Kunitz, no sabiéndose como actúa éste en el proceso proteolítico que lleva a la formación del amiloide⁽¹⁰⁶⁾.

El amiloide de las placas seniles además de A4 contiene alfa 1 antitripsina⁽¹⁰⁷⁾, que es un inhibidor de proteasas sintetizado en el hígado y que circula por la sangre. Por último, el amiloide de las placas seniles está asociado a glicosaminoglicanos ácidos, los cuales no están completamente identificados⁽¹⁰⁸⁾. La composición química del amiloide de las placas seniles es distinta a otras formas de amiloide en el organismo, pero es igual al de los vasos en la angiopatía congofilica^(109,110).

Actualmente ha quedado demostrado que el gen del amiloide no es el gen de la forma familiar de la Enfermedad de Alzheimer y ésta no parece estar relacionada con la sobreproducción de la proteína precursora del amiloide⁽¹¹¹⁾.

La cantidad de amiloide detectado por medio de los estudios inmunocitoquímicos es mayor que la detectada por métodos tradicionales^(82,112). Por ejemplo se ha visto que en el cerebelo, que carece de placas, hay depósitos abundantes de A4.

En las neuritas distendidas de un pequeño número de placas seniles se han identificado neurotransmisores (acetilcolina, GABA y noradrenalina) y neuropéptidos⁽¹¹³⁾ (somatostatina, sustancia P, colecistoquinina, neurotensina y VIP), indicando que las neuronas que contienen diversos sistemas neurotransmisores contribuyen a la formación de placas seniles. El péptido modulador cromogranina A ha sido identificado recientemente como el primer marcador universal de neuritas en placas seniles⁽¹¹⁴⁾.

La nueva lesión llamada "Ovillo neurofibrilar asociado a conglomerados neuríticos (TANCs)", difiere de las placas seniles en que en su centro no hay un depósito amorfo de amiloide sino haces de filamentos rectos con forma de un ovillo neurofibrilar. Por otra parte, a diferencia de la presencia universal de beta/A4 en el centro de las placas, muchas de estas nuevas lesiones no están asociadas con este péptido⁽⁸⁵⁾, sino que son inmunoreactivas para epítopes de filamentos pareados helicoidales. Por el contrario, las neuritas de estas lesiones se asemejan a las placas seniles, en que ambas presentan neuritas inmunoreactivas para Cromogranina A⁽⁴⁾ y ubiquitina⁽¹¹⁵⁾ con un patrón granular y neuritas decoradas por anticuerpos para tau y ubiquitina con un patrón compacto o lineal^(116,117).

CUERPOS DE HIRANO

Están compuestos de actina y varias proteínas ligadas a la actina, entre las que se encuentra la tropomiosina.

DEGENERACION GRANULOVACUOLAR

Los gránulos contienen tubulina, principal proteína de los microtúbulos⁽¹¹⁸⁾, así como ubiquitina, la cual interviene normalmente en el catabolismo de las proteínas.

2.5.- PATOGENIA

Aunque en la actualidad no hay una teoría unificada sobre los mecanismos patogénicos de la Enfermedad de Alzheimer, varios hallazgos recientes refuerzan, todavía más, la teoría en que el amiloide tiene un papel fundamental en la patogenia de la Enfermedad de Alzheimer. Estos hallazgos han demostrado que la proteína beta amiloide tiene un efecto tóxico en vivo⁽¹¹⁹⁾ y en cultivos⁽¹²⁰⁻¹²³⁾ de neuronas maduras de regiones cerebrales típicamente afectadas en la Enfermedad de Alzheimer, mientras que por el contrario puede ser un factor neurotrófico en cultivos de neuronas inmaduras^(120,124). De esta manera, se ha propuesto una sucesión de acontecimientos^(81,125).

El primer paso que se produciría sería el depósito de diversos fragmentos del precursor de la betaproteína (PreA4) en el neurópilo y en las paredes de las arteriolas meningeas y corticales^(102,126,127). El principal fragmento sería la proteína beta-amiloide o A4, la cual se deposita en el neurópilo de dos formas. En la primera, se deposita en forma de infiltrados más o menos esféricos en el neurópilo cortical y subcortical, entre las neuronas morfológicamente normales y las células gliales, sin alterar su posición ni su forma. En cambio, los depósitos similares subpiales y subependimarios presentan una forma elongada. Estos depósitos han recibido el nombre de placa difusa y su componente pre-amiloide^(112,128-130). En la segunda, la betaproteína se deposita en forma de fibrillas entre las neuritas, con o sin un núcleo central inconfundible, recibiendo el nombre de placa clásica. La mejor evidencia en cuanto a que la placa difusa es anterior en el desarrollo a la placa clásica, la dan los estudios sobre el Síndrome de Down, habiéndose visto que las placas clásicas aparecen años después de la edad en la que se detectan las placas difusas^(83,84). Ambos tipos de placas están presentes simultáneamente en la corteza cerebral de los pacientes con Enfermedad de Alzheimer, pero en ciertas regiones, como el cerebelo o el neocórtex, las placas primitivas nunca desarrollan placas clásicas⁽¹³¹⁾. Aunque no han sido identificados los factores responsables de este cambio, el amiloide de las placas clásicas está asociado con dos constituyentes, posiblemente relevantes para su formación. El primero es el inhibidor de proteasas alfa 1

antiquimiotripsina⁽¹⁰⁷⁾ y el segundo los proteoglicanos o los glicosaminoglicanos⁽¹⁰⁸⁾. Estos últimos posiblemente sean los más importantes en la transformación de preamiloide en amiloide⁽¹³²⁾.

El segundo paso que se produciría sería la dilatación de las neuritas (dendritas o axones neuronales)^(133,134), con lo que se añade el elemento neurítico a las placas seniles, así como otros efectos no tan bien conocidos.

El tercer paso sería la formación de filamentos pareados helicoidales en algunas neuritas de las placas seniles⁽⁷³⁾, en el cuerpo celular de las neuronas piramidales (los ovillos neurofibrilares de la neuropatología clásica) y en las dendritas (descritos como fibras del neurópilo⁽¹³⁵⁾. Basándose de nuevo en la evidencia obtenida en el Síndrome de Down, se ha visto que la aparición de las neuritas dilatadas y los filamentos pareados helicoidales en las placas seniles es posterior al depósito de amiloide⁽⁸⁴⁾. Por otra parte, parece que la acumulación de transmisores en las neuritas precede a la formación de filamentos pareados helicoidales en las mismas⁽¹³⁶⁾.

Con respecto al desarrollo de ovillos neurofibrilares y a la muerte neuronal hay una correlación topográfica, siendo la corteza entorrinal la mejor representación, en la que se ve que los ovillos neurofibrilares y la muerte neuronal afectan a las mismas poblaciones neuronales en un patrón ordenado en capas⁽¹³⁷⁾. Sin embargo, esto no descarta que otras neuronas mueran sin haber desarrollado ovillos neurofibrilares.

La razón por la que se forman los ovillos neurofibrilares con su peculiar ultraestructura de filamentos pareados helicoidales es desconocida, pero una teoría actual⁽¹³⁸⁻¹⁴¹⁾ postula que las excitotoxinas tienen un papel en la formación de filamentos pareados helicoidales y en la muerte neuronal. Esta teoría se basa en los siguientes extremos: Primero, el glutamato y el aspartato inducen, en cultivos de neuronas humanas, la formación de estructuras fielmente parecidas a los filamentos pareados helicoidales⁽¹⁴²⁾. Segundo, la aplicación de glutamato agonistas al cortex cerebral es seguida por la degeneración de neuronas colinérgicas en el núcleo basal en la rata⁽¹⁴³⁾. Tercero, se cree que el aminoácido excitatorio beta-N-metilamino-L-alanina (BMAA), derivado de la planta cycad, es la causa del complejo demencia de Guam-Parkinson y esclerosis lateral amiotrófica⁽¹⁴⁴⁾. Estas dos enfermedades en las que hay una innegable evidencia de una causa ambiental, están asociadas con la formación de numerosos ovillos neurofibrilares en áreas corticales y subcorticales, los cuales son indistinguibles de los que se ven en la Enfermedad de Alzheimer.

2.6.- DISTRIBUCION DE LAS LESIONES

Las lesiones de la Enfermedad de Alzheimer predominan en la corteza cerebral, donde se han estudiado preferentemente, pero también afectan a otras zonas del cerebro. Así, los ovillos neurofibrilares se han encontrado en los núcleos subcorticales de proyección a corteza^(145,146); núcleo basal de Meynert (colinérgico), núcleos del rafe (serotoninérgico), y locus coeruleus (noradrenérgico). En cambio, las placas seniles aparecen en regiones a donde proyecta la corteza⁽¹⁴⁷⁾; hipotálamo, neocórtex y cuerpos mamilares. La corteza no está afectada de forma homogénea, sufriendo el mayor impacto el hipocampo, la corteza entorrinal y la amígdala. Los ovillos neurofibrilares son particularmente numerosos en las neuronas de las capas II, III y IV de la corteza entorrinal^(137,148,149). Estas neuronas reciben diversas aferencias y dan lugar a los axones de la vía perforante, la cual es la principal aferencia del hipocampo⁽¹⁵⁰⁻¹⁵²⁾. En el giro dentado del hipocampo, la zona donde termina la vía perforante está selectivamente afectada por placas seniles, lo que concuerda con la opinión de que las placas seniles están formadas por la porción terminal de los axones de las neuronas que contienen ovillos neurofibrilares⁽¹⁵³⁾. El subiculum, que se encuentra más medial en el giro hipocámpal, y la zona adyacente CA1 del hipocampo, cuyas neuronas presentan también considerables ovillos neurofibrilares⁽¹⁴⁹⁾, dan lugar a la principal eferencia del hipocampo^(154,155). En base a que las zonas más severamente dañadas del hipocampo son aquellas que reciben o dan lugar a las aferencias o eferencias principales^(137,149), es por lo que se ha denominado "demencia hipocámpal"⁽¹⁵⁶⁾. La pérdida neuronal es notable en esas regiones del hipocampo y parahipocampo más afectadas por los ovillos y las placas seniles^(137,148,157,158).

En el neocórtex las lesiones no están distribuidas al azar, existiendo una predilección por las regiones de asociación de la corteza temporal y parietal, por cuanto los ovillos neurofibrilares y las placas seniles raramente aparecen en las áreas primarias motoras y sensoriales^(147,159-162). Esta predilección tiene una concomitancia fisiológica que puede ser puesta de manifiesto con la tomografía de emisión de positrones, revelando una disminución de la utilización de glucosa en las regiones de asociación, que contrasta con la disminución relativamente escasa en las áreas motoras y sensoriales primarias⁽¹⁶³⁻¹⁶⁵⁾. El sistema olfatorio representa aparentemente una excep-

ción a la escasa afectación de las áreas motoras y sensoriales primarias, habiéndose descubierto placas seniles y ovillos neurofibrilares en la corteza prepiriforme así como en el núcleo olfatorio anterior⁽¹⁶⁶⁻¹⁶⁸⁾. Recientemente se ha descubierto que las neuronas olfatorias de primer orden contienen ovillos neurofibrilares. Estas neuronas, situadas en la mucosa olfatoria, tienen la peculiaridad de reproducirse continuamente durante la vida adulta, ofreciendo la posibilidad de cultivo *in vitro*⁽¹⁶⁹⁾. Además de esta distribución regional hay una distribución laminar de ovillos neurofibrilares y de placas seniles. Los ovillos neurofibrilares están en su mayor parte restringidos a las neuronas piramidales de las capas III y V^(147,161), el origen de muchas, por no decir todas, las fibras eferentes neocorticales. Los axones de esas capas se proyectan hacia adelante, yendo a otras regiones de asociación, o hacia atrás retroalimentando los orígenes de las aferencias corticales o subcorticales^(147,161). La presencia de los ovillos neurofibrilares en esas capas probablemente produzca la afectación de alguna de estas conexiones⁽¹⁴⁷⁾. La distribución laminar de las placas es más difusa que la de los ovillos neurofibrilares, lo que apoya la opinión que las porciones distales de los axones, los cuales terminan en muchas capas corticales, constituyen un factor principal en la formación de la placa senil⁽¹⁴⁷⁾.

Los ovillos neurofibrilares asociados a conglomerados neuríticos son abundantes en el hipocampo de los pacientes con Enfermedad de Alzheimer y en el núcleo basal de Meynert, en cambio son escasos en neocortex y prácticamente están ausentes en la corteza entorrinal⁽⁸⁵⁾.

La degeneración granulovacuolar y los cuerpos de Hirano normalmente están restringidos a las neuronas piramidales del hipocampo⁽⁸¹⁾.

2.7.- FISIOPATOLOGIA

Poco se conoce a cerca de la fisiopatología de la Enfermedad de Alzheimer. En algunos estudios, la densidad de ovillos neurofibrilares o de placas se ha correlacionado con la presencia^(170,171) o la severidad^(14,147,172,173) de la demencia. También se ha correlacionado la severidad de la demencia con la pérdida de sinapsis^(89,90). La pérdida neuronal se ha correlacionado con la pérdida de memoria, postulándose que la destrucción de grupos específicos celulares podrían desconectar el hipocampo^(149,174). Por ejemplo: En el lóbulo temporal las células afectadas en la corteza entorrinal (capas II y IV) y en el hipocampo (CA1 y el subículo) son aquellas que o bien retransmiten mensajes de otras áreas de control al hipocampo o bien son la fuente principal de los mensajes de salida⁽⁶³⁾. De esta manera, con la afectación de unas pocas células se produciría la desconexión del hipocampo⁽¹⁷⁴⁾. Los cambios de la personalidad y las alteraciones emocionales pueden producirse por lesiones en el sistema límbico (amígdala⁽¹⁷⁵⁾, hipocampo⁽¹⁵⁶⁾, y el núcleo anterior olfatorio⁽¹⁷⁶⁾) o en el área prefrontal. Las lesiones frontotemporales⁽¹⁷⁷⁾ probablemente explican el empobrecimiento emocional, la apatía, el deterioro de la personalidad, la pérdida de control de esfínteres y la alteración del habla. Las lesiones que afectan a las conexiones recíprocas entre el lóbulo frontal y temporal⁽¹⁷⁸⁾ posiblemente expliquen la apraxia, la agnosia la desorientación espacial y la agrafia.

2.8.- DIAGNOSTICO

La enfermedad de Alzheimer se define actualmente como una entidad clínico-patológica, cuyo rasgo clínico fundamental es el deterioro intelectual o demencia. Las lesiones neuropatológicas características como ya hemos visto son: Placas seniles, ovillos neurofibrilares, degeneración gránulovacuolar y angiopatía congofílica.

El diagnóstico clínico de la Enfermedad de Alzheimer se hace por exclusión, debido a la inexistencia de un marcador biológico; siendo el diagnóstico definitivo el realizado unicamente por la histopatología. Aunque ninguna de las lesiones neuropatológicas características halladas en la Enfermedad de Alzheimer son patognomónicas, su presencia elevada y combinada, especialmente en el sistema límbico o la porción basal del lóbulo frontal, permiten un diagnóstico seguro.

DIAGNOSTICO CLINICO:

Desde el punto de vista clínico la Enfermedad de Alzheimer es una demencia de instauración lenta y progresiva que suele iniciarse despues de los 40 años, dividiéndose su curso evolutivo en tres estadios. El tiempo de evolución total oscila entre 1 y 20 años. La causa de muerte generalmente, más que a la enfermedad en sí, es debida a las complicaciones derivadas del encamamiento prolongado en las fases avanzadas de la enfermedad.

Las primeras manifestaciones de la enfermedad se caracterizan por déficit de memoria ante hechos recientes, pérdida de iniciativa y desinterés por las actividades habituales. En un segundo estadio a las alteraciones de la memoria se unen los del lenguaje con defectos en la evocación nominal y desorientación temporo-espacial progresiva. Tambien puede aparecer apraxia. En el tercer y último estadio hay afectación global y severa de todas las áreas cognoscitivas, lo que lleva a una total incapacidad y dependencia. La evolución de la enfermedad no siempre es homogénea. La presencia de mioclonias y semiología extrapiramidal se ha relacionado con una mayor severidad y progresión de la demencia, así como la presencia de afasia⁽¹⁷⁹⁾.

Para hacer el diagnóstico de probable Enfermedad de Alzheimer, el clínico debe servirse de exámenes físicos, neurológicos, psiquiátricos (incluyendo test mentales) y exploraciones complementarias. La fiabilidad de los criterios clínicos oscila entre el 85 y el 90%⁽¹⁸⁰⁾.

El National Institute of Neurological and Communicative Disorders and Stroke (NINCDS-Work Group) elaboró unos criterios diagnósticos diferenciando entre casos probables, posibles y definitivos⁽¹⁸¹⁾. El diagnóstico definitivo de Enfermedad de Alzheimer requiere el criterio clínico de "probable" más la evidencia histopatológica obtenida por autopsia.

Entre los exámenes complementarios que podemos realizar están:

1.- **EEG:** Puede ser normal en los primeros estadios de la enfermedad o mostrar una lentificación de la actividad de fondo, lentificación del ritmo alfa (7 Hz), asimetrías y anomalías focales⁽¹⁸²⁾. Algunos de estos hallazgos pueden encontrarse en personas sanas de la misma edad, por lo que su utilidad queda relegada a poder descartar otros procesos.

2.- **Potenciales Evocados:** Los llamados potenciales evocados tardíos o endógenos son los que más se han aplicado al estudio de la Enfermedad de Alzheimer, entre ellos el P300⁽¹⁸²⁾ que parece mostrar un aumento de la latencia significativamente mayor que en controles.

3.- **Tomografía axial computerizada (TAC):** Su principal interés reside en descartar otras lesiones estructurales. Se han propuesto índices lineales y volumétricos del tamaño ventricular para correlacionar el grado de atrofia con controles de la misma edad.

4.- **Resonancia magnética nuclear (RMN):** Su aportación en el caso de la Enfermedad de Alzheimer es mínimo.

5.- **Tomografía por emisión de positrones (PET):** Esta técnica permite valorar el flujo sanguíneo cerebral y el metabolismo local de oxígeno, así como el metabolismo local de la glu-

cosa. En la Enfermedad de Alzheimer se ha visto que el 27% de los pacientes tienen disminución de la glucosa en el lóbulo parieto-temporal⁽¹⁸¹⁾. Otra técnica para medir el flujo sanguíneo cerebral es la Tomografía Computerizada de Emisión de Fotones (SPECT), aunque no es tan precisa como la anterior su realización presenta menos dificultades técnicas⁽¹⁸³⁾. Estudios recientes, señalan que la sensibilidad de la SPECT en el diagnóstico de la Enfermedad de Alzheimer es del 88%, con una especificidad del 87%⁽¹⁸⁴⁾.

6.- Marcadores biológicos: En algunos estudios se han encontrado alteraciones colinérgicas (disminución de la acetilcolinesterasa en el líquido cefalorraquídeo)⁽¹⁸⁵⁾, monoaminérgicas (se han encontrado alteraciones en los niveles de noradrenalina, dopamina y serotonina así como de sus metabolitos) y peptidérgicas (la más constante es la disminución de somatostatina en el líquido cefalorraquídeo⁽¹⁸⁶⁾ y el aumento de GH como respuesta al test de GHRH⁽¹⁸⁷⁾). También se han encontrado proteínas anormales en el cerebro de pacientes con Enfermedad de Alzheimer, como la proteína A68 que es reconocida por un anticuerpo monoclonal Alz-50⁽¹⁸⁸⁾.

En la actualidad numerosos grupos de investigadores trabajan para encontrar un marcador periférico que permita el diagnóstico de la EA.

DIAGNOSTICO HISTOPATOLOGICO:

Para el diagnóstico definitivo histológico de EA se han postulado criterios microscópicos mínimos (en un campo de 1 mm² y con ampliación de 200 aumentos)⁽¹⁸⁹⁾, ya que las lesiones pueden encontrarse también en cerebros de ancianos no dementes.

Criterios histológicos para el diagnóstico de EA

Múltiples muestras de S.N.C. para el examen microscópico

1. Neocortex (lóbulos frontal, temporal y parietal)
2. Otras regiones (amígdala, formación hipocampal, ganglio basal, sustancia nigra, cortex cerebelar, médula espinal)

En neocortex, en 1 mm cuadrado de tejido y magnificación de 200 aumentos

1. En pacientes de menos de 50 años, el nº de placas y ovillos deben exceder de 2 a 5 / campo.
 2. En pacientes entre 50 y 65 años, por lo menos 8 placas/campo.
 3. En pacientes entre 66 y 76 años, por lo menos 10 placas/campo.
 4. En pacientes mayores de 75 años, más de 15 placas/campo.
-

Estos criterios patológicos cuantitativos son edad dependiente y reflejan que la aparición de algunas placas corticales seniles pueden formar parte del envejecimiento normal. Para Crystal⁽¹⁹⁰⁾ y Wilkock⁽¹⁷²⁾ la presencia de numerosas placas seniles pueden asociarse con pérdida de memoria y menos claramente con demencia, mientras que la asociación entre ovillos neurofibrilares corticales y demencia es convincente, indicando que la presencia de 3 ovillos neurofibrilares/mm² de corteza se asocia siempre con demencia.

Existe una correlación entre el deterioro intelectual y el grado de formación de las placas. En los muy dementes se encontró fusión de placas y fibrillas argirófilas muy difusas, así como tendencia a la distribución a lo largo de todo el espesor de la corteza, mientras que en los menos dementes estaban localizadas en el hipocampo.

PEPTIDOS

Los péptidos son compuestos formados por la unión de dos o más aminoácidos. En los últimos años se han detectado un gran número de ellos en el Sistema Nervioso Central, muchos de los cuales habían sido inicialmente descubiertos en tejidos no neuronales.

La localización de los péptidos varía a lo largo del Sistema Nervioso Central. Algunos están en los cuerpos celulares de múltiples áreas con sistemas de proyección corto, actuando como neurotransmisores (por ejemplo: Somatostatina, Colecistiquinina, Sustancia P, Péptido Intestinal Vasoactivo, Enkefalina, Neurotensina y TRH). Otros están en células localizadas en un área del sistema nervioso central (por ejemplo: Arginina-Vasopresina, Oxitocina, Angiotensina y LHRH). Algunos péptidos, como la Colecistoquinina y el Péptido Intestinal Vasoactivo, tienen las concentraciones más altas en áreas corticales, mientras que otros las tienen en el hipotálamo.

Los estudios post-mortem de los tejidos del cerebro humano han revelado que puede existir una asociación entre ciertas enfermedades neurológicas o psiquiátricas y las alteraciones en algunos neurotransmisores y sus enzimas⁽¹⁹¹⁻¹⁹³⁾. Por otra parte, hay una gran evidencia de que los péptidos del Sistema Nervioso Central juegan un papel en la fisiología del cerebro normal⁽¹⁹⁴⁾. Así, es posible que las alteraciones de la concentración o de la distribución de estos péptidos pueden contribuir a enfermedades del Sistema Nervioso Central⁽¹⁹⁵⁾.

El descubrimiento de contactos sinápticos entre neuritas de placas seniles⁽⁷³⁾ llevó a buscar neurotransmisores en las placas y a la demostración de varias enzimas sintetizadoras de transmisores, incluyendo los que afectan a la síntesis de acetilcolina, catecolaminas y ácido gamma-amino-butírico (GABA).

Con el descubrimiento de acetilcolinesterasa (AChE) en las placas de pacientes con Enfermedad de Alzheimer, se enunció que al menos algunas neuritas de las placas ricas en AChE podrían representar terminales de axones degenerados derivados de neuronas del sistema colinérgico^(196,197). Posteriormente se demostró que las neuritas de las placas derivan de neuronas colinérgicas, somatostatinérgicas, catecolaminérgicas y gabaérgicas⁽¹⁹⁷⁻²⁰¹⁾ y más tarde se demostró que también derivaban de neuronas con Sustancia P, Neurotensina, Colecistoquinina, Leucina Enkefalina y Polipéptido Intestinal Vasoactivo⁽¹¹³⁾.

A continuación se hace una descripción de los péptidos relacionados con esta Tesis: Somatostatina, Sustancia P, Colecistoquinina, Cromogranina A y Calbindina. Las cuatro primeras están presentes en vesículas, mientras que la última está en el citoplasma.

3.1.- SOMATOSTATINA (Som):

A principios de la década de los 70 fue aislado en el hipotálamo ovino un tetradecapéptido que inhibía la secreción de la hormona del crecimiento por la hipófisis anterior⁽²⁰²⁾, al que se dió el nombre de hormona inhibidora de la secreción de la hormona del crecimiento y más tarde Somatostatina (Somatostatina-14). Posteriormente se encontró Somatostatina en otros órganos, entre ellos, páncreas, estómago, corazón, ojos, tiroides, timo, etc.. Además, se identificaron otras formas moleculares de Somatostatina, tales como la Somatostatina-28 y su fragmento dodecapéptido, la Somatostatina 28 (1-12)^(203,204). La Somatostatina-28 en su cadena carboxi-terminal contiene toda la secuencia de la Somatostatina-14, mientras que la Somatostatina-28 (1-12) está formada por la cadena N-terminal. También fue posible identificar la estructura de un péptido de 116 aminoácidos, al que se le denominó Prosomatostatina^(205,206).

Los estudios inmunohistoquímicos⁽²⁰⁷⁻²¹⁰⁾ y bioquímicos^(203,204) han sugerido que: 1) La Somatostatina-28, la Somatostatina 28 (1-12) y la Somatostatina-14 derivan de un precursor, la Prosomatostatina. 2) Los tres péptidos derivados de la Prosomatostatina están presentes en las mismas poblaciones neuronales. 3) La Somatostatina-28 predomina en las cuerpos celulares, donde es dividida y transportada a los terminales y dendritas distales como Somatostatina-14 y Somatostatina 28 (1-12).

La Somatostatina está ampliamente distribuida en el sistema nervioso, tanto central como periférico. En el cerebro tiene una distribución generalizada⁽²¹¹⁻²¹³⁾, pero con diferentes concentraciones. Así, mientras en el hipotálamo y en muchas partes del sistema límbico, como la amígdala y el hipocampo, las concentraciones de Somatostatina son muy altas, en el sistema extrapiramidal y en la corteza cerebral su concentración es intermedia, y en el bulbo olfatorio y cerebelo apenas existe. En el contexto de esta Tesis, cabe resaltar la presencia de Somatostatina en las neu-

ronas de la corteza temporal, corteza entorrinal y corteza frontal, muchas de las cuales también contienen GABA.

Las neuronas que contienen Somatostatina pueden clasificarse en base a su estructura anatómica y función en tres grupos: Interneuronas cortas, neuronas de proyección a una única región anatómica, y neuronas que conectan regiones distantes en el cerebro⁽²¹⁴⁾.

Las neuronas cortas, normalmente implicadas en circuitos locales y en la integración de información aferente, están fundamentalmente en el neocortex y en el hipocampo. En la corteza, las células, a menudo, se localizan en las capas II y III, así como en las capas profundas⁽²⁰⁸⁾. Sin embargo parece haber una localización específica en las diferentes partes de la corteza, por ejemplo en la corteza frontal medial las células con Somatostatina están principalmente en las capas profundas, viéndose menos en las capas II y III⁽²¹⁵⁾. Las células son con frecuencia bipolares, estando su eje orientado perpendicularmente a la superficie del cerebro. También, la sustancia blanca subcortical presenta algunas fibras conteniendo Somatostatina⁽²¹⁶⁾.

Las neuronas de proyección a una única región anatómica o neuronas de proyección local, están representadas por el sistema tuberoinfundibular (sistema hipotalámico). También se han descrito conexiones intrahipotalámicas⁽²¹⁷⁾ e intra-amigdalinas^(218,219).

Las neuronas que conectan regiones distantes en el cerebro son vías neuronales de proyección larga. Se han descrito vías descendentes desde la amígdala al núcleo reticular de la médula oblongata⁽²²⁰⁾ y retrogradamente desde el núcleo central de la amígdala al núcleo del tracto solitario⁽²²¹⁾.

En algunas neuronas, la Somatostatina se encuentra con otros neurotransmisores, tales como Neuropéptido Y, GABA o Tiroxina hidroxilasa⁽²²²⁾. Las neuronas que contienen Somatostatina y Neuropéptido Y tienen una distribución regional, por ejemplo en el hipotálamo hay numerosas neuronas que contienen uno u otro péptido y sin embargo no se encuentran neuronas que contengan conjuntamente los dos péptidos⁽²²³⁾. También se ha localizado acetilcolinesterasa en neuronas corticales que contienen Somatostatina, sugiriendo que estas neuronas pueden recibir aferencias colinérgicas y que una degeneración primaria de la neurona con Somatostatina puede producir una degeneración retrógrada de neuronas colinérgicas del núcleo basalis de Meynert⁽²²⁴⁾.

De acuerdo con el concepto clásico de neurotransmisión, cuando un impulso nervioso despolariza el terminal nervioso, induce un flujo de calcio que produce la liberación del neurotransmisor⁽²²⁵⁾. La dependencia iónica de la liberación de Somatostatina ha sido muy estudiada en el hipotálamo⁽²²⁶⁾, indicando que la concentración de calcio era importante para la liberación de Somatostatina; el principal canal de calcio implicado en la liberación era el canal de calcio voltaje-dependiente y no se necesitaba magnesio ni cloro para la liberación de Somatostatina.

La liberación de Somatostatina está influenciada por algunos neurotransmisores (Péptido Intestinal Vasoactivo, Sustancia P, CRF y GABA) en el hipotálamo y en la corteza⁽²²⁷⁻²²⁹⁾, por hormonas (la hormona del crecimiento estimula la liberación de Somatostatina en el hipotálamo^(230,231)), por la glucosa^(232,233) (la disminución de glucosa in vitro estimula la liberación hipotalámica de Somatostatina) y por sí misma⁽²³⁴⁾.

Las acciones de la Somatostatina en el cerebro están mediadas por receptores, cuya presencia es muy importante en las regiones corticales y límbicas.

Los receptores mantienen en toda la corteza un patrón topográfico caracterizado por densidades intermedias en las capas externas (I-IV) y muy altas en las capas profundas (V-VI)^(235,236).

En cuanto al hipocampo, los estratos medios del area CA1 (fundamentalmente el piramidal en el hombre y el radiatum en la rata) y el area dentada, en particular su lámina molecular, son los que tienen mayor densidad de receptores de Somatostatina. El subículo hipocampal también es moderadamente rico en receptores, mientras que el area CA3 muestra densidades más bajas⁽²³⁶⁾. En algunos de los núcleos de la amígdala también existen niveles altos de receptores de la Somatostatina.

En general, al considerar la distribución de la Somatostatina en las diferentes regiones del cerebro se ha observado que existe una buena correlación entre los niveles del péptido y el de los receptores. Sin embargo, en las regiones donde hay mayores concentraciones de Somatostatina, tales como el hipotálamo medio basal y las capas externas de la corteza, la densidad de receptores es bastante baja.

La Somatostatina además de inhibir la liberación de la hormona del crecimiento, también inhibe la liberación de insulina y glucagón⁽²³⁷⁾, de gastrina⁽²³⁸⁾, y de un gran número de péptidos reguladores. Otra acción que tiene es la de bloquear la secreción de ácido gástrico⁽²³⁸⁾. El meca-

nismo de acción intracelular se desconoce, pero se piensa que éste puede que tenga relación con el flujo de calcio, suprimiendo la producción de adenosinmonofosfato cíclico intracelular y estimulando la permeabilidad al potasio^(239,240). Los efectos sobre el Sistema Nervioso Central son difíciles de evaluar al coexistir la Somatostatina con otros neurotransmisores, lo que da lugar al fenómeno de cotransmisión. Varios estudios han determinado que la Somatostatina es capaz de disminuir la capacidad motora⁽²⁴¹⁾ y de producir apnea o temblores⁽²⁴²⁾. Recientemente se ha implicado a la Somatostatina en enfermedades hipofisiarias y cerebrales. Los niveles de Somatostatina en el líquido cefalorraquídeo están disminuidos en la Enfermedad de Alzheimer, Parkinson, esclerosis múltiple y en la depresión. En la corteza de los cerebros de pacientes con Enfermedad de Alzheimer la inmunorreactividad similar a la de la Somatostatina se ha encontrado disminuida con respecto a los controles sanos^(243,244).

3.2.- SUSTANCIA P (SP):

Hace ya más de medio siglo que se demostró la presencia de una sustancia en extractos de cerebro y de intestino equino, a la que se denominó Sustancia P, que causaba la contracción del músculo liso e hipotensión⁽²⁴⁵⁾. Hubo que esperar cuatro décadas para que el principio activo fuera purificado⁽²⁴⁶⁾ y se determinase la secuencia de sus once aminoácidos⁽²⁴⁷⁾. Por medio de métodos de radioinmunoensayo⁽²⁴⁸⁾ y de técnicas de inmunohistoquímica⁽²⁴⁹⁾ se ha conseguido saber que la Sustancia P está ampliamente distribuida en el cerebro y que ésta ocurre de una manera desigual. Por ejemplo en la corteza cerebral, el allocortex (uncus, corteza entorrinal, hipocampo y cingulada) tiende a tener niveles más altos que el neocortex⁽²⁵⁰⁾. En la corteza las fibras que presentan inmunorreactividad para la Sustancia P son abundantes⁽²⁵¹⁾, así como los cuerpos celulares, principalmente los que se encuentran en la capa VI⁽²⁵²⁾. En la amígdala se encontró Sustancia P en todos los núcleos, presentando los niveles más altos el núcleo medial⁽²⁵³⁾ y en éste los niveles fueron más altos que en cualquier otra región del cerebro examinada en estudios anteriores^(254,255), exceptuando la sustancia nigra. En la rata se ha encontrado inmunorreacti-

dad para la Sustancia P en las vesículas sinápticas de las terminaciones nerviosas de la médula espinal⁽²⁵⁶⁾.

No se conocen exactamente las funciones de la Sustancia P, pero se sabe: 1) que en las neuronas de la sustancia nigra ejerce algún efecto excitatorio⁽²⁵⁷⁾, 2) que las aplicaciones locales de Sustancia P al grupo de células que contienen catecolaminas tienen un efecto excitatorio^(257,258), 3) que el número de catecolaminas se incrementa después de la infusión intraventricular de Sustancia P⁽²⁵⁹⁾, 4) que las inyecciones intracerebrales de Sustancia P tienen un efecto excitatorio sobre las células de Betz⁽²⁶⁰⁾ Y 5) que la Sustancia P protege contra la neurotoxicidad de la proteína beta amiloide^(119,120). Por radioinmunoensayo se detectó que en la médula espinal de la rata la liberación de Sustancia P era calcio dependiente⁽²⁶¹⁾. Las alteraciones de la Sustancia P pueden estar asociadas con algunas enfermedades del Sistema Nervioso Central, entre las que se encuentran la Corea de Huntington y el Parkinson^(262,263). En la Enfermedad de Alzheimer, los niveles de la Sustancia P no se han visto afectados por el intervalo que transcurre entre la muerte y la práctica de la autopsia⁽²⁶⁴⁾, ni tampoco por la edad del paciente⁽²⁵⁰⁾. En la corteza de cerebros con Enfermedad de Alzheimer la inmunorreactividad similar a la de la Sustancia P está disminuida⁽²⁶⁵⁾, oscilando la disminución entre el 32% y 57% con respecto a los controles sanos⁽²⁶⁶⁾.

3.3.- COLECISTOQUININA (CCK):

Es un péptido compuesto por 33 aminoácidos, que clásicamente se relacionó con el sistema gastrointestinal, pero que posteriormente fue identificado en el Sistema Nervioso Central. En el cerebro, el octapéptido carboxiterminal (CCK-8) parece ser el elemento activo^(267,268), siendo su secuencia terminal de cinco aminoácidos igual que la de la gastrina, lo que hace difícil distinguir entre la presencia de una o de la otra en el sistema nervioso por métodos inmunoquímicos⁽²⁶⁹⁾.

Los estudios bioquímicos han demostrado que las células que contienen CCK-8 están distribuidas por todo el Sistema Nervioso Central, presentando las concentraciones más altas en la corteza cerebral, el sistema límbico y las áreas extrapiramidales del cerebro⁽²⁷⁰⁾. En la corteza cere-

bral la mayoría de las células que presentan inmunorreactividad para la Colecistoquinina se encuentran en las capas II y III^(269,271,272). En el hipocampo de la rata, la Colecistoquinina está en las interneuronas que se encuentran dispersas por todo el sector CA4 y el giro dentado⁽²⁷³⁾.

La acción fisiológica de la Colecistoquinina en el intestino es excitadora, actuando como un potente activador de la digestión, estimulando la motilidad intestinal, la secreción pancreática y las contracciones de la vesícula biliar. La Colecistoquinina también ha sido implicada en la regulación de la función reproductora en la mujer^(274,275), en la regulación de la hormona luteinizante (LH)⁽²⁷⁶⁻²⁷⁸⁾, y en la liberación de la hormona liberadora de LH (LHRH)⁽²⁷⁹⁾. Por último, se ha llegado a considerar que la Colecistoquinina actuaría como un neurotransmisor basándose en: 1) la localización de la Colecistoquinina en la vesículas sinápticas⁽²⁶⁷⁾, 2) su liberación calcio dependiente⁽²⁶⁷⁾, y 3) su potente acción excitadora sobre las neuronas corticales⁽²⁸⁰⁾.

Los hallazgos de inmunorreactividad de Colecistoquinina en los cerebros con Enfermedad de Alzheimer son por el momento controvertidos. Así, para unos autores en las áreas 4 y 17 de Brodmann había una disminución de la inmunorreactividad⁽²⁸¹⁾, mientras que otros no encontraron tal disminución⁽²⁸²⁾. En el giro temporal medio para unos⁽²⁸³⁾ fue normal y para otros había una disminución⁽²⁸¹⁾, mientras que en el giro temporal superior en ambos trabajos^(281,283) se encontró que la inmunoreactividad era normal. En el hipocampo, corteza cingulada y corteza motora primaria los niveles de Colecistoquinina fueron normales^(281,283). En extractos acuosos de corteza entorrinal (área 28 de Brodmann), la inmunorreactividad estaba disminuida en un 70% si los estudios se practicaban antes de que transcurrieran 22 horas después de la muerte, mientras que si se practicaban más tarde la disminución era menor⁽²⁸⁴⁾. Las diferencias encontradas en los trabajos mencionados pueden deberse al retraso en practicar los estudios postmortem, ya que podría ser que algunas formas moleculares de Colecistoquinina en la Enfermedad de Alzheimer fuesen inestables postmortem, pudiendo producirse una hidrólisis anormal de Colecistoquinina o la "elaboración" de un precursor de Colecistoquinina⁽²⁸⁴⁾.

3.4.- CROMOGRANINA A (CgA):

Inicialmente se aplicó el término Cromogranina a todas las proteínas solubles liberadas de los gránulos cromafines después de haber sido estimulada la médula adrenal⁽²⁸⁵⁾, hoy día se utiliza para denominar a una familia de glicoproteínas estables al calor, altamente ácidas, que presentan niveles altos de ácido glutámico⁽²⁸⁶⁻²⁸⁸⁾.

La primera en descubrirse fue la Cromogranina A al ser liberada de las vesículas de las células cromafines de la médula adrenal bovina, tras estimulación nerviosa de esta última⁽²⁸⁹⁾. Más tarde fue purificada^(288,290), encontrándose que era una proteína específica altamente ácida de aproximadamente 75 kilodalton (Kd) de peso molecular. La segunda que se detectó en la médula adrenal bovina fue una proteína mucho más grande (100 Kd), a la que se denominó Cromogranina B⁽²⁹¹⁾ o Secretogranina I. Más recientemente se identificó otra proteína ácida en los gránulos secretores de la hipófisis⁽²⁹²⁾, con un peso molecular intermedio (84 Kd), encontrándose posteriormente también en la médula adrenal bovina. Esta última recibió el nombre de Cromogranina C⁽²⁹³⁾ o Secretogranina II⁽²⁹⁴⁾.

Mientras que la Cromogranina A es el principal componente de los gránulos cromafines bovinos, la Cromogranina B es la que predomina en los gránulos cromafines del hombre y de la rata^(291,294,295).

En la médula adrenal las Cromograninas y las catecolaminas son secretadas juntas por exocitosis, desconociéndose la función que tienen. Estas proteínas no están solamente en los gránulos cromafines de la médula adrenal, ni exclusivamente relacionadas con la secreción de catecolaminas, sino que también están presentes selectivamente en los gránulos secretores de las células neuroendocrinas (peptidérgicas), pero en cambio no están en las células exocrinas^(294,296-299). Por añadidura, se ha demostrado la presencia de Cromograninas en neuronas simpáticas periféricas⁽³⁰⁰⁻³⁰²⁾ y en los terminales nerviosos colinérgicos del músculo esquelético⁽³⁰³⁾.

El término Cromogranina A engloba a una preproteína de un peso molecular aparente de 68-87 Kd, así como varios péptidos más pequeños con peso molecular mayor de 20 Kd^(300,304-306), derivados de la anterior probablemente por medio de varios procesos post-translacionales, entre los que se incluyen la fosforilización, la glicosidación cap-

tadora de O₂, y la proteólisis. La preproteína y estos péptidos más pequeños son detectados por inmunotinción en los gránulos cromafines y solamente a algunos de éstos se les ha puesto nombre (betagraninas)^(307,308). La Cromogranina A representa del 40 al 50% del total de las proteínas solubles de la médula adrenal⁽³⁰⁹⁾. Recientemente se ha descubierto la secuencia del DNAc de la Cromogranina A bovina^(310,311), porcina⁽³¹²⁾, de la rata⁽³⁰⁸⁾, y del hombre^(313,314). También ha sido localizado en el cromosoma 14 el gen de la Cromogranina A en el hombre⁽³¹⁵⁾. El DNAc ha permitido deducir la cadena polipeptídica no modificada de la Cromogranina A en el hombre, encontrándose que ésta tiene un peso molecular de solamente 48-50 Kd y que es altamente hidrofílica en toda su longitud. La Precromogranina A se sintetiza en la hipófisis, el cerebro, paratiroides y médula adrenal, encontrándose en más abundancia el RNA mensajero en paratiroides, seguido por la médula adrenal, la hipófisis y el cerebro⁽³¹¹⁾. La liberación de Cromogranina A por las células de la médula adrenal producida en respuesta a la estimulación colinérgica nicotínica es calcio dependiente. Junto a ella también se liberan (Met)encefalina y catecolaminas⁽³¹⁶⁾. La Cromogranina A liberada en cultivos tras estimulación de células de la médula adrenal es transformada, por medio de la acción de enzimas producidas por las mismas células, en péptidos que inhiben específicamente en estas células la secreción de catecolaminas inducida por nicotina⁽³¹⁷⁾. La presencia de Cromogranina A en el Sistema Nervioso Central bovino y ovino ha sido demostrada por métodos inmunoquímicos^(287,302,318) y su distribución fue estudiada por métodos inmunohistoquímicos⁽³¹⁸⁾. Estos últimos demostraron una amplia distribución, pero con un patrón de inmunotinción neuronal altamente selectivo, distinto a los de cualquier neurotransmisor conocido.

Las investigaciones en humanos se han limitado a las células neuroendocrinas⁽³¹⁴⁾. El LK2H10 es un anticuerpo monoclonal de la rata de la clase IgG1, producido contra el feocromocitoma en el hombre, que reconoce la Cromogranina A del hombre con un peso molecular de 68 Kd y los péptidos más pequeños derivados de ella^(309,319,320). Utilizando este anticuerpo, un estudio reciente desarrolló un método con el que demostró inmunorreactividad similar a la de la Cromogranina A en el cerebro del hombre, demostrándose además que la inmunorreactividad de la Cro-

mogranina es destruida por el metanol y la parafina⁽³²¹⁾, razón por la cual en otro estudio llevado a cabo en la rata no se había encontrado inmunorreactividad en el Sistema Nervioso Central, en la hipófisis posterior, ni en los nervios periféricos⁽³⁰⁹⁾. El patrón de tinción intraneuronal de la inmunorreactividad similar a la de la Cromogranina A fue semejante al de los péptidos neurotransmisores, correspondiendo la inmunoreactividad al aparato de Golgi y al núcleo denso de las vesículas sinápticas grandes, tal como muestran los estudios llevados a cabo en animales^(318,322). Esta inmunorreactividad para Cromogranina está ampliamente distribuida en el cerebro del hombre, igual que en los cerebros ovino y bovino, pero es más abundante que cualquier otro péptido neurotransmisor conocido, con la posible excepción del factor de liberación de corticotropina⁽³²³⁾. El patrón de tinción en la corteza cerebral del hombre está dominado por la intensa inmunorreactividad del neurópilo, al que se añaden las neuronas con inmunorreactividad para la Cromogranina A⁽³²¹⁾, lo que contrasta con las escasas fibras esparcidas entre las neuronas descritas en el cerebro ovino⁽³¹⁸⁾.

En el cerebro bovino la inmunorreactividad para la Cromogranina A tiene una amplia distribución en diversas regiones, siendo máxima en el neocortex y mínima en el cerebelo, médula oblongata, y médula espinal. Sin embargo, el cerebro tiene mil veces menos inmunorreactividad que la médula adrenal⁽²⁸⁷⁾.

Recientemente se demostró inmunorreactividad para Cromogranina A en el citoplasma perinuclear de las células piramidales del sector CA2 del hipocampo en el hombre⁽³⁾. La distribución de la inmunorreactividad para la Cromogranina en el hipocampo mostró una llamativa semejanza con el patrón de resistencia selectiva del daño cerebral epiléptico, donde típicamente hay un patrón de daño neuronal hipocampal caracterizado por destrucción de las neuronas piramidales de los sectores CA1 y CA3, respetando el sector CA2 y la capa celular granular del giro dentado.

La función de la Cromogranina A en el cerebro y en la periferia es totalmente desconocida. Sin embargo, para la periferia se han propuesto varias funciones posibles: 1) Las cargas negativas de las Cromograninas de alta densidad pueden estar involucradas en el almacenamiento de catecolaminas y péptidos en los gránulos secretorios^(294,324). 2) La Cromogranina A podría inhibir reversiblemente⁽³¹⁴⁾ el proceso proteolítico de la proencefalina y la hormona adrenocorticotropa por medio de una serina proteasa asociada a membrana (IRCM-serina proteasa 1, enzima aislada

en la hipófisis), y por lo tanto podría influenciar qué clase del péptido sería secretado. 3) La Cromogranina A puede actuar extracelularmente como modulador hormonal.

El hallazgo de que la Cromogranina A es una proteína captadora de calcio es importante no solamente por el papel esencial del calcio en la regulación del metabolismo celular y la exocitosis^(325,326), sino que también lo es, por el interés que presentan las proteínas captadoras de calcio selectivamente expresadas en subtipos neuronales (por ejemplo la Calbindina), como determinantes de susceptibilidad o resistencia a ciertas lesiones, entre las que están incluidas el daño cerebral epiléptico^(327,328), y la Enfermedad de Alzheimer⁽³²⁹⁾.

La Cromogranina es el precursor de la pancreastatina, una hormona que inhibe la liberación de la glucosa inducida por la insulina, así como la secreción de Somatostatina en el páncreas perfundido de la rata^(308,310-312,314,330-332).

Por último, la concentración de Cromogranina en sangre está elevada en una gran variedad de tumores neuroendocrinos^(333,334).

Finalmente, y como se ha mencionado anteriormente, la Cromogranina A ha sido identificada como el primer marcador sináptico universal de neuritas en las placas seniles de la Enfermedad de Alzheimer⁽¹¹⁴⁾.

3.5.- CALBINDINA (CaBP):

Es una proteína vitamina D dependiente ligadora de calcio, de 28 Kd de peso molecular, que fue descubierta en el duodeno de pollo⁽³³⁵⁾, donde está relacionada con la regulación de la absorción de calcio mediada por la vitamina D. Posteriormente se identificó en el riñón^(336,337), cerebro^(338,339), hueso⁽³⁴⁰⁾, páncreas⁽³⁴¹⁾, y en los dientes⁽³⁴²⁾. La Calbindina hallada en el cerebro, a la que recientemente se le ha redenominado Calbindina D28K⁽³⁴³⁾, es inmunológica y quimiofisiológicamente similar a la proteína ligadora de calcio vitamina D dependiente de otros tejidos. Esta proteína se encuentra ampliamente distribuida en el cerebro^(344,345). En la amígdala y en la corteza entorrinal de la rata se detectaron neuronas y fibras teñidas con Calbindina⁽³⁴⁶⁾. En los diferentes tipos neuronales los estudios inmunohistoquímicos han revelado un desigual conte-

nido de Calbindina, por ejemplo, tienen un alto contenido de Calbindina las células de Purkinge del cerebelo, las neuronas del giro dentado y del sector CA1 del hipocampo^(339,345), las neuronas del núcleo basal de Meynert⁽³⁴⁷⁾, y las interneuronas de la corteza cerebral (capas II-III y V-VI)⁽³⁴⁸⁾, mientras que en otras células existe poca o ninguna Calbindina.

La función de la Calbindina no se conoce, aunque se piensa que intracelularmente puede actuar como tampón (buffer) del ión calcio cuando la concentración de éste es superior en más de diez veces a la que existe en condiciones normales⁽³³⁹⁾. Este aumento incontrolado del calcio funciona como un tóxico potente, produciendo una activación de proteasas y la muerte celular⁽³⁴⁹⁾. En el neocortex de cerebros con la Enfermedad de Alzheimer existe una disminución de niveles de Calbindina⁽³⁵⁰⁾. Esta disminución no es exclusiva de la Enfermedad de Alzheimer, ya que también se han encontrado disminución de niveles de Calbindina en la corea de Huntington, la enfermedad de Pick, la atrofia cerebral severa y en la demencia de la diálisis, lo que indica que la disminución de la Calbindina ocurre en las encefalopatías difusas⁽³⁵⁰⁾. En la corteza prefrontal de cerebros con la Enfermedad de Alzheimer, se ha encontrado una disminución de la inmunorreactividad para la Calbindina en las células piramidales en la capa IIIb-c, las cuales contenían bajas concentraciones de Calbindina en los controles normales, mientras que en las interneuronas de las capas II-IIIa, que en los mismos controles contenían grandes cantidades, no se encontró una disminución significativa en el número o en la intensidad de la tinción, lo que ha llevado a pensar que las altas concentraciones citoplásmicas de proteínas ligadoras de calcio pueden jugar un papel protector en el desarrollo de la Enfermedad de Alzheimer⁽³⁵¹⁾.

**ANATOMIA DE LA AMIGDALA
Y DE LA CORTEZA ENTORRINAL**

AMIGDALA

La amígdala recibe este nombre porque su forma general se parece a una almendra. Está situada en la porción dorsomedial del polo temporal del cerebro, formando las paredes ventral, superior y medial del extremo ventral del asta inferior del ventrículo lateral. En su región superior se continúa, en parte, con el borde inferomedial del antemuro o claustro. Está separada de forma incompleta del putamen y globus pallidus por fibras de la cápsula externa y la sustancia gris subestriada, y está en estrecho contacto con la cintilla óptica. La amígdala es en parte profunda a la circunvolución semilunar, el gyrus ambiens y el uncus; zonas de transición la conectan con la sustancia perforada anterior, corteza prepiriforme y circunvolución del hipocampo. Caudalmente está relacionada íntimamente con la porción ventral del hipocampo. Se une con el extremo de la cola del núcleo caudado que cursa ventralmente en el techo del asta inferior del ventrículo lateral; desde su porción caudal surge la estría terminal.

La amígdala junto con el hipocampo, el fornix, el giro cingulado, el núcleo septal y los cuerpos mamilares, forma parte de lo que se ha dado en llamar el Sistema Límbico.

El complejo amigdalino comprende un grupo heterogéneo de núcleos y estructuras corticales, que son diferentes en cuanto a conexiones, citoarquitectura e histoquímica. Los hallazgos anatómicos y fisiológicos avalan el concepto de divisiones amigdalinas individualizadas, aunque los núcleos no están aislados unos de otros, sino que se intercomunican a través de conexiones intrínsecas⁽³⁵²⁻³⁵⁴⁾.

La amígdala tiene al menos 10 núcleos y áreas corticales distintas, muchas de las cuales están divididas en dos o más subregiones. Muchos de estos núcleos tienen un contorno irregular, no distinguiéndose los límites que lo separan del núcleo adyacente. Por otra parte, algunas zonas de transición tienden a oscurecer la delimitación entre dos núcleos. A pesar de los numerosos estudios sobre la organización citoarquitectónica de la amígdala, que comenzaron a principios de este siglo con los trabajos de Volsch^(355,356), todavía persiste una confusión con respecto a la terminología y a la delimitación de estos núcleos. Esta confusión, en parte, es debida a la existencia

de dos escuelas. Una, la escuela japonesa^(357,358), que sigue la tradición alemana de Volsch⁽³⁵⁶⁾ y Brockhaus⁽³⁵⁹⁾, divide la amígdala en pequeñas y numerosas subdivisiones. Por el contrario, la otra escuela, americana y europea, sigue la nomenclatura dada por Johnston⁽³⁶⁰⁾ en el murciélago, y que posteriormente fue promulgada en el mono y en el hombre^(361,362). Esta escuela divide la amígdala en pocos núcleos principales y alguno de ellos es subdividido en dos o tres partes. Un ejemplo de la disparidad en la nomenclatura se encuentra en las descripciones de la porción dorsomedial de la superficie cortical de la amígdala. Las siete subdivisiones de la amígdala superficial de la escuela japonesa⁽³⁵⁷⁾ se corresponden a solamente dos de la escuela americana y europea⁽³⁶⁰⁾, los núcleos cortical y medial.

Además, dentro de cada escuela se han aplicado diferentes términos para designar aparentemente las mismas regiones en las diferentes especies, lo que hizo que la confusión aumentase. Por ejemplo, la región del núcleo basal del mono^(361,362) generalmente se denomina núcleo basolateral en la rata y el gato. Esto es tremendamente confuso, ya que en la nomenclatura original de Johnston⁽³⁶⁰⁾, el término basolateral se utilizó para denominar la región de la amígdala que abarca los núcleos basal, accesorio basal y lateral de la terminología utilizada en la amígdala del mono.

Para comprender las razones de tal disparidad en la terminología de la amígdala, es importante recordar que ha habido tres épocas en el estudio de la amígdala. En la primera, el único criterio para dibujar los límites fue la tinción de los núcleos con Nissl. Johnston⁽³⁶⁰⁾ comunicó los primeros hallazgos en el murciélago, mientras que fue Brodal⁽³⁶³⁾ el que aportó los más sugestivos estudios en la rata y Fox⁽³⁶⁴⁾ en el gato. Los estudios de Crosby y Humphrey en el hombre^(361,362) y Lauer en el mono⁽³⁶⁵⁾ fueron la base de la terminología utilizada después en el mono.

La segunda época corresponde al advenimiento de las técnicas histoquímicas, especialmente la demostración de acetilcolinesterasa. Así, se hicieron estudios detallados en el mono^(366,367), el cerdo⁽³⁶⁸⁾, y más recientemente en la rata^(369,370). Se ha enfatizado que el patrón de tinción con acetilcolinesterasa es de gran ayuda para confirmar ciertos límites, tales como los del núcleo basal⁽³⁷¹⁾. Sin embargo, en el núcleo lateral y en otras áreas los patrones de tinción con Nissl y acetilcolinesterasa no son particularmente complementarios.

En la tercera época se incorporó la información sobre las conexiones para definir los límites de los núcleos^(352,372). Es de esperar que los resultados de los estudios de las conexiones, la citoarquitectura, la histoquímica y la inmunohistoquímica, contribuyan a desarrollar una nomenclatura que ponga de acuerdo a las diferentes escuelas y que al mismo tiempo pueda ser aplicada en cualquier especie, poniendo fin a la confusión creada. Un primer intento fue realizado por Price en la rata, el gato y el mono, utilizando secciones teñidas con Nissl y acetilcolinesterasa⁽³⁷³⁾, proponiendo tres grupos de áreas corticales y núcleos en la amígdala: 1) Núcleo basolateral (núcleos basal, lateral y accesorio del basal) que tienen interconexiones importantes con el neocortex. 2) Núcleo corticomedial (corteza periamigdalina, núcleos corticales anterior y posterior, núcleo medial y núcleo del tracto olfatorio) que están directamente conectados con el sistema olfatorio. 3) Núcleo central y área amigdalina anterior que están interconectadas con las regiones de control autonómico del hipotálamo lateral y tronco cerebral. En el hombre el grupo basolateral es relativamente grande, mientras que el corticomedial es considerablemente pequeño.

A continuación se hace una breve descripción del núcleo medial y de los núcleos que se estudian en este trabajo, así como de las conexiones entre ellos, y de las aferencias y eferencias relacionadas con los mismos:

NUCLEO LATERAL: Este núcleo fue reconocido por Johnston en el feto humano⁽³⁶⁰⁾, y es el componente más grande de la amígdala humana. La extremidad cefálica del núcleo está situada en el polo frontal de la amígdala y se continúa caudalmente hasta las tres cuartas partes de la extensión de la misma⁽³⁶¹⁾. El núcleo lateral en toda su extensión presenta neuronas entremezcladas de pequeño y mediano tamaño, de tipo multipolar, que son más pequeñas y tienen menor concentración de marcadores colinérgicos que las de la adyacente porción lateral del núcleo basal⁽³⁷³⁾. Más caudalmente, en el núcleo lateral se distingue un "núcleo" ventrolateral de la región dorsomedial en base a la gran densidad celular y a que se tiñe más intensamente con acetilcolinesterasa⁽³⁷³⁾. Lateralmente, el núcleo lateral está rodeado por la cápsula externa, presentando células intercaladas excepto en la zona donde forma la pared del ventrículo⁽³⁶¹⁾.

NUCLEO BASAL: Contiene las células más grandes de la amígdala y los mayores niveles de acetilcolintransferasa y acetilcolinesterasa. El núcleo basal presenta neuronas de diferentes tamaños y distintas concentraciones colinérgicas, por lo que se divide en dorsal o magnocelular y ventral o parvicelular⁽³⁷³⁾.

La porción dorsal del núcleo basal tiene las células más grandes de la amígdala y su neuropilo se tiñe intensamente con acetilcolintransferasa y acetilcolinesterasa. Se extiende a lo largo de la mayor parte de la porción rostrocaudal de la amígdala, alcanzando su mayor desarrollo en el tercio medio de ésta. El núcleo está rodeado por fibras longitudinales de asociación que le separan, lateral y medialmente, de los núcleos lateral y accesorio basal y, dorsomedialmente, de los núcleos cortical anterior, medial y central.

La porción ventral del núcleo basal o porción de células más pequeñas está situada ventromedial a la porción dorsal, excepto en los extremos rostral y caudal de la amígdala. Tiene menor concentración de marcadores colinérgicos que la porción dorsal del núcleo. Ventralmente, esta porción del núcleo basal se extiende medialmente bajo el núcleo accesorio basal y lateralmente bajo el margen medial del núcleo lateral. Se distingue de esos núcleos por los diferentes tamaños celulares, por la concentración algo más alta de acetilcolinesterasa y por las extensiones ventrales de los haces de fibras de asociación. A nivel caudal, esta porción del núcleo basal se extiende ventromedialmente hacia la incipiente fisura amigdaloides y se funde con la porción del surco de la corteza periamigdalina.

NUCLEO ACCESORIO BASAL: Se encuentra dorsomedial al núcleo basal, del cual, por lo general, está claramente separado por bandas verticales pertenecientes a los haces de fibras de asociación. El núcleo accesorio basal, como el núcleo basal, tiene neuronas de diferentes tamaños y distintas características de tinción histoquímica, por lo que se divide en tres porciones⁽³⁷³⁾: 1) Dorsolateral o magnocelular, 2) Ventromedial o parvicelular y 3) Medial o superficial.

La porción dorsolateral es pequeña rostralmente, pero caudalmente es el mayor componente del núcleo. Las células, que son de tamaño medio, se tiñen intensamente con Nissl.

Con acetilcolinesterasa se tiñen de forma ligera a moderada, lo que las distingue de las de la adyacente porción dorsal del núcleo basal, que se tiñen intensamente⁽³⁷³⁾.

La porción ventromedial, como su propio nombre indica está localizada ventromedialmente a la porción dorsolateral, tiene células más pequeñas y se tiñen de forma más ligera⁽³⁷³⁾.

La porción medial se ve mejor en la mitad caudal de la amígdala, donde va medial a las divisiones anteriores. Con Nissl sus células son casi tan grandes como las dorsolaterales, aunque no aparecen de forma tan densa, y tienden a ser más redondas y a teñirse más ligeramente que éstas. Con acetilcolinesterasa la tinción es intensa, lo que permite distinguir mejor la porción medial⁽³⁷³⁾.

NUCLEO CORTICAL: Se extiende por algo más de los dos tercios de la longitud total de la amígdala, estando separado de la superficie cerebral por una zona libre de células, que puede considerarse como su zona molecular⁽³⁶¹⁾. En este núcleo se distinguen dos porciones, una anterior y otra posterior.

La porción anterior está localizada inmediatamente caudal a la corteza piriforme, en la unión del lóbulo temporal y el cerebro basal anterior⁽³⁷³⁾. Todas las capas de la porción cortical anterior se tiñen moderadamente con acetilcolinesterasa. La porción posterior es la menos cortical de las estructuras de la superficie de la amígdala. Se localiza caudalmente en la amígdala y es ventral al núcleo medial. Aparece como una masa homogénea de células pequeñas y presenta una tinción moderadamente densa con acetilcolinesterasa y acetilcolintransferasa, aunque ésta no es tan intensa como la que presenta el área amigdalina-hipocampal⁽³⁷³⁾.

NUCLEO MEDIAL: Se localiza caudal a la porción anterior del núcleo cortical, distinguiéndose de ésta porque presenta una capa II más densa⁽³⁷³⁾. Está compuesto por neuronas pequeñas multipolares, entremezcladas de vez en cuando con células ligeramente más grandes⁽³⁶¹⁾. En toda su extensión ocupa una posición cerca de la superficie del cerebro, entre

la fisura rinal y el núcleo cortical⁽³⁶¹⁾. Ventrolateral a él está el núcleo accesorio basal⁽³⁶¹⁾.

El núcleo medial tiene una forma que va de oval irregular a poliédrica⁽³⁶¹⁾.

CONEXIONES DE LA AMIGDALA

Todavía no se han establecido al completo las conexiones de la amígdala en el cerebro humano. La mayor parte de la información disponible proviene de los estudios de degeneración y electrofisiológicos sobre una variedad de mamíferos entre los que se incluyen el mono.

1) CONEXIONES INTRINSECAS

Existe acuerdo general en que las principales conexiones intra-amígdalinas emergen de los núcleos lateral y basal, y terminan en los núcleos más mediales, núcleos accesorio basal, medial y porción anterior del núcleo cortical entre otros. Un hallazgo constante y a la vez sorprendente fue que los núcleos medial y cortical proyectan debilmente hacia atrás a los núcleos lateral y basal, lo que significa que la información a través de la amígdala es fundamentalmente unidireccional, con una dirección que va desde la zona lateral a la medial de la amígdala⁽³⁷³⁾.

El núcleo lateral proyecta de forma densa al núcleo accesorio basal en la rata, gato y mono^(352,354,374,375). También proyecta, aunque debilmente, al núcleo medial y a la porción posterior del núcleo cortical.

El núcleo basal presenta una interconexión entre sus porciones dorsal y ventral, que es bidireccional en la rata y gato, y unidireccional en el mono. Este núcleo proyecta a los núcleos medial y accesorio basal en la rata, gato y mono⁽³⁵²⁻³⁵⁴⁾.

El núcleo accesorio basal del mono presenta una interconexión bidereccional entre sus porciones dorsolateral y ventromedial. También envía proyecciones a los núcleos medial y cortical⁽³⁵⁴⁾. Con trazadores retrógrados se ha identificado una leve proyección a los núcleos lateral y basal en el gato y el mono^(354,374,376).

El núcleo medial solamente da lugar a unas pocas interconexiones intra-amígdalinas. Mientras que en el gato y la rata envía fibras a la porción posterior del núcleo cortical^(352,375,377), en

el mono envía fibras a la porción dorsolateral del núcleo accesorio basal y la porción anterior del núcleo cortical⁽³⁵⁴⁾.

El núcleo cortical envía conexiones al núcleo medial⁽³⁷⁵⁾.

2) AFERENCIAS DE LA AMIGDALA

Las aferencias de la amígdala han sido estudiadas profusamente en la rata, el gato y el mono. Los orígenes de las aferencias han sido clasificados en tres grupos: 1) Sensorial, 2) Límbico y 3) General. En este último grupo están incluidas las aferencias aminérgicas del tronco cerebral y las aferencias colinérgicas del cerebro basal anterior.

En base a que los diferentes grupos terminan en distintos núcleos de la amígdala y a la peculiar disposición de las conexiones internucleares de la amígdala se ha sugerido que las informaciones enviadas a través de los diferentes grupos de aferencias siguen distintas rutas a través de la amígdala, y probablemente la información que sale por las eferencias de los distintos núcleos de la amígdala sea diferente⁽³⁷⁸⁾.

2.1) AFERENCIAS SENSORIALES: El neocortex es la mayor fuente de aferencias que retransmite información sensorial a la amígdala. Así, se han demostrado aferencias provenientes de neocortex temporal⁽³⁷⁹⁾, corteza entorrinal⁽³⁸⁰⁻³⁸²⁾, corteza piriforme^(375,383), lóbulo frontal e insula⁽³⁸⁰⁻³⁸²⁾, y la formación hipocampal^(154,375,383).

El núcleo lateral del gato recibe fibras de neocortex (áreas somatosensoriales⁽³⁸⁴⁾, viscerosensoriales⁽³⁸⁵⁾, visuales y auditivas). En el mono se ha visto que estas aferencias van además a la porción dorsal del núcleo basal^(381,386). En la rata⁽³⁷⁰⁾, las áreas corticales perirrinal e insular, que reciben proyecciones de las áreas de asociación relacionadas con las áreas visuales, auditivas, somatosensoriales y viscerosensoriales, proyectan al núcleo lateral y al núcleo basal.

El bulbo olfatorio proyecta directamente a los núcleos superficiales de la amígdala⁽³⁸⁷⁾ e indirectamente a los núcleos profundos, entre los que se incluye el núcleo lateral.

2.2) **AFERENCIAS LIMBICAS:** En el gato y el mono la corteza frontal medial y de la ínsula, el área 35 de la corteza perirrinal, el área lateral de la corteza entorrinal y el subículo envían aferencias al núcleo basal⁽³⁸³⁾. En la rata el núcleo lateral recibe aferencias que provienen del área frontal medial, del área entorrinal y de la formación hipocampal⁽³⁸⁸⁾.

2.3) **AFERENCIAS GENERALES:** La amígdala recibe aferencias provenientes de grupos celulares aminérgicos del tronco cerebral, así como aferencias colinérgicas provenientes del cerebro basal anterior.

En la rata todos los núcleos han demostrado poseer en mayor o menor cuantía fibras dopaminérgicas, serotoninérgicas y nordrenérgicas, siendo el núcleo lateral el que menor cantidad recibe⁽³⁸⁹⁾.

El núcleo basal ha sido el que presentó principalmente aferencias colinérgicas, aunque no ha sido el único en que se han visto^(374,390,391).

3) EFERENCIAS DE LA AMIGDALA

Además de las importantes conexiones de la amígdala con el hipotálamo y el tronco cerebral, el complejo amigdalino es el lugar de origen de prominentes proyecciones que van al tálamo y neocórtex, a la formación hipocámpal, a porciones principales del estriatum y a varios grupos celulares del cerebro basal anterior, incluyendo las células colinérgicas del núcleo basal de Meynert.

La eferencia mejor estudiada del complejo amigdalino va través de la estría terminal, proyectando hacia las áreas septales y regiones preópticas y adyacentes del hipotálamo, mientras que algunas fibras continúan por la estría medular del tálamo para alcanzar el núcleo habenuar. Otras fibras eferentes no van a la estría terminal (vía amígdalofugal), sino que siguen rutas directas más ventrales para alcanzar muchos de los núcleos hipotalámicos, la corteza del lóbulo piriforme, el núcleo dorsomedial del tálamo y la formación reticular de la calota mesencefálica.

A continuación se describen las eferencias de la amígdala que van al hipocampo, corteza y región subcortical.

3.1) **EFERENCIAS AL HIPOCAMPO:** El núcleo accesorio basal manda fibras al sector CA1 del hipocampo⁽³⁹²⁾. La porción ventral del núcleo basal envía fibras eferentes al pre y parasubiculum, mientras que el núcleo lateral solamente envía fibras al parasubiculum⁽³⁹²⁾.

A la corteza entorrinal llegan fibras de los núcleos accesorio basal y del lateral⁽³⁹²⁾. La porción dorsolateral del núcleo accesorio basal envía fibras a la capa I de toda la corteza entorrinal, y tan solo en la porción rostral de la corteza entorrinal a la capa III y al espacio libre de células de la capa II⁽³⁹²⁾. La porción ventromedial de este mismo núcleo envía algunas fibras a la capa III de la mitad rostral de la corteza entorrinal⁽³⁹²⁾. Por último, el núcleo lateral da eferencias a la capa I de la totalidad de la corteza entorrinal⁽³⁹²⁾.

3.2) **EFERENCIAS A LA CORTEZA:** El complejo amígdalino envía eferencias directamente a las cortezas frontal, temporal, insular y occipital^(386,393-396). La amígdala proyecta fuertemente a las regiones polisensoriales corticales, tales como las cortezas perirrinal, polar temporal y orbitofrontal⁽³⁹²⁾. También se ha visto que las áreas visuales del lóbulo temporal reciben eferencias de la amígdala en la misma cantidad que las regiones anteriormente citadas, mientras que las áreas auditivas corticales reciben menor cantidad, y la corteza motora primaria prácticamente no recibe proyecciones⁽³⁹²⁾.

Las proyecciones que recibe el lóbulo frontal emergen de la porción dorsal del núcleo basal y de la porción dorsolateral del núcleo accesorio basal⁽³⁹²⁾.

Las proyecciones que recibe la corteza insular se originan fundamentalmente en el núcleo lateral, porción ventral del núcleo basal y porción dorsolateral del núcleo accesorio basal⁽³⁹²⁾.

Todas las principales divisiones del lóbulo temporal reciben fibras de la porción dorsal del núcleo basal. Además, la corteza polar temporal recibe proyecciones de los núcleos lateral y accesorio basal⁽³⁹²⁾.

3.3) **EFERENCIAS SUBCORTICALES:** Desde hace años se sabe que la amígdala da importantes proyecciones subcorticales al núcleo de la stria terminalis, hipotálamo y núcleo mediodorsal del tálamo⁽³⁹⁷⁻⁴⁰⁰⁾. Sin embargo, más adelante se ha visto que las proyecciones subcorticales de los núcleos de la amígdala son mucho más complejas y extensas.

Las fibras de muchos núcleos de la amígdala van a través de la vía amigdalofugal ventral alcanzando las áreas adyacentes del cerebro basal anterior, distribuyéndose fundamentalmente en la sustancia innominada, incluyendo el *nucleus basalis*, y en las estructuras estriadas, incluyendo el *nucleus accumbens*, el tubérculo olfatorio y la mayor parte del núcleo caudado y putamen⁽⁴⁰¹⁻⁴⁰⁴⁾.

El núcleo basal (porción ventral) y el núcleo accesorio basal (porción dorsolateral) envían fibras a la sustancia innominada, núcleo caudado, putamen, núcleo accumbens. Sin embargo ninguna de las fibras alcanza la porción dorsolateral del caudado y putamen, relacionadas con la corteza sensoriomotora^(403,405).

Los núcleos del grupo basolateral y el cortical envían fibras al núcleo medio dorsal del tálamo.

Los núcleos medial y el accesorio basal proyectan a la porción medial y lateral del hipotálamo a través de la estría terminal y de la vía amigdalofugal ventral.

Podemos resumir, con el riesgo de simplificar demasiado, que las proyecciones de la amígdala pueden dividirse principalmente en dos sistemas: El primero sería el relacionado fundamentalmente con el cortex cerebral y las estructuras subcorticales, en el cual los núcleos lateral y basal amigdalinos dan lugar a la mayor parte de las proyecciones de la amígdala a la corteza^(395,406), mientras que sus proyecciones subcorticales son menos importantes, siendo estas dirigidas a estructuras que tienen importantes interacciones con la corteza cerebral (sustancia innominada, estriado y núcleo medio dorsal talámico). El segundo sistema de proyección está relacionado con estructuras "viscerales". Por ejemplo, el núcleo medial que no proyecta a la corteza cerebral, ni al núcleo talámico medio dorsal⁽³⁸⁵⁾, sin embargo da la principal proyección a las estructuras relacionadas con funciones viscerales en el hipotálamo y el tronco cerebral. Esta división en dos sistemas sirve para recalcar la doble capacidad que tiene la amígdala. Por una parte, los núcleos amigdalinos pueden influenciar las funciones cognitivas, a través de sus proyecciones corticales o bien a través de estructuras como el *nucleus basalis* o el núcleo medio dorsal talámico. Por otra parte, los mismos núcleos pueden alterar las funciones viscerales a través de las proyecciones que van a los centros neuroendocrinos del hipotálamo.

ASPECTOS FUNCIONALES DEL COMPLEJO AMIGDALINO

1.- Funciones viscerales:

La estimulación o ablación de la amígdala produce diferentes efectos autonómicos y endocrinos, no sólo directamente sino a través de sus conexiones con centros autonómicos del tronco cerebral y con el hipotálamo. La estimulación eléctrica de una serie de regiones de la amígdala del gato, fundamentalmente la porción magnocelular del núcleo basal⁽⁴⁰⁷⁾, produce una respuesta orientada seguida por comportamientos asociados con la defensa o la huida, por ejemplo cese de la espontaneidad con movimientos de búsqueda con la cabeza y postura para el ataque⁽⁴⁰⁸⁾. Además hay una serie de componentes autonómicos de estos comportamientos que incluyen: Retracción de la membrana nictitante y dilatación pupilar, piloerección, hipertensión arterial con bradicardia, disminución de la amplitud y aumento de la frecuencia de las respiraciones, alteraciones de la motilidad gástrica y secreción y movimientos de masticación y olfateo.

2.- Reacción ante el stress:

Las lesiones en la amígdala de la rata disminuyen la acidez gástrica en ayunas y atenúan la formación de lesiones en la mucosa inducidas por lesión hipotalámica bilateral⁽⁴⁰⁹⁾. Acción similar a la producida por el clordiazepóxido, lo que sugiere que la amígdala es un lugar de acción de estas drogas ansiolíticas.

3.- Reproducción:

La amígdala está relacionada con la conducta sexual, especialmente con el papel que juega el olfato en esta conducta, aboliéndose por lesiones en el núcleo medial^(410,411). También interviene en otros aspectos del comportamiento no relacionados con aferencias sensitivas, como la construcción del nido⁽⁴¹²⁻⁴¹⁴⁾. La mayoría de los efectos en la reproducción se relacionan con la región corticomedial, especialmente el núcleo medial. Sin embargo, las lesiones en el grupo basolateral producen aumento de la actividad sexual⁽⁴¹⁵⁻⁴¹⁷⁾, mientras que los estímulos la disminuyen⁽⁴¹⁷⁾.

4.- Alimentación:

Las lesiones en el núcleo central y en el grupo corticomediales producen afagia y adipsia, mientras que las lesiones en el grupo basolateral producen hiperfagia e hiperdipsia⁽⁴¹⁸⁻⁴²⁹⁾.

5.- Comportamiento social:

El daño amigdalino altera el comportamiento social entre individuos. Según el ambiente en que se mantenga a los animales a los que se le ha producido el daño amigdalino, se produce una alteración en la aparición de los síntomas típicos del Síndrome de Klüver-Bucy. Los animales mantenidos en cajas en el laboratorio desarrollan un síndrome completo (incluyendo hipersexualidad), mientras que los que se mantienen en libertad no lo demuestran. En otro orden, las hembras son incapaces de cuidar a sus crías.

6.- Memoria:

Hoy se sabe que la amígdala, el hipocampo y la corteza entorrinal tienen un papel importante en la memoria. Se ha comprobado que los monos con el lóbulo temporal dañado tienen mayor o menor afectación de la memoria, dependiendo del daño de estas estructuras⁽⁴³⁰⁾.

CORTEZA ENTORRINAL

La corteza entorrinal está localizada en la parte ventromedial del tercio anterior del lóbulo temporal. La mitad de la corteza entorrinal está debajo de la amígdala y el resto está asociada con la parte anterior del hipocampo. Sus límites dorsomediales varían en los diferentes niveles antero-posteriores. En la parte más anterior está bordeada por la corteza piriforme, más posterior por la corteza periamigdalina de la que está separada por el sulcus semianularis y hacia su parte posterior está limitada por el parasubiculum. Los límites laterales están formados por el surco rinal, que en su pared medial forma la corteza prorinal y en su cara lateral la corteza peririnal. Esta zona es la zona de transición entre el allocortex y el neocortex.

La corteza entorrinal muestra una diferenciación laminar importante, desapareciendo alguna de las capas con los límites de la región. Las alteraciones del patrón laminar sirven para subdividir la corteza en regiones. La primera descripción de la corteza entorrinal fue dada, en 1.901, por Cajal⁽⁴³¹⁾, quien no sólo determinó su posición sino que describió su estructura, dividiéndola en siete capas. A la capa IV Cajal también la llamó plexiforme profunda o capa sin células. Años más tarde, Lorente de Nó⁽⁴³²⁾ propuso una nueva división de la corteza en sólo seis capas, considerando a la capa IV de Cajal como parte de la capa III, por no ser una capa celular y por su difícil reconocimiento debido a estar poco desarrollada en algunas zonas. Siguiendo la división de Lorente de Nó, la corteza entorrinal estaría formada por las siguientes capas:

I. Capa plexiforme. Formada por pocas células con forma estrellada, redondeada o fusiforme y sobre todo por fibras ascendentes y colaterales.

II. Capa de células estrelladas. Generalmente dispuestas en dos o tres filas y ocasionalmente formando islotes o grupos. Formada por células estrelladas, células con axon ascendente y células con el eje horizontal con muchas colaterales que se dividen en fibrillas que forman un plexo.

III. Capa de células piramidales. Es la más ancha de las capas. A nivel anterior tiene aspecto parchado haciéndose más homogénea y con aspecto columnar en niveles más posteriores.

IV. Capa de células piramidales profundas. Las células piramidales son las más numerosas, presentan una prolongación ascendente que no se ramifica. Además, hay otros tipos de células: Horizontales, globulosas, poligonales y estrelladas.

V. Capa de células piramidales pequeñas. Tienen una prolongación que alcanza la capa I, varias dendritas basales y un axon que desciende y forma un arco volviéndose hacia arriba y ascendiendo hasta las capas superiores donde se ramifica. En esta capa también hay células globulares y fusiformes.

VI. Capa de células polimorfas. El límite entre la capa V y la VI no está bien definido. Las células que forman esta capa son fundamentalmente pequeñas células piramidales, grandes células globulares y células poligonales.

Las nomenclaturas más frecuentemente usadas para distinguir las diferentes capas de la corteza entorrinal, son variaciones de la de Cajal o de la de Lorente de Nó. Menos acuerdo se ha encontrado en la delimitación de las subregiones en que puede dividirse la corteza entorrinal. Aunque Lorente de Nó afirmó que había pocas razones para subdividirla en grupos citoarquitectónicos, de hecho él la dividió en tres partes: Lateral, intermedia y medial, en base a su proyección sobre el hipocampo a través de la vía perforante, de la rama alvear o de ambas. Otros^(433,434), la dividieron en lateral o área 28b y medial o área 28a. Rose^(435,436), dividió la corteza humana en 23 campos. Braak⁽⁴³⁷⁾, utilizando criterios pigmento-arquitectónicos, la divide en 16 áreas. Van Hoesen y Pandya^(151,438,439), basándose en criterios citoarquitectónicos y de conexión, han reconocido tres subdivisiones en monos: 1) Medial o 28a, es la mayor y constituye el prototipo arquitectónico básico con el que se comparan otras. En secciones teñidas con Nissl exhibe una capa I

con escasas células (plexiforme externa); una capa II de células estrelladas grandes; una capa III ancha con células piramidales de tamaño mediano; una capa IV con escasas células (lámina dissecans o plexiforme interna); una capa V estrecha compuesta por células piramidales más pequeñas y horizontales y una capa VI multilaminada compuesta de células descritas por Cajal como polimorfos. 2) Intermedia o 28i, cuya capa II está formada por islotes grandes y presenta lámina dissecans. 3) Lateral o 28b, se diferencia de 28a en que presenta una capa II formando islotes de células pequeñas, la capa III es menos compacta y tiene aspecto más parcheado, la capa IV es variable y difícil de detectar salvo en niveles caudales y la capa VI está más laminada. En Nissl capa II y IV son las características diferenciadoras de este área. Más recientemente, Amaral⁽⁴⁴⁰⁾, que sigue la nomenclatura de Cajal, basándose en las diferencias laminares, que encuentra en sentido anteroposterior, ha subdividido la corteza entorrinal en siete campos distintos.

Para Braak⁽⁴³⁷⁾ la estrecha capa sin células (lámina disecans) sirve para distinguir el estrato principal externo (Pre) del interno (Pri). El estrato principal externo está formado por tres capas: Pre-alfa, Pre-beta y Pre-gamma. La Pre-alfa correspondería a la capa de células estrelladas de Cajal o la capa II de Lorente de Nó. La Pre-beta y la Pre-gamma correspondería a la capa III de Lorente de Nó. La Pri-alfa a la capa IV. La Pri-beta a la capa V y la Pri-gamma a la capa VI.

La corteza entorrinal recibe aferencias desde diversas regiones corticales, frontales y temporales⁽⁴⁴¹⁾, y subcorticales, incluyendo la amígdala^(442,443), claustrum⁽⁴⁴⁴⁾, mesencéfalo⁽⁴⁴⁴⁾, tálamo⁽⁴⁴⁴⁾, hipotálamo⁽⁴⁴⁴⁾, y tallo cerebral^(444,445). Las áreas temporales neocorticales, periamigdalinas y prepiriforme (área 51) proyectan sobre las capas I a III de la corteza entorrinal lateral (área 28b) e intermedia (área 28i)⁽⁴³⁸⁾; el área perirrinal (área 35) proyecta de forma difusa sobre las tres áreas de la corteza entorrinal; el parasubiculum (área 27) proyecta sobre las capas I y III de la corteza entorrinal medial e intermedia, en esta última en la zona caudal. El subiculum y el hipocampo proyectan sobre la capa IV de la corteza entorrinal^(154,446). Además del área periamigdalina, el núcleo basal de la amígdala también proyecta sobre corteza entorrinal intermedia y lateral. Sobre esta última también proyecta el área orbitofrontal⁽⁴³⁹⁾. Desde la amígdala tenemos las siguientes proyecciones: Los núcleos lateral, accesorio basal y basal proyectan sobre las capas I, III y V en la zona rostral, y en la zona intermedia y caudal sobre la capa I, en zona intermedia y caudal⁽⁴⁴⁴⁾. Además, a través del núcleo lateral recibe información de corteza frontal, temporal e

ínsula^(380,447). Esto abre una ruta a través de la cual diversas regiones corticales pueden influir en la función hipocampal. El sector CA1 del hipocampo y el subículum reciben proyecciones amigdalinas fundamentalmente de la división magnocelular del núcleo accesorio basal, la división parvicelular del núcleo basal y de la corteza periamigdalina⁽⁴⁴⁸⁾. El núcleo lateral puede influir indirectamente en el hipocampo a través de proyecciones intra-amigdalinas al núcleo accesorio basal, el cual proyecta sobre CA1 y subículum.

Las proyecciones eferentes de la corteza entorrinal fueron descritas por Cajal⁽⁴⁴⁹⁾ y divididas en varias vías. La más larga y mejor conocida se llamó vía tampo-ammonica directa o vía perforante. Este sistema de axones deja la sustancia blanca situada debajo de la corteza entorrinal y asciende (perfora) a través del presubiculum, subiculum y prosubiculum hasta la fisura hipocampal. Desde aquí distribuye fibras a las capa moleculares del hipocampo y fascia dentada. Dos vías más pequeñas, procedentes de la corteza entorrinal, fueron descritas y llamadas temporo-alveolares, estas vías cruzaban la vía perforante. Cajal describió una cuarta vía que iría al cuerno inferior del ventrículo lateral.

Desde las descripciones de Cajal se han hecho considerables esfuerzos para definir el origen y distribución de las eferencias entorrinales, especialmente de la vía perforante. Por ejemplo, se ha demostrado que las áreas medial (28a) y lateral (28b) de la corteza entorrinal dan lugar a componentes específicos de la vía perforante que terminan, en distintas zonas, entre las dendritas de las células granulosas de la fascia dentada y las dendritas apicales de las células piramidales hipocampales.

Se había descrito⁽⁴⁵⁰⁾ que la parte lateral de la corteza entorrinal proyectaba sobre el tercio externo de la capa molecular, mientras que la parte medial proyectaba sobre el tercio interno de la capa molecular. Posteriormente, Steward⁽⁴⁵¹⁾ demostró que la corteza entorrinal tiene, más que dos campos terminales, múltiples campos terminales en la capa molecular.

Las eferencias de la corteza entorrinal van fundamentalmente al hipocampo a través de la vía perforante. Van desde las capas II y III de Cajal^(431,432,451-454) hasta el hipocampo (presubiculum, subiculum, prosubiculum, fisura hipocampal y fascia dentada). La parte medial de la corteza entorrinal envía fibras a CA1, CA3 y capa molecular de la fascia dentada. La parte intermedia proyecta sobre el estrato molecular de CA1 y la fascia dentada. Además de esta vía hay otra proyec-

ción no hipocampal a la vecindad del surco rinal en la corteza temporal, surgiendo las fibras de las capas profundas de la corteza entorrinal sobre todo de IV⁽⁴⁵⁵⁾. Las capas V y VI mandan proyecciones al estriado⁽⁴⁵⁶⁾.

Para Steward⁽⁴⁵¹⁾, en la rata, la parte medial proyecta sobre CA1, cerca de la transición de CA1 con CA2, y la parte lateral sobre CA1, lejos de CA2 y próximo al subiculum, y en la capa molecular del propio subiculum.

La proyección entorrino-hipocampal va desde las células estrelladas de la capa II de la corteza entorrinal⁽⁴⁵⁰⁾ hasta la capa molecular del área dentada y desde las células piramidales de la capa III hasta el estrato lacunoso-molecular de CA1⁽⁴⁵¹⁾. Las capas profundas V y VI no contribuyen con sus axones a la formación de la vía perforante.

Existe desde la corteza entorrinal una proyección no hipocampal que termina en varias zonas de la corteza temporal. Estas proyecciones salen fundamentalmente de las capas profundas y sobre todo de la capa IV⁽⁴⁵⁵⁾. Como la capa IV recibe proyecciones de la zona CA1 del hipocampo, esta capa se ve implicada en una conexión indirecta entre el hipocampo y la corteza temporal. Es posible además que axones intrínsecos de la corteza entorrinal completen el circuito capa III-CA1 hipocampal-capas IV⁽⁴⁵⁵⁾.

Las capas V y VI mandan proyecciones al estriado⁽⁴⁵⁶⁾, corteza frontal, claustrum, locus ceruleus y núcleo del rafe⁽⁴⁴⁵⁾. La parte lateral de la corteza entorrinal manda proyecciones al núcleo olfatorio anterior y al tubérculo olfatorio⁽⁴⁵⁷⁾. Todas estas eferencias van a áreas que después proyectan sobre la parte lateral de la corteza entorrinal.

Las capas superficiales de corteza entorrinal dan eferencias a hipocampo y subiculum^(431,451,458,459) y desde aquí nuevas vías proyectan sobre capas profundas de la corteza entorrinal⁽⁴⁵⁶⁾. La corteza entorrinal puede ser considerada como un lugar de convergencia de información sensorial que termina en las capas superficiales. De aquí vía perforante va al hipocampo y vuelve a las capas profundas de la corteza. Desde Lorente de Nó⁽⁴³²⁾ se sabe que las capas superficiales y profundas de la corteza entorrinal están muy interconectadas.

La corteza entorrinal ha sido implicada en funciones afectivas, cognoscitivas, motoras y endocrinas.

Podemos resumir que la corteza entorrinal en el ser humano y en los primates superiores es una parte del allocortex particularmente compleja y muy diferenciada. Puede ser considerada como un centro de asociación multimodal y zona de paso de la información procedente del isocortex camino del hipocampo^(441,455,460,461) a través de la vía perforante. Las capas superficiales de corteza entorrinal dan eferencias a hipocampo y subiculum^(431,451,458,459) y desde aquí nuevas vías proyectan sobre capas profundas de la corteza entorrinal⁽⁴⁵⁶⁾. Desde Lorente de Nó⁽⁴³²⁾ se sabe que las capas superficiales y profundas de la corteza entorrinal están muy interconectadas.

La destrucción bilateral de la corteza entorrinal produce una alteración importante de la capacidad intelectual del individuo⁽⁴⁶¹⁾. Además la corteza entorrinal ha sido implicada en funciones afectivas, cognoscitivas, motoras y endocrinas.

OBJETIVOS DE LA TESIS

- I. *Los procesos de ciertas poblaciones neuronales, reconocidas por la presencia de péptidos marcadores, son incorporados preferentemente a las placas.*
- II. *Ciertas poblaciones neuronales, reconocidas por la presencia de péptidos marcadores, son resistentes a la degeneración y muerte en la Enfermedad de Alzheimer.*
- III. *Existe una correlación inversa entre incorporación a las placas de procesos procedentes de un determinado tipo neuronal y sobrevivencia de neuronas.*

Para demostrar estas hipótesis me marco los siguientes objetivos:

- 1.-Estudio de la distribución de células con Cromogranina A y Calbindina en amígdala y corteza entorrinal de cerebros de pacientes normales y con Enfermedad de Alzheimer, y comparación con la distribución de Somatostatina, Colecistoquinina y Sustancia P.
- 2.-Recuento de placas que presentan cada uno de los péptidos anteriormente mencionados, en los núcleos lateral, basal, accesorio basal y cortical de la amígdala y en la corteza entorrinal de pacientes con Enfermedad de Alzheimer. Comparación con los métodos de tinción tradicionales (Rojo Congo y Plata).
- 3.-Determinación de la relación número de placas/número de células, existentes con cada uno de los péptidos, y comparación de dichos cocientes entre sí, para precisar si la incorpo-

ración de neuritas con un determinado péptido a las placas depende de la cantidad de las mismas existente en la vecindad de los depósitos de amiloide o preamiloide, o por el contrario, se incorporan preferentemente dependiendo de la clase de péptido que contienen.

4.-Determinación, en amígdala y corteza entorrinal de cerebros normales y con Enfermedad de Alzheimer, del número de células con los distintos péptidos en relación con las células totales determinadas con Nissl, para valorar su supervivencia en la Enfermedad de Alzheimer.

Las razones para estudiar los péptidos anteriormente mencionados fueron las siguientes:

1º) Somatostatina: Porque su presencia estaba descrita en el 30-50% de las placas neocorticales⁽⁴⁶²⁾.

2º) Colecistoquinina: Porque fue el péptido más frecuentemente hallado en las placas de corteza calcarina⁽⁴⁾.

3º) Sustancia P: Porque al igual que Colecistoquinina, Somatostatina y Cromogranina A su localización es intragranular.

4º) Calbindina: Porque, aunque es un péptido citoplásmico, se ha afirmado que confiere resistencia a la muerte celular producida por excitotóxicos, y porque la población celular que expresa esta proteína se mantiene en el hipocampo de pacientes con Enfermedad de Alzheimer⁽⁴⁶³⁾.

MATERIAL Y METODOS

Se seleccionaron como controles 13 cerebros de pacientes fallecidos por causas diferentes a enfermedades neurológicas, en autopsias consecutivas realizadas en el University Hospital de Saskatoon (Canadá). Las edades de los pacientes oscilaron entre 35 y 78 años. Siete eran varones y seis mujeres. El tiempo transcurrido desde el fallecimiento hasta la realización de la autopsia y fijación de los tejidos osciló entre 3 y 36 horas.

Al mismo tiempo se obtuvieron 8 cerebros de pacientes diagnosticados clínicamente de probable Enfermedad de Alzheimer. Las edades de los pacientes oscilaron entre 71 y 89 años. Siete eran mujeres y uno varón. El tiempo de evolución conocido de la enfermedad fue inferior a nueve años. El tiempo transcurrido desde el fallecimiento hasta la realización de la autopsia fue en todos los casos inferior a 24 horas.

Además, se escogieron cuatro cerebros de pacientes con diagnóstico anatomopatológico de Enfermedad de Alzheimer, que habían sido fijados en formalina por un tiempo que osciló entre 4 y 9 semanas, para comparar el efecto del fijador sobre la población celular. Uno de los cerebros tenía una amígdala y corteza entorrinal fijadas en PPG, mientras que la otra amígdala y corteza entorrinal estaban fijadas en formalina.

En los 13 cerebros seleccionados como controles y en los 8 con probable Enfermedad de Alzheimer se hicieron cortes coronales en fresco, fijándose bloques de amígdala y corteza entorrinal con un grosor de 0.5 a 1 cm en PPG (Ácido Pírico 0,2%, Paraformaldehído 4%, Glutaraldehído 0,05%)⁽⁴⁶⁴⁾ en una proporción tejido-fijador de 1:10, durante al menos 48 horas con agitación continua para favorecer la penetración del fijador y a temperatura ambiente. Posteriormente, con el fin de aclarar la mayor parte del color amarillo del PPG, se lavaron los bloques cuatro veces con fosfato tamponado (0,01M y pH 7,4) que contenía 0.02% de azida sódica (agente antibacteriano). A continuación se crioprotegieron los bloques con una solución de sucrosa al 10% en fosfato tamponado y azida, para impedir el crecimiento de bacterias y hongos, durante 24 horas y después en una solución de sucrosa al 30% en fosfato tamponado y azida. Se cubrieron con Tissue-Tek OCT (Miles Scientific, Naperville, IL) dejándose a menos 20° C hasta que se congelaron, cortándose con el criotomo en secciones de 20, 50 y 400 micras respectivamente.

Una vez cortadas las secciones se transfirieron mediante pinzas frías a un recipiente conteniendo una solución fría de fosfato tamponado y azida para eliminar todo el OCT y para favorecer

su puesta en portaobjetos sin imperfecciones, tales como agujeros o burbujas. Las secciones de 20 micras, que flotan en la superficie del recipiente, se colocaron en portaobjetos y se dejaron secar durante una noche a temperatura ambiente, tapándolas previamente para que no acumularan polvo. Pasado ese tiempo se cubrieron con papel de plástico y se guardaron en el congelador a menos 20° C hasta el momento de utilizarlas. Las secciones de 50 y 400 micras se recogieron con un pequeño pincel y se guardaron en fosfato tamponado con azida a 4° C hasta que se utilizaron.

Las secciones de 20 micras se tiñeron con:

1. Galocianina para obtener una imagen similar a la del Nissl (Método de Einarson), eligiéndose este método porque no puede sobreteñirse al ser un método progresivo, a diferencia del Nissl, que es regresivo.
2. Plata según el método de Campbell que tiñe todas las formas de amiloide y preamiloide⁽⁴⁶⁵⁾.
3. Rojo Congo, que tiñe amiloide compacto y ovillos neurofibrilares.
4. Anticuerpo anti-Cromogranina (LK2H10) contrateñida con Rojo Congo.

Las secciones de 50 micras se tiñeron, mediante el método ABC para secciones flotantes, con los siguientes anticuerpos:

1. Anti-Cromogranina (LK2H10)⁽³⁰⁹⁾ (Hybritech, Inc. San Diego, Cal).
2. Anti-Somatostatina 28 (Incstar).
3. Anti-Colecistoquinina (CCK'8) (Immunonuclear, Incstar).
4. Anti-Calbindina (regalo del Dr. Baimbridge al Dr. Muñoz).
5. Anti-Sustancia P (Immunonuclear, Incstar).

Las secciones de 400 micras se tiñeron por el método de Braak⁽⁴⁶⁶⁾.

Métodos inmunocitoquímicos: Método usado por Somogyi, 1984⁽³²⁶⁾, modificado por Muñoz, 1990⁽³²¹⁾.

Las secciones de 50 micras, en las que se estudia la Cromogranina A, se mantuvieron a 4° C en una solución tampón de fosfato 0,01M, pH 7,41 con azida. En el momento de utilizarlas se hicieron tres lavados de 10 minutos con una solución tampón de fosfatos, pH 7,41. Se suprimió la actividad de peroxidasa endógena con peróxido de hidrógeno al 1% en fosfato tamponado durante una hora. Después de realizar tres lavados de cinco minutos con una solución tampón de fosfato salino, se mantuvieron las secciones durante una o dos horas en una solución supresora, suero de caballo al 10% en solución tampón de fosfato salino tritiado al 0,5%, y se incubaron en anticuerpo primario, LK2H10 (Hybritech Inc, San Diego, CA) diluido al 1:10.000 en solución tampón de fosfato salino tritiado al 0,5% con 3% de albúmina sérica bovina y 0,02% de azida sódica, durante 48 horas a 4° C. Pasado este tiempo se hicieron cuatro lavados de 30 minutos en solución tampón de fosfato salino tritiado al 0,5% y se incubaron durante tres horas, a temperatura ambiente, en el anticuerpo biotinilado IgG cabra anti-ratón (Vector, Burlingame, CA) diluido al 1:225. Se hicieron otros cuatro lavados de 30 minutos en solución tampón de fosfato salino tritiado y se incubaron durante la noche en el complejo avidina-biotina-peroxidasa, Vectastina (Vector), a la dilución recomendada por el fabricante. Para intensificar el producto de reacción de la peroxidasa, las secciones se preincubaron en la oscuridad durante 10 minutos con 3,3'-diaminobencidina tetrahidrocloruro (DAB) al 0,03% (Sigma Chemical Co., St.Louis, MO), Cl₂Ni al 0,04% (Fisher Scientific, Winnipeg, MB) en solución Tris tamponada al 0,05%, pH 7.6. A continuación se incubaron durante 15 minutos en el mismo medio con la adición de H₂O₂ al 30%. Tras lavar las secciones con agua destilada se montaron en portas cubiertos de gelatina con cromo, se deshidrataron, se aclararon con xileno y se cubrieron.

Con los otros neuropéptidos se siguió el mismo método, excepto en lo que se refiere a la supresión y a la incubación, sustituyendo en la primera el suero de caballo por suero de cabra al 3% en solución tampón de fosfato salino tritiado al 0,1%, y en la segunda se sustituyó el anticuerpo primario por el apropiado y el anticuerpo biotinilado anti-ratón por el anti-conejo.

Las secciones de 400 micras se tiñeron siguiendo el método de Braak⁽⁴⁶⁶⁾. Tras ser cortadas con el criostato se pusieron en una solución tampón de fosfato 0,01 M con azida sódica. Posteriormente y durante una semana se tuvieron en formalina al 4%, manteniéndose en continuo movimiento. Se aclararon con agua del grifo y se oxidaron con ácido perbórico, recientemente preparado, durante 30 minutos y en continuo movimiento. Se aclararon durante 1 hora bajo el grifo y se pasaron a etanol al 70% durante 10 minutos. Posteriormente, se tiñeron con una solución de aldehydofucsina durante 12 horas permaneciendo en movimiento. Se aclararon nuevamente con etanol al 70% durante 10 minutos y se deshidrataron en alcohol, haciendo dos pases de 1 hora en etanol al 95% y otros dos también de 1 hora en etanol al 100%, dejándolos posteriormente durante la noche en etanol al 100%. Durante la deshidratación se pusieron las secciones entre papel de filtro para que se mantuvieran planas. Finalmente se aclararon en 3 cambios de 2 horas cada uno en tolueno y se cubrieron con Permount (Fisher).

En las amígdalas teñidas con Nissl se contaron células por milímetro cuadrado en los núcleos lateral, basal, accesorio basal y cortical. El gran número de células superpuestas unas a otras en las secciones de 400 micras teñidas con la tinción de Braak, permitió un fácil reconocimiento de la organización interna de la amígdala. La diferenciación entre núcleos se hizo por la diferente morfología y tamaño de las células en los diferentes núcleos, siguiendo la nomenclatura de Crosby y Humphrey⁽³⁶¹⁾ y de Braak y Braak⁽⁴⁶⁷⁾. Mediante la introducción de una rejilla en el ocular y con una magnificación de diez aumentos se contaron las células existentes en 1 milímetro cuadrado en diez campos diferentes de la muestra, hallándose a continuación la media aritmética. El tamaño del núcleo cortical solo permitió contar seis o siete campos de 1 milímetro cuadrado. En las amígdalas de los 13 cerebros utilizados como control se hicieron recuentos celulares en los diferentes núcleos con Nissl y con Cromogranina A. Para el estudio comparativo de los distintos péptidos se escogieron seis cerebros de entre los anteriores. De los ocho cerebros de pacientes con Enfermedad de Alzheimer se seleccionaron cinco amígdalas por presentar las otras tres algún tipo de deterioro en alguna de sus secciones.

En la corteza entorrinal se eligió la zona medial y en ella se contaron las células existentes en bandas de 1 mm de ancho y en la profundidad total de la corteza. Los recuentos con Nissl y Cromogranina A se realizaron en 11 cerebros de los 13 previamente seleccionados como control, por presentar los otros dos algún tipo de deterioro en algunas de sus secciones. Los estudios de los restantes péptidos se realizaron solamente en cinco cerebros de los seis que se habían escogido para el mismo estudio en la amígdala, por presentar uno algún tipo de deterioro. De los cerebros de pacientes con Enfermedad de Alzheimer se eligieron para los distintos estudios en corteza entorrinal los mismos cerebros que se habían utilizado para la amígdala.

Los recuentos de células con péptidos en las secciones de 50 micras se compararon con los recuentos de células en las secciones de 50 micras teñidas con Nissl, con el fin de conocer el porcentaje de células que se tiñen con cada péptido. Debido a las dificultades para hacer el recuento de células teñidas con Nissl en las secciones de 50 micras, se hicieron cinco contajes de células teñidas con Nissl en las mismas zonas de secciones de 20 y 50 micras correlativas a fin de obtener un factor de corrección que resultó ser para las células de 2,41. El tamaño celular se midió con 40 aumentos.

En las secciones de la amígdala, de 50 micras, teñidas con los diferentes neuropéptidos se contaron células y placas por milímetro cuadrado en cada núcleo. Se contaron placas en secciones de 20 micras teñidas con Cromogranina y contrateñidas con Rojo Congo, en secciones de 20 micras teñidas con rojo congo y hematoxilina y en secciones de 50 micras teñidas con Cromogranina. Para hallar el factor de corrección para el contaje de placas se utilizó el mismo método mencionado en las células teñidas con Nissl, resultando ser de 1,96.

En las secciones de corteza entorrinal, teñidas con plata y Rojo Congo, se contaron placas en una banda de 1 mm de ancho y en toda la profundidad de la corteza y tras aplicar el factor de corrección se compararon con las encontradas con los neuropéptidos.

En el análisis estadístico se utilizó comparación de medias simples mediante la *t* de Student y comparación de medias múltiple mediante análisis de varianza por la técnica de Scheffé (1953), válida para los casos en que las muestras no tengan el mismo tamaño y estando concebida para todo tipo de contrastes (Paquete estadístico SIGMA por J.L. Carrasco).

SOLUCIONES PARA INMUNOTINCION DE CROMOGRANINA A**1.- TAMPON DE FOSFATO 0,01M (TF):**

Sal tampón Fisher pH 7,41 1 pKg
agua destilada 4 litros

2.- TAMPON DE FOSFATO 0,01M CON AZIDA (TFaz)

Para almacenamiento de tejidos y secciones

Preparar 4 litros de TF (solución 1) y añadir 0,8 g de azida sódica.

3.- TAMPON DE FOSFATO SALINO, 0,85% (TFS)

TF 1 litro
cloruro sódico 8,5 g

4.- TRITON 0,5% EN TFS (TTFS)

TFS 500 ml
Triton X-100 2,5 ml

5.- PEROXIDO DE HIDROGENO AL 1% EN TF

Para bloquear la actividad de peroxidasa endógena

Peroxido de hidrógeno al 30% 100 ml
TF 0,01M, pH 7,41 10 ml

6.- SUERO SUPRESOR AL 10%

suero de caballo normal 10 ml
TTFS al 0,5% 90 ml
sucrosa 10 g
azida sódica 0,02 g

7.- DILUENTE DEL ANTICUERPO PRIMARIO

albúmina sérica bovina (ASB)	3	g
TTFS al 0,5%	100	ml
azida sódica	0,02	g

8.- ANTICUERPO BIOTINILADO (dilución 1:225)

Reconstituir anticuerpo anti ratón liofilizado con 1 ml de agua destilada estéril.

Diluir 4,5 ul/1 ml TTFS.

<u>Anticuerpo anti-ratón biotinilado</u>	<u>TTFS 0,5%</u>
45 ul	10 ml
22,5 ul	5 ml
11,25 ul	2,5 ml
9 ul	2 ml

9.- REACTIVO ABC VECTASTINA

Reactivo "A"	45	ul
Reactivo "B"	45	ul
TTFS al 0,5%	5	ml

Mezclar y dejar reposar durante 30 minutos antes de usarlo.

10.- TAMPON TRIS 0,5M, pH 7,6 para almacenar

Disolver 60,6 g de Tris (THAM) en 500 ml de agua destilada. Añadir ClH 1M (aproximadamente 300 ml) hasta que el alcance pH de 7,6. Añadir agua destilada hasta tener 1000 ml. Conservar a 4°C.

11.- TAMPON TRIS 0,05M, pH 7,6 para usar

Solución Tris almacenada 0,5M	100	ml
agua destilada	900	ml

12.- DIAMINOBENCIDINA (DAB)

Solución para almacenar:

DAB en 208 ml de Tris 0,05M, pH 7,6 -solución al 2,4% 5 g

distribuir en porciones de 625 ul.

congelar a menos 20°C.

Solución para trabajar:

descongelar una porción de DAB.

añadir a 50 ml de solución Tris tampón en uso (la concentración final del DAB es 0,03%).

añadir lentamente 250 ul de Cl_2Ni al 8%.

filtrar y usar.

tras la preincubación, preparar otra porción de DAB y añadir 30 ul de peróxido de hidrógeno al 30%.

filtrar y usar.

13.- CLORURO DE NIQUEL AL 8%

Cloruro de níquel (Cl_2Ni) 8 g

agua destilada 100 ml

SOLUCIONES PARA INMUNOTINCION DE NEUROPEPTIDOS**1.- SUERO SUPRESOR AL 3%**

Suero de cabra norma	3	ml
TFS	97	ml
Tritón X-100	0,1	ml
Azida sódica	0,02	ml

2.- DILUENTE DEL ANTICUERPO PRIMARIO

Suero de cabra normal	1	ml
TFS	99	ml
Triton X-100	0,1	ml
Azida sódica	0,02	ml

3.- ANTICUERPO BIOTINILADO

Anticuerpo anticonejo biotinilado diluido en TTFS al 0,1%.

RESULTADOS

La delimitación de núcleos en la amígdala de los pacientes normales utilizados como control en este estudio se hizo de una manera sencilla gracias al examen de las preparaciones con pigmento en secciones de 400 micras. Estas secciones muestran una clara delimitación entre el complejo amigdalino cortico-medial y el basolateral mediante zonas con pocas células.

El complejo basolateral puede subdividirse a su vez en tres zonas separadas por zonas estrechas sin células. Una de ellas separa el núcleo accesorio basal del núcleo basal. Esta zona sin células es ancha dorsalmente y se va estrechando según se va aproximando a la zona ventral. Otra zona similar separa el núcleo lateral del basal. La delimitación del núcleo basal está facilitada además de por estas zonas sin células, por su mayor pigmentación que la distingue claramente del accesorio basal y lateral.

Las zonas más ventrales del accesorio basal y basal parecen unirse en lo que Braak llama "zona transitoria".

En el estudio con Nissl el núcleo lateral aparece en la zona más dorsal y lateral interrumpido por bandas de fibras pertenecientes a la cápsula interna. Sus células son de tamaño mediano. El núcleo basal presenta dos zonas; una, dorso-lateral, de células grandes separada del núcleo lateral y del accesorio basal por fibras, y otra, ventro-medial, de células más pequeñas que se extiende por debajo del núcleo accesorio basal hasta el cortical. El núcleo accesorio basal situado dorsomedial al basal, está separado del basal y del cortical por fibras. En la zona ventro medial su delimitación es más difícil. El núcleo cortical está delimitado por la fisura amigdalina. Las células están dispuestas en capas perpendiculares a la superficie libre.

En la **ENFERMEDAD DE ALZHEIMER** encontramos los siguientes datos:

La delimitación nuclear en la amígdala se hizo fácilmente gracias a la tinción de Braak en la que aparece una clara delimitación entre el complejo corticomedial y el basolateral además de una intensa pigmentación del núcleo basal que lo distingue del accesorio basal y del lateral. (Fig.3)

Con Nissl es difícil delimitar los núcleos. El núcleo lateral es el que mejor conserva su estructura, así como las porciones dorsal o magnocelular y la más ventral del núcleo basal, siendo

difícil delimitar el núcleo accesorio basal de la porción media del núcleo basal. El núcleo cortical pierde la disposición en capas de sus células.

Al estudiar el número de células/mm² presentes en cada núcleo amigdalino de pacientes con Enfermedad de Alzheimer y compararlo con las células presentes en las amígdalas de pacientes sanos vemos que el número de células/mm² se conserva entre el 67% en el Núcleo Cortical y el 81 % en el Núcleo Basal (tabla I). La superficie amigdalina pasó de 126.94 mm² en sanos a 109.45 mm² en pacientes con Enfermedad de Alzheimer.

TABLA I
CEL/mm² EN NUCLEOS AMIGDALINOS TINCION : NISSL

	CONTROLES			E. ALZHEIMER			% E/C	SIG
	MEDIA	DE.	N	MEDIA	DE.	N		
NL	303,42	65,81	13	240,66	24,3	5	79,32	P<0,01
NB	241,71	35,11	13	197,98	30,86	5	81,90	P<0,05
NAB	278,90	81,14	13	222,0	45,02	5	79,59	NO
NCO	439,90	95,37	12	297,46	57,9	5	67,62	P<0,01

NL: Núcleo lateral; NB: Núcleo basal; NAB: Núcleo accesorio basal; NCO: Núcleo cortical.
DE.: Desviación estandar; N: Número de casos; %E/C: Tanto por ciento de células en enfermos con respecto a los controles; SIG: Nivel de significación.

En el estudio de la distribución de células con los cinco péptidos escogidos (CgA, Som, CCK, SP y CaBP), **objetivo 1**, y la relación entre el número de células con cada péptido y el número de células con Nissl, **objetivo 4**, en la amígdala y corteza entorrinal de cerebros normales y con Enfermedad de Alzheimer encontramos:

AMIGDALA

Cromogranina A.- La CgA tiñe fundamentalmente fibras en la unión de los núcleos basal y lateral, en la parte ventral de los mismos y en la parte superficial del núcleo cortical. Las fibras van en todas las direcciones y son varicosas. El núcleo central tiene un conglomerado u ovillo de fibras pero no es objeto de estudio.

Las células teñidas con CgA son aproximadamente un 2-3 % de las células totales identificadas con Nissl en cada núcleo (tabla III). No siguen una orientación definida. En el núcleo cortical son más abundantes en la zona profunda que en la superficial y tienden a estar perpendiculares al borde libre. En el núcleo accesorio basal las células están dispersas. En el basal y en el lateral tienden a concentrarse en las zonas ventrales (Fig.18), siendo escasas en las zonas dorsales.

El tamaño celular osciló en el núcleo lateral entre 36 y 14 micras del eje mayor y entre 14 y 7 micras el eje menor. En el núcleo basal entre 36 y 16 el eje mayor y entre 24 y 12 el menor. En el accesorio basal entre 36 y 16 el mayor y entre 24 y 9 el menor. En el cortical los tamaños oscilaron entre 48 y 24 micras del eje mayor y 24 y 12 del eje menor.

La tinción es granular, alrededor del núcleo y tiñe el inicio de los procesos dendríticos que suelen ser entre dos y cuatro, no visualizándose las ramas dendríticas distales que o bien no se tiñen o se pierden en el neurópilo. El segmento inicial del axon no se reconoce en la mayoría de las células. Entre las neuronas teñidas hay diversos grados de intensidad (Fig.6,7,8).

En las secciones fijadas con formalina en lugar de PPG, el neurópilo es menos aparente y la intensidad de la tinción es más débil.

En la amígdala de pacientes con Enfermedad de Alzheimer las células con Cromogranina A parecen ser entre el 60 -80 % de las células encontradas en controles (tabla II), pero al referir el número de células con Cromogranina A al número total de células encontradas en el Nissl, vemos que también son el 2-3% de éstas manteniéndose con respecto a sujetos sanos, es decir, la pérdida neuronal con Cromogranina A es proporcional a la pérdida neuronal general (tabla III). Las células mantienen distribución, morfología y características tintoriales similares a los controles sanos.

TABLA II

CEL/mm² EN NUCLEOS AMIGDALINOS TINCION: CgA

	CONTROLES			E. ALZHEIMER			% E/C	SIG
	MEDIA	DE.	N	MEDIA	DE.	N		
NL	11,35	4,52	13	9,02	2,38	5	79	NO
NB	15,63	6,63	13	9,52	4,65	5	60	P<0,05
NAB	14,33	7,60	13	8,28	2,87	5	57,78	P<0,05
NCO	23,74	6,80	13	18,32	10,46	5	77,16	NO

NL: Núcleo lateral; NB: Núcleo basal; NAB: Núcleo accesorio basal; NCO: Núcleo cortical. DE.: Desviación estandar; N: Número de casos; %E/C: Tanto por ciento de células en enfermos con respecto a los controles; SIG: Nivel de significación.

TABLA III

CEL. CgA / CEL. CON NISSL EN NUCLEOS AMIGDALINOS

	CONTROLES			E. ALZHEIMER			% E/C	SIG
	MEDIA	DE.	N	MEDIA	DE.	N		
NL	0,0164	0,0085	13	0,0155	0,0039	5	94,51	NO
NB	0,0275	0,011	13	0,0205	0,01	5	74,54	NO
NAB	0,0228	0,014	13	0,0168	0,0083	5	73,68	NO
NCO	0,0245	0,0089	13	0,0260	0,015	5	106,12	NO

NL: Núcleo lateral; NB: Núcleo basal; NAB: Núcleo accesorio basal; NCO: Núcleo cortical. DE.: Desviación estandar; N: Número de casos; %E/C: Tanto por ciento de células en enfermos con respecto a los controles; SIG: Nivel de significación.

Como en este estudio hay una diferencia significativa entre las edad de los pacientes sanos y los enfermos. Para valorar si la diferencia de edad puede influir en el número de células teñidas con CgA, separamos el grupo de sanos en menores de 70 años y mayores de 71 años y contamos el número de células con CgA en cada núcleo amigdalino, no obteniéndose diferencia significativa.

Influencia de la edad en el nº de células presentes con CgA en los distintos núcleos amigdalinos, en pacientes sanos y enfermos.

Pacientes	Media	Des. Est	Er. Est	NºC
Sanos	68,5	7,3793	2,1302	12
Enfermos	81,2	7,1903	3,2156	5

p<0,01

Des.Est.=desviación estandar

Er.Est.=error estandar

NºC=número de casos

Si en la tabla II separamos los enfermos sanos en menores de 70 años y mayores de 71 y contamos el nº de células/mm² teñidas con CgA en cada núcleo para determinar como puede influir la edad tenemos:

Pacientes	Núcleo	Media	Des. Est	Er. Est	N°C
<70	NL	11,94	5,0371	1,9039	7
>71	NL	11,36	4,2613	1,9057	5
<70	NB	15,02	5,3	2,0032	7
>71	NB	15,40	6,712	3,0017	5
<70	NAB	16,01	8,1604	3,0844	7
>71	NAB	9,64	2,7082	1,2112	5
<70	NCO	24,36	9,1913	3,474	7
>71	NCO	22,35	2,676	1,1968	5

Diferencia no significativa. Es decir, la edad no influye de forma significativa en el número de células que se tiñen con CgA.

Influencia del tiempo postmortem hasta la fijación del cerebro.

Pacientes	Media	Des.Est.	Er.Est.	N°C
Sanos	15,1208	9,8453	2,8421	12
Enfermos	19,7	1,5895	0,79477	5

No significativo $p=0,14474$

Somatostatina.- Hay fibras varicosas por todo el conjunto amigdalino y en todas las direcciones.

Las células que se tiñen son el 1 - 2 % de las identificadas con Nissl (tablas IV a XII). Son piramidales o fusiformes y los procesos dendríticos varían entre dos y cuatro saliendo en todas direcciones (Fig.9). Son prácticamente inexistentes en la zona que Braak llama núcleo de transición (Fig.22). El tamaño celular varía en el núcleo lateral entre 28 y 9 micras en el eje mayor y entre 12 y 7 micras en el eje menor. En el núcleo basal oscila entre 24 y 9 micras el eje mayor y entre 9 y 7 el menor. En el accesorio basal entre 36 y 14 micras el eje mayor y entre 14 y 9 el menor. En el cortical entre 48 y 24 el mayor y entre 9 y 7 el menor.

En la Enfermedad de Alzheimer las células en la amígdala parecen perderse de forma paralela a la pérdida celular total excepto en el núcleo basal donde se conservan (tablas IV a XII). La distribución, características tintoriales y tamaño celular son similares a los sujetos sanos: En el núcleo lateral el eje mayor oscila entre 21 y 12 micras y el menor entre 9 y 7 micras. En el núcleo basal oscila entre 31 y 19 micras el eje mayor y entre 9 y 7 el menor. En el accesorio basal entre 24 y 9 micras el eje mayor y entre 12 y 7 el menor. En el cortical entre 16 y 12 el mayor y 12 el menor.

Colecistoquinina.- Produce una buena delimitación de los núcleos amigdalinos por las diferencias de tonalidad. La parte superficial del núcleo cortical tiñe muy intensamente el neuropilo (Fig.1 y 2).

Las células en el núcleo cortical predominan en la capa profunda. En los núcleos lateral y basal predominan en el tercio medio sin llegar a la zona ventral (Fig.20). Representan entre el 2 y el 4% de las células totales identificadas con Nissl (tablas IV a XII). Son triangulares o fusiformes con 3-4 dendritas principales (Fig.10, 11). Su tamaño en el núcleo lateral oscila entre las 24 y 12 micras de eje mayor y las 12 y 7 micras de eje menor. En el núcleo basal oscila entre 48 y 9 micras el eje mayor y entre 12 y 7 el menor. En el núcleo accesorio basal entre 31 y 19 el eje mayor y entre 9 y 4 el menor. En el cortical entre 24 y 14 el mayor y entre 9 y 7 el menor. La tinción es granular.

Tampoco parece haber grandes diferencias celulares en la amígdala de pacientes con Enfermedad de Alzheimer, aunque en los núcleos lateral y basal parecen mantenerse ligeramente las células (tablas IV a XII). El tamaño celular oscila en el núcleo lateral entre 36 y 12 micras el eje mayor y 12 -10 el menor. En el núcleo basal entre 36 y 19 el mayor y entre 12 y 10 el menor. En el accesorio basal entre 36 y 16 el mayor y entre 12 y 10 el menor. En el núcleo cortical oscila entre 24 y 19 micras el eje mayor y entre 14 y 9 el menor.

Sustancia P.- En la amígdala normal tiñe el neurópilo en la parte superficial del núcleo cortical mientras que las células predominan en la parte profunda. Hay acúmulo de fibras varicosas en la zona ventral del núcleo basal y del lateral (Fig.21).

Las células tienen forma fusiforme o triangular con 2 ó 3 procesos gruesos que se dividen, tiñéndose hasta la 2ª división (Fig.12, 13). Representan entre el 0,7 y el 1,7% de las células totales identificadas con el Nissl (tablas IV a XII). La tinción es granular.

En las amígdalas de la Enfermedad de Alzheimer la Sustancia P tiñe el neurópilo de forma similar a como lo hace en controles normales, es decir, en la parte superficial del núcleo cortical. Las células se tiñen débilmente y parecen mantenerse ligeramente mejor que las células generales, salvo en el núcleo accesorio basal donde se pierden de forma casi significativa (tablas IV a XII).

Calbindina.- En la amígdala se ven muchas fibras y campos terminales teñidos sobre todo en la zona de separación de los núcleos basal y lateral.

El número de células teñidas es muy numeroso y la distribución predomina en la zona medial y ventral (Fig.19). Representan entre el 8 y el 12% de las células totales identificadas con Nissl (tablas IV a XII). Las células son de diferentes tamaños y formas, oscilando su tamaño en el núcleo lateral entre 36 y 7 micras el eje mayor y entre 16 y 7 el eje menor. En el núcleo basal oscilan entre 43 y 9 micras el eje mayor y entre 9 y 4 el menor. En el accesorio basal entre 26 y 9 el eje mayor y entre 12 y 4 el menor. En el cortical entre 40 y 14 el eje mayor y entre 12 y 7 micras el menor. La tinción con Calbindina es de tipo citoplásmica y las células presentan tinción de intensidad variable: Unas tienen una tinción muy marcada, son poligonales y bipolares, con

dendritas muy claras sobre todo la apical y con procesos que se extienden mucho dando aspecto de fibras sin varicosidades (Fig.14). Otras, están debilmente teñidas, son redondeadas y sin procesos, difíciles de distinguir de la glia (Fig.16). En la zona ventral del núcleo basal y accesorio basal se ven células con muchos procesos dendríticos (células estrelladas) (Fig.15).

En la Enfermedad de Alzheimer las células en la amígdala siguen un patrón similar en cuanto a distribución y forma al seguido en controles sanos, con una ligera permanencia en los nucleos basal y cortical (tablas IV a XII). El tamaño celular varía en el núcleo lateral entre las 36 y 7 micras de eje mayor y entre las 16 y 7 micras el eje menor. En el núcleo basal oscila entre 43 y 9 micras el eje mayor y entre 9 y 4 el eje menor. En el accesorio basal entre 26 y 9 micras el eje mayor y entre 12 y 4 el eje menor. En el núcleo cortical oscila entre 40 y 14 el eje mayor y entre 12 y 7 micras el eje menor.

Las amígdalas fijadas con formalina presentan menor número de células y el neuropilo más debil al teñirlas con Cromogranina A, Somatostatina y Sustancia P.

TABLA IV

CEL/mm² EN NUCLEOS AMIGDALINOS TINCION: NISSL

	CONTROLES			E. ALZHEIMER			% E/C	SIG
	MEDIA	DE.	N	MEDIA	DE.	N		
NL	265,83	50,94	6	240,66	24,3	5	90,53	NO
NB	236,5	37,45	6	197,98	30,86	5	83,71	CASI
NAB	213	37,06	6	222,0	45,02	5	104,22	NO
NCO	386,6	110,52	5	297,46	57,9	5	76,94	NO

NL: Núcleo lateral; **NB:** Núcleo basal; **NAB:** Núcleo accesorio basal; **NCO:** Núcleo cortical.**DE.:** Desviación estandar; **N:** Número de casos; **%E/C:** Tanto por ciento de células en enfermos con respecto a los controles; **SIG:** Nivel de significación.

TABLA V

NUCLEO LATERAL
CEL./mm² TEÑIDAS CON DIFERENTES PEPTIDOS

	CONTROLES			E. ALZHEIMER			% E/C	SIG
	MEDIA	DE.	N	MEDIA	DE.	N		
CgA	12,31	6,01	6	9,02	2,58	5	73,27	NO
CCK	9,99	3,13	6	10,60	2,90	5	106,01	NO
CABP	49,50	15,84	6	45	8,74	5	90,91	NO
SP	5,16	3,16	6	5,13	1,32	5	99,36	NO
SOM	7,42	2,83	6	6,03	3,02	5	81,31	NO

CgA: Cromogranina; **CCK:** Colecistoquinina; **CABP:** Calbindina; **SP:** Sustancia P;
SOM: Somastotatina; **DE:** Desviación estandar; **N:** Número de casos; **%E/C:** Tanto por ciento de células en enfermos con respecto a los controles; **SIG:** Nivel de significación.

TABLA VI

NUCLEO LATERAL
CEL. TEÑIDAS CON DIFERENTES PEPTIDOS / CEL. CON NISSL

	CONTROLES			E. ALZHEIMER			% E/C	SIG
	MEDIA	DE.	N	MEDIA	DE.	N		
CgA	0,02	0,011	6	0,0115	0,0039	5	77	NO
CCK	0,0155	0,0034	6	0,0182	0,0045	5	117,41	NO
CABP	0,0808	0,033	6	0,0779	0,015	5	96,41	NO
SP	0,008	0,0041	6	0,0089	0,0023	5	111	NO
SOM	0,0119	0,005	6	0,0105	0,0053	5	88,23	NO

CgA: Cromogranina; **CCK:** Colecistoquinina; **CABP:** Calbindina; **SP:** Sustancia P;
SOM: Somastotatina; **DE:** Desviación estandar; **N:** Número de casos; **%E/C:** Tanto por ciento de células en enfermos con respecto a los controles; **SIG:** Nivel de significación.

TABLA VII

NUCLEO BASAL
CEL./mm² TEÑIDAS CON DIFERENTES PEPTIDOS

	CONTROLES			E. ALZHEIMER			% E/C	SIG
	MEDIA	DE.	N	MEDIA	DE.	N		
CgA	12,35	5,41	6	9,52	4,66	5	77,10	NO
CCK	13,85	3,79	6	13,45	5,80	5	97,16	NO
CABP	53,47	12,47	6	51,6	14,10	5	96,50	NO
SP	4,45	1,57	6	3,74	0,90	5	84,16	NO
SOM	4,94	1,79	6	7,2	2,50	5	145,40	NO

CgA: Cromogranina; **CCK:** Colecistoquinina; **CABP:** Calbindina; **SP:** Sustancia P;

SOM: Somastotatina; **DE:** Desviación estandar; **N:** Número de casos; **%E/C:** Tanto por ciento de células en enfermos con respecto a los controles; **SIG:** Nivel de significación.

TABLA VIII

NUCLEO BASAL
CEL. TEÑIDAS CON DIFERENTES PEPTIDOS / CEL. CON NISSL

	CONTROLES			E. ALZHEIMER			% E/C	SIG
	MEDIA	DE.	N	MEDIA	DE.	N		
CgA	0,0222	0,0101	6	0,0205	0,0102	5	91,89	NO
CCK	0,0248	0,0075	6	0,0276	0,0108	5	111,29	NO
CABP	0,0948	0,0203	6	0,1095	0,0315	5	115,50	NO
SP	0,0077	0,0024	6	0,0082	0,003	5	106,50	NO
SOM	0,0089	0,0037	6	0,0148	0,0032	5	166,29	P<0,05

CgA: Cromogranina; **CCK:** Colecistoquinina; **CABP:** Calbindina; **SP:** Sustancia P;

SOM: Somastotatina; **DE:** Desviación estandar; **N:** Número de casos; **%E/C:** Tanto por ciento de células en enfermos con respecto a los controles; **SIG:** Nivel de significación.

TABLA IX

NUCLEO ACCESORIO BASAL
CEL./ mm² TEÑIDAS CON DIFERENTES PEPTIDOS

	CONTROLES			E. ALZHEIMER			% E/C	SIG
	MEDIA	DE.	N	MEDIA	DE.	N		
CgA	14,18	9,47	6	8,28	2,87	5	58,41	NO
CCK	21,78	4,31	6	17,25	8,32	5	79,21	NO
CABP	62,37	16,14	6	57,30	14,47	5	91,85	NO
SP	8,55	3,19	6	5,08	1,70	5	59,43	CASI
SOM	9,63	3,90	6	10,27	1,80	5	106,58	NO

CgA: Cromogranina; **CCK:** Colecistoquinina; **CABP:** Calbindina; **SP:** Sustancia P;

SOM: Somastotatina; **DE:** Desviación estandar; **N:** Número de casos; **%E/C:** Tanto por ciento de células en enfermos con respecto a los controles; **SIG:** Nivel de significación.

CASI: P= 0,057

TABLA X

NUCLEO ACCESORIO BASAL
CEL. TEÑIDAS CON DIFERENTES PEPTIDOS / CEL. CON NISSL

	CONTROLES			E. ALZHEIMER			% E/C	SIG
	MEDIA	DE.	N	MEDIA	DE.	N		
CgA	0,028	0,019	6	0,0168	0,0083	5	59,64	NO
CCK	0,0426	0,0053	6	0,0328	0,014	5	76,99	NO
CABP	0,1209	0,0206	6	0,1118	0,039	5	92,47	NO
SP	0,0177	0,0092	6	0,0097	0,0031	5	54,80	CASI
SOM	0,0189	0,0079	6	0,0195	0,0034	5	103,17	NO

CgA: Cromogranina; **CCK:** Colecistoquinina; **CABP:** Calbindina; **SP:** Sustancia P;

SOM: Somastotatina; **DE:** Desviación estandar; **N:** Número de casos; **%E/C:** Tanto por ciento de células en enfermos con respecto a los controles; **SIG:** Nivel de significación.

TABLA XI
NUCLEO CORTICAL
CEL./mm² TEÑIDAS CON DIFERENTES PEPTIDOS

	CONTROLES			E. ALZHEIMER			% E/C	SIG
	MEDIA	DE.	N	MEDIA	DE.	N		
CgA	25,89	8,50	6	18,33	10,46	5	70,79	NO
CCK	18,55	6,31	6	16,98	12,64	5	91,54	NO
CABP	73,90	7,48	6	71,07	27,72	5	96,16	NO
SP	9,4	4,04	6	7,35	2,99	5	78,19	NO
SOM	12,15	5,94	6	7,61	5,42	5	62,61	NO

CgA: Cromogranina; **CCK:** Colecistoquinina; **CABP:** Calbindina; **SP:** Sustancia P;
SOM: Somastotatina; **DE:** Desviación estandar; **N:** Número de casos; **%E/C:** Tanto por ciento de células en enfermos con respecto a los controles; **SIG:** Nivel de significación.

TABLA XII
NUCLEO CORTICAL
CEL. TEÑIDAS CON DIFERENTES PEPTIDOS / CEL. CON NISSL

	CONTROLES			E. ALZHEIMER			% E/C	SIG
	MEDIA	DE.	N	MEDIA	DE.	N		
CgA	0,0264	0,015	6	0,0260	0,0152	5	98,10	NO
CCK	0,0221	0,0094	6	0,0222	0,014	5	100,45	NO
CABP	0,0829	0,021	6	0,0981	0,026	5	118,33	NO
SP	0,0096	0,0023	6	0,0105	0,0044	5	109,37	NO
SOM	0,0138	0,0046	6	0,0102	0,0065	5	73,91	NO

CgA: Cromogranina; **CCK:** Colecistoquinina; **CABP:** Calbindina; **SP:** Sustancia P;
SOM: Somastotatina; **DE:** Desviación estandar; **N:** Número de casos; **%E/C:** Tanto por ciento de células en enfermos con respecto a los controles; **SIG:** Nivel de significación.

CORTEZA ENTORRINAL

Con la tinción de Braak se delimitan perfectamente las diferentes capas de la corteza entorrinal normal (Fig.5).

Con la tinción de Nissl la zona estudiada mostraba una capa II con células agrupadas dándole un aspecto parcheado, una capa III con células alineadas en bandas, después una zona clara correspondiente a la lámina dissecans, debajo la capa IV y por debajo las capas V y VI (Fig.23).

En la Enfermedad de Alzheimer, con la tinción de Braak se delimitan las dos zonas Pre y Pri y vemos como en la zona lateral, en el límite con la corteza transentorrinal, la capa pre-alfa se hace interna (Fig.4). Con la tinción de Nissl es difícil delimitar las capas por la desaparición preferente de las células de las capas II y IV (Fig.29). En el recuento de células/mm² en toda la profundidad de la corteza vemos que se conservan el 71% de las células/mm² con respecto a los controles sanos (tabla XIII), fundamentalmente a expensas de las células de las capas V y VI.

TABLA XIII

CELULAS EN UNA BANDA DE 1 mm. DE ANCHO Y EN LA PROFUNDIDAD
TOTAL DE LA CORTEZA ENTORRINAL CON NISSL

CONTROLES			E. ALZHEIMER			% E/C	SIG
MEDIA	DE.	N	MEDIA	DE.	N		
731,55	145,04	11	524,84	156,22	5	71,74	P<0,05

DE: Desviación estandar; N: Número de casos; %E/C: Tanto por ciento de células en enfermos con respecto a los controles; SIG: Nivel de significación.

Cromogranina A.- La inmunoreactividad de la corteza entorrinal normal se caracteriza por la intensa tinción del neurópilo, que es mayor en las capas superficiales y de éstas la capa I es la que presenta mayor intensidad de tinción. Además se tiñen cuerpos celulares que están dispuestos en bandas sobre el neurópilo, sobre todo en las capas V y VI. Las células en la porción superficial son escasas (capa III) y por lo general débilmente teñidas. En la sustancia blanca se ven algunos cuerpos celulares (Fig.24).

Las células con Cromogranina A representan aproximadamente el 13% del total de células determinadas por Nissl (tabla XV). La mayoría de las células teñidas son piramidales dispuestas de forma perpendicular al borde libre de la corteza y con tamaños que varían entre 24 y 12 micras el eje mayor y entre 14 y 9 el eje menor. Las células tienen dos o tres dendritas.

En pacientes con enfermedad de Alzheimer las células con Cromogranina A son el 70 - 80 % de las encontradas en cortezas normales (tabla XIV) pero al referirlas al número total de células encontradas con Nissl resultan ser el 14% de éstas, es decir, se mantienen ligeramente mejor que la población neuronal general, aunque la diferencia no es significativa (tabla XV). Se ven fundamentalmente en las capas profundas (V y VI) y en la sustancia blanca. El neurópilo se tiñe más intensamente en las capas superficiales (Fig.30).

TABLA XIV

**CELULAS EN UNA BANDA DE 1 mm. DE ANCHO Y EN LA PROFUNDIDAD
TOTAL DE LA CORTEZA ENTORRINAL CON CgA.**

CONTROLES			E. ALZHEIMER			% E/C	SIG
MEDIA	DE.	N	MEDIA	DE.	N		
243,19	87,15	11	172,9	54,53	5	71,09	NO

DE: Desviación estandar; N: Número de casos; %E/C: Tanto por ciento decélulas en enfermos con respecto a los controles; SIG: Nivel de significación.

TABLA XV

CELULAS CON CgA / CELULAS EN NISSL EN UNA BANDA DE 1 mm. DE ANCHO Y EN LA PROFUNDIDAD TOTAL DE LA CORTEZA ENTORRINAL

CONTROLES			E. ALZHEIMER			% E/C	SIG
MEDIA	DE.	N	MEDIA	DE.	N		
0,1387	0,0484	11	0,1477	0,0665	5	106,48	NO

DE: Desviación estandar; N: Número de casos; %E/C: Tanto por ciento decélulas en enfermos con respecto a los controles; SIG: Nivel de significación.

Somatostatina.- En la corteza entorrinal normal tiñe fibras varicosas y campos terminales distribuidos por toda la corteza. Las células son escasas, predominando en las capas profundas, fundamentalmente en las capas V-VI. Representan el 3% de las células totales con Nissl (tabla XVIII). Hay células en sustancia blanca, que son las de mayor tamaño (Fig.25), con el eje mayor paralelo a las capas corticales. El tamaño celular oscila entre 24 y 12 micras de eje mayor y entre 9 y 7 de eje menor.

En pacientes con Enfermedad de Alzheimer las células siguen un patrón similar a los controles (tabla XVIII), sin variaciones en el tamaño (Fig.31).

Colecistoquinina.- En la corteza entorrinal normal la tinción del neurópilo parece formar dos bandas oscuras que corresponden a las capas II-III y V-VI (Fig.27).

Las células no son muy abundantes, aproximadamente representan el 2% de las células totales con Nissl (tabla XVIII) y se encuentran en la parte superficial de las dos bandas oscuras. Se reconocen dos tipos de células: unas fusiformes con dos dendritas y otras piramidales con al menos tres dendritas. El tamaño celular oscila entre 24 y 14 micras de eje mayor y entre 9 y 7 de eje menor.

En la Enfermedad de Alzheimer las células con Colecistoquinina están preservadas preferentemente en cuanto a número, representan el 4% de las células totales con Nissl ($p<0,1$) (tabla XVIII), y tamaño (Fig.33).

Sustancia P.- En la corteza entorrinal normal el neurópilo forma dos bandas teñidas de más intensidad, una superficial y otra profunda. En la parte superficial se ven fibras sin células. Las células representan el 2% de las células con Nissl (tabla XVIII) y están fundamentalmente en la parte profunda, capas V-VI (Fig.28).

En la Enfermedad de Alzheimer se preservan las células con relación a la población general, representan el 4% de las células con Nissl ($p<0,1$) (tabla XVIII), sobre todo las superficiales. En la capa V parece que siguen una banda. Hay células en sustancia blanca (Fig.32). Las fibras tienen forma arrosariada y algunas terminan en una célula.

Calbindina.- En la corteza entorrinal tiñe neuropilo y células en todas las capas aunque de forma más intensa en las capas superficiales (Fig.26).

Las células representan aproximadamente el 13% del total de células con Nissl (tabla XVIII). Son polimorfas con procesos muy largos que aparentan fibras sin varicosidades y al igual que en la amígdala la intensidad de la tinción celular es variable. El tamaño celular varía entre 26 y 7 micras el eje mayor y entre 16 y 7 el menor (Fig17).

En la Enfermedad de Alzheimer las células se mantienen, representan el 32% de las células con Nissl (tabla XVIII), y siguen siendo más abundantes en las zonas superficiales. Su tamaño y forma es variable, encontrándose desde células poligonales a ovaladas, con ejes que oscilan entre las 16 y las 9 micras el mayor y entre 12 y 9 el menor (Fig.34).

TABLA XVI

**CELULAS EN UNA BANDA DE 1 mm. DE ANCHO Y EN LA PROFUNDIDAD
TOTAL DE LA CORTEZA ENTORRINAL CON NISSL**

CONTROLES			E. ALZHEIMER			% E/C	SIG
MEDIA	DE.	N	MEDIA	DE.	N		
718,96	119,6	5	524,84	156,22	5	73,13	N0

DE: Desviación estandar; N: Número de casos; %E/C: Tanto por ciento de células en enfermos con respecto a los controles; SIG: Nivel de significación.

TABLA XVII

CEL. TEÑIDAS CON DIFERENTES PEPTIDOS
EN UNA BANDA DE 1 mm. DE ANCHO
Y EN LA PROFUNDIDAD TOTAL DE LA CORTEZA ENTORRINAL

	CONTROLES			E. ALZHEIMER			% E/C	SIG
	MEDIA	DE.	N	MEDIA	DE.	N		
CgA	213,17	49,98	5	172,9	54,53	5	81,10	NO
CCK	47,56	18,16	5	62,36	36,74	5	131,11	P<0,1
CABP	237,46	62,58	5	315,38	67,77	5	132,81	NO
SP	40,93	12,47	5	50,3	16,2	5	122,88	NO
SOM	60,46	19,34	5	44,56	20,87	5	73,70	NO

CgA: Cromogranina; **CCK:** Colecistoquinina; **CABP:** Calbindina; **SP:** Sustancia P;

SOM: Somatostatina; **DE:** Desviación estandar; **N:** Número de casos; **%E/C:** Tanto por ciento de células en enfermos con respecto a los controles; **SIG:** Nivel de significación.

TABLA XVIII

CEL. TEÑIDAS CON DIFERENTES PEPTIDOS / CELULAS
CON NISSL EN UNA BANDA DE 1 mm. DE ANCHO
Y EN LA PROFUNDIDAD TOTAL DE LA CORTEZA ENTORRINAL

	CONTROLES			E. ALZHEIMER			% E/C	SIG
	MEDIA	DE.	N	MEDIA	DE.	N		
CGA	0,1310	0,061	5	0,1477	0,0664	5	112,74	NO
CCK	0,028	0,0108	5	0,0489	0,017	5	174,64	P<0,1
CABP	0,13665	0,0261	5	0,3262	0,2717	5	238,71	NO
SP	0,02473	0,011	5	0,0455	0,0203	5	183,98	P<0,1
SOM	0,0345	0,0074	5	0,0365	0,014	5	105,79	NO

CgA: Cromogranina; **CCK:** Colecistoquinina; **CABP:** Calbindina; **SP:** Sustancia P;

SOM: Somastotatina; **DE:** Desviación estandar; **N:** Número de casos; **%E/C:** Tanto por ciento de células en enfermos con respecto a los controles; **SIG:** Nivel de significación.

En el estudio de distribución de placas que contienen los péptidos estudiados (CgA, Som, CCK, SP y CaBP) en la amígdala y corteza entorrinal, **objetivo 2**, encontramos:

AMIGDALA

Cromogranina A.- Las placas están formadas por muchas neuritas pequeñas, más de diez, de forma redondeada, de diferente tamaño y que adoptan forma de corona. El tamaño de las placas bien desarrolladas oscila entre las 13 y las 55 micras de diámetro (Fig.41). En el núcleo basal las placas son escasas en la parte dorsal aumentando según nos acercamos a la parte ventral (Fig.35). Predominan en número y tamaño en los núcleos basal y accesorio basal (tablas XIX a XXII). Algunas placas tienen incorporados elementos celulares y al hacer la contratinción con Rojo Congo vemos que no todas las placas con CgA tienen amiloide (tablas XIX a XXII) (Fig.45), aunque si todas las placas con Rojo Congo tienen Cromogranina A.

Somatostatina.- Las placas son muy escasas, representando menos del 15 % de las presentes con Rojo Congo. Tienen muy pocas neuritas y predominan en los nucleos basal y accesorio basal (tablas XIX a XXII) (Fig.37). Su tamaño oscila entre 17 y 36 micras de diámetro, encontrándose las de mayor tamaño en el núcleo basal (Fig.42).

Colecistoquinina.- Las placas son escasas y grandes, con neuritas distantes entre sí, de predominio en la zona profunda del núcleo cortical, en el límite con el accesorio basal, donde llegan a medir hasta 78 micras, (Fig.39,40) y en la zona dorsal del basal (tablas XIX a XXII). Representan menos del 35 % de las placas con Rojo Congo.

Sustancia P.- Las placas son grandes y densas, como si estuvieran formadas por 3 ó 4 neuritas unidas y muy teñidas sobre todo en la parte profunda del núcleo cortical y en el basal (tablas XIX a XXII) (Fig.38,43). Representan menos del 40 % de las placas con Rojo Congo.

Calbindina.- Las placas son escasísimas, de predominio en núcleo basal y de pequeño tamaño (6 micras) (tablas XIX a XXII) (Fig.36,44). Representan aproximadamente el 1 % de las placas con Rojo Congo.

TABLA XIX

NUCLEO LATERAL
PLACAS/mm² CON CgA EN RELACION CON OTROS PEPTIDOS Y ROJO CONGO

	MEDIA	DE.	N
CgA	8,63	5,95	5
CCK	0	0	5
CABP	0,05	0,07	5
SP	0,45	0,66	5
SOM	0,06	0,08	5
RC	4,21	3,81	5

CgA: Cromogranina; **CCK:** Colecistoquinina; **CABP:** Calbindina; **SP:** Sustancia P;
SOM: Somatostatina; **RC:** Rojo Congo; **DE:** Desviación estandar; **N:** Número de casos.

Al hacer comparación de medias múltiple encontramos diferencia significativa ($p < 0,01$) al comparar CgA con los otros péptidos.

TABLA XX

NUCLEO BASAL
PLACAS/mm² CON CgA EN RELACION CON OTROS PEPTIDOS Y ROJO CONGO

	MEDIA	DE.	N
CgA	20,8	8,84	5
CCK	1,01	1,17	5
CABP	0,17	0,18	5
SP	3,96	2,62	5
SOM	0,78	0,84	5
RC	10,66	9,46	5

CgA: Cromogranina; **CCK:** Colecistoquinina; **CABP:** Calbindina; **SP:** Sustancia P;
SOM: Somastotatina; **RC:** Rojo Congo; **DE:** Desviación estandar; **N:** Número de casos;

Al hacer comparación de medias múltiple encontramos diferencia significativa ($p < 0,01$) al comparar CgA con los otros péptidos.

TABLA XXI

NUCLEO ACCESORIO BASAL
PLACAS/mm² CON CgA EN RELACION CON OTROS PEPTIDOS Y ROJO CONGO

	MEDIA	DE.	N
CgA	15,2	7,04	5
CCK	1,9	1,84	5
CABP	0,10	0,15	5
SP	3,17	3,007	5
SOM	0,63	0,67	5
RC	10,23	8,99	5

CgA: Cromogranina; **CCK:** Colecistoquinina; **CABP:** Calbindina; **SP:** Sustancia P;

SOM: Somastotatina; **RC:** Rojo Congo **DE:** Desviación estandar; **N:** Número de casos.

Al hacer comparación de medias múltiple encontramos diferencia significativa ($p < 0,01$) al comparar CgA con los otros péptidos.

TABLA XXII

NUCLEO CORTICAL

PLACAS/mm² CON CgA EN RELACION CON OTROS PEPTIDOS Y ROJO CONGO

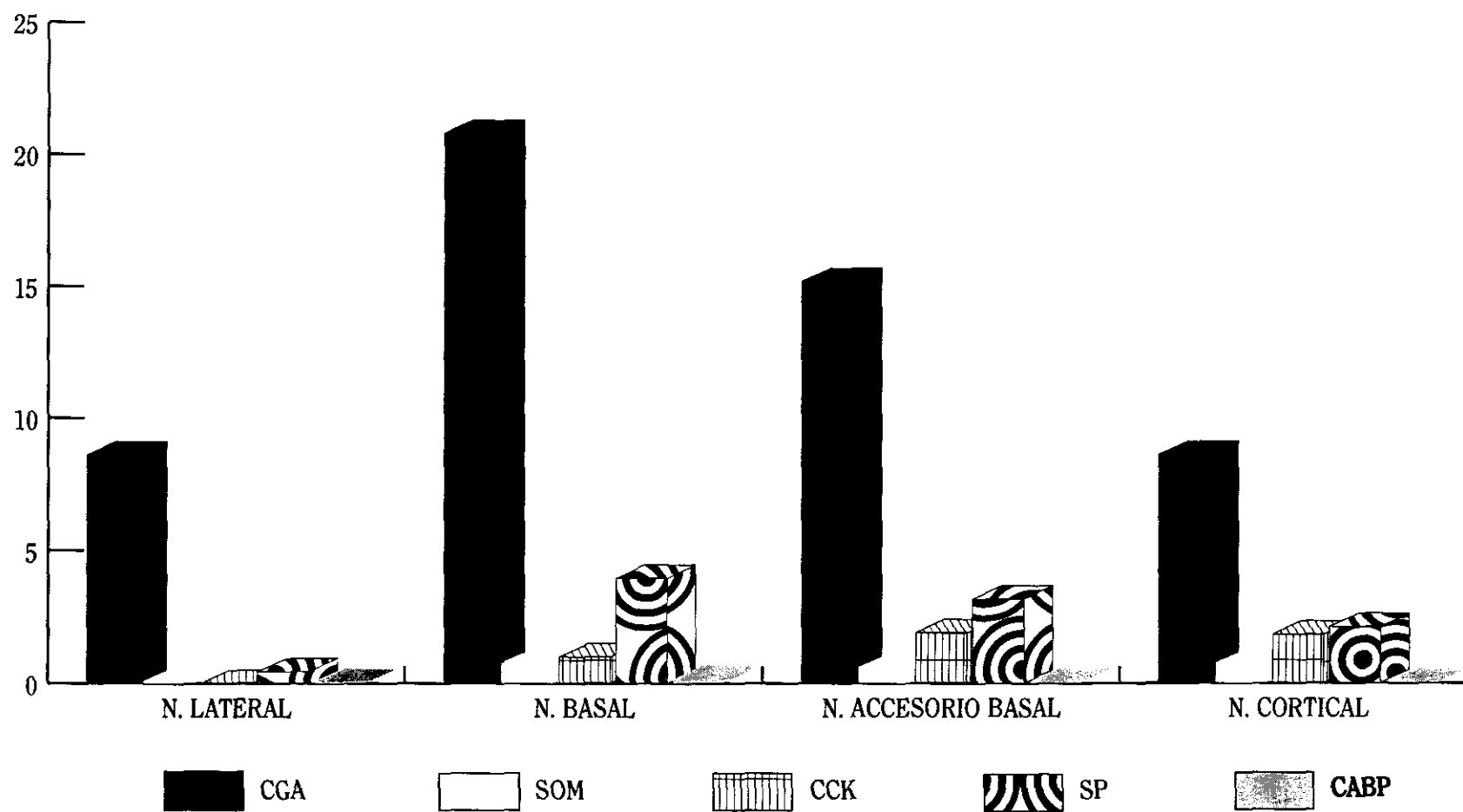
	MEDIA	DE.	N
CgA	8,63	4,08	5
CCK	1,83	2,20	5
CABP	0,03	0,07	5
SP	2,12	2,12	5
SOM	0,78	1,14	5
RC	5,34	3,57	5

CgA: Cromogranina; **CCK:** Colecistoquinina; **CABP:** Calbindina; **SP:** Sustancia P;

SOM: Somastotatina; **RC:** Rojo Congo; **DE:** Desviación estandar; **N:** Número de casos.

Al hacer comparación de medias múltiple encontramos diferencia significativa ($p < 0,01$) al comparar CgA con los otros péptidos.

PLACAS EN NUCLEOS AMIGDALINOS



CROMOGRAMA EN LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER

CORTEZA ENTORRINAL

Cromogranina A. Las placas están en las capas V-VI (Fig.30), haciéndose más superficiales según nos lateralizamos y con neuritas más pequeñas. Lo mismo que en la amígdala, al contrateñir con Rojo Congo vemos que cada núcleo amiloideo está rodeado por neuritas con Cromogranina A, pero algunos conglomerados de neuritas no tienen amiloide asociado, sólo el 98% (tabla XXIII).

Si comparamos el número de placas que contienen CgA con las que se tiñen con plata, placas difusas, encontramos que con plata el número de placas es ligeramente mayor y están distribuidas fundamentalmente en la capa III (tabla XXIII).

TABLA XXIII

PLACAS EN UNA BANDA DE 1 mm. DE ANCHO
Y EN TODA LA PROFUNDIDAD DE LA CORTEZA ENTORRINAL CON:
CgA, ROJO CONGO Y CAMPBELL

	MEDIA	DE.	N
CgA	15,118	19,9163	5
RC	14,9234	16,9364	5
AG	22,3676	35,6079	4

CgA: Cromogranina; RC: Rojo Congo; AG : Plata; Método de Campbell: DE Desviación estandar; N: Número de casos.

Somatostatina.- Se ven muy pocas placas, el 15 de las encontradas con Cromogranina A, y están en las capas profundas (tabla XXIV) (Fig.31). Tienen pocas neuritas dando la sensación de ser un ovillo de fibras.

Colecistoquinina.- Las placas son escasas, 5% de las encontradas con Cromogranina A, sin predominio aparente por una capa. (tabla XXIV) (Fig.33).

Sustancia P.- Las placas representan el 7% de las encontradas con Cromogranina A, y están en las capas profundas (tabla XXIV) (Fig.32).

Calbindina.- Las placas son muy escasas, el 0,4% de las encontradas con Cromogranina A, y parecen un pelotón de fibras arrosariadas (tabla XXIV) (Fig.34).

TABLA XXIV

**PLACAS CON CgA EN RELACION A OTROS PEPTIDOS
EN UNA BANDA DE 1 mm. DE ANCHO
Y EN TODA LA PROFUNDIDAD DE LA CORTEZA ENTORRINAL**

	MEDIA	DE.	N
CgA	15,12	19,92	5
CCK	0,78	0,90	5
CABP	0,07	0,15	5
SP	1,18	1,53	5
SOM	0,18	0,29	5

CgA: Cromogranina; **CCK:** Colecistoquinina; **CABP:** Calbindina; **SP:** Sustancia P;
SOM: Somastotatina; **DE:** Desviación estandar; **N:** Número de casos.

Hemos visto que una serie de péptidos están presentes en las neuritas de las placas seniles y que excepto en el caso de la CgA su número es muy escaso. Se había argumentado que la cantidad de neuritas presentes en las placas únicamente reflejaba la abundancia de neuronas con dichos péptidos. Sin embargo en nuestro estudio vemos que las neuronas con CgA no son muy abundantes en la amígdala, representando solo un 2% del total, y que por el contrario son mucho más abundantes las células con CaBP sin verse reflejado en el número de placas con dicho péptido. Para confirmar la primera hipótesis que postula que la incorporación de neuritas a las placas es selectiva, se ha calculado el cociente entre el número de placas y el número de células marcadas con cada péptido en la amígdala, y en la corteza entorrinal, **objetivo 3**. En la amígdala el cociente de la CgA es 1.000 veces superior al de la CaBP y 10 veces superior al de la Somatostatina, CCK y SP (tablas XXV a XXVIII). En la corteza entorrinal la diferencia es menor (tabla XXIX), siendo el de la CgA solamente 100 veces superior al de la Calbindina.

TABLA XXV

NUCLEO LATERAL
RELACION PLACAS / CELULAS CON LOS DIFERENTES PEPTIDOS

	MEDIA	DE.	N
CgA	1,07	0,87	5
CCK	0	0	5
CABP	0,001	0,002	5
SP	0,08	0,107	5
SOM	0,02	0,02	5

CgA: Cromogranina; **CCK:** Colecistoquinina; **CABP:** Calbindina; **SP:** Sustancia P;
SOM: Somatostatina; **DE:** Desviación estándar; **N:** Número de casos.

Al hacer comparación de medias múltiple encontramos valores significativos, ($p < 0,05$) al comparar CgA con SP y $p < 0,01$ al comparar CgA con el resto de los péptidos.

TABLA XXVI

NUCLEO BASAL
RELACION PLACAS / CELULAS CON LOS DIFERENTES PEPTIDOS

	MEDIA	DE.	N
CgA	2,26	0,69	5
CCK	0,07	0,06	5
CABP	0,003	0,003	5
SP	0,96	0,51	5
SOM	0,13	0,14	5

CgA: Cromogranina; **CCK:** Colecistoquinina; **CABP:** Calbindina; **SP:** Sustancia P;

SOM: Somastotatina; **DE:** Desviación estandar; **N:** Número de casos;

Al hacer comparación de medias múltiple encontramos valores significativos, ($p < 0,01$) al comparar CgA con el resto de los péptidos. $p < 0,05$ entre SP y CCK y CABP.

TABLA XXVII

NUCLEO ACCESORIO BASAL
RELACION PLACAS / CELULAS CON LOS DIFERENTES PEPTIDOS

	MEDIA	DE.	N
CgA	1,77	0,38	5
CCK	0,17	0,15	5
CABP	0,002	0,003	5
SP	0,62	0,66	5
SOM	0,06	0,07	5

CgA: Cromogranina; **CCK:** Colecistoquinina; **CABP:** Calbindina; **SP:** Sustancia P;
SOM: Somastotatina; **DE:** Desviación estandar; **N:** Número de casos.

Al hacer comparación de medias múltiple encontramos diferencia significativa ($p < 0,01$) al comparar CgA con los otros péptidos.

TABLA XXVIII

NUCLEO CORTICAL
RELACION PLACAS / CELULAS CON LOS DIFERENTES PEPTIDOS

	MEDIA	DE.	N
CgA	0,59	0,43	5
CCK	0,22	0,36	5
CABP	0,0007	0,002	5
SP	0,27	0,23	5
SOM	0,14	0,22	5

CgA: Cromogranina; **CCK:** Colecistoquinina; **CABP:** Calbindina; **SP:** Sustancia P;
SOM: Somastotatina; **DE:** Desviación estandar; **N:** Número de casos.

En esta tabla no obtenemos diferencia significativa al hacer comparación de medias múltiples.

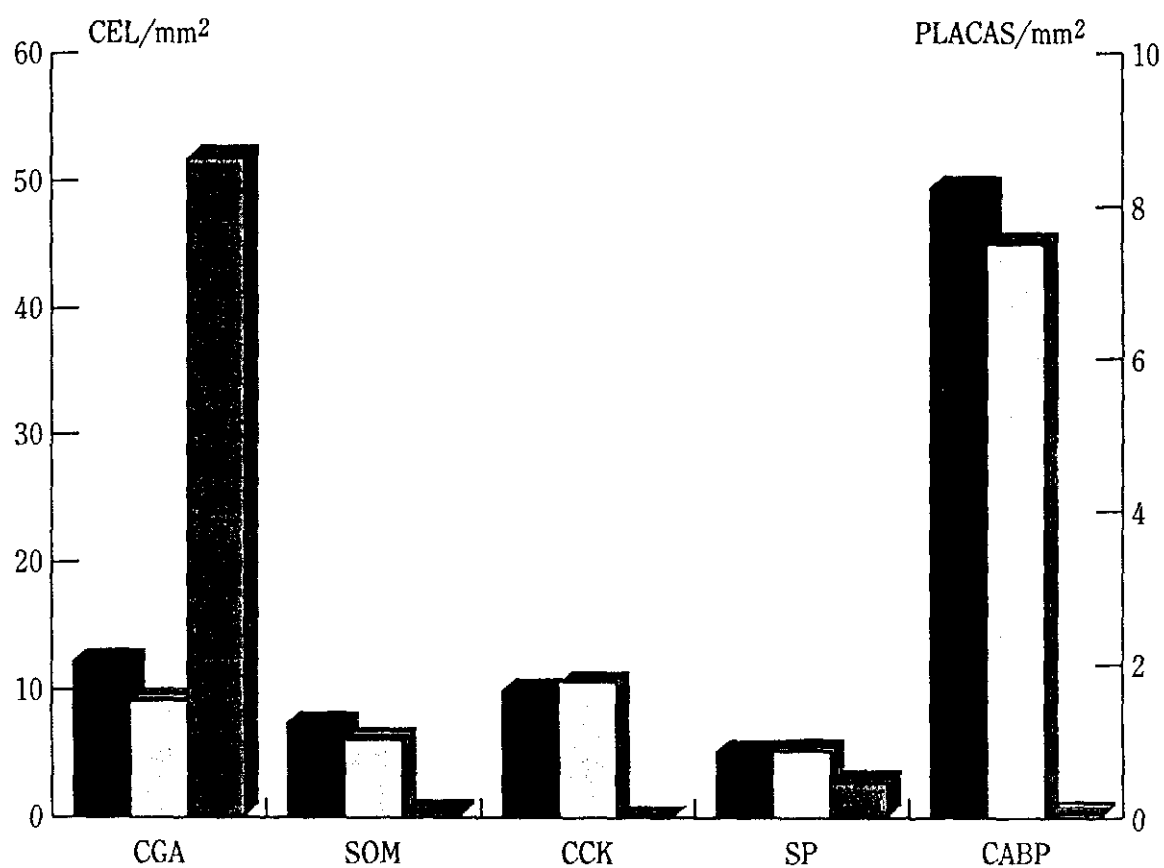
TABLA XXIX

RELACION PLACAS / CELULAS CON LOS DIFERENTES PEPTIDOS
EN UNA BANDA DE 1mm. DE ANCHO
Y EN TODA LA PROFUNDIDAD DE LA CORTEZA ENTORRINAL

	MEDIA	DE.	N
CgA	0,0755	0,0781	5
CCK	0,0153	0,0187	5
CABP	0,0080	0,0178	5
SP	0,0194	0,0238	5
SOM	0,0031	0,0051	5

CgA: Cromogranina; **CCK:** Colecistoquinina; **CABP:** Calbindina; **SP:** Sustancia P;
SOM: Somastotatina; **DE:** Desviación estandar; **N:** Número de casos.

NUCLEO LATERAL

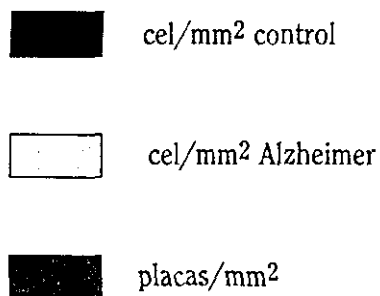
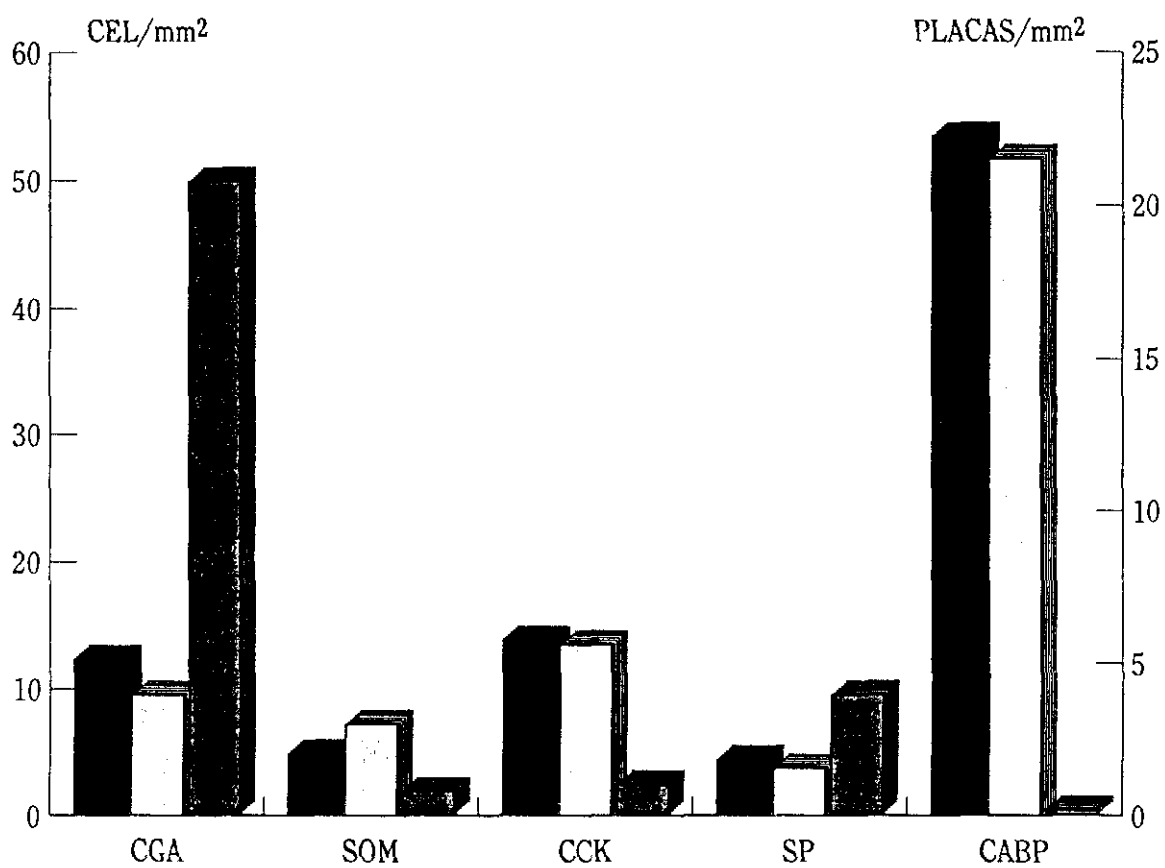


cel/mm² control

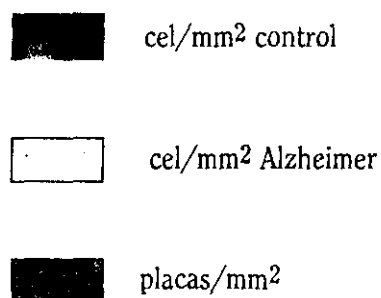
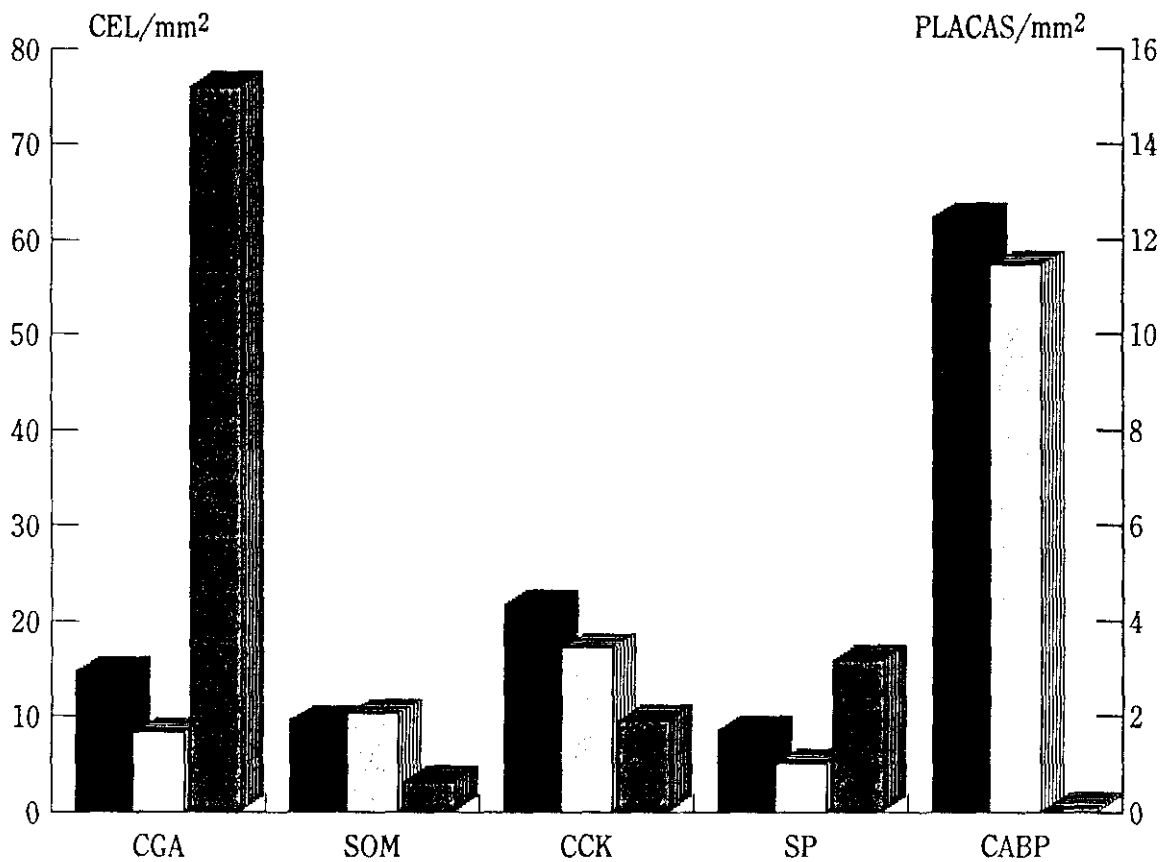
cel/mm² Alzheimer

placas/mm²

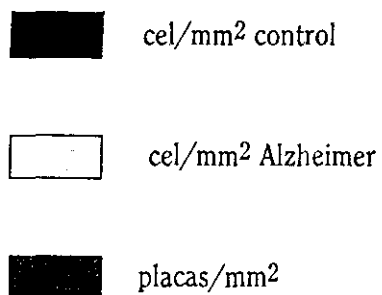
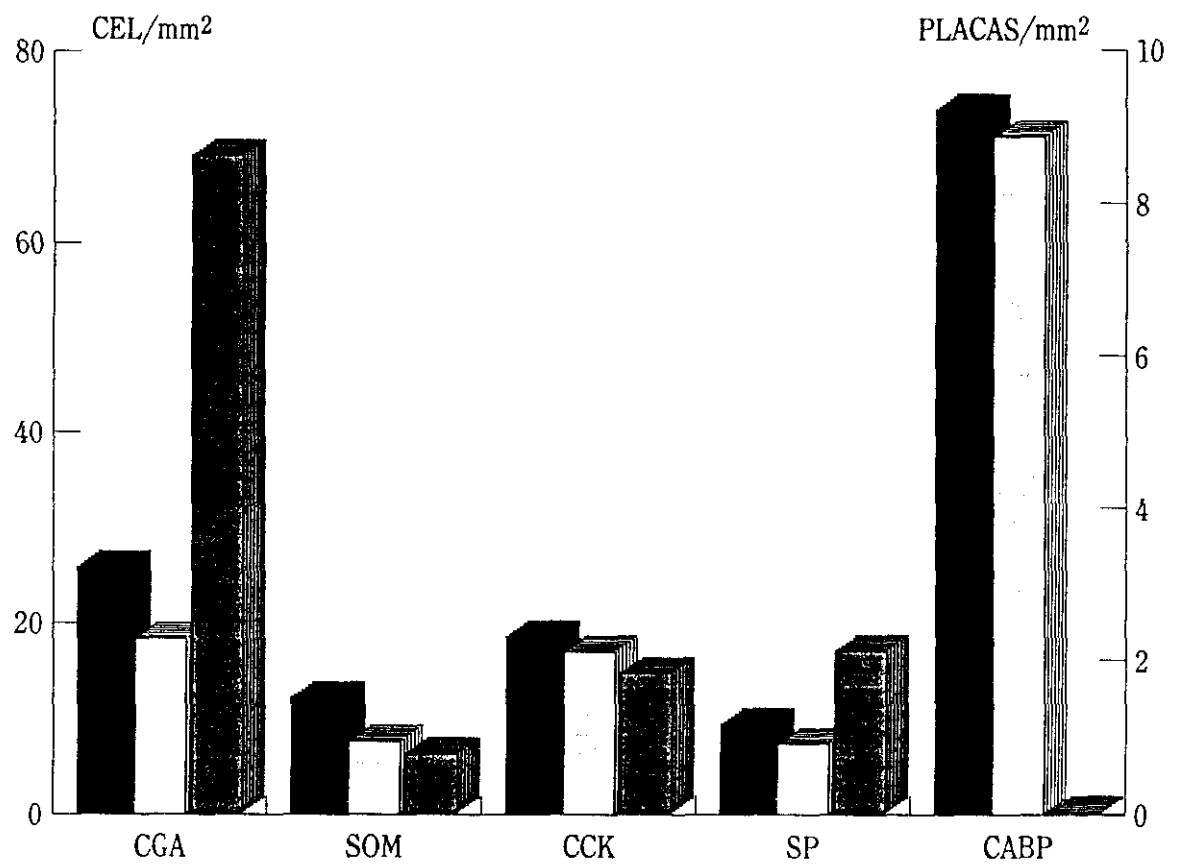
NUCLEO BASAL



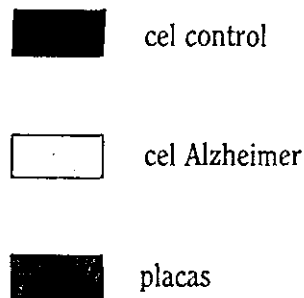
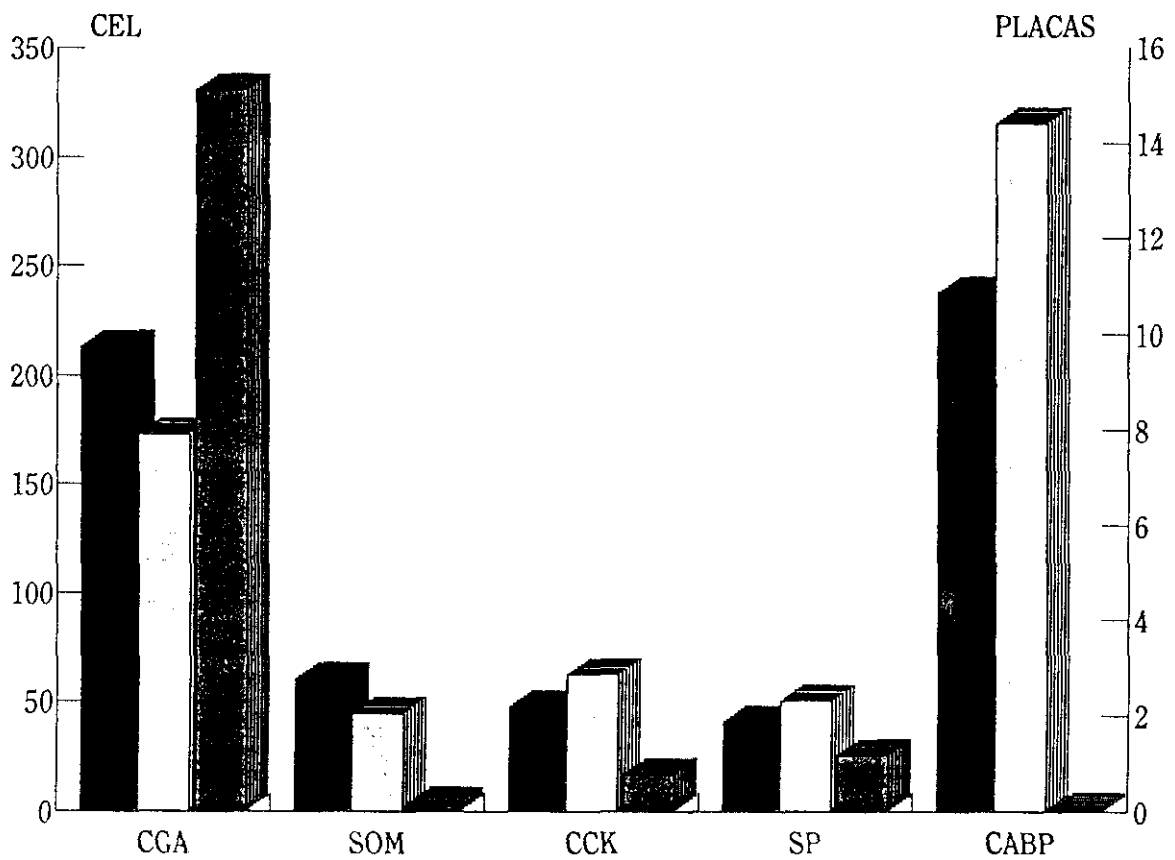
NUCLEO ACCESORIO BASAL

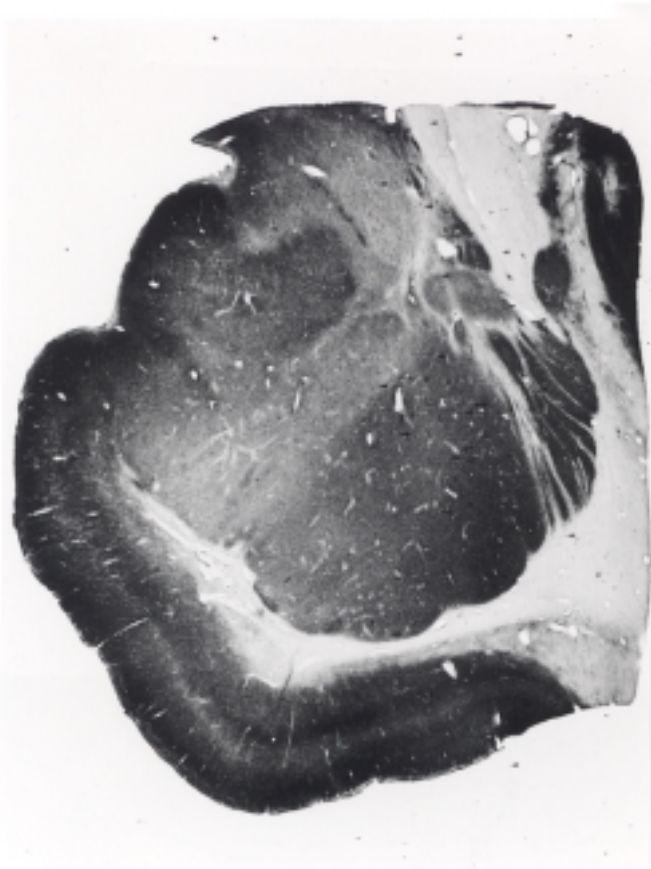


NUCLEO CORTICAL

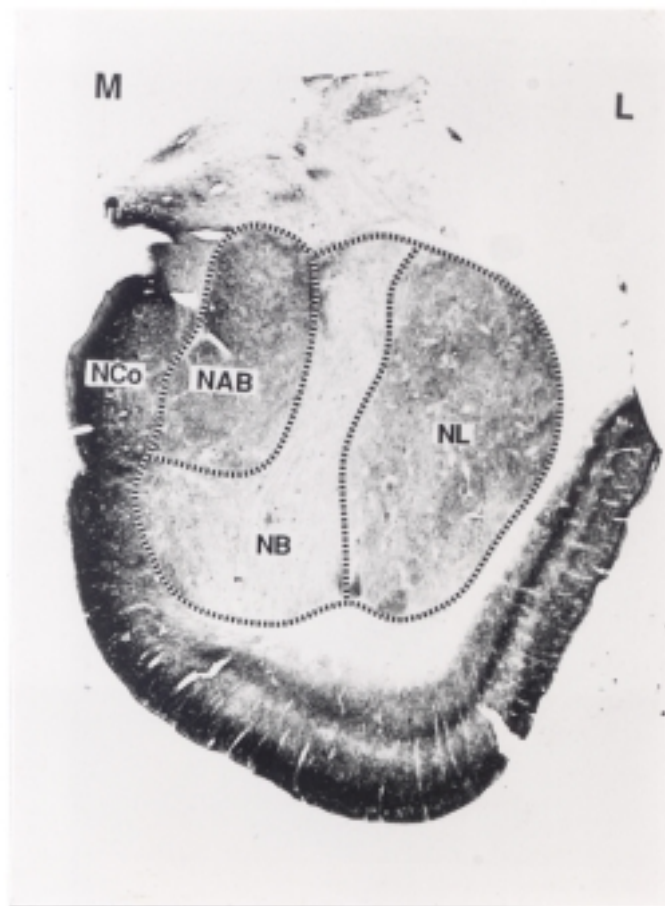


CELULAS Y PLACAS EN UNA BANDA DE 1MM DE ANCHO Y EN TODA LA PROFUNDIDAD DE LA CORTEZA ENTORRINAL

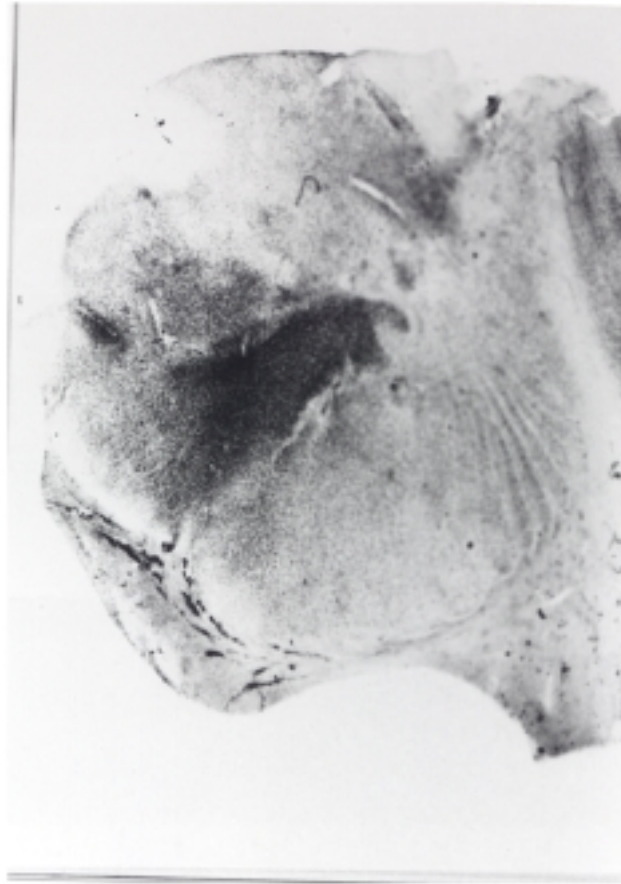




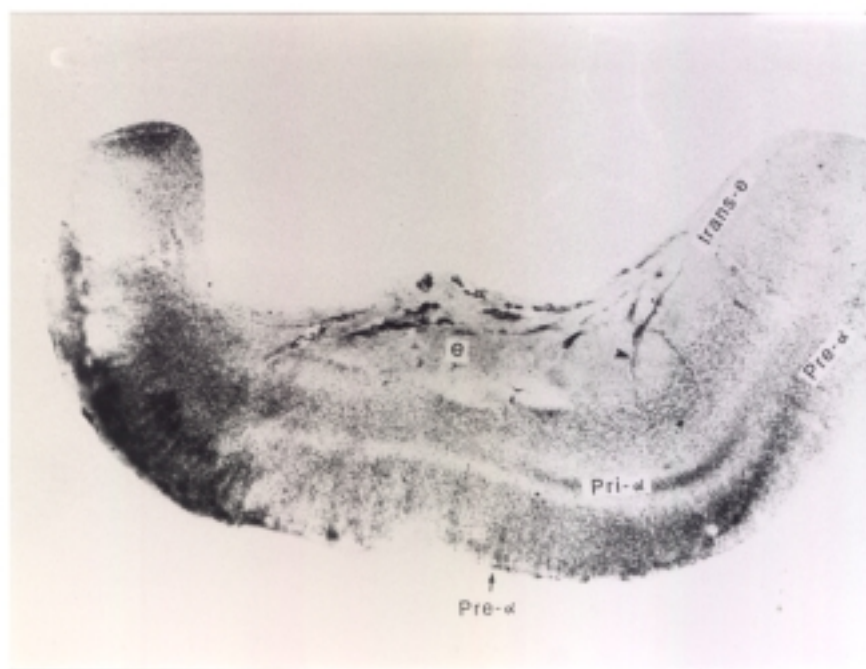
1.- Amígdala y corteza entorrinal de un paciente con Enfermedad de Alzheimer teñida con CCK, 50 micras.



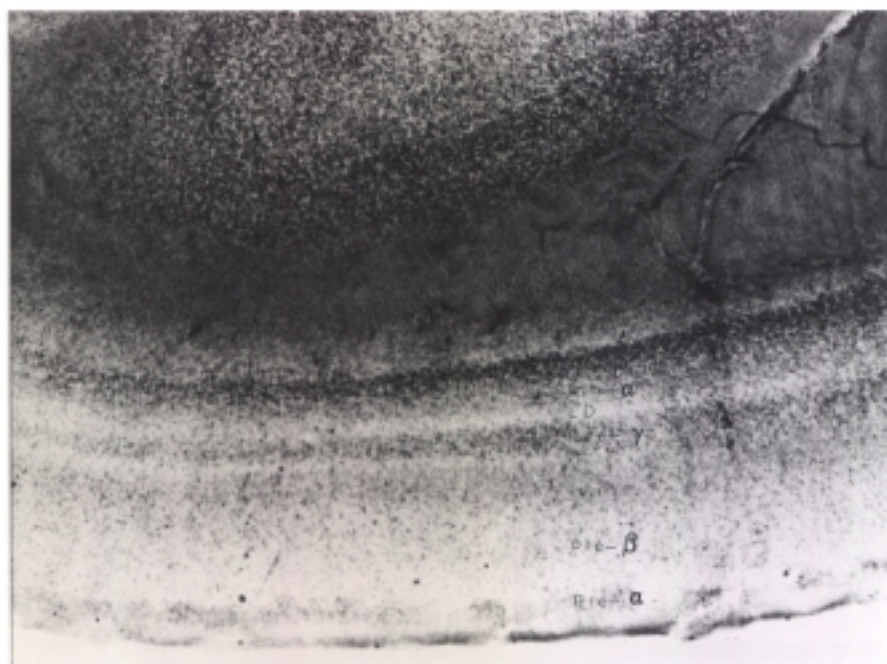
2.-División nuclear en la amígdala del caso anterior.



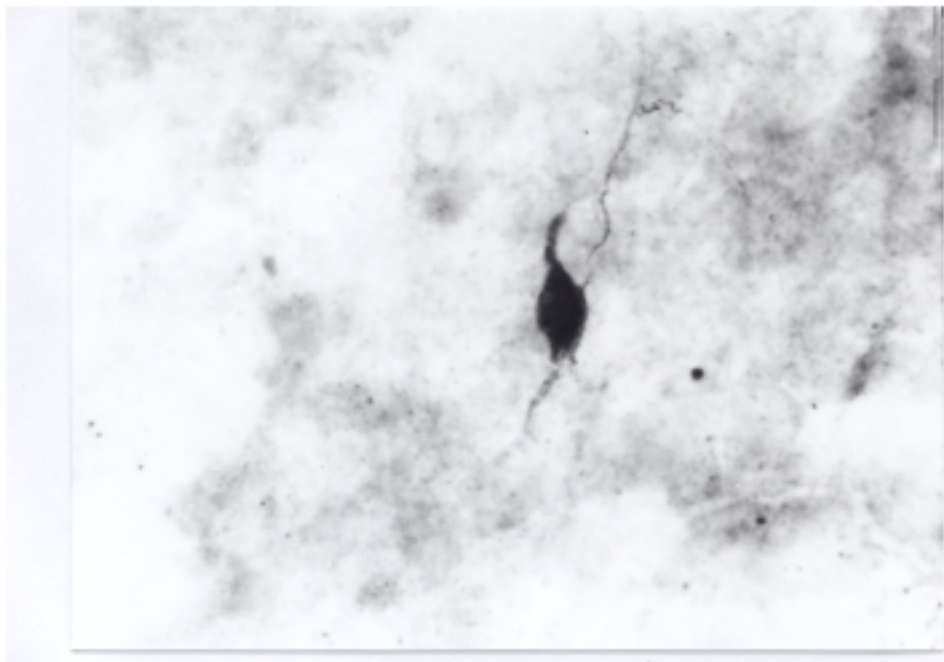
3.- Amígdala de paciente con Enfermedad de Alzheimer, el mismo caso de las figuras anteriores. Sección de 400 micras, tinción de Braak. Se aprecia la hiperpigmentación del núcleo basal.



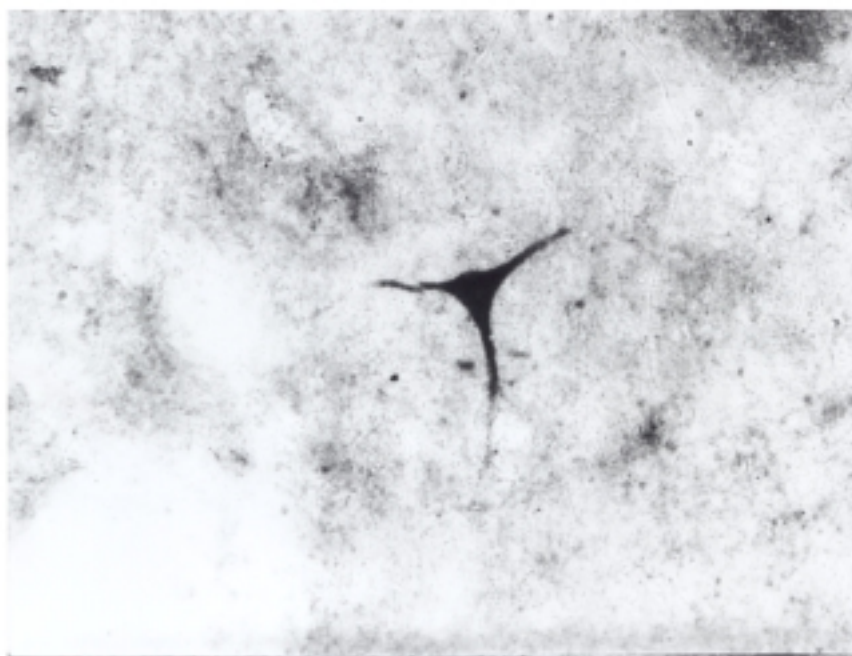
4.-Corteza entorrinal de paciente con Enfermedad de Alzheimer, caso anterior. Sección de 400 micras con tinción de Braak. Se aprecia la capa pre-alfa y como se hace interna según se acerca a la zona transentorrinal.



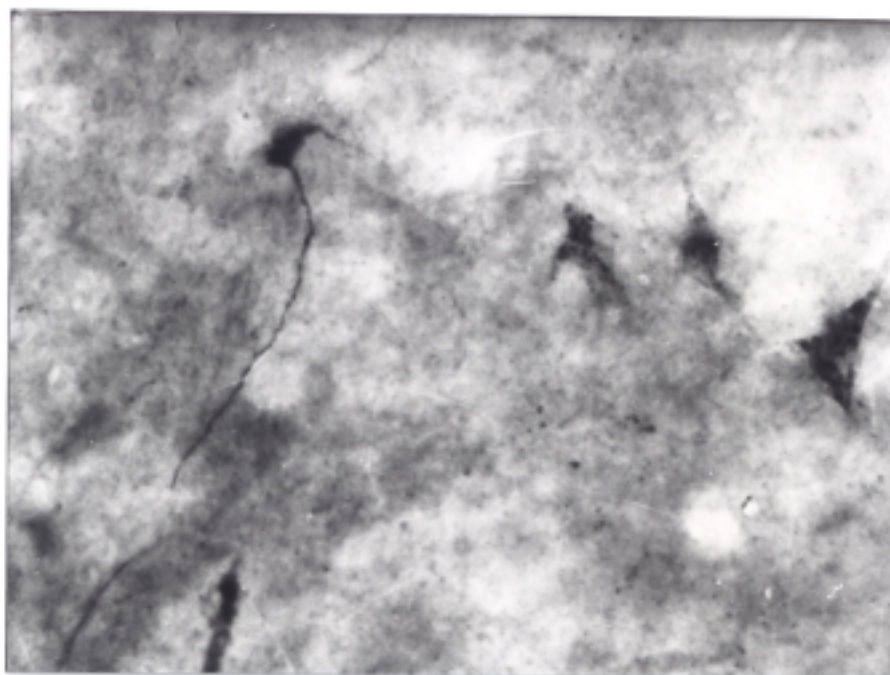
5.- Corteza entorrinal normal. Tinción de Braak, 400 micras. se aprecian las bandas pre-alfa, pre-beta, pre-gamma y por debajo de la dissecans las pri-alfa, pri-betagamma.



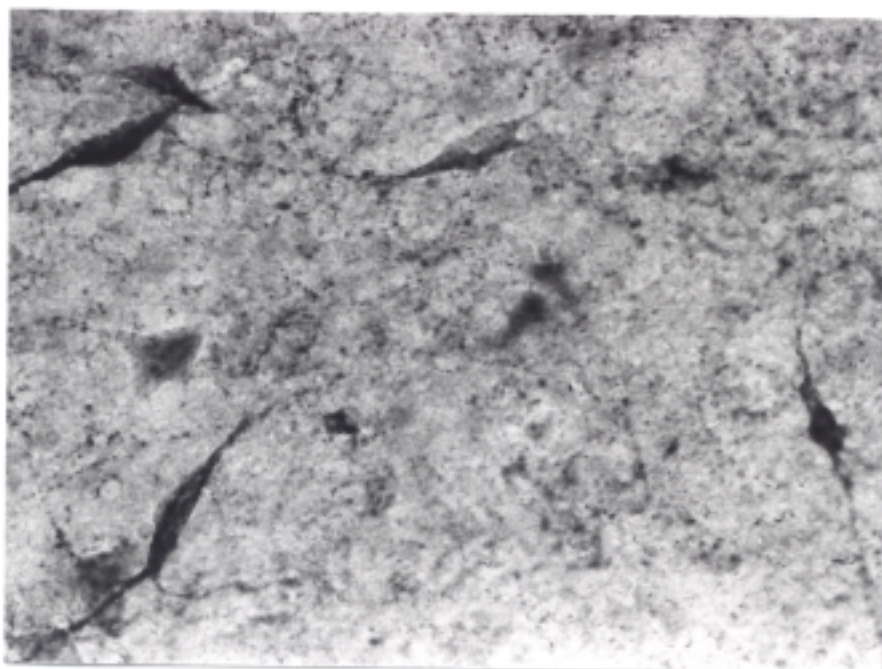
6.- Célula con CgA de forma fusiforme localizada entre los núcleos cortical y accesorio basal. Se visualiza el comienzo de los procesos. Sección congelada de 50 micras de grosor. 330 aumentos.



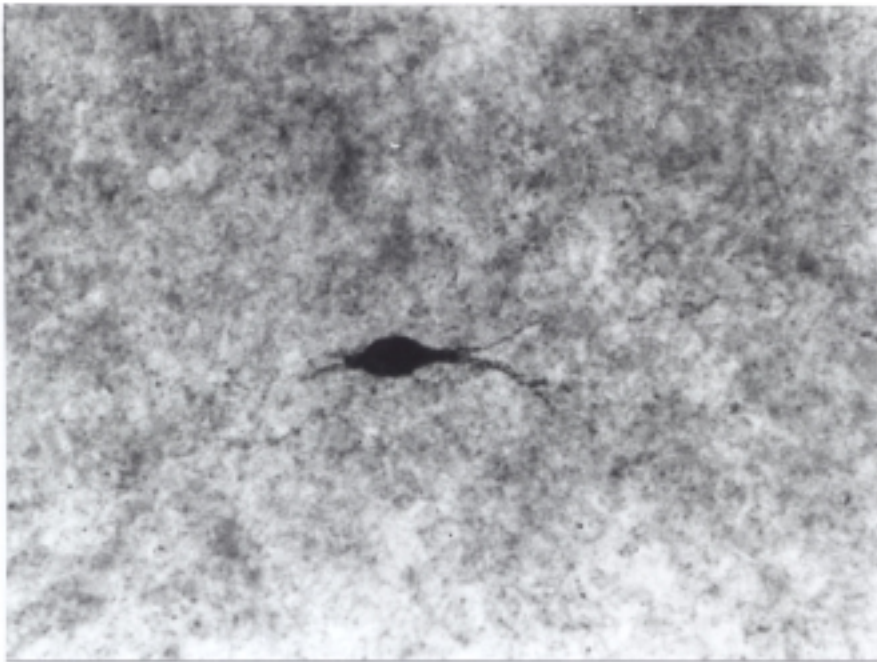
7.- Célula con CgA de forma piramidal, localizada en el núcleo basal. Como en la fig.6 se visualizan el comienzo de los procesos. Sección congelada de 50 micras de grosor. 330 aumentos.



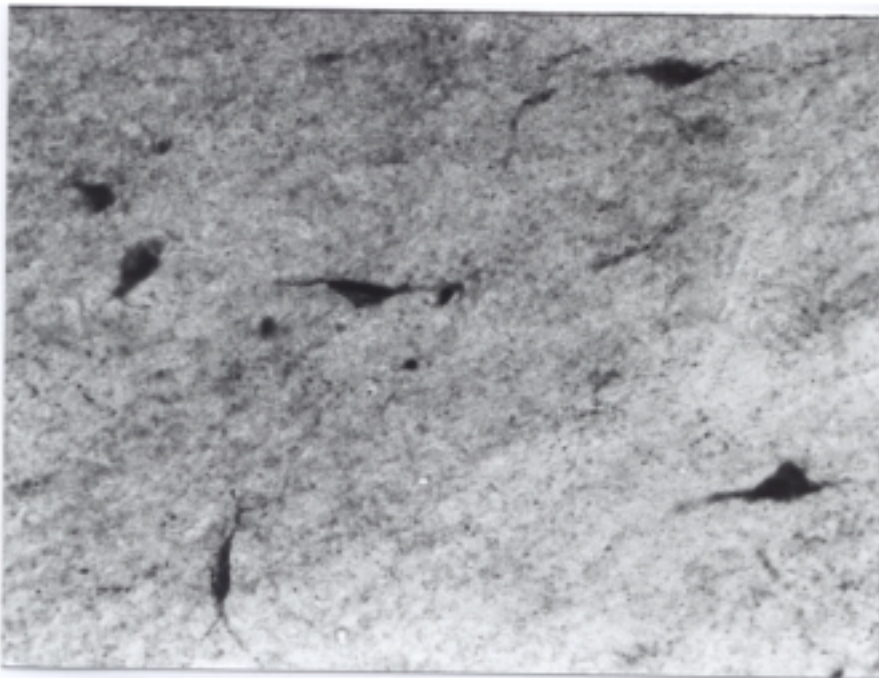
8.- Células de distinto tamaño y forma en el núcleo cortical con CgA, en todas ellas se inicia el árbol dendrítico. El punteado que se observa en el neuropilo corresponde a campos terminales. sección de 50 micras de grosor. 330 aumentos.



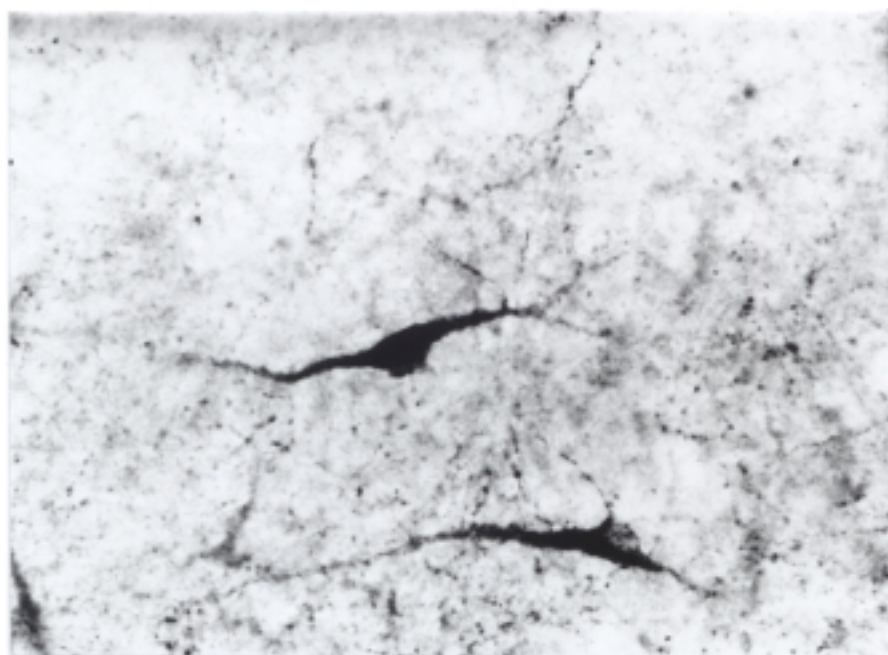
9.- Células con Somatostatina en el núcleo cortical. Aparecen células de distintos tamaños y formas, así como distinta intensidad de la tinción. Sección de 50 micras. 330 aumentos.



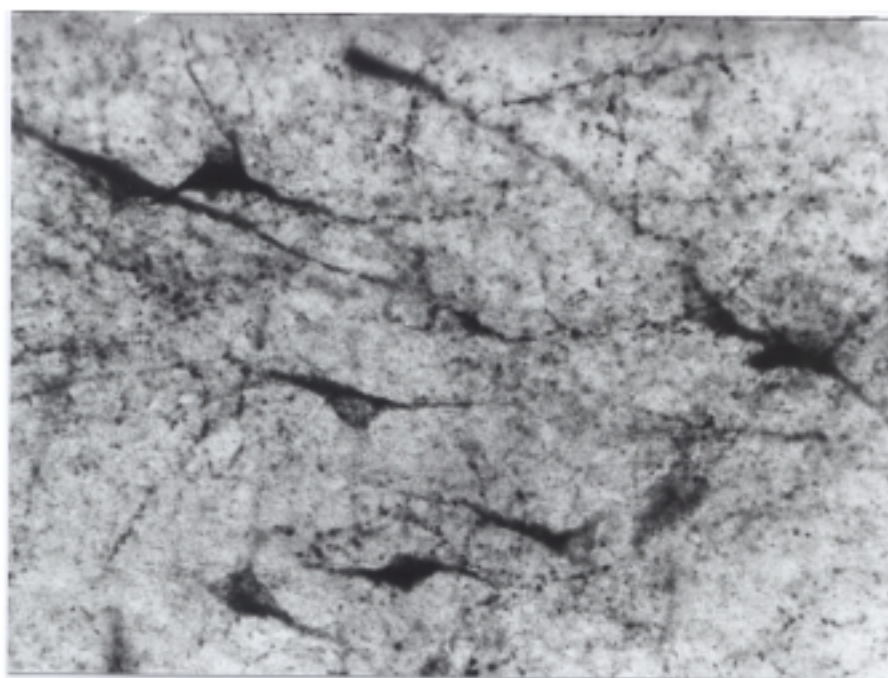
10.-Célula con CCK de forma fusiforme localizada en el núcleo lateral. Sección de 50 micras. 330 aumentos.



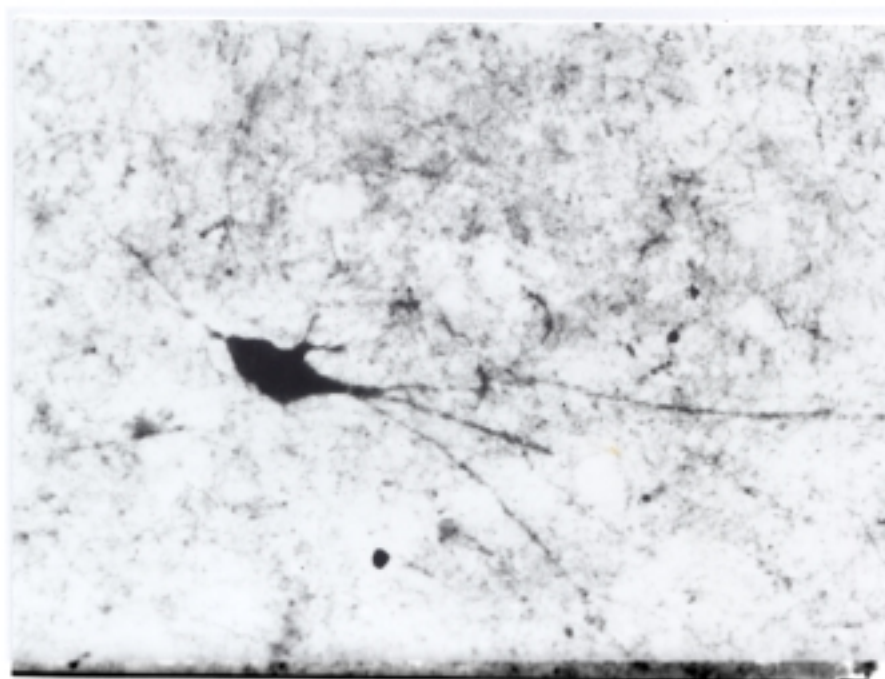
11.- Células con CCK en el núcleo cortical. La mayoría de morfología piramidal. Sección de 50 micras, 330 aumentos.



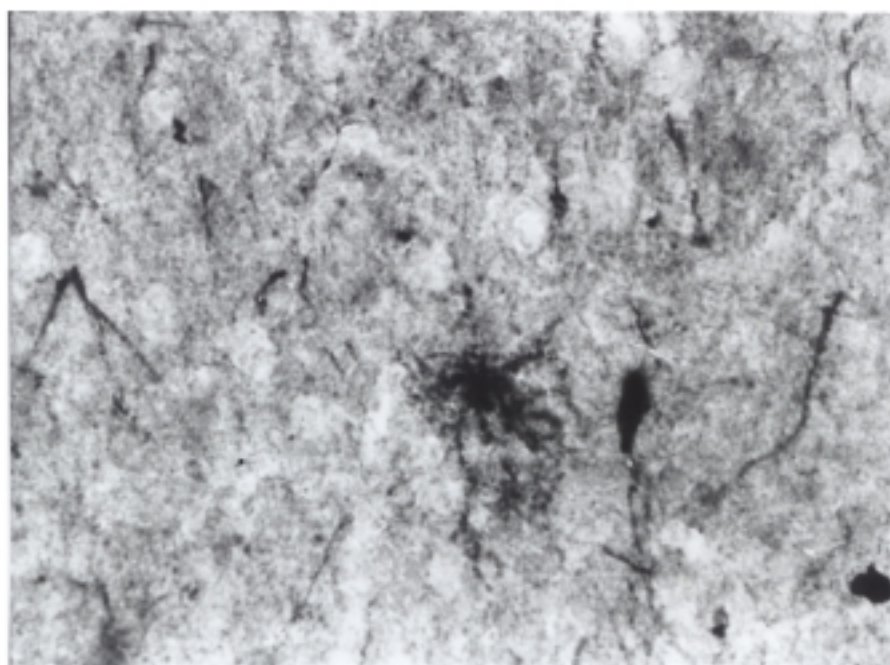
12.- Células con SP en el núcleo cortical. Se ven numerosas fibras. sección de 50 micras, 330 aumentos.



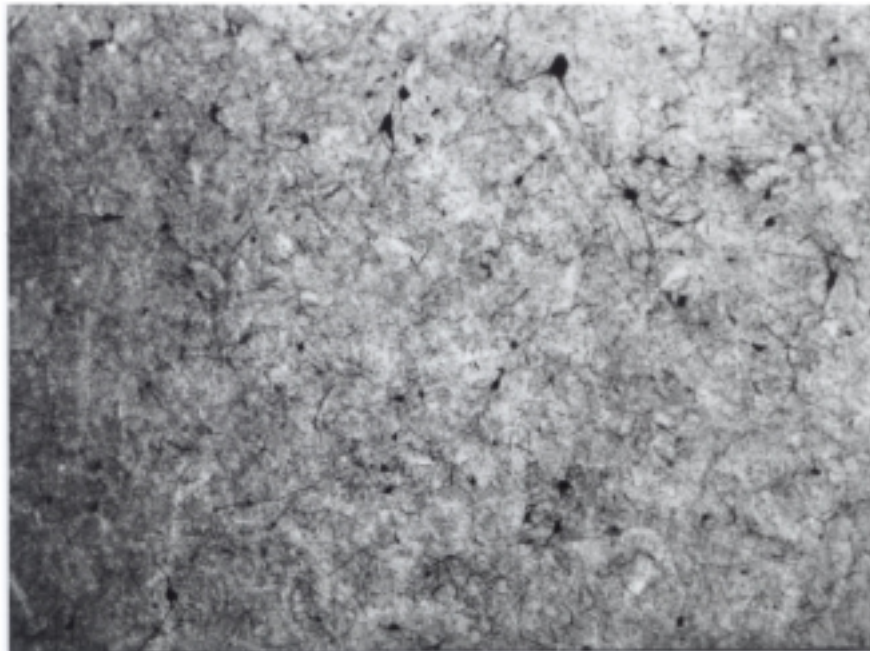
13.- Células con SP en el núcleo cortical, se ven numerosas fibras. Sección de 50 micras, 330 aumentos.



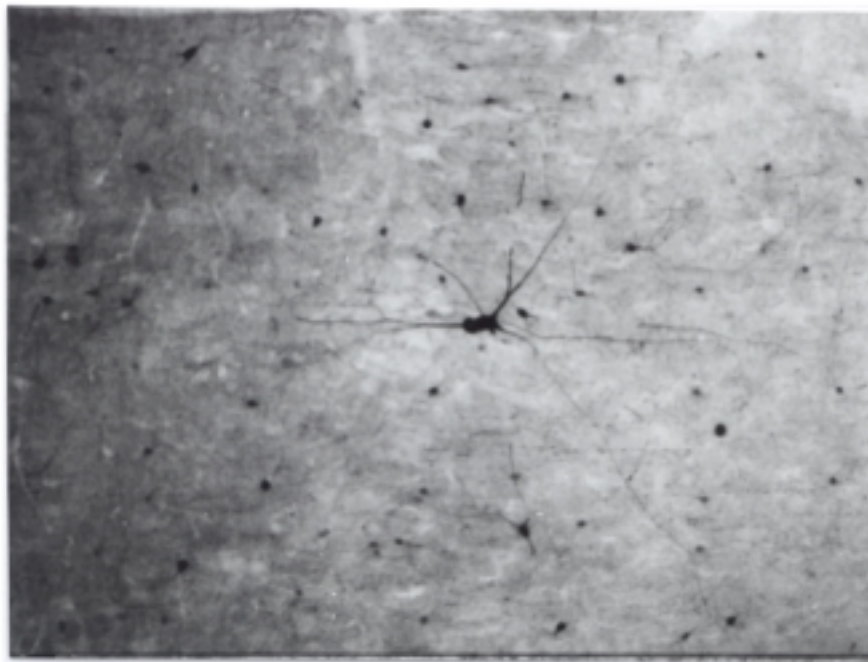
14.- Célula con CaBP en el núcleo basal. Se observa la larga tinción de los procesos. Sección de 50 micras, 330 aumentos.



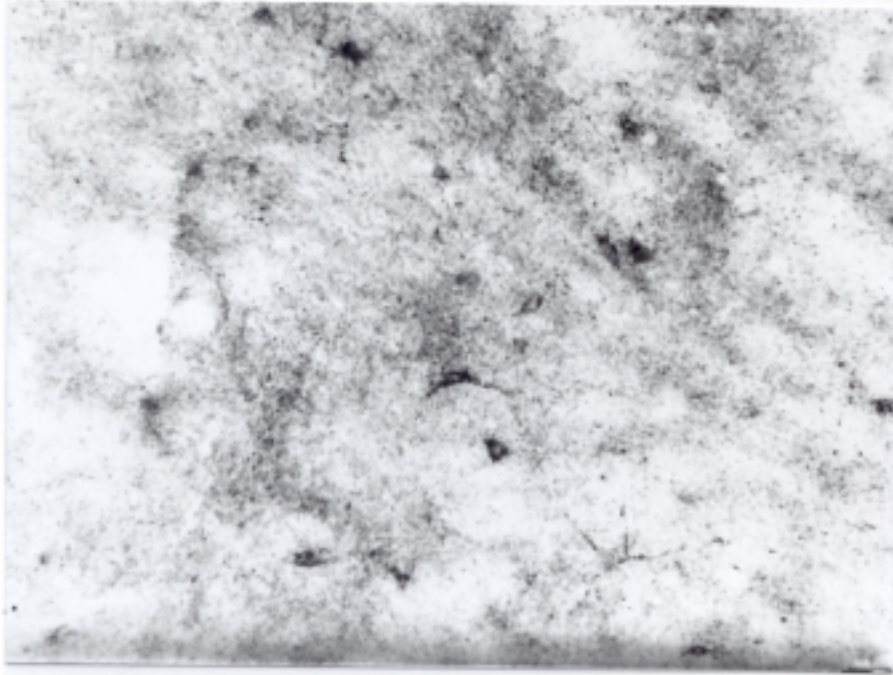
15.- Célula con CaBP de forma estrellada localizada en la parte ventral del núcleo basal. Sección de 50 micras, 330 aumentos.



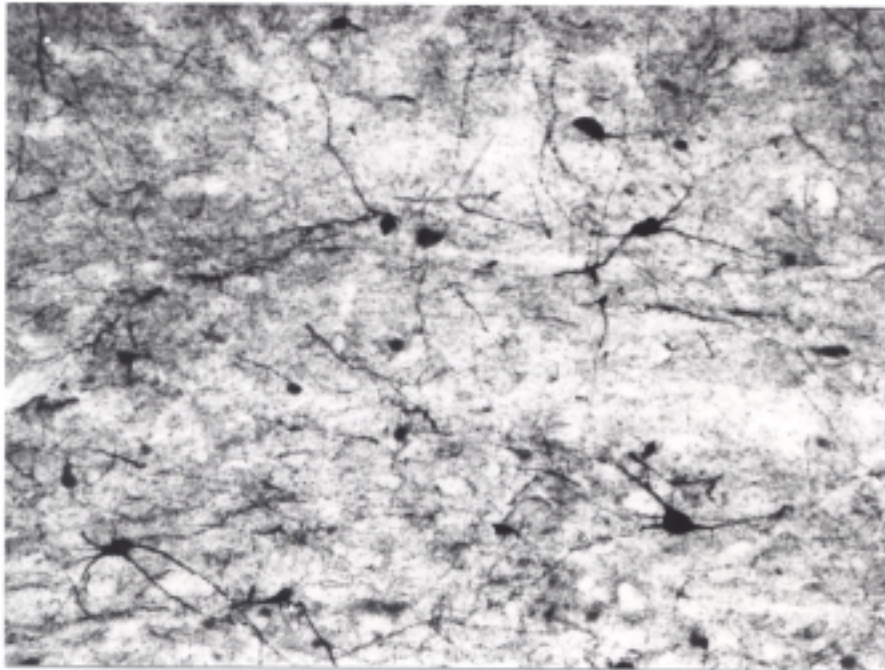
16.- células con CaBP en el núcleo lateral. Se observa el polimorfismo y la diferente intensidad de tinción entre las células. Sección de 50 micras, 82,5 aumentos.



17.- Células con CaBP en corteza entorrinal. Como en la anterior se aprecia diferente intensidad de tinción, tamaño y forma entre las células. sección de 50 micras, 82,5 aumentos.



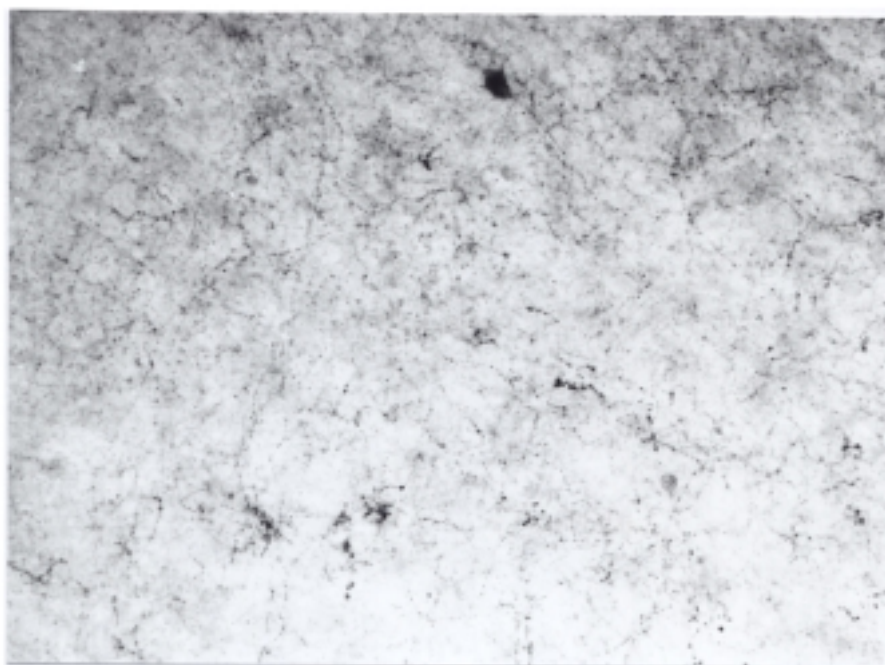
18.- Células con CgA.



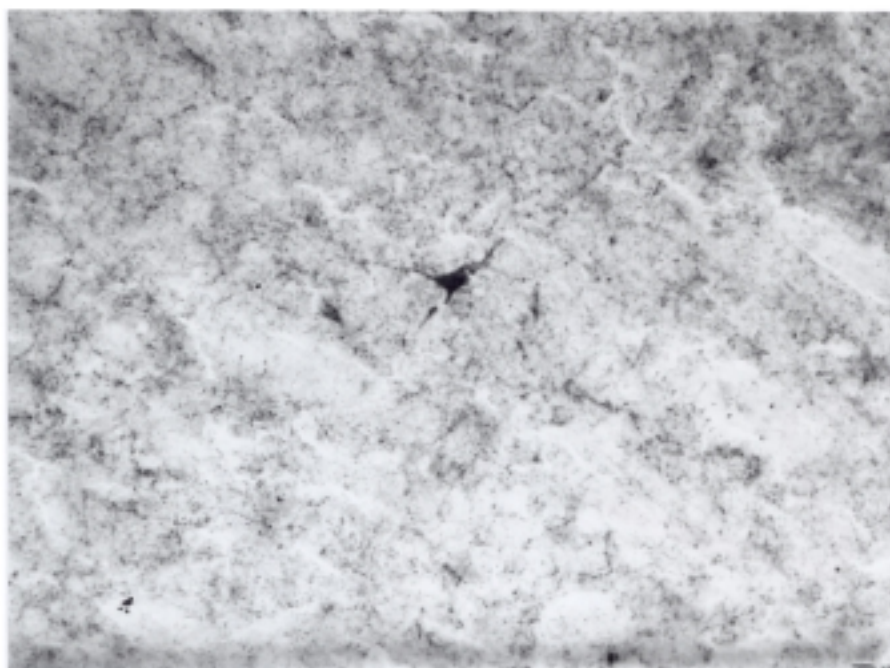
19.- Células con CaBP.



20.- Células con CCK.

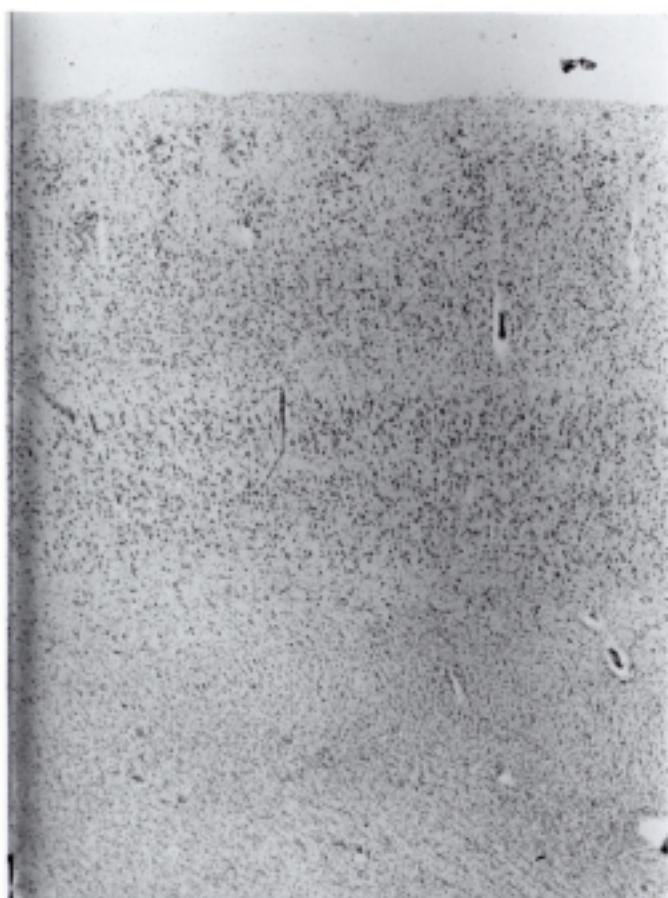


21.- Células con SP.



22.- Células con Som.

Las figuras 18,19,20,21 y 22 son el mismo caso, paciente normal, y en la misma zona del núcleo basal con 165 aumentos para comparar la diferente morfología, tamaño, número y patrón de tinción con los diferentes péptidos.



23.- Corteza
entorrinal normal
con tinción
de Nissl
en sección
de 20 micras y 16,5
aumentos.



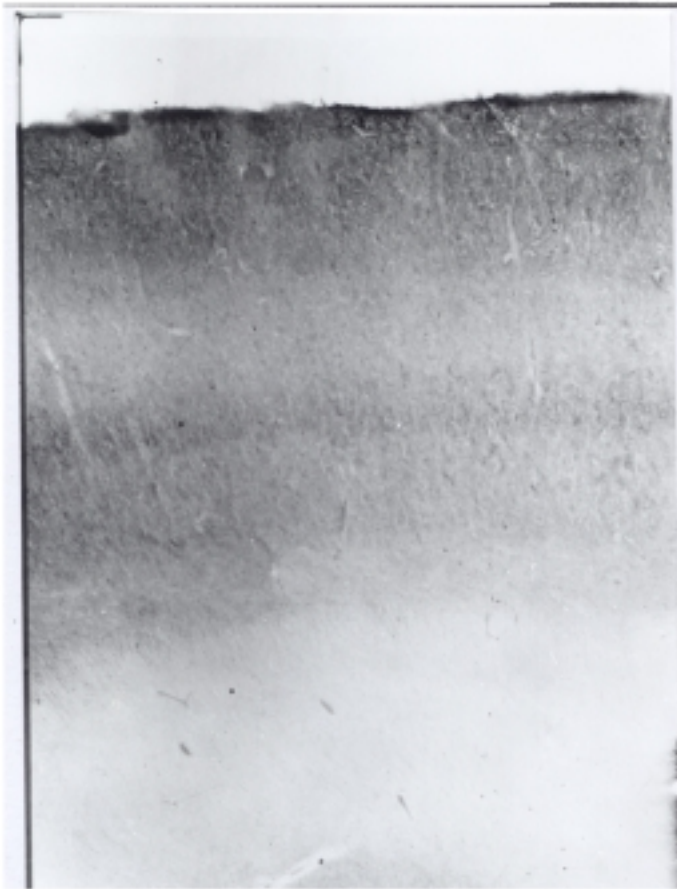
24.- El caso
de la figura
anterior, con
CgA. Sección
de 50 micras
con 16,5
aumentos.



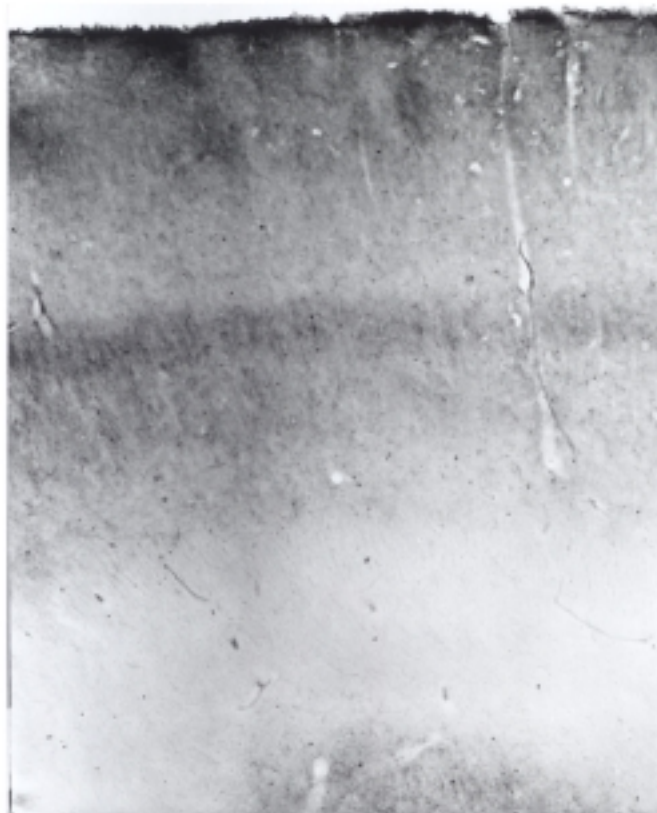
25.- El mismo caso
de la fig. 23, con
Som. Sección de
50 micras y 16,5
aumentos.



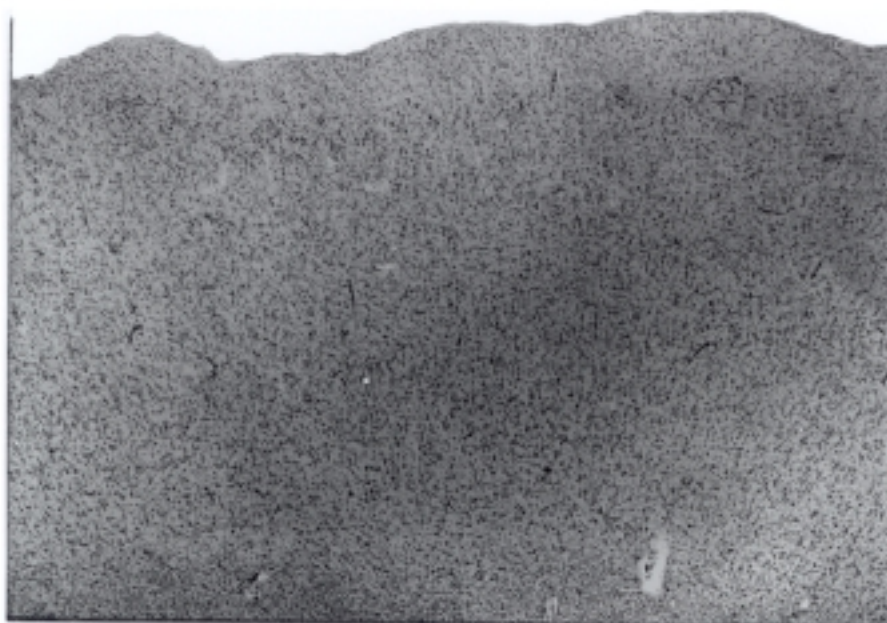
26.- La figura 23
pero con CaBP.
Sección de 50
micras y 16,5
aumentos.



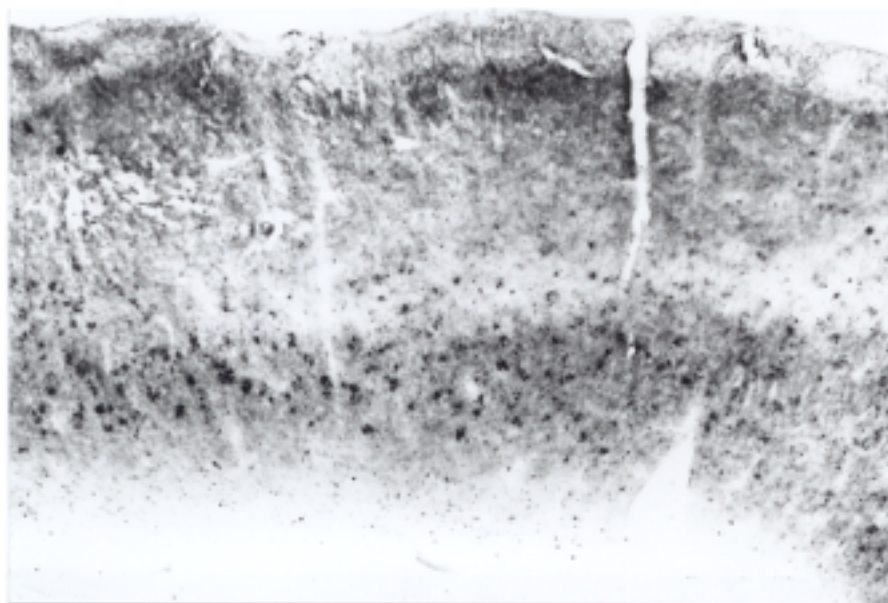
27.- Lo mismo
con CCK.
Sección de 50
micras y 16,5
aumentos.



28.- La misma
figura, con SP.
Sección de 50
micras y 16,5
aumentos.



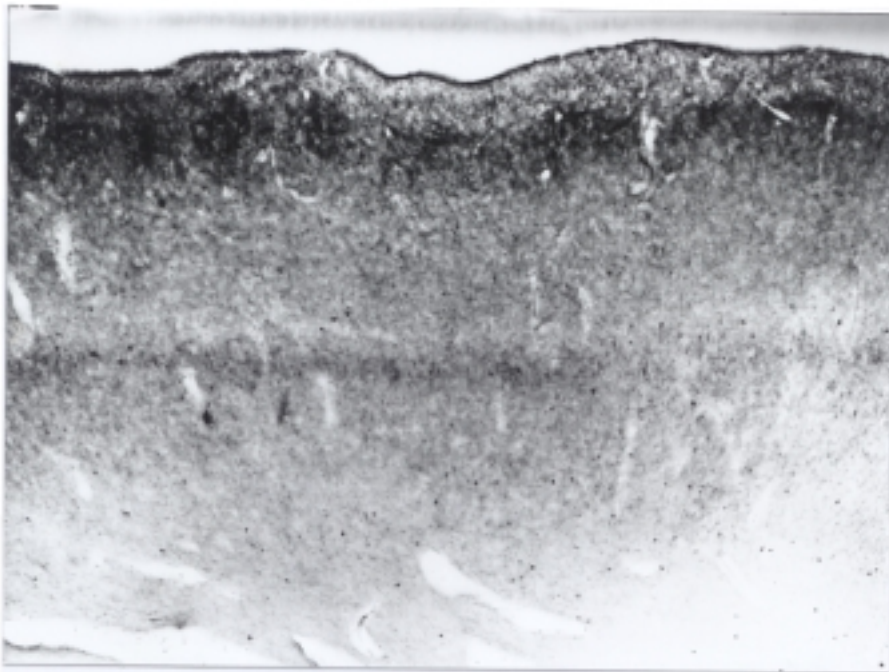
29.- Corteza entorrinal de paciente con Enfermedad de Alzheimer. Tinción de Nissal en sección de 20 micras con 16,5 aumentos. Se observa la gran desestructuración que hace difícil la delimitación de las diferentes capas.



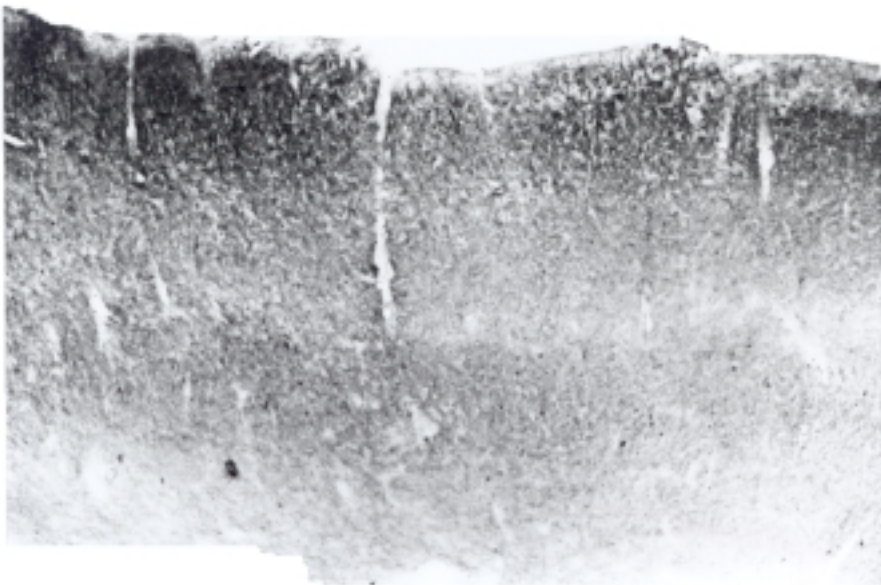
30.- El caso anterior con CgA. Sección de 50 micras y 16,5 aumentos.



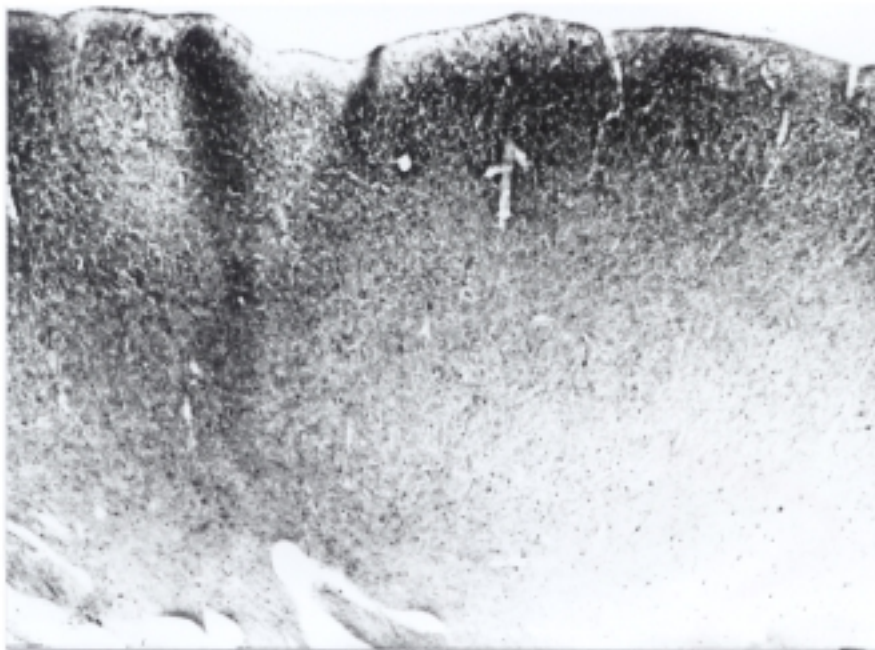
31.- El mismo caso con Som. Sección de 50 micras con 16,5 aumentos.



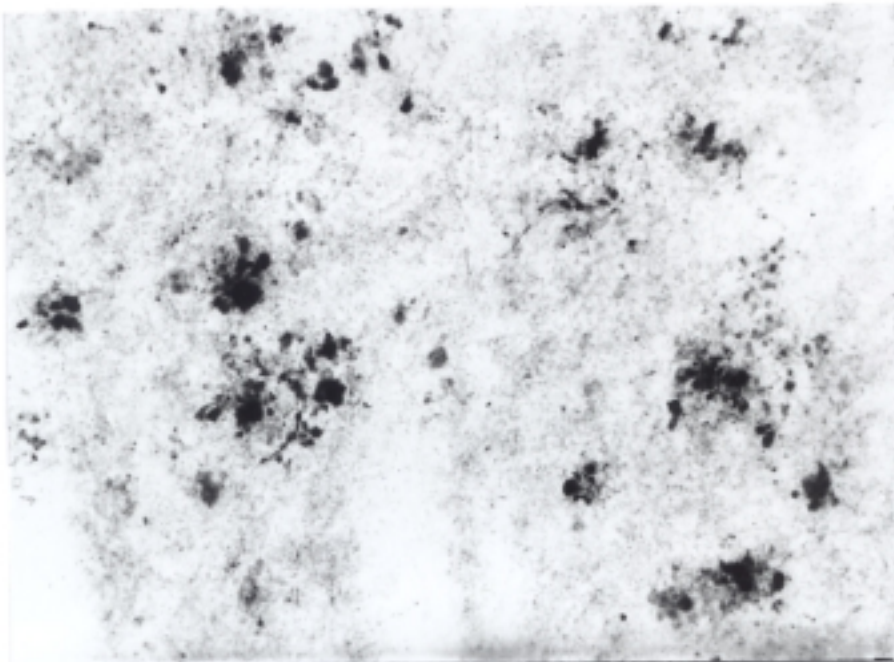
32.- La fig. 29 con SP. Sección de 50 micras con 16,5 aumentos.



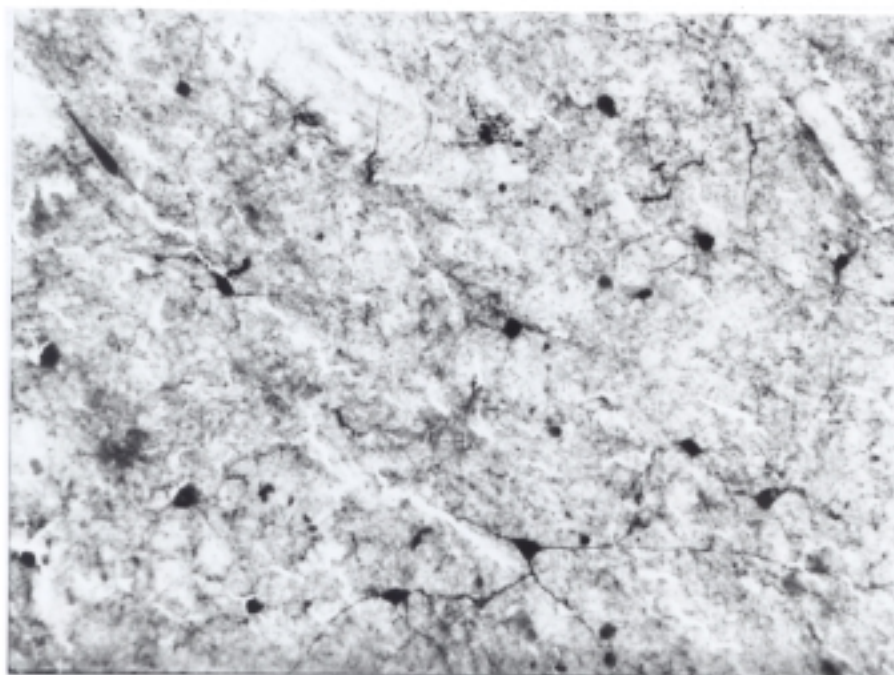
33.-El mismo caso, con CCK. Sección de 50 micras con 16,5 aumentos.



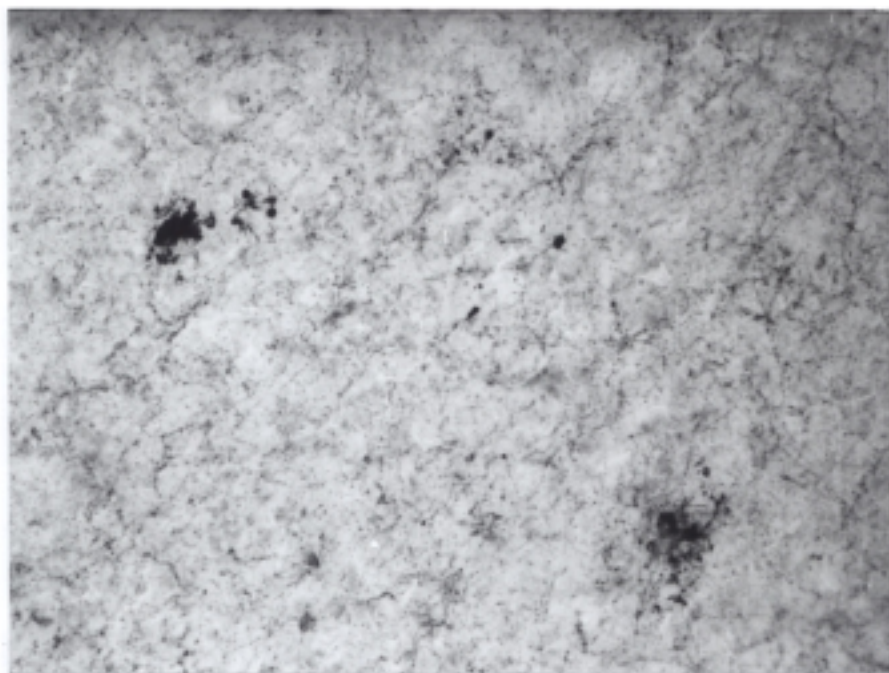
34.- El mismo caso de las anteriores figuras, pero con CalBP. Sección de 50 micras y 16,5 aumentos.



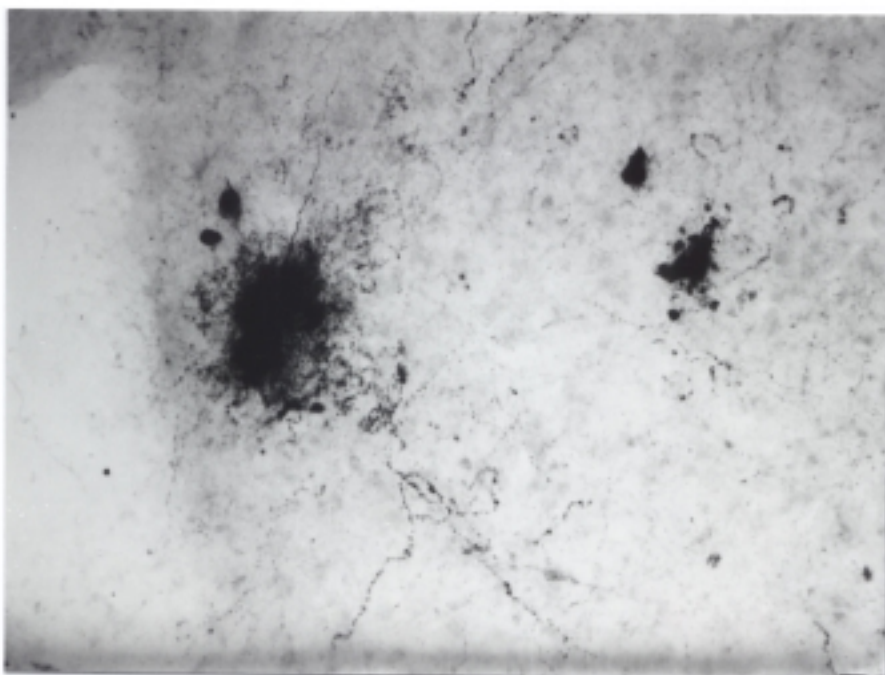
35.- Placas con CgA.



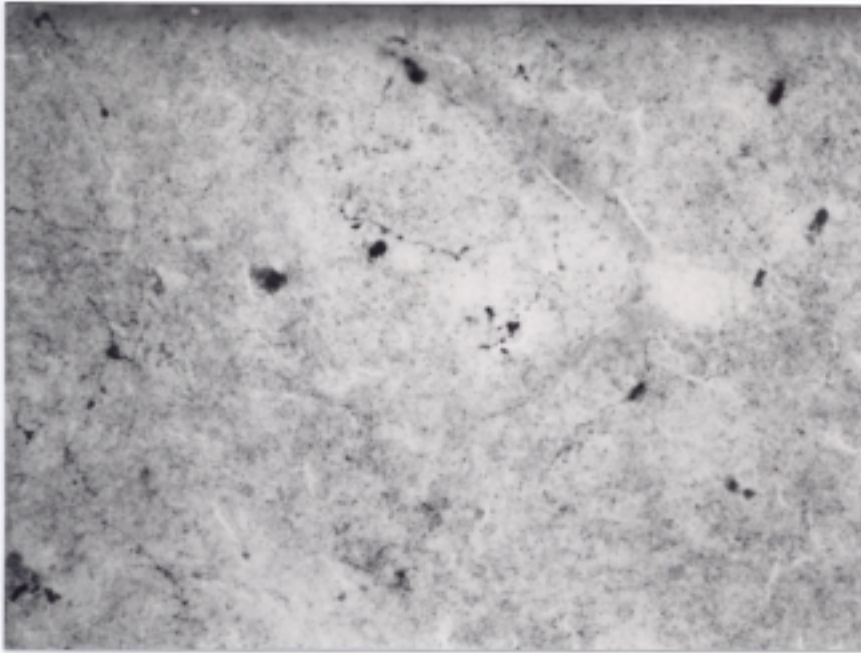
36.- Placas con CaBP.



37.- Placas con Som.

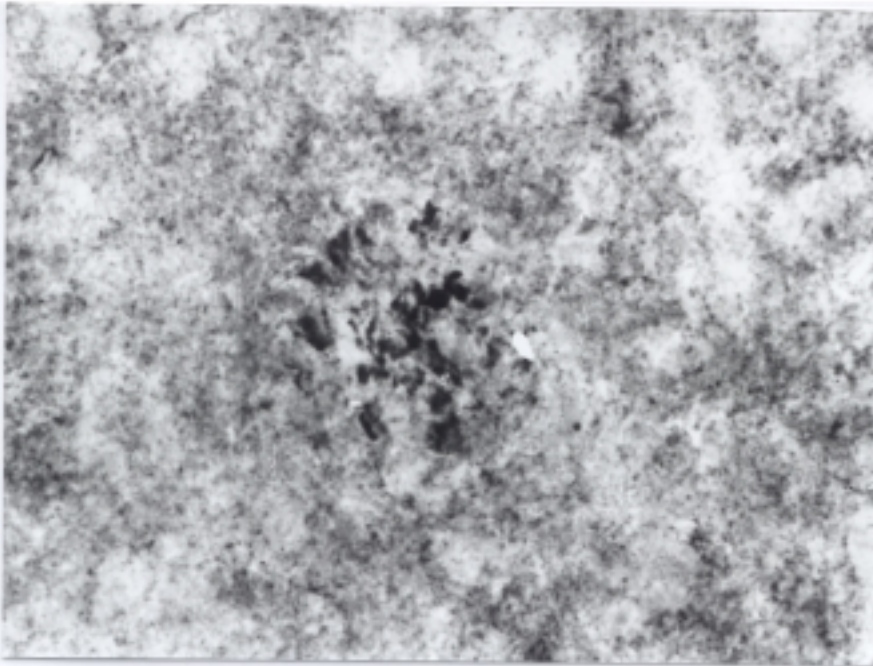


38.- Placas con SP.

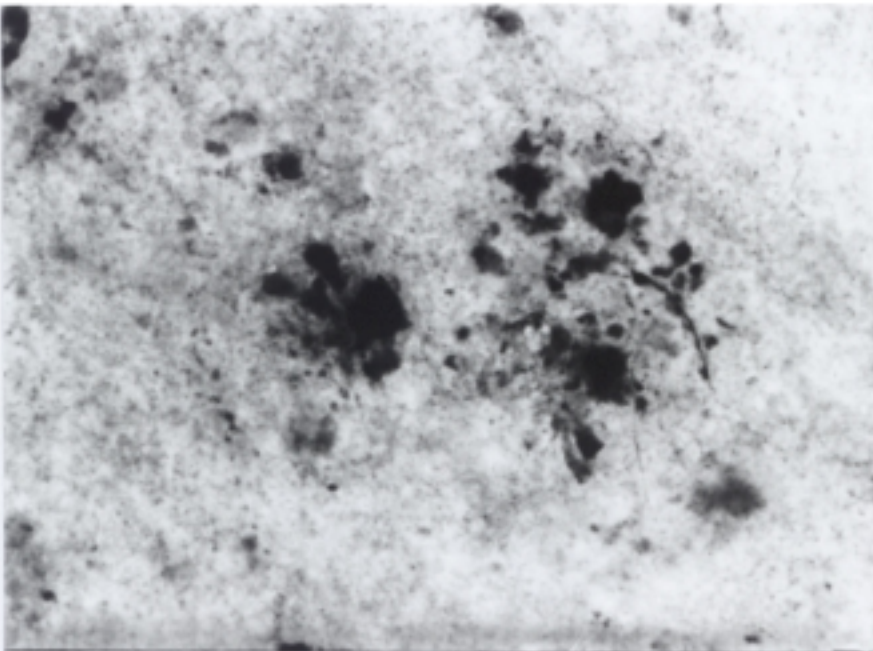


39.- Placas con CCK.

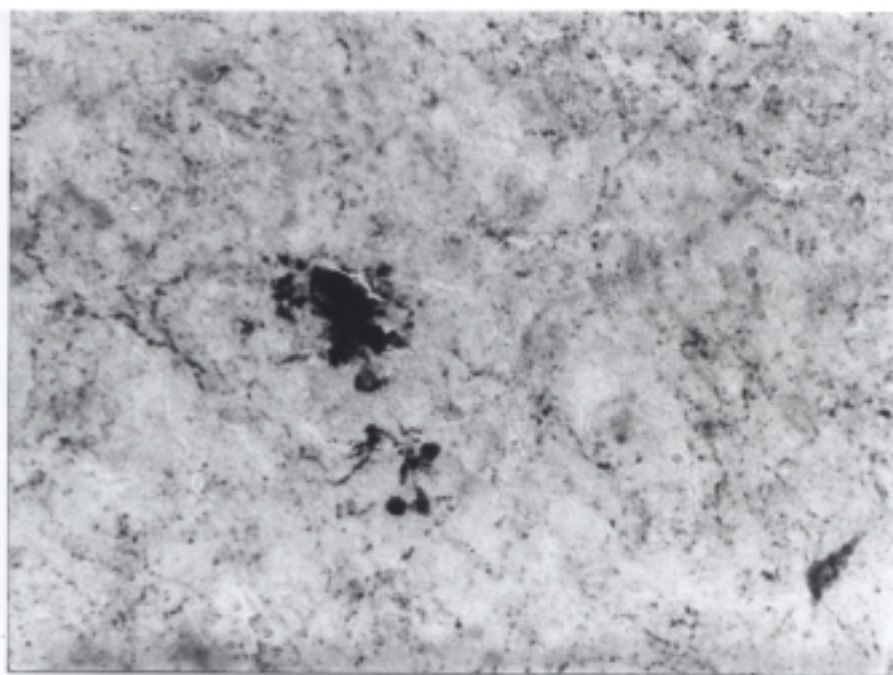
En las fig. 35,36,37,38 y 39 son placas en el mismo caso y en la misma zona del núcleo basal con 165 aumentos para comparar la diferente morfología, tamaño y número de las placas con los distintos péptidos. Obsérvese con CaBP una placa pequeña (flecha) y con SP ninguna. Secciones de 50 micras.



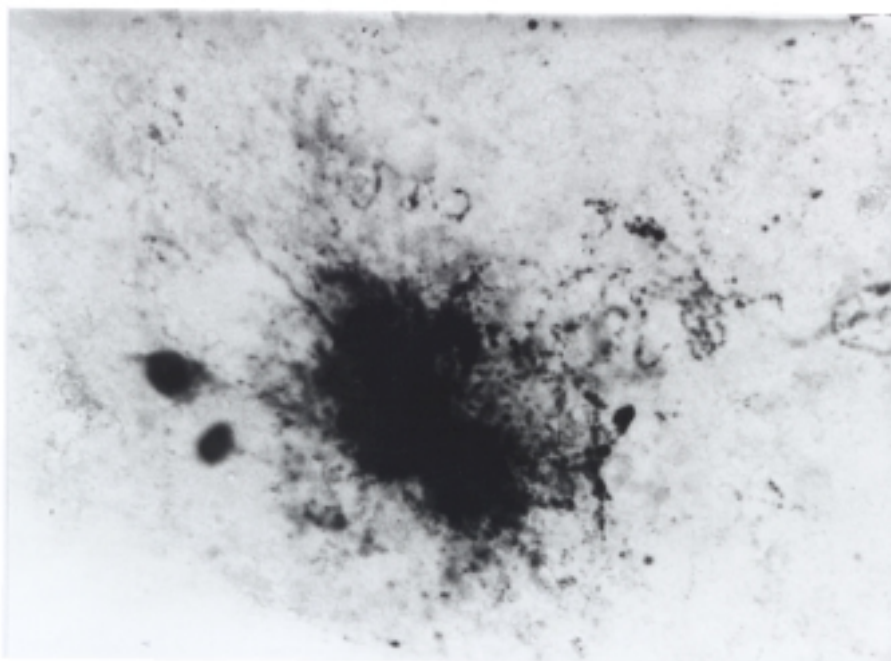
40.- Placa con CCK en núcleo cortical, 330 aumentos.



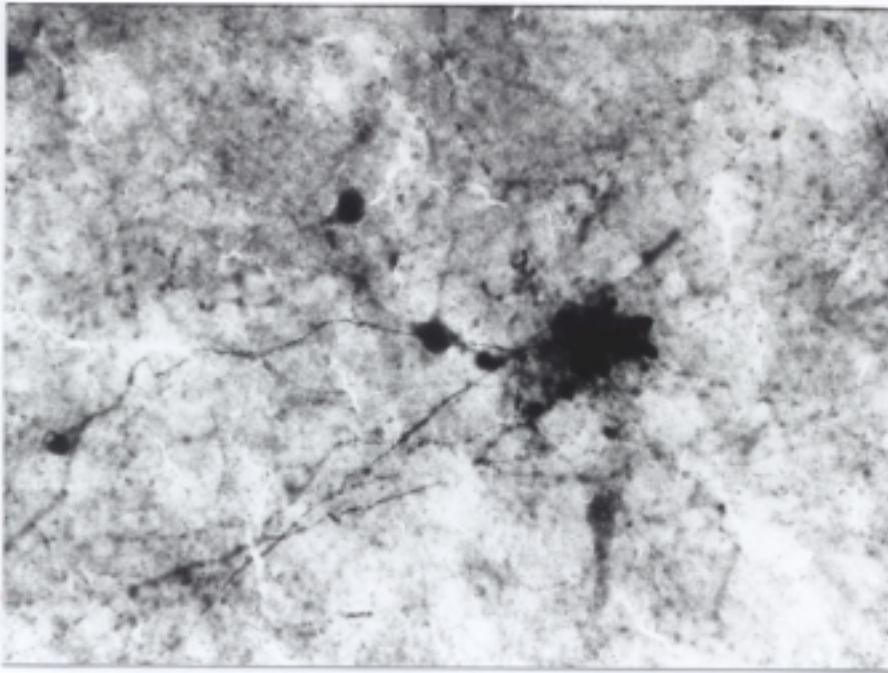
41.- Placa con CgA en núcleo basal, 330 aumentos.



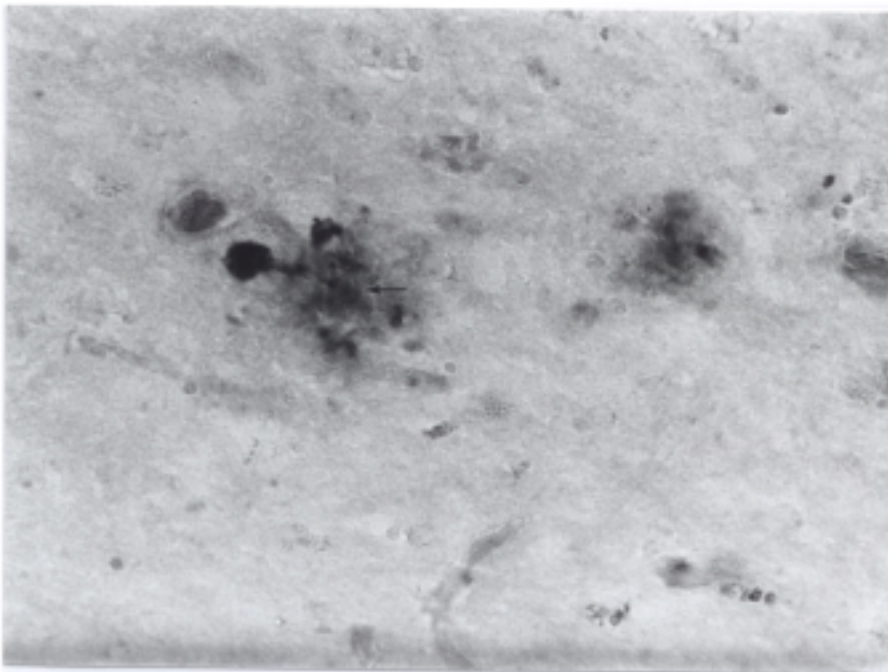
42.- Placa con Som en núcleo basal, 330 aumentos.



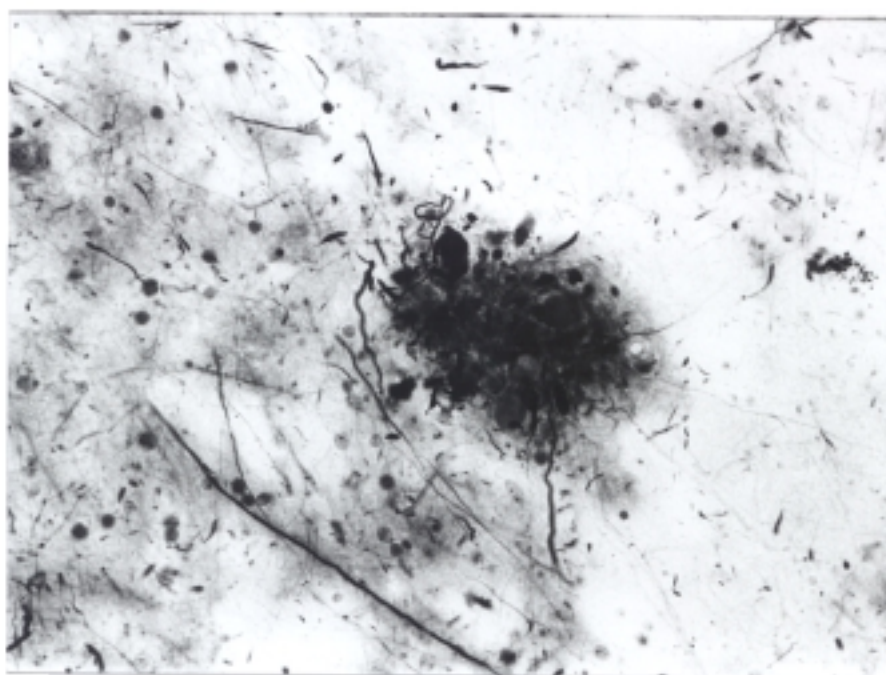
43.- Placa con SP en núcleo basal, 330 aumentos.



44.- Placa con CaBP en núcleo lateral, 330 aumentos.



45.- Placa con CgA contrateñida con Rojo congo en núcleo cortical, la flecha indica el amiloide. Sección de 20 micras, 330 aumentos.



46.- Placa con tinción de plata, metodo Bielchowsky, en núcleo accesorio basal. Sección de 20 micras, 330 aumentos

DISCUSSION

Hasta la fecha poco se ha estudiado de los cambios que ocurren en la amígdala y en la corteza entorrinal de cerebros con la Enfermedad de Alzheimer, lo que hace que la comparación de los hallazgos encontrados en el presente estudio sea limitada. A continuación, siguiendo los objetivos previamente fijados para demostrar las hipótesis marcadas, se valoran los resultados obtenidos.

1) DISTRIBUCION CELULAR EN AMIGDALA Y CORTEZA ENTORRINAL

1.1) SOMATOSTATINA:

La amígdala ha sido considerada como una de las áreas con mayor concentración de Somatostatina, llegando a tener de 4 a 6 veces más que el neocórtex ^(211, 250).

En el presente estudio se ha encontrado que de todas las células identificadas con Nissl en la amígdala normal, solamente entre el 1% y el 2% expresan Somatostatina. Las células con Somatostatina están distribuidas por todos los núcleos estudiados, predominando en el cortical y en el accesorio basal, careciendo de ellas la parte ventral del núcleo basal, a la que Braak llamó núcleo de transición. Los autores que han estudiado la distribución de células con Somatostatina en la amígdala de la rata^(218,468,469) y del hombre⁽⁴⁷⁰⁾, han encontrado la mayor concentración en los núcleos del grupo corticomedial. Si de este grupo excluimos los núcleos central y medial, ya que no se estudian en el presente trabajo, vemos que la distribución de células con Somatostatina en los restantes núcleos está de acuerdo con la encontrada en este estudio. Sin embargo, está en desacuerdo con los hallazgos de Unger⁽⁴⁷¹⁾ en la amígdala del hombre, en la que predominan las células con Somatostatina en los núcleos basal y lateral. En la Enfermedad de Alzheimer la distribución de células es similar a la de cerebros normales salvo por el predominio en el núcleo basal.

También, en la amígdala normal de este estudio, se ha observado una gran variabilidad en el tamaño de las células teñidas con Somatostatina. En el núcleo lateral, el eje mayor osciló entre 28 y 9 micras y el menor entre 12 y 7. En el núcleo basal, el eje mayor osciló entre 31 y 9 micras, mientras que el menor estaba alrededor de las 9 micras. En el núcleo accesorio basal los tamaños estaban entre 36 y 14 micras para el eje mayor y entre 14 y 7 micras para el menor. El núcleo cortical tenía las células de mayor tamaño, oscilando entre 48 y 12 micras el eje mayor y entre 7 y 12 el menor. Esta variabilidad refleja la heterogeneidad neuronal en la zona y que la inmunoreactividad a Somatostatina es un atributo de diversos tipos celulares. Los hallazgos encontrados en el grupo laterobasal están de acuerdo con lo encontrado en ratas por McDonald⁽⁴⁷²⁾, quien basándose en el tamaño celular y en el número de dendritas sugirió que correspondían a células multipolares de tamaño medio y bipolares. En la amígdala de pacientes con Enfermedad de Alzheimer, se ha encontrado una disminución en el tamaño de las células con Somatostatina en los núcleos estudiados, concordando con lo hallado por otros autores^(471,473), quienes además encontraron disminución en el tamaño celular por toda la amígdala sin preferencia por ningún núcleo.

Además, en este estudio se han observado fibras de aspecto algodonoso con varicosidades diseminadas por toda la amígdala normal, lo que concuerda con Mufson⁽⁴⁷⁴⁾, quien describió varios tipos de fibras: Unas, eran algodonosas y salían de la región amigdalina para dirigirse a la sustancia innominada, hipotálamo, bed nucleus y núcleo olfatorio. Otras, eran fibras finas con varicosidades dispuestas de forma regular y dispersa, situadas a lo largo de las fibras algodonosas, con inmunoreactividad difusa y particular en el neurópilo, y que probablemente representen campos de terminales sinápticos.

En la corteza entorrinal normal del presente estudio tan solo el 3% de las células expresan Somatostatina, habiéndose encontrado células y fibras inmunoreactivas para Somatostatina en todas las capas, sobre todo en las capas profundas (V-VI), y en la sustancia blanca subcortical (células intersticiales de Cajal). El tamaño celular hallado no fue constante, oscilando el eje mayor entre 24 y 12 micras y el menor entre 9 y 7, lo que indica que son células de diferentes tipos,

probablemente no piramidales. Estos hallazgos concuerdan en cuanto a localización y tamaño con los de otros autores⁽⁴⁷⁵⁻⁴⁷⁷⁾.

En la corteza entorrinal de los pacientes con Enfermedad de Alzheimer del presente estudio, las células con Somatostatina tienen un patrón similar al de los controles, en cuanto a número y localización.

1.2) SUSTANCIA P:

La mayoría de los estudios existentes en la literatura sobre la presencia de sustancia P en los núcleos amigdalinos cuantifican la Sustancia P en relación al peso de cada núcleo más que su presencia en las células. De este modo, el núcleo medial es el que presenta los mayores niveles^(253,478), seguido en orden decreciente por los núcleos lateral, basomedial, central, cortical y basolateral. En los cuerpos celulares fue encontrada Sustancia P, principalmente en los núcleos medial, central^(218,479) y basal⁽⁴⁸⁰⁾. En el presente estudio se ha encontrado un gran acúmulo de fibras en la zona ventral de los núcleos basal y lateral de la amígdala normal, dato similar al encontrado por Ljungdahl⁽⁴⁸⁰⁾, quien encontró que los núcleos basal y cortical contienen fundamentalmente fibras o terminaciones de baja densidad. Sin embargo, en el presente estudio no se ha encontrado en el núcleo cortical, un paquete de fibras compactas encontrado por Claudio Cuello⁽⁴⁷¹⁾.

En las amígdalas normales del presente estudio, las células que contienen Sustancia P son solamente una pequeña parte del total de células que se tiñen con Nissl, oscilando entre el 0,7% en el núcleo basal y el 1,7% en el núcleo accesorio basal. En las amígdalas de pacientes con Enfermedad de Alzheimer, las células con Sustancia P tienen una distribución similar a los cerebros normales.

En la corteza entorrinal normal del presente estudio se aprecian dos bandas de tinción más intensa con Sustancia P, una superficial y otra profunda. Este hallazgo es similar a lo encontrado en la corteza entorrinal del gato⁽⁴⁸²⁾, en el que se han visto axones en todas las capas, sobre todo en la II y la IV, lugar de llegada de fibras del hipocampo y áreas de asociación neocortical.

Además, en el presente estudio, se ha podido ver que las células con Sustancia P están en la capa profunda (V-VI), representando el 2-3% de las células teñidas con Nissl. En la corteza entorrinal de los pacientes con Enfermedad de Alzheimer del presente estudio las células con Sustancia P siguen la misma distribución que en cerebros normales.

1.3) COLECISTOQUININA:

La Colecistoquinina es un neuropéptido que se encuentra ampliamente distribuido en el cerebro, fundamentalmente en corteza, hipocampo, amígdala, hipotálamo y ganglios basales. En las amígdalas de los pacientes controles de este estudio, las células con Colecistoquinina representan entre el 2% y el 4% del total de células encontradas con Nissl, predominando en el núcleo accesorio basal, seguido del basal, cortical y lateral. Las diferencias entre los distintos núcleos no han sido significativas como tampoco lo fueron para otros autores que encontraron un ligero predominio en los núcleos del grupo basolateral en ratas hembras⁽⁴⁸³⁾. El tamaño de las células con Colecistoquinina en los diferentes núcleos amigdalinos ha sido similar al de las células que presentan Somatostatina.

En la Enfermedad de Alzheimer las células con Colecistoquinina siguen el mismo patrón que en amígdalas normales, con un ligero predominio en los núcleos lateral y basal.

En la corteza entorrinal normal del presente estudio las células con Colecistoquinina representan el 2% de las células totales y están fundamentalmente en la zona superficial de las dos bandas que forma el neurópilo. En la corteza entorrinal de los pacientes con Enfermedad de Alzheimer las células con Colecistoquinina siguen la misma distribución que en los cerebros normales.

1.4) CALBINDINA:

En el presente estudio se encontró que la Calbindina está presente en el 8 al 12 % de las células amigdalinas, predominando en el núcleo cortical. El tamaño y forma de las células es muy

variable, no habiéndose encontrado en la literatura estudios con los que poder contrastar estos hallazgos, salvo uno hecho en ratas⁽³⁴⁶⁾, en el que se describen células y fibras en la amígdala. En la amígdala de los pacientes con Enfermedad de Alzheimer las células tienen una distribución similar a la de la amígdala normal, predominando en los núcleos basal y cortical.

Las células que expresan Calbindina en la corteza entorrinal normal del presente estudio son polimorfas y representan el 13% de las encontradas con Nissl, cifra muy superior a la encontrada con los otros neuropéptidos, y a la que encontró en ratas García Segura⁽³⁴⁶⁾, para quien solamente el 4% de las células que contó en la corteza entorrinal contenían Calbindina. Las células se encuentran distribuidas de forma difusa a lo largo de la corteza entorrinal predominando en las capas superficiales. En la Enfermedad de Alzheimer siguen una distribución similar.

1.5) CROMOGRANINA A

El patrón de inmunoreactividad con Cromogranina A en la amígdala humana es similar al encontrado en cerebros bovinos y ovinos⁽³¹⁸⁾, aunque en éstos se encontró predominio de inmunoreactividad celular en los núcleos central y basolateral, mientras que en las zonas mediales se encontró debilidad de la tinción.

En el presente estudio la Cromogranina A está en el 2% de las células de la amígdala normal, predominando en las zonas mediales del grupo basolateral. El patrón de la tinción es similar al de los otros neurotransmisores, Somatostatina, Colecistoquinina y Sustancia P. El tamaño celular es ligeramente mayor que el de las células con Somatostatina. En la Enfermedad de Alzheimer las células mantienen distribución, morfología y características tintoriales similares a los cerebros sanos.

La Cromogranina A representa el 13% de las células de la Corteza Entorrinal normal del presente estudio. La mayoría de las células teñidas con Cromogranina A están en las capas profundas V-VI, siendo escasas en la III y mínimas en la II y la IV. El neurópilo se tiñe

fundamentalmente en la capa I, lugar de llegada de fibras procedentes de los núcleos lateral, basal y accesorio basal amigdalino, sobre todo en la zona intermedia y caudal de la corteza entorrinal. En la Enfermedad de Alzheimer las células siguen una distribución similar al de los cerebros normales.

En la corteza entorrinal la presencia de Cromogranina A es mucho mayor que la de los otros péptidos, exceptuando la Calbindina, y la localización también es diferente, si exceptuamos la Somatostatina.

De todo lo anterior deducimos: 1) que en amígdala la Calbindina es el péptido más expresado por las células, 8-12%, frente al 2% de células que expresan los otros péptidos. 2) que en la corteza entorrinal la Calbindina y la Cromogranina A son los péptidos más frecuentemente expresados, apareciendo en el 13% de las células frente al 3% de los otros péptidos, con una distribución difusa de células con Calbindina mientras los otros péptidos predominan en las capas profundas.

2 y 3) PLACAS:

En cuanto a la distribución de placas, al comparar las que tienen Cromogranina A con las que tienen cada uno de los otros cuatro péptidos (Som, CCK, SP y CaBP) vemos que las neuritas inmunoreactivas con Cromogranina A son varias veces más frecuentes (tanto en la amígdala como en la corteza entorrinal) que con cualquiera de los otros péptidos también localizados en las vesículas sinápticas.

En la amígdala, encontramos placas neuritas en todos los núcleos amigdalinos, pero sobre todo en el basal y accesorio basal^(484,485). De todos los péptidos estudiados, la Cromogranina A está presente en una cantidad muy superior al resto de los péptidos, llegando a ser 100 veces más que la Calbindina. En el núcleo lateral solamente se encuentran placas con Cromogranina A. En el basal la cantidad de placas con Cromogranina A es 5 veces mayor que con Sustancia P y 20 veces mayor que con Colecistoquinina. En el núcleo accesorio basal la cantidad de placas con Cromogranina A es 5 veces la de Sustancia P y 8 veces la de Colecistoquinina. En el núcleo

cortical esta proporción se reduce, siendo solo 4 veces mayor el número de placas con Cromogranina A que con Sustancia P y con Colecistoquinina. El número de placas con Somatostatina y Calbindina en todos los núcleos estudiados es prácticamente inexistente.

En la corteza entorrinal el número de placas con Cromogranina A es 15 veces mayor que con Sustancia P y 1.000 veces mayor que con Calbindina.

En neocortex, se había visto que la Somatostatina estaba presente en placas neuritas⁽²⁰¹⁾, llegándose a encontrar, por unos autores⁽⁴⁶²⁾, en la capa III cortical, donde la pérdida neuronal es máxima y se origina el sistema de asociación cortico-cortical hasta un 50% de las placas Somatostatin positivas, mientras que otros autores encontraron cifras más bajas, el 20% Armstrong⁽⁴⁸⁶⁾ y el 10% Kowall⁽⁴⁸⁷⁾. En la amígdala también se encontró que el 50% de las placas contenían Somatostatina y el 5% Sustancia P⁽⁴⁶²⁾. Ante estos datos, se relacionó la concentración de placas con la disminución de un neurotransmisor específico⁽⁴⁸⁶⁾. Además, se vio una disminución de receptores de Somatostatina en neocortex, lo que hizo pensar que podría reflejar la degeneración de las neuronas postsinápticas o de las aferencias corticales en las cortezas de los pacientes con Enfermedad de Alzheimer⁽⁴⁸⁸⁾.

En hipocampo y corteza, se vio⁽¹¹³⁾ que la distribución de neuritas inmunoreactivas tendía a ser paralela a la distribución normal de cuerpos celulares y axones inmunoreactivos para una región dada. Por ejemplo, la Sustancia P se vio más frecuentemente en neuritas de la capa molecular del dentado, región en la que la sustancia P se encuentra en un plexo denso de fibras. Las neuritas con Colecistoquinina se ven con más frecuencia en la corteza temporal inferior, donde se encuentran los cuerpos celulares inmunoreactivos a Colecistoquinina. Por el contrario se ven menos frecuentemente en el hipocampo, donde la inmunotinción de Colecistoquinina es escasa. Por otra parte, se demostró que (con la excepción de reducciones en Somatostatina, factor liberador de corticotropina y posiblemente sustancia P) no había reducciones significativas en los niveles de varios neuropéptidos encontrados en las placas seniles, lo que podría explicarse porque las neuritas pudieran originarse de neuronas no afectadas que estuvieran intentando reinervar regiones corticales denervadas, o porque cambios estructurales, como la formación de neuritas, no pudieran asociarse con reducciones neuroquímicas de los marcadores. La sustancia

peptidérgica inmunoreactiva vista en las neuritas de las placas seniles sugiere que algunas neuritas hinchadas pueden tener concentraciones de péptido mayores de las que hay en axones normales. Además, se observó mayor número de placas con plata que con los métodos inmunocitoquímicos usando anticuerpos contra neurotransmisores⁽¹¹³⁾, lo que hizo pensar que podría ser debido: 1º) A no haber medido todos los neurotransmisores presentes en las neuritas de las placas. 2º) A que algunas neuritas procedentes de axones terminales de neuronas enfermas, puedan no expresar cantidades normales de marcadores específicos. 3º) A que algunas neuritas puedan ser regeneradas y, en algunas circunstancias las neuronas regeneradas, muestren reducción de neurotransmisores⁽¹¹³⁾.

En este estudio se ha visto que una serie de péptidos están presentes en las neuritas de las placas seniles y que, excepto en el caso de la Cromogranina A, su número es muy escaso. Se había argumentado que la cantidad de neuritas presentes en las placas únicamente reflejaba la abundancia de neuronas con dichos péptidos⁽⁴⁸⁶⁾. Sin embargo, en nuestro estudio vemos que las neuronas con Cromogranina A no son muy abundantes, en la amígdala solo un 2% del total y en la corteza entorrinal el 13%, y que por el contrario son mucho más abundantes las células con Calbindina (8%-12% en amígdala y 13% en la corteza entorrinal), sin verse esto reflejado en el número de placas con dicho péptido. Para confirmar nuestra primera hipótesis, la incorporación de neuritas con Cromogranina A a las placas es selectiva, se ha calculado el cociente entre el número de placas y el número de células, ambas marcadas con cada péptido. En la amígdala se ha observado que el cociente para la Cromogranina A es 1.000 veces superior al de la Calbindina y 10 veces superior al de la Somatostatina, Colecistoquinina y Sustancia P (tablas XXV-XXVIII). En la corteza entorrinal la diferencia es menor (tabla XIX), siendo el cociente para la Cromogranina A solamente 100 veces superior al de la Calbindina. Estos hallazgos en la amígdala y en la corteza entorrinal confirman la primera hipótesis de este trabajo, rechazando la hipótesis anteriormente mencionada en cuanto a que la cantidad de neuritas con un determinado péptido presentes en las placas únicamente reflejaba la abundancia de neuronas con ese determinado péptido.

Un hallazgo importante de este trabajo es que en la amígdala entre el 49% y el 67% de las placas demostradas con inmunotinción para Cromogranina A, contienen amiloide demostrado por Rojo Congo, mientras que en la corteza entorrinal llegan a alcanzar el 98%. En la introducción de este trabajo hemos descrito que las placas maduras están precedidas por el depósito en el neurópilo de beta-amiloide, que éste no se tiñe por el Rojo Congo, ni tiene configuración fibrilar con el microscopio electrónico, por lo que se llamó preamiloide^(130,489). Para detectar este preamiloide hemos usado la tinción de Campbell, encontrando que en la corteza entorrinal solo el 67% de las placas encontradas con la tinción de Campbell contienen Cromogranina A.

El no haber encontrado la misma relación entre amiloide- Cromogranina A y entre amiloide y el resto de los péptidos, confirma los hallazgos de otros autores^(4,113,462,487), para quienes la asociación de neuropéptidos con placas varía según las diferentes áreas. Por ejemplo, la Sustancia P está presente en el 30-40% de las placas teñidas con Rojo Congo en amígdala, mientras que en la corteza entorrinal solo está presente en el 8% de las mismas.

La mayor asociación entre amiloide y neuritas con Cromogranina A no necesariamente se debe a la mayor expresión de ésta en las neuronas de la amígdala o de la corteza entorrinal, porque como hemos visto al comparar la relación número de placas/números de células con los distintos péptidos esta no es proporcional al número de células. Es posible que las placas maduras tengan un factor que pueda producir crecimiento y aumento de las neuritas con Cromogranina A.

4) PERDIDA NEURONAL EN LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER:

4.1) AMIGDALA:

La pérdida celular en los núcleos de la amígdala fue estudiada por Herzog⁽⁴⁹⁰⁾, quien además tuvo en cuenta la disminución de volumen que se produce en la amígdala de los cerebros con Enfermedad de Alzheimer. Este autor encontró que había pérdida celular en los núcleos de la amígdala tanto en el envejecimiento normal como en la Enfermedad de Alzheimer, siendo más acusada en esta última. En ambos casos la mayor pérdida celular correspondía al núcleo cortical.

Además, en la Enfermedad de Alzheimer encontró una pérdida celular estadísticamente significativa en los núcleos amigdalinos lateral, basal, accesorio basal y cortical del 23%, 31%, 27% y 37% respectivamente. En el presente estudio se ha encontrado que hay una disminución de células en estos mismos núcleos del 21%, 18%, 21% y 33% respectivamente, cifras muy similares a las encontradas por Herzog⁽⁴⁹⁰⁾. En todos los núcleos, excepto el núcleo accesorio basal, la disminución es estadísticamente significativa. Podría ser que la disminución celular en el núcleo accesorio basal fuese estadísticamente significativa si se hubiese tenido en cuenta la disminución de volumen de la amígdala como hizo Herzog⁽⁴⁹⁰⁾. En tal caso, los porcentajes de las disminuciones celulares encontrados en el presente estudio serían mayores de los ya referidos. La disminución de volumen de la amígdala de pacientes con Enfermedad de Alzheimer, que es mucho mayor que la encontrada en la corteza e indica una mayor vulnerabilidad de la amígdala, no es homogénea. No todos los núcleos de la amígdala pierden volumen de igual manera, pero no hay acuerdo en cuanto al grado de afectación de los mismos. Para unos autores⁽⁴⁹⁰⁾, la disminución de volumen de la amígdala era del 25%, sufriendo el mayor impacto el grupo corticomedial con un 33% frente al 23 % del grupo basolateral. Para otros autores⁽⁴⁹¹⁾, la disminución encontrada fue del 55%, siendo el grupo basolateral el más afectado, sobre todo los núcleos lateral y accesorio basal. Podría ser que estos distintos hallazgos estuviesen relacionados con la menor o mayor duración de la enfermedad, es decir, durante los primeros años de padecimiento de la enfermedad se produciría una mayor pérdida de volumen en el grupo corticomedial y en un tiempo posterior la mayor pérdida correspondería al grupo basolateral. Así, los pacientes que habían sufrido la enfermedad solamente durante tres años presentaron mayor disminución de volumen en el grupo corticomedial⁽⁴⁹⁰⁾, mientras que en los pacientes que la habían sufrido durante nueve años la mayor disminución correspondía al grupo basolateral⁽⁴⁹¹⁾. Siguiendo este razonamiento, y aunque no se ha estudiado el núcleo medial, el núcleo que presenta el mayor porcentaje de pérdida celular en el presente estudio es el núcleo cortical y si además tenemos en cuenta que los pacientes estudiados habían padecido la enfermedad durante un corto período, se podría suponer que la mayor pérdida de volumen se produjo en el grupo corticomedial.

4.2) CORTEZA ENTORRINAL:

En el presente estudio, realizado sobre la profundidad total de la corteza entorrinal, se encontró que, en relación a los controles, en la Enfermedad de Alzheimer hay una pérdida celular media del 28%, siendo las capas II y III las más afectadas. Por tanto, la persistencia del 72% de las células de la corteza entorrinal en los cerebros con Enfermedad de Alzheimer, objeto de nuestro estudio, se debe fundamentalmente a las células de las capas profundas (V y VI). Estos hallazgos tienen importancia por dos razones: Primera, porque las capas superficiales reciben aferencias de las áreas 51 (periamigdalina y prepiriforme), 35 (perirrinal), 49 (parasubicular), 27 (presubicular) y de los núcleos lateral, accesorio basal y basal de la amígdala, mientras que las capas profundas, sobre todo la IV, reciben aferencias del hipocampo (CA1 y subiculus). Segunda, porque las alteraciones en las capas superficiales de la corteza entorrinal pueden afectar a las regiones a donde éstas proyectan (por ejemplo, el hipocampo).

4.3) SOMATOSTATINA:

Los primeros en describir la disminución de Somatostatina en corteza de pacientes con Enfermedad de Alzheimer fueron Davies, Katzman y Terry en 1980⁽²⁴⁴⁾. Posteriormente⁽²⁴³⁾, estos autores encontraron disminuciones en todas las áreas que estudiaron, excepto en el área cingulada anterior, donde la disminución no fue significativa. Resultados similares fueron encontrados por otros autores^(283,492). Las mayores disminuciones se descubrieron en el lóbulo temporal: sobre todo en la corteza entorrinal y en la circunvolución temporal inferior⁽⁴⁹³⁾. Estas disminuciones se encontraron tanto con Somatostatina-28 como con Somatostatina-28(1-12), indicando que la causa de la disminución de niveles no era debida a una alteración en la degradación de la Somatostatina⁽⁴⁹³⁾. En cuanto a las concentraciones de Somatostatina en amígdala, los hallazgos no fueron significativamente diferentes de los controles⁽⁴⁷⁰⁾, e incluso un autor encontró niveles más altos en pacientes con Enfermedad de Alzheimer⁽⁴⁹⁴⁾.

En el presente estudio, las células con Somatostatina en las amígdalas de cerebros de pacientes con Enfermedad de Alzheimer parecen perderse de forma paralela a la pérdida celular

total que se observa con el Nissl, excepto en el núcleo basal donde se conservan de forma significativa. Este núcleo proyecta sobre la capa III de la corteza entorrinal, donde tampoco se han encontrado placas con Somatostatina. Estos hallazgos en los núcleos lateral, basal, accesorio basal y cortical están de acuerdo con lo encontrado por diversos autores^(218,470,471,493). El hecho de que la amígdala sea una de las regiones del cerebro con mayor concentración de Somatostatina y que las células que la contienen se pierdan de forma paralela a la población celular general, haría pensar que estas células no son, al menos de forma única, el foco primario de la Enfermedad de Alzheimer como ha sugerido Roberts⁽⁴⁹⁴⁾.

En la corteza entorrinal de los pacientes con Enfermedad de Alzheimer del presente estudio, hemos visto que las células con Somatostatina tienen un patrón similar al de los controles, en cuanto a número y localización. Estos hallazgos están en desacuerdo con algunos estudios que dan a la corteza entorrinal como una de las zonas con mayores cambios en Somatostatina⁽⁴⁹³⁾.

4.4) SUSTANCIA P:

En las amígdalas de pacientes con Enfermedad de Alzheimer, las células con Sustancia P parecen mantenerse con respecto al número de células en el Nissl en todos los núcleos estudiados, excepto en el núcleo accesorio basal.

En la corteza entorrinal de los pacientes con Enfermedad de Alzheimer del presente estudio las células con Sustancia P se conservan de forma significativa.

4.5) COLECISTOQUININA:

En la Enfermedad de Alzheimer las células con Colecistoquinina se mantienen ligeramente mejor que las células generales en los núcleos lateral y basal, pero no de forma estadísticamente significativa.

En la corteza entorrinal de los pacientes con Enfermedad de Alzheimer del presente estudio las células con Colecistoquinina se mantienen de forma significativa, sobre todo en las capas superficiales.

4.6) CALBINDINA:

En la amígdala de los pacientes con Enfermedad de Alzheimer las células con Calbindina tienen una ligera permanencia, no significativa, en los núcleos basal y cortical.

En la corteza entorrinal de pacientes con Enfermedad de Alzheimer, las células que expresan Calbindina, parecen conservarse ligeramente mejor que las células generales. En este estudio la media de las células con Calbindina en pacientes con Enfermedad de Alzheimer es mayor que la de los controles, sin embargo la diferencia no es estadísticamente significativa probablemente debido a la gran desviación estandar que tenemos. En un intento de homogeinización de los casos, se ha suprimido el caso que presenta los hallazgos más extremos, encontrándose que el número de células de los cuatro casos restantes con relación a los controles es estadísticamente significativo para $p < 0.05$, no siéndolo para $p < 0.01$ probablemente por el escaso número de casos. Si esto fuera así, es decir, si las células con Calbindina no se perdieran en la Enfermedad de Alzheimer, significaría que la Calbindina protegería a estas células de la corteza entorrinal de morir en esta enfermedad.

Por otra parte la localización de las células con Calbindina es de forma difusa a lo largo de la corteza entorrinal, pero predominando en las capas superficiales, lugar de origen de la vía perforante que conecta con el giro dentado y el área CA1 del hipocampo, que son las áreas donde preferentemente asientan las lesiones en la Enfermedad de Alzheimer. Cabría pensar que otros tipos de células, que no contienen Calbindina, serían proclives a ser destruidas en la corteza entorrinal de pacientes con Enfermedad de Alzheimer.

4.7) CROMOGRANINA A:

Se sabe que una de las funciones de la Cromogranina A es captar calcio, igual que la Calbindina, lo que puede contribuir a impedir que una sobrecarga de Calcio en la célula produzca una excitotoxicidad y muerte celular, por lo que se pensó que reducciones de esta proteína podrían contribuir a la acción citotóxica del Calcio y muerte celular, de forma similar a lo que ocurre en el hipocampo con la epilepsia, donde hay un gran aflujo de Calcio al interior de la célula durante la excitación⁽⁴⁹⁵⁾, habiéndose demostrado que la disminución de estas proteínas reguladoras en ciertos sectores del hipocampo (CA1) conducen a la muerte de determinadas células, haciendo de este sector una zona especialmente vulnerable a la epilepsia^(3,463,496).

La forma en que las células de las capas II y IV de la corteza entorrinal, que son las más afectadas en la Enfermedad de Alzheimer, serían abocadas a la formación de ovillos neurofibrilares y muerte está aún sin dilucidar. Se sabe que las células de la capa II son glutamatérgicas y vulnerables en la Enfermedad de Alzheimer⁽⁴⁹⁷⁾. También se sabe por algunos experimentos⁽⁴⁹⁸⁾ que el glutamato y algunos aminoácidos excitadores pueden producir la muerte celular en el hipocampo y otras áreas corticales. Por ejemplo, en cultivos de neuronas interconectoras del hipocampo⁽⁴⁹⁹⁾, se ha demostrado que la muerte neuronal causada por anoxia se debía a la liberación sináptica del glutamato y que se podía prevenir bloqueando la transmisión sináptica con Mg^{2+} o con antagonistas de receptores del glutamato. Por otra parte, se sabe que el aflujo de calcio es un componente importante de la neurotoxicidad por glutamato. In vivo, se vió un aumento del aflujo de calcio en las neuronas corticales e hipocampales en situaciones que se creían que aumentaban la excitación del glutamato⁽⁵⁰⁰⁾, así como en respuesta a la aplicación de aminoácidos excitadores⁽⁵⁰¹⁾. In vitro, estos aminoácidos excitadores producen aumento del aflujo de calcio en las neuronas de corteza e hipocampo⁽⁵⁰²⁾. Hipótesis actuales sobre el daño cerebral epiléptico postulan que una excesiva estimulación neuronal, debida a la liberación masiva de glutamato, produce elevación del calcio citoplásmico⁽⁵⁰³⁾. La Calbindina está en el citoplasma de poblaciones neuronales específicas y ha sido implicada en la resistencia al daño cerebral epiléptico inducido experimentalmente. Además se ha demostrado en cultivos⁽³²⁷⁾

que las neuronas con Calbindina son resistentes al aumento de calcio intracelular y a la muerte inducida por la exposición al glutamato.

Basándonos en estos datos pensamos que la proteínas captadoras de calcio podrían prevenir la acción tóxica del glutamato y la muerte celular, o lo que es lo mismo las células que expresasen Calbindina o Cromogranina A serían resistentes a la muerte celular.

En nuestro estudio, las células con Cromogranina A en la amígdala de pacientes con Enfermedad de Alzheimer se pierden de forma proporcional a las células con Nissl y en la corteza entorrinal parecen conservarse ligeramente mejor que las células generales, predominando en las capas profundas V y VI.

El que la Cromogranina A no proteja de forma similar a la Calbindina, podría deberse a que no actúa como proteína captadora de calcio al ser una proteína intragranular, mientras que la Calbindina es citoplasmática.

De lo anteriormente expuesto podemos deducir: 1) que en la amígdala de la Enfermedad de Alzheimer se pierden entre el 18% de células del núcleo basal y el 33 % del núcleo cortical. 2) Las células que expresan Calbindina predominan en el núcleo cortical y en la Enfermedad de Alzheimer se mantienen mejor que el resto de las células. 3) Las células con Cromogranina A se pierden de forma paralela a las células totales. 4) En corteza entorrinal el 28% de las células totales se pierden en la Enfermedad de Alzheimer, manteniéndose las que expresan Calbindina y en menor grado las que expresan Cromogranina A.

Las células con Calbindina que son las que mejor se conservan en la Enfermedad de Alzheimer, tanto en amígdala como en corteza entorrinal, son las que menos se incorporan a las neuritas de las placas, quedando como puerta abierta a futuras investigaciones si la incorporación de neuritas a las placas inicia la muerte celular.

CONCLUSIONES

- 1.- La Cromogranina A se expresa en el 2% de las células de la amígdala normal, predominando su distribución en las zonas mediales del grupo basolateral. En la corteza entorrinal se expresa en el 13% de las células, con predominio en las capas V y VI.

La Calbindina se expresa en el 8-12% de las células de la amígdala normal con predominio en el núcleo cortical. En la corteza entorrinal se expresa en el 13% de las células, distribuída de forma difusa, con predominio en las capas superficiales.

- 2.- Todos los péptidos estudiados, Somatostatina, Sustancia P, Colecistoquinina, Cromogranina A y Calbindina, están presentes en las neuritas de las placas seniles. La presencia de neuritas con un determinado péptido en las placas no depende del número de células con ese péptido existentes en la vecindad sino que es selectiva.

- 3.- La pérdida neuronal en la Enfermedad de Alzheimer es diferencial para los distintos tipos neuronales. La proteína captadora de calcio, Calbindina, protege de la muerte celular, no así la Cromogranina A.

- 4.- Existe una relación inversa entre incorporación de neuritas de unas determinadas células a las placas y resistencia a la muerte celular.

BIBLIOGRAFIA

1. PLUM F: Dementia: an approaching epidemic. *Nature* 1.979; 279:372-373.
2. HAY JW, ERNST RL : The economic costs of Alzheimer's disease. *Am. J. Public Health* 1.987; 77:1169-1175.
3. MUNOZ DAVID G. The distribution of Chromogranin A-like immunoreactivity in the human hippocampus coincides with the pattern of resistance to epilepsy-induced neuronal damage. *Ann. Neurol.* 1.990; 27:266-275.
4. MUNOZ DAVID G: Chromogranin A-like immunoreactive neurites are major constituents of senile plaques. *Lab. Invest.* 1991; 64:826-832.
5. ALZHEIMER A. Über eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde. *Allg Z Psychiatrie Psychisch-Gerichtliche Medizin* 1.907; 64:146-148. Translated by Jarvik L and Greenson H. About a peculiar disease of the cerebral cortex. *Alzheimer Disease and Associated Disorders* 1.987; 1(1):7-8.
6. SIMCHOWICZ T. *Histol. histopath. Arb. Grosshirnrinde* 1.911; 4:267-444. Citado por Ludo van Bogaert en *Alzheimer's Disease and Related Conditions*, pag. 95-104. *A Ciba Foundation Symposium. Wolstenholme GEW, O'Connor M (eds). London: J & A Churchill, 1.970.*
7. DIVRY P. Etude histo-clinique des plaques seniles. *J. belge Neurol. Psychiat.* 1.927; 27:643-654. Citado por Ludo van Bogaert en *Alzheimer's Disease and Related Conditions*, pag. 95-104. *A Ciba Foundation Symposium. Wolstenholme GEW, O'Connor M (eds). London: J & A Churchill, 1.970.*

8. DIVRY P. De la nature de l'altération fibrillaire d'Alzheimer. *J. belge Neurol. Psychiat.* 1.934; 34:197-201. Citado por Ludo van Bogaert en *Alzheimer's Disease and Related Conditions*, pag. 95-104. *A Ciba Foundation Symposium. Wolstenholme GEW, O'Connor M (eds). London: J & A Churchill, 1.970.*
9. DIVRY P. Etude histochimique des plaques séniles et preseniles. En *Proc. I Int. Congr. Neuropath., Rome, 1.952, Turin, Rossenberg & Sellier, 1.952, vol II*, pag. 313-345. Citado por Ludo van Bogaert en *Alzheimer's Disease and Related Conditions*, pag. 95-104. *A Ciba Foundation Symposium. Wolstenholme GEW, O'Connor M (eds). London: J & A Churchill, 1.970.*
10. SCHWARTZ P, KURUCZ J, KURUCZ A. *J. Am. Geriat. Soc.* 1.964; 12:908-921. Citado por Robert D. Terry and Henryk Wisniewski en *Alzheimer's Disease and Related Conditions*, pag. 145-168. *A Ciba Foundation Symposium. Wolstenholme GEW, O'Connor M (eds). London: J & A Churchill, 1.970.*
11. ROTH M. The natural history of mental disorder in old age. *J. Mental Sci.* 1.955; 101:281-301.
12. TERRY RD, GONATAS NK, WEISS M. Ultrastructural studies in Alzheimer's presenile dementia. *Am. J. Pathol.* 1.964; 44:269-297.
13. KIDD M. Paired helical filaments in electron microscopy of Alzheimer's disease. *Nature* 1.963; 197:192-193.
14. BLESSED G, TOMLINSON BE, ROTH M. The association between quantitative measures of dementia and of senile change in the cerebral grey matter of elderly subjects. *Brit. J. Psychiat.* 1.968; 114:797-811.

15. KATZMAN R. The prevalence and malignancy of Alzheimer disease: a major killer. *Arch. Neurol.* 1976; 33:217-218.
16. KATZMAN R, TERRY RD, BICK KL. Recommendations of nosology, epidemiology and pathophysiology commissions of the Workshop-Conference on Alzheimer's dementia and related disorders. En Katzman R, Terry RD, Bick KL (eds). *Alzheimer's disease: Senile dementia and related disorders*. Nueva York, Raven Press (Aging Vol. 7) 1978; 579-585.
17. SELTZER B, SHERWIN I. A comparison of clinical features in early and late-on set primary degenerative dementia. One entity or two. *Arch. Neurol.* 1983; 40:143-146.
18. JORM AF. Subtypes of Alzheimer's disease: a conceptual analysis and critical review. *Psychol. Med.* 1985; 14:543-553.
19. MCKHANN G, DRACHMAN D, FOLSTEIN M, KATZMAN R, PRICE D, STADLAN EM.. Clinical diagnosis of Alzheimer's disease: report of the NINCDS-ADRDA Work Group under the auspices of Department of Health and Human Services Task Force on Alzheimer's disease. *Neurology (Cleveland)* 1984; 34:939-944.
20. ROCCA WA, AMADUCCI LA, SCHOENBERG BS. Epidemiology of clinically diagnosed Alzheimer's disease. *Ann. Neurol.* 1986; 19:415-424.
21. SCHOENBERG BS. Epidemiology of Alzheimer's disease. *J. Chron. Dis.* 1986; 19:1095-1104.
22. CHANDRA V, BHARUCHA NE, SCHOENBERG BS. Patterns of mortality from types of dementia, United States, 1971 and 1973-1978. *Neurology (Cleveland)* 1986; 38:204-208.

23. MAS JL, ALPEROVITCH A, DEROUESNE C. Épidémiologie de la démence de type Alzheimer. *Rev. Neurol.* 1.987; 143:161-171.
24. MÖLSÄ PK, MARTTILA RJ, RINNE UK. Epidemiology of dementia in a Finnish population. *Acta Neurol. Scand.* 1.982; 65:541-552.
25. WEILER PG. The public health impact of Alzheimer's disease. *Am. J. Public Health* 1.987; 77:1157-1158.
26. PFEFFER RI, AFIFI AA, CHANCE JM. Prevalence of Alzheimer's disease in a retirement community. *Am. J. Epidemiol.* 1.987; 125:420-436.
27. SCHOENBERG BS, ANDERSON DW, HAERER AF. Severe dementia. prevalence and clinical features in a biracial U.S. population. *Arch. Neurol.* 1.985; 42:740-743.
28. SCHOENBERG BS, KOKMEN E, OKAZAKI H. Alzheimer's disease and other dementing illnesses in a defined United States population: incidence rates and clinical features. *Ann. Neurol.* 1.987; 22:724-729.
29. SULKAVA R, WIKSTRÖM J, AROMAA A, RAITASOLO R, LEHTINEN V, LAHTELA K, PALO J. Prevalence of severe dementia in Finland. *Neurology* 1.985; 35:1025-1029.
30. TREVES T, KORCZYN AD, ZILBER N. Presenile dementia in Israel. *Arch. Neurol.* 1.986; 43:26-29.
31. HAUW JJ, VIGNOLO P, DUYCKAERTS C, BECK H, FORETTE F, HENRY JF, LAURENT M, PIETTE F, SACHET A, BERTHAUX P. Étude neuropathologique de 12 centenaires: la fréquence de la démence sénile de type Alzheimer n'est pas particulièrement élevée dans ce groupe de personnes très âgées. *Rev. Neurol.* 1.986; 142:107-115.

32. MATSUYAMA H, NAKAMURA S. Senile changes in the brain in the Japanese: incidence of Alzheimer's neurofibrillary change and senile plaque. En Katzman R, Terry RD, Bick KL (eds): *Alzheimer's Disease, Senile Dementia and Related Disorders*. New York: Raven Press, 1978, pag. 287-297.
33. KAPLAN BB, FINCH CE. The sequence complexity of brain ribonucleic acids. En Brown IR (ed): *Molecular Approaches to Neurobiology*. New York: Academic Press 1982, pag. 71-98.
34. TERRY RD. Citado en BALL MJ: Alzheimer's disease: the mystery of senile dementia. *Clinical Review-Modern Medicine of Canada*, August 1982, vol 37 N° 8, pag. 1137-1143.
35. Demografía sanitaria de la ancianidad. *Ministerio de Sanidad y Consumo*, 1989.
36. BERMEJO F. Epidemiología de la demencia. Revisión del tema y datos de España. *Rev. Clin. Esp.* 1987 (Supl.1); 181:13-21.
37. BERMEJO F, Del SER T, FRANCH O, PORTERA A. Demencias vasculares (multiinfarto). En: *Demencias*. PORTERA A, BERMEJO F (Eds.). Mayoría, Madrid 1980.
38. MATA MI, OÑORBE JA, RODRIGUEZ IG, GOMEZ GM, BERMEJO F. Epidemiología de las demencias. En: *Demencias*. PORTERA A, BERMEJO F (Eds.). Mayoría, Madrid 1980.
39. Del SER T, FRANCH O, BERMEJO F, PORTERA A. Aspectos clínicos y epidemiológicos de las demencias en un hospital general. En: *Demencias*. PORTERA A, BERMEJO F (Eds.). Mayoría, Madrid 1980.
40. CACABELOS R. Demencia senil. Aspectos biomédicos y sociosanitarios. *Xunta de Galicia, Santiago de Compostela* 1988.

41. CACABELOS R. Enfermedad de Alzheimer. *JR Prous editores, Barcelona 1.991*

42. EVANS DA, FUNKENSTEIN H, ALBERT MS, SCHERR PA, COOK NR, CHOWN MJ, HEBERT LE, HENNEKENS CH, TAYLOR JO. Prevalence of Alzheimer's disease in a community population of older person. *JAMA 1.989; 262:2551-2556.*

43. SELKOE. D.J.: Recent advances in Alzheimer's disease. En: *Update V. Harrison's Principles of Internal Medicine 1.984; pag. 15-33.*

44. HEYMAN A, WILKINSON WE, STAFFORD JA, HELMS MJ, SIGMON AH, WEINBERG T: Alzheimer's Disease: A study of epidemiological aspects. *Ann. Neurol. 1.984; 15:335-341.*

45. AMADUCCI LA, FRATIGLIONI L, ROCCA WA, FIESCHI C, LIVREA P, PEDONE D, BRACCO L, LIPPI A, GANDOLFO C, BINO G, et al. Risk factors for clinically diagnosed Alzheimer's disease. *Neurology 1.986; 36: 922-931.*

46. HESTON LL, MASTRI AR, ANDERSON VE, WHITE J. Dementia of the Alzheimer type: Clinical genetics, natural history and associated conditions. *Arch. Gen. Psychiatry 1.981; 38: 1085-1090.*

47. BREITNER JCS, SILVERMAN JM, MOHS RC, DAVIS KL. Familial aggregation in Alzheimer's disease: comparison of risk among relatives of early and late onset cases and among male and female relatives in successive generation. *Neurology 1.988; 38:207-212.*

48. FARRER LA, O'SULLIVAN DM, CUPPLES A, GROWDON JH, MYERS RH. Assessment of genetic risk for Alzheimer's disease among first-degree relatives. *Ann. Neurol. 1.989; 25:485-493.*

49. GOATE A, CHARTIER-HARLIN M-C, MULLAN M, et al. Segregation of missense mutation in the amyloid precursor protein gene with familial Alzheimer's disease. *Nature* 1.991; 349:704-706.
50. NARUSE S, IGARASHI S, KOBAYASHI H, et al. Mis-sense mutation Val-Ile in exon 17 of amyloid precursor protein gene in Japanese familial Alzheimer's disease. *Lancet* 1.991; 337:978-979.
51. ST.GEORGE-HYSLOP PH, TANZI RE, POLINSKY RJ, HAINES JL, NEE L, WATKINS PC, MYERS RH, FELDMAN RG, POLLEN D, DRACHMAN D, et al. The genetic defect causing familial Alzheimer's disease maps on chromosome 21. *Science* 1.987; 235:885-890.
52. YATHAM LN, MCHALE PA, KINSELLA A. Down syndrome and its association with Alzheimer disease. *Acta Psychiat. Scand.* 1.988; 77:38-41.
53. WHITE JA, MCGUE M, HESTON LI. Fertility and parental age in Alzheimer's disease. *J. Gerontol.* 1.986; 41:40-43.
54. COHEN D, EISDOFER C, LEVERENZ J. Alzheimer's disease and maternal age. *J. Am. Geriatr. Soc.* 1.982; 30:204-208.
55. SJOGREN T, SJOGREN H, LINDGREN A.G.H. Morbus Alzheimer and Morbus Pick: Genetic, clinical and pathoanatomic study. *Acta Psychiatr. Scand. Supl.* 1.952; 82:1.
56. CORSELLIS JAN, BRUTON CJ, FREEMAN-BROWNE D. The aftermath of boxing. *Psychol. Med.* 1.973; 3:270-303.
57. CORSELLIS JAN. Posttraumatic dementia. En Katzman R, Terry RD, Bick KL (eds): *Alzheimer's disease, senile dementia and related disorders. Aging (Vol. 7).* New York, Raven Press 1.978; 125-133.

58. SHALAT SL, SELTZAE B, PIDCOCK C, BAKER E. Risk factors for Alzheimer's disease: a case-control study. *Neurology* 1.987; 37: 1630-1633.
59. CRAPPER DR, KRISHMAN SS, DALTON AJ. Brain aluminium distribution in Alzheimer's disease and experimental neurofibrillary degeneration. *Science* 1.973; 180:511-513.
60. CRAPPER DR, KRISHMAN SS, QUITTKAT S. Aluminium, neurofibrillary degeneration and Alzheimer's disease. *Brain* 1.976; 99:67-80.
61. CRAPPER DR, KARLIK S, DE BONI U. Aluminum and other metals in senile (Alzheimer's) dementia. En: Katzman R, Terry RD, Bick KL (eds.). *Alzheimer's disease: senile dementia and related disorders*. Vol. 7. New York: Raven Press, 1.978:471-87.
62. MARKESBERY WR, EHMANN WD, HOSSAIN TIM, ALAUDDIN M, GOODIN DT. Brain trace element levels in Alzheimer's disease by instrumental neutron activation analysis. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 1.981;40:395. abstract.
63. KATZMAN R. Alzheimer's disease. Medical progress. *N. Engl. J. Med.* 1.986; 314:964-973.
64. PERL DP, BRODY AR. Alzheimer's disease: x-ray spectrometric evidence of aluminium accumulation in neurofibrillary tangle-bearing neurons. *Science* 1.980; 208:297-299.
65. MUNOZ GARCIA D, PENDLEBURY WW, KESSLER JB, PERL DP. An immunocytochemical comparison of cytoskeletal proteins in aluminium induced and Alzheimer-type neurofibrillary tangles. *Acta Neuropath. (Berl)* 1.986; 70:243-248.
66. PETERSON C, GOLDMAN JE. Alterations in calcium content and biochemical processes in skin fibroblasts from aged and Alzheimer donors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1.986; 83:2758-2762.

67. BURNET FM. A possible role of zinc in the pathology of dementia. *Lancet* 1.981; 186-188.
68. BALL M.J.: Limbic predilection in Alzheimer's dementia: is reactivated herpes virus involved?. *Can. J. Neurol. Sci.* 1.982; 9:303-306.
69. ZHANG M, KATZMAN R, JIN H, CAI G, WANG Z, QU G, GRANT I, YU E, LEVY P, LIU WT. The prevalence of dementia and Alzheimer's disease in Shanghai, China: impact of age, gender, and education. *Ann. Neurol* 1.990; 27:428-437.
70. FRATIGLIONI L, GRUT M, FORSELL Y, VIITANEN M, GRAFSTRÖM M, HOLMEN K, ERICSSON K, BÄCKMAN L, AHLBOM A, WINBLAD B. Prevalence of Alzheimer's disease and other dementias in an elderly urban population: Relationship with age, sex, and education. *Neurology* 1.991; 41:1886-1892.
71. HULETTE CM, WALFORD RL. Immunological aspects of Alzheimer Disease: A review. *Alz. Disease and Assoc. Disorders* 1.987; 1(2):72-82.
72. TERRY RD, WISNIESWKY H. The ultrastructure of the neurofibrillary tangle and senile plaque. En WOLSTENHOLME GEW, O'CONNOR M (eds). *Alzheimer's disease and related conditions. A Ciba Foundation Symposium. J & A Churchill. London* 1.970.
73. KIDD M. Alzheimer's disease. An electron microscopical study. *Brain* 1.964; 87:307-327.
74. WISNIEWSKI HM, WEN GY. Substructures of paired helical filaments from Alzheimer's disease neurofibrillary tangles. *Acta Neuropathol.* 1.985; 66:173-176.
75. KRAEPELIN E. Senile and pre-senile dementias, traducido en Bick k, Amaducci I, Pepeu G (eds). *The early story of Alzheimer's disease. New York: Raven Press, 1.987, pp 32-81.*

76. IQBAL K, WISNIEWSKI HM. Neurofibrillary tangles, en Reisberg (ed). *Alzheimer's disease*. New York: Free Press, 1.983, pp 48-56.

77. SUZUKI K, TERRY RD. Acta neuropath. 1.967; 8: 276-284. Citado por Terry RD, Wisniewski H, en *Alzheimer's Disease and Related Conditions*, pag 145-168. A Ciba Foundation Symposium. Wolstenholme GEW, O'Connor M (eds). London. J & A Churchill, 1.970.

78. WISNIEWSKI HM, TERRY RD. Morphology of the aging brain, human and animal. *Prog. Brain Res* 1.973; 40:167-186.

79. McKEE AC, KOSIK KS, KOWALL NW. Neuritic pathology and dementia in Alzheimer's disease. *Ann. Neurol.* 1.991; 30:156-165.

80. BRAAK H, BRAAK E, GRUNDKE-IQBAL K. Ocurrance of neuropil threads in the senile brain and in Alzheimer's disease. A third location of paired helical filaments outside of neurofibrillary tangles and neuritic plaques. *Neurosci. Lett.* 1.986; 65:351-355.

81. HENDERSON VW, FINCH CE. The neurobiology of Alzheimer's disease. *J. Neurosurg.* 1.989; 70:335-353.

82. YAMAGUCHI H, HIRAI S, MORIMATSU M, SHOJI M, IHARA Y. A variety of cerebral amyloid deposits in the brains of the Alzheimer-type dementia demonstrated by beta protein immunostaining. *Acta Neuropathol.* 1.988; 76:541-549.

83. RUMBLE B, RETALLACK R, HILBICH C, SIMMS G, MULTHAUP G, MARTINS R, HOCKEY A, MONTGOMERY P, BEYREUTHER K, MASTERS CL. Amyloid A4 protein and its precursor in Down's Syndrome and Alzheimer's disease. *N. Engl. J. Med.* 1.989; 320:1446-1452.

84. GIACCONE G, TAGLIAVINI F, LINOLI G, BOURAS C, FRIGERIO L. Down patients: extracellular preamyloid deposits precede neuritic degeneration and senile plaques. *Neurosci. Lett.* 1.989; 97:232-238.

85. MUNOZ DG, WANG D. Tangle-associated neuritic clusters. *Am. J. Pathol.* 1.992; 140:1167-1178.

86. PENDLEBURY WW, MUÑOZ GARCIA D, PERL DP. Cytoskeletal pathology in neurodegenerative diseases. En Ehrlich YH, Lenox RH, Kornecki E, Berry WO (eds). *Plenum Press* 1.987; 427-442.

87. HANSEN LA, De TERESA R, DAVIES P, TERRY RD. Neocortical morphometry, lesion counts, and choline acetyltransferase levels in the age spectrum of Alzheimer's disease. *Neurology* 1.988; 38:48-54.

88. HAMOS JE, DeGENNARO LJ, DRACHMAN DA. Synaptic loss in Alzheimer's disease. *Neurology* 1.989; 39:355-361.

89. TERRY RD, MASLIAH E, SALMON D, BUTTERS N, DeTERESA R, HANSEN LA, KATZMAN R. Structure-function correlations in Alzheimer disease. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 1.990; 49:335.

90. DeKOSKY ST, SCHEFF SW. Synapse loss in frontal cortex biopsies in Alzheimer's disease: correlation with cognitive severity. *Ann. Neurol.* 1.990; 27:457-464.

91. PORTIER MM. Le cytosquelette neuronal: Aspects structuraux, fonctionnels et dynamiques. *Rev. Neurol.* 1.992; 148,1:1-19.

92. SELKOE DJ, IHARA Y, SALAZAR FJ. Alzheimer's disease: Insolubility of partially purified paired helical filaments in sodium dodecyl sulfate and urea. *Science* 1.982; 215:1243-1245.
93. ROHER AE, PALMER KC, CHAU V, BALL MJ. Isolation and chemical characterization of Alzheimer's disease paired helical filament cytoskeletons: differentiation from amyloid plaque core protein. *J. Cell Biol.* 1.988; 2703-2716.
94. STERNBERGER NH, STERNBERGER LA, ULRICH J. Aberrant neurofilament phosphorylation in Alzheimer disease. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1.985; 82:4274-4276.
95. KOSIK KS, DUFFY LK, DOWLING MM, ABRAHAM C, McCLUSKEY A, SELKOE DJ. Microtubule-associated protein 2: monoclonal antibodies demonstrate the selective incorporation of certain epitopes into Alzheimer neurofibrillary tangles. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1.984; 81:7941-7945.
96. KOSIK KS, JOACHIM CL, SELKOE DJ. Microtubule-associated protein tau is a major antigenic component of paired helical filaments in Alzheimer disease. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1.986, 83:4044-4048.
97. MORI H, KONDO J, IHARA Y. Ubiquitin is a component of paired helical filaments in Alzheimer's disease. *Science* 1.987; 235:1641-1644.
98. WOLOZIN B, DAVIES P. Alzheimer-related neuronal protein A68: specificity and distribution. *Ann. Neurol.* 1.987; 22:521-526.
99. PAPASOZOMENOS SCH. Tau protein immunoreactivity in dementia of the Alzheimer type. I. Morphology, evolution, distribution, and pathogenetic implications. *Lab. Invest.* 1.989; 60:123-137.

100. KANG J, LEMAIRE HG, UNTERBECK A, SALBAUM JM, MASTERS CL, GRZESCHIK KH, MULTHAUP G, BEYREUTHER K, MULLER-HILL B. The precursor of Alzheimer's disease amyloid A4 protein resembles a cell-surface receptor. *Nature* 1.987; 325:733-736.
101. SCHUBERT D, SCHOEDER R, LACORBIERE M, SAITOH T, COLE G. Amiloid beta protein precursor is possibly a heparan sulfate proteoglycan core protein. *Science* 1.988; 241:223-226.
102. GOLDGABER D, LERMAN MI, MCBRIDE OW, SAFFIOTTI U, GAJDUSEK DC. Characterization and chromosomal localization of a cDNA encoding brain amyloid of Alzheimer's disease. *Science* 1.987; 235:877-880.
103. TANZI RE, GUSELLA JF, WATKINS PC, BRUNS GA, ST. GEORGE-HYSLOP P, VAN KEUREN ML, PATTERSON D, PAGAN S, KURNIT DM, NEVE RL. Amiolyd betaprotein gen: cDNA, mRNA distribution, and genetic linkage near the Alzheimer locus. *Science* 1.987; 235:880-884.
104. PONTE P, GONZALEZ-DE WHITT P, SCHILLING J, MILLER J, HSU D, GREENBERG B, DAVIS K, WALLACE W, LIEBERBURG I, FULLER F, CORDELL B. A new A4 amyloid mRNA contains a domain homologus to serine proteinase inhibitors. *Nature* 1.988; 331:525-527.
105. GOLDE TE, ESTUS S, USIAK M, YOUNKIN LH, YOUNKIN SG. Expression of beta amyloid protein precursor mRNAs of a novel alteratively spliced form and quantification in Alzheimer's disease using PCR. *Neuron* 1.990; 4:253-267.
106. NEVE RL, FINCH EA, DAWES LR. Expression of the Alzheimer amyloid precursor gene transcripts in the human brain. *Neuron* 1.988; 1:669-677.

107. ABRAHAM CR, SELKOE DJ, POTTER H. Immunochemical identification of the serine protease inhibitor alfa 1 chymiotrypsin in the brain amyloid deposits of Alzheimer's disease. *Cell* 1.988; 52:487-501.
108. SNOW AD, WILLMER JP, KISILEVSKY R. Sulfated glycosaminoglycans in Alzheimer's disease. *Hum. Pathol.* 1.987; 18:506-510.
109. CORIA F, CASTAÑO EM, FRANGIONE B. Brain amyloid in normal aging and cerebral amyloid angiopathy is antigenically related to Alzheimer's disease beta protein. *Am. J. Pathol.* 1.987; 129:422-428.
110. CASTAÑO EM, FRANGIONE B. Biology of disease, human amyloidosis, Alzheimer disease and related disorders. *Lab. Invest.* 1.988; 57:122-132.
111. TANZI RE, ST GEORGE-HYSLOP PH, HAINES JL, POLINSKY RJ, NEE L, FONCIN JF, NEVE RL, McCLATCHEY AI, CONNEALLY PM, GUSELLA JF. The genetic defect in familial Alzheimer's disease is not tightly linked to the amiloid beta-protein gene. *Nature* 1.987; 329:156-157.
112. IKEDA SI, ALLSOP D, GLENNER GG. Morphology and distribution of plaque and related deposits in the brains of Alzheimer's disease and control cases. *Lab. Invest.* 1.988; 60:113-122.
113. STRUBLE RG, POWERS RE, CASANOVA MF, KITT CA, BROWN EC, PRICE DL. Neuropeptidergic systems in plaques of Alzheimer's disease. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 1.987; 46:567-584.
114. MUNOZ-GARCIA D. Chromogranin A-like immunoreactive neurites are universal components of hippocampal and entorhinal plaques in Alzheimer disease. *Neurology* 1.989; 39: (Supp,1) 396.

115. DICKSON DW, WERTKIN A, MATTIACE LA, FIER E, KRESS Y, DAVIES P, YEN SH. Ubiquitin immunoelectron microscopy of dystrophic neurites in cerebellar senile plaques of Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol.* 1.990; 79:486-493.
116. SCHNIDT ML, LEE VMY, TROJANOWSKI JQ. Comparative epitope analysis of neuronal cytoskeletal proteins in Alzheimer's disease senile plaques neurites and neuropil threads. *Lab. Invest.* 1.991; 64:352-357.
117. ARAI H, LEE VMY, OTVOS L GREENBERG BD, LOWERY DE, SHARMA SK, SCHMIDT ML, TROJANOWSKI JQ. Defined neurofilament, T, and B amyloid precursor protein epitopes distinguish Alzheimer from non-Alzheimer senile plaques. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1.990; 87:2249-2253.
118. PRICE DL, ALTSCHULER RJ, STRUBLE RG, CASANOVA MF, CORK LC, MURPHY DB. Sequestration of tubulin in neurons in Alzheimer's disease. *Brain Res.* 1.986; 385:305-310.
119. KOWALL NW, BEAL MF, BUSCIGLIO J, DUFFY LK, YANKNER BA. An in vivo model for the neurodegenerative effects of beta amyloid and protection by substance P. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1.991; 88:7247-7251.
120. YANKNER BA, DUFFY LK, KIRSCHNER DA. Neurotrophic and neurotoxic effects of amyloid beta protein: reverseal by tachykinin neuropeptides. *Science* 1.990; 250:279-282.
121. YANKNER BA, CACERES A, DUFFY LK. Nerve growth factor potentiates the neurotoxicity of beta amyloid. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1.990; 87:9020-9023.
122. ROHER AE, BALL MJ, BHAVE SV, WAKADE AR. Beta-amyloid from Alzheimer disease brains inhibits sprouting and survival of sympathetic neurons. *Biochem. Biophys. Res. Commun* 1.991; 174:570-572.

123. YANKNER BA, DAWES LR, FISHER S, VILLA-KOMAROF L, OSTER-GRANITE ML, NEVE RL. Neurotoxicity of a fragment of the amyloid precursor associated with Alzheimer's disease. *Science* 1.989; 245:417-420.
124. WHITSON JS, SELKOE DJ, COTMAN CW. Amyloid beta protein enhances the survival of hippocampal neurons in vitro. *Science* 1.989; 243:1488-1490.
125. SELKOE DJ. Aging, amyloid, and Alzheimer's disease. *N. Engl. J. Med.* 1.989; 320:1484-1486.
126. JOACHIM CL, DUFFY LK, MORRIS JH AND SELKOE DJ. Protein chemical and immunocytochemical studies of meningeovascular beta amyloid protein in Alzheimer's disease and normal aging. *Brain Res.* 1.988; 474:100-111.
127. PALMERT MR, PODISNY MB, WITKER DS, OLTERDORF T, YOUNKIN LH, SELKOE DJ, YOUNKIN SG. Antisera to an amino-terminal peptide detect the amyloid protein precursor of Alzheimer's disease and recognize senile plaques. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 1.988; 156:432-437.
128. YAMAGUCHY H, HIRAI S, MORIMATSU M, SHOJI M, HARIGAYA Y. Diffuse type of senile plaques in the brains of Alzheimer-type dementia. *Acta Neuropathol.* 1.988; 77:113-119.
129. PROBST A, BRUNNSCHWILER H, LAUTENSCHLAGER C, ULRICH J. A special type of senile plaque, possibly an initial stage. *Acta Neuropathol.* 1.987; 74:133-141.
130. TAGLIAVINI F, GIACCONE G, FRANGIONE B, BUGIANI O. Preamyloid deposits in the cerebral cortex of patients with Alzheimer's disease and non-demented individuals. *Neurosci. Lett.* 1.988; 93:191-196.

131. YAMAGUCHI H, HIRAI S, MORIMATSU M, SHOJI M, NAKAZATO Y. Diffuse type of senile plaques in the cerebellum of Alzheimer-type dementia demonstrated by B protein immunostatin. *Acta Neuropathol.* 1.989; 77:314-319.
132. McCUBBIN WD, KAY CM, NARINDRASORASAK S, KISILEVSKY R. Circular dichroism and fluorescence studies on two murine serum amyloid A proteins. *Biochem. J.* 1988; 256: 775-83.
133. SCHEIBEL AB, TOMIYASU U. Dendritic sprouting in Alzheimer's presenile dementia. *Exp. Neurol.* 1.978; 60:1-8.
134. PROBST A, BASLER V, BRON B, ULRICH J. Neuritic plaques in senile dementia: A golgi analysis in the hippocampal region. *Brain Res.* 1.983; 268:249-254.
135. BRAAK H, BRAAK E. Neuropil threads occur in dendrites of tangle-bearing nerve cells. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* 1.988; 14:39-44.
136. LENDERS MB, PEERS MC, TRAMU G, DELACOURTE A, DEFOSSEZ A, PETIT H, MAZZUCA M. Dystrophic peptidergic neurites in senile plaques of Alzheimer's disease hippocampus precede formation of paired helical filaments. *Brain Res.* 1.989; 481:344-349.
137. HYMAN BT, VAN HOESEN GW, KROMER LJ, DAMASIO AR. Perforant pathway changes and the memory impairment of Alzheimer's disease. *Ann. Neurol.* 1.986; 20:472-481.
138. CHOI DW, MAULUCCI-GEDDE M, KRIEGSTEIN AR. Glutamate neurotoxicity in cortical cell culture. *J. Neuroscience* 1.987; 7:357-368.
139. SCHAWARCZ R, FOSTER AC, FRENCH ED, WHETSELL WO, KOHLER C. Excitotoxic models for degenerative disorders. *Life Sci.* 1.984; 35:19-32.

140. GREENAMYRE JT. The role of glutamate in neurotransmission and in neurologic disease. *Arch. Neurol.* 1.986; 43:1058-1063.

141. MARAGOS WF, GREENAMYRE JT, PENNEY JB, YOUNG AB. Glutamate dysfunction in Alzheimer's disease: An hypotesis. *TINS* 1.987; 10:65-68.

142. De BONI U, CRAPPER-McLACHLAN. Controlled induction of paired helical filaments of Alzheimer type in cultured human neurons by glutamate and aspartate. *J. Neurol. Sci.* 1.985; 68:105-118.

143. SOFRONIEW MV, PEARSON RCA. Degeneration of cholinergic neurons in the basal nucleus following kainic or N-methyl-D-aspartic acid application to the cerebral cortex in the rat. *Brain Res.* 1.985; 339:186-190.

144. SPENCER PS, NUNN PB, HUGON J, LUDOLPH A, ROSS SM, ROY DN, ROBERTSON RC. Guam amyotrophyc lateral sclerosis-Parkinsonism-Dementia linked to a plant excitant neurotoxin. *Science* 1.987; 237:517-522.

145. ISHII T. Distribution of Alzheimer's neurofibrillary changes in the brain stem and hypothalamus of senile dementia. *Acta Neuropathol.* 1.966; 6:181-187.

146. ARENDT T, TAUBERT G, BIGL V, ARENDT A. Amyloid deposition in the nucleus basalis of Meynert complex: a topographic marker for degenerating cell clusters in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol.* 1.988; 75:226-232.

147. PEARSON RCA, ESIRI MM, HIORNS RW, WILCOCK GK, POWELL TPS. Anatomical correlates of the distribution of the pathological changes in the neocortex in Alzheimer's disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1.985; 82:4531-4534.

148. HOOPER MW, VOGEL FS. The limbic system in Alzheimer's disease. A neuropathologic investigation. *Am. J. Pathol.* 1.976; 85:1-19.
149. HYMAN BT, VAN HOESEN GW, DAMASIO AR, BARNES CL. Alzheimer's disease: cell-specific pathology isolates the hippocampal formation. *Science* 1.984; 225:1168-1170.
150. STEWARD O. Topographic organization of the projections from the entorhinal area to the hippocampal formation of the rat. *J. Comp. Neurol.* 1.976; 167:285-314.
151. VAN HOESEN GW, PANDYA DN. Some connections of the entorhinal (area 28) and perirhinal (area 35) cortices of the rhesus monkey. III. Efferent connections. *Brain Res.* 1.975; 95:39-59.
152. WADE JP, MIRSEN TR, HACHINSKI VC, FISMAN L, LAU C, MERSKEY H. The clinical diagnosis of Alzheimer's disease. *Arch. Neurol.* 1.987; 44:24-29.
153. MASTERS CL, MULTHAUP G, SIMMS G, POTTGIESSER J, MARTINS RN, BEYREUTHER K. Neuronal origin of a cerebral amyloid: neurofibrillary tangles of Alzheimer's disease contain the same protein as the amyloid of plaque cores and blood vessels. *EMBO J.* 1.985; 4:2757-2763.
154. ROSENE DL, VAN HOESEN GW. Hippocampal efferents reach widespread areas of cerebral cortex and amygdala in the rhesus monkey. *Science* 1.977;198:315-317.
155. VAN HOESEN GW. The parahippocampal gyrus. New observations regarding its cortical connections in the monkey. *Trends Neurosci.* 1.982; 5:345-350.
156. BALL MJ, HACHINSKI V, FOX A, KIRSHEN AJ, FISMAN M, BLUME W, KRAL VA, FOX H, MERSKEY H. A new definition of Alzheimer's disease: a hippocampal dementia. *Lancet* 1.985; I:14-16.

157. BALL MJ. Neuronal loss, neurofibrillary tangles and granulovacuolar degeneration in the hippocampus with ageing and dementia. A quantitative study. *Acta Neuropathol.* 1977; 37:111-118.
158. DOEBLER JA, MARKESBERY WR, ANTHONY A, RHOADS RE. Neuronal RNA in relation to neuronal loss and neurofibrillary pathology in the hippocampus in Alzheimer's disease. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 1987; 46:28-39.
159. ESIRI MM, PEARSON RCA, POWELL TPS. The cortex of the primary auditory area in Alzheimer's disease. *Brain Res.* 1986; 366:385-387.
160. KEMPER T. Neuroanatomical and neuropathological changes in normal aging and in dementia. En Albert ML (ed): *Clinical Neurology of Aging.* New York: Oxford University Press 1984, pag 9-25.
161. LEWIS DA, CAMPBELL MJ, TERRY RD, MORRISON JH. Laminar and regional distributions of neurofibrillary tangles and neuritic plaques in Alzheimer's disease: a quantitative study of visual and auditory cortices. *J. Neurosci.* 1987; 1799-1808.
162. ROGERS J, MORRISON JH. Quantitative morphology and regional and laminar distributions of senile plaques in Alzheimer's disease. *J. Neurosci.* 1985; 5:2801-2808.
163. BENSON DF, KUHL DE, HAWKINS RA, et al. The fluorodeoxyglucose 18F scan in Alzheimer's disease and multiinfarct dementia. *Arch. Neurol.* 1983; 40:711-714.
164. DUARA R, GRADY C, HAXBY J, SUNDARAM M, CUTLER NR, HESTON L, MOORE A, SCHLAGETER N, LARSON S, RAPOPORT SI. Positron emission tomography in Alzheimer's disease. *Neurology* 1986; 36:879-887.

165. FOSTER NL, CHASE TN, MANSI L, BROOKS R, FEDIO P, PATRONAS NJ, DI CHIRO G. Cortical abnormalities in Alzheimer's disease. *Ann. Neurol.* 1.984; 16:649-654.
166. AVERBACK P. Two new lesions in Alzheimer's disease. *Lancet (letter)* 1.983; 2:1203.
167. ESIRI MM, WILCOCK GK. The olfactory bulbs in Alzheimer's disease. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 1.984; 47:56-60.
168. REYES PF, GOLDEN GT, FAGEL PL, FARIELLO RG, KATZ L, CARNER E. The prepiriform cortex in dementia of Alzheimer type. *Arch. Neurol.* 1.987; 44:644-645.
169. TALAMO BR, RUDEL RA, KOSIK KS, LEE VM-Y, NEFF S, ADELMAN L, KAUER JS. Pathological changes in olfactory neurons in patients with Alzheimer's disease. *Nature* 1.989; 337:736-739.
170. DAYAN AD. Quantitative histological studies on aged human brain. 2. Senile plaques and neurofibrillary tangles in senile dementia (with an appendix on their occurrence in cases of carcinoma). *Acta Neuropathol.* 1.970; 16:95-102.
171. MÖLSÄ PK, SÄKÖ E, PALJÄRVI L, RINNE JO, RINNE UK. Alzheimer's disease: neuropathological correlates of cognitive and motor disorders. *Acta Neurol. Scand.* 1.987; 75:376-384.
172. WILCOCK GK, ESIRI MM. Plaques, tangles and dementia. A quantitative study. *J. Neurol. Sci.* 1.982; 56:343-356.
173. KURUCZ J, CHARBONNEAU R, KURUCZ A, et al. Quantitative clinicopathologic study of senile dementia. *J. Am. Geriatr. Soc.* 1.981; 29: 158-163.

174. HYMAN BT, VAN HOESEN GW, DAMASIO AR. Alzheimer's disease: glutamate depletion in the hippocampal perforant pathway zone. *Ann. Neurol.* 1.987; 22:37-40.
175. KEMPER TL. Organization of the neuropathology of the amygdala in Alzheimer's disease. En: Katzman R (eds.). *Banbury report 15: biological aspects of Alzheimer's disease.* New York: Cold Spring Harbor Laboratory 1.983; 31-36.
176. SIMPSON J, YATES CM. Olfactory tubercle choline acetyltransferase activity in Alzheimer-type dementia, Down's syndrome and Huntington's disease. *J. Neurol. Neurosur. Psychiatry* 1.984; 47:1138-1139.
177. ROTH M. The association of clinical and neurological findings and its bearing on the classification and aetiology of Alzheimer's disease. *Br. Med. Bull.* 1.986; 42:42-50.
178. GOLDMAN-RAKIC PS. Modular organisation of prefrontal cortex. *Trends Neurosci.* 1.984; 7:419-429.
179. CHUI HC. The significance of clinically defined subgroups of Alzheimer's disease. *J. Neural Transm. Suppl.* 1.987; 24:57-68.
180. JOACHIN CL, MORRIS JH, SELKOE DJ. Clinically diagnosed Alzheimer's disease: Autopsy results in 150 cases. *Ann. Neurol.* 1.988; 24:50-56.
181. MCKHANN G, DRACHMAN D, FOSTEIN M et al. Clinical diagnosis of Alzheimer's disease: report of NINCDS-ADRDA Work Group under the auspices of department of Health and Human Services Task Force on Alzheimer's Disease. *Neurology*, 1.984; 34:939-944.
182. FENTON GW. Electrophysiology of Alzheimer's disease. *Br. Med. Bull.* 1.986; 42:29-32.

183. KATZMAN R, SAITOH T. Advances in Alzheimer's disease. *FASEB J.* 1.991; 5:278-286.
184. JOHNSON KA, HOLMAN BL, ROSEN TJ, NAGEL JS, ENGLISH RJ, CROWDON JH. Iofetamine I 123 single photon emission tomography is accurate in the diagnosis of Alzheimer's disease. *Arch. Intern. Med.* 1.990; 150:752-756.
185. SOININEN HS, JOLKKONEN JT, REINKAINEN KJ, et al. Reduced cholinesterase activity and somatostatin-like immunoreactivity in the cerebrospinal fluid of patients with dementia of the Alzheimer type. *J. Neurol. Sci.* 1.983; 63:167-172.
186. SUNDERLAND T, RUBINOW DR, TARIOT PN, COHEN RM, NEWHOUSE PA, MELLOW AM, MUELLER E, MURPHY DL. CSF Somatostatin in patients with Alzheimer's disease, older depressed patients, and age-matched control subjects. *Am. J. Psychiatry* 1.983; 144:1313-1316.
187. CACABELOS R, NIIGAWA H, IKEMURA Y, YANAGI Y, TANAKA S, RODRIGUEZ ARNAO MD, GOMEZ-PAN A, NISHIMURA T. GHRH-induced GH response in patients with senile dementia of the Alzheimer type. *Acta Endocrinol. (Copenh.)* 1.988; 117:295-301.
188. WOLOZIN BL, PRUCHNICKI A, DICKSON DW, DAVIES P. A neuronal antigen in the brains of Alzheimer's patients. *Science*, 1.986; 232:648-650.
189. KHACHATURIAN ZS. Diagnosis of Alzheimer's Disease. *Arch. Neurol.* 1.985, 42:1097-1105.
190. CRYSTAL H, DICKSON D, FULD P, MASUR D, SCOTT R, MEHLER M, NASDEU J, KAWAS C, ARONSON M, WOLFSON L. Clinico-pathologic studies in dementia: Non demented subjects with pathologically confirmed Alzheimer's disease. *Neurology* 1.988; 38:1682-1687.

191. BIRD ED, SPOKES EDS, IVERSEN LL. Increased dopamine concentration in limbic areas of brain from patients dying with schizophrenia. *Brain* 1.979; 102:347-360.
192. DAVIES J, MALONEY AJ. Selective loss of central cholinergic neurones in Alzheimer's disease. *Lancet* 1.976; 2:1403.
193. SPOKES EGS. The neurochemistry of Huntington's chorea. *Trends Neurosci.* 1.981; 4:115-118.
194. HUGHES J. Centrally acting peptides. *Macmillan. London.*
195. MARTIN JB, LANDIS DMD. Potential implications of brain peptides in neurological disorders. En Martin JB, Reichlin d, Bick K. eds. Neurosecretion and brain peptides. Implications for brain functions and neurological disease. *Adv. Biochem. Psychopharmac.* Vol 28, pag 673-691. *Raven Press. New York.*
196. STRUBLE RG, CORK LC, WHITEHOUSE PJ, PRICE DL. Cholinergic innervation in neuritic plaques. *Science* 1.982; 216:413-415.
197. STRUBLE RG, HEDREEN JC, CORK LC, PRICE DL. Acetylcholinesterase activity in senile plaques of aged macaques. *Neurobiol. Aging* 1.984; 5:191-198.
198. KITT CA, STRUBLE RG, CORK LC, et al. Catecholaminergic neurites in senile plaques in prefrontal cortex of aged nonhuman primates. *Neuroscience* 1.985; 16:691-699.
199. WALKER LC, KITT CA, STRUBLE RG, et al. Glutamic acid decarboxylase-like immunoreactive neurites in senile plaques. *Neurosci. Lett.* 1.985; 59:165-169.

200. KITT CA, PRICE DL, STRUBLE RG, et al. Evidence for cholinergic neurites in senile plaques. *Science* 1.984; 226:1443-1445.

201. STRUBLE RG, KITT CA, WALKER LC, CORK LC, PRICE DL. Somatostatinergic neurites in senile plaques of aged nonhuman primates. *Brain Res.* 1.984; 324:394-396.

202. BRAZEU P, VALE W, BURGUS R, LING N, BUTCHER M, RIVIER J, GUILLEMIN R. Hypothalamic polypeptide that inhibits the secretion of immunoreactive pituitary growth hormone. *Science* 1.973; 179:77-79.

203. BENOIT R, BÖHLEN P, LING N, BRISKIN A, ESCH F, BRAZEU P, YING SY, GUILLEMIN R. Presence of somatostatin-28-(1-12) in hypothalamus and pancreas. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1.982; 79:917-921.

204. BENOIT R, BÖHLEN P, LING N, ESCH F, BAIRD A, YING SY, WEHRENBURG WB, GUILLEMIN R, MORRISON JH, BAKHIT C, KODA L, BLOOM FE. Somatostatin-28-(1-12)-like peptides. En Y.C. Patel y GS Tannenbaum (eds): *Somatostatin. New York: Plenum, pag 89-107.*

205. SHEN LP, PICTET RL, RUTTER WJ. Human somatostatin. Sequence of cDNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1.982; 79:4575-4579.

206. GOODMAN RH, ARON DC, ROOS BA. Rat-preprosomatostatin: structure and processing by microsomal membranes. *J. Biol. Chem* 1.983; 258:5570-5573.

207. MORRISON J, BENOIT R, MAGISTRETTI P, LING N, BLOOM F. Immunohistochemical distribution of pro-somatostatin related peptides in hippocampus. *Neurosci. lett.* 1.982; 34:137-142.

208. MORRISON J, BENOIT R, MAGISTRETTI P, BLOOM F. Immunohistochemical distribution of pro-somatostatin related peptides in cerebral cortex. *Brain Res.* 1.983; 262:344-351.
209. LEWIS DA, CAMPBELL MJ, MORRISON JH. An immunohistochemical characterization of somatostatin-28 and somatostatin-28 (1-12) in monkey prefrontal cortex. *J. Comp. Neurol.* 1.986; 248:1-18.
210. CAMPBELL MJ, LEWIS DA, BENOIT R, MORRISON JH. Regional heterogeneity in the distribution of somatostatin-28 and somatostatin-28 (1-12) immunoreactive profiles in monkey neocortex. *J. Neurosci.* 1.987; 7:1133-1144.
211. BROWNSTEIN M, ARIMURA A, SABO H, SCHALLY A, KIZER JS. The regional distribution of somatostatin in the rat brain. *Endocrinology* 1.975; 96:1456-1461.
212. KOBAYASHI RM, BROWN M, VALE W. Regional distribution of neurotensin and somatostatin in rat brain. *Brain Res.* 1.977; 126:584-589.
213. PALKOVITS M, BROWNSTEIN MJ, ARIMURA A, SATO H, SCHALLY AV, KIZER JS. Somatostatin content of the hypothalamic ventromedial and arcuate nuclei and the circumventricular organs in the rat. *Brain Res.* 1.976; 109:430-434.
214. EPELBAUM J. Somatostatin in the central nervous system: physiology and pathological modifications. *Prog. Neurobiol.* 1.986; 27:63-100.
215. JOHANSSON O, HÖKFELT T, ELDE RP. Immunohistochemical distribution of somatostatin-like immunoreactivity in the central nervous system of the adult rat. *Neuroscience* 1.984; 13(2):265-339.

216. SORENSEN KV. Somatostatin: localization and distribution in the cortex and the subcortical white matter of human brain. *Neuroscience* 1.982; 7(5):1227-1232.
217. KAWANO Y, DAIKOKU K, SAITO S. Immunohistochemical studies of intrahypothalamic somatostatin containing neurons in rat. *Brain Res.* 1.982; 142:227-232.
218. ROBERTS G, WOODHAMS P, POLAK J, CROW T. Distribution of neuropeptides in the limbic system of the rat: the amygdaloid complex. *Neuroscience* 1.982; 7(1):99-131.
219. GRAY T, CASSEL M, WILLIAMS T. Synaptology of three peptidergic neuron types in the central nucleus of the rat amygdala. *Peptides* 1.982; 3:273-281.
220. KAWAI Y, INAGAKI S, SHIOSAKA S, SENBA E, HARA Y, SAKANAKA M, TAKATSUKI K TOHYAMA M. Long descending projections from amygdaloid somatostatin containing neurons to the lower brain stem. *Brain Res.* 1.982; 239:603-607.
221. HIGGINS GA, SCHWABER JS. Somatostatinergic projections from the central nucleus of the amygdala to the vagal nuclei. *Peptides* 1.983; 4(5):663-668.
222. VERNEY C, GASPAR P, FEBVRET A, BERGER B. Transient tyrosine hydroxylase-like immunoreactive neurons contain somatostatin and substance P in the developing amygdala and bed nucleus of the stria terminalis of the rat. *Developmental Brain Research.* 1988; 42: 45-58.
223. CHRONWALL BM, CHASE TN, O'DONOHUE TL. Coexistence of neuropeptide-Y and somatostatin in rat and in human cortical and rat hypothalamus neurons. *Neurosci. lett.* 1.984; 52(3):213-217.

224. BEAL MF, MAZUREK MF, SVENDSEN CN, BIRD ED, MARTIN JB. Widespread reduction of somatostatin-like immunoreactivity in the cerebral cortex in Alzheimer's disease. *Ann. Neurol.* 1986; 20:489-495
225. DOUGLAS DW, POISNER AM. Stimulus secretion coupling in a neurosecretory organ: the role of calcium in the release of vasopressin from the neurohypophysis. *J. Physiol.* 1.964; 172:1-18.
226. DROUVA SV, EPELBAUM J, HERY M, TAPIA-ARANCIBIA L, LAPLANTE E, KORDON C. Ionic channels involved in the LHRH and SRIF release from rat mediobasal hypothalamus. *Neuroendocrinology* 1.981;32:155-162.
227. TAPIA-ARANCIBIA L, REICHLIN S. Vasoactive intestinal peptide and PHI stimulate somatostatin release from rat cerebral cortical and diencephalic cells in dispersed cell culture. *Brain Res.* 1.985; 336:67-72.
228. ROBBINS J, LANDON RM. Somatostatin release from cerebral cortical cell: influence of amino-acid neurotransmitters. *Brain Res.* 1.983; 273:374-378.
229. PETERFREUND R, VALE W. Ovine corticotropin-releasing factor stimulates somatostatin secretion from cultured brain cells. *Endocrinology* 1.983; 112(4):1275-1279.
230. TANNENBAUM GS. Evidence for autoregulation of growth hormone secretion via the central nervous system. *Endocrinology* 1.980; 107:2117-2120.
231. WILLOUGHBY JO, MENADUE M, ZEEGERS P, WISE PH, OLIVER JR. Effects of human growth hormone on the secretion of rat growth hormone. *J. Endocrinol.* 1.980; 86:165-169.

232. BERELOWITZ M, DUDLAK D, FROHMAN LA. Release of somatostatin-like immunoreactivity from incubated rat hypothalamus and cerebral cortex. Effects of glucose and glucoregulatory hormones. *J. Clin. Invest.* 1.982; 69(6):1293-1301.
233. ROBBINS R. Influence of glucose on somatostatin synthesis and secretion on isolated cerebral cells. *J. Neurochem.* 1.983; 40:1430-1434.
234. PETERFREUND R, VALE W. Somatostatin analogs inhibit somatostatin secretion from cultured hypothalamus cells. *Neuroendocrinology* 1.984; 39:397-402.
235. GULYA K, WAMSLEY JK, GEHLERT D, PELTON JT, DUEKLES SP, HRUBY VJ, YAMAMURA HI. Light microscopic autoradiographic localization of somatostatin receptors in the rat brain. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1.985; 235:254-258.
236. REUBI JC, CORTES R, MAURER R, PROBST A, PALACIOS JM. Distribution of somatostatin receptors in the human brain: An autoradiographic study. *Neuroscience* 1.986; 18:329-346.
237. MORTIMER CH, CARR D, LIND T et al. Growth hormone release-inhibiting hormone: effects on circulating glucagon, insulin and growth hormone in normal, diabetic, acromegalic and hypopituitary patients. *Lancet* 1.974; i:697-701.
238. BLOOM S, MORTIMER CH, THORNER MO et al. Inhibition of gastrin and gastric-acid secretion by growth hormone release-inhibiting hormones. *Lancet* 1.974; ii:1106-1109.
239. REISINE T. Somatostatin desensitization: loss of the ability of somatostatin to inhibit cyclic AMP accumulation and adrenocorticotropin hormone release. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1.984; 229:14-20.

240. KOCH BD, SCHONBRUNN A. The somatostatin receptor is directly coupled to adenylate cyclase in GH C pituitary cell membranes. *Endocrinology* 1.984; 114:1784-1790.
241. SEGAL DS, MANDELL AJ. Differential behavioral effects of hypothalamic polypeptides. En *The Thyroid Axis Drugs and Behaviour*, pag 129-133. *A.J. Prange (Ed.). Raven Press. N.Y.*
242. HAVLICEK V, REZEK M, FRIESEN H. Somatostatin and thyrotropin releasing hormone central effect on sleep and motor system. *Pharmac. Biochem. Behav.* 1.976; 4:455-459.
243. DAVIES P, TERRY RD. Cortical somatostatin-like immunoreactivity in cases of Alzheimer's disease and senile dementia of the Alzheimer type. *Neurobiol. Aging* 1.981; 2:9-14.
244. DAVIES P, KATZMAN R, TERRY RD. Reduced somatostatin-like immunoreactivity in cerebral cortex from cases of Alzheimer disease and Alzheimer senile dementia. *Nature* 1.980; 288:279-280.
245. EULER US. von, GADDUM JH. An unidentified depressor substance in certain tissue extracts. *J. Physiol. (Lond.)* 1.931; 72:74-87.
246. CHANG MM, LEEMAN SE. Isolation of biologic peptide from bovine hypothalamic tissue and its characterization as substance P. *J. Biol. Chem.* 1.970; 245:4784-4790.
247. CHANG MM, LEEMAN SE, NIALL HD. Amino acid sequence of substance P. *Nature New Biol.* 1.971; 232:86-87.
248. KÖNING JF, KLIPPEL RA. The rat brain. A stereotaxic atlas of the forebrain and lower parts of the brain stem. *Williams and Wilkins, Baltimore, Md.* 1.963.

249. HÖKFELT T, KELLERTH JO, NILLSON G, PERNOW B. Morphological support for a transmitter or modulator role of substance P: immunohistochemical localization in the central nervous system and in primary sensory neurons. *Science* 1.975; 190:889-890.
250. COOPER PE, FERNSTROM MH, RORSTAD O, LEEMAN SE, MARTIN JB. The regional distribution of somatostatin, substance P and Neurotensin in Human Brain. *Brain Res.* 1.981; 218:219-232.
251. HÖKFELT T, LJUNGDAHL A, TERENIUS L, ELDE R, NILSSON G. Immunohistochemical analysis of peptide pathways possibly related to pain and analgesia: enkephalin and substance P. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1.977; 74:3081-3085.
252. MAI JK, STEPHENS PH, HOPF A, CUELLO AC. Substance P in the human brain. *Neuroscience* 1.986; 17:709-739.
253. BEN-ARI U, LE GAL LA SALLE G, KANAZAWA I. Regional distribution of substance P within the amygdaloid complex and bed nucleus of the stria terminalis. *Neurosci. lett.* 1.977;4:299-302.
254. BROWNSTEIN MJ, MROZ EA, KIZER JS, PALKOVITZ M, LEEMAN SE. Regional distribution of substance P in the brain of the rat. *Brain Res.* 1.976; 116:299-305.
255. KANAZAWA I, JESSEL T. Post-mortem changes and regional distribution of substance P in the rat and mouse nervous system. *Brain Res.* 1.976; 117:362-367.
256. CUELLO AC, JESSELL T, KANAZAWA I, IVERSEN LL. Substance P: localization in synaptic vesicles in rat central nervous system. *J. Neurochem.* 1.977; 29:747-751.

257. DAVIES J, DRAY A. Substance P in the substantia nigra. *Brain Res.* 1.976; 107:623-627.
258. GUYENET PG, AGHAJANIAN GK. Excitation of neurons in the nucleus locus coeruleus by substance P and related peptides. *Brain Res.* 1.977; 136:178-184.
259. MAGNUSSON T, CARLSSON A, FISHER GH, CHANG C, FOLKERS K. Effect of synthetic substance P on monoaminergic mechanism in brain. *J. Neural. Transm.* 1.976; 38:89-93.
260. PHILLIS JW, LIMACHER JJ. Substance P excitation of cerebral cortical Betz cells. *Brain Res.* 1.974; 69:158-163.
261. OTSUKA M, KONISHI S. Release of substance P-like immunoreactivity from isolated spinal cord of newborn rat. *Nature* 1.976; 264:83-84.
262. KANAZAWA I, BIRD E, O'CONNELL R, POWELL D. Evidence for a decrease in substance P content of substantia nigra in Huntington's chorea. *Brain Res.* 1.977; 120:387-392.
263. MAUBORGUE A, JAVOY-AGID F, LEGRAND JC, AGID Y, CESSÉLIN F. Decrease of substance P immunoreactivity in the substantia nigra and pallidum of Parkinsonian brains. *Brain Res.* 1.983; 268:167-170.
264. GALE JS, BIRD ED, SPOKES EG, IVERSEN LL, JESSELL T. Human brain substance P: distribution in controls and Huntington's chorea. *J. Neurochem.* 1.978; 30:633-634.
265. DAVIES P, KATZ D, CRYSTAL H. Choline acetyltransferase, somatostatin, and substance P in selected cases of Alzheimer's disease and senile dementia of the Alzheimer type. En Corkin S, Davis KL, Growdon JH, Usdin E, Wurtman RJ (eds.). *Aging, vol. 19: Alzheimer's Disease: A Report of Progress in Research.* Pag. 9-14. Raven Press. New York.

266. CRYSTAL HA, DAVIES P. Cortical substance P-like immunoreactivity in cases of Alzheimer's disease and senile dementia of the Alzheimer type. *J. Neurochem.* 1.982; 38:1781-1784.
267. EMSON PC, LEE C, REHFELD CF. Cholecystokinin octapeptide: vesicular localization and calcium dependent release from rat brain in vitro. *Life Sci.* 1.980; 26:2157-2163.
268. PINGET M SRAUSS E, YALOW RS. Localization of cholecystokinin-like immunoreactivity in isolated nerve terminals. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1.978; 75:6324-6326.
269. PETERS A, MILLER M, KIMERER LM. Cholecystokinin-like immunoreactive neurons in rat cerebral cortex. *Neuroscience* 1.983; 8:431-448.
270. MARLEY PD, REHFELD JF, EMSON PC. Distribution and chromatographic characterization of gastrin and cholecystokinin in the rat central nervous system. *J. Neurochem.* 1.984; 42:1523-1535.
271. FREUND TF, MAGLOCZKY Z, SOLTESZ I, SOMOGYI P. Synaptic connections, axonal and dendritic patterns of neurons immunoreactive for cholecystokinin in the visual cortex of the cat. *Neuroscience* 1.986; 4:1113-1159.
272. SAKAMOTO N, TAKATSUJI K, SHIOSAKA S, TATEISHI K, HASHIMURA E, MIURA S, HAMOKA T, TOHYAMA M. Cholecystokinin-8-like immunoreactivity in the pre- and post-central gyri of the human cerebral cortex. *Brain Res.* 1.984; 307:77-83.
273. GREENWOOD RS, GODAR SE, REAVES TA, HAYWARD JN. Cholecystokinin in hippocampal pathways. *J. Comp. Neurol.* 1.981; 203:335-350.

274. MENDELSON SD, GORZALKA BB. Cholecystokinin-octapeptide produces inhibition of lordosis in the female rat. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 1.984; 21:755-759.
275. BLOCH GJ, BABCOCK AM, GORSKI RA, MICEVYCH PE. Cholecystokinin stimulates and inhibits lordosis behavior in female rats. *Physiol. Behav.* 1.987; 39:217-224.
276. VJAYAN E, SAMSON WK, McCANN SM. In vivo and in vitro effects of cholecystokinin on gonadotrophin, prolactin, growth hormone and thyrotropin release in the rat. *Brain Res.* 1.979; 172:295-302.
277. KIMURA F, HASHIMOTO R, KAWAKAMI M. The stimulatory effect of cholecystokinin implanted in the medial preoptic area on luteinizing hormone secretion in the ovariectomized estrogen-primed rat. *Endocrinol. Jpn.* 1.983; 30:305-309.
278. HASHIMOTO R, KIMURA F. Inhibition of gonadotropin secretion induced by cholecystokinin implants in the medial preoptic area by the dopamine receptor blocker, pimozide, in the rat. *Neuroendocrinology* 1.986; 42:32-37.
279. MICEVYCH PE, BABCOCK AM, MATT A, LU JKH. Cholecystokinin inhibits K⁺ stimulated LHRH release from male and female rat hypothalami in vitro. *Neurosci. Abstr.* 1.986; 12:1415.
280. DODD J, KELLY JS. Excitation of CA1 pyramidal neurones of the hippocampus by the tetra and octapeptide C-Terminal fragments of cholecystokinin (proceedings). *J. Physiol.* 1.979; 295:61-62.
281. MAZUREK MF, BEAL MF. Cholecystokinin and somatostatin in Alzheimer's disease postmortem cerebral cortex. *Neurology* 1.991; 41:716-719.

282. ROSSOR MN, REHFELD JF, EMSON PC, MOUNTJOY CQ, ROTH M, IVERSEN LL. Normal cortical concentration of cholecystokinin-like immunoreactivity with reduced choline acetyltransferase activity in senile dementia of Alzheimer type. *Life Sci.* 1.981; 29:405-410.
283. FERRIER IN, CROSS AJ, JOHNSON JA, ROBERTS GW, CROW TJ, CORSELLIS JAN, LEE YC, et al. Neuropeptides in Alzheimer type dementia. *J. Neurol. Sci.* 1.983; 62:159-170.
284. PERRY RH, DOCKRAY GJ, DIMALINE R, PERRY EK, BLESSED G, TOMLINSON BE. Neuropeptides in Alzheimer's disease, depression and schizophrenia. *J. Neurol. Sci.* 1.981; 51:465-472.
285. BLASCHKO H, COMLINE RS, SCHNEIDER FH, SILVER M, SMITH AD. Secretion of chromaffin granule protein, chromogranin, from the adrenal gland after splanchnic stimulation. *Nature* 1.967; 215:58-59.
286. HOGUE-ANGELLETTI R. Chromogranins and neuroendocrine secretion. *Lab. Invest.* 1.986; 55:387-390.
287. O'CONNOR DT, FRIGON PF. Chromogranin A, the major catecholamine storage vesicle soluble protein. Multiple size forms, subcellular storage, and regional distribution in chromaffin and nervous tissue elucidated by radioimmunoassay. *J. Biol. Chem.* 1.984; 259:3237-3247.
288. SMITH AD, WINKLER H. Purification and prperties of an acidic protein from chromaffin granules of bovine adrenal medulla. *Biochem. J.* 1.967; 103:483-492.
289. BANKS P, HELLE K. The release of protein from the stimulated adrenal medulla. *Biochem. J.* 1.965; 97:40c.

290. SMITH WJ, KIRSHNER N. A specific soluble protein from the catecholamine storage vesicles of bovine adrenal medulla. *Mol. Pharmacol.* 1967; 3:52.
291. FISCHER-COLBRIE R, FRISCHENSCHLAGER I. Immunological characterization of secretory proteins of chromaffin granules: chromogranins a; chromogranins B and adrenal enkephalin-containing peptides. *J. Neurochem.* 1985; 44:1854-1861.
292. ROSA P, ZANINI A. Characterization of adenohipophysial polypeptides by two-dimensional gel electrophoresis. *Mol. Cell Endocrinol.* 1985;24:181.
293. FISCHER-COLBRIE R, HAGN C, KILPATRICK L, WINKLER H. Chromogranin C: a third component of the acidic proteins in chromaffin granules. *J. Neurochem.* 1986; 47:318-321.
294. ROSA P, HILLE A, LEE RWH, ZANINI A, dE CAMILLE P, HUTTNER WB. Secretogranins I and II: two tyrosine-sulfated secretory proteins common to a variety of cells secreting peptides by the regulated pathway. *J. Cell Biol.* 1985; 101:1999-2011.
295. HAGN C, SCHMID KW, FISCHER-COLBRIE R, WINKLER H. Chromogranin A,B and C in human adrenal medulla and endocrine tissues. *Lab. Invest.* 1986; 55:405-411.
296. COHN DV, ZANGERLE R, FISCHER-COLBRIE R, CHU LLH, ELTING JJ, HAMILTON JW, WINKLER H. Similarity of secretory protein I from parathyroid gland to chromogranin A from adrenal medulla. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1982; 79:6056-6059.
297. EHRHART M, GRUBE D, BADER MF, AUNIS D, GRATZL M. Chromogranin A in pancreatic islet: cellular and subcellular distribution. *J. Histochem.* 1986; 34:1673-1682.
298. O'CONNOR DT. Chromogranin: widespread immunoreactivity in polypeptide hormone producing tissues and in serum. *Regul. Pept.* 1983; 6:263-280.

299. O'CONNOR DT, BURTON D, DEFTOS LJ. Chromogranin A: immunohistology reveals its universal occurrence in normal polypeptide hormone producing endocrine glands. *Life Sci.* 1.983; 33:1657-1663.
300. FISCHER-COLBRIE R, HAGN C, SCHOBER M. Chromogranins A,B and C: widespread constituents of secretory vesicles. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1.987; 493:120-134.
301. LASSMANN H, HAGN C, FISCHER-COLBRIE R, WINKLER H. Presence of chromogranin A,B and C in bovine endocrine and nervous tissues: a comparative immunohistochemical study. *Histochem. J.* 1.986; 18:380-386.
302. NOLAN JA, TROJANOWSKI JQ, HOGUE-ANGELETTI R. Neurons and neuroendocrine cells contain chromogranin: detection of the molecule in normal bovine tissues by immunochemical and immunohistochemical methods. *J. Histochem. Cytochem.* 1.985; 33:791-798.
303. VOLKNANDT W, SCHOBER M, FISCHER-COLBRIE R, ZIMMERMANN H, WINKLER H. Cholinergic nerve terminals in the rat diaphragm are chromogranin A immunoreactive. *Neurosci. Lett.* 1.987; 81:241-244.
304. O'CONNOR DT, FRIGON RP, SOKOLOFF RL. Human chromogranin A: purification and characterization from catecholamine storage vesicles of human pheochromocytoma. *Hypertension* 1.984; 6:2-12.
305. KILPATRICK L, GAVINE F, APPS D, PHILLIPS J. Biosynthetic relationship between the major matrix proteins of adrenal chromaffin granules. *FEBS lett.* 1.983; 164:383-388.
306. APPS DK, PHILLIPS JH, PURVES FC. Glycoproteins of the chromaffin-granule matrix: use of lectin blotting to distinguish several separate classes. *Neuroscience* 1.985; 16:477-487.

307. HUTTON JC, HANSEN F, PESHAVARIA M. Beta-granins: 21 KDa co-secreted peptides of the insulin granule closely related to adrenal medullary chromogranin. *FEBS lett.* 1.985; 188:336-340.
308. IACANGELO A, OKAYAMA H, EIDEN LE. Primary structure of rat chromogranin A and distribution of this mRNA. *FEBS lett.* 1.988; 227:115-121.
309. WILSON BS, LLOYD RV. Detection of chromogranin in neuroendocrine cells with a monoclonal antibody. *Am. J. Pathol.* 1.984; 115:458-468.
310. BENEDUM UM, BAEUERLE PA, KONECKI DS, FRANK R, POWELL J, MALLET J, HUTTNER WB. The primary structure of bovine chromogranin A: a representative of a class of acidic secretory proteins common in a variety of peptidergic cells. *EMBO J.* 1.986; 5:1495-1502.
311. IACANGELO A, AFFOLTER H-U, EIDEN LE, HERBERT E, GRIMES M. Bovine chromogranin A sequence and distribution of its messenger RNA in endocrine tissues. *Nature* 1.986; 323:82-86.
312. IACANGELO AL, FISCHER-COLBRIE R, KOLLER KJ, BROWNSTEIN MJ, EIDEN LE. The sequence of porcine chromogranin A messenger RNA demonstrates chromogranin A can serve as the precursor for the biologically active hormone, pancreastatin. *Endocrinology* 1.988; 122:2339-2341.
313. HELMAN LJ, AHN TG, LEVINE MA, ALLISON A, COHEN PS, COOPER MJ, COHN DV, ISRAEL MA. Molecular cloning and primary structure of human chromogranin A (secretory protein) cDNA. *J. Biol. Chem.* 1.988; 263:11559-11563.

314. KONECKI DS, BENEDUM UM, GERDES H-H, HUTTNER WB. The primary structure of human chromogranin A and pancreastatin. *J. Biol. Chem.* 1.987; 262:17026-17030.
315. MURRAY SS, DEAVEN LL, BURTON DW, O'CONNOR DT, MELLON PL, DEFTOS LJ. The gene for human chromogranin A (CgA) is located on chromosome 14. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1.987; 142(1):141-144.
316. EIDEN LE, IACANGELO A, HSU C-M, HOTCHKISS AJ, BADER M-F, AUNIS D. Chromogranin A synthesis and secretion in chromaffin cells. *J. Neurochem.* 1.987; 49:65-74.
317. SIMON JP, BADER MF, AUNIS D. Secretion from chromaffin cells is controlled by chromogranin A-derived peptides. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1.988; 85:1712-1716.
318. SOMOGYI P, HODGSON AJ, DePOTTER RW, FISCHER-COLBRIE R, SCHOBER M, WINKLER H, CHUBB IW. Chromogranin immunoreactivity in the central nervous system. Immunochemical characterization, distribution and relationship to catecholamine and enkephalin pathways. *Brain. Res. Rev.* 1.984; 8:193-230.
319. WILSON BS, PHAN SH, LLOYD RV. Chromogranin from normal human adrenal glands: purification by monoclonal antibody affinity chromatography and partial n-terminal amino acid sequence. *Regul. Pept.* 1.986; 13:207-223.
320. LLOYD RV, WILSON BS. Specific endocrine tissue marker defined by a monoclonal antibody. *Science* 1.983; 222:628-630.
321. MUNOZ DG, KOBYLINSKI L, HENRY DD, GEORGE DH. Chromogranin A-like immunoreactivity in the human brain: distribution in bulbar medulla and cerebral cortex. *Neuroscience* 1.990; 34:533-543.

322. De CAMILLI P, NAVONE F. Regulated secretory pathways of neurons and their relation to the regulated secretory pathway of endocrine cells. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1.987;493:461-479.
323. CUMMINGS SL, SCOTT YOUNG WIII, BISHOP GA, De SOUZA EB, KING JS. Distribution of corticotropin-releasing factor in the cerebellum and precerebellar nuclei of the opossum: a study utilizing immunohistochemistry, in situ hybridization histochemistry, and receptor autoradiography. *J. Comp. Neurol.* 1.989; 280:501-521.
324. WESTERMANN R, STOGBAUER F, UNSICKER K, LIETZKE R. Calcium-dependence of chromogranina A-catecholamine interaction. *FEBS lett.* 1.988; 239:203-206.
325. REIFFEN FU, GRATZI M. Chromogranins, widespread in endocrine and nervous tissue, bind Ca^{2+} . *FEBS lett.* 1.986; 195:327-330.
326. REIFFEN FU, GRATZI M. Ca^{2+} binding to chromaffin vesicle matrix proteins: effect of pH, Mg^{2+} , and ionic strength. *Biochemistry* 1.986; 25:4402-4406.
327. BAIMBRIDGE KG, KAO J. Calbindin D-28K protects against glutamate induced neurotoxicity in rat CA1 pyramidal neuron cultures. *Soc. Neurosci. Abstr.* 1.988; 14:1264.
328. SLOVITER RS. Calcium binding protein (calbindin) immunocytochemistry in normal rat hippocampal granule cells: highest dendritic concentration precisely where hilar mossy cells innervate. *Soc. Neurosci. Abstr.* 1.987; 13:1334.
329. HOFFMAN SR, KOWALL NW, McKEE AC. Calbindin D28 neurons in the hippocampal formation are resistant to degeneration and do not develop regenerative features in Alzheimer's disease. *Soc. Neurosci. Abstr.* 1.988; 14:154.

330. EIDEN LE. Is chromogranin a prohormone?. *Nature* 1.987; 325:301.
331. HUTTNER WB, BENEDUM UM. Chromogranin A and pancreastatin. *Nature* 1.986; 325:305.
332. TATEMOTO K, EFENDIC S, MUTT V, MAKK G, FEISTNER GJ, BARCHAS JD. Pancreastatin, a novel pancreatic peptide that Pinhibits insulin secretion. *Nature* 1.986; 324:476-478.
333. O'CONNOR DT, DEFTOS LJ. Secretion of chromogranin A by peptide-producing endocrine neoplasms. *N. Engl. J. Med.* 1.986; 314(18):1145-1149.
334. SOBOL RE, O'CONNOR DT, ADDISON J, SUCHOCKI K, ROYSTON I, DEFTOS LJ. Elevated serum chromogranin A concentrations in small lung carcinoma. *Ann. Intern. Med.* 1.986; 105:698-701.
335. WASSERMAN RH, TAYLOR AN. Vitamin D3-induced calcium-binding protein in chick intestinal mucosa. *Science* 1.966; 152:791-793.
336. TAYLOR AN, WASSERMAN RH. Vitamin D3-induced calcium-binding protein: Partial purification, electrophoretic visualization and tissue distribution. *Arch. Biochem. Biophys.* 1.967; 119:536-540.
337. HERMSDORF CL, BRONNER F. Vitamin D-dependent calcium-binding protein from the rat kidney. *Biochim. Biophys. Acta* 1.975; 379:553-561.
338. TAYLOR AN. Chick brain calcium-binding protein: Comparison with intestinal vitamin D-induced calcium binding protein. *Arch. Biochem. Biophys.* 1.974; 161:100-108.

339. BAIMBRIDGE KG, MILLER JJ. Immunohistochemical localization of calcium binding protein in the cerebellum, hippocampal formation and olfactory bulb of the rat. *Brain Res.* 1.982; 245:223-229.
340. CHRISTAKOS S, NORMAN AW. Vitamin D3-induced calcium-binding protein in bone tissue. *Science* 1.978; 202:70-71.
341. CHRISTAKOS S, FRIEDLANDER EJ, FRANDSEN BR, NORMAN AW. Studies on the mode of action of calciferol. XIII. Development of a radioimmunoassay for vitamin D-dependent chick intestinal calcium-binding protein and tissue distribution. *Endocrinology* 1.979; 104:1495-1503.
342. TAYLOR AN. Tooth formation and the 28.000 Dalton vitamin D-dependent calcium-binding: An immunocytochemical study. *J. Histochem. Cytochem.* 1.984; 32:159-164.
343. WASSERMAN RH. Nomenclature of the Vitamin-D induced calcium-binding proteins. En AW Norman et al (eds.), *Vitamin D. Berlin, New York: Walter De Gruyter*, 1.985, pag 321-323.
344. JANDE SS, MALER L, LAWSON DEM. Immunohistochemical mapping of vitamin D-dependent calcium-binding protein in brain. *Nature* 1.981; 294:765-767.
345. BAIMBRIDGE KG, MILLER JJ, PARKES CO. Calcium binding protein distribution in the rat brain. *Brain Res.* 1.983; 239:519-525.
346. GARCIA SEGURA LM, BAETENS D, ROTH J, NORMAN AW, ORCI L. Immunohistochemical mapping of calcium-binding protein immunoreactivity in the rat central nervous system. *Brain Res.* 1.984; 296:75-86.

347. CELIO MR, NORMAN AW. Nucleus basalis Meynert neurons contain the vitamin D-induced calcium-binding protein (calbindin-D 28K). *Anat. Embriol.* 1.985; 173:143-148.
348. CELIO MR. Calcium binding proteins in the rat brain. *Habilitationsschrift. Universitat Zurich* 1.984; 1-100.
349. CAMPBELL AK. Intracellular calcium. *New York: John Wiley and sons* 1.983; pag 393-429.
350. CRAPPER DR, WONG L, BERGERON C, BAIMBRIDGE KG. Calmodulin and calbindin D28K in Alzheimer disease. *Alzheimer Dis. Assoc. Disord.* 1.987;1(3):171-179.
351. HOF PR, MORRISON JH. Neocortical neuronal subpopulations labeled by a monoclonal antibody to Calbindin exhibit differential vulnerability in Alzheimer's disease. *Exp. Neurol.* 1.991; 111:293-301.
352. KRETTEK JE, PRICE JL. A description of the amygdaloid complex in the rat and cat with observations on intra-amygdaloid axonal connections. *J. Comp. Neurol.* 1.978; 178:255-280.
353. PRICE JL, AMARAL DG. An autoradiographic study of the projections of the central nucleus of the monkey amygdala. *J. Neurosci.* 1.981; 1:1242-1259.
354. AGGLETON JP. A description of intra-amygdaloid connections in old world monkeys. *Exp. Brain. Res.* 1.985; 57:390-399.
355. VOLSCH M. Zur vergleichenden Anatomie des Mandelkerns und seiner Nachbargebilde. I Teil. *Arch. Mikrosk. Anat. Entwicklungsmech.* 1.906; 68:573-683.

356. VOLSCH M. Zur vergleichenden Anatomie des Mandelkerns und seiner Nachbargebilde. II Teil. *Arch. Mikrosk. Anat. Entwicklungsmech.* 1.910; 76:373-523.
357. UCHIDA Y. A contribution to the comparative anatomy of the amygdaloid nuclei in mammals, especially in rodents: I. Rat and mouse. *Folio Psychiatr. Neurol. Jpn.* 1.950; 4:91-107.
358. KOIKEGAMI H. Amygdala and other related limbic structures; experimental studies on the anatomy and function: I. Anatomical researches with some neurophysiological observations. *Acta Med. Biol. (Niigata)*. 1.963; 10:161-277.
359. BROCKHAUS H. Zur normalen und pathologischen Anatomie des Mandelkerngebietes. *J. Psychol. Neurol.* 1.938; 49:1-136.
360. JOHNSTON JB. Further contributions to the study of the evolution of the forebrain. *J. Comp. Neurol.* 1.923; 35:337-481.
361. CROSBY EC, HUMPHREY T. Studies of the vertebrate telencephalon: II. The nuclear pattern of the anterior olfactory nucleus tuberculum olfactorium and the amygdaloid complex in adult man. *J. Comp. Neurol.* 1.941; 74:309-352.
362. CROSBY EC, HUMPHREY T. Studies of the vertebrate telencephalon: III. The amygdaloid complex in the shrew (*Blarina brevicauda*). *J. Comp. Neurol.* 1.944; 81:285-305.
363. BRODAL A. The amygdaloid nucleus in the rat. *J. Comp. Neurol.* 1.947; 87:1-16.
364. FOX CA. Certain basal telencephalic centers in the cat. *J. Comp. Neurol.* 1.940; 72:1-62.

365. LAUER EW. The nuclear pattern and fiber connections of certain basal telencephalic centers in the macaque. *J. Comp. Neurol.* 1.945; 183:785-816.
366. GIRGIS M. Distribution of cholinesterase in the basal rhinebcephalic structures of the Grivet monkey (*Cercopithecus aethiops*). *Acta Anat.* 1.968; 70:568-576.
367. GIRGIS M. Distribution of cholinesterase in the basal rhinebcephalic structures of the Senegal bush baby (*Galago senegalensis senegalensis*). *Acta Anat.* 1.969; 72:94-100.
368. HALL E, GENESER-JENSEN FA. Distribution of acetylcholinesterase and monoamine oxidase in the amygdala of the guinea pig. *Z. Zellforsch. Mikrosk. Anat.* 1.971; 120:204-221.
369. GIRGIS M. Acetylcholinesterase enzyme localization in the amygdala: a comparative histochemical and ultrastructural study. *Acta. Anat.* 1.980; 106:192-202.
370. TURNER BH, ZIMMER J. The architecture and some of the interconnections of the rat's amygdala and lateral periallocortex. *J. Comp. Neurol.* 1.984; 227:540-557.
371. HALL E. Some aspects of the structural organization of the amygdala. En Eleftheriou BE (Ed.). *The Neurobiology of the Amygdala*, 1.972; pags. 95-122. Plenum Press. New York.
372. SCALIA F, WINANS SS. The differential projections of the olfactory bulb and accessory olfactory bulb in mammals. *J. Comp. Neurol.* 1.975; 161:31-55.
373. PRICE JL, RUSSCHEN FT, AMARAL DG. The limbic region. II: The amygdaloid complex. En Björklund A, Hökfelt T, Swanson LW (Eds.). *Handbook of Chemical Neuroanatomy. Vol. 5: Integrated Systems of the CNS, Part I*. 1.987; pags. 279-388. Elsevier Science.

374. RUSSCHEN FT. Amygdalopetal projections in the cat: II. Subcortical afferent connections. A study with retrograde and anterograde tracing techniques. *J. Comp. Neurol.* 1.982; 207:157-176.
375. OTTERSEN OP. Connections of the amygdala of the rat: IV. Corticoamygdaloid and intraamygdaloid connections as studied with axonal transport of horseradish peroxidase. *J. Comp. Neurol.* 1.982; 205:30-48.
376. WAKEFIELD C. The intrinsic connections of the basolateral amygdaloid nuclei as visualized with HRP method. *Neurosci. Lett.* 1.979; 12:17-21.
377. NITECKA L, AMERSKI L NARKIEWICZ O. The organization of intraamygdaloid connections: an HRP study. *J. Hirnforsch.* 1.981; 22:3-7.
378. RUSSCHEN FT. Cortical and subcortical afferents of the amygdaloid complex. En *Advances in Experimental Medicine and Biology.* 1.985. Vol 203; pag. 35-52.
379. WHITLOCK DG, NAUTA WJH. Subcortical projections from the temporal neocortex in Macaca mulatta. *J. Comp. Neurol.* 1.965; 106:183.
380. AGGLETON JP, BURTON MJ, PASSINGHAM RE. Cortical and subcortical afferents to the amygdala of the rhesus monkey (Macaca mulatta). *Brain Res.* 1.980; 190:347.
381. TURNER B, ZIMMER J. Connections between the cerebral cortex and amygdala in the rat. *Soc. Neurosci. Abstr.* 1.980; 6:113.
382. MUFSON EJ, MESULAM MM, PANDYA DN. Insular interconnections with the amygdala in the rhesus monkey. *Neuroscience* 1.981; 6:1231.

383. RUSSCHEN FT. Amygdalopetal projections in the cat. I. Cortical afferent connections. A study with retrograde and anterograde tracing techniques. *J. Comp. Neurol* 1.982; 206:159.
384. BURTON H, KOPF EM. Ipsilateral cortical connections from the second and fourth somatic sensory areas in the cat. *J. Comp. Neurol* 1.984; 225:527.
385. LESCAULT H. Some neocortico-amygdaloid connections in the cat. *Doctoral thesis. University of Ottawa*, 1.971.
386. Van HOESEN GW. The differential distribution, diversity and sprouting of cortical projections to the amygdala in the rhesus monkey. En BEN ARI Y (ed.). *The Amygdaloid Complex. Elsevier/North-Holland* 1.981; pag. 77.
387. TURNER BH, CUPTA KC, MISHKIN M. The locus and cytoarchitecture of the projection areas of the olfactory bulb in *Macaca mulatta*. *J. Comp. Neurol* 1.978; 177:381.
388. BECKSTEAD RM. An autoradiographic examination of corticocortical and subcortical projections of the mediodorsal projection (prefrontal) cortex in the rat. *J. Comp. Neurol* 1.979; 184:43.
389. FALLON JH. Histochemical characterization of dopaminergic, noradrenergic and serotonergic projections to the amygdala. En BEN ARI Y (ed.). *The Amygdaloid Complex. Elsevier/North-Holland* 1.981; pag. 175.
390. MESULAM MM, MUFSON EJ, LEVEY AI, WAINER BH. Cholinergic innervation of cortex by the basal forebrain: cytochemistry and cortical connections of the septal area, diagonal band nuclei, nucleus basalis (substantia innominata), and hypothalamus in the rhesus monkey. *J. Comp. Neurol* 1.983; 214:170.

391. NAGAI T, KIMURA H, MAEDA T McGEER PL, PENG F, McGEER EG. Cholinergic projections from the basal forebrain of rat to the amygdala. *J. Neurosci.* 1.982; 2:513.
392. AMARAL DG. Amygdalohippocampal and amygdalocortical projections in the primate brain. En *Advances in Experimental Medicine and Biology*. 1.985. Vol 203; pp. 3-17.
393. JACOBSON S, TROJANOWSKI JQ. Amygdaloid projections to prefrontal granular cortex in rhesus monkey demonstrated with horeseradish peroxidase. *Brain Res.* 1.975; 100:132.
394. POTTER H, NAUTA WJH. A note on the problem of olfactory associations of the orbitofrontal cortex in the monkey. *Neuroscience* 1.979; 4:361.
395. PORRINO LJ, CRANE AM, GOLDMAN-RAKIC PS. Direct and indirect pathway a from the amygdala to the frontal lobe in the rhesus monkey. *J. Comp. Neurol* 1.981; 198:121.
396. AVENDANO C, PRICE JL, AMARAL DG. Evidence for a amygdaloid projection to premotor cortex but not to motor cortex in the monkey. *Brain Res.* 1.983; 264:111.
397. NAUTA WJH. Fiber degeneration following lesions of the amygdaloid complex in the monkey. *J. Anat.* 1.961; 95:515.
398. COWAN WM, RAISMAN G, POWELL TPS. The connections of the amygdala. *J. Neurol. Neurosurg. Psych.* 1.965; 28:137.
399. HEIMER L, NAUTA WJH. The hypothalamic distribution of the stria terminalis in the rat. *Brain Res.* 1.969; 182:19.
400. De OLMOS JS. The amygdaloid projection field in the rat as studied with the cupric-silver method. En ELEFThERIOU BE (ed.). *The Neurobiology of the Amigdala*. Plenum Press, pag. 295.

-
401. KRETTEK JE, PRICE JL. Amygdaloid projections to subcortical structures within the basal forebrain and brainstem in the rat and cat. *J. Comp. Neurol.* 1.978; 178:225.
402. KELLY AE, DOMESICK VB, NAUTA WJH. The amygdalostriatal projection in the rat. An anatomical study by anterograde and retrograde tracing methods. *Neuroscience* 1.982; 7:615.
403. RUSSCHEN FT, BAKST I, AMARAL DG, PRICE JL. The amygdalostriatal projections in the monkey. An anterograde tracing study. *Brain Res.* 1.985; 329:241.
404. RUSSCHEN FT, AMARAL DG, PRICE JL. The afferent connections of the substantia innominata in the monkey, *Macaca fascicularis*. *J. Comp. Neurol.* 1.985; 242:1.
405. RUSSCHEN FT, PRICE JL. Amygdalostriatal projections in the rat. Topographical organization and fiber morphology shown using the lectin PHA-L as an anterograde tracer. *Neurosci. Letter* 1.984; 47:15.
406. AMARAL DG, PRICE JL. Amygdalo-cortical projections in the monkey (*Macaca fascicularis*). *J. Comp. Neurol.* 1.985; 230:465.
407. HILTON SM, ZBROZYNA AW. Amygdaloid region for defence reactions and its efferent pathway to the brainstem. *J. Physiol. (London)* 1.963; 165:160-173.
408. KAADA B. Stimulation and regional ablation of the amygdaloid complex with reference to functional representation. En ELEFThERIOU BE (ed.). *The Neurobiology of the Amygdala*, pag. 145-204. Plenum Press, New York.

409. GRUJALVA CV, TACHE Y, GUNION MW, WALSH JH, GIESELMAN P. Amygdaloid lesions attenuate neurogenic gastric mucosal erosions but do not alter gastric secretory changes induced by intracisternal bombensin. *Brain Res. Bull.* 1.986; 5:55-61.
410. LEHMAN MN, WINANS SS, POWERS JB. Medial nucleus of the amygdala mediates chemosensory control of male hamster sexual behavior. *Science* 1.980; 210:557-560.
411. LEHMAN MN, WINANS SS. Vomeronasal and olfactory pathways to the amygdala controlling male hamster sexual behavior: autoradiographic and behavioral analysis. *Brain Res.* 1.982; 240:27-41.
412. LEONARD CM. The connections of the dorsomedial nuclei. *Brain Behav. Evol.* 1.972; 6:524-541.
413. MARQUES DM. Roles of the main olfactory and vomeronasal systems in the response of the female hamster to young. *Behav. Neurol. Biol.* 1.979; 26:311-329.
414. FLEMING AS, MICELI M, MORETTO D. Lesions of the medial preoptic area prevent the facilitation of maternal behavior produced by amygdala lesions. *Physiol. Behav.* 1.980; 31:503-510.
415. ARONSON LR, COOPER ML. Amygdaloid hypersexuality in male cats re-examined. *Physiol. Behav.* 1.979; 22:257-265.
416. KLING A. Effects of amygdectomy and testosterone on sexual behavior of male juvenile macaques. *J. Comp. Physiol. Psychol.* 1.968; 65:466-471.
417. MASCO DH, CARRER HF. Sexual receptivity in female rats after lesion or stimulation in different amygdaloid nuclei. *Physiol. Behav.* 1.980; 24:1073-1080.

418. FONBERG E. Effects of small dorsomedial amygdaloid lesions on food intake and acquisition of instrumental alimentary reactions in dogs. *Physiol. Behav.* 1969; 4:739-743.
419. FONBERG E. Hyperphagia produced by lateral amygdalar lesions. *Acta Neurol. Exp.* 1971; 31:19-32.
420. ROLLS BJ, ROLLS ET. Effects of lesions of the basolateral amygdala on fluid intake in the rat. *J. Comp. Physiol. Psychol.* 1973; 83:240-247.
421. ROLLS ET, ROLLS BJ. Altered food preference after lesions in the basolateral region of the amygdala in the rat. *J. Comp. Physiol. Psychol.* 1973; 83:248-259.
422. NACHMAN M, ASHE JH. Effects of basolateral amygdala lesions on neophobia, learned taste aversions and sodium appetite in rats. *J. Comp. Physiol. Psychol.* 1974; 87:622-643.
423. BOX BM, MOGENSEN GJ. Alterations in ingestive behaviors after bilateral lesions of the amygdala in the rat. *Physiol. Behav.* 1975; 15:679-688.
424. KIEFER ED, GRYALVA CV. Taste reactivity in rats following lesions in the zona incerta or amygdala. *Physiol. Behav.* 1980; 25:549-554.
425. AGGLETON JP, PASSINGHAM RE. Syndrome produced by lesions of the amygdala monkeys (*Macaca mulatta*). *J. Comp. Physiol. Psychol.* 1981; 95:961-977.
426. FITZGERALD RE, BURTON MJ. Effects of small basolateral amygdala lesions on injection in the rat. *Physiol. Behav.* 1981; 27:431-437.
427. LENARD L, HAHN Z. Amygdalar noradrenergic and dopaminergic mechanism in the regulation of the hunger and thirst motivated behavior. *Brain Res.* 1982; 233:115-132.

428. LENARD L, HAHN Z, KARADI K. Body weight changes after neurochemical manipulations of lateral amygdala:noradrenergic and dopaminergic mechanisms. *Brain Res.* 1.982; 249:95-101.
429. BECKER HC, JARVIS MF, WAGNER GC, FLAHERTY CF. Medial and lateral amygdectomy differentially influences consummatory negative contrast. *Physiol. Behav.* 1.984; 33:707-712.
430. SAUNDERS RC, MURRAY EA, MISHKIN M. Further evidence that amygdala and hippocampus contribute equally to recognition memory. *Neuropsychologia* 1.984; 22:785-796.
431. RAMON Y CAJAL SANTIAGO. Histologie du système nerveux de l'homme et des vertébrés. 1911. Maloine, Paris (Reprinted 1955: Consejo superior de investigaciones científicas, Madrid).
432. LORENTE DE NO R. Studies on the structure of the cerebral cortex. *J. Psychol. Neurol.* 1.933; 45:381-438.
433. KRIEG WJS. Connections of the cerebral cortex. I. The albino rat. A. Topography of the cortical areas. *J. Comp. Neurol.* 1.946; 84:221-275.
434. KRIEG WJS. Connections of the cerebral cortex. I. The albino rat.B. Structure of the cortical areas. *J. Comp. Neurol.* 1.946; 84:277-323.
435. ROSE M. Der allocortex bei tier und mensch. *J. Psychol. Neurol.* 1.926; 34:1-99.
436. ROSE M. Die sog. Riechrinde beim menschen und beim affem. II. Teil des "allocortex bei tier und mensch". *J.Psychol. Neurol.* 1.926; 34:261-401.

437. BRAAK H. Zur pigmentarchitektur der grosshirnrinde des menschen. I. Regio entorhinalis. *Z. Zellforsch.* 1.972; 127:407-438.
438. Van HOESEN GW, PANDYA DN. Some connections of the entorhinal (Area28) and perirhinal (Area35) cortices of the rhesus monkey. I. Temporal lobe afferents. *Brain Res.* 1.975; 95:1-24.
439. Van HOESEN GW, PANDYA DN, BUTTERS N. Some connections of the entorhinal (Area 28) and perirhinal (Area 35) cortices of the rhesus monkey. II. Frontal lobe afferents. *Brain Res.* 1.975; 95:25-38.
440. AMARAL DG, INSAUSTI R, COWAN WM. The entorhinal cortex of the monkey: I. Cytoarchitectonic organization. *J. Comp. Neurol.* 1.987; 264:326-355.
441. Van HOESEN GW, PANDYA DN. Cortical afferents to the entorhinal cortex of the rhesus monkey. *Science* 1.972; 175:1471-1473.
442. KRETTEK JE, PRICE JL. Projections from the amygdala to the perirhinal and entorhinal cortices and subiculum. *Brain Res.* 1.974; 71:150-154.
443. KRETTEK JE, PRICE JL. Projections from the amygdaloid complex and adjacent olfactory structures to the entorhinal cortex and subiculum in the rat and cat. *J. Comp. Neurol.* 1.977; 172:723-752.
444. INSAUSTI R, AMARAL DG, COWAN WM. The entorhinal cortex of the monkey: III. Subcortical afferents. *J. Comp. Neurol.* 1.987; 264:396-408.
445. SREBO B, HARKMARK W, KÖHLER CH. Afferent and efferent projections of the entorhinal cortex in the rat. *Neurosc. Lett. Suppl* 1.979; 3:143.

446. SORENSEN KE, SHIPLEY MT. Projections from the subiculum to the deep layers of the ipsilateral presubicular and entorhinal cortices in the guinea pig. *J. Comp. Neurol.* 1.979; 188:313-334.
447. TURNER BH, MISHKIN M, KNAPP M. Organization of the amygdalopetal projections from modality-specific cortical association areas in the monkey. *J. Comp. Neurol.* 1.980; 191:515-543.
448. AMARAL DG. Amygdalohippocampal and amygdalocortical projections in the primate brain. In The entorhinal cortex of the monkey: III. Subcortical afferents. *J. Comp. Neurol.* 1.987; 264:396-408.
449. CAJAL S RAMON Y. Studies on the cerebral cortex. *Yearbook, Chicago, III.* 1.955; 1-175.
450. HJORTH-SIMONSEN A. Projection of the lateral part of the entorhinal area to the hippocampus and fascia dentata. *J. Comp. Neurol.* 1.972; 146:219-232.
451. STEWARD O. Topographic organization of the projections from the entorhinal area to the hippocampal formation of the rat. *J. Comp. Neurol.* 1.976; 167:285-314.
452. WYSS JM. An autoradiographic study of the efferent connections of the entorhinal cortex in the rat. *J. Comp. Neurol.* 1.981; 199:495-512.
453. GERMROTH P, SCHWERTDFEGER WK, BUHL EH. Morphology of identified entorhinal neurons projecting to the hippocampus. A light microscopical study combining retrograde tracing and intracellular injection. *Neuroscience* 1.989; 30:683-691.
454. WITTER MP, Van HOESEN GW, AMARAL DG. Topographical organization of the entorhinal projection to the dentate gyrus of the monkey. *J. Neurosc.* 1.989; 9:216-228.

455. KOSEL KC, Van HOESEN GW, ROSENE DL. Non-hippocampal cortical projections from the entorhinal cortex in the rat and rhesus monkey. *Brain Res.* 1.982; 244:201-213.

456. SORENSEN KE, WITTER MP. Entorhinal efferents reach the caudato-putamen. *Neurosci. Lett.* 1.983; 35:259-264.

457. HABERLY LB, PRICE JL. Association and commissural fiber systems of the olfactory cortex in the rat. I. Systems originating in the piriform cortex and adjacent areas. *J. Comp. Neurol.* 1.978; 178:711-740.

458. BLACKSTAD TW,. Commissural connections of the hippocampal region in the rat, with special reference to their mode of termination. *J. Comp. Neurol.* 1.956; 105:417-537.

459. HJORTH-SIMONSEN A, JEUNE B. Origin and termination of the hippocampal perforant path in the rat studied by silver impregnation. *J. Comp. Neurol.* 1.972; 144:215-232.

460. BRAAK H. Architectonics of the human telencephalic cortex. En Braitenberg V, Barlow H.B., Bizzi E., Florey E., Grüsser O.J., Van der Loos H (eds.). *Studies of Brain Function, Vol. 4. Springer, Berlin Heidelberg New York, 1.980; pag. 3-48.*

461. BRAAK H, BRAAK E. On areas of transition between entorhinal allocortex and temporal isocortex in the human brain. Normal morphology and lamina-specific pathology in Alzheimer's Disease. *Acta Neuropath. (Berl)* 1.985; 68:325-332.

462. MORRISON JH, ROGERS J, SCHERR S, BENOIT R, BLOOM FE. Somatostatin immunoreactivity in neuritic plaques of Alzheimer's patients. *Nature* 1.985; 314:90-92.

463. SLOVITER RS. Calcium-binding protein (Calbindin-D28k) and parvalbumin immunocytochemistry: Localization in the rat hippocampus with specific reference to the selective vulnerability of hippocampal neurons to seizure activity. *J. Comp. Neurol.* 1.989; 280:183-196.
464. SOMOGYI P, TAKAGI H. A note on the use of picric acid-paraformaldehyde-glutaraldehyde fixative for correlated light and electron microscopic immunocytochemistry. *Neuroscience* 1.982; 7:1779-1873.
465. CAMPBELL SK, SWITZER RC, MARTIN TL. Alzheimer's plaques and tangles: a controlled and enhanced method. *Abs. Soc. Neurosci.* 1.987.
466. BRAAK H. Architectonics of the human telencephalic cortex. Notes on techniques. *En Braitenberg V, Barlow H.B., Bizzi E., Florey E., Grüsser O.J., Van der Loos H (eds.). Studies of Brain Function, Vol. 4. Springer, Berlin Heidelberg New York, 1.980; pag. 121-123.*
467. BRAAK H, BRAAK E. Neuronal types in the basolateral amygdaloid nuclei of man. *Brain Res. Bull.* 1.983; 11:349-365.
468. EPELBAUM J, ARANCIBIA LT, KORDON C, OTTERSEN OP, BEN-ARI Y. Regional distribution of somatostatin within the amugdaloid complex of the rat brain. *Brain Res.* 1.979; 174:172-174.
469. FINLEY JCW, MADERDRUT JL, ROGER LJ, PETRUSZ P. The immunocytochemical localitation of somatostatin-containing neurons in the rat central nervous system. *Neuroscience* 1.981; 6:2173-2192.

470. BEAL MF, MAZUREK MF, SVENDSEN CN, BIRD ED, MARTIN JB. Widespread reduction of somatostatin-like immunoreactivity in the cerebral cortex in Alzheimer's disease. *Ann. Neurol.* 1986; 20:489-495.
471. UNGER JW, McNEILL TH, LAPHAM LL, HAMIL RW. Neuropeptides and neuropathology in the amygdala in Alzheimer's disease: relationship between somatostatin, neuropeptide Y and subregional distribution of neuritic plaques. *Brain Res.* 1988; 452:293-302.
472. MCDONALD AJ. Morphology of peptide-containing neurons in the rat basolateral amygdaloid nucleus. *Brain Res.* 1985; 338:186-191.
473. JOYNT RJ, McNEILL TH. Neuropeptides in aging and dementia. *Peptides* 1984; 5(suppl.1):269-274.
474. MUFSON EJ, BENOIT R, MESULAM MM. Immunohistochemical evidence for a possible somatostatin-containing amygdalostriatal pathway in normal and Alzheimer's disease brain. *Brain Res.* 1988; 453:117-128.
475. FRIEDERICH-ECSY B, BRAAK E, BRAAK H, PROBST A. Somatostatin-like immunoreactivity in non-pyramidal neurons of the human entorhinal region. *Cell Tissue Res.* 1988; 254:361-367.
476. BAKST I, MORRISON JH, AMARAL DG. The distribution of somatostatin-like immunoreactivity in the monkey hippocampal formation. *J. Comp. Neurol.* 1985; 236:423-442.
477. CHAN-PALAY V. Somatostatin immunoreactive neurons in the human hippocampus and cortex shown by immunogold/silver intensification on vibratome sections: coexistence with neuropeptide Y neurons, and effects in Alzheimer-type dementia. *J. Comp. Neurol.* 1987; 260:201-223.

478. EMSON PC, JESSELL T, PAXINOS G, CUELLO AC. Substance P in the amygdaloid complex, bed nucleus and stria terminalis of the rat brain. *Brain Res.* 1978; 149:97-105.
479. SHIOSAKA S, SAKANAKA M, INAGAKI S, SENBA E, HARA Y, TAKATSUKI K, TAGAKI H, KAWAI Y, TOHYAMA M. Putative neurotransmitters in the amygdaloid complex with special reference to peptidergic pathways. En: *Chemical Neuroanatomy. EMSON PC (Eds.). Raven Press. New York 1.983; pag. 359-389.*
480. LJUNGDAHL A, HOKFELT T, NILSSON G. Distribution of substance P-like immunoreactivity in the central nervous system of the rat-I. Cell bodies and nerve terminals. *Neuroscience* 1.978; 3:861-943.
481. CUELLO AC, KANAZAWA I. The distribution of substance P immunoreactive fibers in the rat central nervous system. *J. Comp. Neurol.* 1.978; 178:129-156.
482. INO T, ITOH K, SUGIMOTO T, KANEKO T, KAMIYA H, MIZUNO N. The supramammillary region of the cat sends substance P-like immunoreactive axons to the hippocampal formation and the entorhinal cortex. *Neurosci. Lett.* 1.988; 90:259-264.
483. MICEVYCH P, AKESSON T, ELDE R. Distribution of cholecystokinin-immunoreactive cell bodies in the male and female rat:II. Bed nucleus of the stria terminalis and amygdala. *J. Comp. Neurol.* 1.988; 269:381-391.
484. BRASHEAR HR, GODEC MS, CARLSEN J. The distribution of neuritic plaques and acetylcholinesterase staining in the amygdala in Alzheimer's disease. *Neurology* 1.988; 38:1694-1699.
485. TSUCHIYA K, KOSAKA K. Neuropathological study of the amygdala in presenile Alzheimer's disease. *J. Neurol. Sci.* 1.990; 100:165-173.

486. ARMSTRONG DM, LeROY S, SHIELDS D, TERRY RD. Somatostatin-like immunoreactivity within neuritic plaques. *Brain Res.* 1.985; 338:71-79.
487. KOWALL NW, BEAL F. Cortical Somatostatin, Neuropeptide Y, and NADPH diaphorase neurons: Normal anatomy and alterations in Alzheimer's disease. *Ann. Neurol.* 1.988; 23:105-114.
488. BEAL MF, MAZUREK MF, TRAN VT, CHATTHA G, BIRD ED, MARTIN JB. Reduced numbers of Somatostatin receptors in the cerebral cortex in Alzheimer's disease. *Science* 1.985; 229:289-291.
489. VERGA L, FRANGIONE B, TAGLIAVINI F, GIACCONE G, MIGHELI A, BUGIANI O. Alzheimer patients and Down patients: cerebral preamyloid deposits differ ultrastructurally and histochemically from the amyloid of senile plaques. *Neurosci. Lett.* 1.989; 105:294.
490. HERZOG AG, KEMPER TL. Amygdaloid changes in aging and dementia. *Arch. Neurol.* 1.980; 37:625-629.
491. SCOTT SA, DeKOSKY ST, SCHEFF SW. Volumetric atrophy of the amygdala in Alzheimer's disease. *Neurol.* 1.991; 41:351-356.
492. REUBI JC, PALACIOS J. Somatostatin and Alzheimer's disease: a hypothesis. *J. Neurol.* 1.986; 233:370-372.
493. BEAL MF, KOWALL NW, MAZUREK MF. Neuropeptides in Alzheimer's disease. *J. Neural. Transm. Suppl.* 1.987; 24:163-174.

494. ARAI H, MOROJI T, KOSAKA K. Somatostatin and vasoactive intestinal polypeptide in postmortem brains from patients with Alzheimer-type dementia. *Neurosci. Lett.* 1984; 52:73-78.
495. MELDRUM BS. Metabolic effects of prolonged epileptic seizures and the causation of epileptic brain damage. En: F.C. Rose (ed): *Metabolic disorders of the nervous system.* London: Pitman, 1981; pp.175-187.
496. SLOVITER RS, SOLLAS AL, BARBARO NM, LAXER KD. Calcium-binding protein (Calbindin-D28K) and parvalbumin immunocytochemistry in the normal and epileptic human hippocampus. *J. Comp. Neurol.* 1991; 308:381-396.
497. HYMAN BT, Van HOESEN GW, DAMASIO AR. Glutamate depletion of the perforant pathway terminal zone in Alzheimer's disease. *Soc. Neurosci. Abstr.* 1986; 12:994.
498. MATTSON MP. Neurotransmitters in the regulation of neuronal cytoarchitecture. *Brain Res. Reviews* 1988; 13:179-212.
499. ROTHMAN S. Synaptic release of excitatory amino acid neurotransmitter mediates anoxic neuronal death. *J. Neurosci.* 1984; 4:1884-1891.
500. KUDO Y, ITO K, MIYAKAWA H, IZUMI Y, OGURA A, KATO H. Cytoplasmic calcium elevation in hippocampal granule cell induced by perforant path stimulation and L-glutamate application. *Brain Res.* 1987; 407:168-172.
501. RETZ KC, COYLE J. The differential effects of excitatory amino acids on uptake of CaCl_2 by slices from mouse striatum. *Neuropharmacology* 1984; 23:89-94.

502. KUDO Y, OGURA A. Glutamate-induced increase in intracellular Ca^{2+} concentration in isolated hippocampal neurons. *Br. J. Pharmacol.* 1986; 89:191-198.
503. CHOI DW. Glutamate neurotoxicity and diseases of the nervous system. *Neuron* 1988; 1:623-634.