CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA DE LAS INTERNEURONAS DE LAS LÁMINAS SUPRAGRANULARES DE LA CORTEZA ANTERIOR DEL GIRO DEL CÍNGULO EN EL HUMANO

Katherin Flórez

CENTRO DE ESTUDIOS CEREBRALES
ESCUELA DE CIENCIAS BÁSICAS
FACULTAD DE SALUD
UNIVERSIDAD DEL VALLE
Cali-2021

CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA DE LAS INTERNEURONAS DE LAS LÁMINAS SUPRAGRANULARES DE LA CORTEZA ANTERIOR DEL GIRO DEL CÍNGULO EN EL HUMANO

Tesis de grado para optar por el título de:

MAGISTER EN CIENCIAS BIOMÉDICAS – ÉNFASIS NEUROCIENCIAS

Presentado por:
KATHERIN FLOREZ
Director:
PROF. CARLOS ARTURO GONZALEZ ACOSTA
Co-tutor:
PROF. EFRAIN BURITICA
Asesor:
PROF. MAURICIO PALACIOS

CENTRO DE ESTUDIOS CEREBRALES
ESCUELA DE CIENCIAS BÁSICAS
FACULTAD DE SALUD
UNIVERSIDAD DEL VALLE

Cali-2021

Por un mundo donde seamos

Socialmente iguales, humanamente diferentes y totalmente libres.

Quienes no se mueven no notan sus cadenas.

Rosa Luxemburgo

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad del Valle, que desde siempre ha sido mi hogar en términos académicos, facilitando los caminos hacia el conocimiento y abriendo posibilidades de crecimiento profesional para mi vida

Al Centro de Estudios Cerebrales y sus fundadores Hernán Pimienta y Martha Escobar, principalmente a ella, quien me recibió y acogió con confianza dejándome en las mejores manos

Al profesor Efraín Buriticá quien ha acompañado mi proceso con paciencia, dedicación y sobretodo conocimientos; siempre dispuesto a orientarme en el momento apropiado, motivándome a continuar en este camino profesional.

A Carlos Arturo González, a quien quiero sinceramente y que sin darse cuenta motivó mis inicios en este proceso convirtiéndose en un modelo a seguir. Ha acompañado mi proceso como tutor asumiendo este camino con responsabilidad y sobretodo con la confianza suficiente para sacarlo adelante.

Al profesor Mauricio Palacios que, en su calidad de Director del Grupo, transmite confianza y apoyo sincero para cada paso que he iniciado y me motivó de forma constante a terminar con el trabajo iniciado.

A la profesora Lina Becerra y demás integrantes del centro de Estudios Cerebrales quienes constituyen un gran referente de conocimientos y sobretodo de trabajo conjunto, facilitando los procesos y conformando una gran familia.

A mi familia: mi madre, esposo y mis hijos que son mi gran motivación, me generan el soporte necesario para emprender y sacar adelante cualquier propósito.

A mi prima Ivonne, todas mis amigas y amigos que han creído en este proceso, me animaron constantemente a sacarlo adelante, y me sostuvieron cada vez que las cargas se hicieron difíciles.

RESUMEN

Los estudios de citomorfometría resultan importantes para la comprensión de la organización y la función de las neuronas a nivel cortical, y pueden ampliar el conocimiento adquirido acerca de la emergencia de procesos característicos del humano que se han relacionado con estructuras prefrontales. Más aún, cuando las tecnologías disponibles a la fecha no permiten acceder a la arquitectura celular, y menos a las conexiones entre neuronas o a la función de estas derivadas de su interacción. De este tipo, se han hecho estudios en algunas áreas prefrontales humanas como BA9, BA10, BA11 y en las capas infragranulares de BA24, pero no en las supragranulares. Todos estos estudios han sido adelantados por nuestro grupo de investigación. Otras aproximaciones de forma aislada, han abordado la descripción morfológica y funcional detallada de las interneuronas GABAérgicas corticales en roedores o en primates no-humanos; o en humanos se ha abordado la distribución citoarquitectónica de subpoblaciones de interneuronas en áreas corticales como las cortezas somatosensorial y visual primarias, o en algunas áreas prefrontales en condición patológica.

El presente estudio exploró variables citoarquitectónicas y citomorfológicas del soma de las interneuronas corticales en las láminas II y III de la porción supragenual de la corteza anterior del giro del cíngulo en ambos hemisferios, en tejido postmortem de sujetos humanos usando marcadores inmunohistoquímicos contra NeuN y las proteínas de unión al Calcio (CaBPs) Calbindina (CB), Calretinina (CR) y Parvalbúmina (PV). En total se realizaron 240 conteos celulares para establecer la densidad de las 3 subpoblaciones de interneuronas y se determinó el tamaño, forma y número de procesos de 576 neuronas en secciones de tejido de 8 sujetos humanos adultos sin patología neurológica ni psiquiátrica, cuyos datos citomorfológicos luego fueron sometidos a un análisis de conglomerados.

Las características citoarquitectónicas halladas en el presente estudio son similares a las reportadas previamente para el área 24.

Se encontró que, de las 3 subpoblaciones, la de mayor densidad son las neuronas CR+ en ambas láminas, seguidas de las CB+ y las PV+. Además, se encontró una distribución lámino-específica de los tipos morfológicos en cada subpoblación, donde las células CR+ presentan tamaños pequeños y formas poligonales con dos o tres procesos en las 2 láminas; mientras las CB+ aunque presentan la misma forma somática de las CR+, aumenta su tamaño en la lámina III. Las células PV+ conservan en ambas láminas, el mayor tamaño entre las interneuronas, siendo más abundantes en la lámina III que en la II, donde mantienen formas poligonales y tres procesos.

Las características estudiadas en relación con la densidad, el tamaño, la forma y el número de procesos de las interneuronas permiten plantear la existencia de un predominio de la función inhibitoria por la actividad de las neuronas CR+. Dicha actividad se caracteriza por un despliegue de procesos axonales predominantemente intracolumnar e intralaminar, derivados de somas pequeños y de las formas poligonales de estas neuronas, lo cual implicaría un predominio de la inhibición muy circunscrita a las dendritas de neuronas pertenecientes a una misma columna (y quizá minicolumna) y en muchas ocasiones sin abordar otras láminas más profundas, regulando la información que ingresa desde otras regiones corticales hacia las neuronas piramidales desde regiones corticales de mayor nivel de desarrollo filogenético.

Este estudio aporta a la comprensión de la citomorfología de las interneuronas en las láminas supragranulares de la corteza supragenual de la región anterior del giro del cíngulo en tejido neurotípico, base del conocimiento necesario para entender patologías como el trastorno afectivo bipolar y el autismo.

Palabras clave: Interneuronas gabaérgicas, Corteza Anterior del Giro del Cíngulo, área 24, láminas supragranulares, Proteínas atrapadoras de Ca, Calbindina, Calretinina, Parvalbumina.

Contenido

INTRODUCCIÓN 1

MARCO CONCEPTUAL 4

LOCALIZACIÓN ÁREA 24 4

CITOARQUITECTURA 6

CONECTIVIDAD Y FUNCION 9

NEUROQUÍMICA 13

INTERNEURONAS GABAÉRGICAS 15

Calretinina, Calbindina y Parvalbumina 17

Calretinina (CR) 17

Calbindina (CB) 18

Parvalbumina (PV) 18

Células en Cesta. 20

Células en Candelabro. 21

Células de Martinotti. 21

Células Double – Bouquet. 22

Células bipolares. 22

Células bipenachadas (“bitufted”) 22

Células neurogliaformes. 22

Células horizontales de Cajal. 23

INTERNEURONAS GABAÉRGICAS EN LA CORTEZA PREFRONTAL 23

JUSTIFICACIÓN Y PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA 29

OBJETIVOS 32

OBJETIVO GENERAL 32

OBJETIVOS ESPECÍFICOS 32

METODOLOGÍA 33

REGISTRO Y ANÁLISIS DE IMÁGENES 37

Registro Fotográfico 37

Observaciones, imágenes y mediciones en 10x: 37

Imágenes y mediciones en 40x: 39

ANÁLISIS ESTADÍSTICO 41

RESULTADOS 43

ORGANIZACIÓN LAMINAR DE LA PARTE ANTERIOR DEL GIRO DEL CÍNGULO (ÁREA 24, TRANSICIÓN ENTRE LA PORCIÓN PRE- SUPRA-GENUAL). 43

VARIABLES CITOMORFOLÓGICAS DE LAS NEURONAS QUE EXPRESAN CaBPs EN LAS CASPAS SUPRAGRANULARES DEL ÁREA 46

DENSIDAD DE SUBPOBLACIONES DE INTERNEURONAS 47

MORFOLOGÍA DEL SOMA DE LAS INTERNEURONAS 49

ANÁLISIS DE CONGLOMERADOS 51

Descripción de los clústers 54

DISCUSIÓN 60

Organización citoarquitectónica de la corteza anterior del giro del cíngulo en el humano (área 24 supragenual). 60

Interneuronas en áreas prefrontales 63

Patrones de organización de las interneuronas en láminas supragranulares de la región anterior del giro del cíngulo en el humano (área 24) a partir de criterios citomorfológicos 67

CONCLUSIONES 75

REFERENCIAS 77

INTRODUCCIÓN

El estudio del sistema nervioso ha sido motivo de interés desde la antigüedad, debido a su implicación con las actividades propias del ser humano como las respuestas a las demandas cognitivas, sociales y emocionales características de las interacciones personales. Desde el siglo XIX, este interés se ha dirigido especialmente al estudio del vínculo existente entre la estructura cerebral (a nivel del macro o micro sistema), centrando sus análisis en la comprensión del sustrato biológico de funciones como la locomoción o la actividad sensoriomotora, y también en funciones de alto orden como el lenguaje y el pensamiento entre otras que se consideran emergentes y propias de los animales más derivados. Estas investigaciones se han enfocado en el estudio de la unidad funcional del sistema nervioso; la neurona en su distribución y organización particular de acuerdo con las distintas estructuras cerebrales.

Dentro de estos estudios destacan las investigaciones dirigidas a identificar sectores específicos de distribuciones particulares de tamaños y formas de las neuronas, que finalmente han dado lugar a la creación de mapas citoarquitectónicos como los propuestos por Brodman, Vogt y Vogt y Walker (Walker AE, 1940). Estos mapas permitieron identificar distintos sectores de la corteza cerebral a partir de sus características histológicas destacando la importancia de la organización celular en la corteza cerebral. Identificar que existían variaciones en cuanto a densidad, tamaño y distribución de las neuronas de acuerdo con las distintas ubicaciones en los accidentes anatómicos, fortaleció el concepto de la existencia de una organización neuronal diferenciada y diversa en el sistema nervioso.

Los desarrollos en torno a la importancia de la organización neuronal tomaron fuerza con posteriores investigaciones adelantadas por neurólogos como Penfield, quien encontró que distintos sectores anatómicos de la corteza cerebral respondían a la estimulación con acciones motoras o respuestas sensoriales, y que estos sectores estimulados se correspondían con las divisiones definidas previamente por

Brodman a partir de sus análisis citomorfológicos con la tinción de Nissl (Brodmann, 1909). Estos hallazgos contribuyeron a reconocer la importancia de la estructura en la emergencia de gran variedad de funciones. En ese momento histórico, fue posible reconocer que los cambios en la densidad y el tamaño neuronal podrían estar en relación con una estructura específicamente organizada para facilitar la emergencia de distintas funciones, entre estas aquellas más complejas y distintivas del ser humano como el pensamiento, la toma de decisiones, la planificación entre otras.

Esta breve síntesis histórica es relevante en el contexto actual de las investigaciones en torno a la organización celular cortical. Los avances en la comprensión de esta organización neuronal se han realizado principalmente para el estudio de la célula principal o piramidal, identificando aspectos relacionados con la morfología, conectividad y características fisiológicas. Sin embargo, aunque se ha logrado cierta comprensión de las características de las interneuronas Gabaérgicas a partir de estudios en murinos y en primates no humanos, el estudio de las mismas en el humano aún presenta vacíos de conocimiento entre los que se encuentra la comprensión de la participación de las interneuronas en los circuitos inhibitorios de la organización cortical.

Este estudio aporta a la comprensión de la organización típica o normal de las interneuronas Gabaérgicas de la superficie supragenual del giro del cíngulo del humano a partir de la descripción morfológica de las CaBPs (Calcium Binding Proteins): CR (Calretinina), CB (Calbindina) y PV (Parvalbúmina). Al respecto, se pretende estudiar la forma, el tamaño y el número de procesos de estas células por medio de su tinción en láminas supragranulares de la superficie anterior (supragenual) del giro del cíngulo. El actual estudio aporta evidencia acerca de la organización de estas células planteando la existencia de características particulares de las mismas y la existencia de un patrón de inhibición en esta área mediado por las interneuronas Gabaérgicas. Estos resultados permiten también plantear la existencia de un patrón típico que aporte información sobre la patología y abre espacios para futuras investigaciones al respecto de este tema.

Los hallazgos recogidos en este estudio también aportan información valiosa para la comprensión de la superficie supragenual del giro del cíngulo, área que se ha vinculado estratégicamente con aspectos asociados a la confluencia de información cognitiva, límbica y visceral. Al respecto, los hallazgos se compararon con los resultados en otras láminas supragranulares de áreas corticales dorsomediales y de la superficie basal de los hemisferios identificando variaciones que aporten información sobre la funcionalidad diferenciada para cada una de ellas. Para esto, se utilizaron métodos estadísticos como el análisis de conglomerados que permitió generar agrupaciones celulares relevantes para la comprensión de los hallazgos aquí descritos.

Dentro de los resultados, esta investigación pretende aportar información para la apertura de espacios futuros en torno al progreso de las estrategias metodológicas y estadísticas, para la comprensión de la organización neuronal cortical humana.

MARCO CONCEPTUAL

LOCALIZACIÓN ÁREA 24

Con el fin de comprender la ubicación del área 24, se hará referencia inicialmente a la localización del giro del cíngulo. Este giro se aprecia en la cara medial de los hemisferios, bordeando toda la extensión del cuerpo calloso (rostro, rodilla, cuerpo y esplenio). Se divide en varios sectores: anterior (comprende una porción subgenual que se encuentra por debajo de la rodilla del cuerpo calloso, y pregenual que se ubica anterior a la rodilla del cuerpo calloso), medio, posterior y retroesplenial (Brent A. Vogt & Palomero-Gallagher, 2012). En la superficie subgenual el giro del cíngulo limita con la lámina terminal. Está delimitado por el surco del cíngulo hasta su porción media, donde dicho surco se extiende hasta la convexidad dorsomedial, constituyendo la rama marginal. En su porción más posterior (porción caudal o retroesplenial) se adelgaza significativamente constituyendo el istmo del cíngulo, continuándose anatómicamente con el giro parahipocampal. Existen variantes anatómicas de este giro en aproximadamente el 24% de los casos analizados por Ono y cols (Ono, Kubik, & Abernathey, 1990), en los cuales se observó un surco adicional, denominado surco paracingular, el cual lo divide en dos giros dispuestos de forma paralela.

Para el presente estudio es de interés la clasificación desarrollada por Vogt, acerca de la corteza anterior del giro cíngulo. Según sus informes, esta se extiende desde la porción subgenual hasta la transición entre la rodilla y el cuerpo del Cuerpo Calloso (Brent A Vogt & Laureys, 2005). Los autores han determinado un límite arbitrario, el cual se establece al trazar una línea imaginaria, perpendicular a la comisura blanca anterior. En esta región se han definido tres áreas principales: 25, 32 y 24, las cuales muestran patrones de conectividad diferente y composición citoarquitectónica particulares. Para efectos de la presente investigación solo se describirán para el área 24.

El área 24 en su totalidad se encuentra limitada inferiormente por el surco del cuerpo calloso y el área 33. En la superficie dorsal y anterior colinda con el surco del

cíngulo. En su porción subgenual, limita posteriormente con el área 25, circunscrita aproximadamente en el giro paraterminal. El área 32 bordea al área 24 en toda su extensión rostral y dorsal (Brent A. Vogt, Nimchinsky, Vogt, & Hof, 1995).

La localización del área 24 ha sido correlacionada con la organización citoarquitectónica, conexiones y características neuroquímicas. Se han realizado estudios comparativos entre humano y macaco evidenciando una disposición cortical altamente heterogénea (MacLean, 1993). Existen diferencias citoarquitectónicas en esta área que han permitido una división más específica de la misma, las cuales se han denominado: 24a, 24b y 24c. El área 24a ocupa toda la extensión de la superficie anterior del giro cíngulo, entre la vecindad del área 33, que se ubica en la profundidad parenquimatosa del surco del cuerpo calloso y el área 24b que lo bordea superficialmente. Subsecuentemente, el área 24b se localiza entre el área 24a y el área 24c en su porción pregenual; subgenualmente limita en la parte dorsal con el área 24a y ventralmente con el área 32. Es importante destacar que las regiones 24a y 24b ocupan una región subgenual y pregenual. El área 24c limita dorsalmente con el área 32 y solo se encuentra en la porción pregenual (Palomero-Gallagher, Mohlberg, Zilles, & Vogt, 2008). Dispuestas de forma similar, en sentido caudal (posterior) el área 24 se encuentra subdividida en subáreas, cuya notación es la siguiente: 24a', 24b', 24c', estas ocupan la porción media del giro cíngulo.

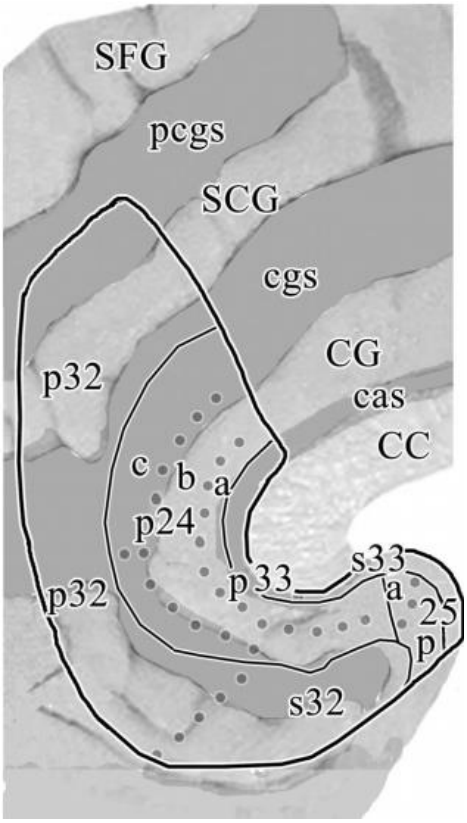


Figura 1: Superficie anterior de la cara medial en el hemisferio izquierdo. Se aprecia la parte anterior del giro del cíngulo, las áreas constitutivas y adyacentes a esta estructura. Fuente: Palomero-Gallagher y cols, 2008.

CITOARQUITECTURA

Distintas investigaciones en torno a las características citoarquitectónicas de la corteza cerebral han permitido determinar patrones de organización específica de las áreas inicialmente definidas por Brodman en 1909 (Brodmann, 1909). Estos estudios han permitido revisar las definiciones realizadas hasta ese momento, replanteando en algunos casos los limites citoarquitectónicos establecidos para algunas áreas, además de aportar información acerca de la conectividad y sugerir en algunos casos roles funcionales. La descripción citoarquitectónica más reciente del área 24 ha sido realizada por Vogt y cols (Palomero-Gallagher et al., 2008), por lo cual, dada la relevancia para el presente estudio, haremos referencia a la descripción propuesta por este grupo.

En estos estudios, y como se explicó previamente, la corteza de la región anterior del cíngulo se ha dividido en áreas subgenuales y pregenuales atendiendo a las

características de las láminas corticales. En general, las áreas subgenuales tienen una amplia lámina II y una lámina III más delgada, con una poca diferenciación de las láminas V y VI. La diferencia subgenual y pregenual se establece para las áreas 24a y 24b, mientras el área 24c solo presenta una porción pregenual.

La división del área 24a (A24a) en una porción subgenual y en otra pregenual, ha correspondido a diferencias en las láminas II, III y V, VI, las cuales se caracterizan de la siguiente manera:

- Lámina II: delgada y con mayor densidad neuronal y grupos de células en agregados, mientras que el A24a pregenual tiene neuronas más dispersas y no se encuentran agrupadas.
- Lámina III: la porción subgenual contiene células piramidales grandes en la parte superficial, mientras la porción pregenual tiene piramidales medianas que se distribuyen uniformemente por toda la capa, disminuyendo su tamaño a medida que se acercan a la lámina V. Esta lámina tiende a ser más ancha en la porción pregenual.
- Lámina V: delgada en la porción subgenual con piramidales pequeñas y densamente empaquetadas, teniendo dendritas que se ubican alrededor de estas neuronas. Las neuronas entonces, mantienen poca extensión de sus dendritas basales y apicales.
- Lámina VI: es la capa más delgada en ambas porciones, y la subgenual tiene más células dispersas.

En cuanto a las generalidades del área 24b, se encuentra una lámina II más densa, una lámina Va más amplia y con mayor densidad neuronal (especialmente en la región dorsal del giro del cíngulo), además de neuronas piramidales pequeñas y grandes. La lámina VI presenta mayor densidad neuronal que el área 24a. Se establecen algunas distinciones en las características propias de las porciones subgenual (s24b) y pregenual (p24b):

- Lámina II: es más delgada y más densa neuronalmente en s24b, mientras que en p24b las células tienden a fusionarse con las de la lámina III sin que exista mucha diferenciación entre ambas.
- Lámina III: en la parte superficial de s24b hay células piramidales grandes que en la parte profunda se hacen más pequeñas y bordean la lámina V. p24b tiene piramidales medianas que reducen su tamaño en la parte más profunda denominada IIIc.
- Lámina V: en s24b se presenta sublaminación. La Va se observa más amplia que Vb, mientras que ambas subláminas son de la misma amplitud en p24b. Va se observa más densa en s24b mientras que la Vb de p24b tiene más neuronas que la de s24b.
- Lámina VI: tiene más población celular en s24b que en p24b.

En resumen, se considera que la lámina II del área p24c es más amplia que en el área p24b. La lámina III tiene neuronas piramidales medianas que se empaquetan de forma menos densa en su parte profunda. La lámina Va contiene mayor cantidad de neuronas piramidales pequeñas que en p24c, aunque es más delgada que p24b. La lámina Vb del área 24c presenta alta densidad de neuronas en su mayoría piramidales y la lámina VI muchas piramidales medianas.

En p24c se reconoce una subdivisión dorsal (pd24c) y ventral (pv24c), cuyas características son:

- Lámina II: es más ancha y presenta células más dispersas en pd24c que en pv24c.
- Lámina III: pd24c tiene células piramidales más grandes en la parte superficial y neuronas más pequeñas en el borde con la lámina V que las observadas para la subdivisión pv24c.
- Lámina V: pd24c presenta características que permiten clasificarla como sublaminada. La Va es más prominente por la presencia de células piramidales, mientras que la lámina Vb de pd24c tiende a mantener células más empaquetadas que pv24c (en esta última las células tienden a formar pequeños agregados).

- Lámina VI: pd24c tiene una lámina VI con neuronas de mayor tamaño que las de pv24c.

También se distingue una división dorsal y ventral en pd24c, que se ubican en el banco dorsal (pd24cd) y en el banco ventral (pd24cv) del surco del cíngulo respectivamente. En términos generales, esta división se establece debido a las altas densidades de neuronas en las láminas V y VI y adicionalmente por la mayor expresión de proteínas de neurofilamento en somas y en plexos dendríticos en láminas II y III (Palomero-Gallagher et al., 2008).

CONECTIVIDAD Y FUNCION

La heterogeneidad citoarquitectónica y de características neuroquímicas del giro del cíngulo, le ha conferido también una participación en distintas funciones. Dentro de los autores que han estudiado las funciones de esta región, se destacan los estudios realizados por Vogt, destinados a proponer una división del giro del cíngulo en tres porciones: cíngulo anterior, cíngulo medio y la región posterior o retroesplenial (Brend A. Vogt & Gabriel, 1993; Brent A Vogt, 2005; Brent A Vogt & Laureys, 2005).

Cada porción participaría en funciones de distinto orden, de tal manera que la región posterior del giro del cíngulo estaría involucrada en tareas donde se requiere el uso de información directamente desde la memoria, por ejemplo en los pensamientos acerca del futuro (Schacter, Addis, & Buckner, 2007), en juicios sencillos sobre asociaciones semánticas (Jackson, Hoffman, Pobric, & Lambon Ralph, 2016), durante tareas independientes del estímulo natural (Grafton et al., 2007; Stawarczyk, Majerus, Maquet, & D'Argembeau, 2011), y en general muestra gran capacidad de ajuste con las regiones de control ejecutivo cuando es necesario recuperar información de la memoria para la consecución de objetivos de la tarea (Krieger-Redwood et al., 2016).

Por su parte, la región media del giro del cíngulo con su subdivisión anterior y posterior participa en funciones marcadamente distintas. La división anterior de la región media se ha vinculado con la capacidad de anticipación de recompensas

(Kirsch et al., 2003), el cambio de elección antes de realizar un movimiento (Periáñez et al., 2004), el inicio de la respuesta en el contexto de la libre elección a partir del procesamiento de errores (Fiehler, Ullsperger, & Von Cramon, 2004; Hoffstaedter, Grefkes, Zilles, & Eickhoff, 2013; Holroyd et al., 2004). En cuanto a la parte posterior se encuentra evidencia de participación en la orientación reflexiva del cuerpo en el espacio en función de los estímulos sensoriales (Brent A Vogt, 2016), activación durante la generación externa de estímulos nocivos (Helmchen, 2005) y también con la experimentación del dolor (Singer et al., 2004).

La región anterior del giro del cíngulo especialmente en su superficie dorsal se ha vinculado con una serie de tareas que vinculan procesos de integración cognitiva como el monitoreo de conflictos (Botvinick, 2007), detección de errores (Holroyd & Coles, 2014; Ito, Stuphorn, Brown, & Schall, 2003), y toma de decisiones basadas en recompensas (Behrens, Woolrich, Walton, & Rushworth, 2007; Kolling, Behrens, Wittmann, & Rushworth, 2016; Walton, Bannerman, Alterescu, & Rushworth, 2003). Las conexiones de esta región le confieren un papel predominante en la interfase entre el sistema motor y la cognición social, principalmente por su vínculo estructural con la totalidad del cíngulo. De esta forma, se encuentra que existen fibras anteriores que se proyectan para terminar en el lóbulo frontal (áreas 32 y 10 mediales, y área 25), fibras posteriores que se proyectan a cortezas parietales mediales y retroespleniales (Baker et al., 2018). También existen estudios en primates no humanos que muestran amplias conexiones con regiones dorsolaterales (áreas 46d, 8Ad y 6d), estructuras límbicas como el área 25, la amígdala y la corteza peririnal, aspectos que sustentan su participación en la selección de estímulos relevantes para el individuo y la atención selectiva (Schmahmann & Pandya, 2012).

Considerando la importancia para este estudio de la región supragenual del cíngulo se han encontrado investigaciones que, en relación con las teorías de la conectividad, vinculan a este sector con la Red de Saliencia proponiéndolo como un nodo de actividad fuertemente implicado en el procesamiento emocional requerido para la participación en una tarea y la ansiedad anticipatoria frente a la misma

(Seeley et al., 2007). De igual forma, aproximaciones más recientes, proponen la participación de la Corteza del Cíngulo Anterior dorsal (CCAd), en la toma de decisiones y específicamente en el Control del Valor Esperado en relación con el esfuerzo asignado a la solución de una tarea, la recompensa y el valor general de la tarea para su solución (Shenhav, Cohen, & Botvinick, 2016). También se ha asociado no solo al resultado esperado, sino con la toma de decisiones durante el proceso de resolución de la tarea participando en la generación de una retroalimentación para la elección correcta de las respuestas (Blanchard & Hayden, 2014).

Estas investigaciones realizadas desde finales de los años 90's encuentran un vínculo estructural para esta "Red de Saliencia", en la cual la corteza del cíngulo anterior trabaja de forma conjunta con la corteza insular anterior y ventral y mantiene patrones de conectividad con distintas estructuras como hipotálamo, amígdala, estriado ventral, y núcleos específicos del tallo cerebral. De esta forma, estaría participando en la activación destinada a mantener los elementos relevantes para una tarea, como apoyo importante a la función ejecutiva (Seeley, 2019). La saliencia en este sentido, está referida a aquello que resulta ser importante para el individuo por su carácter personal, cognitivo y vinculante con el "tono" emocional y motivacional que implica, además de los cambios que puede significar a nivel de la activación simpática básica (Seeley et al., 2007).

En el mismo sentido de los estudios en torno a la conectividad, se ha planteado que la región dorsal de la corteza anterior del giro del cíngulo, participaría también de la "Red fronto parietal", la cual integraría información proveniente de áreas prefrontales rostrolaterales, el giro frontal medio, el Precúneo, y las regiones anterior e inferior del lóbulo parietal para activarse durante la realización de tareas dirigidas al cumplimiento de objetivos externamente (Spreng, Stevens, Chamberlain, Gilmore, & Schacter, 2010). Lo anterior le confiere a esta región un papel altamente dinámico en el procesamiento de información cotidiana y requerida para la realización de tareas diversas que implican actividad cognitiva, vinculación

emocional, respuesta motora y activación autonómica durante la ejecución de las acciones.

A continuación, se plantea un esquema de conectividad general de la región anterior del giro del cíngulo sintetizando con sus principales conexiones y la magnitud o "fuerza" de dichas conexiones.

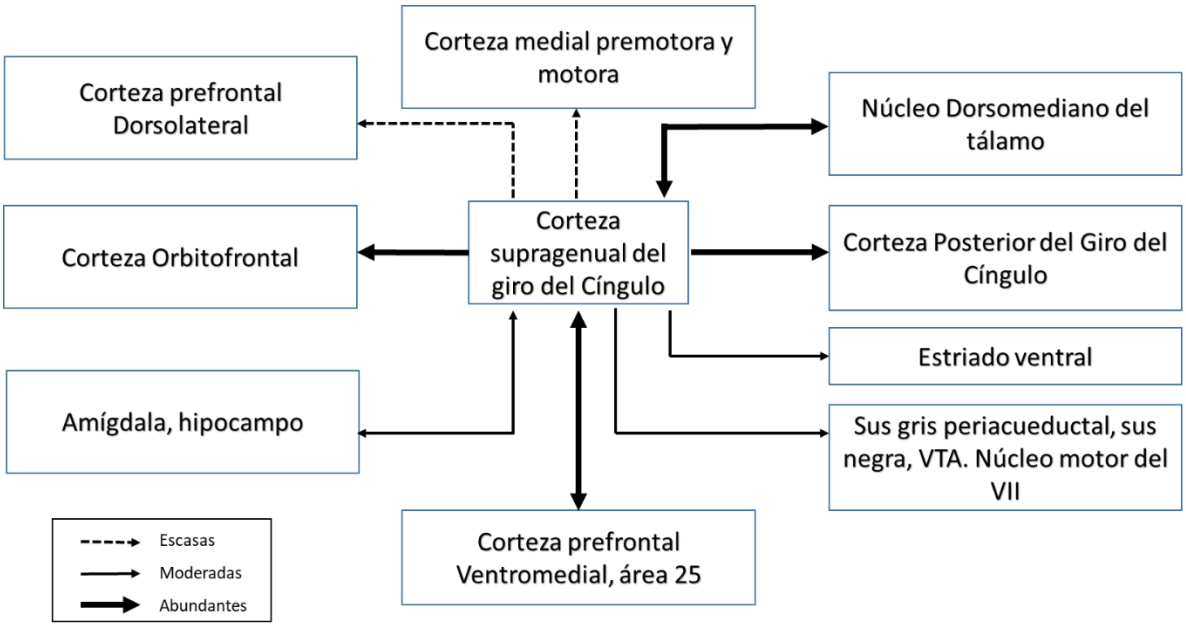


Figura 2: Relaciones de la corteza supragenual de la región anterior del giro del cíngulo en el humano con otras estructuras. En la figura se sintetiza la conectividad aferente y eferente de la corteza supragenual del giro del cíngulo. La información es tomada de estudios de tractografía e Imágenes de Resonancia Magnética Funcional (RMNf).

El esquema describe algunos de los hallazgos en relación con las relaciones de la Corteza Anterior del Giro del Cíngulo con otras estructuras especialmente en su superficie rostral o perigenual. Algunos estudios de neuroimagen midieron la intensidad de la conectividad de la corteza anterior del giro del cíngulo en estado de reposo, arrojando resultados de correlaciones positivas para aferencias provenientes de estructuras como la amígdala, el hipocampo y la corteza prefrontal ventromedial. En este estudio, también se encuentra una conectividad muy fuerte entre áreas que comunican sectores rostrales con cortezas caudales del giro del cíngulo, evidenciando una comunicación rostrocaudal importante en la generación de respuestas destinadas al cumplimiento de demandas propias a las tareas

(Margulies et al., 2007) (Margulies et al., 2007). En una investigación realizada posteriormente por Beckmann y cols. donde se analiza la conectividad probable a partir de análisis con vóxels se encuentra que, además de las conexiones ya descritas, hay conectividad con el estriado ventral (Beckmann, Johansen-Berg, & Rushworth, 2009).

Estudios previos ya habían demostrado la conectividad con áreas corticales ventrales como el área 25 y con la sustancia gris periacueductal que estarían generando procesos de interfase para la regulación emocional y la respuesta conductual (Vogt A, Finch M, & Olson R, 1992). Al respecto de la conectividad que caracteriza a esta región con estructuras del tallo cerebral, también se encuentra correlación positiva de activación con estructuras como la Sustancia Negra y la VTA (Área Tegmental Ventral), las cuales evidenciaron niveles de activación importante en la red de saliencia o prominencia y se vinculan con la retroalimentación interoceptiva y la activación simpática indirecta (Seeley et al., 2007).

NEUROQUÍMICA

La división pregenual – subgenual (dentro de la pregenual se considera la corteza supragenual) ha sido también estudiada en relación con la arquitectura de los receptores de neurotransmisores presentes en el área 24a, encontrando algunas diferencias y similitudes en la distribución de ambos sectores.

Los receptores de Kainato, NMDA (N-metil-D-aspartato), M2 (muscarínico 2), 5-HT1A (5-hidroxitriptamina) tienen un mismo patrón de distribución a lo largo de todas las láminas en los sectores pre y subgenuales del área 24. Por otro lado, los receptores de AMPA (ácido α-amino-3-hidroxi-5-metilo-4-isoxazolpropiónico), GABA-A (ácido gamma-aminobutírico), BZ (benzodiazepina) y M3 (receptor colinérgico muscarínico 3), presentan una distribución homogénea en todas las láminas de la corteza del cíngulo anterior, pero en los sectores pregenuales se caracterizaron por altas densidades en las capas superficiales en comparación con las láminas profundas (Palomero-Gallagher et al., 2008). En este estudio también

se encontraron significativamente mayores densidades de GABA-A, GABA-B, BZ, 1 y 5-HT1A en las cortezas subgenuales versus las pregenuales; y los receptores M3 y 5-HT2 se hallaron con mayor densidad en estas cortezas, sin que este incremento fuese significativo (Palomero-Gallagher et al., 2008). Los anteriores hallazgos muestran una participación importante del neurotransmisor GABA en los procesos de inhibición que caracterizan a estas áreas corticales.

Es importante aclarar que los anteriores hallazgos son generales para cortezas subgenuales que incluyen las áreas 24, 32 y 25 y, no se circunscriben específicamente a las regiones del área 24. Al respecto, la investigación encuentra que las características de los receptores definen con más claridad las subdivisiones propuestas para el área 24. Por ejemplo, las densidades de GABA-B, BZ y D1 fueron significativamente mayores en las láminas I-III del área pd24cv, mientras que las densidades del receptor α1 fueron mayores en todas las láminas de pd24cv (Palomero-Gallagher et al., 2008).

Otros estudios que han utilizado tinción para AChE han identificado diferencias en las subdivisiones para el área 24, encontrando una marcación muy densa en el área 24a, especialmente en láminas I y V adyacentes al cuerpo calloso. De otro lado, el área 24b tiene un patrón de marcación moderado en plexos en la lámina I y en las partes profundas de las láminas III y V (Öngür, Ferry, & Price, 2003).

En cuanto a estudios para identificación de neuronas piramidales, se ha encontrado que la lámina V del área 24b muestra expresión densa de células positivas para SMI-32, mientras el área 24a contiene pocas y dispersas (Öngür et al., 2003).

Finalmente, es importante mencionar los resultados obtenidos para la identificación de interneuronas por medio de la expresión de las proteínas de unión al calcio (CaBPs: Parvalbúmina, Calbindina y Calretinina) en esta región cortical. De estos, se destaca el de Ongur y Price (2003), donde se encontró una distribución moderada de las neuronas PV+ (Parvalbúmina positivas) en las áreas 24a y 24b, con tendencia a formar dos plexos de fibras en la profundidad de las láminas III y IV.

INTERNEURONAS GABAÉRGICAS

Dentro del conocimiento adquirido en torno a las características de las neuronas presentes en el cerebro humano, se reconoce el predominio de las células piramidales (60-80% de la población total), sobre el resto de los subtipos neuronales (interneuronas con un 20-40%). Este hecho es de gran importancia debido a que evidencia la tendencia del sistema a la excitación y la regulación necesaria de los procesos de inhibición ejercidos por las interneuronas para generar un balance necesario para la realización de acciones apropiadas a nivel conductual (Ferguson & Gao, 2018).

Las interneuronas entonces se conocen como las células no-piramidales, morfológicamente se distinguen por presentar predominantemente un tamaño de soma inferior al de las piramidales pero de formas múltiples, con procesos bipolares o multipolares, de escasa ramificación dendrítica, pocas espinas dendríticas (en muchas ocasiones ausentes) y un axón corto pero muy ramificado que tiene como objetivo la misma columna o la misma lámina, y a lo sumo las columnas o láminas inmediatamente adyacentes (DeFelipe, 2002).

En cuanto a su actividad, la principal función que se les ha atribuido es la participación en los procesos de inhibición de las células piramidales, especialmente por la capacidad para controlar la velocidad y el patrón de disparo de estas últimas a través de la retroalimentación negativa (Krishnamurthy, Silberberg, & Lansner, 2012).

De igual forma, las interneuronas han sido motivo de interés debido a la mayor diversidad de sus características morfológicas y electrofisiológicas, diferente a lo observado en las células piramidales. Al respecto, el grupo de Petilla ha sugerido una terminología y criterios de clasificación que resulta útil en este estudio para la comprensión de los subtipos de interneuronas (Ascoli GA et al., 2018) (ver figura 3).

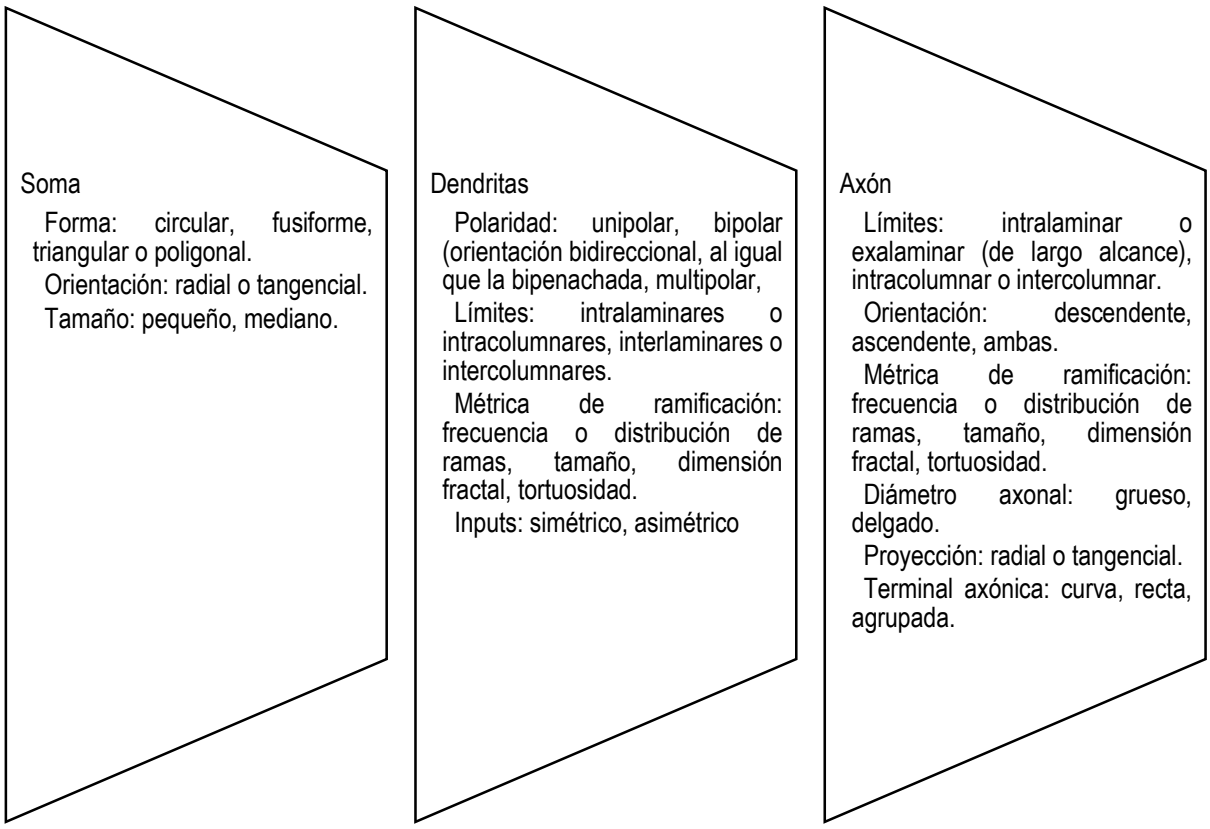


Figura 3: Características morfológicas de las interneuronas Gabaérgicas. La información del cuadro describe las características del soma, las dendritas y el axón de las interneuronas Gabaérgicas corticales. Adaptado de "Petilla terminology: nomenclature of features of GABAergic interneurons of the cerebral cortex, 2008".

La actividad de las células piramidales está mediada por el neurotransmisor Glutamato, mientras la actividad propia de la mayoría de las interneuronas se caracteriza por la liberación de GABA en las terminales sinápticas. Dicha liberación está administrada por mecanismos dependientes de Calcio (Ca), que se expresan en las interneuronas y permiten la realización de una clasificación de acuerdo con las proteínas que funcionan como tampones de Ca, entre las que se encuentran la Calbindina (CB), Calretinina (CR) y Parvalbúmina (PV). Estas tienen sitios de adhesión y actúan como un buffer molecular.

Calretinina, Calbindina y Parvalbumina

Las proteínas de unión al calcio Calretinina (CR), Calbindina (CB) y Parvalbumina (PV), pertenecen a la familia de las EF-hands, denominadas de esta manera debido a las características de su dominio estructural compuesto por hélice- bucle- hélice. Dichas proteínas se unen al calcio para controlar los niveles de este ion a nivel intracelular, ejerciendo un papel neuroprotector (Claus W. Heizmann, 2019). En procesos asociados a metodologías de investigación, estas proteínas se han convertido en un foco de interés debido a que existen altas concentraciones de ellas en las interneuronas inhibitorias corticales, facilitando la identificación de las mismas por medio de marcaciones histológicas que permiten estudiar su expresión.

A continuación se describen brevemente sus características.

Calretinina (CR)

La Calretinina comparte una secuencia idéntica con la Calbindina del 58%, pero tienen características de dominio bastante diferentes (Palczewska, 2003). La Calretinina es de 269 a 271 de residuos de largo según la especie y cinco de sus seis EF-hands se unen al calcio. Tiene 4 sitios de unión al calcio con alta afinidad con cooperación positiva y un sitio de baja afinidad con una constante de afinidad de 0,5 mM. La estructura secundaria de la proteína se modifica poco durante la unión al calcio, aunque el patrón de la tripsinolisis de la Calretinina depende en gran medida de la presencia o ausencia de calcio (Ishida & Vogel, 2013).

Esta es una de las proteínas más estudiadas en el sistema Nervioso central y se ha observado que actúa dependiente del calcio con componentes del citoesqueleto (Marilley & Schwaller, 2000). Se considera abundante en el bulbo olfatorio y sus conexiones, y en las células granulares del cerebelo (Bastianelli, 2003). En la corteza cerebral se considera que existen en distintas clases de interneuronas que se distribuyen en todas las láminas pero se expresan preferentemente en las láminas II y III conjuntamente con las células inmunoreactivas para Calbindina (Hof, P. R., Glezer, I. I., Condé, F., Flagg, R. A., Rubin, M. B., Nimchinsky, E. A., 1999).

Calbindina (CB)

Esta proteína puede funcionar de forma alternativa como un buffer y también como un sensor de Ca y participa en distintos procesos fisiológicos fundamentales ya que se expresa en cerebro y órganos cómo riñón, hueso, páncreas, entre otros (Berggård et al., 2002; Kojetin et al., 2006). En su estructura consta de 261 residuos y contiene 6 EF-hands empaquetadas en una estructura globular, pero solo une Ca a 4. El sitio de más alta afinidad corresponde a EF-hand 1, mientras que los dominios 3, 4 y 5 se unen con menos fuerza. Los dominios 2 y 6 no son esenciales para la unión del Ca a la proteína. Tras la activación del Ca en una célula, la Calbindina sufre cambios estructurales importantes (Ishida & Vogel, 2013).

Se han propuesto varias funciones para la Calbindina, entre las que se encuentran la reabsorción del calcio en el riñón, la modulación de la producción de insulina, la secreción en las células β pancreáticas y la neuroprotección contra la excitotoxicidad. Se ha demostrado también la función de la Calbindina D28k en la modulación de las señales de calcio en las espinas y dendritas de las células de Purkinje, y en la plasticidad a corto plazo evidente en las neuronas corticales multipolares o en las conexiones de las fibras musgosas con las piramidales en CA3 del hipocampo (Blatow, Caputi, Burnashev, Monyer, & Rozov, 2003).

Parvalbumina (PV)

La proteína Parvalbúmina fue la primera proteína EF-hand en tener su estructura cristalina y su secuencia de aminoácidos determinadas. Contiene seis hélices α de la A a la F, que constituyen 52 de sus 108 residuos. Las seis hélices están conectadas por bucles, de los cuales forman sitios de unión al calcio los que se encuentran entre las hélices C y D y entre E y F (Permyakov, Eugene A. Kretsinger, 2011).

Dentro de sus principales funciones se encuentra ejercer control y modular los parámetros espacio-temporales de las señales de calcio intracelular que son de corta duración especialmente en células como las neuronas. En las células

musculares se ha asociado a la regulación de la contracción ya que funciona como un tampón de calcio. En otras células se ha observado que actúa como una fuente de calcio importante que permite la liberación fuerte del neurotransmisor inhibitorio posterior a un disparo proveniente de una membrana presináptica. De esta forma, la PV tiene un rol importante en la regulación del efecto local ejercido por las interneuronas Gabaérgicas en la célula piramidal (Permyakov, Eugene A. Kretsinger, 2011).

La expresión de estas CaBPs se encuentra distribuida en distintas clases de interneuronas inhibitorias en la corteza cerebral del humano, las cuales como se explicó previamente exhiben características morfológicas diferentes indicando también patrones diferenciados de conectividad con la celula piramidal (ver figura 3) (Javier DeFelipe, 2002b). Al respecto, es importante considerar que las variantes morfológicas que se correlacionan con la expresión de las distintas CaBPs se encuentran en varias especies estudiadas (roedores y primates principalmente), con un nivel muy bajo de sobrelapamiento en inmunoreactividad. Dicho nivel de sobrelapamiento en el humano es aun mas bajo en humano, logrando una marcación casi excluyente para cada una de las CaBPs, en la que neuronas en cesta y en candelabro expresan PV; celulas que expresan CR son bipolares, doble bouquet, algunas Martinotti y Neurogliaformes, y las Horizontales de Cajal Retzius; y las neuronas que marcan CB son double bouquet, algunas Martinotti y neurogliaformes (Del Río & DeFelipe, 1996; Markram et al., 2004; Zaitsev et al., 2005).

A continuación se describen las características morfológicas de cada una de estas interneuronas. Las descripciones se plantean a partir de hallazgos de estudios provenientes de estudios con roedores, primates no humanos y en algunas áreas corticales motoras y somatosensoriales. Estos estudios no se han realizado en la corteza anterior del giro del cíngulo en el humano.

Células en Cesta.

Se describen como células multipolares con somas poligonales con largas arborizaciones axonales dispuestas horizontalmente que se organizan alrededor del soma y las dendritas proximales de la neurona piramidal y de otras interneuronas. Acerca de su morfología se han descrito tres subtipos distintos: pequeñas, grandes y células en nido en la corteza motora del humano y en la corteza somatosensorial de rata (Marin-padilla, 1969; Wang, Gupta, Toledo-Rodriguez, Wu, & Markram, 2002). Expresan dos tipos de CaBPs (PV y CB) y muchos neuropéptidos (Kisvárday, 1992; Marin-padilla, 1969). Electrofisiológicamente se ha descrito que la mayoría tienen un patrón de disparo rápido con potenciales de acción breves denominado fast-spiking (disparo rápido) (Kawaguichi & Kubota, 1997; Zaitsev et al., 2005). Están conectadas mutuamente por sinapsis químicas y eléctricas, mientras que la inhibición a las células piramidales regula la sincronización y la actividad regulatoria de grupos grandes de estas neuronas integrando su actividad dentro de una extensa área cortical (Freund & Katona, 2007).

Las células en cesta grandes tienen somas multipolares entre 20-25 um, con tres o más dendritas dirigidas en distintas direcciones, con un axón que presenta colaterales dispuestas horizontalmente y verticalmente hasta 900 o 1000 um, y terminan en el soma de otras células en cesta y neuronas piramidales realizando inhibición perisomática. Su disposición evidencia mayor capacidad para la inhibición a través de columnas corticales dentro de la misma lámina, prevaleciendo en las láminas III a V y expresando en un 50% PV, en un 25% CB y el 25% restante expresan Neuropéptido Y(NPY), Colecistoquinina (CCK) y ocasionalmente Somatostatina (SOM) (Markram et al., 2004).

Las células en cesta pequeñas son neuronas espinosas con somas de hasta 20 um, con forma multipolar y variando esta morfología a bipolar o bipenachadas de acuerdo a su ubicación laminar. La arborización axonal es densa, circunscrita a una sola lámina y termina en el cuerpo celular de otras neuronas. Todas expresan VIP, en algunas colocalizado con CCK y SOM, y hasta el 30% de ellas expresan CB (Markram et al., 2004).

Las células en nido, tienen somas irregulares, pequeños de hasta 20 um, con dendritas espinosas que se disponen radialmente y una arborización axonal más compacta y circunscrita a un plexo en forma de nido alrededor del cuerpo celular postsináptico, ejerciendo un efecto inhibidor local y posiblemente intracolumnar (Y. Wang et al., 2002). La mitad de estas células expresan PV, un tercio CB y cada neuropéptido (NPY, SOM y CCK) se expresa de manera uniforme en el 30% de estas celulas. Estas neuronas prevalecen en las láminas II y III y requieren un mayor número de células piramidales para su activación en comparación con otras interneuronas.

Células en Candelabro.

Se han encontrado en las láminas II a VI, son células espinosas, de soma ovalado, multipolar, o bipenachado con dendritas se proyectan radialmente y arborización axonal ramificada en forma de botones similar a las velas de un candelabro que se dirige al segmento inicial del axón de la neurona piramidal (DeFelipe, 1999). Esta disposición la cataloga como la interneurona con la capacidad inhibitoria más fuerte de todas las interneuronas corticales, expresan PV y CB y tienen un perfil electrofisiológico fast-spiking (Kawaguchi & Kondo, 2002).

Células de Martinotti.

Se encuentran distribuidas principalmente en las áreas II a V, con soma fusiforme, tiene dendritas orientadas verticalmente a láminas infragranulares con una extensión bastante amplia que sugiere recepción de aferencias de varias láminas corticales dentro de una única columna cortical (Markram, H., Toledo-Rodriguez, M., Wang, Y., Gupta, A., Silberberg, G., And Wu, 2004). Sus axones se proyectan a la lámina I distribuyéndose allí de forma horizontal y generando inhibición a las dendritas apicales de las neuronas piramidales predominantemente y en menor proporción a interneuronas corticales. Expresan CaBPs como la CB y la CR, su patrón electrofisiológico es “regular spiking”, de bajo umbral, y tienden a participar de procesos desinhibitorios en la corteza cerebral conectándose mediante sinapsis gabaérgicas con otras interneuronas (Kawaguchi & Kondo, 2002; Wang et al., 2004).

Células Double – Bouquet.

Presentan una distribución en láminas supragranulares, aunque se pueden encontrar en las láminas II a V. Presentan una distribución de sus dendritas en dos penachos, con axones descendentes que se dirigen verticalmente y se integran a fascículos inervando espinas y ejes dendríticos. De esta forma participan de la inhibición interlaminar e intracolumnar con un patrón electrofisiológico de tipo no-fast-spiking (Kawaguchi & Kondo, 2002). Expresan CB y CR.

Células bipolares.

Son neuronas pequeñas que se encuentran principalmente en las láminas II a VI, con soma ovoide o fusiforme de cuyos extremos se desprenden dendritas que se dirigen a la lámina I o a la lámina VI. El axón se proyecta en forma descendente, en sentido vertical atravesando todas las capas y conectándose pocas veces principalmente con neuronas piramidales. Por lo general expresan CR (Markram, H., Toledo-Rodriguez, M., Wang, Y., Gupta, A., Silberberg, G., And Wu, 2004).

Células bipenachadas ("bitufted")

Células con somas ovoides y dendritas organizadas en forma de penacho. Estas se encuentran en las láminas II a VI. Su axón orientado verticalmente se distribuye de forma más circunscrita que las células bipolares a láminas vecinas dirigiéndose a las dendritas de otras neuronas. Expresan CR y CB (Markram, H., Toledo-Rodriguez, M., Wang, Y., Gupta, A., Silberberg, G., And Wu, 2004)

Células neurogliaformes.

Son células pequeñas que se encuentran en todas las láminas corticales, tienen somas redondos que dan lugar a dendritas que se organizan en forma de esfera en un campo de 100 a 200 um. La arborización axonal se extiende hasta los 400 um y es fundamental ya que realiza sinapsis eléctricas con otras interneuronas como las Células en Cesta y en Candelabro (Simon, Oláh, Molnár, Szabadics, & Tamás, 2005). Expresan CB y funcionalmente pertenecen a la categoría late-spiking (Markram, H., Toledo-Rodriguez, M., Wang, Y., Gupta, A., Silberberg, G., And Wu, 2004). Evidencia reciente sobre la accion de estas interneuronas sugiere que su disparo, a diferencia de la acción de las celulas en cesta, genera corrientes

postsinápticas mas lentas con concentraciones bajas pero mas prolongadas de GABA en la terminal postsináptica (Overstreet-Wadiche & McBain, 2015).

Células horizontales de Cajal.

Tienen un soma ovoide dispuesto paralelamente a la superficie pial, con largas dendritas horizontales y un axón que forma un plexo de procesos restringidos a la lámina I proyectándose sobre milímetros de la superficie cortical. Existen datos que evidencian que estas neuronas contienen altos niveles de glutamato y expresan CR con mayor frecuencia que CB. Además, reciben fibras excitatorias del tálamo y fibras serotoninérgicas provenientes del tallo cerebral, y proyectan sus axones hacia las dendritas apicales de las células piramidales (Kirmse, Dvorzhak, Henneberger, Grantyn, & Kirischuk, 2007; Soriano & Del Río, 2005). Estudios recientes plantean la hipótesis de que, mientras los terminales axonicos de las celulas Horizontales de Cajal se extienden por la lámina I generando inhibición de las dendritas apicales de las neuronas piramidales, sus cuerpos surgen una “dilución del desarrollo” que los hace difícil de identificar en las distintas regiones del cerebro adulto (Marín-Padilla, 2015).

INTERNEURONAS GABAÉRGICAS EN LA CORTEZA PREFRONTAL

Para efectos del presente estudio se ha revisado la literatura en torno a los hallazgos en torno a las interneuronas Gabaérgicas en la región anterior del giro del cíngulo, a partir del estudio de las diferentes CaBPs (Calbindina, Calretinina y Parvalbúmina). Mucha de la información obtenida al respecto se ha realizado en investigaciones que incluyen análisis citomorfológico en patologías como los trastornos depresivos y el autismo.

En estudios realizados en la década de los noventa se estudió la distribución de las proteínas de unión al Ca en el área 24 encontrando un patrón de mayor presencia de la PV para la lámina V que en otras láminas, aumentando su expresión desde 24a a 24c. En el resto de las láminas se encontraron diferencias de acuerdo con la subdivisión del área 24 de esta manera: en el área 24a se encontraron en la lámina

II, en el área 24b en las láminas III y V, y se evidenció una inmunorreactividad para las láminas II a la VI en el área 24c. En el mismo sentido, se encontraron distribuciones verticales de inmunorreactividad para las láminas V y VI en todas las subdivisiones del área 24 que sugieren la organización característica de las inhibiciones perisomáticas de la célula piramidal (Nimchinsky, Vogt, Morrison, & Hof, 1997).

Acerca de las células inmunorreactivas a CB se encontraron predominantemente en la lámina III y en menor cantidad en las láminas V y VI. En cuanto a las subdivisiones del área 24 se encontró menor inmunorreactividad para la porción ventral de la lámina III del área 24a, apareciendo más en este mismo sector en el área 24b y teniendo aun mayor concentración en la subdivisión 24c.

En relación con la Calretinina se encuentra un patrón constante en lo referido para otros sectores de la corteza, con una inmunorreactividad muy intensa para estas neuronas, las cuales se encontraron predominantemente en la lámina II y la parte superficial de la III. Estas neuronas conservaron la morfología de las neuronas en penacho y algunas con apariencia bipolar. El soma era de ovoide a fusiforme, y algunas ocuparon la lámina I por lo que se presume, corresponden a neuronas de Cajal-Retzius. Se observaron neuronas dispersas en las láminas III, V y VI. En esta última las neuronas asumieron distintas formas entre ellas multipolares y horizontales (Nimchinsky et al., 1997).

Otros estudios desarrollados en el área 24 del humano, realizan una descripción de las neuronas CR+ mostrando una distribución preferencial para láminas supragranulares, aspecto similar lo encontrado en otras áreas corticales. Se encuentran células dispuestas principalmente en la parte profunda de la lámina II y superficial de la lámina III, las cuales son bipolares, bipenachadas, multipolares y algunas bipenachadas dispuestas horizontalmente. Las células reportadas como bipolares presentan diámetros del soma pequeño y mediano (diámetro medio para la totalidad de las láminas de 11.6 µm, láminas II-III 13.4 µm, y láminas V-VI 15.8 µm), formas de huso con dendritas orientadas verticalmente que en su mayoría se distribuyeron a cortas distancias (algunas muestran un proceso dendrítico más

largo). En ocasiones un tercer proceso emergió de la base del soma de la dendrita principal dando una apariencia tripolar. Estas células bipolares y tripolares constituyeron el 52% de la población de células CR+ estudiada. El segundo tipo celular encontrado correspondió al 27% de la población total de neuronas, las cuales se describen como células bipenachadas, con dendritas en penachos orientados verticalmente que emergen de los polos del soma neuronal. El tercer subtipo correspondió a células con dendritas ascendentes y descendentes que se restringieron a columnas largas y estrechas de la corteza con una distribución mucho más radial de las dendritas. Un último tipo de célula (4%), presentó disposición simétrica de sus penachos de forma horizontal, con un soma multipolar (algunas de estas fueron espinosas). Estas células se encontraron mucho más en la lámina III. En este estudio también reportan un tipo de células de forma "piramidal", debido a la presencia de un soma de forma triangular con una dendrita dispuesta en sentido apical y procesos que emergen del soma neuronal. Se diferenciaron de las células piramidales debido a que su dendrita apical rápidamente se bifurcó dando como resultado dos procesos conjuntos de dendritas apicales (Gabbott, Jays, & Bacon, 1997) (Gabbott, Jays, & Bacon, 1997). Según refieren en este estudio, algunos de los subtipos neuronales con morfología del soma multipolar corresponderían a células en cesta. Estas células CR+ ubicadas en láminas supragranulares tendrían como objetivos sinápticos preferiblemente otras células no-piramidales, sus contactos sinápticos son de tipo axosomático y tienden a realizar formaciones pericelulares en forma de cesta alrededor de somas circulares de otras células Gabaérgicas. Se considera que las células bipolares y bipenachadas estarían participando de procesos de inhibición intracolumnar, sincronizando la actividad eferente de las células de proyección en distintos niveles dentro de las columnas de células individuales (Gabbott et al., 1997).

Estudios que analizaron la densidad del neuropilo expresado por estas proteínas muestran un incremento de la CB en la región anterior del cíngulo en relación con las partes más rostrales del giro. Igualmente, encontraron predominio de neuronas inmunorreactivas a CR en la lámina V y mayor neuropilo de células

inmunorreactivas a PV y CB en la lámina III de la corteza anterior del giro del cíngulo (Nimchinsky et al., 1997).

Algunos estudios realizados con tejido post-mortem derivado de pacientes psiquiátricos con esquizofrenia y trastorno afectivo bipolar, analizaron las densidades de las distintas CaBPs en la corteza anterior del giro del cíngulo. Se encontró que las densidades de CB tienden a estar disminuidas en la lámina II en comparación con los sujetos control. En este estudio, aunque no se observó significancia estadística para la reducción de las proteínas CB y PV, en este último grupo sí se encontró disminución de la densidad neuronal hasta en un 20 % de las células en ambos grupos de patologías estudiadas. Estos hallazgos sugieren la presencia de una condición patofisiológica compartida por dichas entidades (Cotter et al., 2002).

Estudios realizados en tejido post-mortem derivado de pacientes con diagnóstico de autismo encontraron una disminución de los receptores de GABA-A en todas las láminas del área 24 (46.8% supragranular y 20.2% infragranular), además de disminución en la densidad de los sitios de unión a benzodiacepinas (A. Oblak, Gibbs, & Blatt, 2009). En base a estos resultados, los autores sugieren que existe regulación negativa determinada por una mayor liberación de GABA. Posteriores estudios realizados por estos autores también encontraron disminución de los receptores GABA-B en los cerebros de personas con autismo en comparación con los controles emparejados (A. L. Oblak, Gibbs, & Blatt, 2010), sugiriendo una relación de este hallazgo con las alteraciones en los procesos socio-emocionales y cognitivos. Acerca de la distribución de las CaBPs en la corteza anterior del giro del cíngulo, no se encontraron diferencias significativas en cuanto a morfología, tamaño y densidad de las células CR+ para cinco casos con autismo y cinco controles pese a la disminución del 33% de la densidad neuronal general para los casos de autismo. Sin embargo, se observaron ciertas tendencias distribuidas a nivel de las láminas corticales, encontrando una densidad más baja de células CR+ para las láminas II a VI y un incremento de la densidad en la lámina I en los sujetos con autismo comparado con controles. La única diferencia significativa se encontró para

densidades bajas de células CR+ en la lámina V de sujetos con autismo (Adorjan et al., 2017).

En relación con la participación de las distintas interneuronas inhibitorias en funciones asociadas a la actividad cortical general, algunos estudios sostienen que las interneuronas PV+ participan en la generación de oscilaciones gama, las cuales dependen en gran medida de la fuerte inhibición proveniente de las células en cesta hacia las células piramidales. Al respecto, se considera que una disminución en la inhibición cortical como mecanismo compensatorio para el desbalance inhibición-excitación característico de la esquizofrenia alteraría los niveles necesarios de inhibición requerida para la generación de las oscilaciones gamma, que constituyen un papel importante en los procesos de control cognitivo (Lewis, Curley, Glausier, & Volk, 2012).

También se plantea que las neuronas inmunorreactivas para PV participan en la manifestación de trastornos depresivos debido a su participación en los procesos de regulación de las eferencias de la célula piramidal, ejerciendo una fuerte inhibición perisomática y en el segmento inicial del axón. Estas células reciben conexiones excitatorias provenientes del tálamo y de proyecciones cortico-corticales, además de realizar inhibición recíproca por medio de la actividad de otras células PV+. También se destaca en este circuito el patrón de disparo fast-spiking y la propiedad no-adaptable de su actividad. Dichas propiedades permiten la activación sincrónica de disparos para las células piramidales manteniendo la integridad y propagación de la información (Northoff & Sibille, 2014).

En el trastorno depresivo mayor se ha estudiado la distribución de neuronas en la corteza prefrontal dorsolateral (CPDL, área 9) para células inmunorreactivas a CB, encontrándose una disminución del 50% de estas en las láminas supragranulares y una tendencia a la reducción en la corteza orbitofrontal (COF, área 47). Aparte de la densidad neuronal disminuida, se encontró una reducción significativa del soma de las células CB+ en estos sujetos hasta en un 18% para las neuronas en CPDL y una tendencia a la disminución en la COF. En este estudio también se analizaron los parámetros de densidad y tamaño del soma para las células PV+ sin encontrar

variaciones entre los sujetos estudiados (Rajkowska, O'Dwyer, Teleki, Stockmeier, & Miguel-Hidalgo, 2007). En el mismo sentido se encuentra un estudio posterior realizado por este grupo en donde hallaron una reducción significativa (28%) de la densidad de células inmunorreactivas para CB en la lámina II de la corteza occipital (área 17) de personas con trastorno depresivo mayor, en relación con el grupo control (Maciag et al., 2010).

JUSTIFICACIÓN Y PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El estudio del funcionamiento del sistema nervioso implica la comprensión del sustrato neurobiológico que caracteriza las distintas funciones emergentes superiores que hacen parte de aquello que distingue lo específicamente humano. En este sentido, se ha comprendido la importancia de identificar factores diferenciales en la organización citomorfológica de las neuronas corticales y existen varios estudios de análisis para las características de la célula piramidal. Sin embargo, poco se conoce acerca de las características de las interneuronas Gabaérgicas esenciales para la constitución del balance excitación-inhibición requerido para el funcionamiento armónico del sistema (Ferguson & Gao, 2018). Los acercamientos en esta parte se derivan de estudios realizados en torno a la distribución de la expresión de las distintas CaBPs en diversos sectores de la corteza cerebral, entre los que se encuentran algunos desarrollados en primates no humanos donde refieren que la mayor proporción de neuronas corresponde a las células IR (inmunorreactivas) para CR (45-50%) (R Druga, 2009), un 9 y 21% de la población total de neuronas en la corteza cerebral del mamífero (Barinka & Druga, 2010) y distribuyendose en la parte superficial de las láminas supragranulares de la corteza prefrontal del macaco en un 11% (Gabbott & Bacon, 1996b). En láminas supragranulares de áreas auditivas se encuentra una distribución mayoritaria de este tipo celular (Chiry, Tardif, Magistretti, & Clarke, 2003) y en la corteza prefrontal medial se ha reportado que las láminas II y III presentan mayor densidad y corresponden al 8% de la población neuronal total (Gabbott et al., 1997). En estudios realizados en la corteza prefrontal humana (área 10) se encuentra una distribución de este tipo neuronal mayoritariamente en láminas supragranulares, también constituyendo el mayor número entre las interneuronas estudiadas (Gaitan, 2014).

De otro lado, en estudios realizados para la corteza prefrontal medial del macaco afirman que las células IR para CB corresponden al 26% de la totalidad de

interneuronas Gabaérgicas, distribuyéndose preferencialmente en las láminas II y III y disminuyendo su densidad a medida que se acercan a la lámina VI (Gabbott & Bacon, 1996b, 1996a). En las láminas supragranulares de la corteza prefrontal humana, específicamente en el área 10, se encuentra que corresponden a la tercera población de interneuronas con mayor densidad (Gaitan, 2014) y para las áreas 9 y 11 superan en número a las interneuronas inmunorreactivas a PV (Ocampo Gonzalez, 2019). Acerca de este último grupo, algunos autores consideran que corresponden al 25% de la totalidad de interneuronas Gabaérgicas corticales en el humano (Rastislav Druga, 2009); en la corteza prefrontal del macaco se encontró que correspondía al 5.9% del total de neuronas en esta región, mientras que en el humano se observaron dos bandas horizontales de neuropilo distribuidas la primera en las láminas II y III, y la segunda en las láminas V y VI. En áreas prefrontales aparece como el grupo celular de menor densidad para las láminas supragranulares en las áreas corticales 9, 10 y 11 (Gaitan, 2014; Ocampo Gonzalez, 2019).

Otros estudios han reportado información acerca de la distribución de las neuronas que expresan las distintas CaBPs en la superficie anterior del giro del cíngulo. En estas investigaciones se encuentra que las neuronas IR para PV evidenciaron un incremento en la densidad para la lámina V, y mostraron inmunorreactividad distribuida de forma vertical para las láminas V y VI, sugiriendo una organización perisomática alrededor de las neuronas piramidales (no entendí esta frase). Las neuronas inmunorreactivas para CB se distribuyeron principalmente en la lámina III, mientras que las neuronas CR+ se encontraron en su gran mayoría en las láminas II y III (Nimchinsky et al., 1997). En este mismo estudio reportaron predominantemente formas ovoides y fusiformes, y algunas morfologías multipolares y horizontales dispersas entre las láminas III, V y VI para las neuronas CR+.

Las descripciones para las neuronas IR a CR en el área 24 del humano reportan la presencia de las mismas en la parte profunda de la lámina II y superficial de la III, con formas variadas (bipolares, bipenachadas, multipolares), pero generalmente las describen con somas pequeños y medianos (Gabbott et al., 1997).

Otros estudios evidencian hallazgos de disminución en las densidades de células CB+ en la lámina II en pacientes con trastorno afectivo bipolar y esquizofrenia (Cotter et al., 2002) y en estudios con autismo se encuentra disminución de las densidades de CR en la lámina V (Adorjan et al., 2017).

Es importante considerar que no existen estudios que evalúen cuantitativamente aspectos como el tamaño y la forma del soma, así como el número de procesos entre las tres poblaciones de interneuronas que expresan las CaBPs (CR, CB y PV), de la manera en que se propone la realización de la presente investigación.

De acuerdo con lo anterior, el problema de investigación se plantea a partir de las siguientes preguntas:

- ¿Cuál es la densidad y perfil de distribución de las subpoblaciones de interneuronas que expresan las CaBPs en las láminas supragranulares de la corteza supragenual del giro del cíngulo en el humano?
- ¿Cuáles son las características morfológicas del soma (tamaño, forma y número de procesos primarios) de las subpoblaciones de interneuronas que expresan las CaBPs en las láminas supragranulares de la corteza supragenual del giro del cíngulo del humano?
- ¿Existen asimetrías interhemisféricas en el perfil morfológico y en la distribución de las subpoblaciones de interneuronas que expresan las CaBPs de las láminas supragranulares de la corteza supragenual del giro del cíngulo del humano?

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Caracterizar citomorfológicamente las subpoblaciones de interneuronas corticales en las capas supragranulares del sector supragenual de la región anterior del giro del cíngulo del humano.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar la densidad y el perfil de distribución de cada subpoblación de interneuronas que expresan las CaBPs en las láminas II y III de la región supragenual del giro del cíngulo.
- Establecer el perfil de las características morfológicas del soma de cada subpoblación de interneuronas que expresan las CaBPs en las láminas supragranulares de la región supragenual del giro del cíngulo.
- Determinar posibles asimetrías interhemisféricas en el perfil morfológico del soma y en la distribución de las subpoblaciones de interneuronas en las láminas II y III de la región supragenual del giro del cíngulo.

METODOLOGÍA

Selección y procesamiento del tejido cortical

En esta investigación se utilizó tejido postmortem de 8 sujetos humanos recolectado a través de un convenio entre el Centro de Estudios Cerebrales (CEC) y el Instituto Nacional de Medicina Legal y Ciencias Forenses de las ciudades de Bogotá y Cali entre los años 2006 y 2007. La recolección inicial de las muestras contó con el aval del Comité Institucional de Revisión de Ética Humana de la Facultad de Salud (Acta No. 065 de 2005). El tejido se encontraba procesado y almacenado en placas histológicas en el CEC. A partir de este convenio se recogió material histológico de cerebros de sujetos masculinos sin antecedentes de enfermedad psiquiátrica o neurológica, sin signos de trauma craneoencefálico o edema cerebral que pudiera afectar el sistema nervioso central. El rango de edad de los sujetos estudiados estuvo entre los 18 y 50 años (promedio: 34.1), 5 de los cuales fallecieron por herida con arma de fuego (en tórax), y 3 por herida con arma cortopunzante (en región torácica o precordial). El intervalo postmortem (IPM) fue entre 6 y 14 (promedio: 9,1) horas.

Existe poca disponibilidad de muestras cerebrales de sujetos femeninos (proporción 1/10 en relación con sujetos masculinos), razón por la cual, en este estudio no se recogieron este tipo de muestras. La tabla 1 describe las características de los sujetos estudiados.

Tabla 1. Datos de los sujetos postmortem. Descripción de las variables sexo, edad, IPM (Intervalo Post Mortem) y causa de muerte de los sujetos cuya muestra de tejido cerebral fue utilizada para el presente estudio.

SUJETO	SEXO	EDAD	IPM	CAUSA DE MUERTE
1	M	18	10	Herida por arma de fuego en tórax
2	M	26	10	Herida por arma cortopunzante en región precordial
3	M	50	10	Herida por arma de fuego en tórax
4	M	37	7	Herida por arma cortopunzante en región precordial
5	M	47	14	Herida por arma de fuego en tórax
6	M	35	8	Herida por arma de fuego en tórax
7	M	48	6	Herida por arma cortopunzante en región precordial

8	M	20	8	Herida por arma de fuego en tórax

El actual estudio hizo parte de un proyecto de investigación financiado por la Vicerrectoría de Investigaciones de la Universidad del Valle (CI 1810), titulado "*Caracterización citoarquitectónica de poblaciones de interneuronas de las láminas II, III, V y VI de las áreas 9, 24 y 11 de la corteza prefrontal de sujetos humanos*". Todos los procedimientos para la selección y análisis de las muestras fueron aprobados por el Comité Institucional de Revisión de Ética Humana de la Facultad de Salud (CIREH) de la Universidad del Valle (Acta No 008-2016), de conformidad con el protocolo de Helsinki.

Se identificaron las superficies dorsolateral, medial y orbital del lóbulo frontal de ambos hemisferios cerebrales y se localizó el área 24 a partir de los criterios de localización topográfica y la subdivisión cito-arquitectónica propuestos por Öngür, Ferry & Price en el 2003. Posteriormente, de los cerebros extraídos en fresco, se tomó una muestra mediante cortes perpendiculares a la superficie cortical, desde las crestas de los giros corticales hasta la sustancia blanca subyacente, extrayendo bloques de $1cm^3$ (1 cm de ancho x 1 cm de largo x 1 cm de profundidad aproximadamente), Ver Figura: 4.

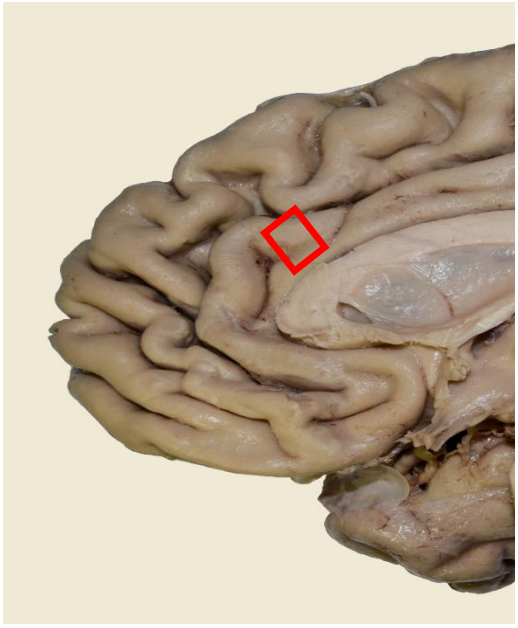


Figura 4. Localización anatómica del área 24 y localización macroscópica de la toma de muestra. Fotografía de la corteza prefrontal medial humana donde se aprecia el cuadro rojo que

describe el lugar de la superficie supragenual del giro del Cíngulo donde se obtuvo la muestra de tejido postmortem procesada para la presente investigación.

El procedimiento para almacenar, preservar y procesar histológicamente las muestras, se describe en Gaitán (2014), y se presenta brevemente a continuación. Inmediatamente las muestras de tejido son extraídas, se sumergen en Solución Salina al 8,9%, con el fin de realizar lavado y remoción de residuos como sangre, y se depositan en recipientes con una mezcla de paraformaldehido-lisina-periodato de sodio (pH 7.4), durante 6 a 10 días (4° C), con el fin de realizar fijación de la muestra. Después de este tiempo, los bloques son cortados en sentido coronal a 50 µm de espesor en un Vibrátomo (Lancer Vibratome series 1000®). Los primeros cortes se marcan con azul de toluidina, corroborando la presencia de toda la corteza cerebral, desde la capa I hasta la sustancia blanca subcortical, así como la organización vertical de las dendritas apicales de las neuronas piramidales. Los cortes siguientes se sometieron al proceso de inmersión en solución de metanol absoluto al 30% y peróxido de hidrogeno al 0.3% durante 12 minutos para evitar la actividad de la peroxidasa endógena. Se realizó lavado con solución PBS (Phosphate Buffer Saline, con pH de 7,4), 3 veces por 5 minutos cada vez y se procedió a inmersión en suero normal de caballo al 1,5% (Vectastain Elite ABC, PK-6102 Mouse IgG, Vector Laboratories ®) en PBS, durante 40 minutos para bloquear la adhesión a antígenos inespecíficos.

Posteriormente, cada 800 µm (el tejido restante, no colectado dentro de esas 800 µm, era utilizado para otros proyectos de investigación con diferentes marcadores inmunohistoquímicos), se recogió una sección de tejido para ser procesada por inmunohistoquímica, realizando incubación del tejido por un periodo de 18 hrs en los anticuerpos primarios, los cuales fueron diluidos en PBS con Tritón X-100 al 0,5% de la siguiente forma:

a. Anti-NeuN (Monoclonal Antineuronal Nuclei, Chemicon International - MAB377®), dilución 1:2500: este anticuerpo reconoce antígenos específicos presentes en las células neuronales, proporciona una marcación selectiva de los núcleos y somas de

dichas células. La proteína NeuN (*Neuronal Nuclei),* es una proteína asociada al ADN nuclear de las neuronas y su patrón de inmunorreactividad permite caracterizar la morfología somática y la disposición laminar de la corteza cerebral.

b. Anti-Parvalbúmina (Monoclonal Anti-Parvalbumin antibody, Sigma St. Louis - PARV-19 P-3088), dilución 1:5000: Anticuerpo dirigido contra la proteína de unión al calcio Parvalbúmina, la cual permite la identificación de los subtipos de interneuronas en cesta y candelabro predominantemente (DeFelipe, 1993; Hof y Col., 1999).

c. Anti-Calbindina (Polyclonal Anti-Calbindin antibody, Sigma St. Louis - Clon CB-955. G9848), dilución 1:5000: Dirigido contra la proteína de unión al calcio Calbindina, expresada predominantemente por células Neurogliaformes, en doble bouquet o bipenachadas y de Martinotti (DeFelipe, 1993; Hof y Col., 1999).

d. Anti-Calretinina (Policlonal Anti-Calretinin antibody, Chemicon International - clon AB-149). dilución 1:500: Dirigido contra la proteína de unión al calcio Calretinina, expresada predominantemente por células bipolares, horizontales de Cajal, y double bouquet o bipenachadas (DeFelipe, 1993; Hof y Col., 1999).

Posteriormente, se trataron los tejidos con anticuerpos secundarios biotinilados diluidos en PBS en proporción 1:200, y se sumergieron en una solución compuesta por “Avidina-Biotina-HRP” (ABC Vectastain – Elite PK – 6102 Mouse IgG, PABC®Laboratorios Vector) durante 40 minutos a temperatura ambiente, cada paso fue seguido de lavados en PBS, 3 veces por 5 minutos cada uno. El proceso de revelado se realizó con una solución de Diaminobencidina al 4%, peróxido de hidrógeno al 2% y níquel al 2% (Peroxidase Substrate Kit; DAB SK-4100), en PBS durante 10 minutos. El tejido se montó sobre placas cromo-aluminadas secadas a temperatura ambiente, se deshidrataron progresivamente por inmersión en alcohol con diferentes concentraciones y en xilol. Por último, el tejido fue cubierto con un medio de montaje histológico (Fisher Permount Mounting Media□) y laminillas

cubreobjetos. Todos los procedimientos descritos anteriormente fueron realizados a temperatura ambiente del laboratorio (24º C).

Se seleccionaron aquellas muestras correspondientes a 8 sujetos, que al observarlas al microscopio (Axio Scope A1 Zeiss) en objetivo de 10x, cumplían con los siguientes criterios:

a) Integralidad del tejido, marcación homogénea y pocos o ningún accidente anatómico o de procedimiento.

b) Se excluyeron aquellas placas en las cuales se observó desintegración del tejido, sobreexposición al revelador y/o marcación no uniforme.

REGISTRO Y ANÁLISIS DE IMÁGENES

Registro Fotográfico

Se realizó un proceso de observación y registro fotográfico de las placas histológicas con el microscopio de campo claro Axio Scope A1 de Zeiss acoplado a una cámara de alta resolución (Axio Cam HRc) y con los objetivos de 10x y 40x. Las fotografías se tomaron a partir de placas previamente seleccionadas que cumplían con los criterios de mantener una marcación homogénea, pocos accidentes anatómicos y sin sobrexposición del agente revelador.

Observaciones, imágenes y mediciones en 10x:

Para las fotografías tomadas a 10x, primero se seleccionó un segmento de cada corte del tejido cerebral en la placa, después, en cada segmento se tomaron fotos consecutivas en sentido vertical desde la superficie pial hasta la sustancia blanca (aproximadamente 4 capturas) para cada marcador (NeuN, PV, CB y CR). Finalmente, se fusionaron las fotografías en forma consecutiva con la asistencia del

programa PhotoStitch (versión 3.11, Canon 2000®), obteniendo una reconstrucción digital de un segmento completo de la corteza cerebral. Para determinar los espesores laminares y corticales, se utilizaron 3 reconstrucciones por hemisferio para cada sujeto de cada sección de tejido marcada con anti-NeuN.

De igual forma, se registraron fotografías para cada uno de los 8 sujetos incluidos en el estudio, en cada uno de los marcadores de las CaBPs (CB, CR, PV) en ambos hemisferios y se realizaron 3 reconstrucciones fotográficas en los mismos sectores homólogos y con las mismas condiciones referidas para la reconstrucción cortical del tejido marcado con anti-NeuN.

Utilizando los criterios de Öngür, Ferry & Price (2003) para la definición laminar cortical, en las placas marcadas con anti-NeuN se determinaron las mediciones de cada lámina cortical y el espesor cortical total con el programa Image-J del Instituto Nacional de Salud de los Estados Unidos de América (NIH). Dado que los límites entre las capas corticales no son líneas rectas, se registraron tres mediciones en cada reconstrucción fotográfica de la corteza cerebral (en el extremo izquierdo, el centro y el extremo derecho). Para cada sujeto, los tres valores adquiridos para espesor cortical total y espesor laminar se promediaron, y el espesor relativo de cada capa cortical se determinó con la fórmula:

Espesor laminar relativo (%) = (grosor laminar / grosor cortical) x 100

Los espesores laminares relativos encontrados en las mediciones del tejido marcado con anti-NeuN se utilizaron para definir los límites entre las capas corticales en las reconstrucciones microfotográficas homólogas de las secciones inmunomarcadas contra cada una de las CaBP. Esto se realizó promediando el espesor laminar de las mediciones en anti-NeuN y aplicando el promedio obtenido a la medición cortical para cada segmento marcado con las CaBPs, con el fin de establecer el límite preciso de cada lamina cortical para la toma de imágenes con el objetivo 40x.

Imágenes y mediciones en 40x:

Las imágenes del objetivo de 40x se tomaron en los mismos sectores tisulares de las reconstrucciones realizadas con el objetivo de 10x, de manera que se pudiera conservar los límites entre las láminas corticales previamente establecidos.

Las fotografías con el objetivo de 40x se obtuvieron definiendo una "ventana" de 300 x 100 µm por medio del programa Zen (interface entre el microscopio y el computador para procesar los datos acopiados por la cámara), con un espacio en el centro de cada una de las láminas supragranulares (II y III). La ventana fue definida a partir de la calibración de la cámara para su posterior registro. No se consideró una cuadrícula de mayor tamaño ya que teniendo en cuenta el espesor de las capas estudiadas (especialmente la lámina II), un aumento en los valores podría superar los límites citoarquitectónicos de la misma. Antes de la ubicación de la cuadrícula, cada microfotografía se calibró a partir de una microfotografía estándar obtenida con un micrómetro deslizante (objetivo de micrómetro de etapa NIKON, Tipo A, MBM 11100) en condiciones similares. La densidad neuronal se calculó con la fórmula:

Neuronas por rejilla / área de rejilla (0.03 mm^2)

El registro fotográfico con el objetivo de 40x permitió recolectar datos morfológicos del tamaño del soma neuronal (área en μm^2), forma del soma y número de procesos primarios de las células que expresan las CaBPs. Se escogieron células que no estaban superpuestas, encontrándose aisladas de otras, con un estado de inmunorreactividad aparentemente normal y con adecuada visualización de los procesos primarios.

Después de escoger las células, la información morfométrica de tamaño y forma del soma neuronal se recogió por medio del programa Image-J. Se señalaron con el puntero el número de procesos primarios y se resaltó el contorno perimetral del soma, y el programa automáticamente determinó el área (en μm^2) y el valor del factor forma o también denominado "grado de esfericidad" ("shape factor"). De igual

manera, los datos se guardaron de forma automática en una hoja de cálculo para su posterior análisis estadístico.

Se obtuvo la imagen de 6 células en promedio por cada lámina cortical (II y III), de las cuales se obtuvieron datos de las variables ya mencionadas, por lo cual el número de observaciones esperadas sería de: Sujetos x Campos Fotográficos x Láminas x Hemisferio Cerebral x número Interneuronas x proteína de unión al Calcio = 8 X 1 X 2 X 2 X 6 x 3 = 576 Interneuronas.

Las variables morfométricas evaluadas se describen a continuación:

- Espesor Cortical: Dimensión existente entre el límite de la superficie pial (parte superficial de la lámina I), y la parte profunda de la lámina VI marcada por su vecindad con la sustancia blanca.
- Espesor laminar: las mediciones se obtuvieron a partir de identificación de los límites entre una lámina cortical y otra a partir de los cambios observados en la tipología celular, el tamaño neuronal y la densidad celular.
- Número de neuronas (densidad neuronal): resultado del conteo de somas neuronales que se observaron en la cuadrícula de 300 µm x 100 µm ubicada en el centro de cada lámina cortical.
- Tamaño y forma del soma: el tamaño del soma se midió a partir de delinear con el puntero, el contorno o perímetro del pericarión, en neuronas que presentaban características distinguibles de integridad y ausencia de superposición. El programa Image-J automáticamente arrojó una medida del Shape factor (factor forma) definiendo el grado de esfericidad del soma de la célula, el cual se estableció entre 0 y 1, siendo las medidas más cercanas a 1 las más esféricas o redondas y las medidas cercanas a 0.5 las más fusiformes.
- Número de procesos: Los marcadores utilizados en este estudio, aunque no permiten distinguir entre dendritas y axones, permitieron la identificación de procesos primarios originados a partir del soma, los cuales fueron contabilizados para el análisis morfométrico.

Con el fin de mantener la objetividad y disminuir la presencia de errores humanos, se utilizó la técnica del doble ciego para todos los conteos celulares y las mediciones morfológicas realizadas (espesor laminar, espesor cortical, conteos neuronales y evaluación de parámetros morfológicos).

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El análisis estadístico se realizó por medio del programa GraphPad Prism Versión 6.0 (©2012 GraphPad Software, Inc.). Las variables cuantitativas continuas se presentan mediante la media y el error estándar y las variables cuantitativas discretas mediante la mediana y el rango intercuartil. Las variables estudiadas se resumen en la tabla 2.

Tabla 2. Descripción de las variables utilizadas en el estudio. La tabla describe las variables utilizadas para el análisis de los datos de acuerdo a su clasificación y la unidad de medida utilizada. Las variables descritas son: espesor cortical total, espesor laminar, espesor laminar relativo, población neuronal total, densidad neuronal, tamaño del soma, grado de esfericidad y numero de procesos.

Variable	Descripción	Clasificación	Unidad de medida
Espesor cortical total	Distancia entre la superficie de la lámina I y el límite entre la lámina VI y la sustancia blanca subcortical	Cuantitativa Continua	µm
Espesor laminar	Límites entre las láminas definido por cambios en la densidad y morfología de las células.	Cuantitativa Continua	µm
Espesor laminar relativo	Proporción de espesor laminar y espesor cortical total	Cuantitativa Continua	Porcentaje
Población neuronal total	Número de neuronas cuantificadas por cada marcador	Cuantitativa Discreta	Número de neuronas
Densidad neuronal	Neuronas contadas en una cuadrícula de 100 x 300 µm dividido entre 0.03	Cuantitativa Continua	Número de neuronas / μm^2
Tamaño del soma	Área del soma de la neurona establecido en una imagen bidimensional	Cuantitativa continua	µm
Grado de esfericidad Shape factor	Indicador cuantitativo proporcionado por la relación entre el área y el perímetro según fórmula: $\frac{4\pi \times \text{área del soma}}{\text{Perímetro del soma}}$ Valores cercanos a 1 representan formas circulares y cercanos a 0 representan formas fusiformes.	Cuantitativa Continua	
Número de procesos	Procesos generados a partir del soma neuronal	Cuantitativa Discreta	Número de procesos

El análisis estadístico se realizó aplicando inicialmente pruebas de normalidad a los datos a partir del test Shapiro Wilk. De acuerdo con los resultados de la prueba se utilizó una prueba t-student o U-Mann Whitney para el análisis bivariado a dos colas, ANOVA y prueba de Kruskal Wallis, realizándose las pruebas de correcciones múltiples correspondientes (Tukey, Bonferroni y Sidak). Para todas las pruebas empleadas, el nivel de significancia fue establecido en al menos 0,05. En el análisis bivariado se hicieron comparaciones entre ambos hemisferios para una misma área cortical, y para las características citomorfológicas (tamaño del soma, número de procesos primarios, grado de esfericidad) se compararon las tres subpoblaciones neuronales identificadas con los tres anticuerpos contra CaBPs entre hemisferios para una misma lámina cortical y entre láminas corticales.

Posteriormente, se realizó un análisis de conglomerados con la asistencia del programa Statistical Analysis Systems (SAS), que evaluó la relación entre las variables citomorfológicas estudiadas (tamaño y forma del soma, y número de procesos). Los resultados permitieron establecer un perfil de la población de interneuronas en cada lámina de acuerdo con sus características y la CaBP que expresa.

RESULTADOS

ORGANIZACIÓN LAMINAR DE LA PARTE ANTERIOR DEL GIRO DEL CÍNGULO (ÁREA 24, TRANSICIÓN ENTRE LA PORCIÓN PRE- SUPRA-GENUAL).

Al observar la corteza inmunorreactiva a los cuatro marcadores (NeuN, CB, CR, PV), se destacan algunas características que resultan pertinentes de explicar para la comprensión de la distribución celular particular en la región anterior del área 24.

Las secciones marcadas con el anticuerpo contra NeuN muestra una lámina I con muy pocas células dispersas en un espacio laminar amplio, mientras que la lámina II aparece como un estrecho cinturón de múltiples neuronas de tamaño pequeño y con formas de tendencia esférica. Los límites entre esta lámina y la III son comúnmente difusos y difíciles de identificar en esta región cortical.

La lámina III se observa de gran espesor y compuesta predominantemente por células de forma triangular (morfología de las células piramidales) y de tamaño mediano, que forman conjuntos o agrupaciones dando la apariencia columnar a esta capa. En esta lámina se aprecian algunas células granulares (no-piramidales) dispersas que constituyen una menor cantidad en relación con las piramidales ya descritas.

La terminación en la parte profunda de la lámina III está determinada por la disminución abrupta de la presencia de neuronas piramidales y un leve aumento de la concentración de neuronas granulares (comparado con la concentración de las mismas en la lámina III) de tamaño pequeño. Estas neuronas en ocasiones no forman una lámina continua y se observan inmersas en la transición entre la lámina III y la V. En el presente estudio, se consideró que estas células correspondían a la lámina IV, de apariencia entre agranular y disgranular.

En la lámina V se observa células piramidales de mayor tamaño a las de la lámina III, en su parte superficial más agrupadas y en la parte profunda más dispersas, mientras que la lámina VI se observa con células piramidales, algunas de ellas con cambios en la presencia u orientación de la dendrita apical (piramidales

modificadas), la cual se extiende de forma transversal. De igual forma, se observan neuronas granulares que ocasionalmente forman conjuntos de células (ver figura 5).

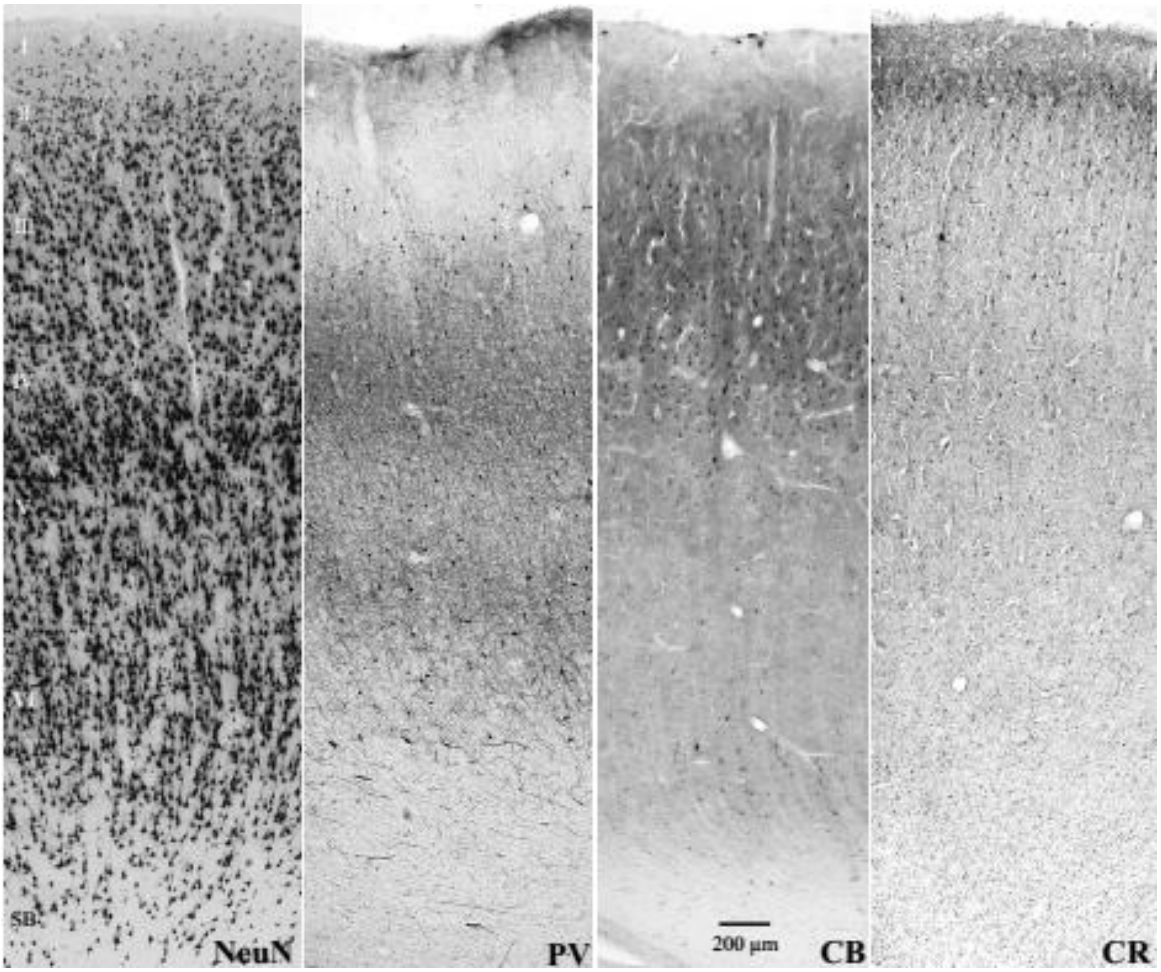


Figura 5. Segmentos de la corteza cerebral de humano (Área 24) procesados con los cuatro marcadores del estudio. A la izquierda, Anti-NeuN, proteína que marca predominantemente el núcleo y el soma de toda la población neuronal. Seguidamente hacia la derecha, segmentos marcados con los anticuerpos contra las CaBPs: Parvalbúmina (PV), nótese la presencia de las células a partir de la lámina II) Calbindina (CB, con distribución predominantemente supragranular) y Calretinina (CR, con neuronas distribuidas a lo largo de toda la corteza y cierto predominio en capas II-III). Objetivo 10x.

El resultado de la medición del espesor cortical total promedio para el hemisferio derecho fue de 2590.46 +/- 287.95 um y para el hemisferio izquierdo fue de 2590.84 +/- 197.90 um, sin que existan diferencias significativas entre ambas mediciones ($p > 0.05$). La lámina con mayor espesor cortical fue la III para ambos hemisferios: 800.91 +/- 163.22 um para el hemisferio derecho y 724.25 +/- 123.86 um para el

izquierdo con una diferencia significativa entre ambos valores (p< 0.01). Seguidamente, las láminas que presentan mayor espesor cortical son las infragranulares: la lámina V con 583.09 +/- 90.95 um para el hemisferio derecho y 611.67 +/- 74.94 um para el izquierdo (diferencia significativa entre ambos valores, p< 0.05); y la lámina VI con 587.51 +/- 112.94 um para el hemisferio derecho y 626.97 +/- 153.60 um para el izquierdo (no hay diferencia significativa entre ambos valores).

Las láminas que presentan un menor espesor cortical son en orden descendente: la lámina I, con 272.59 +/- 80.9 um para el hemisferio derecho y 258.48 +/- 63.32 um para el izquierdo; la lámina II con 250.77 +/- 70.55 um en el hemisferio derecho y 232.18 +/- 42.03 um para el izquierdo; la lámina IV con el menor espesor cortical registrado, 85.47 +/- 19.02 um para el hemisferio derecho y 86.33 +/- 18.03 um para el izquierdo (no hay diferencia significativa entre ambos valores (Ver tabla 3).

En general se observa un espesor cortical mayor en láminas infragranulares, las cuales cuentan con un espesor relativo de 45.19% +/- 6.18 para el hemisferio derecho, y 49.38% +/- 7.38 para el izquierdo, comparadas con las láminas supragranulares que tienen un espesor de 40.76% +/- 7.06 para el hemisferio derecho y 38.29% +/- 6.23 para el izquierdo.

Tabla 3. Espesor Cortical y Laminar de la región anterior del cíngulo, área 24. Se describen los valores de espesor cortical y laminar para ambos hemisferios. L: lámina; HD: Hemisferio Derecho; HI: Hemisferio Izquierdo; EC: Espesor Cortical; *: los valores se presentan con la media (desviación estándar). Valores P en rojo: <0.05.

L	*HD*		*L*	*HI*		*Valor P*
	Espesor laminar	*Espesor Relativo*		*Espesor laminar*	*Espesor Relativo*	
I	272.59 (80.9) *	10.52 (2.61)	*I*	258.48 (63.32)	10.18 (2.42)	0.14
II	250.77 (70.55)	9.81 (3.02)	*II*	232.18 (42.03)	9.31 (1.66)	0.06
III	800.91 (163.22)	30.95 (4.04)	*III*	724.25 (123.86)	28.98 (4.57)	0.002
IV	85.47 (19.02)	3.33 (0.66)	*IV*	86.33 (18.03)	3.48 (0.73)	0.78
V	583.09 (90.95)	22.60 (3.21)	*V*	611.67 (74.94)	24.42 (1.98)	0.048

VI	587.51 (112.94)	22.59 (2.97)	*VI*	626.97 (153.60)	24.96 (5.40)	0.08
EC	**2590.46 (287.95)**		*EC*	**2502.84 (197.90)**		0.67
	Supragranular	40.76 (7.06)		**Supragranular**	38.29 (6.23)	
	Infragranular	45,19 (6,18)		**Infragranular**	49,38 (7,38)	

VARIABLES CITOMORFOLÓGICAS DE LAS NEURONAS QUE EXPRESAN CaBPs EN LAS CASPAS SUPRAGRANULARES DEL ÁREA

En cuanto a las neuronas marcadas con los anticuerpos contra las CaBPs, se registraron fotografías con el objetivo de 40x encontrándose características distintivas para cada una de ellas (ver figura 10).

En el caso de las células CB+ de la lámina II se encuentra predominio de somas medianos, con formas esféricas y múltiples procesos. En algunos casos se observan formas fusiformes, con dos polos de los cuales emergen de manera abundante los procesos. Estas células también se observan en la lámina III y tienden a mantener su tamaño (soma mediano), con algunas excepciones donde se observa un aumento del mismo. En cuanto a la forma, en la lámina III se observa tendencia a tornarse fusiforme con procesos que se desprenden de los extremos.

Las neuronas CR+ de la lámina II presentan predominio de somas más pequeños que los observados para las células CB+. En general, su forma tiende a ser esférica con varios procesos que se desprenden en distintas direcciones. En cuanto a las células CR+ de la lámina III, generalmente mantienen su tamaño (con algunas excepciones) en relación con la lámina II, aunque su soma se torna fusiforme y de apariencia bipolar, con un proceso que emerge de cada extremo.

Las neuronas PV+ en general, presentan el tamaño del soma más grande en comparación con el resto de las células estudiadas. En la lámina II se observan formas irregulares (ni esféricas ni fusiformes): en algunos casos poligonales con abundantes procesos. En cuanto a la lámina III se mantienen las características de la lámina II con una leve disminución de los procesos.

A continuación, se describirán los resultados cuantitativos producto de las mediciones de forma, tamaño y número de procesos de los somas de las interneuronas que expresan CaBPs, además de su densidad característica.

DENSIDAD DE SUBPOBLACIONES DE INTERNEURONAS

La densidad de cada subpoblación de interneuronas que expresa cada una de las CaBPs en las capas supragranulares, se calculó a partir del conteo de las neuronas encontradas en cada cuadrícula de 300 µm x 100 µm, la cual representa 0.03 mm^2. En la tabla 4 se presenta la cantidad de conteos o registros hechos de neuronas en cada lámina y por cada marcador para establecer posteriormente la densidad interneuronal).

Tabla 4. Cantidad de conteos neuronales para establecer densidad. Se describe el número de conteos o registros realizados de neuronas por cada lamina supragranular y por cada marcador de CaBPs (CB, CR, PV) para posteriormente establecer la densidad. II: lámina II; III: lámina III. n: Número de conteos. %=porcentaje de conteos por CaBPs.

n= 240

	II		**III**	
Marcador	**n**	**%**	**n**	**%**
CB	33	27.5	33	27.5
CR	42	35.0	42	35.0
PV	45	37.5	45	37.5

La distribución de subpoblaciones de interneuronas corticales identificadas por la expresión de proteínas de unión al calcio es diferente entre las láminas II y III en la región anterior del cíngulo del humano.

Las células CR+ constituyen la subpoblación de interneuronas de mayor densidad en ambas láminas supragranulares. En la lámina II, las CR+ son significativamente más densas, seguidas de las CB+ ($p<0.001$), y las PV+ que son las más escasas ($p<0.0001$). En la lámina III, las células CR+ conservan una densidad significativamente mayor a las otras dos subpoblaciones (CB+ $p<0.0001$; PV+

p<0.001), pero entre las interneuronas CB+ y PV+ no hay diferencias en su densidad (ver figura 2A).

De esta manera, se observa que cada subpoblación de interneuronas en las capas supragranulares del área 24 tiene una distribución lámina-específico, siendo la lámina II aquella que tiene mayor cantidad de neuronas CB+ y CR+ que la lámina III (p<0,0001), aspecto más notorio para las CR+ (ver figura 2A). En contraste, las células PV+ presentan mayor cantidad en la lámina III que en la II (p<0.01).

No se encontraron diferencias interhemisféricas estadísticamente significativas en la distribución de las neuronas que expresan CaBPs en cada capa supragranular de la región anterior del giro del cíngulo del humano (p>0,05).

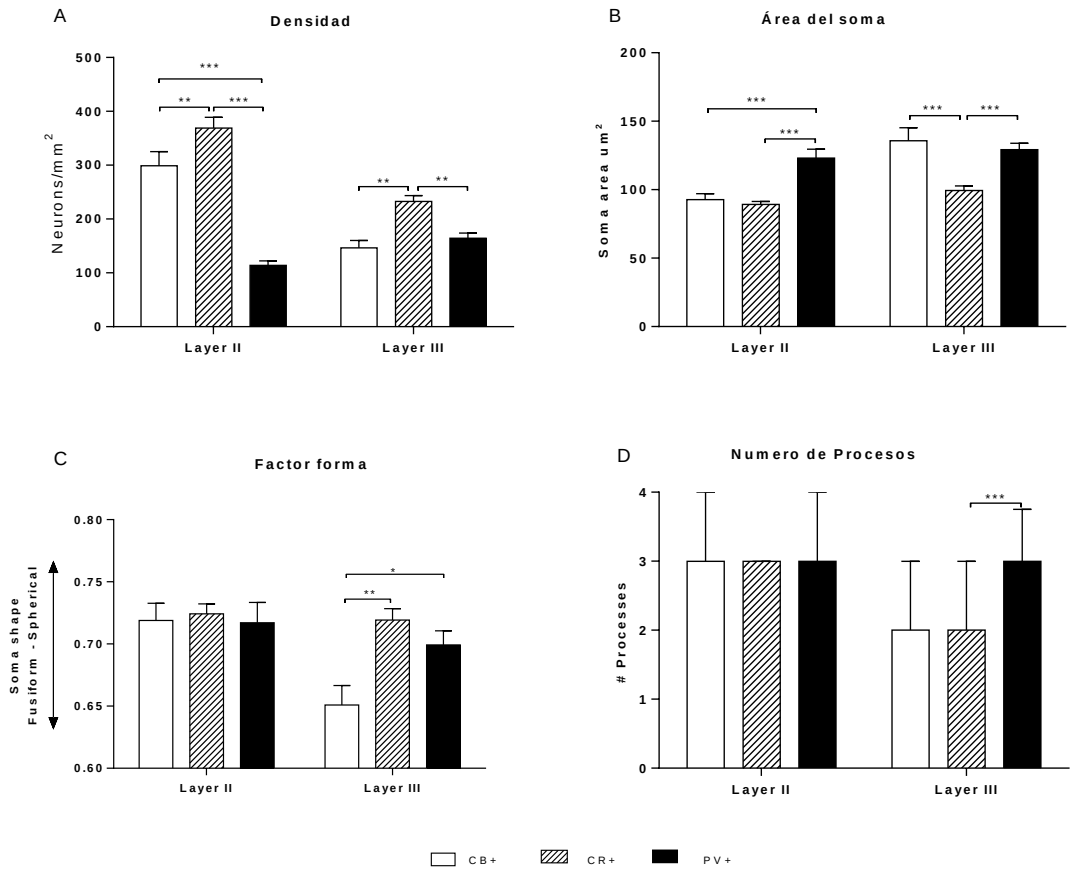


Figura 6. Densidad neuronal y variables citomorfológicas de cada subpoblación que expresa CaBPs en las láminas II y III. La barra de color blanco corresponde a células CB+, la barra con patrón de líneas negras cruzadas a CR+ y la barra

de color negro a PV+. A: Densidad de neuronas positivas para CaBPs (media y error estándar) para la lámina II y III de la corteza anterior del giro del cíngulo en el humano. B: Tamaño del soma (área en μm^2) de neuronas positivas para CaBPs (media y error estándar) para la lámina II y III de la corteza anterior del giro del cíngulo en el humano. C: Forma del soma de neuronas (se consideran valores entre 0 y 1 donde los resultados cercanos a 0.5 indican somas con forma fusiforme, y los valores cercanos a 1 corresponden a formas esféricas) positivas para CaBPs (media y error estándar) para la lámina II y III de la corteza anterior del giro del cíngulo en el humano. D: Número de procesos primarios (derivados del soma) de las neuronas positivas para CaBPs (mediana y rango intercuartil) para la lámina II y III de la corteza anterior del giro del cíngulo en el humano. Nivel de significancia: *p<0.01, ** p<0.001, *** p<0.0001.

MORFOLOGÍA DEL SOMA DE LAS INTERNEURONAS

Tabla 5. Cantidad de neuronas analizadas mediante variables morfométricas. Se describe el número de neuronas sometidas a medición de tamaño, factor forma, y conteo de número de procesos para cada CaBPs (CB, CR, PV), en las láminas supragranulares y en ambos hemisferios. D: hemisferio derecho; I: hemisferio Izquierdo; II: lámina II; III: lámina III. n: Número de neuronas sometidas a Morfometría. %=porcentaje de neuronas sometidas a Morfometría.

n= 574

	D=288				I=286			
	II		III		II		III	
Marcador	**n**	**%**	**n**	**%**	**n**	**%**	**n**	**%**
CB	30	20.4	25	17.7	33	21.0	20	15.5
CR	87	59.2	69	48.9	87	55.4	68	52.7
PV	30	20.4	47	33.3	37	23.6	41	31.8

Se encuentran diferencias en el tamaño del soma de las neuronas que expresan cada CaBP, observándose un mayor tamaño de las PV+ en comparación con CB+ y CR+ ($p<0.0001$, ver figura 6B) principalmente para la lámina II. Las neuronas de la lámina III que expresan CB+ se observan mucho más grandes que las de la lámina II ($p<0.0001$); mientras se observa un tamaño más constante y sin variación significativa de las células CR+ y PV+ entre las láminas.

En relación con el tamaño del soma de las láminas II y III, se logró verificar que existe un tamaño significativamente más grande de las células PV+ para la lámina II y un tamaño significativamente más pequeño para las CR+ en la lámina III ($p<0.0001$, ver figura 6B).

La medición de la forma del soma arroja puntuaciones entre 0 y 1, siendo en los extremos 1.0 el valor de un círculo y 0.0 el de una línea recta. En nuestro estudio,

las neuronas con formas de tendencia fusiforme presentan puntuaciones inferiores a 0.69 y formas con tendencia circular presentan puntuaciones superiores a 0.79. El valor encontrado en formas de somas alrededor de 0.74 se ha definido para formas triangulares, poligonales o de trayectoria irregular en su morfología.

La forma del soma para las neuronas CB+ tiende a ser circular en la lámina II, y cambia significativamente cuando se encuentra en la lámina III tornándose más fusiforme por la presencia de puntuaciones promedio de 0.65 (ver figura 6C, $p<0.001$). Las células CR+ ($p<0.001$) y PV+ ($p<0.01$) por el contrario, mantienen una forma mucho más constante, siendo las CR+ las más redondas, seguidas por las PV+ principalmente para la lámina III (ver figura 6C).

El número de procesos primarios (derivados directamente del soma) de las 574 neuronas valoradas se encuentra entre 1 y 6. Respecto de esta variable citomorfológica, se encontró que las células CB+ y CR+ tienden a presentar más procesos en la lámina II que en la III (ver figura 6D). El análisis estadístico reportó que la tendencia previamente mencionada sólo fue significativa para las células CR+ ($p< 0.01$).

Las células PV+, en ambas láminas corticales analizadas tienen una mediana de 3 procesos. En la lámina III, estas interneuronas presentan un mayor número de procesos que las CB+ y las CR+, siendo significativa la diferencia contra estas últimas ($p<0.0001$). Lo anterior da cuenta de una distribución lámina-específica del número de procesos para las neuronas CB+ y CR+.

En resumen, es posible afirmar que el perfil morfológico de los somas de las interneuronas corticales en la región anterior del cíngulo del humano (área 24 supragenual), es específico por la CaBP que expresan y por lámina cortical donde se encuentran. De esta manera encontramos que las interneuronas CB+ se distinguen por presentar somas más grandes y fusiformes en la lámina III que en la II ($p<0.0001$), las interneuronas CR+ se diferencian por presentar más procesos primarios derivados del soma en la lámina II que en la III ($p<0.01$, ver figura 2),

mientras las PV+ no presentan variaciones morfológicas entre las láminas supragranulares.

ANÁLISIS DE CONGLOMERADOS

El análisis multivariado utilizado permitió la identificación de conglomerados de la información a partir de la similitud o el grado de cercanía entre las variables: tamaño, forma del soma y número de procesos en cada una de las subpoblaciones de interneuronas que expresan las CaBPs. Las variables fueron sometidas a análisis en cada lámina estudiada (LII y LIII), para un total de 304 neuronas analizadas en la lámina II y 270 para la lámina III.

Con el fin de definir el número de agrupaciones más apropiado para realizar el análisis comparativo entre láminas, se revisó detenidamente la historia de los 10 conglomerados y se estableció como punto de corte el grado de disimilitud en el que los clústers empezarían a separarse unos de otros en forma drástica. De esta manera, el grado de disimilitud o distancia promedio entre clústers (eje Y) para los análisis de ambas láminas fue igual, 0.5.

Las agrupaciones de las neuronas de acuerdo con la distancia promedio entre clústers por cada lámina se presenta en un dendograma para cada lámina, generando un total de 6 clúster para la capa II y 5 clúster para la lámina III (ver figuras 7 y 8).

Los clústers configurados por el análisis de conglomerado presentan diferencias significativas entre ellos determinadas por alguna de las variables citomorfológicas (tamaño del soma, forma del soma o número de procesos), o por combinaciones de varias de estas. Adicionalmente, se tabuló la caracterización de cada clúster de acuerdo con la cantidad de neuronas por subpoblación y las características morfológicas estudiadas (ver tablas 6 y 7).

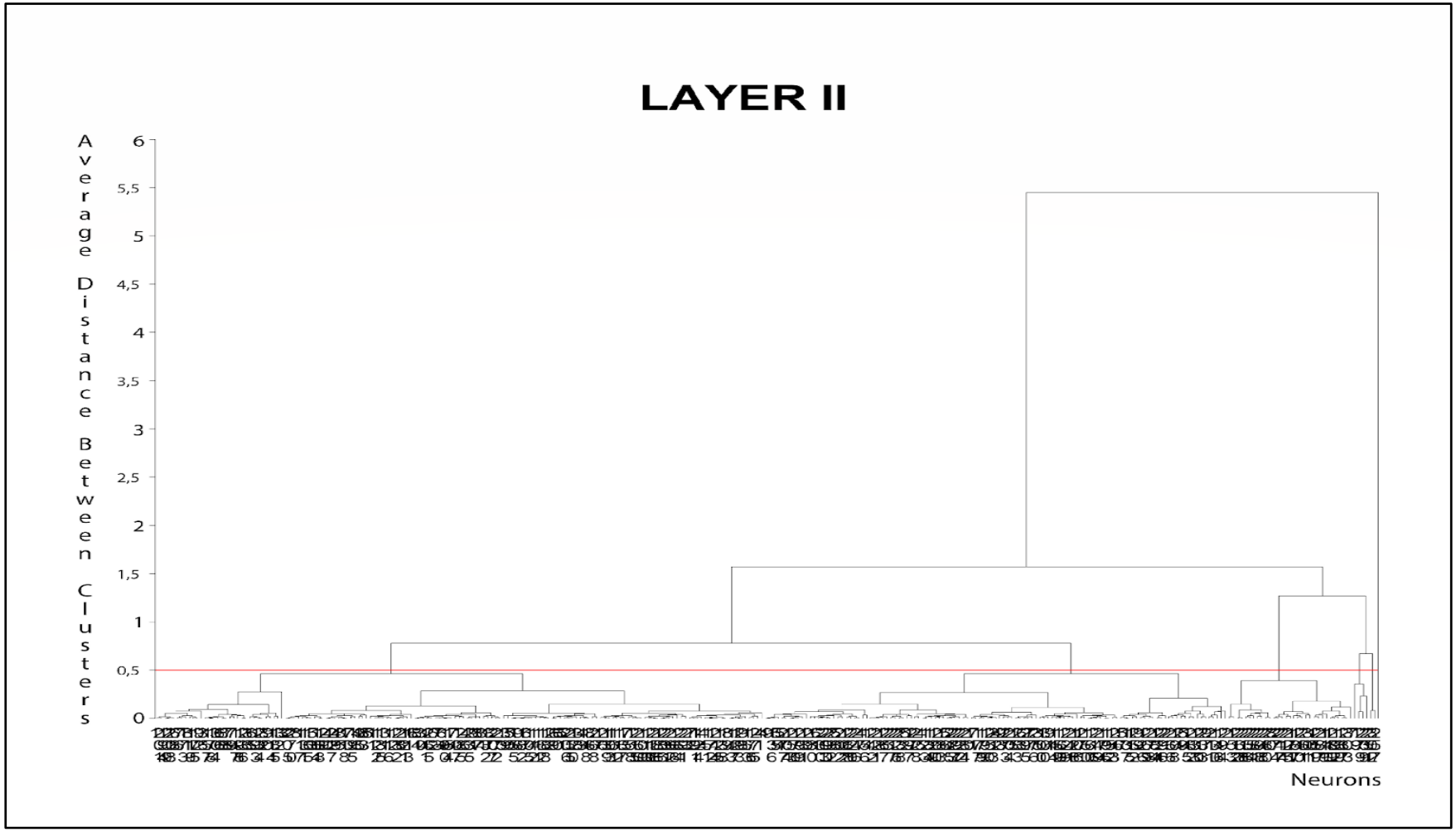


Figura 7. Dendograma derivado del análisis de conglomerado de las láminas II. Se describe el punto de corte establecido para las neuronas de la lámina II (0.5), del cual se derivan 6 cluster (ver agrupaciones por debajo de la línea de corte roja).

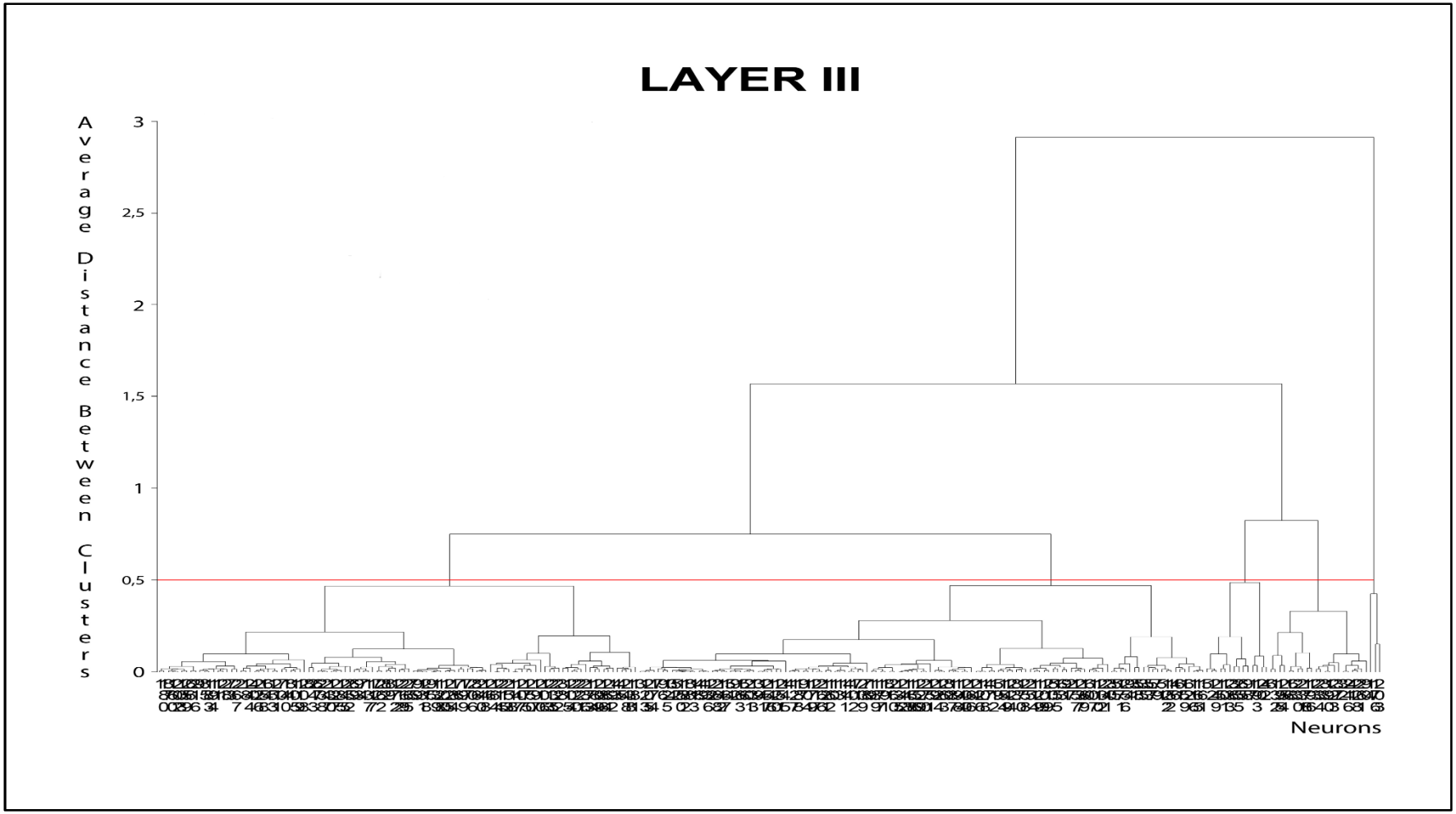


Figura 8. Dendograma derivado del análisis de conglomerado de las láminas III. Se describe el punto de corte establecido para las neuronas de la lámina III (0.5), del cual se derivan 5 cluster (ver agrupaciones por debajo de la línea de corte roja).

Descripción de los clústers

De la lámina II se analizan 304 y se hallaron 6 clústers con características citomorfológicas particulares. La mayor cantidad de neuronas analizadas corresponden a las CR+ con un total de 174 células, seguidas de las PV+ con 67 células y CB+ con 63. Las características de cada clúster se describen en la tabla 6.

El primer clúster contiene 151 neuronas, distribuidas de la siguiente manera: CR+ 100 células (66% del clúster), CB+ 35 células y PV+ 16 células. Estas células tienen como características morfológicas la presencia de un soma pequeño (media = 69.71 um^2), la forma del soma de tendencia poligonal (factor forma media = 0.74) y 3 procesos aproximadamente (media = 2.72).

El segundo clúster de la lámina II tiene 115 neuronas: 60 de CR+ (52% del clúster); 30 de PV+; y 25 de CB+, las cuales mantienen algunas de las características citomorfológicas del clúster 1, por la presencia de la forma del soma poligonal (media = 0.71) y 3 procesos aproximadamente (media = 2.75). Estas células se diferencian en que presentan un aumento del tamaño del soma en relación con el clúster 1 (media = 109.09 um^2).

El tercer clúster tiene 31 células con una distribución por CaBPs como se describe a continuación: 16 de PV+; 14 de CR+; y 1 de CB+. En este clúster las células aumentan su tamaño y se tornan más fusiformes en relación con las neuronas del clúster 2 (tamaño, media = 155.34 um^2; factor forma, media = 0.68), conservando el número de procesos.

El cuarto clúster contiene cuatro neuronas: 2 CB+ y 2 PV+, manteniendo una forma somática igual a la del clúster 3 (media = 0.68) y el número de procesos (media = 3.25), pero aumentan su tamaño en relación con grupo anterior (media = 210.21 um^2).

El quinto clúster contiene dos neuronas PV+, con aumento de tamaño (media = 246.17 um^2), de formas más fusiformes que las características del clúster anterior (media = 0.59) y con cuatro procesos aproximadamente.

El sexto clúster está compuesto por una neurona PV+ con el mayor tamaño hallado (396.36 um^2), con la forma más redonda de todas las neuronas estudiadas (0.83) y con cuatro procesos.

Tabla 6. Características de los clústers para la lámina II. Se describen las características de los clústers de acuerdo a las variables tamaño del soma, forma y numero de procesos cuantificadas por la media para cada una de las CaBPs estudiadas.

	Variable citomorfológica	**Media**	**# de CaBPs por clúster**
Clúster 1 n = 151	Tamaño del soma	69.71	CR+ 100
	Forma del soma	0.74	CB+ 35
	N de procesos	2.72	PV+ 16
Clúster 2 n = 115	Tamaño del soma	109.09	CR+ 60
	Forma del soma	0.71	PV+ 30
	N de procesos	2.75	CB+ 25
Clúster 3 n = 31	Tamaño del soma	155.34	PV+ 16
	Forma del soma	0.68	CR+ 14
	N de procesos	3	CB+ 1
Clúster 4 n = 4	Tamaño del soma	210.21	CB+ 2
	Forma del soma	0.68	PV+ 2
	N de procesos	3.25	CR+ 0
Clúster 5 n = 2	Tamaño del soma	246.17	PV+ 2
	Forma del soma	0.59	CB+ 0
	N de procesos	4	CR+ 0
Clúster 6 n = 1	Tamaño del soma	396.36	PV+ 1
	Forma del soma	0.83	CB+ 0
	N de procesos	3	CR+ 0

Para la lámina III se definieron 5 conglomerados a partir del análisis de 270 células, distribuidas de la siguiente manera: 137 CR+, 88 PV+, y 45 CB+. Las características de los clústers se presentan en la tabla 7.

El primer clúster de la lámina III contiene 125 neuronas: 82 células CR+ (66% del clúster), 26 PV+ y 17 CB+. En este grupo de neuronas se encuentran células con somas de tamaño pequeño (media = 77.78 um^2), con formas que tienden a ser poligonales (media = 0.71) y con aproximadamente dos procesos (media = 2.48).

El segundo clúster se compone de 106 neuronas: 47 CR+ (44% del clúster), 46 PV+ (corresponden al 43%) y 13 CB+. Estas células aumentan su tamaño del soma con relación al grupo anterior (media = 124.88 um^2) y el número de procesos (media = 2.76), pero mantienen su forma poligonal (media = 0.71).

El tercer clúster está compuesto por 22 neuronas que se distribuyen como sigue: 11 PV+, 7 CB+ y 4 CR+. En este grupo las células aumentan su tamaño del soma en relación con el clúster anterior (media = 179.21 um^2), pero se tornan más fusiformes (media = 0.66). El número de procesos se mantiene constante respecto del clúster anterior (media = 2.9).

El cuarto clúster de la lámina III contiene 14 neuronas, de las cuales 7 son CB+, 4 son PV+ y 3 son CR+. En este caso las células presentan somas de tamaño más grande que las previas (media = 232.43 um^2), con formas que tienden a ser más fusiformes que las del grupo anterior (media = 0.60) y aproximadamente 3 procesos (media = 2.75).

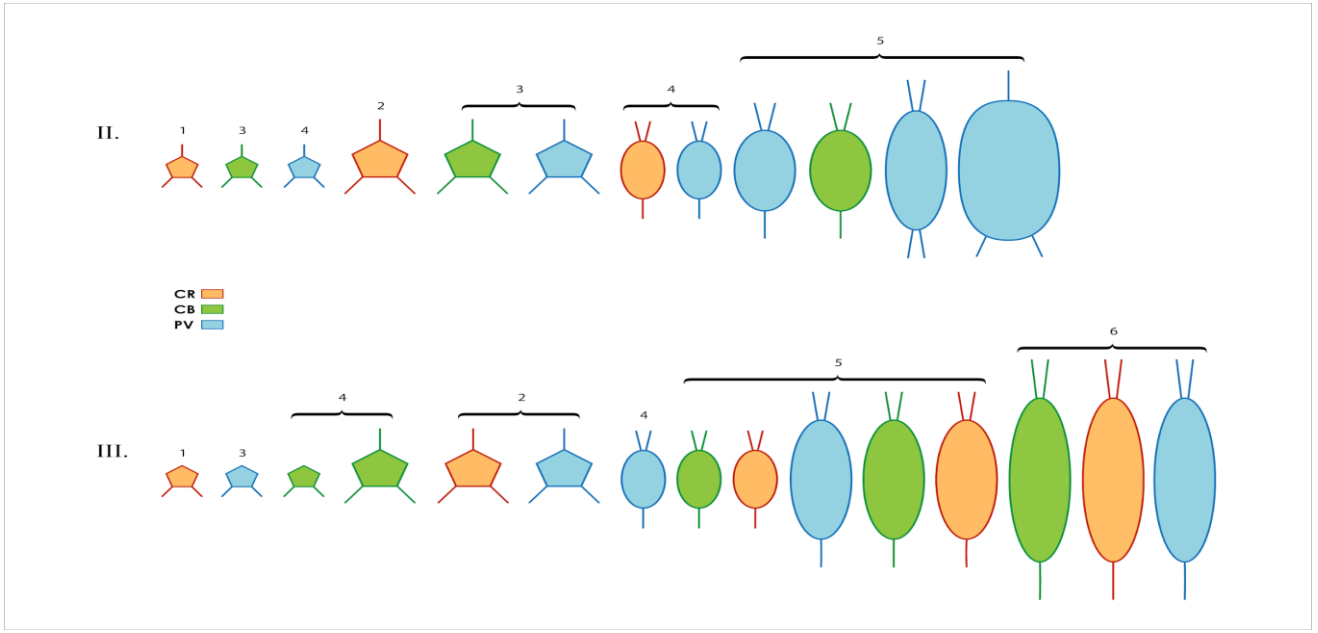
El quinto y último clúster de la lámina III está compuesto por 3 neuronas que corresponden a cada una de las CaBPs Estas tres células son las que presentan tamaño del soma más grandes de todo el conjunto analizado en esta lámina (media = 308.60 um^2), y la forma más fusiforme (media = 0.52). El número de procesos se mantiene en aproximadamente en 3 (media = 2.66).

Al parecer, tanto en la lámina II como en la III, la variable tamaño del soma se constituye en el principal factor diferenciador entre los clústers organizados por el análisis de conglomerado, seguida por la variable forma. La variable número de procesos es la más estable entre clústers, principalmente en la lámina III.

Tabla 7. Características de los clústers para la lámina III. Se describen las características de los clústers de acuerdo a las variables tamaño del soma, forma y numero de procesos cuantificadas por la media para cada una de las CaBPs estudiadas.

	Variable citomorfológica	Media	# de CaBPs por clúster
Clúster 1 n = 125	Tamaño del soma	77.78	CR+ 82
	Forma del soma	0.71	PV+ 26
	N de procesos	2.48	CB+ 17
Clúster 2 n = 106	Tamaño del soma	124.88	CR+ 47
	Forma del soma	0.71	PV+ 46
	N de procesos	2.76	CB+ 13
Clúster 3 n = 22	Tamaño del soma	179.21	PV+ 11
	Forma del soma	0.66	CB+ 7
	N de procesos	2.90	CR+ 4
Clúster 4 n = 14	Tamaño del soma	232.43	CB+ 7
	Forma del soma	0.60	PV+ 4
	N de procesos	2.85	CR+ 3
Clúster 5 n = 3	Tamaño del soma	308.60	PV+ 1
	Forma del soma	0.52	CB+ 1
	N de procesos	2.66	CR+ 1

En la figura 9 se esquematiza el perfil morfológico de las interneuronas corticales de las láminas supragranulares de la parte anterior del giro del cíngulo en el humano (área 24 supragenual), como resultado del análisis de conglomerados. Debajo de la figura se encuentra la descripción de las cantidades correspondientes a cada grupo celular descrito para ambas láminas, las cuales se encuentran representadas en corchetes dentro de la figura.



Número de neuronas por grupo Lámina II

Group	# neurons
1	100
2	60
3	25 – 35
4	14 – 16
5	1 – 2

Número de neuronas por grupo Lámina III

Group	# neurons
1	82
2	46 – 47
3	26
4	11 – 17
5	4 – 7
6	1

Figura 9. Perfil morfológico de las interneuronas inhibitorias de láminas supragranulares en la corteza supragenual de la región anterior del cíngulo en el humano. La figura describe los conglomerados resultantes de las variables tamaño, forma y numero de procesos para las tres CaBPs en las láminas II y III. Las tablas de la parte inferior contienen información relacionada con rangos de la cantidad de neuronas que se encuentran en cada uno de los conglomerados.

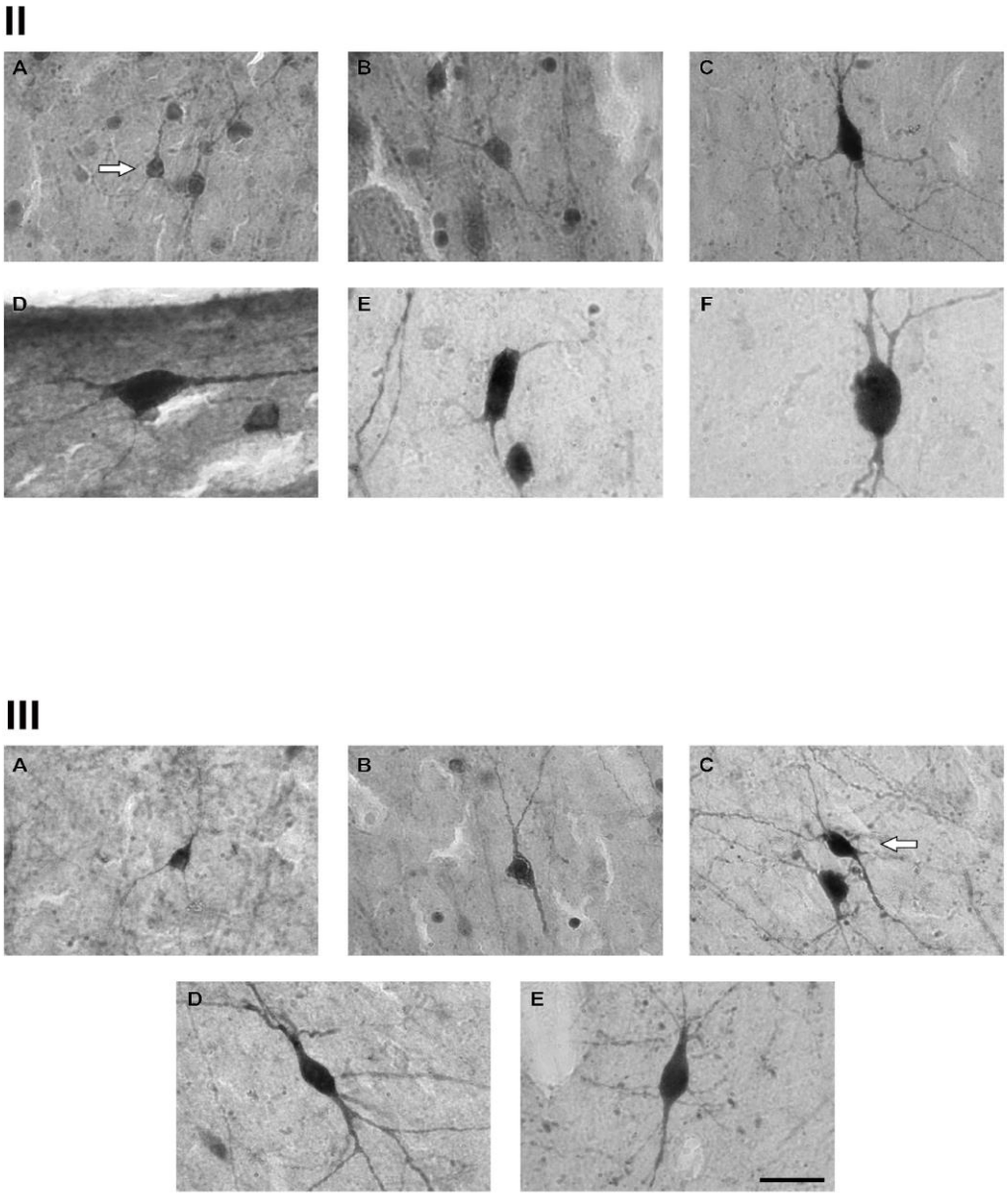


Figura 10: Fotografías de Interneuronas tomadas a 40X y observadas en las láminas II y III de la corteza supragenual, región anterior del giro del cíngulo en el humano. Cada foto corresponde a una neurona típica de cada uno de los clúster definidos para las láminas supragranulares del sector estudiado.
Lamina II: IIA – Clúster 1, Calretinina; IIB – Clúster 2, Calretinina; IIC – Clúster 3, Parvalbumina; IID – Clúster 4, Calbindina; IIE – Clúster 5, Parvalbumina; IIF – Clúster 6, Parvalbumina.
Lamina III: IIIA – Clúster 1, Calretinina; IIIB – Clúster 2, Calretinina; IIIC – Clúster 3, Parvalbumina; IIID – Clúster 4, Calbindina; IIIE – Clúster 5, Parvalbumina.

DISCUSIÓN

Organización citoarquitectónica de la corteza anterior del giro del cíngulo en el humano (área 24 supragenual).

La observación de la corteza cerebral de la parte anterior del giro del cíngulo, y en particular de la porción supragenual del área 24, permitió la identificación de características distintivas para este sector, dentro de las que se encuentran: la identificación de que se trata de una corteza de tipo disgranular debido al incipiente desarrollo de la lámina IV, el amplio espesor de la lámina III y su límite difuso con la lámina II. También la presencia de una lámina V con una subdivisión superficial y profunda (la primera más estrecha pero con mayor presencia celular que la segunda) y la existencia de una lámina VI bien desarrollada, con un espesor ligeramente superior al de la lámina V y con presencia de neuronas de distinto tipo. Dichas características coinciden con lo encontrado en estudios previos acerca de las características de dicho sector cortical (Palomero-Gallagher et al., 2008; Brent A. Vogt, Wiley, & Jensen, 1995).

En un estudio previamente realizado en el Centro de Estudios Cerebrales (Villalba Moreno, 2016), se encontraron valores que, aunque difieren de los reportados en esta investigación, evidencian la prominencia de las láminas infragranulares sobre las supragranulares en la región anterior del giro del cíngulo. Los datos de otro estudio previo también realizado por el Centro de Estudios Cerebrales (Ocampo-González, 2019) sobre el espesor cortical exhibido para las láminas supragranulares de áreas prefrontales en humano, encontró que sectores corticales como la región dorsolateral del área 9 y orbitofrontal de la 11 tienen láminas supragranulares con mayor tamaño que el encontrado en el presente estudio. Lo anterior tiene relación con la actividad propia del área 24, que tradicionalmente se ha catalogado como disgranular y efectora, mientras las áreas 9 y 11 han sido catalogadas como eulaminadas tipo 2 o predominantemente asociativas.

En el mismo sentido, estudios para el área 24a (Bouras, Kövari, Hof, Riederer, & Giannakopoulos, 2001) aunque se reportan valores significativamente diferentes para las láminas V y VI, persiste la tendencia encontrada en esta investigación para el mayor espesor cortical de las láminas infragranulares. De igual forma, en estudios que analizan el espesor cortical relativo del área 24b (Cotter, Mackay, Landau, Kerwin, & Everall, 2001), se encuentran valores que resultan similares al promedio encontrado para ambos hemisferios en el presente estudio (ver tabla de espesor Laminar y Cortical de la región anterior del cíngulo). Lo anterior resulta de especial interés para el análisis propio de esta investigación, ya que la muestra tomada corresponde a la superficie supragenual, la cual abarca las tres subdivisiones del área 24, permitiendo afirmar que aparte de las diferencias existentes en la sublaminación, es posible considerar que el patrón consistente para esta superficie es la presencia de un mayor espesor en las láminas infragranulares sobre las supragranulares.

La prominencia de láminas infragranulares en la parte anterior del giro del cíngulo, según el modelo de Barbas & Rempel-Clower (Barbas & Rempel-Clower, 1997) daría cuenta de la conexión de estas con láminas supragranulares de áreas de mayor desarrollo filogenético como aquellas más rostrales y dorsales en la misma superficie medial o las de la superficie dorsolateral (áreas 9 ó 10, por ejemplo). Lo anterior, sumado a que presenta una lámina V bien desarrollada y sublaminada, y además contiene las células giganto-piramidales similares a las células gigantes de Betz de la lámina V del área motora primaria, lo cual la catalogarían como efectora o ejecutora (Pauc & Young, 2010).

Lo anterior resulta de especial interés principalmente por las eferencias reconocidas para las láminas infragranulares (V y VI) hacia estructuras subcorticales y por la funcionalidad que se ha atribuido al área 24 en el proceso de integración entre las emociones y la cognición (Allman et al., 2001), además de su participación en la iniciación de la respuesta motora por las conexiones existentes con áreas motoras adyacentes (Morecraft & Tanji, 2009).

El estudio de Villalba-Moreno (2016), reporta un mayor espesor cortical total en la corteza del cíngulo derecha en comparación con la izquierda, aspecto que no se observó en esta investigación. Sin embargo, en los análisis realizados se encontraron algunas diferencias relacionadas con el espesor laminar especialmente por diferencias significativas en las láminas III y V. Estas diferencias resultan difíciles de contrastar con la literatura debido a que no existen estudios previos de análisis citomofológico de la corteza donde se observen asimetrías interhemisféricas de este tipo. Sin embargo, en algunos estudios que han utilizado resonancia magnética nuclear en individuos sanos para evaluar macroscópicamente la anatomía del giro del cíngulo, pese a que no se han realizado mediciones del espesor cortical sí se ha encontrado mayor volumen del hemisferio derecho en hombres (Yücel et al., 2001). Por otro lado, un estudio más reciente realizado por Wang y cols (J. Wang et al., 2013) desarrolló una división más precisa de la corteza anterior del cíngulo dorsal CACd (superior – alrededor del surco del cíngulo e inferior – alrededor del surco del cuerpo calloso) para la medición de la densidad de la sustancia gris. En esta investigación se encontró una asimetría significativa para cada región dependiendo del hemisferio: derecho > izquierdo en la parte inferior, izquierdo > derecho en la parte superior. No se encontraron diferencias por el sexo de los participantes.

Aunque en este estudio se considera que algunas de las diferencias encontradas pueden corresponder a un patrón de girificación específico y relacionado con los procesos de desarrollo de la parte anterior del cíngulo, es posible que las diferencias encontradas en los espesores laminares estén asociadas a las diferencias de conectividad y patrones de funcionalidad dados por las láminas estudiadas y el hemisferio correspondiente. Se considera que un mayor espesor indicaría la presencia de mayor cantidad de neuronas y de fibras o conexiones con otras estructuras, de manera que el patrón de conectividad requerido para la lámina III del hemisferio derecho, podría demandar un mayor contingente de fibras asociativas que facilitaran la integración de la información, mientras que la lámina V izquierda requeriría mayor conexión con estructuras subcorticales eferentes promoviendo la interface necesaria con los procesos efectores. Dicha lateralización

de las funciones se ha observado en estudios de estimulación cerebral profunda en la CCAd (Corteza del Cíngulo Anterior Dorsal) y exposición a tareas de presentación de objetos, respuesta motora y retroalimentación visual, en los que se ha encontrado frecuencias de activación claramente distintas para ambos hemisferios (Weiss et al., 2018). En este mismo estudio, el hemisferio izquierdo mostró activación ante la valencia de los resultados y los errores de predicción, mientras que el derecho participó en la formación de la predicción. Estos hallazgos confirman claramente la participación diferenciada de la corteza del cíngulo derecha e izquierda en procesos cognitivos complejos, la integración con información límbica y la preparación para la respuesta motora.

Interneuronas en áreas prefrontales

En cuanto al estudio de distribución de las neuronas que expresan cada CaBP en la corteza cerebral, investigaciones previas encuentran que la población de células inmunorreactivas para CR corresponden al 45-50% del total de las interneuronas Gabaérgicas (R Druga, 2009) y entre un 9 y 21% de la población total de neuronas de la corteza cerebral, constituyéndose en la mayor subpoblación de interneuronas de la corteza cerebral en el mamífero (Barinka & Druga, 2010). En la corteza prefrontal del macaco, estas corresponden a un 11% de la población neuronal total, predominando en la lámina II y en la parte superficial de la III (Gabbott & Bacon, 1996a).

En el humano se encuentra que existe una distribución mayoritaria de las células CR+ en láminas supragranulares para áreas auditivas primarias (Chiry et al., 2003), y en la corteza prefrontal medial corresponden al 8 % de la población neuronal total, siendo las láminas II y III las que presentan mayor densidad (Gabbott et al., 1997). En un estudio previo realizado por el Centro de Estudios Cerebrales (Gaitán, 2014), sobre la organización de las interneuronas corticales del área 10, también se encontró que las células CR+ son la subpoblación interneuronal predominante en las láminas supragranulares; dato igualmente encontrado en el presente estudio para la porción supragenual del área 24.

En cuanto a las células CB+, en el presente estudio encontramos que corresponden a la segunda subpoblación interneuronal con mayor densidad descrita después de las células CR+, lo que resulta congruente con lo referido para estudios de estas neuronas realizados en el área 10, donde se encuentra que se distribuyen mayoritariamente en las láminas II y III (Gaitán, 2014). De igual forma, en la corteza medial del macaco se ha encontrado una distribución similar a la reportada en este estudio, donde las células inmunorreactivas a CB se encuentran en las láminas II y III preferencialmente y disminuyen su densidad a medida que se acercan a la sustancia blanca subcortical (Gabbott & Bacon, 1996b) correspondiendo al 26% de la totalidad de interneuronas Gabaérgicas de la corteza cerebral (Gabbott & Bacon, 1996a).

Con relación a la distribución de neuronas PV+ en el presente estudio, se encontró que corresponde al menor número de interneuronas en las capas supragranulares del área 24, lo que es similar a los hallazgos en otras áreas corticales donde se ha observado una menor densidad de estas neuronas en dichas capas y una mayor densidad en las infragranulares (Gaitán, 2014; Ocampo-González, 2019). Estos hallazgos concuerdan con investigaciones realizadas en la corteza prefrontal de macacos y en mediciones de la densidad neuronal en el humano (Rastislav Druga, 2009).

Lo anterior permite concluir la existencia de un patrón de organización laminar de las distintas subpoblaciones de interneuronas que expresan las CaBPs para las láminas supragranulares del área 24, que no es distante de lo referido para otras áreas de la corteza cerebral, tanto en humanos como en otros primates. En dicho patrón predomina la presencia de mayor cantidad de células CR+, seguidas de las CB+ y finalmente las células PV+. Esta forma de organización laminar de las subpoblaciones de interneuronas en el área 24, permite suponer que las células CR+ y CB+ de las láminas supragranulares buscarían predominantemente una regulación de las aferencias que recibe la célula piramidal, más específicamente sobre las dendritas basales de células piramidales cuyo soma se encuentra en estas mismas capas y sobre las dendritas apicales de aquellas que atraviesan las capas

II-III pero cuyo soma se ubica en las V-VI, suponiendo un ejercicio dirigido a mantener una modulación a la baja de la información que procesan las neuronas piramidales de este sector cortical.

En relación con las variables citomorfológicas motivo de interés en nuestro estudio (número de procesos, tamaño y forma del soma), se explicarán los hallazgos de cada una en relación con otras áreas corticales prefrontales para posteriormente plantear una conclusión general de los hallazgos al respecto de dichas variables.

Con respecto al número de procesos, se encuentra que la distribución es lámino-específica y CaBP-específica, encontrándose que las subpoblaciones de interneuronas presentan un número de tres procesos para la lámina II, mientras que este número disminuye para la lámina III en las neuronas CR+ y CB+ a dos procesos, pero mantiene su cantidad para las neuronas PV+ (3). Lo anterior difiere de lo encontrado para las láminas supragranulares de las áreas 9 y 11, donde la organización de procesos depende de forma exclusiva de la subpoblación que expresa cada CaBPs y no de la lámina cortical, evidenciando un mayor número de procesos para las células PV+ (4 procesos), seguidas por las CB+ (3) y las CR+ con la menor cantidad (2) (Ocampo-González, 2019). En el área 10, si bien el mayor número de procesos sigue siendo de las células PV+, las células CR+ presentan mayor número de procesos que las CB+ (Gaitán, 2014), mientras en nuestra área, estas últimas dos subpoblaciones no mostraron diferencias significativas.

Al estudiar la forma del soma, en el presente estudio se encontró que existe mayor número de neuronas con somas de formas poligonales las cuales predominan en ambas láminas corticales analizadas sobre el resto de tipos morfológicos. Este hallazgo difiere de lo encontrado en estudios realizados en las áreas 9 y 11, donde existe predominio de formas esféricas y no se encuentran formas fusiformes (Ocampo-González, 2019).

En el área 10 se encontró una mayor cantidad de neuronas con formas poligonales y fusiformes para las células CR+ y CB+, mientras que las formas esféricas corresponden a las células PV+, hallándose una correspondencia entre la forma del

soma y la CaBP expresada por las interneuronas (Gaitán, 2014). Esto coincide parcialmente con lo observado en nuestro estudio, donde predominaron las formas poligonales del soma entre las células inmunorreactivas a CR y CB. Si bien en el presente estudio se presentaron pocas formas esféricas en las células PV+, se considera que este tipo celular tiende a mantener una forma multipolar como la descrita en la literatura (DeFelipe, 2002; Rastislav Druga, 2009).

En nuestra investigación, la variable tamaño del soma reportó ser mayor para las neuronas PV+ respecto de las otras subpoblaciones, aspecto similar a lo encontrado por otros estudios para las áreas prefrontales 9, 10, 11 y 46 (Gabriel Arteaga, Efrain Buritica, Martha Isabel Escobar, 2015; Gaitán, 2014; Ocampo-González, 2019). Lo anterior parece correlacionarse con la variable número de procesos, ya que se encuentra que las células PV+ también presentan la mayor cantidad de procesos primarios, lo cual podría estar en consonancia con una mayor demanda metabólica por un espacio de acción local mucho más amplio y el disparo de tipo *fast-spiking* no adaptable de este tipo neuronal (Kubota, Karube, Nomura, & Kawaguchi, 2016; Rotaru et al., 2015).

Para el área 10 se encuentra que existe un aumento significativo del soma de la lámina II a la III para las tres subpoblaciones de interneuronas estudiadas (Gaitán, 2014), aspecto que para nuestra región cortical estudiada, solo se encontró en las células CB+ que aumentaron su tamaño de la lámina II a la III. En general, para la corteza supragenual del giro del cíngulo las tres subpoblaciones tienen variaciones de tamaño de acuerdo con la lámina donde se ubican, existiendo una relación inversamente proporcional entre densidad y tamaño: mientras aumentan su tamaño disminuyen su densidad.

Los tamaños del soma neuronal registrados en este estudio son similares a los reportados para las áreas prefrontales 9, 10 y 11 (Gaitán, 2014; Ocampo-González, 2019), donde predominan tamaños pequeños y medianos para la mayoría de las células estudiadas. Sin embargo, el tamaño de las neuronas del área 24 supragenual tiende a ser más grande que en esas otras áreas, sugiriendo que,

aunque existe un proceso de inhibición local para la CCA, este podría ser mayor que en las otras áreas.

Al respecto del análisis de las variables citomorfológicas en la corteza supragenual del cíngulo anterior es posible concluir que el número de procesos permite plantear un patrón de inhibición específico y diferenciado, donde existiría mayor participación de la modulación de aferencias por parte de células inmunorreactivas a CR y CB, mientras que las células PV+ participarían de forma diferente en un proceso de regulación más potente, en este caso de las eferencias de la célula piramidal. La forma y tamaño del soma (poligonal y gran tamaño, respectivamente) puede relacionarse con el tipo de información que es procesada en láminas supragranulares del A24 que correspondería a información de egreso o salida hacia otras regiones corticales, requiriendo más inhibición a nivel local, diferenciada, intracolumnar e intralaminar, con requerimientos de integración de información transcolumnar y translaminar.

Patrones de organización de las interneuronas en láminas supragranulares de la región anterior del giro del cíngulo en el humano (área 24) a partir de criterios citomorfológicos

Los resultados evidencian que se encuentra un perfil para cada subpoblación de interneuronas estudiada de acuerdo con los criterios descritos en cuanto a densidad, forma, tamaño y número de procesos. En el caso de las células CR+ tienden a ser las más abundantes en ambas láminas, aspecto que es congruente con lo encontrado en otros estudios (Nimchinsky et al., 1997). Sin embargo, se observa una morfología y tamaño del soma diverso, existiendo predominancia de gran cantidad de células pequeñas con formas poligonales las cuales tienen apariencia “tripolar” como la referida por Gabbott y cols en su estudio del área 24 (Gabbott et al., 1997). Estas células incrementan su tamaño sin dejar de pertenecer a la categoría de células pequeñas, pero mantienen su forma constituyéndose en células tripolares.

Es importante considerar el incremento del tamaño del soma y el cambio en la morfología que presentan algunas de las células CR+ de la lámina II a la III, de manera que se convierten en células medianas y con forma ovoide, correspondiendo a la morfología típica de las neuronas bipolares (Rastislav Druga, 2009; Markram, H., Toledo-Rodriguez, M., Wang, Y., Gupta, A., Silberberg, G., And Wu, 2004). Dichas neuronas estarían ejerciendo procesos de regulación inhibitoria en ambas láminas, específicamente en la lámina III y por su aumento de tamaño posiblemente estarían ejerciendo inhibición intercolumnar y translaminar, en este sector. Este tipo de inhibición se considera menos frecuente que la propuesta inicialmente para las neuronas CR+ de menor tamaño, debido a la disminución en la densidad de este subtipo neuronal.

Con respecto a las neuronas CB+, las cuales constituyen el segundo grupo de interneuronas en cantidad, estas mantuvieron una apariencia similar en cuanto a forma y tamaño del soma que las inmunorreactivas para CR, principalmente para la lámina II. Este tipo celular es similar al referido en la literatura en algunos estudios que lo describen con un soma multipolar y disposición de los procesos en sentido horizontal (Barinka & Druga, 2010; Caputi, Rozov, Blatow, & Monyer, 2009) y puede corresponder a células neurogliaformes o de Martinotti, las cuales se han referido con un patrón de inhibición mucho menos fuerte por sus características fisiológicas de disparo *late spiking* (Kawaguchi, 1995). Existe otro tipo neuronal de células CB+ que corresponden a interneuronas de las láminas II y III, las células bipenachadas y en *doble bouquet*, que presentan una disposición vertical con dos extremos de los cuales emergen los procesos. Con respecto a los procesos, estos tienden a incrementar en la lámina II pero se mantienen estables para la lámina III. Lo anterior permite considerar que predomina en este tipo de células un tipo de inhibición intracolumnar e intralaminar para la regulación de la información procesada a nivel de cada módulo similar al ejercido por las células CR+.

Diversos autores han propuesto un arreglo microcircuital para la inhibición establecida por las células CR y CB+ el cual es aplicable a lo encontrado en la presente investigación (Javier DeFelipe, 1999, 2002b; Del Río & DeFelipe, 1996;

Meskenaite, 1997). En estos estudios se propone que la inhibición establecida por las células CR y CB+ puede estar dirigida a las células piramidales u otras interneuronas. En el caso de la actual investigación, se considera que en la lámina II la inhibición puede estar dirigida hacia dos tipos de blanco sináptico: las dendritas apicales de las células piramidales, y otras células CB+. En el primer caso es posible que exista un proceso de inhibición local de las aferencias excitatorias características de la neurona piramidal y en el segundo caso se propone la desinhibición indirecta de la piramidal, al ejercer acción local sobre la interneurona CB+ que a su vez inhibiría directamente a la piramidal.

Con respecto a lo referido por autores como Del Rio y DeFelipe (Defelipe et al., 2015; J DeFelipe, 1997; Del Río & DeFelipe, 1996) en torno a los arreglos microcircuitales que se pueden aplicar a los hallazgos de la presente investigacion para la lámina III, es posible considerar que el blanco característico de las células CR+ serían directamente las dendritas basales de la neurona piramidal para modular su actividad, al mismo tiempo que inhiben a las neuronas CB+ quienes a su vez inhiben también a la piramidal; y así lograr finalmente y de forma simultánea, un efecto inhibitorio (con contactos directos) y desinhibitorio (con contactos indirectos) sobre la neurona principal. De esta manera, es posible proponer que la participación de las neuronas CR+ estaría orientada a generar un proceso de inhibición local, pequeño y circunscrito en las láminas II y III a las células piramidales, mientras que el efecto hacia las interneuronas CB+ aunque continúa siendo local y circunscrito sería más tendiente a ejercer inhibición hacia otras interneuronas Gabaérgicas. La mayor cantidad de neuronas CR+ en la lámina II podría asociarse a una mayor participación inhibitoria en este sector, principalmente para la regulación de la actividad en las dendritas apicales de las células piramidales provenientes de láminas más profundas.

Con respecto a la morfología característica de las neuronas inmunorreactivas a CB, en la lámina II se observa un predominio de somas poligonales con varios procesos, aspecto que también se presenta para la lámina III. En esta lámina, adicionalmente se presenta un agregado de células CB+ que incrementan su tamaño y modifican

su forma a ovalada, sin llegar a constituir un subgrupo neuronal tan numeroso como el referido previamente. Teniendo en cuenta la actividad microcircuital propuesta por algunos autores para las células CB+ (Defelipe et al., 2015; J DeFelipe, 1997; Javier DeFelipe, 2002a) es posible que existan dos posibles efectos de estas células: por un lado, generarían un papel inhibitorio local para la célula piramidal de la lámina III, especialmente en las dendritas apicales de estas neuronas y además, se considera que podrían participar de los procesos de desinhibición “indirecta” a la piramidal al inhibir las interneuronas que generan excitación de las células piramidales. De otro lado, las neuronas que incrementan su tamaño y presentan morfología ovalada para la lámina III podrían corresponden a neuronas bipenachadas o *doble bouquet* (Druga, 2009; Hof et al., 1999), con procesos que se extienden verticalmente a lo largo de varias láminas corticales, regulando la actividad translaminar e intracolumnar.

En cuanto a las neuronas PV+ que se observaron en menor cantidad en ambas láminas, pero de mayor tamaño somático respecto de las otras dos subpoblaciones, en la lámina II predominaron las formas poligonales de tamaño pequeño y mediano con tres procesos e incrementaron su tamaño y pasaron de poligonales a ovoides hacia la lámina III, constituyendo la morfología característica de las células en cesta y en candelabro (Rastislav Druga, 2009; Markram, H., Toledo-Rodriguez, M., Wang, Y., Gupta, A., Silberberg, G., And Wu, 2004). Esta subpoblación, se considera estarían generando una fuerte inhibición y regulación de las eferencias de la célula piramidal por el contacto que realizan al soma y al segmento proximal del axón y por presentar un modo de disparo *fast-spiking*. Dado que estos tipos morfológicos de interneuronas despliegan su ramificación axonal en forma horizontal predominantemente, se considera que estarían ejerciendo regulación de las eferencias piramidales intralaminarmente. Esta regulación podría ser intracolumnar para aquellas de soma pequeño (las cuales predominan) y transcolumnar para aquellas de soma mediano y grande, en el entendido que el tamaño del soma está correlacionado con la extensión de la ramificación axonal. La participación planteada para las células PV+ es mucho más relevante para la lámina III que presenta una mayor densidad de estas neuronas en comparación con la lámina II.

Se plantea entonces que el rol de las interneuronas en las láminas supragranulares del área 24 supragenual, correspondería a un patrón predominantemente inhibitorio en sentido intracolumnar derivado de la acción local o específica de las células bipolares y bipenachadas CR+ y CB+, encargadas de generar efecto modulatorio de las aferencias a la célula piramidal. Y de forma complementaria, las células PV+ estarían generando procesos de regulación de las eferencias de la neurona piramidal intralaminar e intracolumnarmente hacia otras regiones corticales, lo cual permite proponer una actividad de segregación de la información procesada en cada módulo a partir de la interacción inhibitoria de los distintos tipos celulares que expresan cada CaBP.

Dicha actividad propuesta para el circuito de control inhibitorio en las láminas supragranulares de la porción supragenual del área 24, resulta ser importante en términos de la conectividad que caracteriza este sector a nivel cortical. Su localización le confiere un papel importante en la confluencia de información cognitiva y límbica; principalmente su conexión con el área 25 y la corteza orbitofrontal, para la integración de contenido emocional necesario para la activación del sistema autónomo y para la toma de decisiones respectivamente (Seeley et al., 2007; Vogt A et al., 1992). De igual manera, este sector también estaría enviando información a estructuras de la superficie posterior de la corteza del cíngulo para generar activación de sectores necesarios para la resolución de tareas que implican activación sensorial de distintas modalidades (Margulies et al., 2007). En términos de conectividad, este sector tiene aferencias de sectores límbicos que también participarían en el procesamiento de información emocional, necesaria para los procesos de memoria y ubicación espacial (Beckmann et al., 2009; Seeley et al., 2012).

Según el modelo de Barbas y Rempel-Clower (Barbas & Rempel-Clower, 1997), la conectividad de láminas supragranulares que se genera en áreas disgranulares de menor nivel de desarrollo filogenético (como la superficie supragenual del cíngulo), genera eferencias a áreas de mayor nivel de desarrollo filogenético como las áreas prefrontales dorsolaterales (Seeley, 2019) principalmente hacia sus capas

infragranulares. Lo anterior resulta importante en torno al rol de la superficie supragenual del cíngulo en el procesamiento de la información segregada hacia sectores dorsolaterales (áreas 8, 9, 46) para la activación de información requerida en la ejecución de las tareas y la respuesta efectiva a las demandas de las mismas.

Con los hallazgos del presente estudio y la discusión previamente planteada de los mismos, proponemos el siguiente patrón de organización de las subpoblaciones de interneuronas de las láminas supragranulares alrededor de la neurona piramidal, en la corteza supragenual del giro del cíngulo, que se sintetiza en la siguiente figura:

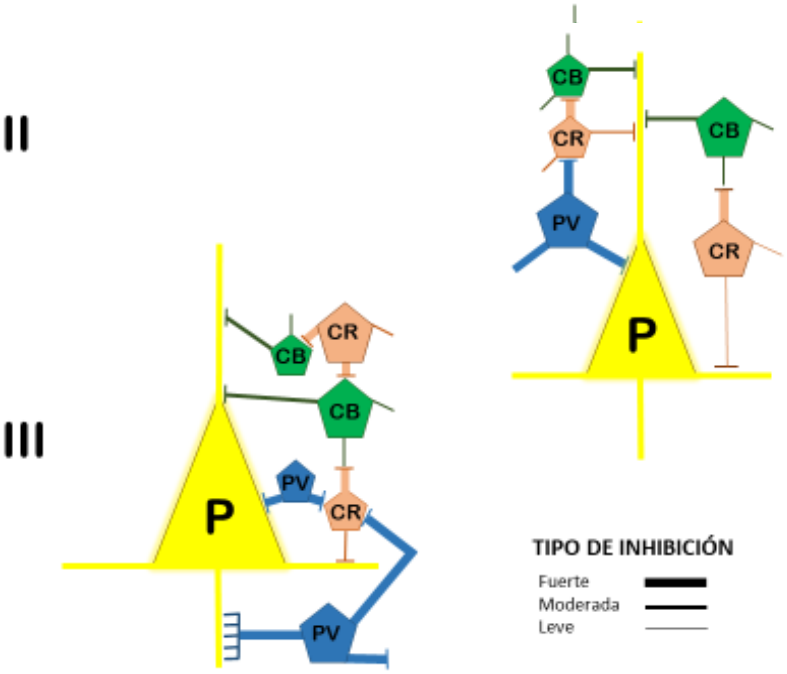


Figura 11: Propuesta de Perfil inhibitorio que caracteriza a las interneuronas de la región supragenual de láminas supragranulares de la corteza anterior del giro del cíngulo en el humano. La grafica resume los procesos de inhibición propuestos para la región supragenual del giro del cíngulo: la célula Piramidal (P) tiene color amarillo, y las CaBPs se grafican de acuerdo a las formas encontradas en la investigación con distintos colores CB (Calbindina) verde, CR (Calretinina), PV (Parvalbumina). Además, se proponen los tipos de inhibición realizadas por cada una de las interneuronas: fuerte, moderada, leve.

Los hallazgos de este estudio sugieren que el área 24 supragenual, en sus láminas supragranulares, generaría un circuito inhibitorio de regulación de las aferencias predominantemente para la lámina II (por la participación de células CR+ y CB+), y

de las eferencias para la lámina III (incluyendo células PV+). Dicho circuito estaría específicamente centrado en la realización de análisis sectorizado a nivel intracolumnar, segregando información de un solo tipo de forma particular. Dicha información posteriormente sería enviada hacia otros sectores corticales, entre estos algunos de mayor desarrollo filogenético como las cortezas dorsolaterales para favorecer las actividades ejecutivas y hacia sectores de límbicos para favorecer el procesamiento de información emocional.

Limitaciones del estudio

- El tamaño de la muestra comprende tejido postmortem de 8 hombres, sin inclusión de tejido proveniente de mujeres, lo cual permitiría estudiar diferencias entre sexos relacionadas con la actividad propia del sector estudiado. La recolección de la muestra para tejido postmortem proveniente de mujeres no fue posible debido a situaciones socioculturales de la ciudad, donde se encuentra mayor cantidad de individuos hombres que mueren a causa de fenómenos violentos, lo cual dificulta la adquisición de dichas muestras.
- Es posible que en futuros estudios sea necesario ampliar la muestra incluyendo un número mayor de sujetos estudiados que permita a su vez la obtención de mayor cantidad de segmentos corticales y por ende mayor número de neuronas analizadas. Esto con el fin de encontrar una mayor diversidad en las células analizadas que permita una mayor comprensión de la microcircuitería del sector. Sin embargo, el número de neuronas analizadas morfológicamente (574), estadísticamente representa una cantidad adecuada para la realización de análisis.
- En investigaciones futuras es posible incluir el uso de técnicas de 3D para el análisis morfométrico de las neuronas con el fin de definir con mayor precisión variables de forma, tamaño y numero de procesos. En el presente estudio solo fue posible utilizar la técnica en 2D, la cual resultó importante para definir las variables mencionadas previamente.

- El conocimiento previamente adquirido en cuanto a la morfología característica de las interneuronas permitió asumir en el presente estudio la marcación de neuronas CB, CR y PV, como aquellas neuronas objeto de esta investigación. En futuras investigaciones es pertinente incluir métodos que permitan la comprobación de estas marcaciones como interneuronas gabaérgicas teniendo mayor certeza de las neuronas estudiadas.

CONCLUSIONES

- La corteza supragenual del giro del cíngulo presenta características ya referidas en la literatura como una región disgranular y predominantemente efectora por la mayor dimensión y densidad neuronal de capas infragranulares.
- No se encontraron asimetrías interhemisféricas en la densidad de las subpoblaciones de interneuronas así como en las características citomorfológicas estudiadas en estas.
- Existe un patrón citomorfológico distintivo de las subpoblaciones de interneuronas en la superficie supragenual del giro del cíngulo, donde aquellas CR+ y CB+ tienden a mantener formas poligonales y tamaños pequeños y medianos.
- Sus células PV+, al igual que en otras áreas prefrontales, presentan el mayor tamaño y tienden a presentar forma poligonal.
- Es posible plantear la existencia de un circuito inhibitorio característico de la corteza supragenual del giro del cíngulo, donde predomina la modulación de aferencias a la célula piramidal por parte de células CR+ y CB+ en la lámina II. Dicho patrón se conserva en la lámina III, pero con mayor participación de neuronas PV+ para la regulación de eferencias de la neurona piramidal.
- Este circuito inhibitorio permitiría la segregación de información a nivel intralaminar y transcolumnar, modulando la información a nivel local antes de ser enviada a regiones corticales de mayor nivel de integración y desarrollo filogenético.
- En este circuito también se daría regulación translaminar e intracolumnar por la presencia de neuronas de formas fusiformes (bipolares y bipenachadas), que ejercerían integración de distintos tipos de información, como complemento de la modulación previamente descrita.

- Este trabajo realiza aportes a la comprensión de la microcircuitería inhibitoria característica de la región supragenual de láminas supragranulares de la corteza anterior del giro del cíngulo en el humano, aspecto implicado en

actividades tan importantes como la atención y la integración de funciones emocionales y cognitivas.

REFERENCIAS

Adorjan, I., Ahmed, B., Feher, V., Torso, M., Krug, K., Esiri, M., Szele, F. G. (2017). Calretinin interneuron density in the caudate nucleus is lower in autism spectrum disorder. *Brain*, *140*(7), 2028–2040. https://doi.org/10.1093/brain/awx131

Allman, J. M., Hakeem, A., Erwin, J. M., Nimchinsky, E., & Hof, P. (2001). The anterior cingulate cortex: The evolution of an interface between emotion and cognition. In A. R. Damasio, A. Harrington, J. Kagan, B. S. McEwen, H. Moss, & R. Shaikh (Eds.), *Unity of knowledge: The convergence of natural and human science* (pp. 107–117). New York Academy of Sciences.

Ascoli GA, et al. (2008). Petilla terminology: nomenclature of features of GABAergic interneurons of the cerebral cortex. *Neuroscience*, *9(7)*, 557-568. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2868386/

Baker, C. M., Burks, J. D., Briggs, R. G., Stafford, J., Conner, A. K., Glenn, C. A., … Sughrue, M. E. (2018). A Connectomic Atlas of the Human Cerebrum-Chapter 4: The Medial Frontal Lobe, Anterior Cingulate Gyrus, and Orbitofrontal Cortex. *Operative Neurosurgery (Hagerstown, Md.)*, *15*(1), S122–S174. https://doi.org/10.1093/ons/opy257

Barbas, H., & Rempel-Clower, N. (1997). Cortical structure predicts the pattern of corticocortical connections. *Cerebral Cortex*, *7*(7), 635–646. https://doi.org/10.1093/cercor/7.7.635

Barinka, F., & Druga, R. (2010). Calretinin expression in the mammalian neocortex: A review. *Physiological Research*, *59*(5), 665–677.

Bastianelli, E. (2003). Distribution of calcium-binding proteins in the cerebellum. *Cerebellum*, *2*(4), 242–262. https://doi.org/10.1080/14734220310022289

Beckmann, M., Johansen-Berg, H., & Rushworth, M. F. S. (2009). Connectivity-

Based Parcellation of Human Cingulate Cortex and Its Relation to Functional Specialization. *Journal of Neuroscience*, *29*(4), 1175–1190. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3328-08.2009

Behrens, T. E. J., Woolrich, M. W., Walton, M. E., & Rushworth, M. F. S. (2007). Learning the value of information in an uncertain world, *10*(9), 1214–1221. https://doi.org/10.1038/nn1954

Berggård, T., Miron, S., Önnerfjord, P., Thulin, E., Akerfeldt, K. S., Enghild, J. J., … Linse, S. (2002). Calbindin D28k exhibits properties characteristic of a Ca2+ sensor. *Journal of Biological Chemistry*, *277*(19), 16662–16672. https://doi.org/10.1074/jbc.M200415200

Blanchard, T. C., & Hayden, B. Y. (2014). Neurons in dorsal anterior cingulate cortex signal postdecisional variables in a foraging task. *Journal of Neuroscience*, *34*(2), 646–655. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3151-13.2014

Blatow, M., Caputi, A., Burnashev, N., Monyer, H., & Rozov, A. (2003). Ca2+ buffer saturation underlies paired pulse facilitation in calbindin-D28k-containing terminals. *Neuron*, *38*(1), 79–88. https://doi.org/10.1016/S0896-6273(03)00196-X

Botvinick, M. M. (2007). Conflict monitoring and decision making: Reconciling two perspectives on anterior cingulate function. *Cognitive, Affective, & Behavioral Neuroscience*, *7*(4), 356–366.

Bouras, C., Kövari, E., Hof, P. R., Riederer, B. M., & Giannakopoulos, P. (2001). Anterior cingulate cortex pathology in schizophrenia and bipolar disorder. *Acta Neuropathologica*, *102*(4), 373–379. https://doi.org/10.1007/s004010100392

Brend A, Vogt; Palomero Gallagher, N., Vogt, B. A., Nimchinsky, E. A., Vogt, L. J., & Hof, P. R. (2012). Chapter 25 - Cingulate Cortex. In Paxinos (Ed.), *Mai, Jürgen K. G. B. T.-T. H. N. S.* (Third E., Vol. 359, pp. 943–987). San Diego: Academic Press. https://doi.org/10.1002/cne.903590310

Brodmann, K. (1909). Vergleichende Lokalisationslehre der Grosshirnrinde in ihren Prinzipien dargestellt auf Grund des Zellenbaues. *Leipzig: Barth*.

Caputi, A., Rozov, A., Blatow, M., & Monyer, H. (2009). Two calretinin-positive gabaergic cell types in layer 2/3 of the mouse neocortex provide different forms of inhibition. *Cerebral Cortex*, *19*(6), 1345–1359. https://doi.org/10.1093/cercor/bhn175

Chiry, O., Tardif, E., Magistretti, P. J., & Clarke, S. (2003). Patterns of calcium-binding proteins support parallel and hierarchical organization of human auditory areas. *European Journal of Neuroscience*, *17*(2), 397–410. https://doi.org/10.1046/j.1460-9568.2003.02430.x

Cotter, D., Landau, S., Beasley, C., Stevenson, R., Chana, G., MacMillan, L., & Everall, I. (2002). The density and spatial distribution of GABAergic neurons, labelled using calcium binding proteins, in the anterior cingulate cortex in major depressive disorder, bipolar disorder, and schizophrenia. *Biological Psychiatry*, *51*(5), 377–386. https://doi.org/10.1016/S0006-3223(01)01243-4

Cotter, D., Mackay, D., Landau, S., Kerwin, R., & Everall, I. (2001). Reduced glial cell density and neuronal size in the anterior cingulate cortex in major depressive disorder. *Archives of General Psychiatry*, *58*(6), 545–553. https://doi.org/10.1001/archpsyc.58.6.545

DeFelipe, J. (1999). Chandelier cells and epilepsy. *Brain*, *122*(10), 1807–1822. https://doi.org/10.1093/brain/122.10.1807

DeFelipe, J. (2002). Chapter 17 Cortical interneurons: from Cajal to 2001. *Progress in Brain Research*, *136*, 215–238. https://doi.org/doi.org/10.1016/S0079-6123(02)36019-9

Druga, R. (2009). Review Article Neocortical Inhibitory System. *Cell*, *217*(January 2009), 201–217.

Druga, Rastislav. (2009). Neocortical inhibitory system. *Folia Biologica*, *55*(6), 201–

217.

Ferguson, B. R., & Gao, W. J. (2018). Pv interneurons: critical regulators of E/I balance for prefrontal cortex-dependent behavior and psychiatric disorders. *Frontiers in Neural Circuits*, *12*(May), 1–13. https://doi.org/10.3389/fncir.2018.00037

Fiehler, K., Ullsperger, M., & Von Cramon, D. Y. (2004). Neural correlates of error detection and error correction: is there a common neuroanatomical substrate? *European Journal of Neuroscience*, *19*(11), 3081–3087. https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.0953-816X.2004.03414.x

Freund, T. F., & Katona, I. (2007). Perisomatic Inhibition. *Neuron*, *56*(1), 33–42. https://doi.org/10.1016/j.neuron.2007.09.012

Gabbott, P. L. A., & Bacon, S. J. (1996a). Local circuit neurons in the medial prefrontal cortex (areas 24a,b,c, 25 and 32) in the monkey: I. Cell morphology and morphometrics. *Journal of Comparative Neurology*, *364*(4), 567–608. https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-9861(19960122)364:4<567::AID-CNE1>3.0.CO;2-1

Gabbott, P. L. A., & Bacon, S. J. (1996b). Local circuit neurons in the medial prefrontal cortex (areas 24a,b,c, 25 and 32) in the monkey. *Jornal of Comparative Neurology*, *364*, 609–636.

Gabbott, P. L. A., Jays, P. R. L., & Bacon, S. J. (1997). Calretinin neurons in human medial prefrontal cortex (areas 24a,b,c, 32', and 25). *Journal of Comparative Neurology*, *381*(4), 389–410. https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-9861(19970519)381:4<389::AID-CNE1>3.0.CO;2-Z

Arteaga, G., Buriticá, E., Escobar, M.I., Pimienta, H. (2015). Human prefrontal layer II interneurons in areas 46, 10 and 24 Interneuronas. *Colombia Médica*, *46*. https://doi.org/10.25100/cm.v48i4.3662

Gaitan, O. L. (2014). *Estudio Citomorfológico de las Interneuronas del Área 10*

orbital de la Corteza Prefrontal Humana (Tesis de Maestría, Universidad del Valle). Biblioteca Universidad del Valle.

Grafton, S. T., Macrae, C. N., Mason, M. F., Norton, M. I., Horn, J. D. Van, Wegner, D. M., … Macrae, C. N. (2007). Wandering minds: Stimulus-independent thought. *Science*, *315*(January), 393–395. https://doi.org/10.1126/science.1131295

Heizmann, C. W. (2019). Calcium-Binding Proteins of the EF-Hand Superfamily, From Basics to Medical Applications. New York, USA: Humana Press. Recuperado de https://link.springer.com/book/10.1007%2F978-1-4939-9030-6#about

Helmchen, C. (2005). The anterior cingulate cortex contains distinct areas dissociating external from self-administered painful stimulation: a parametric fMRI study, *114*, 347–357. https://doi.org/10.1016/j.pain.2004.12.036

Hof, P. R., Glezer, I. I., Condé, F., Flagg, R. A., Rubin, M. B., Nimchinsky, E. A., et al. (1999). Cellular distribution of the calcium-binding proteins parvalbumin, calbindin and calretinin in the neocortex of mammals: phylogenetic and developmental patterns. *J. Chem. Neuroanat.*, *16*, 77–116. https://doi.org/doi: 10.1016/s0891- 0618(98)00065-9.

Hof, P. R., Glezer, I. I., Condé, F., Flagg, R. A., Rubin, M. B., Nimchinsky, E. A., & Vogt Weisenhorn, D. M. (1999). Cellular distribution of the calcium-binding proteins parvalbumin, calbindin, and calretinin in the neocortex of mammals: Phylogenetic and developmental patterns. *Journal of Chemical Neuroanatomy*, *16*(2), 77–116. https://doi.org/10.1016/S0891-0618(98)00065-9

Hoffstaedter, F., Grefkes, C., Zilles, K., & Eickhoff, S. B. (2013). The “what” and “when” of self-initiated movements. *Cerebral Cortex*, *23*(3), 520–530. https://doi.org/10.1093/cercor/bhr391

Holroyd, C. B., & Coles, M. G. H. (2014). The Neural Basis of Human Error Processing: Reinforcement Learning, Dopamine, and the Error-Related

Negativity. *Psychological Review*, (November 2002), 679–709. https://doi.org/10.1037/0033-295X.109.4.679

Holroyd, C. B., Nieuwenhuis, S., Yeung, N., Nystrom, L., Mars, R. B., Coles, M. G. H., & Cohen, J. D. (2004). Dorsal anterior cingulate cortex shows fMRI response to internal and external error signals. *Nature Neuroscience*, *7*(5), 497–498. https://doi.org/10.1038/nn1238

Ishida, H., & Vogel, H. J. (2013). EF-Hand Proteins. *Encyclopedia of Metalloproteins*, 766–775. https://doi.org/10.1007/978-1-4614-1533-6_51

Ito, S., Stuphorn, V., Brown, J. W., & Schall, J. D. (2003). Performance Monitoring by the Anterior Cingulate Cortex During Saccade Countermanding, *302*(October), 120–123.

Jackson, R. L., Hoffman, P., Pobric, G., & Lambon Ralph, M. A. (2016). The Semantic Network at Work and Rest: Differential Connectivity of Anterior Temporal Lobe Subregions. *The Journal of Neuroscience*, *36*(5), 1490–1501. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2999-15.2016

Kawaguchi, Y. (1995). Physiological subgroups of nonpyramidal cells with specific morphological characteristics in layer II/III of rat frontal cortex. *Journal of Neuroscience*, *15*(4), 2638–2655. https://doi.org/10.1523/jneurosci.15-04-02638.1995

Kawaguchi, Y., & Kondo, S. (2002). Parvalbumin, somatostatin and cholecystokinin as chemical markers for specific GABAergic interneuron types in the rat frontal cortex. *Journal of Neurocytology*, *31*(3-5 SPEC. ISS.), 277–287. https://doi.org/10.1023/A:1024126110356

Kawaguichi, Y., & Kubota, Y. (1997). GABAergic cell subtypes and their synaptic connections in rat frontal cortex. *Cerebral Cortex*, (7), 476–486.

Kirmse, K., Dvorzhak, A., Henneberger, C., Grantyn, R., & Kirischuk, S. (2007). Cajal-Retzius cells in the mouse neocortex receive two types of pre- and

postsynaptically distinct GABAergic inputs. *Journal of Physiology*, *585*(3), 881–895. https://doi.org/10.1113/jphysiol.2007.145003

Kirsch, P., Schienle, A., Stark, R., Sammer, G., Blecker, C., Walter, B., … Vaitl, D. (2003). Anticipation of reward in a nonaversive differential conditioning paradigm and the brain reward system: An event-related fMRI study. *NeuroImage*, *20*(2), 1086–1095. https://doi.org/10.1016/S1053-8119(03)00381-1

Kisvárday, Z. F. (1992). Chapter 18 GABAergic networks of basket cells in the visual cortex. *Progress in Brain Research*, *90*(C), 385–405. https://doi.org/10.1016/S0079-6123(08)63623-7

Kojetin, D. J., Venters, R. A., Kordys, D. R., Thompson, R. J., Kumar, R., & Cavanagh, J. (2006). Structure, binding interface and hydrophobic transitions of Ca 2+-loaded calbindin-D28K. *Nature Structural and Molecular Biology*, *13*(7), 641–647. https://doi.org/10.1038/nsmb1112

Kolling, N., Behrens, T. E. J., Wittmann, M. K., & Rushworth, M. F. S. (2016). ScienceDirect Multiple signals in anterior cingulate cortex. *Current Opinion in Neurobiology*, *37*, 36–43. https://doi.org/10.1016/j.conb.2015.12.007

Krieger-Redwood, K., Jefferies, E., Karapanagiotidis, T., Seymour, R., Nunes, A., Ang, J. W. A., Smallwood, J. (2016). Down but not out in posterior cingulate cortex: Deactivation yet functional coupling with prefrontal cortex during demanding semantic cognition. *NeuroImage*, *141*, 366–377. https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2016.07.060

Krishnamurthy, P., Silberberg, G., & Lansner, A. (2012). A Cortical Attractor Network with Martinotti Cells Driven by Facilitating SynapsesNo Title. *PLoS ONE*, *7*(4). https://doi.org/10.1371/journal.pone.0030752

Kubota, Y., Karube, F., Nomura, M., & Kawaguchi, Y. (2016). The diversity of cortical inhibitory synapses. *Frontiers in Neural Circuits*, *10*(APR), 1–15. https://doi.org/10.3389/fncir.2016.00027

Lewis, D. A., Curley, A. A., Glausier, J. R., & Volk, D. W. (2012). Cortical parvalbumin interneurons and cognitive dysfunction in schizophrenia. *Trends in Neurosciences*, *35*(1), 57–67. https://doi.org/10.1016/j.tins.2011.10.004

Maciag, D., Hughes, J., O'Dwyer, G., Pride, Y., Stockmeier, C. A., Sanacora, G., & Rajkowska, G. (2010). Reduced Density of Calbindin Immunoreactive GABAergic Neurons in the Occipital Cortex in Major Depression: Relevance to Neuroimaging Studies. *Biological Psychiatry*, *67*(5), 465–470. https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2009.10.027

MacLean, P. D. (1993). Perspectives on Cingulate Cortex in the Limbic System. In Brent A. Vogt & M. Gabriel (Eds.), *Neurobiology of Cingulate Cortex and Limbic Thalamus A Comprehensive Handbook* (1st ed., pp. 1–19). Boston: Birkhauser. https://doi.org/10.1007/978-1-4899-6704-6

Margulies, D. S., Kelly, A. M. C., Uddin, L. Q., Biswal, B. B., Castellanos, F. X., & Milham, M. P. (2007). Mapping the functional connectivity of anterior cingulate cortex. *NeuroImage*, *37*(2), 579–588. https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2007.05.019

Marilley, D., & Schwaller, B. (2000). Association between the calcium-binding protein calretinin and cytoskeletal components in the human colon adenocarcinoma cell line WiDr. Experimental Cell Research, 259(1), 12–22. https://doi.org/10.1006/excr.2000.4942

Marin-padilla, M. (1969). Origin of the Pericellular Baskets of the pyramidal Cells of the human motor cortex: A golgi study, *14*, 633–646.

Markram, H., Toledo-Rodriguez, M., Wang, Y., Gupta, A., Silberberg, G., And Wu, C. (2004). Interneurons of the neocortical inhibitory system. *Nat. Rev. Neurosci*, *5*, 793–807. https://doi.org/doi: 10.1038/nrn1519

Morecraft, R. J., & Tanji, J. (2009). Cingulofrontal interactions and the cingulate motor areas. In B.A. Vogt (Ed.), *Cingulate Neurobiology and Disease*. New York: Oxford University Press. Retrieved from

https://books.google.es/books?hl=es&lr=&id=jJuk7MRD1GkC&oi=fnd&pg=PA113&dq=Cingulofrontal+interactions+and+the+cingulate+motor+areas.+In:+Vogt,+B.A&ots=4mVGwjN4JV&sig=9lhIAiiQzK2KuYLaqg94FlgGJTs#v=onepage&q=Cingulofrontal interactions and the cingulate mo

Nimchinsky, E. A., Vogt, B. A., Morrison, J. H., & Hof, P. R. (1997). Neurofilament and calcium-binding proteins in the human cingulate cortex. *Journal of Comparative Neurology*, *384*(4), 597–620. https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-9861(19970811)384:4<597::AID-CNE8>3.0.CO;2-Y

Northoff, G., & Sibille, E. (2014). Why are cortical GABA neurons relevant to internal focus in depression? A cross-level model linking cellular, biochemical and neural network findings. *Molecular Psychiatry*, *19*(9), 966–977. https://doi.org/10.1038/mp.2014.68

Oblak, A., Gibbs, T. T., & Blatt, G. J. (2009). Decreased GABAa receptors and benzodiazepine binding sites in the anterior cingulate cortex in autism. *Autism Research*, *2*(4), 205–219. https://doi.org/10.1002/aur.88

Oblak, A. L., Gibbs, T. T., & Blatt, G. J. (2010). Decreased GABAB receptors in the cingulate cortex and fusiform gyrus in Autism. *Journal of Neurochemistry*, *114*(5), 1414–1423. https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2010.06858.x

Ocampo Gonzalez, Á. A. (2019). *Caracterización citoarquitectónica de poblaciones de interneuronas de las láminas II, III, V y VI de las áreas 9 y 11 de la corteza prefrontal de sujetos humanos* (Tesis de doctorado, Universidad del Valle). Biblioteca Universidad del Valle.

Öngür, D., Ferry, A. T., & Price, J. L. (2003). Architectonic subdivision of the human orbital and medial prefrontal cortex. *Journal of Comparative Neurology*, *460*(3), 425–449. https://doi.org/10.1002/cne.10609

Ono, M., Kubik, S., & Abernathey, C. D. (1990). *Atlas of the cerebral sulci*. Stuttgart: Thieme.

Palczewska, M. (2003). Calretinin and calbindin D28k have different domain organizations. *Protein Science*, *12*(1), 180–184. https://doi.org/10.1110/ps.0215303

Palomero-Gallagher, N., Mohlberg, H., Zilles, K., & Vogt, B. (2008). Cytology and receptor architecture of human anterior cingulate cortex. *Journal of Comparative Neurology*, *508*(6), 906–926. https://doi.org/10.1002/cne.21684

Pauc, R., & Young, A. (2010). Little-known neurons of the medial wall: A literature review of pyramidal cells of the cingulate gyrus. *Journal of Chiropractic Medicine*. National University of Health Sciences. https://doi.org/10.1016/j.jcm.2010.05.001

Periáñez, J. A., Maestú, F., Barceló, F., Fernández, A., Amo, C., & Ortiz Alonso, T. (2004). Spatiotemporal brain dynamics during preparatory set shifting: MEG evidence. *NeuroImage*, *21*(2), 687–695. https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2003.10.008

Permyakov, Eugene A. Kretsinger, R. H. (2011). Parvalbumin. In J. & S. Wiley (Ed.), *Calcium Binding Proteins* (Vol. 15 de Wile, pp. 221–235).

Rajkowska, G., O'Dwyer, G., Teleki, Z., Stockmeier, C. A., & Miguel-Hidalgo, J. J. (2007). GABAergic neurons immunoreactive for calcium binding proteins are reduced in the prefrontal cortex in major depression. *Neuropsychopharmacology*, *32*(2), 471–482. https://doi.org/10.1038/sj.npp.1301234

Rotaru, D. C., Olezene, C., Miyamae, T., Povysheva, N. V., Zaitsev, A. V., Lewis, D. A., & Gonzalez-Burgos, G. (2015). Functional properties of GABA synaptic inputs onto GABA neurons in monkey prefrontal cortex. *Journal of Neurophysiology*, *113*(6), 1850–1861. https://doi.org/10.1152/jn.00799.2014

Schacter, D. L., Addis, D. R., & Buckner, R. L. (2007). Remembering the past to imagine the future: the prospective brain. *Nature Reviews Neuroscience*, *8*, 657–661. https://doi.org/10.1038/nrn2213

Schmahmann, J. D., & Pandya, D. N. (2012). *Fiber Pathways of the Brain - Chapter 2 BT - Fiber Pathways of the Brain*. *Fiber Pathways of the Brain*. Retrieved from papers3://publication/uuid/0C9F35B3-8675-42E8-BD19-82F8B8AD0790

Seeley, W. W. (2019). The salience network: A neural system for perceiving and responding to homeostatic demands. *Journal of Neuroscience*, *39*(50), 9878–9882. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1138-17.2019

Seeley, W. W., Menon, V., Schatzberg, A. F., Keller, J., Glover, G. H., Kenna, H., Greicius, M. D. (2007). Dissociable Intrinsic Connectivity Networks for Salience Processing and Executive Control. *Journal of Neuroscience*, *27*(9), 2349–2356. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5587-06.2007

Seeley, W. W., Merkle, F. T., Gaus, S. E., Craig, A. D., Allman, J. M., & Hof, P. R. (2012). Distinctive neurons of the anterior cingulate and frontoinsular cortex: A historical perspective. *Cerebral Cortex*. https://doi.org/10.1093/cercor/bhr005

Shenhav, A., Cohen, J. D., & Botvinick, M. M. (2016). Dorsal anterior cingulate cortex and the value of control. *Nature Neuroscience*, *19*(10), 1286–1291. https://doi.org/10.1038/nn.4382

Simon, A., Oláh, S., Molnár, G., Szabadics, J., & Tamás, G. (2005). Gap-junctional coupling between neurogliaform cells and various interneuron types in the neocortex. *Journal of Neuroscience*, *25*(27), 6278–6285. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1431-05.2005

Singer, T., Seymour, B., Doherty, J. O., Kaube, H., Dolan, R. J., & Frith, C. D. (2004). Empathy for Pain Involves the Affective but not Sensory Components of Pain, *303*(FEBRUARY), 1157–1163.

Soriano, E., & Del Río, J. A. (2005). The cells of cajal-retzius: Still a mystery one century after. *Neuron*, *46*(3), 389–394. https://doi.org/10.1016/j.neuron.2005.04.019

Spreng, R. N., Stevens, W. D., Chamberlain, J. P., Gilmore, A. W., & Schacter, D.

L. (2010). Default network activity, coupled with the frontoparietal control network, supports goal-directed cognition. *NeuroImage*, *53*(1), 303–317. https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2010.06.016

Stawarczyk, D., Majerus, S., Maquet, P., & D'Argembeau, A. (2011). Neural correlates of ongoing conscious experience: Both task-unrelatedness and stimulus-independence are related to default network activity. *PLoS ONE*, *6*(2). https://doi.org/10.1371/journal.pone.0016997

Villalba Moreno, N. D. (2016). *Caracterización Morfológica de las interneuronas de la lámina VI de las áreas 10o y 24 de la Corteza Prefrontal Humana* (Tesis de Maestría, Universidad del Valle). Biblioteca Universidad del Valle.

Vogt A, B., Finch M, D., & Olson R, C. (1992). Functional heterogeneity in cingulate cortex: The anterior executive and posterior evaluative regions. *Cerebral Cortex*.

Vogt, Brend A., & Gabriel, M. (1993). *Neurobiology of cingulate cortex and limbic thalamus*. (Brend A. Vogt & M. Gabriel, Eds.) (1st ed.). New York. https://doi.org/10.1007/978-1-4899-6704-6

Vogt, Brent A., Nimchinsky, E. A., Vogt, L. J., & Hof, P. R. (1995). Human cingulate cortex: Surface features, flat maps, and cytoarchitecture. *Journal of Comparative Neurology*, *359*(3), 490–506. https://doi.org/10.1002/cne.903590310

Vogt, Brent A. (2005). Pain and emotion interactions in subregions of the cingulate gyrus. *Nature Reviews Neuroscience*. https://doi.org/10.1038/nrn1704

Vogt, Brent A. (2016). Midcingulate cortex: Structure , connections , homologies , functions and diseases. *Journal of Chemical Neuroanatomy*, *74*, 28–46. https://doi.org/10.1016/j.jchemneu.2016.01.010

Vogt, Brent A, & Laureys, S. (2005). Posterior cingulate, precuneal and retrosplenial cortices: Cytology and components of the neural network correlates of

consciousness. *Progress in Brain Research*. https://doi.org/10.1016/S0079-6123(05)50015-3

Walker AE. (1940). A cytoarchitectural study of the prefrontal area of the macaque monkey. *Journal of Comparative Neurology*, *73*, 59–86.

Walton, M. E., Bannerman, D. M., Alterescu, K., & Rushworth, M. F. S. (2003). Functional Specialization within Medial Frontal Cortex of the Anterior Cingulate for Evaluating Effort-Related Decisions, *23*(16), 6475–6479.

Wang, J., Liu, D. Q., Zhang, H., Zhu, W. X., Dong, Z. Y., & Zang, Y. F. (2013). Asymmetry of the dorsal anterior cingulate cortex: Evidences from multiple modalities of MRI. *Neuroinformatics*, *11*(2), 149–157. https://doi.org/10.1007/s12021-012-9167-9

Wang, Y., Gupta, A., Toledo-Rodriguez, M., Wu, C. Z., & Markram, H. (2002). Anatomical, physiological, molecular and circuit properties of nest basket cells in the developing somatosensory cortex. *Cerebral Cortex*, *12*(4), 395–410. https://doi.org/10.1093/cercor/12.4.395

Weiss, A. R., Gillies, M. J., Philiastides, M. G., Apps, M. A., Whittington, M. A., FitzGerald, J. J., Green, A. L. (2018). Dorsal Anterior Cingulate Cortices Differentially Lateralize Prediction Errors and Outcome Valence in a Decision-Making Task. *Frontiers in Human Neuroscience*, *12*(May), 1–15. https://doi.org/10.3389/fnhum.2018.00203

Yücel, M., Stuart, G. W., Maruff, P., Velakoulis, D., Crowe, S. F., Savage, G., & Pantelis, C. (2001). Hemispheric and Gender-related Differences in the Gross Morphology of the Anterior Cingulate/Paracingulate Cortex in Normal Volunteers: An MRI Morphometric Study. *Cerebral Cortex*, *11*, 17–25.

Zaitsev, A. V., Gonzalez-Burgos, G., Povysheva, N. V., Kröner, S., Lewis, D. A., & Krimer, L. S. (2005). Localization of calcium-binding proteins in physiologically and morphologically characterized interneurons of monkey dorsolateral prefrontal cortex. *Cerebral Cortex*, *15*(8), 1178–1186.

https://doi.org/10.1093/cercor/bhh218