

**ESTUDIO CITOMORFOLÓGICO DE LAS INTERNEURONAS DEL AREA 10 ORBITAL
DE LA CORTEZA PREFRONTAL HUMANA**

OLGA LUCIA GAITAN GOMEZ



**UNIVERSIDAD DEL VALLE
FACULTAD DE SALUD
ESCUELA DE CIENCIAS BIOMEDICAS
CENTRO DE ESTUDIOS CEREBRALES
SANTIAGO DE CALI
2014**

**ESTUDIO CITOMORFOLÓGICO DE LAS INTERNEURONAS DEL AREA 10 ORBITAL
DE LA CORTEZA PREFRONTAL HUMANA**

OLGA LUCIA GAITAN GOMEZ

**UNIVERSIDAD DEL VALLE
FACULTAD DE SALUD
ESCUELA DE CIENCIAS BIOMEDICAS
CENTRO DE ESTUDIOS CEREBRALES
SANTIAGO DE CALI
2014**

**ESTUDIO CITOMORFOLÓGICO DE LAS INTERNEURONAS DEL AREA 10 ORBITAL
DE LA CORTEZA PREFRONTAL HUMANA**

**Tesis de grado para optar al título de:
MAGISTER EN CIENCIAS BIOMÉDICAS**

**Presentado por:
OLGA LUCIA GAITAN GOMEZ**

**Director:
EFRAIN BURITICA, Psic, MSc.**

Profesor Asistente

**UNIVERSIDAD DEL VALLE
FACULTAD DE SALUD
ESCUELA DE CIENCIAS BIOMEDICAS
CENTRO DE ESTUDIOS CEREBRALES
SANTIAGO DE CALI
2014**

AGRADECIMIENTOS

- Durante el desarrollo del postgrado mi familia fue mi apoyo, inspiración y compañía, sin su ayuda habría sido imposible culminar los estudios. A mis padres (Lucero Gómez & Jorge Gaitán) y hermanos (Claudia Gaitán & William Gaitán) les debo la confianza, el cariño y el optimismo que depositaron en mi.
- Encontré durante mi formación en la Escuela de Ciencias Biomédicas compañeros tan amables como talentosos en sus áreas de formación. Fue muy grato compartir conocimiento con diferentes disciplinas y roles profesionales, sin duda de los elementos más enriquecedores del programa.
- A mis amigas cercanas (Karen Suarez, Gladis Aristizabal, Iris Delgado) por su afecto, seguridad y esperanza durante estos años.
- A los docentes en la Escuela de Ciencias Biomédicas por su paciencia, vocación investigativa y pedagogía, cualidades dignas de replicar.
- Gracias a mi tutor, Efraín Buritica Ramírez quien durante el desarrollo del postgrado fue receptivo ante mis dudas y opiniones, y facilitador del proceso de aprendizaje investigativo y académico.
- A Sandra Lizeth Valencia por sus sugerencias y continuo apoyo en el desarrollo de la Tesis
- Gracias especiales a los docentes Adalberto Sánchez y Leonardo Fierro por su interés, asesoría y acompañamiento.
- Gracias a los docentes del Centro de Estudios Cerebrales (Gabriel Arteaga, Martha Escobar, Hernán Pimienta y Mauricio Palacios) de la Universidad del Valle por la oportunidad de formación académica y personal.

- A la Vicerrectoría de Investigaciones de la Universidad del Valle, por la financiación del proyecto “*Organización Citoarquitectónica de la Lámina II en la Corteza Prefrontal Humana*”, del cual el presente trabajo de investigación es un un producto.

CONTENIDO

	Pag
1 INTRODUCCION	1
2 MARCO TEORICO	3
2.1 CORTEZA PREFRONTAL	3
2.2 AREA 10	6
2.2.1 Ubicación y citoarquitectura	6
2.2.2 Conexiones	11
2.2.3 Funciones asociadas	12
2.3 ORGANIZACIÓN Y CLASIFICACION DE LAS INTERNEURONAS GABAERGICAS EN LA CORTEZA CEREBRAL	15
3 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	23
4 OBJETIVO GENERAL	25
4.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS	25
5 METODOLOGÍA	27
5.1 SELECCIÓN Y PROCESAMIENTO DEL TEJIDO CORTICAL	27
5.2 REGISTRO Y ANALISIS DE IMAGENES	30
5.2.2 Imágenes y mediciones en 40x	35
5.3 ANALISIS ESTADISTICO DE LOS DATOS	38
5.3.1 Analisis estadistico de las variables de caracterizacion	38
5.3.2 Analisis estadistico de las variables morfologicas	38
5.4 Consideraciones Eticas	39
6 RESULTADOS	42
6.1 CARACTERIZACION HISTOLOGICA GENERAL DEL AREA 10	42
6.1.1 Organización neuronal general: laminas supragranulares vs infragranulares	43
6.2 CARACTERIZACION MORFOLOGIA DE LAS INTERNEURONAS EN LAS LAMINAS II Y III DEL AREA 10	48

6.2.1	Caracterizacion morfologica general	48
7	DISCUSION	60
7.1	CONSIDERACIONES METODOLOGICAS	60
7.2	HALLAZGOS CITOARQUITECTONICOS	61
7.3	SIMETRIAS INTERHESMISFERICAS EN EL AREA 10 DEL HUMANO	65
7.4	DISTRIBUCION DE LAS SUBPOBLACIONES DE INTERNEURONAS GABAERGICAS EN EL AREA 10 DEL HUMANO	67
7.5	MORFOMETRIA DE LAS INTERNEURONAS GABAERGICAS CORTICALES DEL AREA 10 DEL HUMANO	71
7.6	ASPECTOS FUNCIONALES DEL AREA 10	75
8.	CONCLUSIONES	78
9.	BIBLIOGRAFIA	80
10	ANEXOS	95

LISTA DE TABLAS

	Pag
TABLA 1. Características citoarquitectónicas del área 10 en diferentes especies de primates	8
TABLA 2. Datos demográficos de los sujetos port-mortem	28
TABLA 3. Espesor Laminar y Espesor Cortical del área 10	43
TABLA 4. Densidad neuronal y de subpoblaciones de Interneuronas	44
TABLA 5. Porcentaje de interneuronas por marcador y lámina cortical	46
TABLA 6. Comparación intrahemisférica del número de neuronas por cada proteína atrapadora de Calcio	46
TABLA 7. Caracterización morfológica (tamaño del soma, número de procesos primarios, forma del soma) de las interneuronas CB, CR y PV positivas en láminas supragranulares	49
TABLA 8. Clasificación y caracterización de las interneuronas según la forma del soma	50
TABLA 9. Comparación de las variables morfológicas entre las 3 CaBPs por lámina cortical	53
TABLA 10. Correlación entre las variables morfológicas por subpoblación de interneuronas identificadas con las CaBPs por lámina cortical	55
TABLA 11. Resumen de las Características morfológicas de los 8 grupos	57
TABLA 12. Resumen de las principales características de los 8 Conglomerados	59

LISTA DE FIGURAS

	Pag
Figura 1. Mapa que resume los criterios de organización de la nomenclatura y clasificación morfológica, molecular y fisiológica de las interneuronas Gabaérgicas corticales	18
Figura 2. Taxonomía propuesta por el grupo de Petilla	19
Figura 3. Ubicación del área 10p en la superficie orbital de la corteza prefrontal	27
Figura 4. Selección de las mejores zonas para los campos fotográficos y empalme de las imágenes	31
Figura 5. Conteo neuronal y medición del espesor laminar	32
Figura 6. Registro fotográfico para el análisis morfológico	36
Figura 7. Mapa conceptual resume las comparaciones realizadas y las pruebas estadísticas correspondientes a la caracterización de los sujetos	40
Figura 8. Análisis Estadístico de los Datos	41
Figura 9. Microfotografías a 10x que ilustran un corte coronal del área 10 marcado con NeuN, PV, CB y CR desde la superficie pial hasta la sustancia blanca, la barra corresponde a 100 μ m	45
Figura 10. Algunos ejemplos de interneuronas de acuerdo con la categorización de la forma del soma en las láminas II y III del área 10 humana	51
Figura 11. Análisis de Conglomerado Jerárquico Aglomerativo	56

LISTA DE ANEXOS

		Pag
ANEXO # 1	Comparación de la densidad neuronal en las lamina II y III del hemisferios derecho vs otras laminas del hemisferio ipsilateral y contralateral	88
ANEXO # 2	Comparación de las variables morfológicas: Tamaño del soma, Forma de la Célula y Numero de Procesos entre laminas II y III intrahemisferios corticales	89
ANEXO # 3	Comparación de las variables morfológicas: Tamaño del soma, Forma de la Célula y Numero de Procesos primarios entre laminas II y III entre hemisferios corticales	90
ANEXO # 4	Formulacion de hipotesis para cada una de las pruebas realizadas con la Tabla # 10 comparacion metodologica J	93
ANEXO # 5	Resumen de las características morfológicas de las interneuronas atípicas	96
ANEXO # 6	Ejemplo de algunas interneuronas del area 10 pertenecientes a los 8 conglomerados	97
ANEXO # 7	Interneuronas del area 10 corteza prefrontal humana	99
ANEXO # 8	Resumen de los principales resultados de la Investigacion	103

RESUMEN

El presente es un estudio descriptivo y exploratorio que busca caracterizar la organización citoarquitectónica y morfológica de las subpoblaciones de interneuronas Gabaérgicas de las láminas II y III del área 10 en la superficie orbital de la Corteza Prefrontal del Humano, desde variables como: densidad, espesor cortical, espesor laminar relativo, tamaño del soma, factor forma (grado de esfericidad del soma celular) y número de procesos primarios. Se analizaron placas histológicas que contenían cortes de 5 sujetos post-mortem, del área 10 orbital de los dos hemisferios, procesados con anticuerpos contra NeuN y las proteínas que atrapan calcio (CaBPs): Parvalbúmina (PV), Calbindina (CB) y Calretinina (CR). En total se analizaron 1646 interneuronas.

Se encontró que el área 10 de humano posee mayor densidad de interneuronas y de neuronas en general, en las láminas supragranulares (II-III), aunque el espesor de las capas supra e infragranulares (V-VI) es similar. Las láminas II y IV poseen la densidad celular más alta, las láminas III, V y VI una densidad media; y la lámina I, la densidad más baja. En materia de interneuronas, las láminas II y IV también presentan la mayor densidad, seguida de las láminas III y V con una densidad media, y las láminas I y VI presentan la densidad más baja. En términos de las subpoblaciones de interneuronas, las células CR positivas (CR+) son las más abundantes y las células CB positivas (CB+) las más escasas. Las células CR+ se distribuyen homogéneamente entre las seis láminas corticales; las CB+ predominan en las láminas II y III, con una densidad muy baja en la IV y prácticamente no hay en las demás láminas; y las células PV positivas (PV+) predominan en las láminas III, IV y V, seguidas de las láminas II y VI, y en la lámina I son prácticamente inexistentes.

Las variables morfométricas analizadas en las 1646 interneuronas de las láminas II y III, permiten distinguir morfológicamente entre las tres subpoblaciones de interneuronas que expresan cada una de las CaBPs. Las células PV+ presentan los somas más grandes, con la forma más esférica y el mayor número de procesos primarios; las células CR+ tienen los somas más pequeños y con el menor número de procesos; y las células CB+

número intermedio de procesos primarios, pero la forma y el tamaño del soma es similar al de las células CR+. Entre las dos láminas corticales observadas, se presentaron dos variaciones morfológicas; una, es el mayor tamaño del soma en la lámina III de las células de las tres subpoblaciones; y dos, el menor número de procesos primarios en las células PV+ de la lámina III respecto de aquellas en la lámina II. En ninguna de las variables morfométricas consideradas en el presente estudio, se presentaron asimetrías interhemisféricas.

El análisis de conglomerado jerárquico aglomerativo, permitió identificar 8 subgrupos de interneuronas Gabaérgicas en las capas supragranulares del área 10 orbital del humano diferenciados por no solo sus características morfológicas particulares, sino por su ubicación laminar específica y la CaBP que expresan. Los resultados de este análisis fueron coherentes con lo descrito en la fase descriptiva del estudio, con el análisis de correlación y con lo descrito en la literatura para estas poblaciones celulares.

Palabras Claves: Corteza Prefrontal Humana, Área 10, Interneuronas Gabaérgicas.

ABSTRACT

The present research is a descriptive study that search to establish the morphological and cytoarchitectural organization of subpopulations of GABAergic interneurons in the cortical layers II and III of area 10 on the orbital surface of the Human Prefrontal Cortex, assessing features such as density, cortical thickness, laminar thickness, neuronal soma size, shape factor (degree of sphericity of the cell soma) and number of primary processes. Histological slides containing sections of area 10 of the two hemispheres from 5 post-mortem subjects were observed. This tissue was processed with antibodies against NeuN, and calcium-binding proteins (CaBPs): Parvalbumin (PV), Calbindin (CB) and Calretinin (CR). 1646 interneurons were analyzed.

We found that the human area 10 has the highest neuronal and interneuronal density in supragranular layers (II-III), although the thicknesses of supragranular and infragranular (V-VI) layers are similar. The layers II and IV have highest neuronal density, followed by layers III, V and VI; and layer I have lowest neuronal density.

In relation to interneuronal density, area 10 layers II and IV have highest density, followed by layers III and V; and layers I and VI have lowest density. The CR-positive (CR+) cells subpopulation is the largest and CB-positive (CB+) cells subpopulation is the smallest. The CR+ somas are distributed uniformly throughout the six cortical layers. CB+ somas are predominant in layers II and III, scarce in layer IV and practically nonexistent in the other layers. PV-positive (PV+) somas are predominant in layers III, IV and V, followed by layers II and VI, and are practically nonexistent in layers I.

Morphometric features evaluated in 1646 interneurons of layers II and III allowed distinguishing morphological differences between the three subpopulations of cortical interneurons that expressed each one of CaBPs. The PV+ cells present the largest cell bodies, with a marked tendency to spherical shape and the greatest number of the primary process; the CR+ cells have smaller somas and the least number of primary processes. CB+ cells have an intermediate number of primary processes between CR+ and PV+ cells, but its soma shape and size are similar to CR+ cells. In both cortical layers studied (II and III) morphological variations in interneurons were observed: the soma size of interneurons

increase from layer II to layer III (for the interneuronal subpopulations); the PV+ cells of layers III showed less number of primary processes than the ones located in layer II. None of the morphometric features considered in this study presented interhemispheric asymmetries.

The agglomerative hierarchical clustering analysis allowed the identification of eight subgroups of GABAergic interneurons in supragranular layers of human area 10 differentiated by the morphological features considered, and Besides by their laminar location and the expression of a CaBP type. The results of this analysis were consistent with the descriptive data, the correlation analysis and the data reported by others authors in the literature about these cell populations in others cortical areas.

Key words: Human Prefrontal Cortex, area 10, GABAergic interneurons.

1. INTRODUCCION

Los análisis realizados hasta el momento sobre la corteza prefrontal han permitido identificar aspectos como la diversidad neuronal, el patrón laminar y minicolumnar en algunas de las regiones que la comprende. A partir de ahí los investigadores han propuesto modelos de conectividad que conjuntamente con los estudios funcionales constituyen las bases de los procesos mentales superiores y del comportamiento. Sin embargo aspectos finos relacionados con el tamaño, forma, patrón de arborización neuronal de las diferentes poblaciones neuronales en la corteza prefrontal siguen siendo una incógnita.

En esta investigación se propuso estudiar las características citomorfológicas de las interneuronas ubicadas en las láminas II y III del área 10 de la superficie orbital (área 10o) de la Corteza Prefrontal Humana (CPF), mediante la utilización de marcadores inmunohistoquímicos para las diferentes proteínas atrapadoras de calcio (Calbindina, Calretinina y Parvalbúmina) que permiten diferencialmente identificar subpoblaciones de interneuronas Gabaérgicas corticales. En la actualidad se conocen solo parámetros de espesor laminar, espesor cortical, densidad celular, citoarquitectura y posibles asimetrías en esta área cortical, por un par de trabajos previos realizados en el Centro de Estudios Cerebrales de la Universidad del Valle (1-3) y por un par de estudios realizados por otros grupos de investigación alrededor del mundo (4, 5); como por ejemplo, las investigaciones morfológicas (reconstrucciones de interneuronas en 3D) y estudios electrofisiológicos desarrollados en áreas 9 y 46, de la corteza prefrontal del macaco por el Departamento de Neurociencias y Psiquiatría de la Universidad de Pittsburgh. Sin embargo, no se tratan parámetros básicos de tamaño del soma, número de procesos primarios (originados desde el cuerpo celular) y la forma de la interneurona (grado de esfericidad) en el ser humano, es por ello que el presente trabajo de investigación se propone contribuir a subsanar parcialmente estos vacíos.

Una mayor comprensión de esta región cerebral, aportaría elementos que permitirían indagar en las bases neurobiológicas de los procesos mentales superiores y comportamientos propios del ser humano, además de contribuir a formular hipótesis que sustenten las alteraciones y condiciones clínicas patológicas asociadas a los mismos.

Estudiar estos aspectos en sujetos sanos son el punto de partida para otras investigaciones interesadas en el impacto funcional de la citoarquitectura y conectividad, además de brindar mayor entendimiento sobre la participación de las interneuronas del área 10 en la génesis de los desórdenes mentales, permitiendo que los estudios comparativos de sujetos patológicos vs sujetos “normales” o sanos puedan llevarse a cabo y tengan sustento desde el punto de vista morfológico.

2. MARCO TEORICO

2.1 LA CORTEZA PREFRONTAL

La Corteza Prefrontal (CPF) también denominada corteza frontal granular o corteza frontal asociativa, recibe estos nombres dada sus características de citoarquitectura y conectividad. Incluye la corteza frontal excepto la corteza motora y pre motora (6). Varios autores entre ellos Vogt & Sanides (7, 8), fueron los primeros en afirmar que la Corteza Prefrontal en el primate es el resultado del crecimiento y desarrollo de dos patrones de organización, uno de origen en el hipocampo y otro en la corteza olfatoria. El primero, con predominio de células piramidales y de desarrollo en sentido medial-dorsal-lateral; y el segundo de células granulares y desarrollo en sentido ventro-lateral. Por lo tanto, la CPF es un mosaico de regiones que entremezclan sectores con 4 a 6 láminas, entre disgranulares y granulares, y con grados diferentes de diferenciación laminar.

Se ha relacionado a las áreas de la Corteza Prefrontal Dorsolateral con algunas funciones, como por ejemplo el área 46 y 9/46 participa en el monitoreo y manipulación de las actividades que realiza la memoria operativa, permitiendo que las acciones que se han planeado y se llevan a cabo durante el presente sean constantemente actualizadas al contexto y al objetivo ideado, además de involucrarse en la planeación secuencial de dichas actividades y en la toma de decisiones. Se ha relacionado con la implementación de estrategias para facilitar la memoria, como la organización de la información antes de codificarla y procesarla, al tiempo que verifica y evalúa la información que se trae de la memoria a largo plazo. (9-11)

Se ha observado que lesiones en la corteza prefrontal dorsolateral, medial y ventral de monos ocasiona déficits en el aprendizaje y respuestas condicionadas, memoria operativa y control de funciones ejecutivas respectivamente. (11-15)

Las áreas ubicadas en la región orbital y medial participan en la memoria declarativa, en la evaluación de información nueva con el objetivo de regular las respuestas del organismo a la misma, además de involucrarse en el control emocional. Esta región en compañía de otras estructuras límbicas (corteza entorrinal, perirrinal, hipocampo y amígdala) participan en el procesamiento de la memoria declarativa que se ve afectada al lesionarse de manera bilateral esta zona, también se ha reportado una amnesia anterograda pero manteniendo la habilidad de aprendizaje intacta. Se ha evidenciado un detrimento en las actividades que requieren un reconocimiento visual y el recuerdo del mismo, además participa en la regulación de aspectos motivacionales y emocionales relacionados a un nuevo estímulo y asociado a la regulación del comportamiento y respuesta autonómica (visceral y endocrina) (16, 17). Adicionalmente, se ha implicado en procesos motivacionales o en la adjudicación de valor emocional a la información que ingresa, como en el reforzamiento de procesos asociados al tacto, el sabor y el olor, además de involucrarse en la representación asociada actividades de castigo – recompensa (9).

En la actualidad se reconoce que la CPF se encuentra distribuida sobre las tres caras del lóbulo frontal. En sentido postero-anterior, en la cara lateral se ubican sobre el giro frontal superior el área 8 y 9 extendiéndose hacia la cara medial; sobre el giro frontal medio se encuentran las áreas 9, 46 y 10, esta última proyectándose hasta cara medial y orbital; en el giro frontal inferior sobre el giro opercular se encuentra el área 44, sobre el giro triangular el área 45 y en el giro orbitario el área 47/12. (11) En la cara Medial se encuentran las áreas 24 y 32 en la región anterior del giro cíngulo en dirección postero – dorsal, en la parte más anterior el área 32 y rostralmente al giro cíngulo se encuentra el área 12, mientras que en la cara orbital encontramos además de las mencionadas previamente sobre el giro orbitario posterior el área 13. (18)

Dombrowski, Hilgetad & colaboradores clasificaron las áreas prefrontales en cuatro categorías, dependiendo del número de láminas y su grado de definición: agranulares (3 láminas, eje: OPAlI, 24a), disgranular (4 láminas, eje: Opro, M25, 13, 32), Eulaminado: corteza granular caracterizada por 6 láminas, se divide en Eulaminada I: corteza granular medial - orbital con un grado moderado de definición laminar (M9, M10, 11, O12) y

Eulaminada II: corteza de tipo granular lateral que tiene la mejor definición laminar y diferenciación de la lámina IV. (8, 19, 20)

Dombrowski y col (21) también encontraron que las áreas agranulares y disgranulares se caracterizaron por prominentes láminas V-VI (infragranulares) acompañadas de una distribución glial más dispersa, al contrario de las cortezas eulaminadas que presenta mayor prominencia en láminas supragranulares (láminas II-III), una lámina IV densamente poblada y diferenciada, y una presencia glial mayor; siendo prevalente en las láminas I, V-VI y IV y menos prevalente en láminas II-III de todas las áreas prefrontales. Adicionalmente describen que la distribución de interneuronas Gabaérgicas que expresan proteínas atrapadoras de calcio (CaBPs) como Parvalbumina (PV), Calbina (CB) y Calretinina (CR), de acuerdo con el tipo de corteza, así las cortezas agranulares y disgranulares presentaron la mayor densidad de neuronas CB positivas y menos PV positivas, mientras que en las cortezas eulaminadas las concentraciones de PV y CB son similares, la marcación para CR mostro una relativa distribución uniforme a lo largo de toda la CPF.

La ventaja de usar anticuerpos contra las CaBPs, es que permiten identificar tres subpoblaciones diferentes de interneuronas Gabaérgicas en el tejido cortical de humano. Varios grupos de investigación han validado estos datos, entre ellos el Departamento de Anatomía y Neurobiología de la Universidad de Washington (101) & El Instituto de Investigación en Química y Física de Japón (82). Otros estudios han establecido que el grado de superposición o co-localización de dos o tres de estas CaBPs entre las interneuronas Gabaérgicas corticales en el humano es entre el 1 y el 3% (102, 103).

Las conexiones cortico-corticales habían sido previamente documentadas por autores como Barbas y Rempel-Clower 1997 (22), quienes definieron un modelo estructural que permite predecir el patrón de conexiones de un área según su estructura laminar. En el modelo propuesto las cortezas con mayor diferenciación laminar envían sus proyecciones desde las láminas superiores (II-III) y terminan predominantemente en las láminas profundas (IV-VI) de cortezas menos definidas; al contrario de las proyecciones de áreas menos diferenciadas cuyas proyecciones se originan en las láminas profundas y sus

axones terminan predominantemente en las láminas superficiales de áreas mejor diferenciadas.

2.2 EL ÁREA 10

2.2.1 Ubicación y citoarquitectura:

El área 10 se encuentra ubicada hacia el polo frontal extendiéndose hacia las tres superficies de los hemisferios cerebrales, caracterizada por ser corteza granular, subdivididas en sentido caudo-rostral la superficie medial se subdivide en 10 medial (10m), 10 rostral (10r) y 10 polar (10p). La primera subdivisión limita con el área 32pl ventral a la rodilla del cuerpo calloso, en sentido rostral se continúa la subdivisión 10r con una mejor granularidad y laminaridad, mientras que el área 10p hacia el extremo anterior frontal (y que representa propiamente las tres caras del polo frontal: lateral, medial y orbital) presenta la mejor diferenciación laminar de todas las subdivisiones. Las tres áreas se diferencian por el grado de desarrollo laminar y granularidad de las láminas III y IV, el área 10m presenta una lámina III dividida en a y b, con una lámina IV delgada pero granular y una lámina V prominente, el área 10r presenta una lámina II más definida, con las mismas subdivisiones de la lámina III pero de menor tamaño, con una lámina IV más granular y una lámina V menos prominente a diferencia del área 10p que presenta la mejor granularidad en la lámina IV y unas láminas infra y supragranulares similares en tamaño. (18, 23) Se sugiere que el área 10 presenta dos orígenes filogenéticos distintos su porción medial y lateral encuentra su origen en la arquicorteza, mientras que la porción orbital en la paleocorteza. (24)

Los límites del área 10 sobre la superficie lateral son el área 9 sobre el giro frontal superior, el área 46 sobre el giro frontal medio y el área 47/12 sobre el giro frontal inferior; en la superficie basal-orbital limita con el área 11 y sobre la superficie medial con las áreas que se extienden de las otras caras como la 9, 32, 24 y 25 dorsal y ventralmente, y con las áreas 11 y 14 caudalmente. El área 10 se conecta con áreas que tienen tanto mayor o menor grado de diferenciación laminar (9/46, 8a, 47/12, 25, 32, 13 y 11); esto

significa que las áreas mediales y dorsolaterales de la corteza prefrontal establecen conexiones fuertes entre ellas y guardan algunas relaciones con otras áreas ventrolaterales y orbitales aunque no de la misma magnitud. (24-26)

Se ha descrito que el área 10 en el humano posee un volumen de aproximadamente 14 cm³, siendo la más grande de todos los homínidos y corresponde a 1.2% del total del volumen cerebral. Sus láminas supragranulares poseen la mayor amplitud relativa con un 53% vs las infragranulares con un 40%. Esto último permite sugerir que el área presenta mayores conexiones asociativas intra e interhemisféricas que conexiones cortico-subcorticales. Se ha estimado que esta área en el hemisferio derecho presenta un estimado de 254.4 millones de neuronas para el hombre, un número mucho mayor para los registrados en otros homínidos que varía entre 8 y 64 millones. Estas características permiten deducir que el área 10 presenta un incremento del tamaño (desproporcionado) durante la evolución de los homínidos acompañado de un aumento de las conexiones con otras áreas supramodales. (27)

En la tabla 1, se presentan las características más relevantes del área 10 en diferentes especies de primates.

Tabla # 1. Características citoarquitectónicas del área 10 en diferentes especies de Primates

Sujetos	Características Citoarquitectónicas	Sujetos	Características Citoarquitectónicas
Humanos	Presenta seis láminas corticales, las primeras tres con espesores relativos de 11% (lámina I), 9% (lámina II) y 31% (lámina III), con células granulares pequeñas y piramidales que aumentan su tamaño conforme se acerca a límites con la lámina IV. La lámina IV es delgada, con límites discernibles y un espesor del 9%. Las láminas V (sublaminada en Va y Vb) y VI presentan amplitud similar a las capas supragranulares, con espesores relativos del 17% y 23% respectivamente, caracterizadas por tener células piramidales y fusiformes grandes.	Chimpancé	Presenta las seis láminas corticales fácilmente diferenciables. Con láminas I y II de un tamaño delgado a mediano, una lámina III muy amplia y homogénea en su distribución celular. La lámina IV delgada y poblada de células medianas y pequeñas y las láminas V y VI con un espesor mediano y células piramidales de soma prominente.
Bonobo	Presenta una lámina I mediana, con una pequeña pero distinguible lámina II, además de una lámina III con una densidad celular homogénea, lámina IV muy delgada con unas láminas infragranulares de menor tamaño que las supragranulares.	Gorila	Presenta una apariencia heterogénea, con lámina II y V prominentes, una lámina III ampliamente poblada de piramidales medianas a grandes. La lámina IV es granular pero pequeña y una lámina VI grande y distinguible.
Orangután	Presenta una lámina I, II y III de tamaños entre delgadas y medianas pero homogéneas, con unas láminas IV y V casi iguales en tamaño, a diferencia de la lámina VI que es más amplia y contiene piramidales grandes.	Gibbon	Se caracteriza por ser una corteza delgada y homogénea, de tamaños proporcionales entre láminas supra e infragranulares. La única que destaca un poco por su aspecto más amplio es la lámina V.
Macaco	Posee una lámina I de tamaño mediano, una lámina II delgada con bordes borrosos con gran cantidad de células pequeñas, mientras la lámina III es amplia y con piramidales de tamaño mediano a grande. Presenta una lámina IV diferenciada y granular. Las láminas infragranulares son medianas, con buena densidad celular y somas de tamaño grande.		

Tabla elaborada a partir del resumen de los hallazgos de los estudios de Semendeferi y col (27,

Respecto de la morfología de las neuronas piramidales en la lámina III del Área 10 (que no son objeto del presente estudio), estas se localizan a una profundidad promedio de 800.1 μm desde la superficie pial, con un promedio de tamaño de 290 μm^2 , una longitud dendrítica apical de 4,193 μm /célula, es decir un 31.4% más larga que en otras regiones corticales. También se observó un mayor número de espinas por célula (aproximadamente 1,378), siendo 68,9% mayor que el encontrado en regiones menos complejas funcionalmente. Todo esto permitió sugerir que las áreas clasificadas como supramodales, como el área 10 presentan un campo receptivo más amplio que les permite la integración de mayor información multimodal. (29)

Elston y col en el año 2000 (30) investigaron sobre las características morfológicas de las células piramidales en las áreas 10, 11, y 12 del lóbulo frontal del macaco en comparación con los demás lóbulos, encontrando que la dendrita basal de las neuronas ubicadas en la lámina III del área 10, tienen una mayor extensión, ramificación y densidad de espinas a las encontradas en las áreas occipitales, temporales y parietales, incluso de otras áreas del lóbulo frontal. Estos datos sugieren una mayor integración de las aferencias y una notoria interconectividad entre las áreas prefrontales con el área 10.

Las características fenotípicas de las neuronas piramidales (mayor ramificación y mayor número de espinas dendríticas en la lámina III) soportarían la habilidad de la corteza prefrontal para mantener la información relevante aún en presencia de distractores. Esta actividad no sería posible sin la regulación que realizan las interneuronas Gabaérgicas presentes en estos sectores, sin embargo las características morfológicas de las Interneuronas no está completamente dilucidada. (31, 32)

Las áreas prefrontales como el área 10 se caracterizan por presentar una gran población de interneuronas Gabaérgicas que expresan CaBPs, en particular Parvalbúmina (PV) células localizadas entre las láminas II y VI, así como dos plexos de neuropilo separados por la lámina IV. Las que expresan Calbindina (CB) presentan una proporción menor en áreas eulaminadas, como la estudiada en el presente estudio, sin embargo se distinguen claramente dos bandas de somas: una entre las láminas II y III, y otra entre V y VI. Las

interneuronas que expresan Calretinina (CR) presentan una distribución más homogénea en todas las láminas y abundantes en comparación con las otras CaBPs. (18, 21, 27, 33)

En un estudio realizado en el 2007 por Buritica & Pimienta (1) en el Centro de Estudios Cerebrales, sobre la organización neuronal de las regiones lateral y medial del área 10p de la corteza prefrontal de humano, se encontró que el área 10p se caracteriza por presentar neuronas pequeñas a medianas en las láminas I, II, IV y V (en un rango aproximado de 90.57 a 97.60 μm^2), a diferencia de las ubicadas en las láminas III y VI las cuales poseen un tamaño significativamente mayor (entre 167.30 a 183.38 μm^2). En ese estudio también se reportó que la lámina III comprende el 36.2% del espesor cortical total, seguido de la lámina VI y la menor proporción la tienen las láminas I, II, IV y V; la mayoría de las neuronas del área son aportadas por las láminas III y VI (58,9%), mientras, que la lámina II posee la mayor densidad celular seguida por las láminas IV y V. En este estudio también se valoró la organización de la subpoblación de interneuronas Gabaérgicas que expresan PV, encontrándose que corresponden a 6,6 – 9,1% de la población neuronal total, que son más abundantes en la porción medial que en la lateral del área 10, y más numerosas en las capas supragranulares (láminas II-III) que en las infragranulares (láminas V-VI), y de mayor densidad en las láminas III y IV. También se evaluaron posibles asimetrías en la organización laminar o neuronal de la corteza frontopolar, pero no se encontraron diferencias significativas entre regiones homólogas (cara lateral y medial) para ninguno de los parámetros evaluados: espesor laminar relativo y cantidad total de neuronas.

Umbarila y col en el 2006 miembro de este grupo, analizo la organización del área 10p orbital: citoarquitectura y asimetrías en la corteza cerebral del humano. En el estudio se describió como un área “isocortical” con predominio de láminas infragranulares, la marcación con parvalbumina permitió identificar un subtipo de interneuronas gabaérgicas en mayor cantidad en láminas supragranulares, mientras que la marcación con calbindina permitió ver una distribución en todas las láminas corticales pero con predominio de las supragranulares. Se observó una organización dendrítica más organizada en láminas supragranulares, identificando espacios inter-fasciculares de aproximadamente 40-50 micras, características que demuestran la “alta complejidad de una área heteromodal” (2).

2.2.2 Conexiones:

El área 10 se conecta de manera recíproca, predominantemente con su área homóloga contralateral y con sus áreas vecinas (áreas 9, 46, 47/12, 11 y 32). También se ha reportado conexiones abundantes con otras áreas más caudales del frontal de las tres superficies cerebrales (áreas 8 y 44-45 lateralmente, áreas 24 y 25 medialmente, y áreas 13 y 14 orbitalmente).

El área 10 orbital recibe aferencias de dos tipos de fibras cortico-corticales extra-frontales: uno a través del fascículo uncinado que lleva información de la parte rostral del lóbulo temporal y el giro parahipocampal y termina en las porciones ventrales y caudales de la corteza prefrontal (áreas 13, 11, 47/12, 14, 25, 32 y 10); el otro sistema de fibras es a través de la cápsula extrema que se origina en la porción medial del giro temporal superior, giro parahipocampal e ínsula y termina en las áreas prefrontales ventro-laterales (11, 45, 47/12, 9/46v y 10). Además, se ha documentado la presencia en el humano del fascículo fronto-occipital, atribuyéndole las conexiones a través de éste entre el área 10 y las regiones asociativas parieto-occipitales, la razón de un mayor tamaño en la superficie cortical y el incremento significativo de la sustancia blanca adyacente en el polo frontal (27, 34-36).

El área 10 establece conexiones con diversas estructuras subcorticales, como algunos de los núcleos del tálamo, entre ellos el dorsomediano, el núcleo anterior y ventral anterior que se conecta con la porción dorsolateral y ventral del área 10, mientras que del núcleo pulvinar recibe proyecciones de la porción dorsal y medial; estas conexiones con el tálamo son recíprocas. Estas mismas regiones frontopolares reciben proyecciones del hipotálamo, de la sustancia gris periacueductal y de los núcleos Basales de Meynert y en menor medida de la Banda Diagonal de Broca. El área 10 solo recibe algunas aferencias de las estructuras límbicas mencionadas, pero no envía proyecciones directas a ellas, a diferencias de otras áreas prefrontales mediales y orbitales más caudales. (10, 37-42) (20, 38, 41, 43, 44)

Como se puede observar en esta revisión de las conexiones del área 10, ésta es un área que establece conexiones recíprocas con otras áreas multimodales y supramodales, en

particular del lóbulo frontal, y recibe o genera poca o ninguna influencia de estructuras sensoriales, motoras y límbicas.

2.2.3 Funciones asociadas:

Se le han adjudicado al área 10 diversas funciones, entre ellas ser el sustrato que permite la organización del contenido mental, la creatividad, el lenguaje, la expresión artística y la planeación de acciones a futuro, por supuesto a través de sus conexiones con otras áreas prefrontales. Se ha asociado con el interés y la motivación al realizar una actividad y ser responsable de algunas habilidades cognitivas superiores como la coordinación del pensamiento orientado e independiente de los estímulos, la extracción del significado a las experiencias vividas, la introspección, la divagación mental, la Teoría de la Mente y la evaluación de estados mentales propios y ajenos. (8, 9, 24, 45-48)

Al área 10 también se la ha vinculado con la memoria operativa, principalmente con el control de la información interferente y el mantenimiento de las metas durante la ejecución de tareas alternas. Al respecto, Melchirzky, González-Burgos, Barrionuevo & Lewis (49, 50) proponen un modelo funcional en el que describen la conectividad de las láminas supragranulares de la CPF del mono, resaltan las conexiones asociativas excitatorias de las células piramidales, y entre módulos funcionales a una distancia mínima de 300 μm y en algunos casos a través de la sustancia blanca, por fibras de asociación. Esta conectividad mantiene la actividad recurrente de las células piramidales entre módulos adyacentes, que procesan el mismo tipo de información, permitiendo la codificación de los datos necesarios para llevar a cabo tareas en un futuro inmediato (memoria operativa). También sugieren que existe un reclutamiento de las interneuronas, específicamente de las células en candelabro, reduciendo la activación de los módulos de la CPF que codifican información irrelevante para la tarea en desarrollo. Esto permite concluir que el árbol axónico de las células en candelabro (250-300 μm de diámetro) favorece la regulación de las eferencias de las células piramidales al interior de un módulo funcional. A su vez describen otra manera para controlar la actividad de las neuronas piramidales de la lámina III, estas de manera directa pueden establecer sinapsis sobre varios tipos de interneuronas (doble bouquet, Bipenachadas etc) ejerciendo control sobre las eferencias

del módulo funcional, debido al efecto de retroalimentación negativa sobre la propia piramidal que inicio la actividad.

De las funciones adjudicadas a la corteza rostral prefrontal (Área 10 de Brodman), una de ellas es explicada en la teoría de la compuerta, hipótesis conformada por dos ideas básicas: una de ellas refiere que diferentes formas de cognición son generadas por experiencias percibidas por medio de los sentidos, mientras que la otra idea argumenta que un proceso cognitivo puede ser independiente de aferencias (por ejemplo: pensamientos, soñar, mente pensante o errante, mentalización e introspección). Ambos tipos de conocimientos generan representaciones mentales a nivel central y hacen parte de lo que algunos autores han denominado un “sistema” supervisor de la atención, que alterna el flujo de la información, funcionando como una “compuerta” entre el contenido mental interno y el contenido que surge de la interacción con el mundo exterior. Siendo la región más antero-medial-rostral de la corteza prefrontal la más activa cuando se realizan actividades orientada por estímulos (por ejemplo: observar algo) y la región latero-rostral de la corteza prefrontal la más crucial en actividades independientes de estímulos (por ejemplo: planear una acción). Además se ha reportado la participación de esta área en la transición entre el procesamiento cognitivo independiente del estímulo y el proceso cognitivo orientado por estímulos. Esta habilidad de intercambiar el foco de la atención permite la exploración de situaciones complejas, la organización de las acciones para metas futuras y la escogencia de un comportamiento cuando el estímulo es nuevo o cuando se han generado varias opciones a un mismo estímulo. (9) (51) (52)

En otras tareas en la que se ha visto activación de la corteza prefrontal rostral en estudios de neuroimagen es en la recuperación de la memoria episódica (memoria relacionada con procesos autobiográficos) y en la memoria prospectiva (aquella que mantiene las intenciones y planes de acción a futuro). Varios autores han sugerido que la principal función de esta zona es la integración de diversos tipos de información con el objetivo de alcanzar una meta, permitiendo al mismo tiempo diversificar la atención para mantener en mente propósitos a corto y largo plazo, mientras se realiza una actividad. (52, 53)

Estudios de pacientes con lesiones en la corteza prefrontal rostral han mostrado que estas no causan un deterioro cognitivo pero si genera un impedimento en la iniciación y desarrollo de las actividades, especialmente si son varias al mismo tiempo, ya que requieren cierta concentración para mantener una idea y reflexionar en ella mientras se interacciona con el mundo exterior. De esta manera, se ha observado deterioro en dos clases de situaciones: a) En aquellas que requieren organización de las acciones con antelación, para así, optar por el curso de acción más adecuado para cumplir un objetivo; y b) en situaciones en las que se requiere autodeterminación para mantener la atención constante en una meta. (52, 54-56) Sin embargo, estos pacientes conservan gran parte de sus habilidades de lenguaje, cognitivas, sociales, de percepción, funciones ejecutivas y de memoria retrospectiva. (57-60)

Esta dificultad en el desarrollo de varias tareas al tiempo parece estar relacionada con el deterioro para ejecutar acciones planeadas previamente, por lo cual se asocian las lesiones del área 10 con un detrimento en la memoria prospectiva. Gracias a estudios de neuroimagen (61, 62), se han sugerido que el área 10 (porción lateral) puede estar más involucrada en el mantenimiento de la “intención” que en la ejecución de la acción. Mientras que la porción medial se encuentra más activa en condiciones en las cuales aun se está realizando la acción, es decir, cuando el sujeto debe responder de manera oportuna al cambio. Esto permite decir que la CPF rostral lateral y medial soporta un sistema de atención que responde a los cambios del medio en tiempo real y a las tareas que se tienen en mente para realizar en el futuro. (51, 54, 56)

Otra función atribuida al área 10 es el proceso de la metacognición, el cual consiste en la reflexión sobre los propios pensamientos de manera consciente y controlada. Esta autorregulación explicaría la capacidad de aprendizaje del ser humano, además de la habilidad en comprender y atribuir pensamientos e intenciones a otro individuo. (55, 57, 63, 64)

Ramnani & Owen (9), también estudiaron las funciones de la corteza prefrontal y sugirieron tres funciones. La primera, explica un modelo de recuperación de la información, el cual requiere de un estado cognitivo apropiado, además de un estímulo

externo “clave” que facilite recordar la información, haciendo de este un pensamiento consciente que se mantiene durante el desarrollo de una tarea, y así llevarla a cabo con éxito. Esta interrelación y recuperación de datos mientras se mantiene la atención en una actividad requiere la participación de varios sectores corticales entre ellos la región anterior del cíngulo, la corteza frontal ventro-lateral y dorsolateral. Lesiones en el área 10 o en alguna de estas otras zonas han mostrado un deterioro en los mecanismos de recuperación y reconocimiento de los recuerdos. (65) (66, 67)

La segunda función sugerida es la “diversificación y reubicación de la atención”, actividad llevada a cabo por la corteza frontopolar medial. Esta habilidad permite mantener en mente las metas mientras se explora y se consiguen metas secundarias, lo cual hace necesario la vinculación de la memoria operativa y la prospectiva. Por lo tanto, la diversificación de la atención entre tareas permite mantener la información presente mientras se obtienen subtareas y se retorna a la tarea principal. Esto constituye una actividad cognitiva compleja e involucra adicionalmente planeación, resolución de problemas, toma de decisiones e intercambio del foco de atención. (68, 69)

La tercera función adjudicada al área 10 por Ramnani & Owen (9), es la integración y relación del conocimiento, es decir, el considerar de manera simultánea las múltiples relaciones entre los objetos y pensamientos, permitiendo un razonamiento más complejo para generar una conclusión. (70, 71) (72-74)

2.3 ORGANIZACIÓN Y CLASIFICACIÓN DE LAS INTERNEURONAS GABAÉRGICAS EN LA CORTEZA CEREBRAL

Las interneuronas conforman aproximadamente el 25-30% de la población neuronal cortical en el primate, se caracterizan por poseer pocas o ninguna espina dendríticas, un soma de tamaño reducido en comparación a la piramidal en el cual reciben las aferencias excitatorias e inhibitorias, con un axón corto que se proyecta localmente sobre la columna de origen y lateralmente sobre las columnas vecinas, pero no sobre la sustancia blanca

hacia otras regiones cerebrales. Se encuentran ubicadas en mayor proporción en las cortezas agranulares y disgranulares 44-50%, y en las granulares en un 36-37%, con un mayor porcentaje para aquellas que expresan CR (13-29%), seguido por las que expresan PV (8-13%), y por último las que expresan CB (10-12%). Participa en la modulación de la actividad cortical, regulación que está definida por las características moleculares, fisiológicas y morfológicas de cada subtipo celular; y su capacidad de interactuar con otras neuronas en diferentes dominios (segmento inicial del axón, alrededor del soma y en las dendritas) impacta en la modulación de las aferencias dendríticas, en la sumatoria de las aferencias en el soma y en la generación de potenciales de acción en el axón de las neuronas piramidales. (5, 75-77)

Las interneuronas corticales o neuronas de circuito local denominadas también como células Golgi tipo II, en su gran mayoría utilizan como neurotransmisor el ácido-γ-aminobutírico (GABA), constituyendo el componente inhibitorio de la corteza cerebral. Se ha reportado que las neuronas piramidales e interneuronas se originan en la zona ventricular de las regiones dorsales y ventrales del telencéfalo denominadas el palio y el subpalio durante el desarrollo embrionario, migrando radial y tangencialmente a través de la zona intermedia hasta alcanzar su posición definitiva en la corteza cerebral. (78-82)

Se ha documentado que el origen específico de las neuronas Gabaérgicas son diversas zonas del subpalio (eminencia ganglionar medial y lateral, el área entopeduncular anterior y el área retrobulbar). Adicionalmente, algunos autores han sugerido que cada zona puede producir diversos tipos celulares dependiendo de su estadio de desarrollo, pero que en general la zona progenitora impacta en la forma de migración hacia la corteza y en las características futuras de la interneurona. (83-85)

Zecevic, Hu y col (76) mencionan que en el cerebro fetal humano las interneuronas Calretinina (CR) y Calbindina (CB) positivas se presentan desde periodos embrionarios tempranos y se mantiene constantes durante el periodo fetal. Generadas inicialmente en la eminencia ganglionar medial, migran tangencialmente hacia la lámina plexiforme primitiva alrededor de la semana 5-6 de gestación; siendo las primeras células en poblar la placa cortical pero siguiendo un orden de adentro hacia fuera. Esto podría indicar que estas dos subpoblaciones de interneuronas corticales podría influenciar la neurogénesis

además de impactar en la actividad proliferativa de otras zonas (subventricular y ventricular) y de ser una fuerza inductora del desarrollo cortical. (86) Se ha reportado que cerca del 35% de las interneuronas Gabaérgicas en la placa cortical corresponden a las originadas en la Eminencia Ganglionar y el 65% restante a las originadas en las zona ventricular. El aumento en el número de células en la segunda mitad de la gestación y su correspondiente migración hacia la corteza podría explicar el por qué del mayor tamaño de las láminas supragranulares (II-III) en los primates. (87, 88)

Alrededor de la mitad de la gestación el número de neuronas que expresan CB y CR se incrementan ubicándose en la parte superior de la placa cortical, mientras que otros tipos de interneuronas (aquellos que expresan Parvalbúmina, Somatostatina y Neuropéptido Y) se evidencian más esparcidos en la parte inferior, volviéndose más numerosos en la segunda mitad de la gestación. (87)

Desde las primeras descripciones de las interneuronas corticales hace más de un siglo hechas por Santiago Ramón y Cajal, hasta el presente, los investigadores han generado diferentes clasificaciones de estas, basándose en algunas características morfológicas, bioquímicas, electrofisiológicas, de conectividad, o por combinaciones de varias de estas. Sin embargo, la clasificación no es siempre compatible ni generalizable, provocando inconvenientes al hacer referencia a un subtipo celular particular. Por esta razón, en Julio del año 2008 se publicó la Terminología de Petilla (89), nomenclatura ideada por un grupo de científicos con el objetivo de generalizar un lenguaje común al referirse a las interneuronas Gabaérgicas de la corteza cerebral. Los autores de la Terminología de Petilla sugieren tres características a tener en cuenta para categorizar las interneuronas en la corteza cerebral: morfológicas, moleculares y fisiológicas (Ver Figura # 1 y 2). (89-91)

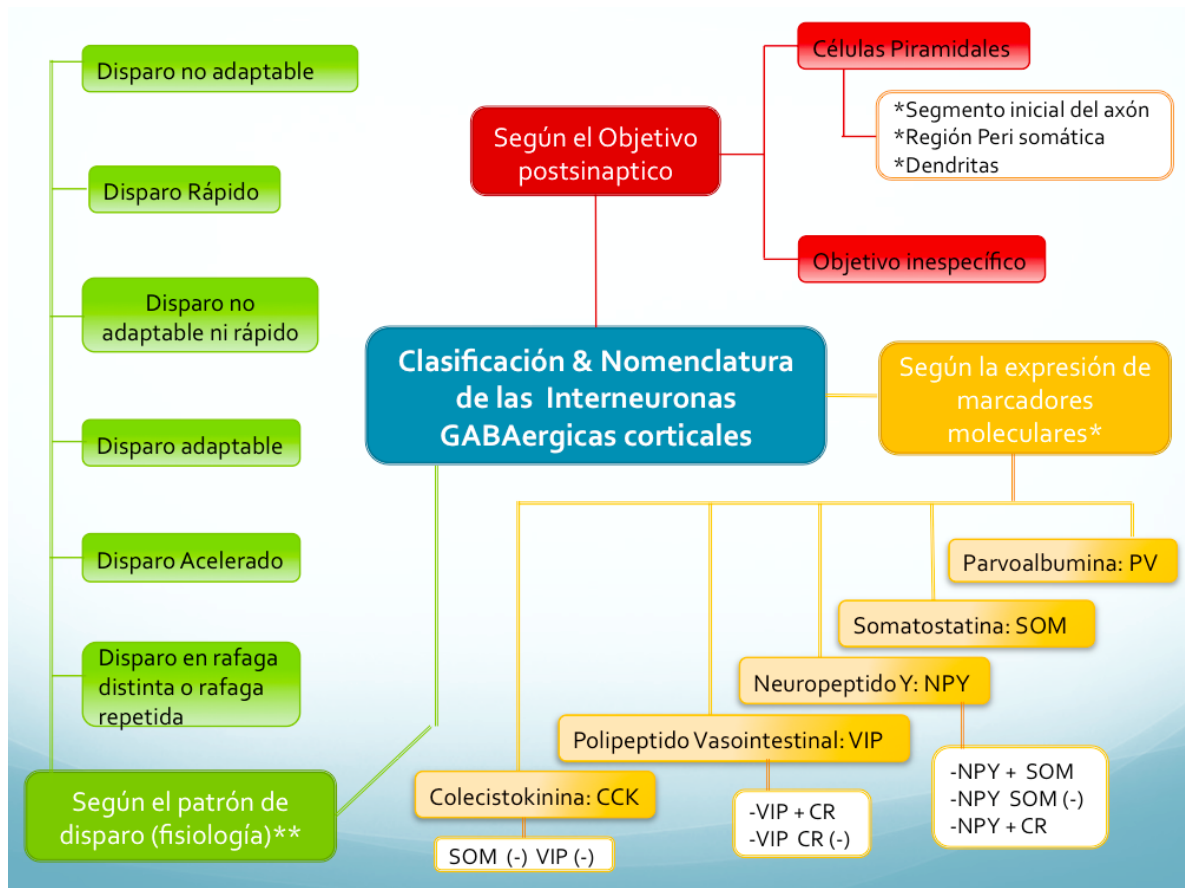


Figura 1: Mapa que resume los criterios de organización de la nomenclatura y clasificación morfológica, molecular y fisiológica de las interneuronas Gabaérgicas corticales. El mapa muestra los marcadores moleculares predominantes en las Interneuronas. Convenciones: (+) = co-localización con otro marcador, (-) = no co-localización con otro marcador. Esta clasificación molecular puede subdividirse en múltiples categorías, por ejemplo: factores de transcripción, neurotransmisores, enzimas sintetizadoras, neuropéptidos, proteínas atrapadoras de calcio, receptores, proteínas estructurales, canales iónicos, conexinas, transportadores de membrana; también según el lugar embrionario de origen (Eminencia Ganglionar Medial, Eminencia Ganglionar Dorso caudal y Área Preóptica). En la clasificación fisiológica se enuncian 6 patrones de disparo. Tomado de las publicaciones del Grupo de Petilla (89, 91).

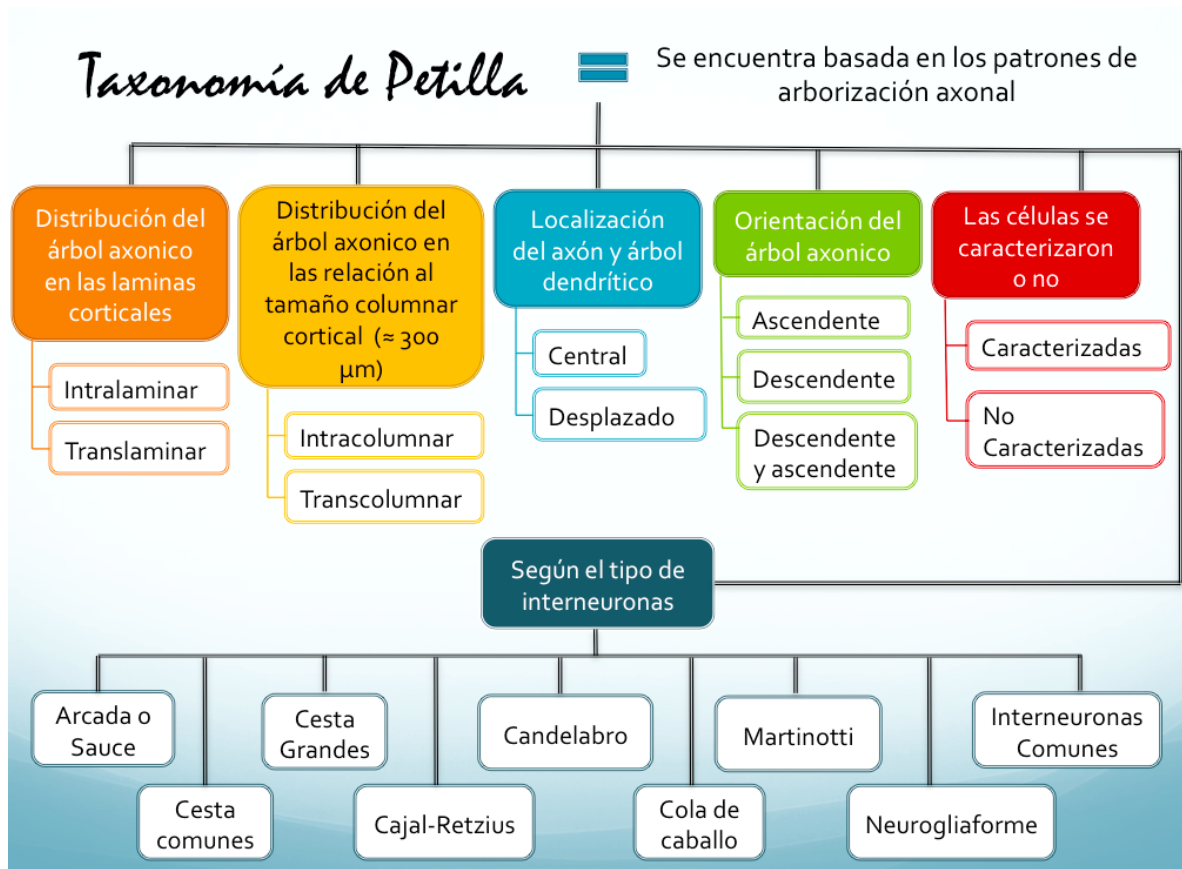


Figura 2: Taxonomía propuesta por el grupo de Petilla (2013), basada en los patrones de arborización axonal de las interneuronas (en la parte superior), y los subtipos morfológicos (en la parte inferior). Tomado de las publicaciones del Grupo de Petilla (89, 91).

A continuación se describen cada uno de los subtipos morfológicos de las interneuronas Gabaérgicas corticales, considerando varias clasificaciones hechas hasta el momento, incluyendo la taxonomía de Petilla.

Células en Cesta: Se caracterizan por establecer sinapsis en los somas y dendritas proximales de las neuronas piramidales y de otras interneuronas formando canastos o nidos con sus terminaciones axonales. Se han descrito diferentes subtipos (grandes, medianas y pequeñas) de acuerdo con el tamaño del soma y la extensión de su axón. Su soma es de apariencia bipolar en las láminas II-III y multipolar en la lámina IV, sus dendritas no poseen espinas, y su axón es ampliamente ramificado y en algunos casos

con varicosidades, alcanzando columnas corticales vecinas y las láminas inmediatamente adyacentes a la de ubicación del soma. Su modo de disparo es de espiga rápida no-adaptable. Además de GABA, utiliza otros neurotransmisores como Neuropéptido Y, Colecistokinina y Somatostatina. Expresa dos CaBPs CB o PV. (92, 93)

Células en Candelabro: Se caracterizan por ejercer su actividad sobre el segmento inicial del axón de la neurona piramidal, impactando en la respuesta de esta célula a la sumatoria de aferencias recibidas en el soma y en las dendritas provocando un cambio en su eferencia (de sincronización con otras neuronas piramidales vecinas). Poseen apariencia multipolar o bipenachada, su axón es ramificado por debajo del soma con terminaciones en “cartucho”. Su modo de disparo es de espiga rápida no-adaptable. Se ha reportado su presencia en las láminas II a la IV y pueden expresar como CaBPs CB o PV, con predominio de esta última. (94-96)

Células de Martinotti: Establecen sinapsis sobre las dendritas apicales distales de las piramidales gracias a la orientación de su axón hacia la lámina I y la amplia ramificación del mismo en ésta, logrando impactar en la actividad de varias columnas además de la propia al prolongarse varios milímetros horizontalmente. Su morfología suele ser bipenachada pero con un árbol dendrítico más prominente, se ubican entre las láminas II y VI. Su modo de disparo es adaptable, de espigas regulares o en ráfaga. Utiliza como neurotransmisor además de GABA, Somatostatina. Expresa como CaBPs CR o CB, con predominio de esta última. (77, 89, 91)

Células Bipolares: Se caracterizan por tener un soma pequeño y ovoide o en forma de huso, con una dendrita que emerge de cada extremo del soma, que luego se ramifica atravesando varias láminas corticales, y un axón que se deriva de una dendrita. Se ubican entre las láminas I y VI, con predominio en ésta última. Realiza sinapsis (con disparos que pueden ser regulares e irregulares) sobre las dendritas basales de las neuronas piramidales. Su modo de disparo es adaptable, de espigas regulares o en ráfaga. Utilizan como neurotransmisor además de GABA, el Polipéptido Vasointestinal, y expresan como CaBPs CR. (77, 89, 91)

Células Bipenachadas o Doble Bouquet o Cola de Caballo: Poseen un soma mediano a grande de forma ovoide y procesos primarios con una morfología bipenachada, su axón está conformado por un fascículo muy estrecho, que se origina de un axón principal que genera colaterales que se extienden sobre todas las láminas. Estas colaterales poseen unos botones que realizan sinapsis sobre las dendritas basales y apicales (espinas y ejes dendríticos) de las neuronas piramidales. Su soma se ubica predominantemente sobre las láminas supragranulares y su axón se extiende verticalmente hasta las láminas infragranulares. Su modo de disparo es adaptable, de espigas regulares o en ráfaga. Utilizan como neurotransmisor además de GABA, el Polipéptido Vasointestinal o Colecistoquinina, y expresan como CaBPs CB o CR. (97)

Células Neurogliaformes: Denominadas así porque su tamaño y la arborización de sus procesos la asemejan al de los astrocitos. Es una célula de soma pequeño con finas proyecciones dendríticas que se proyectan radialmente cerca a la vecindad del soma y su axón presenta abundantes ramificaciones enmarañadas. Establece sinapsis sobre las dendritas basales de las neuronas piramidales. Se ubican entre las capas II y VI, con predominio en las láminas intermedias (III, IV y V). Su modo de disparo es adaptable, de espigas regulares o en ráfaga. Utilizan como neurotransmisor además de GABA, Colecistoquinina o Somatostatina, y expresan como CaBPs CR o CB, con predominio de esta última. (77, 89, 91)

Células Horizontales de Cajal Retzius: Se localiza únicamente en la lámina I con proyección de sus dendritas y axón horizontalmente limitándose a esa lámina. Su morfología es multipolar con apariencia aplanada u ovoide del soma. Abundantes durante el desarrollo embrionario y escasas en la adultez. Sus sinapsis las establece sobre las terminales dendríticas apicales de las neuronas piramidales que ascienden hasta la lámina I. Su modo de disparo es adaptable, de espigas regulares o en ráfaga. Utilizan como neurotransmisor GABA y expresan como CaBP CR. (98-100)

Como se aprecia en la descripción anterior sobre las interneuronas de acuerdo con su clasificación morfológica hay tres modos posibles de disparo de las mismas, el cual está directamente relacionado con la CaBPs que expresan. Esta asociación fue establecida por las investigaciones del Departamento de Neurociencias y Psiquiatría de la Universidad

de Pittsburgh en asociación con el Departamento de Fisiología y Neurociencias Médicas de la Universidad de Carolina del Sur. (4, 5)

Así, las neuronas que expresan PV (células en cesta y en candelabro) presentan un patrón de disparo rápido no-adaptable (Fast-spiking), las células que expresan CB o CR (doble bouquet, bipenachadas, neurogliaformes, etc.) presentan un patrón de disparo no-rápido y adaptable, que puede ser regular (Regular-spiking) o en ráfagas (Burst-spiking). (4, 5)

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Aunque muchos investigadores reconocen el papel de las áreas prefrontales en las funciones más complejas de la cognición humana, y en particular, a través de las conexiones cortico-corticales que hacen las láminas supragranulares, pocos estudios se han enfocado en la valoración de las características morfológicas de subpoblaciones de interneuronas Gabaérgicas de estas áreas, en particular de aquellas que mayor desarrollo han tenido en el humano dentro de la línea primate, como el área 10. El sistema Gabaérgico en las áreas prefrontales es el último componente celular en culminar su proceso de maduración durante el desarrollo post-natal, proceso que concurre con el desarrollo paralelo de las funciones abstractas en el humano, las cuales como se observó en la revisión bibliográfica son de difícil acceso en modelos animales, pero de gran interés para las neurociencias pero en especial para la neuropsicología y psiquiatría que buscan comprender las bases cerebrales del comportamiento humano. El área 10 en el humano ya cuenta con diversos estudios desde la neuroimagenología, se le ha vinculado con diversas funciones, todas del más alto nivel de complejidad en la cognición. Por todo lo anterior, se hace imperioso el abordaje microestructural de la misma. Ya se ha estudiado su particular crecimiento en el humano y en el primate, su subespecialización en la superficie medial, y las especificidades morfológicas de las neuronas piramidales en la lámina III, pero poco se conoce de la organización de las neuronas Gabaérgicas en la capas supragranulares. El estudio de las características citomorfológicas de las interneuronas en el área 10, además de proporcionar un estándar de organización “normal” susceptible de ser comparado con condiciones patológicas (como la esquizofrenia, el autismo, entre otras), pueden dar luces sobre las conexiones y funciones de las mismas, lo cual podría dar cuenta de la actividad neuronal de esta área y explicar la emergencia de funciones tan particulares.

El correlato neurobiológico de las asimetrías funcionales corticales sólo ha sido abordado exitosamente en las regiones asociadas con la comprensión y articulación del lenguaje como el planum temporale (giro temporal superior- área de Wernicke) y el giro frontal

inferior (giros opercular y triangular, o área motora de Broca) (Paul Broca 1861- 1863, Carl Wernicke 1874, Norman Geschwind y Walter Levistky 1960). En la corteza prefrontal, aunque también se han identificado algunas diferencias funcionales interhemisféricas, la búsqueda de las bases celulares de las mismas ha sido escasa hasta el momento. El Centro de Estudios Cerebrales de la Universidad del Valle (3, 104, 105), en la última década ha realizado varios estudios buscando asimetrías interhemisféricas en algunas áreas prefrontales (9, 10, 11, 24 y 46) del humano, en particular, en algunas características histológicas gruesas como espesor cortical, espesor laminar, distribución laminar de la población total neuronal, densidad neuronal por láminas o en la distribución laminar de algunas poblaciones de neuronas piramidales o de las interneuronas, pero en ninguna de estas variables se han hallado diferencias significativas. Hasta el momento no se han abordado características citoarquitectónicas o morfológicas más puntuales como el tamaño y la forma del soma, y el número de procesos de cada subpoblación de interneuronas Gabaérgicas, o diferencias en la distribución de las tres subpoblaciones de interneuronas identificadas con las CaBPs por lámina, ya que siempre se ha valorado una subpoblación u otra pero no las tres de manera simultáneamente.

Por tanto, en el presente trabajo nos proponemos dar respuesta a la siguiente pregunta:

¿Las subpoblaciones de interneuronas corticales de las láminas II y III del área 10 del humano, identificadas con marcadores contra las CaBPs Parvalbúmina, Calbindina y Calretinina, presentan características citomorfológicas diferentes entre sí o entre láminas supragranulares, o entre sectores homólogos en los dos hemisferios?

4. OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GENERAL

Caracterizar morfológicamente las subpoblaciones de interneuronas gabaérgicas de las láminas II y III del área 10o de la Corteza Prefrontal Humana.

4.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS

-Establecer la distribución de las subpoblaciones de interneuronas en las láminas supragranulares, para el área 10o de la Corteza Prefrontal Humana, identificadas con las proteínas atrapadoras de calcio PV, CB y CR.

-Comparar la distribución de las subpoblaciones de interneuronas entre los dos hemisferios cerebrales, en el área 10o de la Corteza Prefrontal Humana.

-Determinar las características morfológicas de tamaño, forma del soma y número de procesos primarios, en las neuronas inmunoreactivas a las proteínas atrapadoras de calcio (PV, CB, CR) ubicadas en las láminas supragranulares (II-III) del área 10o de la Corteza Prefrontal Humana.

-Comparar las características morfológicas de las tres subpoblaciones de interneuronas, identificadas con cada proteína atrapadora de calcio (PV, CB, CR), en las láminas II y III del área 10o de la Corteza Prefrontal Humana.

-Comparar las características morfológicas de las interneuronas identificadas en el área 10o de la Corteza Prefrontal Humana, entre las dos láminas valoradas intra e interhemisféricamente.

-Identificar si existe correlación entre los parámetros morfológicos valorados en las láminas II y III del área 10o de la Corteza Prefrontal Humana, por cada subpoblación de interneuronas.

-Identificar grupos de interneuronas Gabaérgicas con características morfológicas similares en las láminas supragranulares del área 10o de la Corteza Prefrontal Humana.

5. METODOLOGIA

5.1 SELECCIÓN Y PROCESAMIENTO DEL TEJIDO CORTICAL

En el presente trabajo se utilizó tejido post-mortem humano recolectado a través de un convenio con el Instituto Nacional de Medicina Legal y Ciencias Forenses de las ciudades de Bogotá y Cali entre los años 2006 y 2007. Se recogió material histológico de las áreas prefrontales 10, 46, 24 y 9 de ambos hemisferios cerebrales, utilizando como criterios de localización topográfica la subdivisión cito-arquitectónica sugerida por Ongur & Price en el 2003. (18) La muestra se tomó mediante cortes perpendiculares a la superficie cortical sobre las crestas de los giros corticales hasta la sustancia blanca subyacente, obteniendo un bloque de 1cm³ (Ver Figura # 3: Localización anatómica del área 10 y localización macroscópica de la toma de muestra).

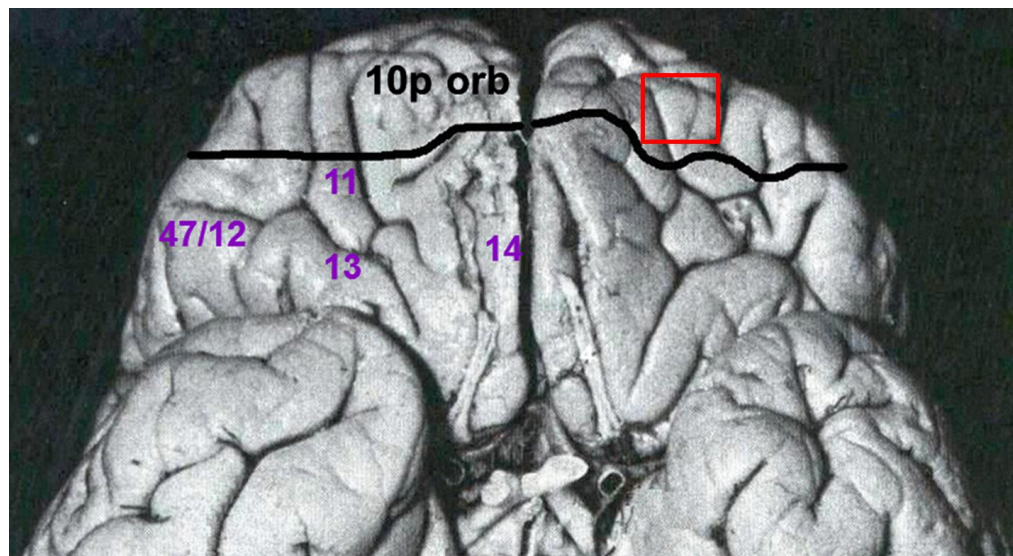


Figura # 3: Ubicación del área 10p en la superficie orbital de la corteza prefrontal, de acuerdo con la nomenclatura de Öngür y col. (2003). Imágenes tomadas de Pimienta y Cruz (1986), con permiso de los autores. Los números en violeta, identifican la ubicación de áreas citoarquitectónicas vecinas al área 10p. El cuadrado de borde rojo, indica la ubicación para la toma de muestra del tejido de las placas histológicas del presente estudio.

Tabla 2. Datos demográficos de los sujetos post-mortem

SUJETOS	GENERO	EDAD	PMI (hrs)	CAUSA DE MUERTE
C1	M	45	12	Herida por arma de fuego en región precordial
C4	M	32	13	Herida por arma de fuego en región precordial
C9	M	29	9	Herida por arma de fuego en tórax y abdomen
C10	M	47	23	Politraumatismo
C11	M	26	13	Herida por arma corto punzante en región precordial

M: Masculino; PMI: intervalo post-mortem (hrs)

El procedimiento para almacenar, preservar y procesar histológicamente las muestras, se describe ampliamente en Buriticá y col. (2009), y a continuación se expone brevemente.

Una vez extraídas las muestras de tejido del cerebro, se lavaron en Solución Salina al 10% durante 10 minutos y se fijaron de 6 a 10 días (4° C) en para formaldehído-lisina-periodato de sodio (pH 7.4). El tejido fue cortado en un Vibratomo (Lancer Vibratome series 1000®), donde se realizaron secciones coronales de 50 µm de espesor, los primeros cortes fueron marcados con azul de toluidina para comprobar la orientación de los cortes y su integridad. Se realizaron cortes consecutivos de los tejidos por hemisferio para ser sometidos a reacciones inmuistoquímicas específicas. El tejido post-mortem se sumergió en suero de bloqueo normal de caballo (Vectastain Elite ABC – Elite PK – 6102 Mouse Ig G, Vector Laboratorios ®) al 1,5 % en PBS durante 40 minutos, para evitar la adhesión de antígenos inespecíficos. Posteriormente se incubó el tejido durante 18 horas en los anticuerpos primarios. NeuN es una proteína asociada al ADN nuclear de las neuronas, aunque su marcación se expande al soma y algunos procesos dendríticos proximales (Mullen et al, 1992, Gittins y Harrison 2004). Su marcación intensa permite la caracterización de la población neuronal en forma, tamaño, cito-arquitectura y laminariedad. Las proteínas atrapadoras de calcio (CaBPs) Parvalbúmina, Calbindina y Calretinina, permiten la identificación específica de tres subpoblaciones de interneuronas presentes en la corteza cerebral. Los anticuerpos primarios se diluyeron en PBS con Tritón X-100 al 0.5%, así: NeuN (anticuerpo neuronal monoclonal de ratón, Monoclonal Anti-neuronal nuclei – NeuN. Chemicon International - MAB377®) en una proporción de 1:2500, y Parvalbúmina (anticuerpo parvalbumina monoclonal PARV-19 P-3088, Sigma St

Louis, MO), Calbindina (anticuerpo calbindina monoclonal D-28K, clon CB-955, G9848, Sigma) y Calretinina (anti-calretinina policlonal clon AB-149 Chemical International) se diluyeron 1:5000. Los controles negativos se sometieron al mismo protocolo previamente descrito, con excepción de la incubación en el anticuerpo primario. Posteriormente se trataron los tejidos con anticuerpos secundarios biotinilados diluidos en PBS en proporción 1:200, luego 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 (24° C).

Se seleccionaron aquellas muestras correspondientes a 5 sujetos, que al observarlas al microscopio (Axio Scope A1 Zeiss) en objetivo de 10x, cumplieran con los siguientes criterios:

- a) Integralidad del tejido, marcación homogénea y pocos o ningún accidente anatómico.
- b) Se excluyeron aquellas placas en las cuales se observó desintegración del tejido, sobre-exposición al revelador y/o marcación no uniforme.

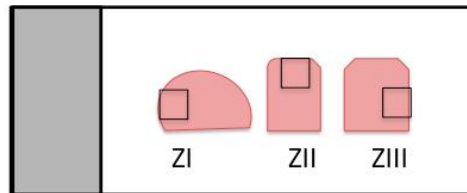
5.2 REGISTRO Y ANÁLISIS DE IMÁGENES

Se realizó un registro fotográfico de las placas histológicas con la asistencia de una cámara digital (Cámara Axio Cam HRc Zeiss) acoplada al microscopio (Axio Scope A1 Zeiss), para obtener imágenes de alta resolución con objetivos de 10x y 40x. De las imágenes capturadas con el objetivo de 10x se obtuvieron las mediciones de espesor cortical, espesor laminar y cuantificación de somas neuronales para determinar la densidad celular de la subpoblación neuronal marcada con cada anticuerpo; mientras con las imágenes del objetivo de 40x, se obtuvieron las mediciones de tamaño, forma y número de procesos primarios. El análisis de las imágenes y la toma de las mediciones consideradas se hicieron con la asistencia del programa Sigma Scan-Pro 5 (SPSS, Chicago – Illinois). Las imágenes del tejido, fueron inicialmente calibradas con la ayuda de imágenes tomadas en las mismas condiciones de las primeras, del micrómetro tipo A MBM11100 Stage micrometer objetivo NIKON ® de 1mm. A continuación se describe el proceso para registrar y analizar las imágenes obtenidas con cada magnificación.

5.2.1 Imágenes y mediciones en 10x:

De cada marcador (NeuN, CB, CR y PV) se obtuvieron tres **“campos fotográficos”** contruidos a partir del programa Photo Stitch de Canon, teniendo como base imágenes fotográficas de cada lámina cortical a un objetivo de 10x. Estos campos deben cumplir la condición de incluir en su totalidad la profundidad de la corteza cerebral, tal como se ilustra en la Figura # 4.

1. Paso: Selección de los campos fotográficos



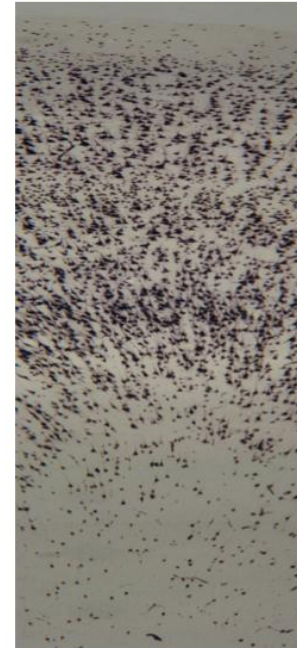
Ejemplo: selección de las mejores zonas observadas al microscopio a un objetivo de 10x para el registro fotografico



2. Paso: Toma de las Fotografías

Fotografías desde la pia hasta la sustancia blanca que incluyan la extensión vertical de la corteza por lamina cortical

3. Paso: Empalme Fotografico con Photo Stitch



Empalme de las fotografías tomadas con la Camara Axio Cam HRc Zeiss acoplada al Microscópio Axio Scope A1 Zeiss , zoom de 4x con un lente de objetivo a 10x.

Figura # 4: Selección de los mejores zonas para los campos fotográficos y empalme de las imágenes (ZI: Zona 1, ZII: Zona 2, ZIII: Zona 3)

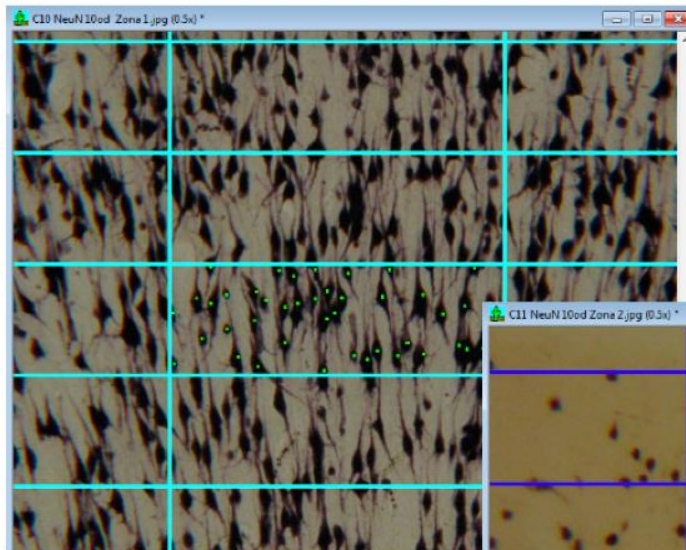
Posterior al empalme fotográfico se realizó la medición del espesor cortical y laminar en los tres campos fotográficos. Para ello se tomaron 3 medidas en lugares diferentes, al extremo derecho, al extremo izquierdo y en el centro de la fotografía. Luego se ubicó una “ventana” de 300 x 100 μ m hacia el centro de cada lámina cortical, en la cual se realizaron los conteos.

En consecuencia, para la cuantificación de las neuronas positivas a la marcación de las proteínas atrapadoras de calcio (PV, CR, CB) y a NeuN por lámina, hemisferio y sujeto, se hicieron las siguientes observaciones:

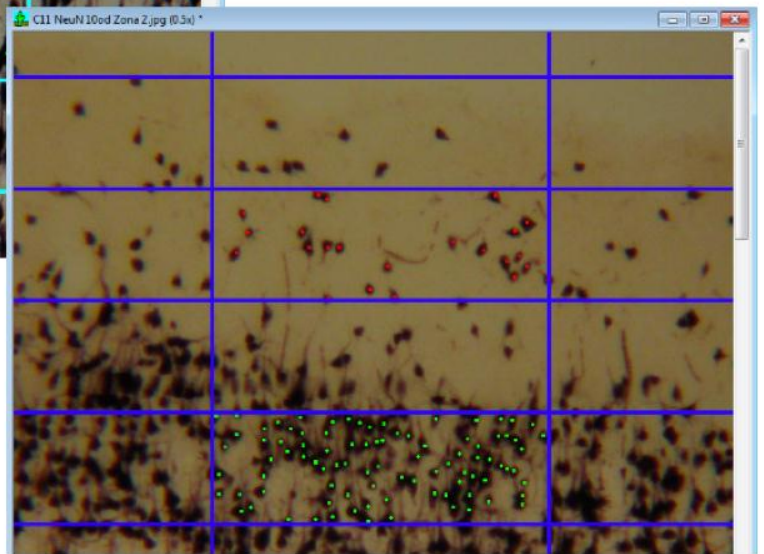
Sujeto x Campo Fotográfico x Ventana de conteo x Lámina Cortical x Hemisferio: 5 X 3 X 1 X 2 X 2 = 180 observaciones. 180 observaciones por cada marcador inmunohistoquímico (4) = 720 observaciones.

El número de observaciones para las medidas de espesor laminar y cortical fueron: 5 sujetos x 3 campos fotográficos x 3 medidas repetidas x 6 láminas x 2 hemisferios = 540 observaciones (ver Figura # 5).

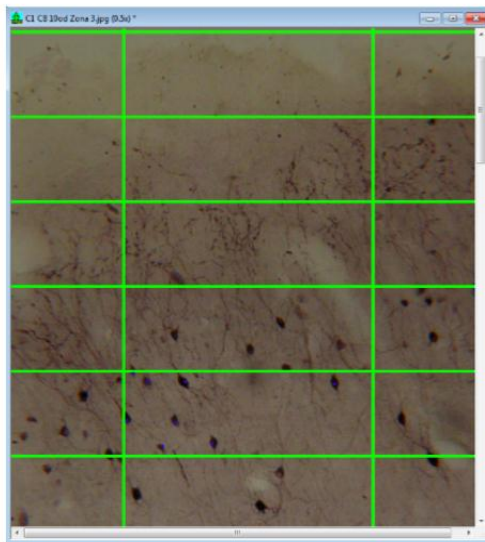
Conteo por marcador inmunohistoquímico NeuN



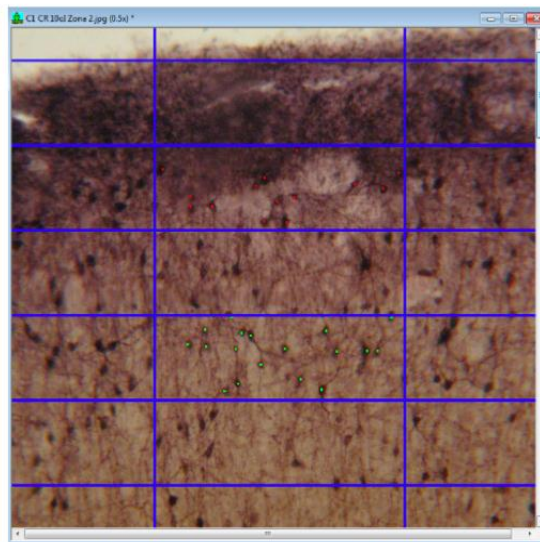
Se utilizaron Ventanas de conteo de 300 um de ancho por 100 um de largo



Conteo por marcador inmunohistoquímico CaBPs



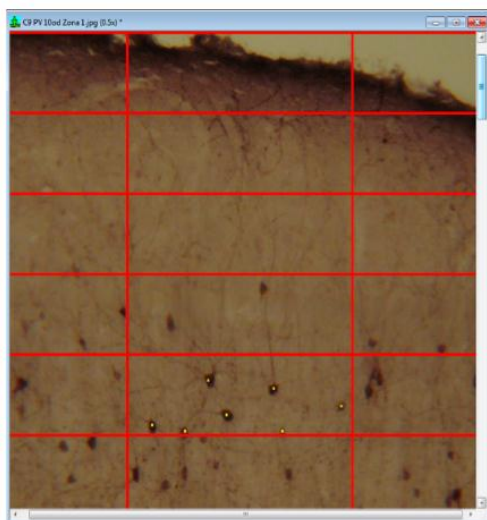
Calbindina



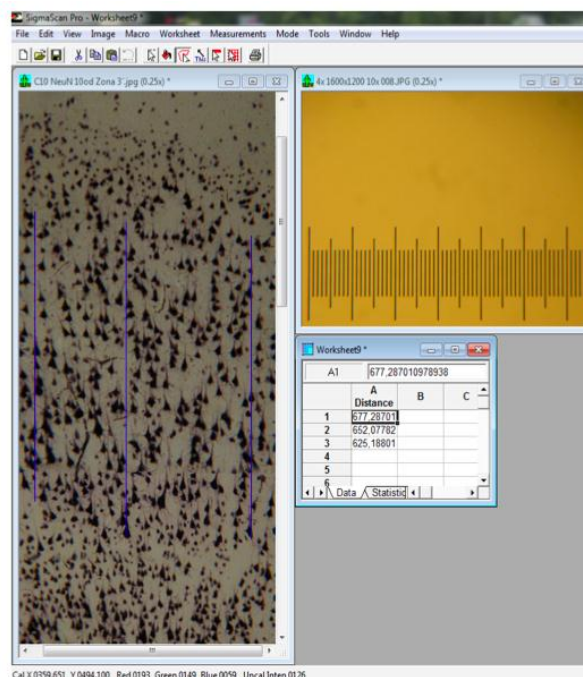
Calretinina

5 sujetos X 3 campos X 6 laminas X 2 hemisferios = 180 X 4 marcadores = 720 observaciones

Conteo por marcador inmunohistoquímico CaBPs

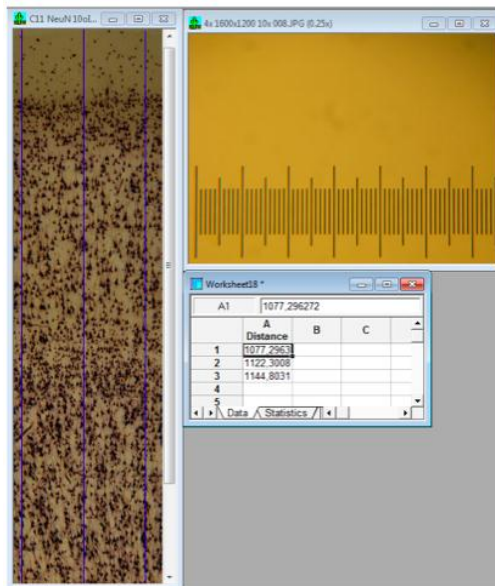


Parvalbumina

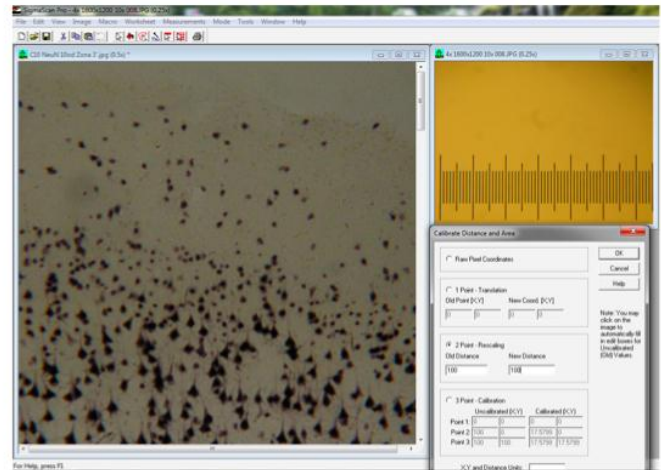


Medidas de Espesor laminar
(marcador NeuN)

Registro del Espesor Cortical (marcador NeuN)



La imagen muestra como se realiza el registro del espesor cortical, cada línea azul corresponde a una medida



Calibración de imágenes digitales

La imagen muestra como se calibran las fotografías en el programa Sigma Scan Pro 5 (SPSS Science, 2000)

Figura # 5: Conteo neuronal y medición del espesor laminar. Esta figura muestra la visualización del programa Sigma Scan Pro, que se utilizó para llevar a cabo los conteos celulares en el presente trabajo. Las fotografías corresponden a diversos sectores de la reconstrucción vertical de la corteza cerebral marcada con los diferentes anticuerpos (NeuN, CB, CR, PV). Después de calibrarse la fotografía se aplica una cuadrícula de 300 x 100 μm sobre la misma. Se escoge la cuadrícula ubicada en el centro de la lámina y se realizan los conteos con un puntero de color diferente. Los datos se almacenan y organizan en una hoja de cálculo para su posterior análisis estadístico. Las medidas de espesor cortical se tomaron en 3 puntos diferentes desde la superficie pial hasta los límites de la lámina VI con la sustancia blanca; de la misma manera se midió el espesor laminar, teniendo como base tres puntos diferente de la corteza donde se iniciaba la lámina correspondiente, estos puntos abarcaban la extensión horizontal de la fotografía y se extendían verticalmente hasta el límite inferior de la lámina a medir.

- El espesor cortical se entiende como la distancia comprendida entre la superficie pial sobre la lámina I y el límite inferior de la lámina VI en la transición hacia la sustancia blanca subcortical, observada en los cortes marcados con NeuN.

- El espesor laminar se estableció identificando los cambios en la densidad celular, morfología, tamaño neuronal y laminar según la literatura y la experiencia de los investigadores del CEC en el estudio de la corteza cerebral.

- La Densidad neuronal por lámina en los cortes marcados con cada anticuerpo, se obtuvo de la relación entre el número total de neuronas contadas en la cuadrícula de 300 x 100 μm sobre el área ocupada por la misma (0,03 mm^2).

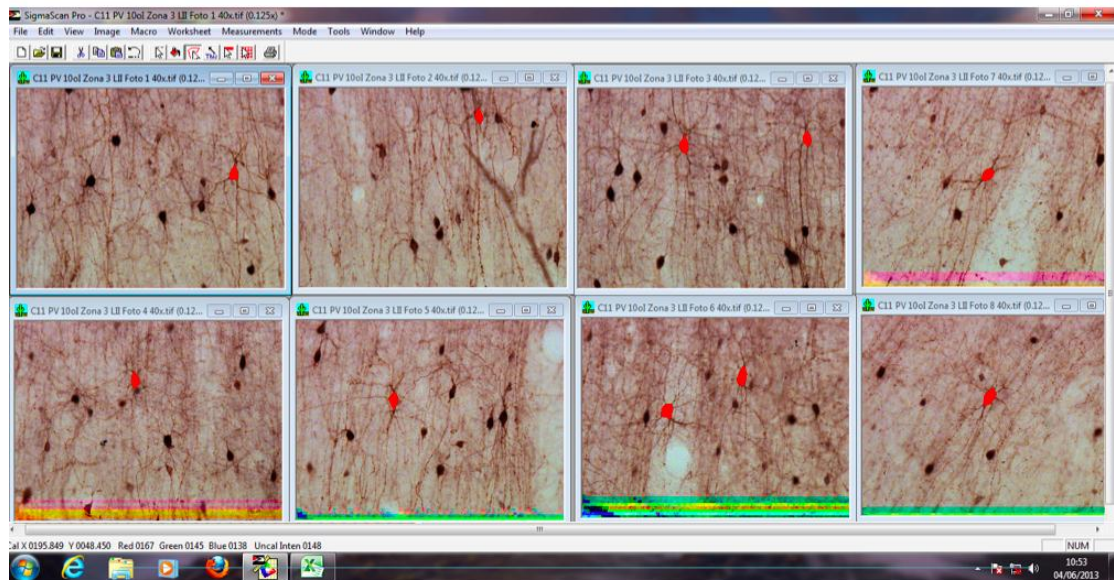
5.2.2 Imágenes y mediciones en 40x:

En esta fase de la investigación, se realizó un registro fotográfico con el objetivo de 40x, el cual permitió la recolección de datos morfológicos de tamaño del soma neuronal (área en mm^2), forma del soma y número de procesos primarios de las células IR a los anticuerpos contra las proteínas atrapadoras de Calcio, manteniendo en lo posible la misma zona cortical en la cual se realizó el conteo neuronal. De cada campo donde se realizaron los conteos neuronales, se escogieron aquellas células que estaban aisladas de otras (no superpuestas), en estado morfológico y de inmunorreactividad, aparentemente normal. Se obtuvo la imagen de 10 células en cada lámina cortical (II y III), en las cuales se analizaron las variables ya mencionadas, por lo cual el número de observaciones esperadas fueron: Sujetos x Campos Fotográficos x Láminas x Hemisferio Cerebral x número interneuronas x proteína atrapadora de Calcio = $5 \times 3 \times 2 \times 2 \times 10 \times 3 = 1800$ interneuronas.

Teniendo cada imagen calibrada y dispuesta en el software Sigma Scan Pro 5, con el puntero se indicaba el número de procesos primarios, se resaltaba el contorno perimetral del soma y el programa determinaba automáticamente el área (en μm^2) y el valor del factor forma o también denominado “grado de esfericidad” (“shape factor”). Los datos se almacenaron y organizaron en una hoja de cálculo para su posterior análisis estadístico (ver Figura # 6).

Todos los conteos celulares y las mediciones morfológicas realizadas (espesor laminar, espesor cortical, conteos neuronales y evaluación de parámetros morfológicos) se hicieron en doble ciego para evitar los riesgos de subjetividad de un solo observador y/o de medidas sesgadas.

Recoleccion de datos Morfológico



Marcador	Sujeto	Zona	Area	INTERNEURONA 1		INTERNEURONA 2		
				# Procesos Primarios	Shape Factor	Area	# Procesos Primarios	Shape Factor
Calbindina	C9	1	70,745439	3	0,612637526	62,93472064	4	0,756679334
		2	50,08250825	3	0,67071158	30,91309131	2	0,833261205

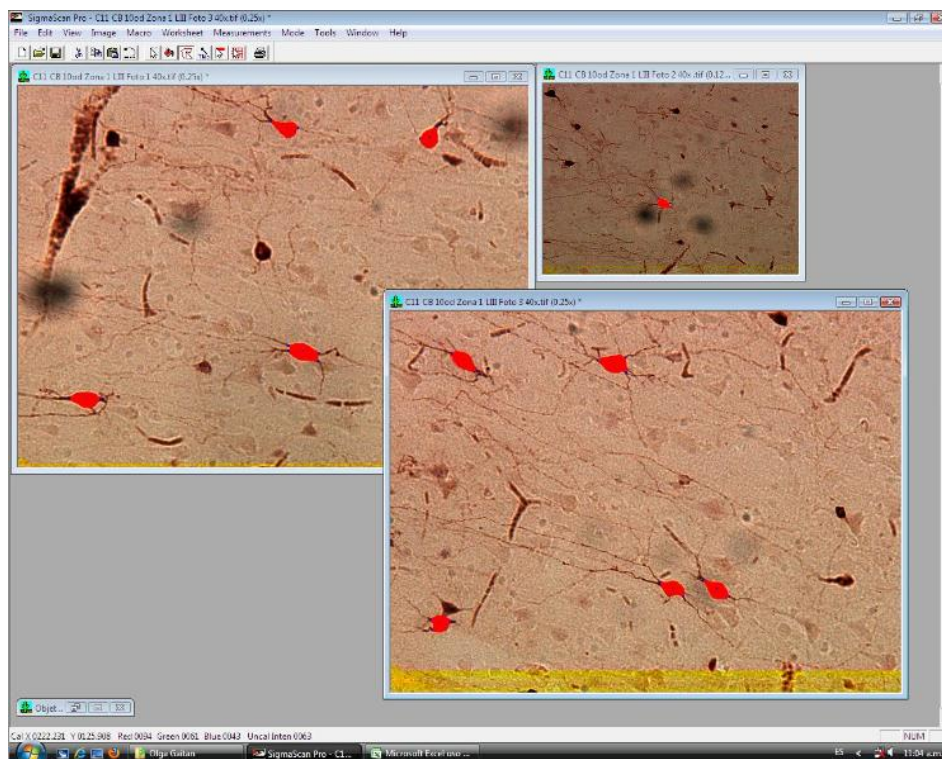


Figura # 6: Registro fotográfico para el análisis morfológico. Las fotografías para el análisis morfológico tomadas a un objetivo de 40x eran calibradas (1 μm = 1 pixel), posteriormente se seleccionaban las interneuronas que cumplían con los criterios de inclusión y con el puntero se indicaba el número de procesos primarios, se resaltaba el contorno perimetral del soma y el programa determinaba el área y el valor del factor forma o también denominado “grado de esfericidad” (shape factor). Los datos se almacenaron y organizaron en una hoja de cálculo para su posterior análisis estadístico.

En la siguiente tabla, se definen y tipifican las variables morfológicas del estudio de las imágenes en 40x, así como se determina la escala o unidad de medida en la que será presentada en los resultados.

Variable	Definición	Tipo	Escala y Unidad de medida
Tamaño del Soma	Es el área del cuerpo de la célula delimitado dentro de su contorno en una imagen en 2D.	Cuantitativa Continua	Micras ² (μm^2)
Forma del soma o grado de esfericidad (“Shape factor” o factor forma)	Determina cuantitativamente la forma de los objetos, este factor establece que tan circular o lineal es un objeto. Una célula con forma completamente circular tienen un valor forma de 1, mientras que una célula muy delgada y alargada tiene un factor forma cercano a 0. Esta medida se obtuvo con la delimitación del soma neuronal y equivale a $a = 4\pi \times \text{Área del objeto} / \text{Perímetro del objeto}^2$. Los valores del factor forma fueron agrupados así: Grupo 1: Somas con factor forma entre 0,400 – 0,5974, poseen un soma con forma fusiforme. Grupo 2: Somas con factor forma entre 0,5975 – 0,7899, poseen un soma con forma irregular o poligonal. Grupo 3: Somas con factor forma entre 0,7900 – 0,982, poseen un soma con forma esférica.	Cuantitativa Continua	<i>Valor del factor forma:</i> de 0 a 1. <i>Categoría de la neurona:</i> 1, 2 o 3, de acuerdo con los grupos
Número de procesos primarios	Se cuantificó el número de procesos originados desde el soma de la interneurona; es importante aclarar que por el tipo de marcación no es posible distinguir entre dendritas y axones.	Cuantitativa Discreta	Número de procesos

Cuadro de las variables morfológicas del estudio. (106)

5.3. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS DATOS

5.3.1 Análisis estadístico de las variables de caracterización:

El análisis estadístico comprende en primer lugar el análisis descriptivo univariado de las láminas corticales permitiendo la caracterización de los sujetos de estudio utilizando medidas de *tendencia central* (promedios y medianas), además de medidas de *dispersión* (desviación estándar). En segundo lugar se realizó comprobación de *hipótesis* usando pruebas no-paramétricas (*Prueba U de Mann-Whitney*) debido a que los datos pertenecían a una muestra pequeña ($n=15$), se compararon como muestras independientes, las variables son de naturaleza cuantitativa en escala continua y otras discretas, las pruebas se corrieron con una significancia del 5% ($\alpha=0,05$), a dos colas (por lo cual la región de rechazo se estableció con una probabilidad de 0,025).

Se realizaron varias comparaciones entre las variables anteriormente descritas (para mayor comprensión ver la Figura # 7), a continuación se explica el proceso.

5.3.2 Análisis estadístico de las variables morfológicas:

Esta fase corresponde a la medición y análisis de las variables de estudio (tamaño del soma, factor forma y numero de procesos primarios) en las interneuronas del área 10 de la CPF según la ubicación laminar, hemisferio y proteína atrapadora de calcio. Se realizaron pruebas de *normalidad* (*Kolmogórov-Smirnov*) para saber cómo se comportan las variables y definir si se trabajaba con pruebas paramétricas (Prueba T- Student para muestras independientes) o no (Prueba U de Mann Whitney). Se resaltarán cuando se encuentre alguna diferencia significativa, acompañadas de su indicación en el texto, en la tabla y gráficos correspondientes.

Para las comparaciones de las variables morfológicas celulares, entre marcadores (CaBPs) por cada lámina analizada (II y III), se tuvo en cuenta si las variables presentaban una distribución normal o no. Por lo tanto, las variables factor forma y tamaño del soma se compararon con pruebas paramétricas para muestras

independientes (T-Student & ANOVA) y la variable número de procesos, se comparó con pruebas no-paramétricas para muestras independientes (Man-Whitney & Kuskal Wallis). Una vez hecho el análisis entre subpoblaciones de interneuronas, entre hemisferios, entre láminas corticales y entre variables citomorfológicas, se procedió a hacer un análisis de conglomerado jerárquico aglomerativo utilizando distancia de mahalanobis, un método de vinculación intergrupo (Between), con el propósito de establecer si las interneuronas Gabaérgicas forman agrupaciones determinadas por alguna o algunas de las variables consideradas en el estudio. También se hizo un análisis de correlación entre las variables citomorfológicas utilizando la prueba Coeficiente de Correlación de Spearman (tamaño del soma vs # proceso y # procesos vs factor forma) y Pearson (para las variables tamaño del soma vs factor forma), para intentar establecer si existen determinantes entre estas variables para las subpoblaciones de interneuronas Gabaérgicas corticales (ver Figura # 8).

5.4 CONSIDERACIONES ETICAS

La recolección, procesamiento y análisis de las muestras de tejido empleadas en el presente trabajo contaron con el Aval del Comité de Ética Humana de la Universidad del Valle (Acta No. 065 de 2005). La actual investigación hace parte del proyecto "*Organización Citoarquitectónica de la Lámina II en la Corteza Prefrontal Humana*" del año 2011, financiado por la Vicerrectoría de Investigaciones de la Universidad del Valle. Todas las muestras fueron codificadas y actualmente no hay posibilidad de identificar los sujetos, garantizándose la privacidad y confidencialidad de la información. La investigación se considera de bajo riesgo y cumple con los principios éticos propuestos en la declaración de Helsinki.

Analisis Estadistico



Caracterizacion de los Sujetos

Estadistica No parametrica
Prueba U de Mann-Whitney

Comparacion:



- | | |
|---|--|
| A. La Proporcion del Espesor laminar de cada lamina (I-VI) entre hemisferios | F. La densidad neuronal en las laminas II y III por cada marcador (NeuN, CB, CR, PV) vs las otras laminas (I, IV, V y VI) del mismo hemisferio. |
| B. El Promedio del Espesor cortical entre hemisferios | |
| C. La Proporcion del Espesor laminar de las laminas II y III intrahemisferios | G. La densidad neuronal en las laminas II y III por cada marcador (NeuN, CB, CR, PV) vs las otras laminas (I, IV, V y VI) del hemisferio contralateral |
| D. La densidad neuronal en las laminas II y III por cada marcador (NeuN, CB, CR, PV) intrahemisferio | |
| E. La densidad neuronal en cada una de las 6 laminas por cada marcador (NeuN, CB, CR, PV) entre hemisferios | |

Figura # 7: Este mapa conceptual resume las comparaciones realizadas y las pruebas estadísticas correspondientes a la caracterización de los sujetos.

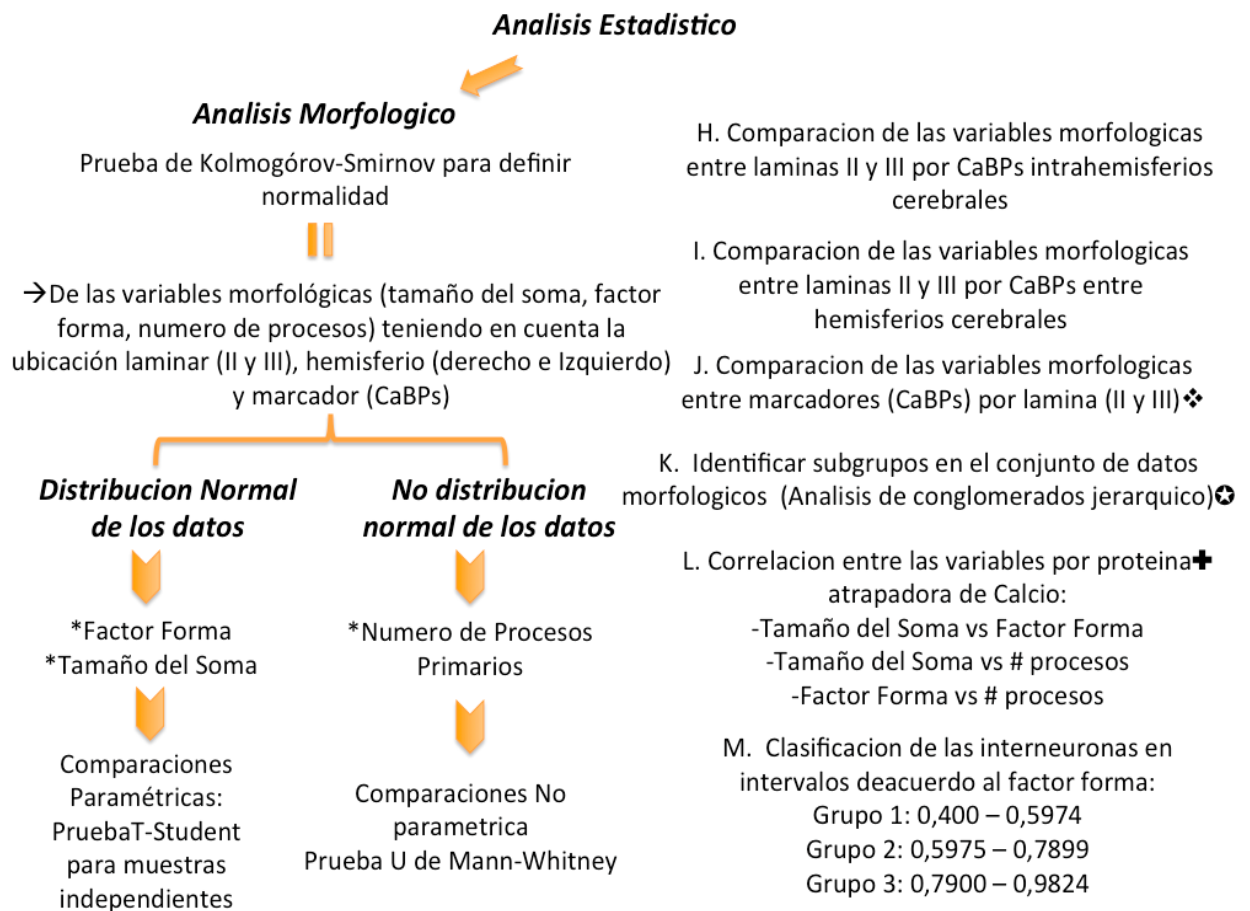


Figura # 8: Análisis Estadístico de los Datos. Este mapa conceptual resume las comparaciones realizadas y las pruebas estadísticas correspondientes. ❖ Para las comparaciones realizadas en el numeral J entre proteínas atrapadoras de calcio para cada variable morfológica, se tuvo en cuenta si las variables presentaban una distribución normal o no, para el primer caso las variables factor forma y tamaño del soma se compararon con pruebas paramétricas para muestras independientes (T-Student & ANOVA) y para el segundo caso, la variable número de procesos se comparó con pruebas no paramétricas para muestras independientes (Mann-Whitney & Kruskal Wallis). ⚙ El numeral K es un análisis de conglomerado jerárquico aglomerativo, se utilizó distancia de Mahalanobis y método de vinculación promedio entre grupos (Between), característica de asociación: datos citomorfológicos, ubicación laminar y hemisférica (paquete estadístico XLSTAT). + Para el numeral L se utilizó la prueba Coeficiente de Correlación de Spearman (tamaño del soma vs # proceso y # procesos vs factor forma) y Pearson (para las variables tamaño del soma vs factor forma). Convenciones: # proceso: número de procesos.

6 RESULTADOS

6.1 CARACTERIZACION HISTOLÓGICA GENERAL DEL ÁREA 10

El área 10 de la cara orbital posee un espesor cortical promedio para el hemisferio derecho de 2280 +/- 439 μm y para el hemisferio izquierdo de 2444 +/- 252 μm . Las láminas con mayor espesor para ambos hemisferios fueron la III (28%), la V (18%) y la VI (21%) (Ver tabla # 3). La densidad neuronal (neuronas NeuN+/ mm^2) es mayor en las láminas II (HD: 29133,3; HI: 32333,3) y IV (HD: 32500,0; HI: 33333,3). Las neuronas CB+ se observan en mayor densidad en la lámina II, seguida de las láminas III y IV, siendo casi inexistentes en las demás láminas. Las neuronas CR+ están densamente ubicadas en las láminas II y IV, y en las demás láminas son también abundantes aunque con una densidad un poco menor. Las neuronas PV+ están predominantemente ubicadas en la lámina IV, seguida de las láminas II, III y V, un poco menos en la lámina VI y son prácticamente inexistentes en la lámina I (Ver tabla # 4).

En la lámina I la mayoría de las interneuronas son CR+, en la lámina II las células CR+ y CB+ son cerca del 85% del total de células Gabaérgicas, en lámina III las células PV+ y CR+ están entre el 18% y el 67% respectivamente, mientras que para la lámina IV el 95% del total de interneuronas corresponde a células CR+ y PV+. En las láminas infragranulares la expresión de células CB+ es mínima a diferencia de las PV+ cuyo porcentaje oscilo entre 12 y 20% y las CR+ entre el 79 y 87% (Ver Tabla # 4).

Al comparar el espesor laminar, el espesor cortical y la densidad neuronal entre láminas homólogas de ambos hemisferios (comparaciones metodológicas A, B y E), no se encontraron diferencias interhemisféricas significativas, permitiendo sugerir simetrías en estos parámetros (Ver Tabla # 3 y 4).

Tabla # 3: Espesor Laminar y Espesor Cortical del área 10

L	HD		L	HI		HD vs HI (valor p)
	M +/- DE	ER (%)		M +/- DE	ER (%)	
		M +/- DE			M +/- DE	
I	249,91 +/- 33,75	11,34 +/- 2,51	I	282,08 +/- 31,72	11,61 +/- 1,13	0,389
II	214,84 +/- 33,42	9,77 +/- 2,24	II	214,19 +/- 41,63	8,79 +/- 1,46	0,285
III	616,67 +/- 146,43	26,99 +/- 3,39	III	707,13 +/- 87,81	29,03 +/- 2,89	0,074
IV	283,34 +/- 49,38	11,74 +/- 2,32	IV	306,06 +/- 65,37	12,52 +/- 2,15	0,161
V	412,58 +/- 111,84	17,99 +/- 2,71	V	440,11 +/- 95,46	17,99 +/- 2,59	0,935
VI	500,85 +/- 268,17	20,92 +/- 7,11	VI	493,76 +/- 119,48	20,03 +/- 3,05	0,624
EC	2280,18 +/- 439,44		EC	2444,29 +/- 252,13		0,345
	Supragranular	36.76 +/- 5.63		Supragranular	37.82 +/- 4.35	
	Infragranular	38.91 +/- 9.82		Infragranular	38.02 +/- 5.64	

L: lámina; HD: hemisferio derecho; HI: hemisferio izquierdo; EC: espesor cortical; ER: espesor relativo; M: media; DE: desviación estándar. Significancia del 5% ($\alpha=0,05$) a dos colas (por lo cual la región de rechazo se estableció con una probabilidad de 0,025).

6.1.1 Organización neuronal general: láminas supragranulares vs infragranulares:

Las láminas supragranulares (láminas corticales II y III) del área 10 humana poseen espesores relativos que oscilan entre 36,76% en el HD y 37,82% en el HI, siendo levemente de menor espesor que las láminas infragranulares (láminas corticales V y VI) con espesores entre 38,91% en el HD y 38,02% en el HI; y sin diferencia estadísticamente significativa entre las mismas. La densidad neuronal (NeuN+) de las capas supragranulares es de aproximadamente de 46633,3 neuronas/mm², mientras en las capas infragranulares es un poco menor, siendo de 38466,6 neuronas/mm² aproximadamente. Para el caso de las subpoblaciones de interneuronas marcadas con las CaBPs, la densidad de células CR+ es similar entre capas supragranulares e infragranulares (aproximadamente 20450,0 vs 19016,6 neuronas/mm²), la densidad de neuronas PV+ es levemente mayor en capas supragranulares (aproximadamente 5116,6 vs 3900,0 neuronas/mm²), al igual que la densidad de neuronas CB+ (aproximadamente 6717,7 vs 66,6 neuronas/mm²).

Tabla # 4: Densidad neuronal y de subpoblaciones de interneuronas

		HI	HD	HI vs HD	Densidad aprox.
MARCADOR	Lámina	neuronas/mm ²	neuronas/mm ²	Valor P	Supra e Infra
NeuN	I	9133,3	8166,7	0,486	46633,3
	II	29133,3	32333,3	0,653	
	III	15833,3	15966,7	0,713	
	IV	32500,0	33333,3	0,838	38466,6
	V	17233,3	20366,7	0,285	
	VI	19333,3	20000,0	0,967	
CB	I	0,0	100,0	0,539	6716,7
	II	4800,0	5100,0	0,806	
	III	1566,7	1966,7	0,367	
	IV	300,0	633,3	0,902	66,6
	V	100,0	33,3	0,744	
	VI	0,0	0,0	1,000	
CR	I	9766,7	10433,3	0,325	20450,0
	II	11000,0	11100,0	0,870	
	III	9666,7	9233,3	0,713	
	IV	12466,7	11300,0	0,512	19016,6
	V	9433,3	9400,0	0,902	
	VI	9766,7	9433,3	0,683	
PV	I	133,3	33,3	0,539	5116,6
	II	2833,3	2633,3	0,595	
	III	2300,0	2466,7	0,653	
	IV	3300,0	3266,7	0,567	3900,0
	V	2600,0	2433,3	0,595	
	VI	1400,0	1366,7	0,838	

**Significancia del 5% ($\alpha=0,05$) a dos colas (por lo cual la región de rechazo se estableció con una probabilidad de 0,025). Hipótesis Nula (H_0): El Numero de neuronas por cada marcador (NeuN, CB, CR y PV) es igual entre hemisferios cerebrales por cada lámina cortical. Hipótesis Alternativa (H_a): El Numero de neuronas por cada marcador (NeuN, CB, CR y PV) es diferente entre hemisferios cerebrales por cada lámina cortical.

Visualmente (ver figura # 9), es notorio el cambio en la densidad neuronal entre las láminas II y III de la neocorteza cerebral; en el caso del área 10, decidimos indagar sobre el tipo de células que aportaban a dicha diferencia. Al comparar la densidad neuronal de cada marcador al interior de cada hemisferio (comparación metodológica D), se

encontraron diferencias estadísticamente significativas en la densidad de neuronas CB+ y NeuN+ entre las láminas II y III en ambos hemisferios ($p=,000^*$ con un $\alpha=0,05$), siendo mayor la densidad neuronal para ambos marcadores en la lámina II (Ver Tabla # 4 y 6).

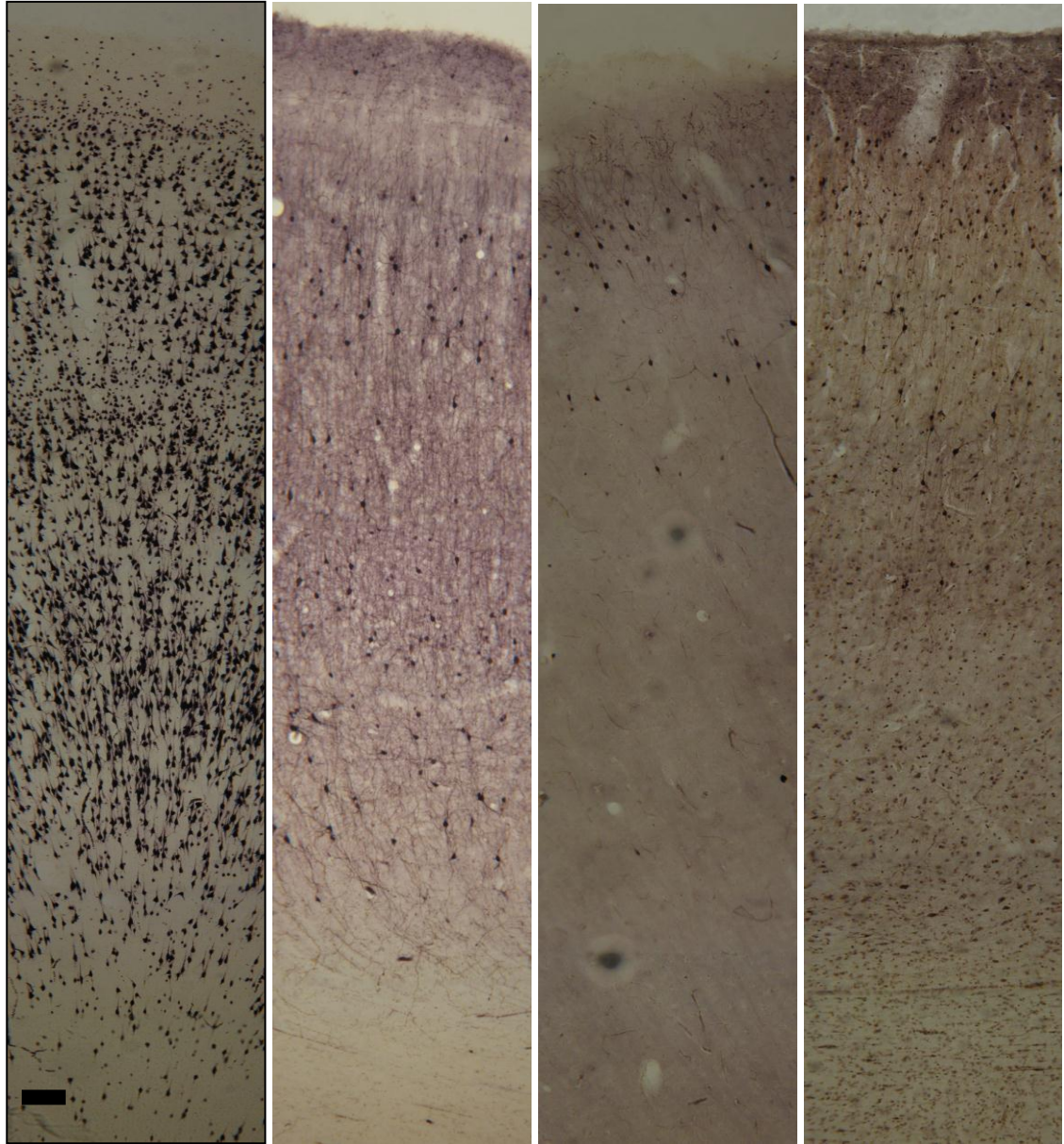


Figura # 9: Microfotografías a 10x que ilustran un corte coronal del área 10 marcado con NeuN, PV, CB y CR desde la superficie pial hasta la sustancia blanca, la barra corresponde a 100 μm .

Tabla # 5: Porcentaje de interneuronas por marcador y lámina cortical

Lámina Cortical	INTERNEURONAS TOTALES	% CB	% CR	% PV
I	10566,7	0,95	98,74	0,32
II	18833,3	27,08	58,94	13,98
III	13666,7	14,39	67,56	18,05
IV	15200,0	4,17	74,34	21,49
V	11866,7	0,28	79,21	20,51
VI	10800,0	0,00	87,35	12,65
	PROMEDIO	7,81	77,69	14,50

Interneuronas totales: sumatoria de neuronas PV+, CB+, y CR+

Tabla # 6: Comparación intrahemisférica del número de neuronas por Cada proteína atrapadora de calcio

VARIABLE	HEMISFERIO IZQUIERDO		HEMISFERIO DERECHO	
	COMPARACIÓN	VALOR P	COMPARACIÓN	VALOR P
<i>Número de neuronas</i>	L II Vs III NEUN	0,000**	L II Vs III NEUN	0,000**
	L II Vs III CB	0,000**	L II Vs III CB	0,000**
	L II Vs III CR	0,389	L II Vs III CR	0,161
	L II Vs III PV	0,137	L II Vs III PV	0,486

L: lámina; HD: hemisferio derecho; HI: hemisferio izquierdo; **Significancia del 5% ($\alpha=0,05$) a dos colas (por lo cual la región de rechazo se estableció con una probabilidad de 0,025). Las comparaciones con diferencias estadísticamente significativas se resaltan en color verde. Hipótesis Nula (Ho): El Numero de neuronas por cada marcador (NeuN, CB, CR y PV) es igual entre láminas II vs lámina III intrahemisferio cerebral derecho. Hipótesis Alternativa (Ha): El Numero de neuronas por cada marcador (NeuN, CB, CR y PV) es diferente entre láminas II vs Lámina III intrahemisferio cerebral derecho.

En la tabla # 4 se aprecia el perfil de densidades neuronales entre las diferentes láminas corticales del área 10. Así mismo, en las imágenes histológicas de los diferentes marcadores se observa variaciones en la cantidad de neuronas entre las diferentes láminas; por lo cual decidimos establecer dónde se hallaban estas diferencias, o lo que es igual, cuáles láminas presentan similitudes en la cantidad de neuronas positivas para cada marcador. Para tal efecto, se comparó la densidad neuronal (con cada marcador) de la lámina II con respecto a la de las demás láminas corticales (comparación metodológica F y G), y luego se comparó la densidad neuronal de la lámina III con respecto a la de las demás láminas (ver tabla # 6, Anexo # 1).

Estas comparaciones arrojaron los siguientes resultados: en densidad neuronal (neuronas NeuN+/mm²), la lámina II es similar a la lámina IV y significativamente diferente de las demás láminas corticales, constituyéndose estas en las láminas con mayor densidad neuronal del área 10 humana. Mientras la lámina III presenta una densidad neuronal similar a la de la lámina V, siendo significativamente mayor a la lámina I, significativamente menor a las láminas II y IV, y solo levemente menor a la lámina VI. Es decir, la densidad neuronal entre capas granulares es similar, y entre capas piramidales también, pero entre capas granulares y piramidales es significativamente diferente.

Respecto de las comparaciones entre las supoblaciones de interneuronas marcadas con las CaBPs, se observó lo siguiente: la densidad de neuronas CR+ es homogénea entre las 6 láminas corticales, sin diferencias estadísticamente significativas entre ninguna de las comparaciones entre láminas. La densidad de neuronas CB+ de la lámina II es la mayor (estadísticamente significativa) entre las 6 láminas corticales, seguida por la lámina III, que presenta una densidad significativamente menor a la lámina II pero significativamente mayor a la de las láminas I, IV, V y VI. La densidad de neuronas PV+ es similar entre las láminas II, III, IV y V, y significativamente mayor a la de las láminas I y VI (ver Anexo # 1).

En la marcación con CR se observaron interneuronas con soma de morfología fusiforme tanto de disposición vertical como horizontal (podrían corresponder a las células descritas en la literatura como Bipolares, Bipenachadas y Horizontal de Cajal Retzius). En la

marcación con CB se pudo apreciar una distribución a manera de dos bandas, la primera entre las láminas II-III, de alta densidad celular, y la segunda entre las láminas IV y V de menor densidad. Además, se distinguieron dos grupos de neuronas CB+: el primero, de células piramidales en la parte profunda de la lámina III, y el segundo de células no-piramidales (podrían corresponder a las células descritas en la literatura como Horizontales de Cajal Retzius en la lámina I, Bipenachadas, algunas células en cesta, de Martinotti y Neurogliaformes). En la marcación para PV se observó una marcación predominante en láminas intermedias (III y IV), con una morfología principalmente del tipo en cesta o en candelabro, de acuerdo con la literatura (5, 21, 24).

6.2 CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA DE LAS INTERNEURONAS EN LAS LÁMINAS II Y III DEL ÁREA 10

6.2.1 Caracterización morfológica general:

Se obtuvieron datos morfológicos de tamaño, forma del soma y número de procesos primarios de 1646 interneuronas del área 10 de la CPF humana, 600 de ellas CR+, 599 CB+ y 447 PV+. El tamaño del soma de las interneuronas CR+ osciló entre 57,1 y 66,2 μm^2 , para las células CB+ fue entre 59,7 y 64,6 μm^2 y para PV+ entre 82,4y 99,6 μm^2 . Las células CB+ y CR+ presentaron una forma del soma perteneciente al grupo 2 (promedio entre 0,67 y 0,71) que corresponde a formas irregulares (entre fusiformes y poligonales); y las células PV+, aunque en su gran mayoría pertenecían a este mismo grupo, su promedio se acercaba más al del grupo 3 con forma tendiente a ser esférica (entre 0,73 a 0,74). Se observó que las células positivas para cada marcador presenta un número de procesos diferente; así, para CR fue de 2, para CB de 3 y para PV de 4 (ver Tabla # 7).

Tabla # 7: Caracterización morfológica (tamaño del soma, numero de procesos primarios, forma del soma) de las interneuronas CB, CR y PV positivas en láminas supragranulares

VARIABLE MORFOLOGICA		CB		CR		PV	
	L	HI	HD	HI	HD	HI	HD
TAMAÑO DEL SOMA	II	59,73 +/- 14,76	60,11 +/- 15,69	58,07 +/- 13,97	57,16 +/- 13,24	87,20 +/- 18,73	82,45 +/- 23,19
	III	64,63 +/- 18,91	64,18 +/- 18,23	64,34 +/- 18,06	66,24 +/- 18,32	97,72 +/- 22,35	99,66 +/- 32,84
FORMA DE LA CELULA	II	0,70 +/- ,09	0,71 +/- ,07	0,67 +/- ,09	0,69 +/- ,08	0,73 +/- ,07	0,73 +/- ,08
	III	0,69 +/- ,08	0,69 +/- ,07	0,69 +/- ,08	0,68 +/- ,08	0,74 +/- ,07	0,74 +/- ,06
NUMERO DE PROCESOS	II	3	3	2	2	4	4
	III	3	3	2	2	4	4

L: lámina; HD: hemisferio derecho; HI: hemisferio izquierdo. Los valores corresponden a la media
 +/- Desviación estándar para Tamaño y forma de la célula, y para el numero de procesos
 corresponde a la mediana

En la Clasificación de las interneuronas de acuerdo con la variable forma del soma (Grupo 1: 0,400 – 0,5974, Grupo 2: 0,5975 – 0,7899 y Grupo 3: 0,7900 – 0,9824), se encontró que el 64,6% de las 1646 interneuronas pertenecían al grupo 2 (0,5974 – 0,7899), con soma predominantemente poligonal, tamaño promedio de 69,9 μm^2 y número de procesos de mediana 3. Las células de este grupo se ubican en la misma proporción (aproximadamente) en las dos láminas estudiadas (Ver Tabla # 8 y Figura 10).

Tabla # 8: Clasificación y caracterización de las interneuronas según la forma del soma

Intervalos	Frecuencia	%	Forma del Soma	Tamaño del Soma	# procesos	# de interneuronas en LII	%	# de interneuronas en LIII	%
<i>Grupo 1</i>	187	10,4	0,54 +/- ,04	69,30 +/- 18,71	2	100	53,5	87	46,5
<i>Grupo 2</i>	1163	64,6	0,70 +/- 0,04	69,92 +/- 23,13	3	569	48,9	594	51,1
<i>Grupo 3</i>	296	16,4	0,82 +/- 0,02	72,41 +/- 26,19	4	156	52,7	140	47,3

Los datos descriptivos son la media +/- la desviación estándar para las variables Forma de la célula y Tamaño del soma, y el numero de procesos se representa con la mediana. #: Numero.

Al Comparar las tres variables morfológicas entre láminas II y III por CaBPs de forma intrahemisférica (comparación metodológica H), solo se observaron diferencias significativas en el tamaño del soma (ver anexo # 2), es decir, el tamaño del soma de las interneuronas de la lámina III es significativamente mayor que el de las interneuronas de la lámina II, en las 3 CaBPs y en los dos hemisferios. El resto de comparaciones para forma del soma y número de procesos no dio diferencias significativas, sugiriendo cierto grado de similitud entre las interneuronas de estas láminas para los aspectos evaluados.

Los anteriores resultados permiten sugerir dos cosas, la primera, que la variable tamaño del soma es la característica morfológica más sobresaliente, permitiendo el establecimiento de los límites laminares y distinción de los grupos morfológicos de interneuronas, lo cual aplica para las tres CaBPs en ambos hemisferios cerebrales. La segunda, que las variables número de procesos y factor forma son características morfológicas importantes desde el punto de vista descriptivo, pero no como punto de diferenciación entre estas dos láminas.

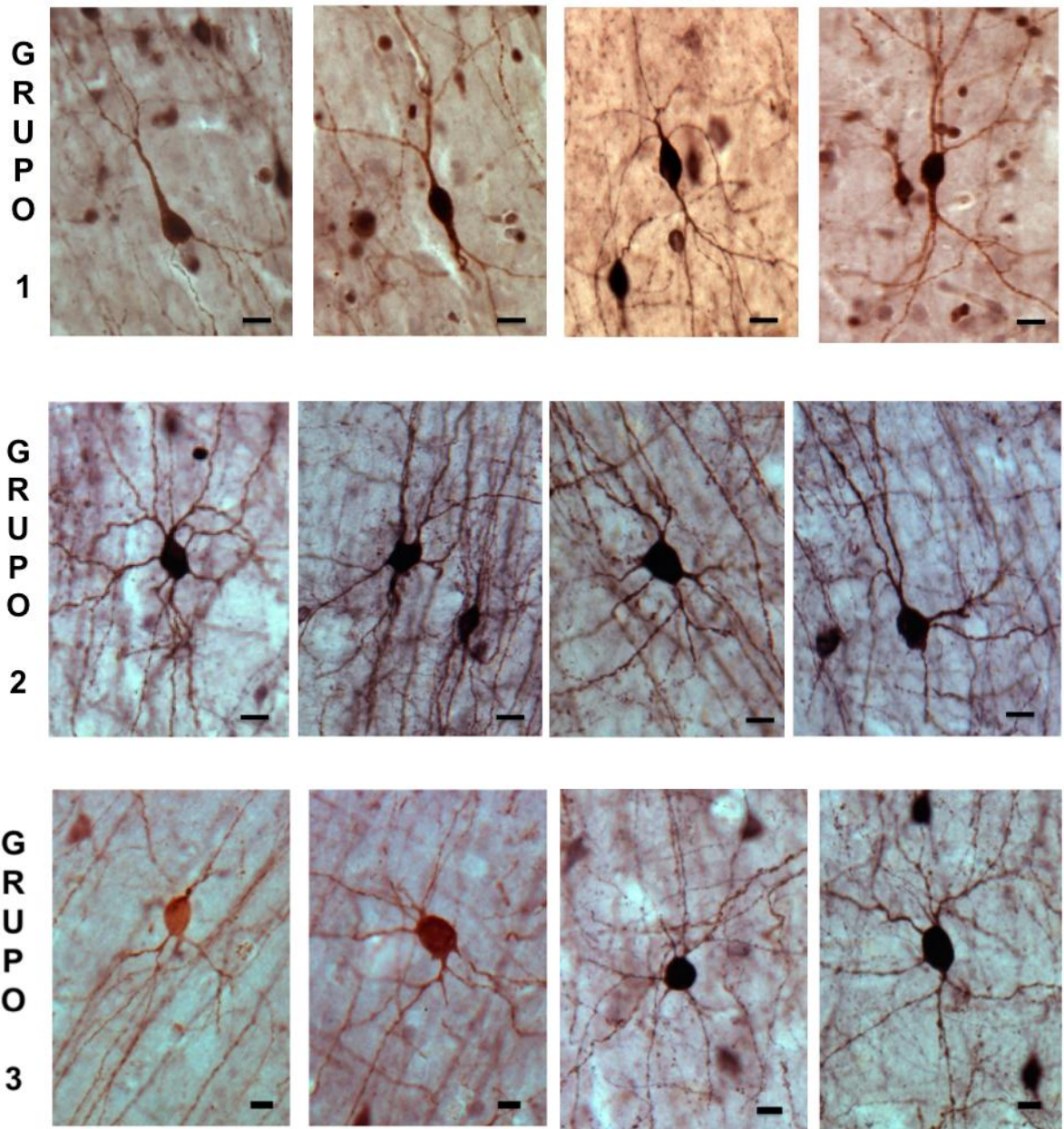


Figura # 10: Algunos ejemplos de interneuronas de acuerdo con la categorización de la forma del soma en las láminas II y III del área 10 humana. En el grupo 1 se presentan neuronas CB+ y CR+. En el grupo 2 se presentan neuronas CB+ y PV+. En el grupo 3 se presentan solo neuronas PV+. La barra corresponde a 10 μ m.

En la comparación interhemisférica de las variables morfológicas consideradas entre láminas II y III por cada CaBP (comparación metodológica I) no se encontró diferencias estadísticamente significativas para ninguna de las condiciones evaluadas (ver anexo # 3), por lo cual se concluye que en las características morfológicas de tamaño y forma del soma, y el número de procesos primarios de las interneuronas tampoco hay asimetrías entre los hemisferios cerebrales en el área 10 de la corteza prefrontal humana. En adelante, el análisis estadístico de los datos se llevará a cabo sin distinción de hemisferios, dada la ausencia de diferencia entre estos en las variables estudiadas.

A continuación se intentó establecer si las interneuronas marcadas con cada CaBP difieren en las variables morfológicas estudiadas (comparación metodológica J), inicialmente en la lámina II y luego en la lámina III (ver tabla # 9). Los resultados de las comparaciones fueron los siguientes:

- Los tres grupos de interneuronas identificados con las tres CaBPs presentan diferencias estadísticamente significativas en las tres variables morfológicas estudiadas, tanto en la lámina II como en la lámina III, del área 10 de la corteza prefrontal humana.
- Dichas diferencias se presentan en la variable número de procesos, cuando se comparan los grupos de interneuronas CB+ vs CR+, CB+ vs PV+ y CR+ vs PV+; y en las variables tamaño y forma del soma, cuando se comparan los grupos CB+ vs PV+ y CR+ vs PV+. De esta manera, el mayor número de procesos lo tienen las células PV+ (4), seguido de las CB+ (3); y las células CR+ (2) presentan la menor cantidad de procesos primarios derivados del soma. El tamaño del soma es mayor y tiende a ser más esférico en las células PV+, mientras los otros 2 grupos de interneuronas tienen un tamaño menor y la forma del soma tiende a ser entre fusiforme y poligonal.
- Es decir, que las células CB+ y CR+ tienen el tamaño y la forma del soma similares, constituyendo un grupo bien separado del de las células PV+; y la variable número de procesos es la característica morfológica que permite diferenciar claramente entre los 3 subgrupos de interneuronas corticales de las láminas II y III identificadas con las CaBPs.

Tabla # 9: Comparación de las variables morfológicas entre las 3 CaBPs por lámina Cortical

VARIABLES	COMPARACIÓN	LÁMINA II RESULTADO	LÁMINA III RESULTADO
Tamaño del Soma	CB, CR y PV	p = 0,000**	p =0,000**
	CB Vs PV	p = 0,000**	p =0,000**
	CR Vs PV	p = 0,000**	p =0,000**
	CB Vs CR	p = 0,994	p = 0,892
Factor forma	CB, CR y PV	p =0,000**	p =0,000**
	CB Vs PV	p =0,001**	p =0,000**
	CR Vs PV	p =0,000**	p =0,000**
	CB Vs CR	p =0,036	p =0,750
Número de procesos	CB Vs CR	p =0,000**	p =0,000**
	CB Vs PV	p =0,000**	p =0,000**
	CR Vs PV	p =0,000**	p =0,000**
	CB, CR y PV	p =0,000**	p =0,000**

**Significancia del 5% a dos colas (por lo cual la región de rechazo se estableció con una probabilidad de 0,025). En el Anexo # 4 se encuentran la formulación de Hipótesis para cada prueba realizada en la Tabla.

Luego, decidimos establecer si existía algún tipo de correlación entre las variables morfológicas consideradas en el estudio y cada subpoblación de interneuronas de las láminas II y III (Tabla #10, comparación metodológica L). Para ello, utilizamos la prueba de Coeficiente de Correlación de Spearman para las comparaciones del tamaño del soma vs número de procesos y número de procesos vs forma del soma; y el Coeficiente de

Correlación de Pearson para la comparación del tamaño del soma vs forma del soma. Los resultados fueron los siguientes:

- En la lámina II se observaron más correlaciones en las tres subpoblaciones que en la lámina III, sugiriendo que esta última lámina presenta una mayor diversidad morfológica entre las interneuronas.

- En la lámina II, las células CB+, entre mayor es el tamaño de su soma, la forma tiende a ser más fusiforme y a presentar mayor número de procesos; pero cuando el número de procesos sobrepasa el promedio (3), la forma del soma se presentará entre poligonal a esférica. Mientras en la lámina III, estas interneuronas presentan mayor cantidad de procesos entre más grande es el soma, independientemente de la forma.

- En la lámina II, las células CR+, entre mayor es el tamaño de su soma, la forma tiende a ser más fusiforme y a presentar mayor número de procesos (al igual que las células CB+). En la lámina III, parecen identificarse 2 grupos de interneuronas, uno en el que a mayor tamaño presenta forma de huso; y otro, en el que a mayor cantidad de procesos, la forma celular tiende a ser poligonal o esférica.

- En la lámina II, las células PV+, entre mayor es el número de sus procesos, mayor podrá ser el tamaño del soma o tenderá a presentar forma esférica, pero no las dos condiciones simultáneamente. En la lámina III, solo se aprecia correlación entre el número de procesos y la forma del soma, de tal manera que entre más procesos tiene la célula PV+, más esférico es su soma.

Tabla # 10: Correlación entre las variables morfológicas por subpoblación de interneuronas identificadas con las CaBPs por lámina cortical

		LAMINA II		LAMINA III	
CaBPs	CORRELACIÓN	RESULTADO	CONCLUSIÓN	RESULTADO	CONCLUSIÓN
CB	Tamaño del Soma y Factor forma	Valor de la p = 0,006	Correlación = -0.159, el sentido de la asociación es INVERSO	Valor de la p = 0,745	NO existe correlación estadística
	Tamaño del soma y # procesos	Valor de la p = 0,000	Correlación = 0.254, el sentido de la asociación es DIRECTO	Valor de la p = 0,000	Correlación=0,230, el sentido de la asociación es DIRECTO
	# procesos y Factor forma	Valor de la p = 0,003	Correlación = 0.173, el sentido de la asociación es DIRECTO	Valor de la p = 0,364	NO existe correlación estadística
CR	Tamaño del soma y Factor forma	Valor de la p = 0,008	Correlación = -0,152, el sentido de la asociación es INVERSO	Valor de la p = 0,000	Correlación= -0,342, el sentido de la asociación es INVERSO
	Tamaño del soma y # procesos	Valor de la p = 0,009	Correlación = 0,152, el sentido de la asociación es DIRECTO	Valor de la p = 0,863	NO existe correlación estadística
	# procesos y Factor forma	Valor de la p = 0,070	NO existe correlación estadística	Valor de la p = 0,020	Correlación=0,134, la asociación es DIRECTA
PV	Tamaño del Soma y Factor forma	Valor de la p = 0,604	NO existe correlación estadística	Valor de la p = 0,794	NO existe correlación estadística
	Tamaño del Soma y # procesos	Valor de la p = 0,001	Correlación = 0.291, el sentido de la asociación es DIRECTO	Valor de la p = 0,602	NO existe correlación estadística
	# procesos y Factor forma	Valor de la p = 0,004	Correlación = 0.261, el sentido de la asociación es DIRECTO	Valor de la p = 0,000	Correlación=0,249, la asociación es DIRECTA

**Significancia del 5% a dos colas (por lo cual la región de rechazo se estableció con una probabilidad de 0,025). Hipótesis Nula (Ho): No existe correlación entre las variables. Hipótesis Alternativa (Ha): Existe correlación entre las variables. Convenciones: # procesos: numero de procesos.

Una vez se estableció la manera como se correlacionan las variables morfológicas del estudio, según las subpoblaciones de interneuronas identificadas con cada CaBPs, se procedió a establecer si la muestra total de células observadas se organiza en grupos diferentes con características morfológicas particulares, sumadas a la ubicación laminar y al marcador inmunohistoquímico (comparación metodológica K). Antes de realizar el análisis de conglomerado, se revisaron los datos en bruto con el objetivo de identificar las interneuronas atípicas, es decir, aquellas cuyas características morfológicas son únicas y difícilmente se agruparían o formarían grupos individuales. Se identificaron solo 7

neuronas que están por fuera de las tres desviaciones estándar en al menos una de las variables morfológicas (Ver Anexo # 5).

El Análisis de Conglomerado incluyó 1639 interneuronas. En la figura # 11, se presenta el dendrograma horizontal que muestra en el eje Y cada una de las interneuronas, y en el eje X el grado de disimilitud entre las mismas. Hacia la derecha, las interneuronas se van agrupando de acuerdo con todas las variables consideradas en el presente estudio (tamaño del soma, forma, número de procesos, marcador inmunohistoquímico y lámina cortical). El método establece un punto de corte automático (en línea punteada) y arrojó 8 clúster o grupos, los cuales serán descritos a continuación.

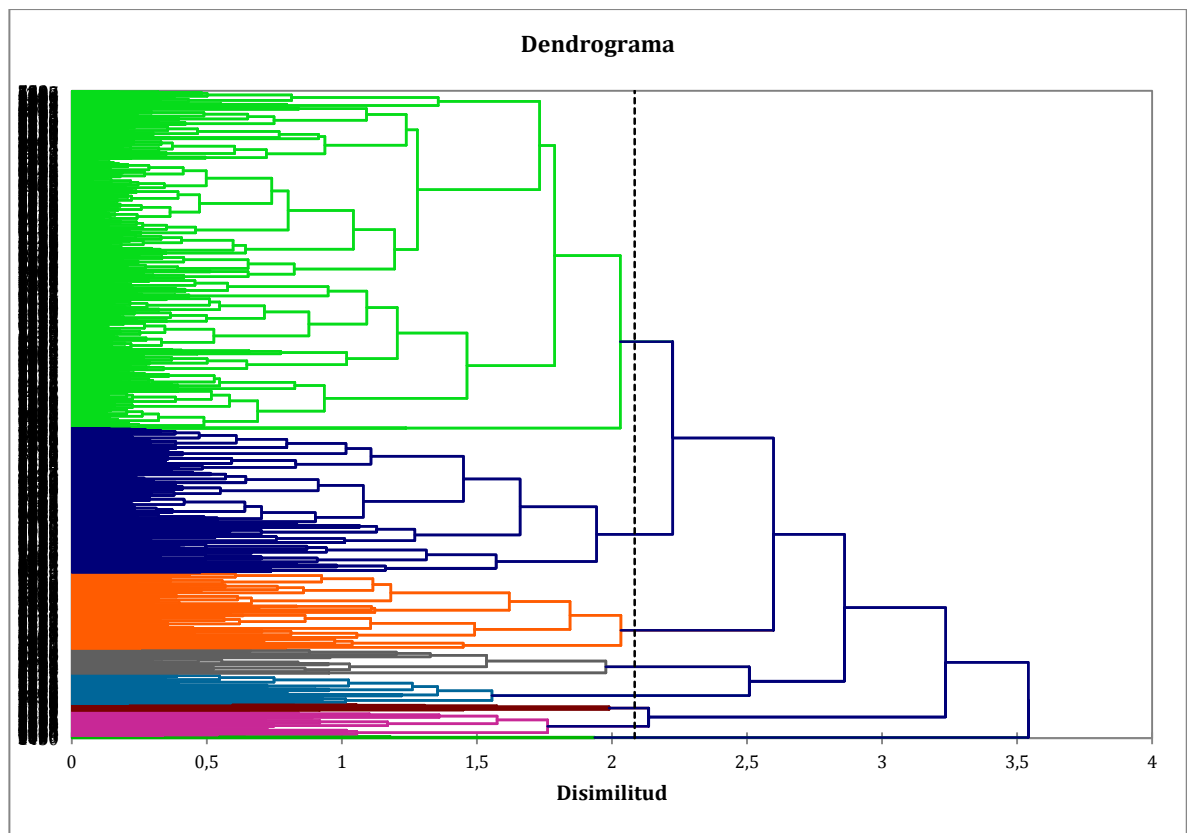


Figura # 11: Análisis de Conglomerado Jerárquico Aglomerativo, distancia de mahalanobis y método de vinculación promedio entre grupos (Between), Las neuronas agrupadas en color verde corresponden al conglomerado 1, las de color azul oscuro al 2, las de color naranja al 4, las de color gris al 3, las de color azul aguamarina y rojo al grupo 5 y 8, y por último las neuronas identificadas con los colores vino tinto y verde claro a los grupos 7 y 6.

Tabla # 11: Resumen de las características morfológicas de los 8 grupos

Conglomerado	No. de Interneuronas	Tamaño del Soma	Número de Procesos	Forma del Soma
1	855	60,889	2,000	0,708
2	364	63,840	4,000	0,733
3	77	62,418	4,000	0,581
4	193	100,478	5,000	0,761
5	63	83,082	2,000	0,516
6	6	54,932	6,000	0,723
7	17	146,888	3,000	0,695
8	64	116,526	3,000	0,730

El primer grupo comprende la mayor cantidad de interneuronas estudiadas, con predominio de células CR+ y algunas CB+, con cantidad similar entre las 2 láminas, tamaño entre pequeño y mediano, predominio de forma poligonal y número de procesos reducido (2).

El segundo grupo se encuentra conformado por 364 interneuronas, con células predominantemente CB y PV positivas, distribuidas por igual entre las dos láminas supragranulares, con somas entre pequeños y medianos con forma poligonal, dando lugar a múltiples procesos primarios (3, 4 y 5).

El tercer grupo son células en su mayoría CB+, ubicadas en lámina III, con tamaños que oscilan entre pequeños a medianos, con formas fusiformes y algunas irregulares, y procesos primarios superiores a 4 por célula.

El cuarto grupo está conformado por células multipolares (4, 5 y 6) con formas tanto poligonales como circunferenciales, sus somas son entre medianos a grandes, con interneuronas positivas a PV, ubicadas en láminas II y III.

El quinto grupo son células fusiformes, con un tamaño de soma entre mediano a grande, IR en la mayoría de los casos a CR y CB, localizadas en láminas II y III, con un predominio de 2 y 3 procesos por célula.

El sexto grupo son células CB+ y PV+, con forma irregular y tamaño de soma entre pequeño y mediano, pero con una cantidad de procesos superior al reportado por los otros grupos (6-7 por célula).

El séptimo grupo son células con forma poligonal, sus somas poseen el mayor tamaño, reportado en el presente estudio, con un predominio de procesos entre 2 a 4 por célula, estas interneuronas en su mayoría son PV positivas, localizadas en lámina III.

El octavo grupo son células con un soma grande e irregular, positivas a PV, CR y CB ubicadas en la mayoría de los casos en lámina III, con una cantidad de procesos primarios variable entre 2 a 4 por célula (Ver Tabla # 12 y Anexo # 6) (Para un mayor entendimiento de los resultados remitirse al Anexo # 8).

Tabla # 12: Resumen de las principales características de los 8 conglomerados

Conglomerado	1	2	3	4
Numero de Interneuronas	855	364	77	193
% CB+	29,4	65,1	84,4	9,8
% CR+	60,7	4,7	5,2	0,0
% PV+	9,9	30,2	10,4	90,2
% Lámina II	52,3	55,8	37,7	49,7
% Lámina III	47,7	44,2	62,7	50,3
Intervalo Tamaño del Soma (um)	22,2 - 103,4	27,8 - 99,0	31,1 - 95,47	71,6 - 137,39
Categoría Factor Forma (%)	G2 (78,1) y G3 (13,8)	G2 (78) y G3 (22)	G1(66,2) y G2(33,8)	G2 (58,5) y G3 (41,5)
Número de Procesos (%)	2(76,7) y 3(23)	3(22), 4(44,5) y 5(26,4)	3(20,8), 4(51,9), 5(24,7)	4(43), 5(36,3), 6(16,1)

Conglomerado	5	6	7	8
Numero de Interneuronas	63	6	17	64
%Calbindina	19,0	83,3	0,0	12,5
%Calretinina	69,8	0,0	5,9	20,3
%Parvalbumina	11,1	16,7	94,1	67,2
%Lámina II	46,0	50,0	5,9	20,3
%Lámina III	54,0	50,0	94,1	79,7
Intervalo Tamaño del Soma (um)	51,1 - 122,7	37,8 - 79,4	121,6 - 175,1	90,5 - 142,6
Grupo(s) Factor Forma (%)	G1 (100)	G2 (83,3) y G3(16,7)	G2 (100)	G2(76,6) y G3(23,4)
Numero de Procesos (%)	2 (77,8) y 3 (20,6)	6(83,3) y 7(16,7)	2(29,4), 3(35,3), 4(17,6), 5(11,8)	2(25), 3(39), 4(34,4)

G1: Grupo 1: 0,400 – 0,5974, G2: Grupo 2: 0,5975 – 0,7899, G3: Grupo 3: 0,7900 – 0,9824, Numero de Procesos: el numero de procesos primarios identificados en la célula: 2 a 6 y entre paréntesis (el porcentaje de interneuronas del total del conglomerado).

7. DISCUSION

7.1 CONSIDERACIONES METODOLÓGICAS

Existen varias dificultades a la hora de comparar estudios de citoarquitectura, distribución y morfometría; entre ellas, el poco número de investigaciones en el área, los diferentes abordajes metodológicos y la dificultad de obtener muestras para un área en particular (por ejemplo: la corteza prefrontal), por lo tanto, llevar a cabo comparaciones entre los estudios publicados y el actual, requiere prudencia dadas las limitaciones.

Hay algunos aspectos en el desarrollo de la investigación que se deben tener en cuenta a la hora de interpretar los resultados; uno de ellos es el tamaño de la muestra, para la caracterización del tejido, se utilizó un total de 5 sujetos, mientras que para la descripción morfológica fue de 1646 interneuronas. Epidemiológicamente hablando parece una muestra pequeña, pero la mayoría de los estudios reportan números similares, debido a la dificultad de conseguir muestras postmortem que cumplan con los criterios de inclusión y requisitos legales; además, el trabajo de investigación que se desarrolló no pretendía ser de carácter epidemiológico. Para la caracterización morfológica se contó con un número muy superior al de otros estudios, por ejemplo: Zatievs y colegas en el 2005: utilizaron 81 interneuronas, en el 2009: 194 interneuronas y De Felipe & col. en el 2013: 320 interneuronas; números que compensan la complejidad de reconstruir una neurona en 3D como ocurre en esos estudios, tecnología que no hacía parte del propósito del presente estudio (107-109).

Segundo, el tejido histológico se seleccionó teniendo en cuenta la integridad, organización laminar y homogeneidad entre sujetos, ninguna de las causas de muerte incluyo el sistema nervioso central y el intervalo post-mortem osciló entre 9 y 23 horas; además, las muestras fueron preservadas y fijadas entre 7 y 10 días, medidas que garantizaron el mantenimiento del tejido. Estas características del tejido cerebral de humano, mejoran aquellas presentadas en otros estudios en los cuales el intervalo post-mortem

generalmente es superior a las 18 horas y el tiempo de fijación pre-seccionamiento es de meses y hasta años, pues proceden de bancos. (10, 18, 33)

7.2 HALLAZGOS CITOARQUITECTÓNICOS

El área estudiada posee una apariencia homogénea a la observación con NeuN sin desproporciones “aparentes” entre láminas supra e infragranulares, se distinguen 6 láminas corticales, la lámina I con una amplitud mediana; la lámina II algo estrecha pero fácilmente identificable gracias a las diferencias de tamaño y densidad celular entre las láminas I, II y III, en la que se distinguen células piramidales y no piramidales de tamaños pequeños a medianos conforme se acercan a lámina III. Esta última lámina es de las más amplias con presencia de células granulares y piramidales, se caracteriza por el cambio progresivo de tamaño en los somas (de pequeños a medianos y grandes) conforme se profundiza en la misma. La lámina IV es delgada y granular, fácilmente diferenciable de las láminas vecinas. La lámina V es tan amplia como la III y se observa cierto grado de sublaminaridad, la porción Vb es un poco más densa que la Va y poseen células un poco más grandes que las examinadas en lámina III. La lámina VI posee células polimórficas grandes, además es evidente la transición de la sustancia gris a la sustancia blanca. Estas características unidas a la posición topográfica y la descripción en la literatura permiten confirmar al área estudiada como el área 10o. (18, 27) El grado de definición laminar permite considerar al área 10o como isocórtex, con un grado de diferenciación laminar menor al de áreas ubicadas en posiciones más dorsolaterales del lóbulo frontal. Es necesario aclarar que el área 10 presenta diferencias intrínsecas en su citoarquitectura, diferencias que son progresivas en su desplazamiento hacia el polo frontal dentro de la superficie medial del hemisferio, de ahí que varios autores hayan intentado subdividirla (10, 21, 28, 33, 110). Basados en la descripción hecha por Ongür & Price 2003, el área estudiada corresponde a la porción 10p cara basal, con una lámina III bien definida, al punto de identificarse sublaminaridad (LIIIa y LIIIb), además de unas láminas infragranulares un poco mayores en espesor laminar, pero no tan densamente

pobladas como las supragranulares. (18)

El espesor cortical del área 10 en esta investigación oscila entre 2280,18 – 2444,29 μm , coincidiendo con lo reportado en otros estudios, por ejemplo, para el área 10 cara lateral grosor cortical desde la superficie pial hasta el comienzo de la sustancia blanca, está entre 2324,93 μm a 2301,67 μm (111), valores muy similares a los encontrados en la porción orbital (2581.1 μm - 2592.8 μm) (110)

Respecto del espesor relativo de las láminas se evidenció coincidencia entre los datos de éste y de otros trabajos previos. La lámina I de la cara orbital posee un espesor aproximado del 11% semejante al reportado por otros autores: 11% (27), 8.9-9.2% (110) y 11.9 - 12.1% (111). Al comparar las láminas supragranulares se encontró una sutil diferencia, la sumatoria de las láminas II y III para la porción orbital fluctúa entre 36.7-37.8%, para la porción lateral fue del 43-44% y para la cara medial se mantuvo entre el 43.7 al 44.1%; lo anterior permite reflexionar sobre el impacto del origen filogenético sobre el espesor cortical de un área multimodal, es decir, se ve con claridad como la tendencia ventrolateral y medio-dorsal se encuentran en la porción más rostro-polar y como las zonas cercanas a la cara lateral y medial poseen un espesor ligeramente mayor a la cara orbital. (23, 27) De manera contraria, se observa una leve disminución de las láminas infragranulares conforme se avanza en sentido orbito-medial-lateral (38%-37%-36%). Al ser una corteza granular posee una lámina IV apreciable y distinguible de sus vecinas (LIII y LV), con una proporción en relación al total de la corteza entre 6% (cara lateral), 7% (cara medial) y el 8.5-11% (cara orbital) (110, 111).

El área 10 se encuentra catalogada como una área eulaminada I, de nivel 4 según la clasificación de Barbas and Rempel-Clower 1997 (22), aclarando que es un área que establece conexiones con otras con el mismo grado de diferenciación laminar (un grado mayor o menor, es decir nivel 3 o 5), pero en un grado mucho menor con las áreas de niveles más inferiores, ejemplo: nivel 2 y 1 (disgranulares o agranulares). El predominio de las láminas supragranulares en dos de las tres caras del área 10 (lateral y medial), se explicaría por las abundantes conexiones que establece con áreas pertenecientes al nivel 3 (eje: áreas 11 y 14), eferencias que terminan en láminas infragranulares; mientras, que

las aferencias al área 10 son de áreas de niveles superiores (eje: áreas 46 y 8), conexiones que se originan en las láminas II y III, y finalizan en las V y VI. La cara orbital presenta una pequeña diferencia; y es, el incremento no significativo de las láminas infragranulares, que puede implicar dos cosas, la primera una igualdad en el establecimiento de conexiones corticales y subcorticales o un leve mayor nivel en las conexiones con estructuras límbicas (hipotálamo, amígdala, el hipocampo, la corteza entorrinal, la región anterior del giro cíngulo, entre otras) (24, 27).

Se ha establecido que el área 10 cara orbital hace parte de un macrocircuito que incluye la mayoría de áreas ubicadas en la cara basal de lóbulo frontal, integrando la información sensorial (olfato, gusto, visión, somática y límbica) procesada en estructuras como la ínsula y las cortezas post-rolándicas; diferente del circuito medial que integra las representaciones viscerales con las intenciones motoras. No obstante, estos dos circuitos mantienen retroalimentación continua entre ellos (6).

El área 10 de la superficie orbital de la corteza prefrontal del humano presenta láminas infragranulares ligeramente mayores a las láminas supragranulares, sin ser esta diferencia estadísticamente significativa (110, 111), permitiendo sugerir una similitud en el establecimiento de conexiones intracorticales, tanto asociativas como comisurales y subcorticales. También se observó un predominio de interneuronas CB- y PV-positivas en las láminas II, III y IV (103, 112), a diferencia de aquellas CR-positivas cuya distribución fue uniforme a lo largo del espesor cortical (113), datos que concuerdan con lo descrito en la literatura. (103)

Estos hallazgos generales permiten hacer hincapié en dos aspectos importantes: el primero, son las conexiones asociadas a esta particular organización celular y laminar. Las aferencias serían preferiblemente de origen cortical desde áreas prefrontales vecinas (áreas 9, 47/12, 11, 13, 14, 24, 32 ipsilaterales y el área 10 contralateral), que en la mayoría de los casos terminarían en las láminas supragranulares o desde áreas corticales con mayor nivel de definición laminar (áreas 8, 46 y 9/46) que terminarían en las láminas infragranulares (22, 24), las eferencias también serían predominantemente hacia las mismas áreas corticales de las que recibió aferencias con un origen laminar también similar. Además de estas conexiones corticales extrínsecas, también debemos considerar

aquellas generadas por colaterales axónicas que alcanzan las neuronas piramidales de las láminas superficiales de columnas vecinas y su vez a interneuronas que retroalimentan negativamente éste microcircuito. Entonces, el área 10, con estas conexiones cortico-corticales extrínsecas e intrínsecas, que se originan predominantemente en las neuronas piramidales de las láminas II-III, establecen un circuito interno de procesamiento de la información rescatada por las áreas prefrontales con las que se conecta, que facilitaría funciones, como por ejemplo los procesos metacognitivos o mantener los ítems de información on-line el tiempo suficiente para realizar una acción o llevar a cabo un pensamiento. (1, 24, 114)

El segundo aspecto son los patrones de organización laminar de los grupos de interneuronas que expresan las diversas proteínas atrapadoras de calcio, en regiones corticales de diversos animales con diferentes grado de desarrollo filogenético. Estudios realizados en varias especies (primates, roedores, gatos, marsupiales, cetáceos, ungulados e insectívoros) han facilitado definir dos patrones: el primero se caracteriza por un alto grado de diferenciación morfológica y laminar, presencia de lámina IV, cambios en el tamaño y densidad neuronal a lo largo de la corteza para las tres proteínas atrapadoras de calcio (CB, CR y PV), rasgos distintivos de los carnívoros, murciélagos, roedores y primates. El segundo patrón presenta una citoarquitectura homogénea con una notoria disminución de la lámina IV, predominio de células IR a CB y CR a expensas de las PV, particularidad observada en cetáceos y ungulados.

Estas descripciones permiten ver los cambios en el árbol filogenético de los mamíferos conforme se pasa a especies de mayor orden; coincidencialmente estos animales son los que poseen mayor grado de girificación de la corteza cerebral, en la mayoría de ellos se evidencia versiones morfológicas muy similares a las células bipolares, doble bouquet y bipenachadas, pero solo en el ratón y en el primate se reportó la presencia de células Neurogliaformes y de Martinotti. Estas células se encuentran distribuidas espacialmente de manera muy similar a la del ser humano, las células IR a CB entre lámina II-III y algunas pocas en láminas infragranulares, mientras que las células IR a CR se ubicaban de manera uniforme a lo largo de la corteza. La mayor diferencia se observó en las interneuronas IR a PV (células en cesta y en candelabro), las cuales eran más

abundantes en los caninos, los roedores y los primates entre las láminas II y V. Lo anterior unido a los hallazgos de la presente investigación, demuestran coherencia en los resultados, evidencia al humano como el punto de mayor desarrollo neocortical, y sugiere que los subtipos de interneuronas identificados con las tres proteínas atrapadoras de calcio juegan un rol específico en la migración, y en el establecimiento y maduración de los circuitos inhibitorios. (102)

7.3 SIMETRÍAS INTERHEMISFÉRICAS EN EL ÁREA 10 DEL HUMANO

Durante el último siglo se ha incrementado las investigaciones que indagan en lateralización de ciertas funciones cognitivas en el ser humano, y su posible sustrato macroscópico (tamaño de los giros, surcos y áreas), microscópico (celular y conectividad) y neuroquímico (distribución de neurotransmisores y sus receptores), en un intento por encontrar correlación entre el procesamiento de la información y el desempeño del hemisferios, va acompañada de asimetrías entre áreas homologas, como se ha reportado para las áreas corticales relacionadas con la comprensión y producción del lenguaje. (115-117) En la actualidad, podemos afirmar que no se han encontrado diferencias significativas interhemisféricas en las áreas corticales 9, 46, 24 (3, 104) y, ahora en el área 10 de la corteza prefrontal humana, al menos en los parámetros micro-estructurales (espesor cortical, espesor laminar, densidad neuronal), y citomorfológicos considerados (tamaño y forma del soma y número de procesos primarios en las subpoblaciones de interneuronas Gabaérgicas).

La simetría microestructural y citomorfológica observada entre áreas 10 de los dos hemisferios cerebrales, podría interpretarse desde varios ángulos, el primero, como un intento cortical para soportar funciones de orden cognitivo superior (pensamiento orientado o no por estímulos, introspección, divagación mental, teoría de la mente, evaluación de los estados mentales propios y externos), que requieren una alta demanda en tiempo y consciencia sobre los mismos, además de experiencia y práctica en su

desarrollo. Por lo tanto, funciones tan “humanas” necesitarían no solo de un volumen cortical generoso, con tendencia neocortical, sino del trabajo al unísono de ambas áreas homólogas para su desempeño. O la pregunta que deberíamos hacernos sería: ¿las variaciones estructurales interhemisféricas que sustenten los hallazgos funcionales en el área 10 deberían buscarse en otras variables microestructurales no consideradas hasta el momento?

Si comparamos el área 10 con las otras áreas en las cuales se han encontrado especialización citoarquitectónica y lateralización de funciones (ejemplo: áreas relacionadas con la producción, procesamiento y comprensión del lenguaje), el desarrollo de la función comienza en edades tempranas y es imperativo para la organización del resto de la corteza, además de requerir ejemplo y práctica. Por su lado, las funciones relacionadas con el área 10 requieren no solo de las mismas condiciones anteriores, sino del desarrollo previo de las esferas emocional, ética y moral en el individuo, cuyo sustrato anatómico cortical madura de forma tardía con respecto a las áreas relacionadas con el lenguaje (adolescencia y adultez joven) (78, 118, 119). Por lo tanto, nos preguntamos si las diferencias interhemisféricas en este tipo de áreas cuyo máximo nivel de organización y maduración se alcanza finalizando la tercera década de la vida, deberán buscarse en sujetos a partir de la cuarta década y no antes, como hasta ahora se ha hecho.

Muchas de las habilidades humanas sustentadas por características morfológicas y lateralización, requirieron de una aparición espontánea entre individuos a manera de variantes genéticas, la necesidad de su permanencia en la especie, patrones hereditarios y por tanto muchos años de evolución. Las funciones mentales superiores adjudicadas al área 10 no debieron estar ajenas a este proceso, su desarrollo surgió basado en la necesidad de supervivencia del hombre ante los ambientes hostiles, la búsqueda de alimento y la compleja red socio-cultural que lo acompaña. Es imperativo aclarar, que sin esta última característica no habría sentido para el desarrollo de estas funciones. Esta antesala, tiene como objetivo preguntarnos, si ¿se requerirá más años de evolución para que ciertas funciones específicas del área 10 en cada hemisferio tengan su propio sustento neurobiológico?

Por último, nos preguntamos si, la diferencia en un área supramodal como el área 10, podría radicarse en la conectividad macroscópica, teniendo en cuenta que estudios de imagenología funcional y estudios de casos patológicos, muestran que varias de las funciones mentales superiores no se pueden adjudicar a una zona cerebral específica, pues supera los límites de una o más áreas.

7.4 DISTRIBUCIÓN DE LAS SUBPOBLACIONES DE INTERNEURONAS GABAÉRGICAS EN EL ÁREA 10 DEL HUMANO

En el presente trabajo, nosotros reportamos la densidad absoluta y la densidad relativa de cada subpoblación de interneuronas (identificada con cada proteína atrapadora de calcio) en cada lámina cortical al interior del área 10 del humano.

En el área 10 la proporción de interneuronas identificadas por proteína atrapadora de calcio difieren en algunos casos con lo reportado en la literatura para otras áreas corticales y otras especies de animales. No hay cifras en la literatura que permitan comparar los datos obtenidos en el presente trabajo, ya que han sido obtenidos sin discriminar los conteos por lámina cortical, y generalmente la población total de neuronas es estimada a partir de la marcación con Nissl, la cual identifica toda la población celular del tejido y hace difícil distinguir astrocitos de interneuronas Gabaérgicas corticales.

Las células IR para CR representan la mayor subpoblación de interneuronas Gabaérgicas de la corteza cerebral y la de mayor extensión al encontrarse en todas las regiones y en todas las láminas corticales. Encontramos que la subpoblación de interneuronas más abundante en el área 10 también fueron las células CR+, con distribución homogénea desde la lámina I hasta la VI y una proporción variable por lámina respecto de las células CB+ y PV+. La representación de esta subpoblación de interneuronas varía dependiendo de la lámina, fluctuando desde 58,9% en la lámina II hasta un 100% en la lámina I del total de interneuronas (Ver Tabla # 5).

Algunas revisiones sugieren que la subpoblación de interneuronas CR+ corresponde al 45-50% del total de interneuronas Gabaérgicas (120) y que corresponderían al 9% y 21% del total de la población neuronal de la corteza cerebral de los mamíferos (121). En la corteza visual del conejo se identificó un predominio de estas células en las capas II (35%) y III (28,4%), con cerca de las dos terceras partes de la población total de estas interneuronas (122); en la corteza prefrontal medial de la rata se ha reportado células CR+ en las seis láminas con predominio de las capas supragranulares (107) y en la corteza visual se halló un leve predominio en las capas supragranulares de esta subpoblación, particularmente en la lámina I fue del 20%, en las capas II-III del 16.2%, y en la lámina IV con 15,8% (121); en la corteza prefrontal medial del macaco esta población de interneuronas corresponde al 11% del total de neuronas, con un predominio en las láminas II y parte superficial de la III y un descenso progresivo hacia la lámina VI (109); y en el humano se ha reportado que las células CR+ se limitan a las láminas supragranulares en las áreas auditivas primarias y conforme se pasa a las áreas secundarias se extiende a capas infragranulares (123), en la corteza temporal no-auditiva se distribuyen homogéneamente a lo largo de todas las capas corticales con una mayor densidad en las láminas II (21,67%) y III (13,32%) (124); y en la corteza prefrontal medial las interneuronas CR+ corresponden al 8% de la población neuronal total, siendo las láminas II (33-41%) y III (39-43%) las más pobladas por este subtipo celular. (125)

En la presente investigación, encontramos que las células PV+ constituyen la segunda subpoblación de interneuronas Gabaérgicas corticales en el área 10 del humano. Estas células, en su mayoría se distribuyen sobre las láminas II, III, IV y V y su representación fluctúa desde un 0% en la lámina I, pasando por un 12-18% en las láminas II, III y VI, hasta un 21-22% en las láminas IV y V del total de interneuronas en cada una de esas láminas (Ver Tabla # 5). Otros autores estiman su proporción en no más del 25% del total de las interneuronas Gabaérgicas corticales en el humano (120). En la corteza visual del conejo se identificó un predominio de estas células en las capas IV (28,9%), V (26,5%) y VI (25,9%), y su presencia en capas supragranulares solo fue ocasional (122); en la corteza visual de la rata representan un 50.8% de células que co-expresan Gaba y PV, y también son las interneuronas predominantes en las láminas IV (72.8%), V (69.9%) y VI (52.8%), y entre las láminas II y III suman solo 37.2% del total de las interneuronas (101);

en la corteza prefrontal medial de la rata también se reportó abundante presencia de estas células en la parte profunda de la lámina III, y en las láminas IV y V (107). La misma distribución se observó en la corteza prefrontal medial del macaco en la cual se reportó que correspondían al 5.9% del total de las neuronas de la región (109). En la corteza auditiva primaria del humano se ha descrito un patrón similar al observado en el primate no-humano, con predominio de marcación de células PV+ en las láminas II/III, IV y V, distribución que disminuye al observarse las áreas auditivas secundarias (124). En la corteza prefrontal dorsolateral (áreas 9 y 46) de humano se observaron dos bandas horizontales de neuropilo, la primera en las láminas II/III y la otra en láminas V/VI (3) y en la corteza frontopolar orbital ya se había reportado una distribución similar de estas células con predominio en las láminas intermedias. (2)

En el presente trabajo, la cantidad de células encontradas que expresan CB representó la menor de las subpoblaciones de interneuronas Gabaérgicas corticales, con un marcado predominio en las láminas supragranulares, representando su mayor densidad relativa en la lámina II con un 27%, seguida de la lámina III con un 14,4% y fluctuando entre 0 y 4% en las demás láminas corticales (Ver Tabla # 5). En la corteza visual del conejo, se encontró que estas células se distribuían en casi todas las láminas corticales pero con preferencia por las láminas intermedias e infragranulares (lámina IV 20.8%, V 26,2%, y VI 19%) (122); y en la de la rata, aunque también se encontraban en todas las láminas corticales, se evidenció una mayor disposición en las capas II/III y IV, aportando casi el 19% del total de interneuronas de la corteza visual de esta especie. (101) Otro estudio menciona que las células CB+ podrían representar hasta el 25% de la población total de interneuronas Gabaérgicas en la corteza visual de la rata (120); entretanto en la corteza prefrontal medial tendrían su pico en las láminas III y V (107). En la corteza prefrontal medial del macaco se ha observado, como en el presente trabajo, células piramidales como no-piramidales IR para CB, las primeras diferenciadas en la parte profunda de la lámina III y en la lámina V, mientras que las no-piramidales se presentan predominantemente en las capas II-III y disminuyen su densidad gradualmente conforme se acercan a la sustancia blanca. (108) Se ha reportado que las interneuronas CB+ son el 5% del total de neuronas del macaco. (109, 124) En la corteza auditiva primaria del

humano, CB se expresa de igual manera que en la corteza prefrontal medial del macaco y que en el área 10 del humano, permitiendo identificar tanto células piramidales como no-piramidales, con mayor presencia de estas últimas en láminas supragranulares (lámina II: 24,73% y lámina III: 6,71%); y corresponderían al 26% del total de interneuronas Gabaérgicas de esta corteza. (109, 124) En la corteza prefrontal dorsolateral y en la corteza frontopolar orbital del humano, también se han reportado algunas descripciones previas de la distribución de las interneuronas CB+, sugiriendo igualmente, un predominio en su distribución supragranular. (3)

De la comparación de los resultados de la presente investigación con los datos encontrados en la literatura, podemos concluir que la distribución laminar de las interneuronas que expresan CaBPs conserva similitud entre especies, es decir, cada marcación se limita a las mismas láminas corticales y algunos subtipos morfológicos típicos entre áreas homólogas; las mayores diferencias que por cierto son sutiles, radican en la distribución y proporción de las CaBPs según el grado de desarrollo laminar y especialización por área cortical. Así mismo, se aprecia que de las áreas sensoriales primarias (como el área visual primaria) a las supramodales (como el área 10), o de áreas prelímbicas (como las áreas 24 y 32) a las áreas más neocorticales (como el área 10), las interneuronas Gabaérgicas tienden a pasar de concentrarse en las capas infragranulares a las supragranulares; y la presencia de los subtipos PV+ y CB+ tienden a disminuir.

7.5 MORFOMETRÍA DE LAS INTERNEURONAS GABAÉRGICAS CORTICALES DEL ÁREA 10 DEL HUMANO

Entre las 1646 interneuronas valoradas en las láminas II y III del área 10 orbital del humano durante el presente estudio, se lograron identificar algunos subtipos morfológicos, descritos por Zaitsev y col (4, 5) gracias al reconocimiento de características como el tamaño y la forma del soma, la cantidad de procesos primarios y su orientación, la

ubicación laminar y la proteína atrapadora de calcio que expresan, ante la dificultad de distinguir entre procesos axonal y dendríticos.

Entre las interneuronas más fáciles de reconocer se encuentra el grupo de las interlaminares, por su soma pequeño y ovalado, sus procesos nacidos de los polos del cuerpo celular, con procesos que se ramifican proximalmente y hacia las láminas más superficiales y/o profundas. Estas células corresponderían a las denominadas células doble bouquet o bipenachadas (entre estas las “Horse-tail”) y células bipolares, usualmente ubicadas en las láminas II-III y que expresan CR o CB; agrupadas así (VOBC-DBC) por el grupo Petilla en el 2008. (89) (Ver Anexo # 7, imagen A, B, C, D, E, F)

Existen otros tres subtipos morfológicos que fueron más difíciles de reconocer dada la importancia de sus terminales axonales; por lo tanto, características como la forma de su soma, el número de procesos primarios, la orientación de los mismos y la proteína atrapadora de calcio que expresan, permitió su identificación. Uno de estos subtipos podrían corresponder a las células neurogliaformes (NGFC), con somas casi esféricos, múltiples procesos primarios radiales, cortos y ondulados, a manera de cuentas de rosario, identificadas con el marcador para CB (Ver Anexo # 7, imagen G). Las otras dos interneuronas poseen procesos que se distribuyen intralaminar y transcolumnarmente, identificadas gracias a que son las únicas células que expresan PV, esto en conjunto con otras características morfológicas como la ubicación laminar (predominantemente en la lámina III y IV), el tamaño de sus somas entre medianos a grandes, con formas multipolares, semi-esféricos u ovalados permiten concluir que corresponderían a las células en candelabro o en cesta (Ver Anexo # 7, imagen K, L, M, N, O, P) (5, 91).

Existe un último subtipo, tal vez el más observado y que no entra en ninguna categoría previa, con un soma de apariencia irregular (ni esférica ni ovalada), de tamaño entre pequeño y grande, con procesos dendríticos y axonales radiales y tortuosos (5, 91). Cada interneurona de este subtipo podría corresponder a cualquiera de los tipos morfológicos clásicos, pero la dificultad para marcar la extensión total de sus procesos, de distinguir dendritas de axón y el lugar de sus terminales axónicas sobre la neurona piramidal, hacen difícil denominaciones específicas más allá de describir sus características (Ver Anexo # 7, imagen G, H, I).

En el análisis de las variables morfológicas se encontró que las interneuronas presentan un incremento progresivo del tamaño del soma al pasar de una proteína atrapadora de calcio a la otra, siendo las de mayor tamaño aquellas que expresan PV seguidas por las CB+ y las más pequeñas las CR+. Variaciones que no presentan diferencias interhemisféricas.

En la cara medial y lateral del área 10 se han reportado tamaños de somas no piramidales que oscilan entre $43.64 \mu\text{m}^2$ (célula ubicada en la lámina V) a $97.60 \mu\text{m}^2$ (célula ubicada en la lámina I), datos que coinciden con el actual estudio ($57,16 - 99,6 \mu\text{m}^2$) (111). En una investigación finalizada en el 2012 por el Centro de Estudios Cerebrales (126), se observó en la lámina II un aumento progresivo del espesor cortical, la densidad celular y el tamaño del soma conforme se pasa de un área agranular (área 24) a un área granular (área 46) (PV: $A24= 44,0 \pm 7,59$, $A46=132,2 \pm 31,5$, CB: $A24= 44,3 \pm 11,2$, $A46=105,2 \pm 14,0$, CR: $A24=72,6 \pm 7,5$, $A46: 98,14 \pm 21,8$)(126), permitiendo ubicar al área 10 en medio de esta transición (datos sin publicar).

Otro estudio realizado en la Corteza Prefrontal medial del Macaco (108) mencionan valores entre 4.9 a $27.8 \mu\text{m}$ en el tamaño del soma de las interneuronas, mientras que para cada proteína atrapadora de calcio las medidas no solo fueron diferentes sino contrarios a los nuestros (CR: $9,0 \pm 0,8 \mu\text{m}$; CB: $11,9 \pm 1,1$; y PV: $12,9 \pm 1,1 \mu\text{m}$). Las diferencias entre nuestro estudio y el referido previamente radican en la técnica para determinar el tamaño del soma en cada uno, siendo en nuestro caso el área (bordeando el perímetro, en μm^2) y el otro estudio determinó el diámetro del círculo del soma (y no todos los somas son circulares, en μm).

En nuestro análisis de las variables morfológicas también se observó la tendencia del tamaño del soma para las variables factor forma y número de procesos, es decir, las neuronas con soma de tendencia más esférica son las PV+ y las de tendencia más ovalada las CR+, y las interneuronas con más número de procesos primarios son las PV+ y las de menor número son las CR+. Estos datos coinciden con los de otro estudio hecho en corteza prefrontal medial de macaco en el que también se observó el mismo aumento progresivo en el número de procesos, por ejemplo: las células con morfología bipolar-

bipenachadas (VOBCs) poseen dos procesos, mientras que las neurogliaformes entre 10 a 12 por célula, quedando el resto de subtipos de interneuronas con un promedio 4 a 6 procesos. (5)

El análisis del factor forma permitió confirmar algunas tendencias observadas de manera cualitativa durante la recolección de los datos; primero, el grado de circunferencia del soma no está relacionado con su ubicación laminar, y segundo, las formas irregulares y fusiformes predominan en células CR+ y CB+, mientras que las formas más esféricas las poseen células positivas para PV. Esto nos permite concluir que el grupo de interneuronas Gabaérgicas con las características morfológicas más particulares de los tres, es el de aquellas que expresan Parvalbúmina.

Zaitsev y col 2009 (5) también tomaron la forma del soma con el objetivo describir y clasificar las interneuronas del área 9 y 46 del macaco, encontrando que las células con mayor grado de esfericidad son las neurogliaformes (NGFC) y células en cesta grandes (LAC), mientras que las células con tendencia a formas fusiformes son las doble bouquet, algunas en candelabro y las VOBCs (soma oval o multipolar con gruesos troncos axonales descendentes y colaterales horizontales, con terminales en garra). Ese estudio y el presente coinciden en que las células con mayor grado de circunferencia de sus soma son las PV+ (células en cesta) y CB+ (Neurogliaformes), mientras que las células con forma ahusadas son las CR+ (bipenachadas, bipolares) y CB+.

En el presente estudio también encontramos que el tamaño del soma de las interneuronas aumenta significativamente de la lámina II a la lámina III, en las tres subpoblaciones, pero las otras variables morfológicas consideradas no presentan diferencias entre las láminas.

Las pruebas de correlación que se llevaron a cabo, mostraron como las diferentes características morfológicas valoradas en cada subpoblación de interneuronas Gabaérgicas de las láminas II y III del área 10 orbital del humano, parecen establecer una interdependencia entre ellas. Así, las interneuronas CB+ poseen un soma que aumenta de tamaño conforme se profundiza en la corteza cerebral, al tiempo que se hace más ovoide y posee menos procesos primarios. Las células PV+ también aumentan de tamaño entre más profundas se ubican en la corteza cerebral, pero a diferencia de las CB+,

tienden al mismo tiempo a hacerse más esféricas y aumentar sus procesos primarios. Las células CR+ aumentaron el tamaño del soma de la lámina II a la lámina III, con formas predominantemente ovaladas en lámina II y un subgrupo muy particular hacia lámina III con formas más irregulares y mayor cantidad de procesos. Este análisis permite concluir que de las tres subpoblaciones de interneuronas Gabaérgicas, el grupo de las CR+ es más homogéneo translaminarmente, y las que expresan CB y PV tienen características morfológicas particulares por cada lámina. Probablemente, las especificidades morfológicas de las interneuronas por lámina, correspondan a roles particulares en el control inhibitorio sobre otras interneuronas o sobre neuronas piramidales, para el procesamiento de información que ingresa o sale de estas.

El análisis de conglomerado permitió condensar abundante información de cada célula y de una abundante cantidad de interneuronas en una sola área cortical, con el fin de obtener una clasificación objetiva y coherente, en la cual una sola o dos variables no definieran la agrupación, sino la asociación de varias de ellas; por eso los grupos (conglomerados) fueron descritos por al menos tres de las variables consideradas (forma del soma vs tamaño del soma vs número de procesos vs CaBPs vs lámina). El resultado del análisis de conglomerado no fue ajeno a lo que nos esperábamos de acuerdo con el análisis descriptivo, inferencial y correlacional de las variables hecho previamente, de hecho muchas de las asociaciones encontradas coincidieron con las correlaciones y lo descrito en la literatura para las células que expresan estas CaBPs. Por ejemplo, con respecto a nuestras correlaciones, los conglomerados 3 y 5, mostraron somas con aumento progresivo de tamaño y factores formas cada vez más fusiformes, los conglomerados 1, 2 y 3 mostraron un aumento progresivo del tamaño de su soma y del número de procesos primarios, y en los conglomerados 4, 7 y 8 se observó como el número de procesos primarios aumentaba conforme el tamaño del soma y la célula se hacía más esférica. Con respecto a lo reportado en la literatura para las subpoblaciones de interneuronas que expresan cada CaBP, las células PV+ presentan somas grandes, con aumentos graduales hacia lámina III y formas cada vez más poligonales y circunferenciales en la misma dirección (conglomerados 4, 7 y 8), mientras que las células CB+ y CR+ poseen somas fusiformes e irregulares, con tamaños entre pequeños y medianos, y con una distribución homogénea a lo largo de las dos láminas

(conglomerados 1, 2, 3 y 5); y hubo un par de excepciones, de pequeños grupos de interneuronas cuyas características morfológicas eran especiales (conglomerados 6 y 7).

7.6 ASPECTOS FUNCIONALES DEL ÁREA 10

Podemos decir que el área 10 orbital del humano posee unas características citoarquitectónicas importantes, las cuales se resumen en el Anexo # 8; un espesor laminar equilibrado entre las láminas supra e infragranulares, mayor densidad celular en láminas supragranulares tanto para neuronas piramidales como interneuronas, un espesor cortical mayor al compararlo con áreas agranulares y disgranulares, buen grado de diferenciación laminar, al punto de distinguirse las 6 láminas corticales, con una lámina IV de 8-10% del espesor cortical total, una distribución espacial de las células IR para CR, CB y PV similar a la descrita en la literatura para áreas asociativas supramodales, subpoblaciones de interneuronas que expresan CaBPs con claras diferencias morfológicas entre ellas (soma más grande, con forma esférica y mayor número de procesos primarios en células PV+ y tendencia a formas irregulares y ovalados, somas más pequeños y menor número de procesos en células CB+ y aún más en CR+) y sin asimetrías hemisféricas para ninguno de los parámetros anteriormente mencionados.

En la segunda parte del Anexo # 8, se presenta cómo los grupos formados por el análisis de conglomerado se asocian con las correlaciones halladas en el análisis de correlación de las variables citomorfológicas del presente estudio. La observación de estas asociaciones permitió organizar un modelo que sugiere el funcionamiento de las interneuronas alrededor de las neuronas piramidales en las láminas supragranulares del área 10 orbital y relacionar éste con las funciones en las que se ha vinculado a la misma área cortical.

La base del control inhibitorio del área 10 orbital son las interneuronas CB y CR positivas, las cuales constituyen la gran mayoría de células Gabaérgicas corticales y están distribuidas en la misma proporción tanto en lámina II como en la III (esto se evidencia en los Conglomerados # 1 y 2). Estas células corresponden a subtipos morfológicos

específicos (células fusiformes u ovoides como las doble bouquet, bipenachadas y algunas neurogliaformes), y se les suman algunas neuronas de otros conglomerados (como los #1 4, 5 y 6) con un mayor tamaño del soma y número de procesos, pero localizadas en mayor medida en la lámina III. Lo anterior permite establecer que las células predominantes en las láminas II y III son interneuronas con procesos de orientación vertical, de árbol axonal preferentemente descendente hacia láminas intermedias e infragranulares, generando una regulación inhibitoria translaminar e intracolumnar sobre las porciones distales de las dendritas apicales de las neuronas piramidales, lo cual generaría tanto una regulación de las aferencias como una retroalimentación negativa al interior de la columna cortical.

En la lámina III se localizaron interneuronas pertenecientes a todos los conglomerados, lo que permite decir que posee una mayor diversidad morfológica que la lámina II; además se encontraron correlaciones entre variables citomorfológicas específicas (no siendo así en la lámina II), tales como: A. células que a mayor tamaño, mayor número de procesos, B. somas que a mayor tamaño, mayor forma ovoide (estas dos correlaciones se encontraron para células CB y CR positivas), y C. células PV positivas con tamaños grandes y formas más circunferenciales conforme aumentaba su número de procesos. Estas características pueden estar relacionadas con un mayor árbol dendrítico y sobretodo axonal de estas interneuronas, el cual daría soporte a una mayor actividad regulatoria de las aferencias de las neuronas piramidales (en el caso de las correlaciones A y B), las cuales establecen circuitos tanto intrahemisféricos como interhemisféricos desde la lámina III.

Es necesario destacar que las células PV positivas (interneuronas en cesta y en candelabro) ubicadas en la lámina III poseen una morfología particular respecto de las interneuronas que expresan las otras CaBPs o de aquellas ubicadas en la lámina II: sus somas son los de mayor tamaño, lo que presupone un árbol axonal extenso y profuso; y sus procesos tienen dirección oblicua (un poco más horizontal que vertical), por lo que su influencia axonal es levemente translaminar y claramente transcolumnar. Es bien conocido que su dominio sináptico es el soma y el segmento inicial del axón de la neurona piramidal donde ejerce el mayor poder inhibitorio por sus características electrofisiológicas

particulares. El hallazgo de la correlación C mencionada en el párrafo anterior y las características fisiológicas y morfológicas anteriormente destacadas de las neuronas PV positivas, nos permiten sugerir que estas neuronas y sus procesos influyen en la actividad de las minicolumnas e incluso de columnas aledañas, las cuales no procesarían los mismos ítems de información que la columna que aloja el soma, generando especificidad en el procesamiento de los mismos, al tiempo que podría sincronizar y sostener la actividad de las neuronas piramidales de la lámina III, las cuales realizan conexiones principalmente intrafrontales e interhemisféricas.

Lo anterior nos permite decir, que las interneuronas ubicadas en láminas supragranulares poseen unas características morfológicas particulares a la función que desempeñan al interior de los circuitos cortico-corticales, y su distribución axonal y dendrítica apoya la actividad al interior de los módulos funcionales descritos por Melchinzky, González-Burgos, Barrionuevo & Lewis 2001. Esta configuración celular del componente inhibitorio podría explicar procesos como la actividad sostenida, importante para llevar a cabo funciones de memoria operativa, atención, recuperación de memoria episódica y prospectiva, e inclusive el desarrollo de múltiples tareas; todas estas, habilidades adjudicadas al área 10 (24, 27, 51, 52, 54, 56, 110).

El tamaño y la ubicación hemisférica, y dentro del lóbulo frontal, del área 10 es el resultado del desarrollo evolutivo de dos tendencias corticales (arquicorteza - paleocorteza), extendiéndose sobre las tres caras y subdividida por algunos autores, según el tamaño y grado diferenciación de las láminas III y IV. Es un área asociativa con amplia conectividad con otras áreas prefrontales, con otras asociativas del lóbulo temporal y con regiones límbicas corticales y subcorticales, participando en la integración de diversas modalidades de información. Esta conectividad explicaría el rol de la porción lateral y medial del área 10 en la hipótesis de la compuerta; comunicando el contenido mental interno (recuerdos, sentimientos, mente errante etc.) y el estímulo externo (información sensorial) en la representación mental y en el intercambio de la atención entre estímulos, además de la connotación emocional a las experiencias que se vive o recuerda. (18, 22, 33, 44)

El aporte más valioso de los estudios que exploran la citoarquitectura y morfología de una región cerebral en particular, es la descripción de sus características citomorfológicas y estructurales en condiciones “normales”, permitiendo posteriores comparaciones con estadios patológicos, alteraciones del desarrollo o comparación entre especies. Se ha reportado alteraciones estructurales en la corteza prefrontal humana asociadas a patologías neuropsiquiátricas como por ejemplo: autismo, esquizofrenia, trastorno por déficit de atención e hiperactividad, depresión, drogadicción y trastorno obsesivo-compulsivo, entre otros. (127-132)

En el autismo se ha descrito alteraciones en el tamaño de las minicolumnas corticales, densidad neuronal y tamaño celular en áreas 9 y 10 (127, 128, 133), en esquizofrenia se ha sugerido diversas hipótesis que en conjunto pueden explicar algunos de los signos y síntomas observados en los pacientes, por ejemplo: alteraciones genéticas (genes involucrados en el desarrollo de la corteza cerebral, transmisión glutamatérgica e inhibidores de señalización intracelular) (129, 134), el funcionamiento defectuoso de los mecanismos dopaminérgicos ocasionando un exceso del neurotransmisor en el neocorteza (135-137), este último, no es el único neurotransmisor reportado en esquizofrenia, se ha sugerido que la regulación inadecuada del glutamato y Gaba aportarían elementos a la fisiopatológica de la enfermedad (138), dato corroborado por estudios de conectividad y citomorfología que demuestran que las células más afectadas en esta enfermedad son las células en candelabro, ubicadas en láminas supragranulares e intermedias de la corteza prefrontal humana (131, 139-141), dejando la inquietud de si los cambios morfológicos y por lo tanto funcionales en estas interneuronas (pobre efecto inhibitorio en el segmento inicial del axón sobre células piramidales) son la causa o la consecuencia de la patología, conociendo de antemano múltiples factores epigenéticos y genéticos involucrados en su desarrollo.

A futuro se debe continuar con la exploración de la citomorfología y conectividad de las neuronas en la Corteza Prefrontal humana, con métodos que permitan una reconstrucción de toda su morfología (softwares para análisis en 3D), múltiples marcajes y comparaciones entre áreas con diferentes grados de laminaridad y origen cortical, con el

objetivo de relacionar la citoarquitectura y conectividad con la(s) función(es) adjudicada(s) a la región cerebral por lesiones, estudios postmortem, neuroimagen y tractografía. Conociendo de antemano las dificultades para obtener tejido humano postmortem y más cuando se requiere con antecedentes de alguna patología neuropsiquiátrica, sería un aporte significativo al conocimiento, un estudio comparativo con una muestra más grande de individuos, que aborde las características evaluadas en la presente investigación, además, de otras más específicas como el número y calidad de las terminales axonales por subtipo de interneurona y la configuración y tamaño de los módulos funcionales descritos en láminas supragranulares de áreas prefrontales.

8. CONCLUSIONES

El área 10p cara basal es una área eulaminada tipo I, de nivel 4 (22) con un grado de diferenciación laminar típico de una neocorteza, pero, un grado menor a las ubicadas en la cara dorsolateral del lóbulo frontal. Su descripción es igual a la expuesto por otros investigadores como Ongur & Price 2003 (18); sublaminaridad en la lámina III, con mayor densidad celular en láminas supragranulares y láminas infragranulares ligeramente mayores a las supragranulares. Se observó una distribución uniforme a lo largo de las seis láminas corticales de las células CR positivas, mientras que las células CB y PV positivas predominaron sobre láminas supragranulares e intermedias, estas características se han descrito en carnívoros, murciélagos, roedores y primates. Llama la atención, la conservación entre especies de la distribución laminar y de algunos subtipo de interneuronas, las diferencias, aunque pequeñas se observaron en la tendencia de las interneuronas a localizarse en láminas supragranulares, en especial de células positivas a PV.

No se encontraron diferencias significativas interhemisféricas en el área 10 de la corteza prefrontal humana en los parámetros citomorfológicos y micro-estructurales estudiados. Sin embargo se logró identificar subtipos morfológicos descritos por otros investigadores como Zaitsev y col & el grupo Petilla (por ejemplo: células doble bouquet, bipenachadas o bipolares o VOBC-DBC, entre otras).

La única variable morfológica que mostro un aumento conforme se profundizaba en la corteza y se pasa de una proteína atrapadora de calcio a la otra, fue el tamaño del soma (células positivas a PV>CB + >CR +). Esta tendencia también se observó para las variables factor forma y número de procesos, siendo las neuronas con somas más esféricos las PV+ y las de formas más ahusadas las CR+, mientras que las interneuronas con mayor número de procesos primarios son las PV+ y las de menor número son las CR+. Lo anterior permite concluir que las tres subpoblaciones de interneuronas Gabaérgicas, el grupo de las CR+ es más homogéneo translaminarmente, y las que expresan CB y PV tienen características morfológicas particulares por cada lámina

Uno de los hallazgos más interesantes fue la interdependencia entre las variables cito morfológicas con las pruebas de correlación y el análisis de conglomerado. Ambos muestran conjuntos de neuronas que responden a las necesidades de su posición laminar, a su morfología, al tipo de información que procesan en el momento y al rol inhibitorio que ejerce en la corteza.

9. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Buritica, Efrain,. Organización Neuronal de las regiones lateral y medial del area 10p de la corteza prefrontal del humano. Centro de Estudios Cerebrales, Universidad del Valle; 2007. p. (Tesis para optar por el titulo de Maestria, sin publicar).
2. Umbarila, John Organización del Area 10p orbital de la corteza cerebral del humano citoarquitectura y asimetria. Centro de Estudios Cerebrales, Universidad del Valle; 2006. p. (Tesis para optar por el titulo de Maestria, sin publicar).
3. Arteaga, Pimienta, Escobar. Neuronas Inmunoreactivas a Parvalbumina y Calbindina en la Corteza Prefrontal Dorsolateral de sujetos humanos. Acta Neurologica Colombiana; 2004.
4. Zaitsev AV, Gonzalez-Burgos G, Povysheva NV, Kröner S, Lewis DA, Krimer LS. Localization of calcium-binding proteins in physiologically and morphologically characterized interneurons of monkey dorsolateral prefrontal cortex. Cereb Cortex. 2005;15(8):1178-86.
5. Zaitsev AV, Povysheva NV, Gonzalez-Burgos G, Rotaru D, Fish KN, Krimer LS, et al. Interneuron Diversity in Layers 2–3 of Monkey Prefrontal Cortex. Cerebral Cortex. 2009;19(7):1597-615.
6. Joaquín M F. Chapter 2 - Anatomy of the Prefrontal Cortex. The Prefrontal Cortex (Fourth Edition). San Diego: Academic Press; 2008. p. 7-58.
7. Vogt CaV, O. Allgemeine Ergebnisse unserer Hirnforschung. J. Psychol. Neurol; 1919. p. 279-462.
8. Sanides F. The cyto-myeloarchitecture of the human frontal lobe and its relation to phylogenetic differentiation of the cerebral cortex. J . Hirnforsch.; 1964. p. 269 – 82.
9. Ramnani N, Owen AM. Anterior prefrontal cortex: insights into function from anatomy and neuroimaging. Nat Rev Neurosci. 2004;5(3):184-94.
10. Petrides M, Pandya DN. Dorsolateral prefrontal cortex: comparative cytoarchitectonic analysis in the human and the macaque brain and corticocortical connection patterns. Eur J Neurosci. 1999;11(3):1011-36.
11. Petrides M. Lateral prefrontal cortex: architectonic and functional organization. Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences. 2005;360(1456):781-95.
12. Petrides M, Pandya DN. Association fiber pathways to the frontal cortex from the superior temporal region in the rhesus monkey. J Comp Neurol. 1988;273(1):52-66.
13. Petrides M. Nonspatial conditional learning impaired in patients with unilateral frontal but not unilateral temporal lobe excisions. Neuropsychologia. 1990;28(2):137-49.
14. Petrides M. Frontal lobes and behaviour. Curr Opin Neurobiol. 1994;4(2):207-11.
15. Petrides M. Functional organization of the human frontal cortex for mnemonic processing. Evidence from neuroimaging studies. Ann N Y Acad Sci. 1995;769:85-96.
16. Bachevalier J, Mishkin M. Visual recognition impairment follows ventromedial but not dorsolateral prefrontal lesions in monkeys. Behav Brain Res. 1986;20(3):249-61.
17. Petrides M. The orbitofrontal cortex: novelty, deviation from expectation, and memory. Ann N Y Acad Sci. 2007;1121:33-53.

18. Öngür D, Ferry AT, Price JL. Architectonic subdivision of the human orbital and medial prefrontal cortex. *The Journal of Comparative Neurology*. 2003;460(3):425-49.
19. Lewis DA, Melchitzky DS, Burgos GG. Specificity in the functional architecture of primate prefrontal cortex. *J Neurocytol*. 2002;31(3-5):265-76.
20. Ferry AT, Ongür D, An X, Price JL. Prefrontal cortical projections to the striatum in macaque monkeys: evidence for an organization related to prefrontal networks. *J Comp Neurol*. 2000;425(3):447-70.
21. Dombrowski SM, Hilgetag CC, Barbas H. Quantitative architecture distinguishes prefrontal cortical systems in the rhesus monkey. *Cereb Cortex*. 2001;11(10):975-88.
22. Barbas H, Rempel-Clower N. Cortical structure predicts the pattern of corticocortical connections. *Cereb Cortex*. 1997;7(7):635-46.
23. Barbas H, Pandya DN. Architecture and intrinsic connections of the prefrontal cortex in the rhesus monkey. *J Comp Neurol*. 1989;286(3):353-75.
24. Buriticá-Ramírez E, Pimienta-Jiménez HJ. Corteza Frontopolar Humana: Area 10. *Revista Latinoamericana de Psicología*. 2007;39(1):127-42.
25. Petrides M, Tomaiuolo F, Yeterian EH, Pandya DN. The prefrontal cortex: comparative architectonic organization in the human and the macaque monkey brains. *Cortex*. 2012;48(1):46-57.
26. Yeterian EH, Pandya DN, Tomaiuolo F, Petrides M. The cortical connectivity of the prefrontal cortex in the monkey brain. *Cortex*. 2012;48(1):58-81.
27. Semendeferi K, Armstrong E, Schleicher A, Zilles K, Van Hoesen GW. Prefrontal cortex in humans and apes: a comparative study of area 10. *Am J Phys Anthropol*. 2001;114(3):224-41.
28. Semendeferi K, Lu A, Schenker N, Damasio H. Humans and great apes share a large frontal cortex. *Nat Neurosci*. 2002;5(3):272-6.
29. Jacobs B, Schall M, Prather M, Kapler E, Driscoll L, Baca S, et al. Regional dendritic and spine variation in human cerebral cortex: a quantitative golgi study. *Cereb Cortex*. 2001;11(6):558-71.
30. Elston GN. Pyramidal cells of the frontal lobe: all the more spinous to think with. *J Neurosci*. 2000;20(18):RC95.
31. Jelinek HF, Elston GN. Pyramidal neurones in macaque visual cortex: Interareal phenotypic variation of dendritic branching patterns. *Fractals*. 2001;09(03):287-95.
32. Elston GN, Jelinek HF. Dendritic branching patterns of pyramidal cells in the visual cortex of the new world marmoset monkey, with comparative notes on the old world macaque monkey. *Fractals*. 2001;09(03):297-303.
33. Hof PR, Mufson EJ, Morrison JH. Human orbitofrontal cortex: cytoarchitecture and quantitative immunohistochemical parcellation. *J Comp Neurol*. 1995;359(1):48-68.
34. Catani M, Dell'acqua F, Vergani F, Malik F, Hodge H, Roy P, et al. Short frontal lobe connections of the human brain. *Cortex*. 2012;48(2):273-91.
35. JB S, J S, CR C, A C, K A, K Z. Primate Prefrontal Cortex Evolution: Human Brains Are the Extreme of a Lateralized Ape Trend. *Brain Behavior and Evolution*; 2011. p. 67 - 78.
36. Smaers JB, Steele J, Case CR, Cowper A, Amunts K, Zilles K. Primate prefrontal cortex evolution: human brains are the extreme of a lateralized ape trend. *Brain Behav Evol*. 2011;77(2):67-78.

37. Morecraft RJ, Van Hoesen GW. Frontal granular cortex input to the cingulate (M3), supplementary (M2) and primary (M1) motor cortices in the rhesus monkey. *J Comp Neurol.* 1993;337(4):669-89.
38. Bachevalier J, Meunier M, Lu MX, Ungerleider LG. Thalamic and temporal cortex input to medial prefrontal cortex in rhesus monkeys. *Exp Brain Res.* 1997;115(3):430-44.
39. Kondo H, Saleem KS, Price JL. Differential connections of the temporal pole with the orbital and medial prefrontal networks in macaque monkeys. *J Comp Neurol.* 2003;465(4):499-523.
40. Hackett TA, Stepniewska I, Kaas JH. Prefrontal connections of the parabelt auditory cortex in macaque monkeys. *Brain Res.* 1999;817(1-2):45-58.
41. Ghashghaei HT, Barbas H. Neural interaction between the basal forebrain and functionally distinct prefrontal cortices in the rhesus monkey. *Neuroscience.* 2001;103(3):593-614.
42. Barbas H, De Olmos J. Projections from the amygdala to basoventral and mediodorsal prefrontal regions in the rhesus monkey. *J Comp Neurol.* 1990;300(4):549-71.
43. Erickson SL, Melchitzky DS, Lewis DA. Subcortical afferents to the lateral mediodorsal thalamus in cynomolgus monkeys. *Neuroscience.* 2004;129(3):675-90.
44. Rempel-Clower NL, Barbas H. Topographic organization of connections between the hypothalamus and prefrontal cortex in the rhesus monkey. *J Comp Neurol.* 1998;398(3):393-419.
45. Fuster JM. Executive frontal functions. *Exp Brain Res.* 2000;133(1):66-70.
46. Fuster JM. Memory networks in the prefrontal cortex. *Prog Brain Res.* 2000;122:309-16.
47. Fuster JM. Prefrontal neurons in networks of executive memory. *Brain Res Bull.* 2000;52(5):331-6.
48. Harlow HF, Seay B. Affectional systems in rhesus monkeys. *J Ark Med Soc.* 1964;61:107-10.
49. Melchitzky DS, Sesack SR, Pucak ML, Lewis DA. Synaptic targets of pyramidal neurons providing intrinsic horizontal connections in monkey prefrontal cortex.
50. Melchitzky DS, Gonzalez-Burgos G, Barrionuevo G, Lewis DA. Synaptic targets of th intrinsic axon collaterals of supragranular pyramidal neurons in monkey prefrontal cortex. *The Journal of Comparative Neurology* 2001. p. 209-21.
51. Burgess PW, Gilbert SJ, Dumontheil I. Function and localization within rostral prefrontal cortex (area 10). *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2007;362(1481):887-99.
52. Gilbert SJ, Spengler S, Simons JS, Steele JD, Lawrie SM, Frith CD, et al. Functional specialization within rostral prefrontal cortex (area 10): a meta-analysis. *J Cogn Neurosci.* 2006;18(6):932-48.
53. Pollmann S. Anterior prefrontal cortex contributions to attention control. *Exp Psychol.* 2004;51(4):270-8.
54. Burgess PW, Scott SK, Frith CD. The role of the rostral frontal cortex (area 10) in prospective memory: a lateral versus medial dissociation. *Neuropsychologia.* 2003;41(8):906-18.
55. Simons JS, Schölvink ML, Gilbert SJ, Frith CD, Burgess PW. Differential components of prospective memory? Evidence from fMRI. *Neuropsychologia.* 2006;44(8):1388-97.
56. Burgess PW, Dumontheil I, Gilbert SJ. The gateway hypothesis of rostral prefrontal cortex (area 10) function. *Trends Cogn Sci.* 2007;11(7):290-8.
57. Bird CM, Castelli F, Malik O, Frith U, Husain M. The impact of extensive medial frontal lobe damage on 'Theory of Mind' and cognition. *Brain.* 2004;127(Pt 4):914-28.
58. Eslinger PJ, Damasio AR. Severe disturbance of higher cognition after bilateral frontal lobe ablation: patient EVR. *Neurology.* 1985;35(12):1731-41.

59. Shallice T, Burgess PW. Deficits in strategy application following frontal lobe damage in man. *Brain*. 1991;114 (Pt 2):727-41.
60. Burgess PW. Strategy application disorder: the role of the frontal lobes in human multitasking. *Psychol Res*. 2000;63(3-4):279-88.
61. Okuda J, Fujii T, Yamadori A, Kawashima R, Tsukiura T, Fukatsu R, et al. Participation of the prefrontal cortices in prospective memory: evidence from a PET study in humans. *Neurosci Lett*. 1998;253(2):127-30.
62. Burgess PW, Quayle A, Frith CD. Brain regions involved in prospective memory as determined by positron emission tomography. *Neuropsychologia*. 2001;39(6):545-55.
63. Frith U, Frith CD. Development and neurophysiology of mentalizing. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 2003;358(1431):459-73.
64. Frith CD, Frith U. The neural basis of mentalizing. *Neuron*. 2006;50(4):531-4.
65. Tulving E. Episodic memory: from mind to brain. *Annu Rev Psychol*. 2002;53:1-25.
66. Wagner AD, Desmond JE, Glover GH, Gabrieli JD. Prefrontal cortex and recognition memory. Functional-MRI evidence for context-dependent retrieval processes. *Brain*. 1998;121 (Pt 10):1985-2002.
67. Velanova K, Jacoby LL, Wheeler ME, McAvoy MP, Petersen SE, Buckner RL. Functional-anatomic correlates of sustained and transient processing components engaged during controlled retrieval. *J Neurosci*. 2003;23(24):8460-70.
68. Koechlin E, Corrado G, Pietrini P, Grafman J. Dissociating the role of the medial and lateral anterior prefrontal cortex in human planning. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000;97(13):7651-6.
69. Braver TS, Bongiolatti SR. The role of frontopolar cortex in subgoal processing during working memory. *Neuroimage*. 2002;15(3):523-36.
70. Kroger JK, Sabb FW, Fales CL, Bookheimer SY, Cohen MS, Holyoak KJ. Recruitment of anterior dorsolateral prefrontal cortex in human reasoning: a parametric study of relational complexity. *Cereb Cortex*. 2002;12(5):477-85.
71. Waltz JA, Lau A, Grewal SK, Holyoak KJ. The role of working memory in analogical mapping. *Mem Cognit*. 2000;28(7):1205-12.
72. Green AE, Fugelsang JA, Kraemer DJ, Shamosh NA, Dunbar KN. Frontopolar cortex mediates abstract integration in analogy. *Brain Res*. 2006;1096(1):125-37.
73. Richland LE, Morrison RG. Is Analogical Reasoning just Another Measure of Executive Functioning? *Front Hum Neurosci*. 2010;4.
74. Cho S, Moody TD, Fernandino L, Mumford JA, Poldrack RA, Cannon TD, et al. Common and dissociable prefrontal loci associated with component mechanisms of analogical reasoning. *Cereb Cortex*. 2010;20(3):524-33.
75. DeFelipe J. Cortical interneurons: from Cajal to 2001. *Prog Brain Res*. 2002;136:215-38.
76. Zecevic N, Hu F, Jakovcevski I. Interneurons in the developing human neocortex. *Dev Neurobiol*. 2011;71(1):18-33.
77. Markram H, Toledo-Rodriguez M, Wang Y, Gupta A, Silberberg G, Wu C. Interneurons of the neocortical inhibitory system. *Nat Rev Neurosci*. 2004;5(10):793-807.
78. Kilb W. Development of the GABAergic system from birth to adolescence. *Neuroscientist*. 2012;18(6):613-30.
79. Jones EG. The origins of cortical interneurons: mouse versus monkey and human. *Cereb Cortex*. 2009;19(9):1953-6.

80. Wonders CP, Anderson SA. The origin and specification of cortical interneurons. *Nat Rev Neurosci.* 2006;7(9):687-96.
81. Kawaguchi Y. Physiological subgroups of nonpyramidal cells with specific morphological characteristics in layer II/III of rat frontal cortex. *J Neurosci.* 1995;15(4):2638-55.
82. Kawaguchi Y, Kubota Y. GABAergic cell subtypes and their synaptic connections in rat frontal cortex. *Cereb Cortex.* 1997;7(6):476-86.
83. Shoukimas GM, Hinds JW. The development of the cerebral cortex in the embryonic mouse: an electron microscopic serial section analysis. *J Comp Neurol.* 1978;179(4):795-830.
84. Austin CP, Cepko CL. Cellular migration patterns in the developing mouse cerebral cortex. *Development.* 1990;110(3):713-32.
85. O'Rourke NA, Sullivan DP, Kaznowski CE, Jacobs AA, McConnell SK. Tangential migration of neurons in the developing cerebral cortex. *Development.* 1995;121(7):2165-76.
86. Ben-Ari Y. Excitatory actions of gaba during development: the nature of the nurture. *Nat Rev Neurosci.* 2002;3(9):728-39.
87. Letinic K, Zoncu R, Rakic P. Origin of GABAergic neurons in the human neocortex. *Nature.* 2002;417(6889):645-9.
88. Hill RS, Walsh CA. Molecular insights into human brain evolution. *Nature.* 2005;437(7055):64-7.
89. Ascoli GA, Alonso-Nanclares L, Anderson SA, Barrionuevo G, Benavides-Piccione R, Burkhalter A, et al. Petilla terminology: nomenclature of features of GABAergic interneurons of the cerebral cortex. *Nat Rev Neurosci.* 2008;9(7):557-68.
90. Huang ZJ, Di Cristo G, Ango F. Development of GABA innervation in the cerebral and cerebellar cortices. *Nat Rev Neurosci.* 2007;8(9):673-86.
91. DeFelipe J, López-Cruz PL, Benavides-Piccione R, Bielza C, Larrañaga P, Anderson S, et al. New insights into the classification and nomenclature of cortical GABAergic interneurons. *Nat Rev Neurosci.* 2013;14(3):202-16.
92. Wang Y, Gupta A, Toledo-Rodriguez M, Wu CZ, Markram H. Anatomical, physiological, molecular and circuit properties of nest basket cells in the developing somatosensory cortex. *Cereb Cortex.* 2002;12(4):395-410.
93. Kisvárdy ZF, Martin KA, Whitteridge D, Somogyi P. Synaptic connections of intracellularly filled clutch cells: a type of small basket cell in the visual cortex of the cat. *J Comp Neurol.* 1985;241(2):111-37.
94. Fairén A, Valverde F. A specialized type of neuron in the visual cortex of cat: a Golgi and electron microscope study of chandelier cells. *J Comp Neurol.* 1980;194(4):761-79.
95. Zhu Y, Stornetta RL, Zhu JJ. Chandelier cells control excessive cortical excitation: characteristics of whisker-evoked synaptic responses of layer 2/3 nonpyramidal and pyramidal neurons. *J Neurosci.* 2004;24(22):5101-8.
96. Somogyi P, Freund TF, Cowey A. The axo-axonic interneuron in the cerebral cortex of the rat, cat and monkey. *Neuroscience.* 1982;7(11):2577-607.
97. DeFelipe J, Hendry SH, Jones EG. Synapses of double bouquet cells in monkey cerebral cortex visualized by calbindin immunoreactivity. *Brain Res.* 1989;503(1):49-54.
98. Hestrin S, Armstrong WE. Morphology and physiology of cortical neurons in layer I. *J Neurosci.* 1996;16(17):5290-300.

99. Anderson JC, Martin KA, Picanço-Diniz CW. The neurons in layer 1 of cat visual cortex. *Proc Biol Sci.* 1992;248(1321):27-33.
100. Zhou FM, Hablitz JJ. Morphological properties of intracellularly labeled layer I neurons in rat neocortex. *J Comp Neurol.* 1996;376(2):198-213.
101. Gonchar Y, Burkhalter A. Three distinct families of GABAergic neurons in rat visual cortex. *Cereb Cortex.* 1997;7(4):347-58.
102. Hof PR, Glezer II, Condé F, Flagg RA, Rubin MB, Nimchinsky EA, et al. Cellular distribution of the calcium-binding proteins parvalbumin, calbindin, and calretinin in the neocortex of mammals: phylogenetic and developmental patterns. *J Chem Neuroanat.* 1999;16(2):77-116.
103. DeFelipe J. Types of neurons, synaptic connections and chemical characteristics of cells immunoreactive for calbindin-D28K, parvalbumin and calretinin in the neocortex. *J Chem Neuroanat.* 1997;14(1):1-19.
104. Perlaza, Buritica, Umbarila, Arteaga, Pimienta. *Corteza Prefrontal Humana: Areas 10m, 11o y 46d citoarquitectura e implicaciones funcionales.* 2005.
105. Buritica E, Pimienta JHJ. *Corteza Frontopolar Humana: Area 10.* *Revista Latinoamericana de Psicología.* 2007;39(1):127-42.
106. Matusiewicz P, Czarski A, Adrian H. Estimation of materials microstructure parameters using computer program Sigma Scan Pro. *Metallurgy and Foundry Engineering;* 2007.
107. Gabbott PL, Dickie BG, Vaid RR, Headlam AJ, Bacon SJ. Local-circuit neurones in the medial prefrontal cortex (areas 25, 32 and 24b) in the rat: morphology and quantitative distribution. *J Comp Neurol.* 1997;377(4):465-99.
108. Gabbott PL, Bacon SJ. Local circuit neurons in the medial prefrontal cortex (areas 24a,b,c, 25 and 32) in the monkey: I. Cell morphology and morphometrics. *J Comp Neurol.* 1996;364(4):567-608.
109. Gabbott PL, Bacon SJ. Local circuit neurons in the medial prefrontal cortex (areas 24a,b,c, 25 and 32) in the monkey: II. Quantitative areal and laminar distributions. *J Comp Neurol.* 1996;364(4):609-36.
110. Umbarila, Jhon. *Organización del Area 10p orbital de la corteza cerebral del humano citoarquitectura y asimetría,* Centro de Estudios Cerebrales, Universidad del Valle. 2008. p. (Tesis para optar por el título de Maestría, sin publicar).
111. Buritica, Efrain. *Organización Neuronal de las regiones lateral y medial del area 10p de la corteza prefrontal del humano,* Centro de Estudios Cerebrales, Universidad del Valle. 2007. p. (Tesis para optar por el título de Maestría, sin publicar).
112. Ince P, Stout N, Shaw P, Slade J, Hunziker W, Heizmann CW, et al. Parvalbumin and calbindin D-28k in the human motor system and in motor neuron disease. 1993;19(4):291-9.
113. Defelipe J, González-Albo MC, Del Río MR, Elston GN. Distribution and patterns of connectivity of interneurons containing calbindin, calretinin, and parvalbumin in visual areas of the occipital and temporal lobes of the macaque monkey. 1999;412(3):515-26.
114. Douglas RJ, Martin KA. Neuronal circuits of the neocortex. *Annu Rev Neurosci.* 2004;27:419-51.
115. Uylings HB, Jacobsen AM, Zilles K, Amunts K. Left-right asymmetry in volume and number of neurons in adult Broca's area. *Cortex.* 2006;42(4):652-8.
116. Amunts K, Schleicher A, Ditterich A, Zilles K. Broca's region: cytoarchitectonic asymmetry and developmental changes. *J Comp Neurol.* 2003;465(1):72-89.

117. Falzi G, Perrone P, Vignolo LA. Right-left asymmetry in anterior speech region. *Arch Neurol*. 1982;39(4):239-40.
118. Brennaman LH, Maness PF. Developmental regulation of GABAergic interneuron branching and synaptic development in the prefrontal cortex by soluble neural cell adhesion molecule. *Mol Cell Neurosci*. 2008;37(4):781-93.
119. Crews F, He J, Hodge C. Adolescent cortical development: a critical period of vulnerability for addiction. *Pharmacol Biochem Behav*. 2007;86(2):189-99.
120. Druga R. Neocortical inhibitory system. *Folia Biol (Praha)*. 2009;55(6):201-17.
121. Barinka F, Druga R. Calretinin expression in the mammalian neocortex: a review. *Physiol Res*. 2010;59(5):665-77.
122. Park HJ, Lee SN, Lim HR, Kong JH, Jeon CJ. Calcium-binding proteins calbindin D28K, calretinin, and parvalbumin immunoreactivity in the rabbit visual cortex. *Mol Cells*. 2000;10(2):206-12.
123. Chiry O, Tardif E, Magistretti PJ, Clarke S. Patterns of calcium-binding proteins support parallel and hierarchical organization of human auditory areas. *Eur J Neurosci*. 2003;17(2):397-410.
124. del Río MR, DeFelipe J. Colocalization of calbindin D-28k, calretinin, and GABA immunoreactivities in neurons of the human temporal cortex. *J Comp Neurol*. 1996;369(3):472-82.
125. Gabbott PL, Jays PR, Bacon SJ. Calretinin neurons in human medial prefrontal cortex (areas 24a,b,c, 32', and 25). *J Comp Neurol*. 1997;381(4):389-410.
126. Arteaga G, Burititca E, Pimienta H, Escobar M. Citoarquitectura de la lamina II en la Corteza Prefrontal Humana y procesos cognitivos complejos. Aun sin publicar 2012.
127. Casanova MF, Buxhoeveden DP, Switala AE, Roy E. Minicolumnar pathology in autism. *Neurology*. 2002;58(3):428-32.
128. Casanova MF, van Kooten IA, Switala AE, van Engeland H, Heinsen H, Steinbusch HW, et al. Minicolumnar abnormalities in autism. *Acta Neuropathol*. 2006;112(3):287-303.
129. Owen MJ, O'Donovan MC, Harrison PJ. Schizophrenia: a genetic disorder of the synapse? *BMJ*. 2005;330(7484):158-9.
130. Pierri JN, Chaudry AS, Woo TU, Lewis DA. Alterations in chandelier neuron axon terminals in the prefrontal cortex of schizophrenic subjects. *Am J Psychiatry*. 1999;156(11):1709-19.
131. Woo TU, Whitehead RE, Melchitzky DS, Lewis DA. A subclass of prefrontal gamma-aminobutyric acid axon terminals are selectively altered in schizophrenia. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998;95(9):5341-6.
132. Everitt BJ, Robbins TW. Neural systems of reinforcement for drug addiction: from actions to habits to compulsion. *Nat Neurosci*. 2005;8(11):1481-9.
133. Casanova MF. Neuropathological and genetic findings in autism: the significance of a putative minicolumnopathy. *Neuroscientist*. 2006;12(5):435-41.
134. Owen MJ. Genomic approaches to schizophrenia. *Clin Ther*. 2005;27 Suppl A:S2-7.
135. Albert KA, Hemmings HC, Adamo AI, Potkin SG, Akbarian S, Sandman CA, et al. Evidence for decreased DARPP-32 in the prefrontal cortex of patients with schizophrenia. *Arch Gen Psychiatry*. 2002;59(8):705-12.
136. Bannon MJ, Wolf ME, Roth RH. Pharmacology of dopamine neurons innervating the prefrontal, cingulate and piriform cortices. *Eur J Pharmacol*. 1983;92(1-2):119-25.

137. Bannon MJ, Roth RH. Pharmacology of mesocortical dopamine neurons. *Pharmacol Rev.* 1983;35(1):53-68.
 138. Yang TT, Wang SJ. Effects of haloperidol and clozapine on glutamate release from nerve terminals isolated from rat prefrontal cortex. *Synapse.* 2005;56(1):12-20.
 139. Lewis DA, Pierri JN, Volk DW, Melchitzky DS, Woo TU. Altered GABA neurotransmission and prefrontal cortical dysfunction in schizophrenia. *Biol Psychiatry.* 1999;46(5):616-26.
 140. Lewis DA. GABAergic local circuit neurons and prefrontal cortical dysfunction in schizophrenia. *Brain Res Brain Res Rev.* 2000;31(2-3):270-6.
 141. Lewis DA, Volk DW, Hashimoto T. Selective alterations in prefrontal cortical GABA neurotransmission in schizophrenia: a novel target for the treatment of working memory dysfunction. *Psychopharmacology (Berl).* 2004;174(1):143-50.
-

10. ANEXO # 1

Comparación de la densidad neuronal en las lámina II y III del hemisferios derecho vs otras láminas del hemisferio ipsilateral y contralateral

Densidad neuronal	L II HD VS OTRAS L HD	LII HD VS OTRAS L HI	L III HD VS OTRAS L HD	LIII HD VS OTRAS L HI
NeuN	L I p = 0,000**	L I p = 0,000**	L I p = 0,000**	L I p = 0,000**
	L III p = 0,000**	L III p = 0,000**	L II p = 0,000**	L II p = 0,000**
	L IV	L IV	L IV p = 0,000**	L IV p = 0,000**
	L V p = 0,000**	L V p = 0,000**	L V	L V
	L VI p = 0,002**	L VI p = 0,000**	L VI	L VI p = 0,021**
CB	L I p = 0,000**	L I p = 0,000**	L I p = 0,000**	L I p = 0,000**
	L III p = 0,000**	L III p = 0,000**	L II p = 0,000**	L II p = 0,000**
	L IV p = 0,000**	L IV p = 0,000**	L IV p = 0,010**	L IV p = 0,010**
	L V p = 0,000**	L V p = 0,000**	L V p = 0,000**	L V p = 0,000**
	L VI p = 0,000**	L VI p = 0,000**	L VI p = 0,000**	L VI p = 0,000**
CR	L I	L I	L I	L I
	L III	L III	L III	L III
	L IV	L IV	L IV	L IV
	L V	L V	L V	L V
	L VI	L VI	L VI	L VI
PV	L I p = 0,000**	L I p = 0,000**	L I p = 0,000**	L I p = 0,000**
	L III	L III	L II	L II
	L IV	L IV	L IV	L IV p = 0,013**
	L V	L V	L V	L V
	L VI p = 0,001**	L VI p = 0,001**	L VI p = 0,000**	L VI p = 0,000**

L: lámina, HI: Hemisferio Izquierdo, HD: Hemisferio Derecho. **Significancia del 5% ($\alpha=0,05$) a dos colas (por lo cual la región de rechazo se estableció con una probabilidad de 0,025). Aquellas comparaciones con diferencias estadísticamente significativas se resaltan en color azul. Convenciones: L II: lámina II, L III: lámina III, HI: Hemisferio Izquierdo, HD: Hemisferio Derecho. **Significancia del 5% ($\alpha=0,05$) a dos colas (por lo cual la región de rechazo se estableció con una probabilidad de 0,025). Comparación LII vs otras láminas ipsi y contralaterales: Hipótesis Nula (H_0): El Numero de neuronas es igual entre las láminas II vs las otras láminas del hemisferio ipsilateral y contralateral. Hipótesis Alternativa (H_a): El Numero de neuronas es diferente entre las láminas II vs las otras láminas del hemisferio ipsilateral y contralateral. Comparación LIII vs otras láminas ipsi y contralaterales: Hipótesis Nula (H_0): El Numero de neuronas es igual entre las láminas III vs las otras láminas del hemisferio ipsilateral y contralateral. Hipótesis Alternativa (H_a): El Numero de neuronas es diferente entre las láminas III vs las otras láminas del hemisferio ipsilateral y contralateral.

ANEXO # 2

Comparación de las variables morfológicas: Tamaño del soma, Forma de la Célula y Numero de Procesos entre láminas II y III intrahemisferios corticales

VARIABLE	COMPARACIÓN	RESULTADO	CONCLUSIÓN
Tamaño del Soma	Lámina II Vs Lámina III Hemisferio Izquierdo CB	$p = 0,012^{**}$	SI existen diferencias estadísticamente significativas con $\alpha \leq 0,05$
	Lámina II Vs Lámina III Hemisferio Izquierdo CR	$p = 0,001^{**}$	SI existen diferencias estadísticamente significativas con $\alpha \leq 0,05$
	Lámina 2 Vs Lámina 3 Hemisferio Izquierdo PV	$p = 0,000^{**}$	SI existen diferencias estadísticamente significativas con $\alpha \leq 0,05$
Factor forma	Lámina II Vs Lámina III Hemisferio Izquierdo CB	$p = 0,667$	NO existen diferencias estadísticamente significativas con $\alpha \leq 0,05$
	Lámina II Vs Lámina III Hemisferio Izquierdo CR	$p = 0,138$	NO existen diferencias estadísticamente significativas con $\alpha \leq 0,05$
	Lámina II Vs Lámina III Hemisferio Izquierdo PV	$p = 0,282$	NO existen diferencias estadísticamente significativas con $\alpha \leq 0,05$
Número de procesos	Lámina II Vs Lámina III Hemisferio Izquierdo CB	$p = 0,604$	NO existen diferencias estadísticamente significativas con $\alpha \leq 0,05$
	Lámina II Vs Lámina III Hemisferio Izquierdo CR	$p = 0,087$	NO existen diferencias estadísticamente significativas con $\alpha \leq 0,05$
	Lámina II Vs Lámina III Hemisferio Izquierdo PV	$p = 0,012^{**}$	SI existen diferencias estadísticamente significativas con $\alpha \leq 0,05$
Tamaño del Soma	Lámina II Vs Lámina III Hemisferio Derecho CB	$p = 0,039$	NO existen diferencias estadísticamente significativas con $\alpha \leq 0,05$
	Lámina II Vs Lámina III	$p = 0,000^{**}$	SI existen diferencias estadísticamente

	Hemisferio Derecho CR		significativas con $\alpha \leq 0,05$
	Lámina II Vs Lámina III Hemisferio Derecho PV	$p = 0,000^{**}$	SI existen diferencias estadísticamente significativas con $\alpha \leq 0,05$
Factor forma	Lámina II Vs Lámina III Hemisferio Derecho CB	$p = 0,048$	NO existen diferencias estadísticamente significativas con $\alpha \leq 0,05$
	Lámina II Vs Lámina III Hemisferio Derecho CR	$p = 0,191$	NO existen diferencias estadísticamente significativas con $\alpha \leq 0,05$
	Lámina II Vs Lámina III Hemisferio Derecho PV	$p = 0,376$	NO existen diferencias estadísticamente significativas con $\alpha \leq 0,05$
Número de procesos	Lámina II Vs Lámina III Hemisferio Derecho CB	$p = 0,208$	NO existen diferencias estadísticamente significativas con $\alpha \leq 0,05$
	Lámina II Vs Lámina III Hemisferio Derecho CR	$p = 0,704$	NO existen diferencias estadísticamente significativas con $\alpha \leq 0,05$
	Lámina II Vs Lámina III Hemisferio Derecho PV	$p = 0,893$	NO existen diferencias estadísticamente significativas con $\alpha \leq 0,05$

****Significancia del 5% a dos colas** (por lo cual la región de rechazo se estableció con una probabilidad de 0,025). Hipótesis Nula (H_0): El área de las interneuronas es igual entre láminas II y III del mismo hemisferio cerebral Hipótesis Alternativa (H_a): El área de las interneuronas es diferente entre láminas II y III del mismo hemisferio cerebral. Hipótesis Nula (H_0): El factor forma de las interneuronas es igual entre láminas II y III del mismo hemisferio cerebral. Hipótesis Alternativa (H_a): -El factor forma de las interneuronas es diferente entre láminas II y III del mismo hemisferio cerebral. Hipótesis Nula (H_0): El número de procesos primarios de las interneuronas es igual entre láminas II y III del mismo hemisferio cerebral. Hipótesis Alternativa (H_a): El número de procesos primarios de las interneuronas es diferente entre láminas II y III del mismo hemisferio cerebral.

ANEXO # 3

Comparación de las variables morfológicas: Tamaño del soma, Forma de la Célula y Número de Procesos primarios entre láminas II y III entre hemisferios corticales

VARIABLE	COMPARACIÓN	RESULTADO LÁMINA II	RESULTADO LÁMINA III
Tamaño del Soma	HD vs HI CB	p = 0,826	p = 0,835
	HD vs HI CR	p = 0,562	p = 0,366
	HD vs HI PV	p = 0,092	p = 0,612
Forma de la Célula	HD vs HI CB	p = 0,331	p = 0,684
	HD vs HI CR	p = 0,144	p = 0,184
	HD vs HI PV	p = 0,658	p = 0,521
Número de procesos primarios	HD vs HI CB	p = 0,267	p = 0,711
	HD vs HI CR	p = 0,984	p = 0,192
	HD vs HI PV	p = 0,026 □	p = 0,940

❖□ El valor de la prueba para esta comparación fue la más cercana a la zona de rechazo.

Significancia del 5% a dos colas (por lo cual la región de rechazo se estableció con una probabilidad de 0,025). Hipótesis Nula (Ho): El área de las interneuronas es igual al comparar las láminas II entre hemisferios cerebrales. Hipótesis Alternativa (Ha): El área de las interneuronas es diferente al comparar las láminas II entre hemisferios cerebrales. Hipótesis Nula (Ho): El factor forma de las interneuronas es igual al comparar las láminas II entre hemisferios cerebrales. Hipótesis Alternativa (Ha): El factor forma de las interneuronas es diferente al comparar las láminas II entre hemisferios cerebrales. Hipótesis Nula (Ho): El número de procesos primarios de las interneuronas es igual al comparar las láminas II entre hemisferios cerebrales. Hipótesis Alternativa (Ha): El número de procesos primarios de las interneuronas es diferente al comparar las láminas II entre hemisferios cerebrales.

****Significancia del 5% a dos colas (por lo cual la región de rechazo se estableció con una probabilidad de 0,025). Hipótesis Nula (Ho): El área de las interneuronas es igual al comparar las láminas III entre hemisferios cerebrales. Hipótesis Alternativa (Ha): El área de las interneuronas es diferente al comparar las láminas III entre hemisferios cerebrales. Hipótesis Nula (Ho): El factor forma de las interneuronas es igual al comparar las láminas III entre hemisferios cerebrales. Hipótesis Alternativa (Ha): El factor forma de las interneuronas es diferente al comparar las láminas III entre hemisferios cerebrales. Hipótesis Nula (Ho): El número de procesos primarios de las interneuronas es igual al comparar las láminas III entre hemisferios cerebrales. Hipótesis Alternativa (Ha): El número de procesos primarios de las interneuronas es diferente al comparar las láminas III entre hemisferios cerebrales.**

Formulación de hipótesis para cada una de las pruebas realizada en la Tabla # 10
comparación metodológica J

LÁMINA II

Hipótesis Nula (Ho): El tamaño de las células IR a CB y CR ubicadas en la lámina II del HI (Hemisferio Izquierdo) son estadísticamente iguales. Hipótesis Alternativa (Ha): El tamaño de las células IR a CB y CR ubicadas en la lámina II del HI (Hemisferio Izquierdo) son estadísticamente diferentes. Hipótesis Nula (Ho): El tamaño de las células IR a CB y PV ubicadas en la lámina II del HI (Hemisferio Izquierdo) son estadísticamente iguales. Hipótesis Alternativa (Ha): El tamaño de las células IR a CB y PV ubicadas en la lámina II del HI (Hemisferio Izquierdo) son estadísticamente diferentes. Hipótesis Nula (Ho): El tamaño de las células IR a CR y PV ubicadas en la lámina II del HI (Hemisferio Izquierdo) son estadísticamente iguales. Hipótesis Alternativa (Ha): El tamaño de las células IR a CR y PV ubicadas en la lámina II del HI (Hemisferio Izquierdo) son estadísticamente diferentes. (Las hipótesis planteadas también aplican para el Hemisferio Derecho)

Hipótesis Nula (Ho): El factor forma de las células IR a CB y CR ubicadas en la lámina II del HI (Hemisferio Izquierdo) son estadísticamente iguales. Hipótesis Alternativa (Ha): El factor forma de las células IR a CB y CR ubicadas en la lámina II del HI (Hemisferio Izquierdo) son estadísticamente diferentes. Hipótesis Nula (Ho): El factor forma de las células IR a CB y PV ubicadas en la lámina II del HI (Hemisferio Izquierdo) son estadísticamente iguales. Hipótesis Alternativa (Ha): El factor forma de las células IR a CB y PV ubicadas en la lámina II del HI (Hemisferio Izquierdo) son estadísticamente diferentes. Hipótesis Nula (Ho): El factor forma de las células IR a CR y PV ubicadas en la lámina II del HI (Hemisferio Izquierdo) son estadísticamente iguales. Hipótesis Alternativa (Ha): El factor forma de las células IR a CR y PV ubicadas en la lámina II del HI (Hemisferio Izquierdo) son estadísticamente diferentes. (Las hipótesis planteadas también aplican para el Hemisferio Derecho)

Hipótesis Nula (Ho): El numero de procesos de las células IR a CB y CR ubicadas en la lámina II del HI (Hemisferio Izquierdo) son estadísticamente iguales. Hipótesis Alternativa (Ha): El numero de procesos de las células IR a CB y CR ubicadas en la lámina II del HI (Hemisferio Izquierdo) son estadísticamente diferentes. Hipótesis Nula (Ho): El numero de procesos de las células IR a CB y PV ubicadas en la lámina II del HI (Hemisferio Izquierdo) son estadísticamente iguales. Hipótesis Alternativa (Ha): El numero de procesos de las células IR a CB y PV ubicadas en la lámina II del HI (Hemisferio Izquierdo) son estadísticamente diferentes. Hipótesis Nula (Ho): El numero de procesos de las células IR a CR y PV ubicadas en la lámina II del HI (Hemisferio Izquierdo) son estadísticamente iguales. Hipótesis Alternativa (Ha): El numero de procesos de las células IR a CR y PV ubicadas en la lámina II del HI (Hemisferio Izquierdo) son estadísticamente diferentes. (Las hipótesis planteadas también aplican para el Hemisferio Derecho)

Para la comparación de las variables (numero de procesos y factor forma) para 3 muestras independientes (pruebas: Kuskal-Wallis & ANOVA), las prueba de hipótesis planteadas fueron: Hipótesis nula (Ho): El factor forma de las interneuronas IR a CB, CR y PV ubicadas en la lámina II HI son estadísticamente iguales. Hipótesis alternativa (Ha): El factor forma de las interneuronas IR a CB, CR y PV ubicadas en la lámina II HI son estadísticamente diferentes. Hipótesis nula (Ho): El numero de procesos de las interneuronas IR a CB, CR y PV ubicadas en la lámina II HI son

estadísticamente iguales. Hipótesis alternativa (Ha): El numero de procesos de las interneuronas IR a CB, CR y PV ubicadas en la lámina II HI son estadísticamente diferentes. (Las hipótesis planteadas también aplican para el Hemisferio Derecho)

LÁMINA III

Hipótesis Nula (Ho): El tamaño de las células IR a CB y CR ubicadas en la lámina III del HI (Hemisferio Izquierdo) son estadísticamente iguales. Hipótesis Alternativa (Ha): El tamaño de las células IR a CB y CR ubicadas en la lámina III del HI (Hemisferio Izquierdo) son estadísticamente diferentes. Hipótesis Nula (Ho): El tamaño de las células IR a CB y PV ubicadas en la lámina III del HI (Hemisferio Izquierdo) son estadísticamente iguales. Hipótesis Alternativa (Ha): El tamaño de las células IR a CB y PV ubicadas en la lámina III del HI (Hemisferio Izquierdo) son estadísticamente diferentes. Hipótesis Nula (Ho): El tamaño de las células IR a CR y PV ubicadas en la lámina III del HI (Hemisferio Izquierdo) son estadísticamente iguales. Hipótesis Alternativa (Ha): El tamaño de las células IR a CR y PV ubicadas en la lámina III del HI (Hemisferio Izquierdo) son estadísticamente diferentes. (Las hipótesis planteadas también aplican para el Hemisferio Derecho)

Hipótesis Nula (Ho): El factor forma de las células IR a CB y CR ubicadas en la lámina III del HI (Hemisferio Izquierdo) son estadísticamente iguales. Hipótesis Alternativa (Ha): El factor forma de las células IR a CB y CR ubicadas en la lámina III del HI (Hemisferio Izquierdo) son estadísticamente diferentes. Hipótesis Nula (Ho): El factor forma de las células IR a CB y PV ubicadas en la lámina III del HI (Hemisferio Izquierdo) son estadísticamente iguales. Hipótesis Alternativa (Ha): El factor forma de las células IR a CB y PV ubicadas en la lámina III del HI (Hemisferio Izquierdo) son estadísticamente diferentes. Hipótesis Nula (Ho): El factor forma de las células IR a CR y PV ubicadas en la lámina III del HI (Hemisferio Izquierdo) son estadísticamente iguales. Hipótesis Alternativa (Ha): El factor forma de las células IR a CR y PV ubicadas en la lámina III del HI (Hemisferio Izquierdo) son estadísticamente diferentes. (Las hipótesis planteadas también aplican para el Hemisferio Derecho)

Hipótesis Nula (Ho): El numero de procesos de las células IR a CB y CR ubicadas en la lámina III del HI (Hemisferio Izquierdo) son estadísticamente iguales. Hipótesis Alternativa (Ha): El numero de procesos de las células IR a CB y CR ubicadas en la lámina III del HI (Hemisferio Izquierdo) son estadísticamente diferentes. Hipótesis Nula (Ho): El numero de procesos de las células IR a CB y PV ubicadas en la lámina III del HI (Hemisferio Izquierdo) son estadísticamente iguales. Hipótesis Alternativa (Ha): El numero de procesos de las células IR a CB y PV ubicadas en la lámina III del HI (Hemisferio Izquierdo) son estadísticamente diferentes. Hipótesis Nula (Ho): El numero de procesos de las células IR a CR y PV ubicadas en la lámina III del HI (Hemisferio Izquierdo) son estadísticamente iguales. Hipótesis Alternativa (Ha): El numero de procesos de las células IR a CR y PV ubicadas en la lámina III del HI (Hemisferio Izquierdo) son estadísticamente diferentes. (Las hipótesis planteadas también aplican para el Hemisferio Derecho)

Para la comparación de las variables (numero de procesos y factor forma) para 3 muestras independientes (pruebas: Kuskal-Wallis & ANOVA), las prueba de hipótesis planteadas fueron: Hipótesis nula (Ho): El factor forma de las interneuronas IR a CB, CR y PV ubicadas en la lámina III HI son estadísticamente iguales. Hipótesis alternativa (Ha): El factor forma de las interneuronas IR a CB, CR y PV ubicadas en la lámina III HI son estadísticamente diferentes. Hipótesis nula (Ho): El

numero de procesos de las interneuronas IR a CB, CR y PV ubicadas en la lámina III HI son estadísticamente iguales. Hipótesis alternativa (Ha): El numero de procesos de las interneuronas IR a CB, CR y PV ubicadas en la lámina III HI son estadísticamente diferentes. (Las hipótesis planteadas también aplican para el Hemisferio Derecho).

ANEXO # 5

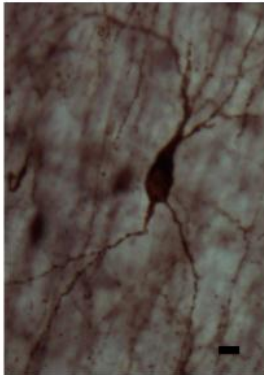
Resumen de las características morfológicas de las interneuronas atípicas

MARCADOR	Lámina	Tamaño del soma (um)	Numero de Procesos	Forma de la Célula
CALBINDINA	II	77,93	6	0,4
CALRETININA	II	60,27	2	0,98
PARVALBUMINA	II	117,02	5	0,51
CALRETININA	II	0,95	2	0,41
CALBINDINA	III	63,35	5	0,45
PARVALBUMINA	III	210,18	3	0,83
PARVALBUMINA	III	175,99	2	0,73

ANEXO # 6

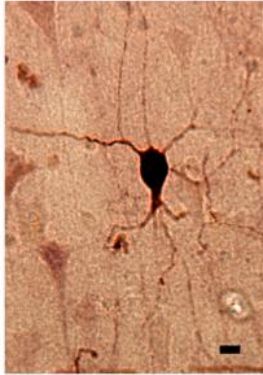
Ejemplo de algunas interneuronas del área 10 pertenecientes a los 8 conglomerados

CONGLOMERADO 1



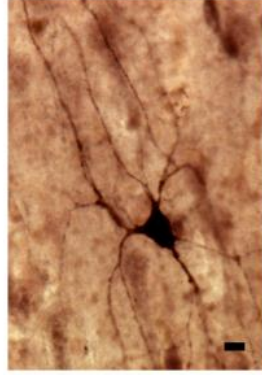
Interneurona IR a
CB localizada en LIII

CONGLOMERADO 2

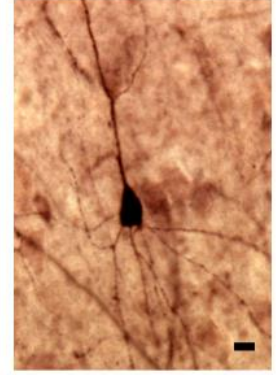


Interneurona IR a
CB localizada en LIII

CONGLOMERADO 3

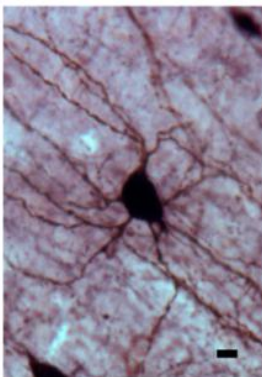


Interneurona IR a
CB localizada en LIII



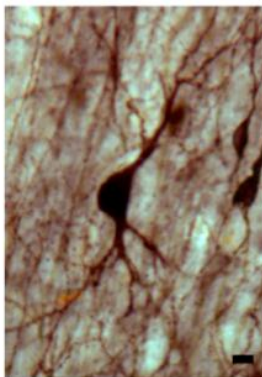
Interneurona IR a
CB localizada en LIII

CONGLOMERADO 4

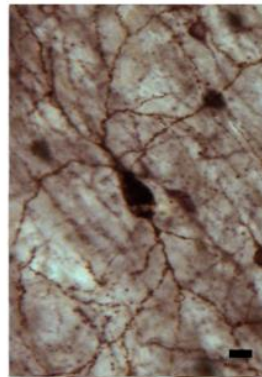


Interneurona IR a
PV localizada en LIII

CONGLOMERADO 5

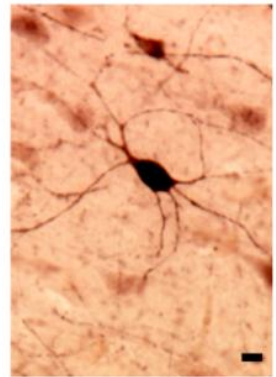


Interneurona IR a
CR localizada en LIII



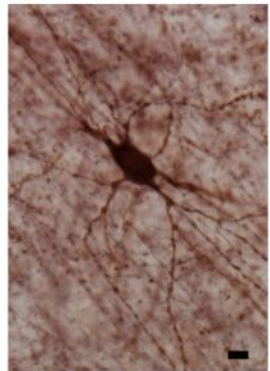
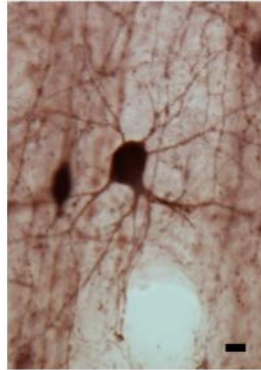
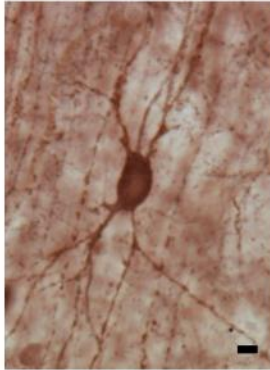
Interneurona IR a
CR localizada en LIII

CONGLOMERADO 6

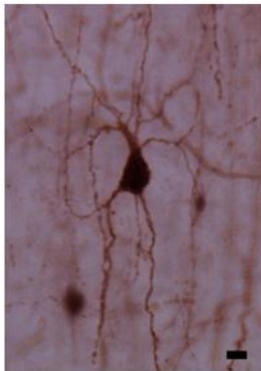


Interneurona IR a
CB localizada en LIII

CONGLOMERADO 7

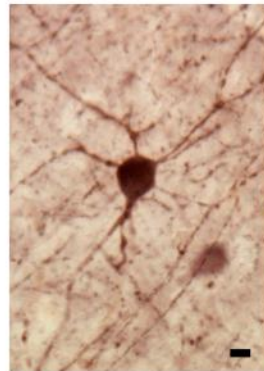
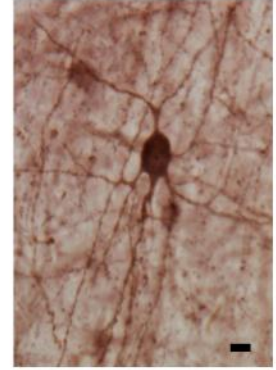
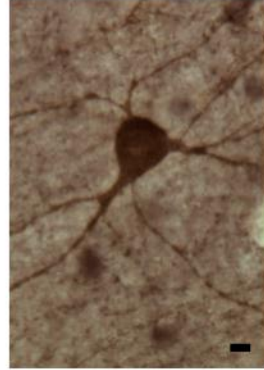


Interneurona IR a PV
localizada en LIII

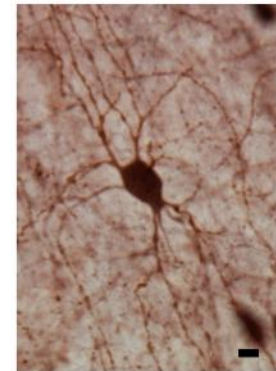


Interneurona IR a PV
localizada en LII

CONGLOMERADO 8



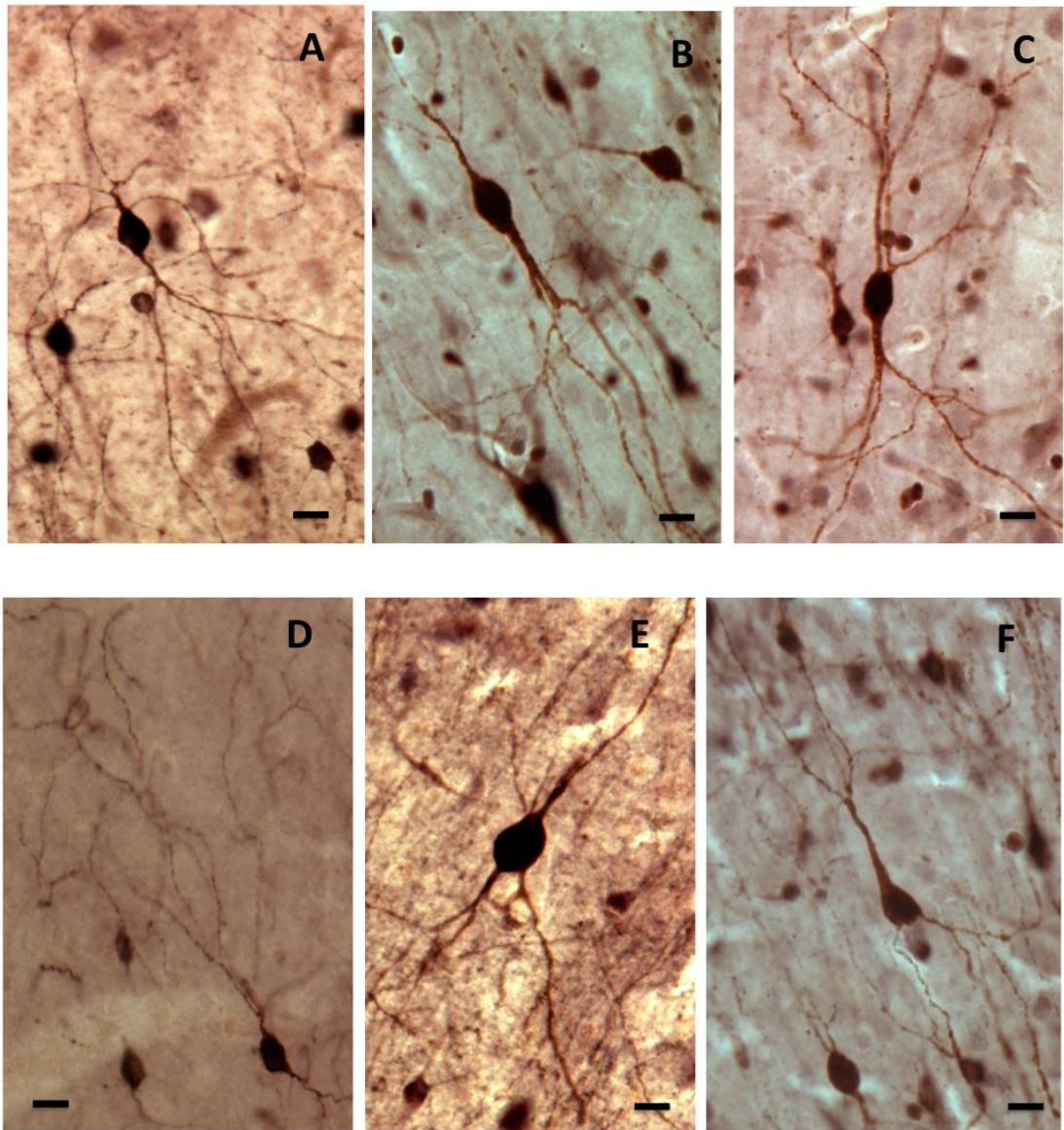
Interneurona IR a PV
localizada en LIII



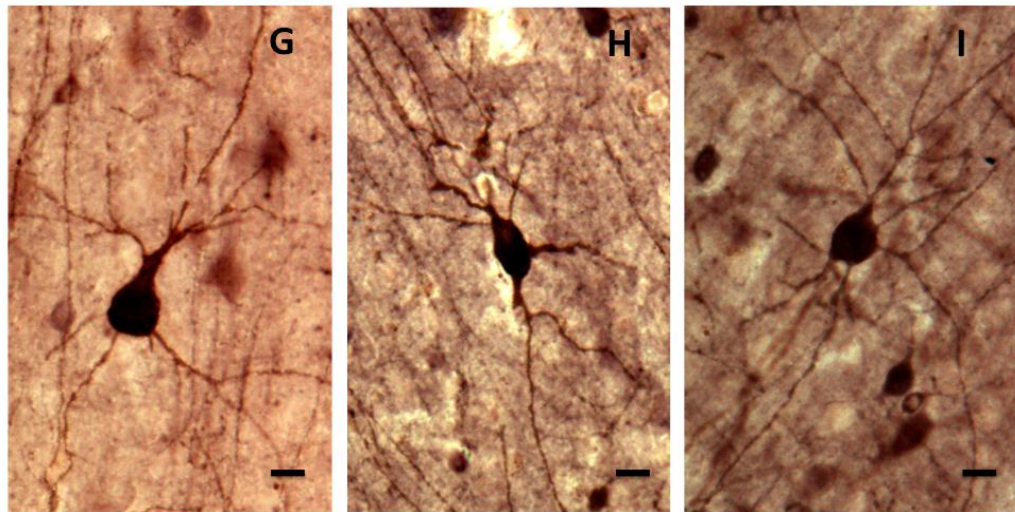
Interneurona IR a PV
localizada en LII

ANEXO # 7

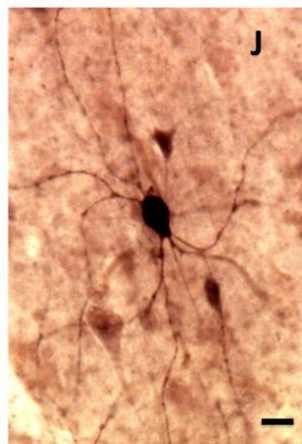
Interneuronas del área 10 corteza prefrontal humana



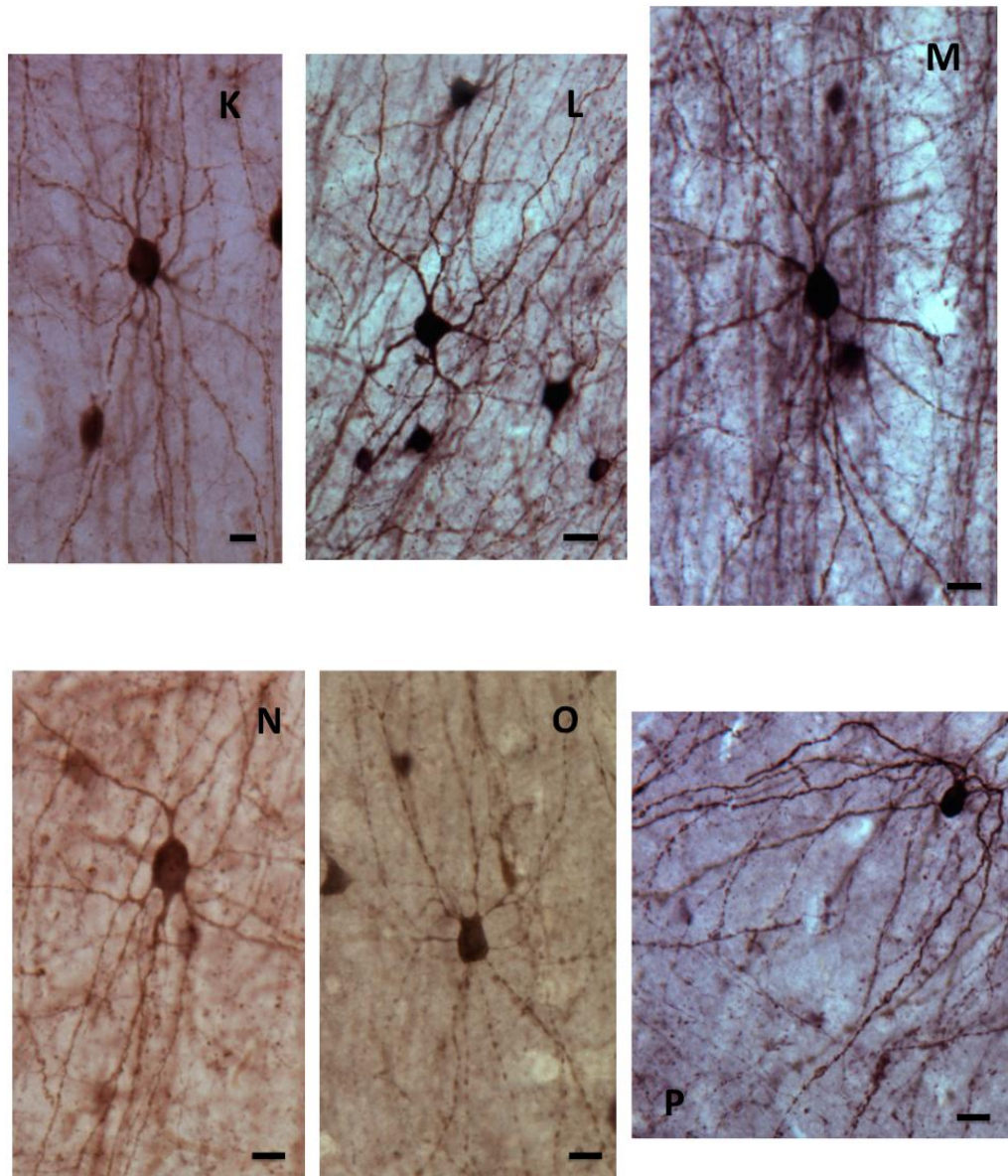
Interneuronas del área 10o de la corteza prefrontal humana. Según descripción hecha por Zaitsev 2009 & el grupo de Petilla 2013, estas células son traslaminares – intracolumnares con procesos orientados verticalmente hacia laminas profundas denominadas como VOBC-DBC o como bípennachadas, bipolares, doble bouquet o “Horse-tail”. A: Célula inmunoreactiva (IR) a CB localizadas en lamina II. B: Célula IR a CR localizadas en lamina III. C: Célula IR a CR localizada en lamina III. D, E: Células IR a CB localizada en LIII. E: se ha reportado en la literatura algunas células piramidales IR a CB hacia la parte profunda de la lamina III. La barra corresponde a 10 μ m.



Interneuronas del área 10o de la corteza prefrontal humana, según la descripción hecha por Zaitsev 2009 & Grupo Petilla 2013. Estas células son intracolumnares – translaminares con procesos orientados hacia la lamina I denominada como MC o reconocida en la literatura como células de Martinotti : G y H, células IR CB localizadas en la parte profunda de la lamina III. I: célula IR a CB localizada en lamina III, denominada como célula Heterogénea o Interneuronas común por el grupo de Petilla, ya que no pertenece a ninguno de los otros subtipos morfológicos y no se distingue su objetivo postsináptico.



Interneuronas del área 10o de la corteza prefrontal humana. Según la descripción hecha por Zaitsev & Grupo Petilla 2013, estas células es intralaminar – intracolumnar sin terminales especializadas con procesos tortuosos y ondulados (NGFC) o reconocida en la literatura como neurogliaformes. J: Célula IR a CB localizada en lamina III. La barra corresponde a 10 um.



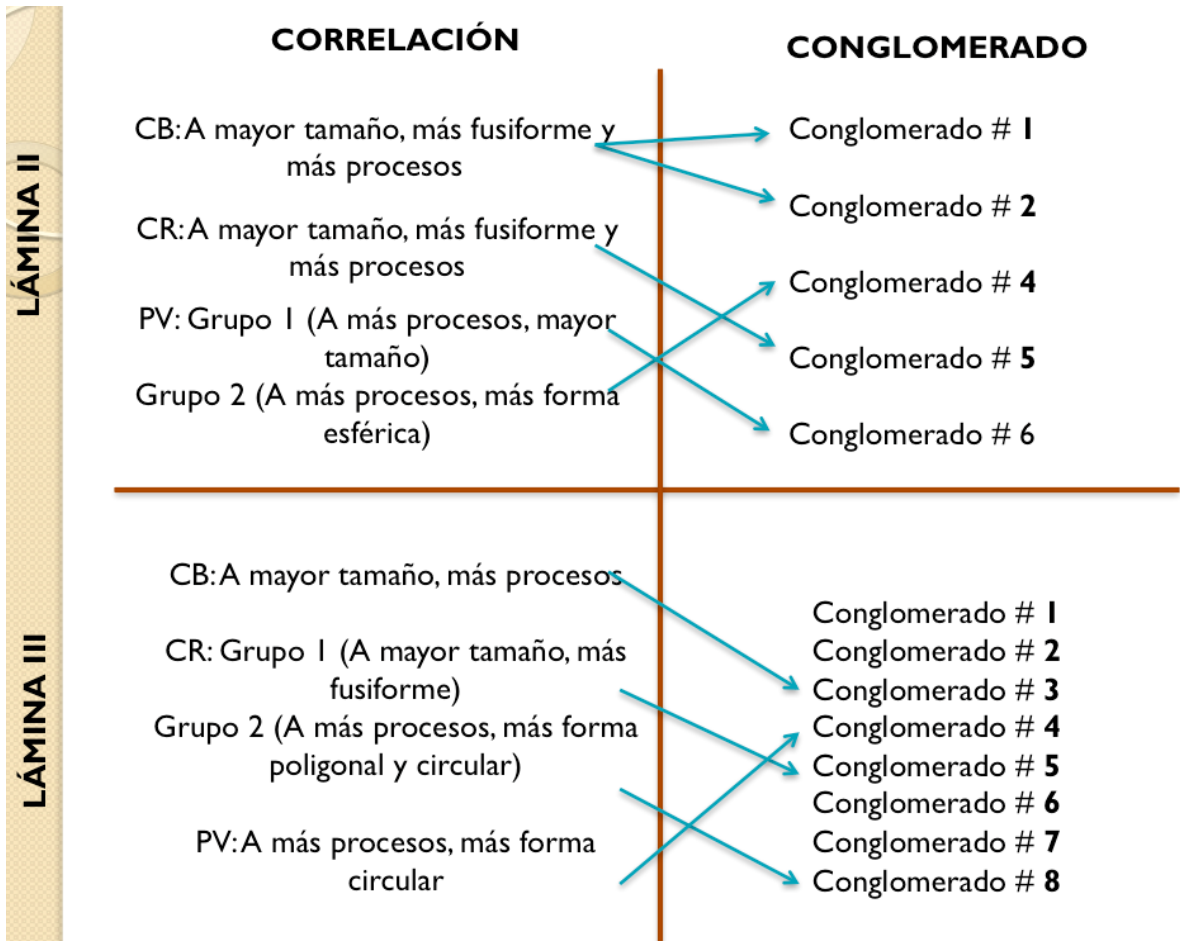
Interneuronas del área 10 de la corteza prefrontal humana, según la descripción hecha por Zaitsev 2009 & Grupo Petilla 2003, estas células son translaminares – transcolumnares con terminales especializadas, denominadas como Interneuronas en candelabro y en Cesta (ChC- LPBC). K, L, M, N, O: células IR a PV localizadas entre laminas II y III. P: Es una célula IR a PV localizada en la lamina II, esta interneurona es denominada en la clasificación de Petilla como en arcada o en sauce. La barra corresponde a 10 μ m.

ANEXO # 8

Resumen de los principales resultados de la investigación

Características	CB	CR	PV	NeuN
Densidad Celular	Mayor en láminas II y III	Similar en las 6 láminas. Algo mayor en II y IV	Mayor en láminas II, III y IV	En láminas II a VI, pero mayor en II y III
Espesor Laminar Relativo	Es similar entre las láminas supra (36%) e infragranulares (38%)			
Espesor Cortical	Oscila entre 2280,18 y 2444,24 μm . Valores similares			
Tamaño del Soma	Pequeño a mediano (59-66 μm^2)		Mediano a grande (82-99 μm^2)	NA
Forma del Soma	Fusiforme y poligonal		Poligonal y circular	NA
Número de procesos	3	2	4	NA
Clasificación según la forma de la célula	La mayoría de las células poseen somas poligonales con tamaño mediano y 3 procesos. Se distribuyen homogéneamente en las láminas II y III			NA
Comparación de las características morfológicas entre láminas y hemisferios	Las variables tamaño del soma y número de procesos permiten distinguir las láminas corticales y diferenciar los subgrupos morfológicos identificados con cada CaBP.			NA

Esta tabla resume los principales hallazgos citoarquitectónicos y morfológicos de las interneuronas positivas a las diferentes proteínas atraparoras de calcio en el Área 10o. Convenciones: NA: no aplica.



Resumen de los principales hallazgos del análisis de conglomerado y correlación por lámina cortical. Para cada lámina cortical se describió las correlaciones y conglomerados presentes. Esta tabla permitió identificar los conjuntos neuronales a los cuales estaban haciendo referencia las correlaciones y como algunas correlaciones se repetían entre láminas supragranulares.