

CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA DE LAS INTERNEURONAS DE LA  
LÁMINA VI DE LAS ÁREAS 10o Y 24 DE LA CORTEZA PREFRONTAL HUMANA

NELSON D. VILLALBA MORENO M.D

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

2016

CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA DE LAS INTERNEURONAS DE LA  
LÁMINA VI DE LAS ÁREAS 10o Y 24 DE LA CORTEZA PREFRONTAL HUMANA

Tesis de Grado para optar por el título de:  
MAGÍSTER EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

Presentado por:

NELSON D. VILLALBA MORENO M.D.

Director:

Dr. HERNÁN J. PIMIENTA

Asesora:

Dra. MARTHA I. ESCOBAR

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

2016

- ¡Ataja  
el cansancio! – exclamó mi señor-.  
No se llega a la victoria con  
blanduras. Sólo el recio corazón  
logra el premio. Cuanto hay de valor  
cuesta. ¡Levántate!, el dolor  
pasará. Ve que el cuerpo es carbón  
seco e inerte, si la pasión  
del alma cesa  
*Infierno, Canto XXIV, La Divina Comedia*

## AGRADECIMIENTOS

A la profesora Martha I. Escobar por su conocimiento, orientación y el acompañamiento constante durante mi formación en el programa de maestría.

Al profesor Hernán J. Pimienta, por su conocimiento, orientación, pero sobre todo por sus preguntas.

A Efraín Buriticá por su generosidad con el conocimiento.

A mi mamá Patricia Moreno, por todo el amor.

A Magdalena, por su apoyo, voz de aliento y ánimo.

A la Universidad del Valle por ser el espacio de mi crecimiento profesional y personal.

## RESUMEN

Los estudios que abordan la organización citoarquitectónica y celular de la corteza prefrontal son de gran utilidad, ya que sirven como punto de partida para comprender como de la actividad cortical emergen las funciones mentales superiores, además, ayudan al esclarecimiento de las bases neurobiológicas de enfermedades como los trastornos del estado de ánimo, la esquizofrenia, los trastornos del espectro autista y enfermedades neurodegenerativas como el Alzheimer. En el presente estudio la proteína del núcleo neuronal (NeuN) y las proteínas atrapadoras de calcio (*CaBP*), Calbindina (CB), Calretinina (CR) y Parvoalbúmina (PV) se usaron como marcadores neuroquímicos para estudiar la organización laminar de la porción orbital del área 10 (10o) y del área 24,, así como las características morfológicas de las interneuronas identificadas con las CaBP, específicamente en la lámina VI de ambas áreas corticales en sujetos humanos sin evidencia de anormalidad. Las áreas 10o y 24 son histológicamente granular y agranular respectivamente. En el área 10o no se encontraron diferencias en el espesor cortical total entre hemisferios cerebrales, en el área 24 en cambio, se encontró que el hemisferio derecho tiene un mayor espesor cortical. Mientras que en el área 10o hay un predominio de las láminas supragranulares, en el área 24 las láminas con mayor desarrollo son infragranulares. Al compararlas entre sí el área 24 tiene un mayor espesor cortical que el área 10o, a expensas de un mayor espesor en las láminas infragranulares del área 24. En la lámina VI de ambas áreas corticales las neuronas inmunoreactivas para PV son las más numerosas y las de mayor tamaño, las características morfológicas de cada sub población de

interneuronas, CB+, CR+ y PV+ no variaron de forma significativa entre áreas corticales o entre hemisferios cerebrales. El predominio de las células inmunoreactivas para PV en la lámina VI de ambas áreas corticales sugiere una preponderancia de esta población neuronal en la modulación de circuitos corticotalámicos involucrados en procesos atencionales o en la selección de estímulos.

Palabras clave: Área 10, área 24, NeuN, interneuronas, proteínas atrapadoras de calcio.

## ABSTRACT

Studies addressing the citoarchitecture and cellular organization of the prefrontal cortex are very useful as they serve as a starting point to understand how from cortical activity higher mental functions emerge, also, it helps to clarify the neurobiological basis of diseases such as the mood disorder, schizophrenia, autism spectrum disorders and neurodegenerative diseases like Alzheimer's. In the present study neuronal nuclei protein (NeuN) and calcium binding proteins (CaBP), calbindin (CB), calretinin (CR) and parvalbumin (PV) were used as neurochemical markers to the study of the laminar organization of the orbital portion of area 10 (10o) and area 24, besides the distribution and morphological characteristics of interneurons identified with CaBP, specifically in lamina VI of both cortical areas in human subjects with no evidence of abnormality. The 10o and 24 areas are histologically granular and agranular respectively. In the 10o area no differences in total cortical thickness between cerebral hemispheres was found, on the other hand, in area 24 it was found that the right hemisphere has a greater cortical thickness. While in the 10o area there is a predominance of supragranular layers in the 24 area the most developed are the infragranular ones. Compared to each other, area 24 has a greater cortical thickness than 10o area has, at the expense of a greater thickness in the infragranular layers in area 24. In the layer VI of both cortical areas, PV immunoreactive neurons are the most numerous and larger, the morphological characteristics of each subpopulation of interneurons, CB+, CR+ and PV+ did not differ significantly between cortical areas or between cerebral hemispheres. The prevalence of PV immunoreactive cells in layer VI of both cortical areas suggests a

preponderance of this neuronal population in modulating corticothalamic circuits involved in attentional processes or in the stimuli selection.

Keywords: Area 10, Area 24, NeuN, interneurons, calcium binding proteins.

## TABLA DE CONTENIDO

1. INTRODUCCIÓN
2. MARCO TEÓRICO
  - 2.1. Corteza prefrontal
  - 2.2. Área 10
    - 2.2.1. Localización
    - 2.2.2. Citoarquitectura
    - 2.2.3. Quimioarquitectura
    - 2.2.4. Conectividad
    - 2.2.5. Aspectos funcionales
  - 2.3. Área 24
    - 2.3.1. Localización y organización citoarquitectónica
    - 2.3.2. Conectividad
    - 2.3.3. Aspectos funcionales
  - 2.4. Lámina VI
  - 2.5. Interneuronas gabaérgicas de la corteza cerebral
3. JUSTIFICACIÓN
4. OBJETIVOS
  - 4.1. Objetivo general
  - 4.2. Objetivos específicos
5. MATERIALES Y MÉTODOS
  - 5.1. Origen del tejido cerebral
  - 5.2. Localización de las áreas 10o y 24
  - 5.3. Procedimiento inmunohistoquímico
  - 5.4. Registro fotográfico
    - 5.4.1. Análisis de imágenes
  - 5.5. Análisis estadístico
  - 5.6. Consideraciones éticas
6. RESULTADOS

- 6.1. Organización laminar de las áreas 10o y 24
- 6.2. Organización celular de la lámina VI del área 10o
- 6.3. Organización celular de la lámina VI del área 24
- 6.4. Análisis bivariado área 10o vs área 24
- 6.5. Caracterización morfológica de las interneuronas de la lámina VI de las áreas 10o y 24
- 6.6. Clasificación de las interneuronas inmunoreactivas para CB, CR y PV en las áreas 10o y 24
7. DISCUSIÓN
  - 7.1. Tejido cerebral
  - 7.2. Organización laminar del área 10o
  - 7.3. Organización laminar del área 24
  - 7.4. Diferencias entre el área 10o y el área 24
  - 7.5. Neuronas gabaérgicas de la lámina VI
  - 7.6. Consideraciones funcionales
8. CONCLUSIONES
9. BIBLIOGRAFÍA
10. ANEXOS

## LISTA DE TABLAS

- Tabla 1. Características de los sujetos estudiados.
- Tabla 2. Variables en estudio.
- Tabla 3. Espesor cortical y laminar área 10o.
- Tabla 4. Espesor cortical y laminar área 24.
- Tabla 5. Composición celular de la lámina VI, área 10o.
- Tabla 6. Composición celular de la lámina VI, área 24.
- Tabla 7. Distribución de neuronas inmunoreactivas para CB, CR y PV en las áreas 10o y 24.
- Tabla 8. Características morfológicas de neuronas inmunoreactivas para CB, CR y PV en las áreas 10o y 24.
- Tabla 9. Comparación entre hemisferios de las variables morfológicas, área 10o.
- Tabla 10. Comparación entre hemisferios de las variables morfológicas, área 24.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Ilustración de las superficies de la corteza prefrontal humana.
- Figura 2. Clasificación de las interneuronas gabaérgicas – características fisiológicas.
- Figura 3. Clasificación de las interneuronas gabaérgicas – características morfológicas.
- Figura 4. Localización macroscópica de las áreas 24 y 10o.
- Figura 5. Ilustración de una placa histológica.
- Figura 6. Calibración de la herramienta de medida.
- Figura 7. Medición del espesor cortical total y el espesor laminar.
- Figura 8. Conteo neuronal en un campo de 100 x 300  $\mu\text{m}$ .
- Figura 9. Medición del área del soma neuronal y cuantificación del número de procesos.
- Figura 10. Marcación con Anti-NeuN área 10o, ampliación de la lámina VI.
- Figura 11. Marcación con Anti-NeuN área 24, ampliación de la lámina VI.
- Figura 12. Inmunoreactividad para CB, CR y PV, área 10o.
- Figura 13. Inmunoreactividad para CB, CR y PV, área 24.
- Figura 14. Espesor cortical, áreas 10o y 24.
- Figura 15. Espesor laminar, área 10o.
- Figura 16. Espesor laminar, área 24.
- Figura 17. Espesor de las láminas supra e infragranulares del área 10o.
- Figura 18. Espesor de las láminas supra e infragranulares del área 24.
- Figura 19. Comparación del espesor de las láminas supra e infragranulares entre las áreas 10o y 24.
- Figura 20. Número total de neuronas inmunoreactivas para NeuN, área 10o.
- Figura 21. Número total de neuronas inmunoreactivas para CB, CR y PV, área 10o.
- Figura 22. Número total de neuronas inmunoreactivas para NeuN, área 24.
- Figura 23. Número total de neuronas inmunoreactivas para CB, CR y PV, área 24.
- Figura 24. Análisis bivariado del número de neuronas inmunoreactivas para NeuN y su densidad, áreas 10o y 24.

- Figura 25. Análisis bivariado número de neuronas inmunoreactivas para CB, CR y PV y su densidad, áreas 10o y 24.
- Figura 26. Tamaño del soma de las neuronas inmunoreactivas para CB, CR y PV, áreas 10o y 24.
- Figura 27. Número de procesos y grado de esfericidad de las neuronas inmunoreactivas para CB, CR y PV, área 10o.
- Figura 28. Número de procesos y grado de esfericidad de las neuronas inmunoreactivas para CB, CR y PV, área 24.
- Figura 29. Número de procesos primarios del área 10o Vs. área 24.
- Figura 30. Área del soma de las interneuronas del área 10o Vs. área 24.
- Figura 31. Grado de esfericidad de las interneuronas del área 10o Vs. área 24.
- Figura 32. Modelo de regresión lineal, área del soma y número de procesos – grado de esfericidad y número de procesos, área 10o.
- Figura 33. Modelo de regresión lineal, área del soma y número de procesos – grado de esfericidad y número de procesos, área 24.
- Figura 34. Interneuronas positivas para CB y CR de la lámina VI, área 10o.
- Figura 35. Interneuronas positivas para PV de la lámina VI, área 10o.
- Figura 36. Interneuronas positivas para CB y CR de la lámina VI, área 24.
- Figura 37. Interneuronas positivas para PV de la lámina VI, área 24.

## 1. INTRODUCCIÓN

Durante el siglo XIX se consolidó la teoría celular y con ella el principio de que la célula es la estructura básica de los seres vivos y la unidad fundamental de las funciones biológicas (1), también en este siglo llegaría a considerarse que la enfermedad era el resultado de la alteración en las células en el organismo (2). En el Sistema Nervioso esta unidad estructural y funcional está representada en las neuronas.

El estudio de la Corteza Cerebral -estructura de mayor complejidad en el Sistema Nervioso- ha permitido conocer una gran diversidad neuronal y un patrón general de organización en láminas y columnas (Mountcastle, 1954; Jones y Col., 2000) que discurren de forma paralela y perpendicular a la pía madre respectivamente. En relación al componente celular se distingue dos tipos principales al interior de la corteza cerebral, las células piramidales encargadas fundamentalmente de la actividad excitatoria y las interneuronas encargadas de la actividad inhibitoria (3). Desde una perspectiva funcional se considera que la corteza cerebral, particularmente la corteza prefrontal -porción más anterior del lóbulo frontal, por delante de las áreas motora y premotora- es el sustrato biológico de las funciones mentales superiores, el comportamiento y la interpretación que hacemos del mundo (Creutzfeldt, 1977; Fuster, 2001).

Los avances técnicos del siglo XX permitieron el desarrollo de diversas técnicas para el estudio de la estructura y función de la corteza cerebral, sin embargo, nuestro conocimiento al respecto dista de ser completo. Hay en la literatura reportes sobre la organización celular de la corteza cerebral del hombre, primates no

humanos y otros mamíferos, sobre todo respecto a cortezas posteriores y de las láminas supragranulares, pero la descripción de aspectos como la densidad, forma, tamaño y patrón de arborización de las células de la corteza prefrontal humana, particularmente de las interneuronas de las láminas infragranulares no se ha completado aún.

En este trabajo de investigación se estudió la organización y morfología de las interneuronas de la lámina VI en las áreas 10 orbital (10o) y 24 de la Corteza Prefrontal (CPF) Humana. Para este fin se utilizaron marcadores dirigidos contra las proteínas atrapadoras de calcio: Calbindina (CB), Calretinina (CR) y Parvoalbúmina (PV), las cuales permiten distinguir entre subpoblaciones de interneuronas, se estudiaron además áreas homólogas de ambos hemisferios con el fin de establecer si existen asimetrías entre ellos.

Partiendo del paradigma de la teoría celular, estudios como el presente que abordan la organización de la citoarquitectura de la corteza prefrontal resultan de gran utilidad al tratar de comprender cómo de la actividad cortical emergen las funciones mentales superiores, y también, ayudaría a establecer las bases neurobiológicas de enfermedades mentales tales como los trastornos del estado de ánimo (depresión, manía), esquizofrenia e incluso trastornos del espectro autista al servir como punto de referencia de la citoarquitectura normal de las interneuronas de la corteza prefrontal humana.

## 2. MARCO TEÓRICO

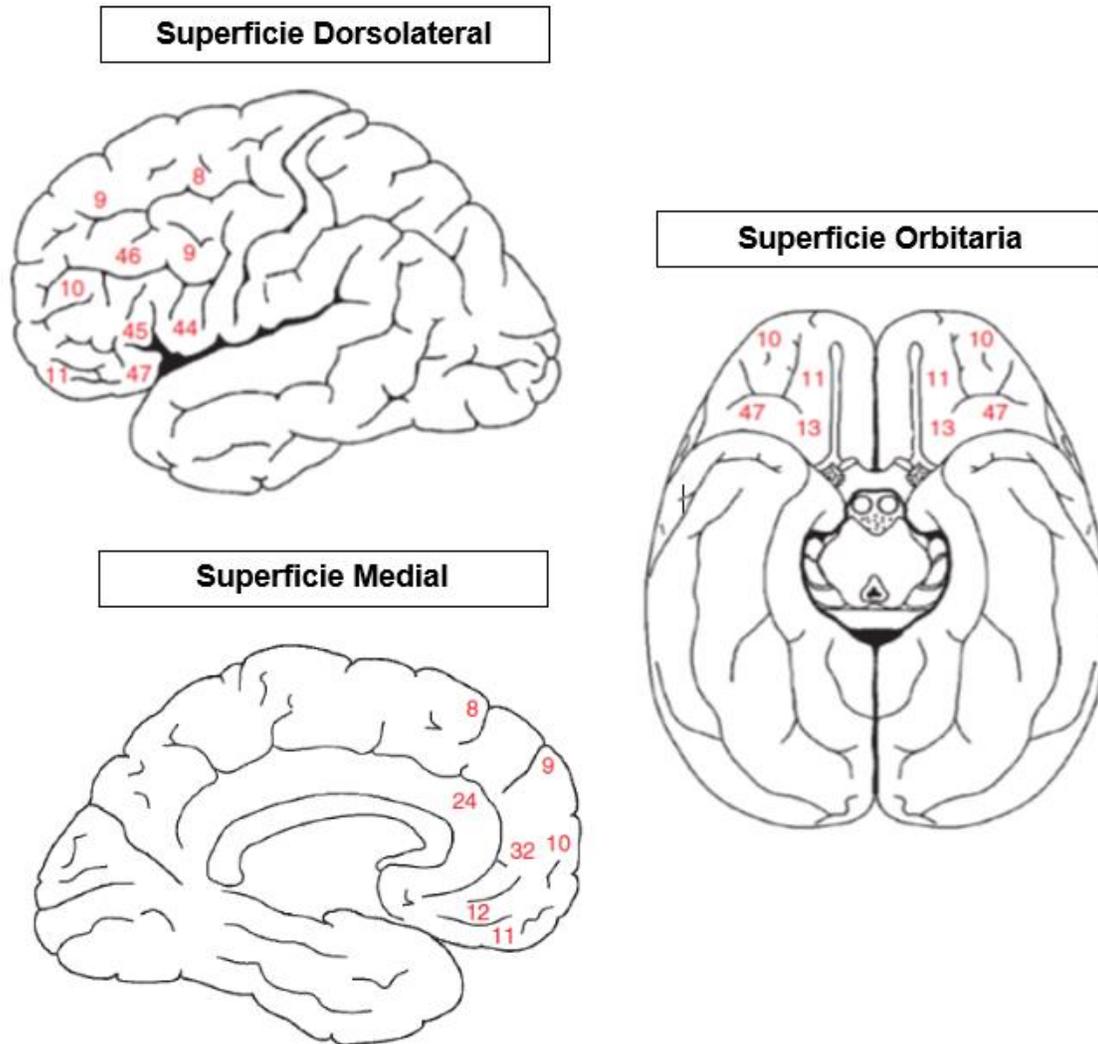
### 2.1 Corteza Prefrontal

Macroscópicamente la Corteza Prefrontal -CPF- corresponde a las áreas corticales del lóbulo frontal anteriores a las áreas motora -BA 4- y premotora -BA 6- (4, 6), atendiendo a un criterio de conectividad también puede ser definida como la región de la corteza cerebral que recibe aferencias del núcleo dorsomediano del tálamo (6). Se distinguen en ella tres superficies: Dorsolateral -BA 9, 46, 47/12, 45, 10-, Medial -BA 24, 25, 32, 10- y Orbitofrontal -10, 11, 12, 13, 14-, **Figura 1**, que en conjunto son consideradas el sustrato anatómico de los procesos cognitivos más complejos, sin embargo, se acepta que hay una mayor participación de cada una de estas subregiones en tareas específicas, de modo que la superficie dorsolateral se relaciona principalmente con funciones ejecutivas, la memoria operativa, atención sostenida/selectiva (Baddeley, 1992; Fuster, 2000; Jurado y Rosselli, 2007), la superficie medial con el procesamiento emocional, motivación, control autónomo y (Habib y Col., 1996, Stone y Col., 1998, Fellows, 2007) la superficie orbitaria con la conducta social y la integración sensorio-emocional (Barbas, 2006, Cummings, 2007).

La CPF humana representa el 29% del volumen cortical total en seres humanos (5), en términos absolutos es tres veces más grande que la de los grandes simios (7), mamíferos más cercanos al hombre en la escala filogenética, pero en conjunto, su tamaño no es mayor al esperado para el cerebro de un simio de tamaño humano (Semenderifi y Col., 2002). La similitud en las dimensiones globales de la CPF entre

homínidos sugiere que la diferencia existente entre las habilidades cognitivas del hombre y otros primates subyace en las diferencias microestructurales.

**Figura 1. Ilustración de las superficies de la Corteza Prefrontal Humana.**



*Ilustración de las superficies dorsolateral, medial y orbitaria de la corteza prefrontal humana en la que se incluyen la nomenclatura de las áreas corticales sugerida por Brodman (1909). Actualmente se reconoce que el área 47/12 se extiende desde el giro frontal inferior en la cara dorsolateral hasta el giro orbitario lateral en la cara orbitaria (Ongür y Col., 2003) y el área 13 se localiza en el giro orbitario medial y se extiende hasta la superficie medial del lóbulo frontal al igual que el área 14. Adaptado de: **Fuster, J. M. (2008). The Prefrontal Cortex. Los Ángeles: Elsevier.***

Microscópicamente las áreas corticales de la región prefrontal presentan diversidad citoarquitectónica, se encuentran en ella sectores de organización laminar granular, disgranular y agranular (9, 10). Esta heterogeneidad histológica es el resultado de la convergencia de dos vertientes evolutivas separadas, una paleocortical que se origina en la corteza olfatoria y otra arquicortical de origen hipocampal (Dart, 1934; Abbie, 1940; Sanides, 1969; Barbas y Pandya, 1989), que avanzan en sentidos opuestos hasta coincidir en el aspecto dorsolateral del lóbulo frontal (6,11). Durante esta migración ocurre un proceso de diferenciación que incluye un aumento del grosor cortical, una mayor definición laminar y finalmente la aparición de células granulares (Sanides, 1964, 1970).

Atendiendo a estos parámetros de diferenciación Dombrowski y Col., (2001) clasificaron las áreas corticales prefrontales en cuatro categorías: agranulares (que carecen de una lámina IV, (como el área 24), disgranulares (lámina IV rudimentaria, como las áreas 25,13, 32) y eulaminadas bien de tipo I (área 9, 10, 11, 12) o de tipo II (área 46) que se distinguen por la mejor definición laminar y mayor grosor de la lámina IV en las de tipo II (12, 13). En adición a la organización laminar, se ha descrito que la distribución de las interneuronas gabaérgicas inmunoreactivas para las proteínas atrapadoras de calcio Calbindina (CB), Calretinina (CR) y Parvoalbúmina (PV) varía entre las distintas áreas de la corteza prefrontal. En 2001 Dombrowski y Col., describen una mayor densidad de interneuronas inmunoreactivas para CB en las cortezas de tipo granular y disgranular al compararse con las que son inmunoreactivas para PV, diferencia no observada en las áreas eulaminadas donde la inmunoreactividad para ambos marcadores fue

similar; respecto a la marcación con CR, la distribución de las células inmunoreactivas fue similar en los diferentes tipos de corteza (14).

## **2.2 Área 10**

El área 10 ocupa el polo frontal, se extiende a través de las superficies lateral, medial y orbital del lóbulo frontal y establece conexiones bidireccionales con otras áreas prefrontales y algunas estructuras subcorticales (15, 16). Funcionalmente se le relaciona con procesos cognitivos (Pandya y Yeterian, 1990; Fuster, 2000), el control de impulsos, la toma de decisiones, el control de la motivación y la atención y el desarrollo de tareas que requieren de gran precisión (Öngür y Price, 2000). Alteraciones estructurales o funcionales de esta área cortical se han asociado a trastornos del neurodesarrollo como trastornos del espectro autista, trastorno de déficit de atención e hiperactividad y esquizofrenia (17).

### **2.2.1 Localización**

Según la descripción original de Brodmann (1909), el área 10 o área frontopolar ocupaba el aspecto anterior del giro frontal superior y medio en la convexidad del hemisferio sin extenderse medialmente hasta el giro callosomarginal o giro cíngulo, e inferiomedialmente se extendía hasta el surco rostral superior (18). Posteriormente Walker (1940) la extendería también a la superficial orbitaria del lóbulo frontal. Carmichael y Price (1994) y más recientemente Öngür y Col., (2003), prolongaron la extensión del área 10 en la corteza cerebral humana en la superficie

medial hasta el giro cíngulo, cerca al rostro del cuerpo caloso, además, atendiendo a criterios citoarquitectónicos la subdividieron en tres porciones a partir del polo frontal: polar (10p), rostral (10r) y medial (10m) (20). La porción 10p está presente en las tres caras del lóbulo frontal: en la cara lateral se extiende desde el polo y limita posteriormente con las áreas 9 (giro frontal superior), 46 (giro frontal medio) y 47/12 (giro frontal inferior) (Petrides y Pandya, 1999); en la cara medial esta porción limita caudalmente y sentido dorso-ventral con las áreas 9, 32, la porción rostral del área 10 y el área 11 que se extiende desde la superficie orbitaria; en la cara basal se ubica en el giro orbitario anterior por delante del área 11. La porción rostral (10r) y medial (10m) del área 10 se encuentran en la superficie medial del lóbulo frontal: la porción rostral limita ventralmente con el aspecto medial del área 11 y dorsalmente con el área 32, la porción medial limita en sentido dorsal con el área 24 y con las áreas 32 y 14 en sentido caudal y ventral respectivamente (19-21).

### **2.2.2 Citoarquitectura**

Las características citoarquitectónicas del área 10 son similares entre los homínidos, hay, sin embargo, en el cerebro humano, pequeñas variaciones en su organización que lo diferencian de otras especies de la familia (23). Semenderifi y Col., (2001) estimaron que el hemisferio derecho del humano tiene un número considerablemente mayor de neuronas que el de otros homínidos (humanos: 254.400, chimpanze:64.500, bonobo: 63.500, gorila: 45.900, orangután: 63.000 gibbon: 8.000) mientras que su densidad neuronal es menor (humanos: 34.014 x mm<sup>3</sup>, chimpancé: 60.468 x mm<sup>3</sup>, bonobo: 55.690 x mm<sup>3</sup>, gorila: 47.300 x mm<sup>3</sup>,

orangután: 78.182 x mm<sup>3</sup> gibbon: 6.250 x mm<sup>3</sup>), esta menor densidad da cuenta del aspecto “pálido” del área 10 en comparación con las áreas corticales vecinas, es decir, que la densidad neuronal del área 10 no sólo es menor al compararse con otras especies, sino que también es menor que la de otras áreas de la corteza cerebral humana. De otro lado, en el área 10 humana el neuropilo representa una mayor porción de la sustancia gris que en otros primates. Jacobs y Col., (2001) cuantificaron un mayor número de espinas dendríticas por célula y mm<sup>3</sup> de tejido cerebral en el área 10 que en otras áreas de la corteza cerebral humana (23, 24).

El área 10 tiene una organización hexalaminar, sus láminas supragranulares representan el 40-43% del espesor cortical total, mientras que las infragranulares representan el 39-41% (23,25). Según la descripción hecha por Semenderifi y Col., (2001) sus láminas I y II son delgadas con un espesor relativo de 11% y 9% respectivamente, en la lámina II se encuentran células piramidales y granulares de menor tamaño que en las láminas siguientes. La lámina III, más gruesa, tiene un espesor relativo del 31%, mientras que en la lámina IV este oscila entre un 6 y 9%. La lámina V tiene un espesor del 17%, y es posible subdividirla de acuerdo al tamaño y densidad de sus células piramidales en una lámina Va superficial y otra Vb más profunda, de estas, la capa más superficial está ocupada por neuronas piramidales de mayor tamaño y tiene una mayor densidad celular. Finalmente, la lámina VI está poblada por células piramidales medianas y fusiformes y su espesor cortical relativo es del 23%.

En 2003, Öngür y Col., publicaron sus observaciones sobre la arquitectura del área 10 en el humano (20), mediante el uso de técnicas de histoquímica (Nissl) e

inmunohistoquímica (anticuerpos dirigidos contra la proteína de la mielina, parvoalbúmina, acetilcolina y SMI-32). según sus hallazgos, el área 10 podría ser subdividida por sus características citoarquitectónicas en tres segmentos, en sentido rostro-caudal 10p, 10r, 10m. De acuerdo con la descripción de los autores, la porción 10p es la de mayor espesor cortical, muy granular, con una lámina III sublaminada (IIIa y IIIb) y una menor densidad celular en las láminas infragranulares, la porción 10r tiene una lámina III menos desarrollada y la porción más posterior, 10m, aunque granular, tiene una lámina IV más delgada. La heterogeneidad arquitectónica del área 10 es el resultado de las dos vertientes evolutivas que dan lugar a ella, la primera de origen paleocortical que deriva en la cara orbitaria y la segunda de origen arquicortical que deriva en la cara dorsal (Barbas y Pandya, 1989).

Al compararla con las áreas vecinas, el área 10 tiene un mayor grado de definición laminar que las áreas prefrontales de la cara medial (áreas 24, 32), pero menor que las de la superficie dorsolateral (áreas 9 y 46). Su lámina II es más delgada y tiene una mayor densidad celular que las áreas 9 y 46 de la superficie dorsolateral mientras el desarrollo de las láminas III y IV es similar entre ambas regiones. Adicionalmente sus láminas Va y Vb son menos prominentes que las del área 11 (superficie orbital) (20-25).

### 2.2.3 Quimioarquitectura

En adición a las técnicas de histoquímica clásicas, el uso de anticuerpos marcados contra proteínas del tejido nervioso ha permitido una mejor caracterización del mismo, entre estos se cuenta la utilización de marcadores dirigidos contra la proteína de la mielina, la enzima acetilcolinesterasa, anticuerpos como NeuN, que es afín a una proteína nuclear de las células nerviosas, o SMI-32 que marca proteínas presentes en los neurofilamentos (20, 26). Otros marcadores de gran utilidad son los anticuerpos dirigidos contra proteínas atrapadoras de calcio como Calbindina (CB), Calretinina (CR) y Parvoalbúmina

Las neuronas positivas para PV, CB y CR representan subtipos diferentes de interneuronas gabaérgicas (14, 28-29). En la corteza prefrontal, hay una gran concentración de neuronas inmunoreactivas para parvoalbúmina, su distribución tiene una progresión caudo-rostral y medio-lateral, de manera tal que su densidad aumenta en el mismo sentido que la definición laminar entre las áreas corticales prefrontales, siendo mayor en cortezas granulares como la porción polar del área 10, se ha descrito también que su concentración es mayor en la porción profunda de la lámina III, la lámina IV y en la porción superficial de lámina V, así como la formación de dos plexos celulares separados por la lámina IV, este último hallazgo fue reportado por Hof y Col., en 1995, aunque estudios más recientes (Öngür y Col., 2003) no han encontrado una distribución similar. La inmunoreactividad de las células positivas para CB es mayor en las áreas de la superficie orbito-medial (área 13, área 25) que en las de la superficie dorsolateral (área 9, área 46) y su densidad es mayor en las láminas supragranulares. La marcación con CR tiene una

distribución homogénea entre las áreas prefrontales, excepto en el área 24 donde es ligeramente menor y se concentran sobre todo en las láminas supragranulares (14, 30-31).

#### **2.2.4 Conectividad**

En la corteza cerebral de los primates el procesamiento de la información se hace de forma jerárquica, la información se hace más abstracta desde las áreas primarias hacia las asociativas y multimodales. Al parecer, el área 10 no establece conexiones directas con áreas corticales primarias que se encuentran corriente abajo en la organización jerárquica del flujo de la información en la corteza cerebral (15,24). En este sentido, el área 10 se distingue de otras áreas prefrontales por establecer, de forma preferencial, conexiones recíprocas solo con áreas supramodales de la corteza prefrontal, la corteza temporal anterior y la región anterior del cíngulo (13,21,32,33), de estas las más abundantes son aquellas interconexiones con las cortezas más derivadas de la superficie dorsolateral (áreas 9/46).

El área 10 tiene conexiones recíprocas con las áreas 24,32 y 9 en la superficie medial y con las áreas 8, 9, 46, 47/12 y 45 en la superficie lateral (Petrides y Pandya, 1999), mientras que en la superficie orbitaria se comunica con las áreas 11, 13 y 14 (Cavada y Col., 2000). Las conexiones del área 10 se extienden más allá de la corteza prefrontal hasta el área 23 en las porciones posteriores del giro del cíngulo y el área 30 en la región retrosplenial (Morecraft y Van Hoesen, 1993; Bates y Goldman-Rakic, 1993) (13, 35-37). Se han documentado, además, conexiones con

la porción disgranular de la ínsula –a través de la capsula extrema-, la región parahipocampal en el lóbulo temporal -a través del fascículo uncinado- (Bachevalier y Col., 1997) (33), las áreas asociativas del giro temporal superior (Hacket y Col., 199) (38).

Además de sus conexiones corticales, el área 10 establece conexiones con estructuras subcorticales, particularmente el tálamo. La región dorso-lateral del área 10 establece conexiones bidireccionales con el núcleo dorsomediano del tálamo -región anterodorsal-, la región medial del núcleo anterior y la porción magnocelular del núcleo ventral anterior, mientras que las regiones medial y orbitaria se comunican con la región medial del núcleo Caudado, el núcleo Acumbens y la porción ventral del Putamen (39, 40, 41). Existen también conexiones con estructuras más ventrales del neuroeje como la sustancia gris periacueductal, núcleos reticulares de la región tegmental del puente (42). De otro lado, se sabe que el área 10 recibe aferencias unidireccionales de los núcleos Basales de Meynert y la Banda Diagonal de Broca sin enviar conexiones directas a ellas (43).

### **2.2.5 Aspectos Funcionales**

Debido a limitaciones técnicas para el estudio de la corteza frontopolar en el humano y la limitación de la extrapolación de hallazgos en modelos animales aún se desconocen muchos aspectos de las funciones de esta región cerebral (44). A partir de la evaluación de pacientes con lesiones en esta región y de los hallazgos en estudios de neuroimagen como la resonancia nuclear magnética funcional o la

tomografía por emisión de positrones, se le ha involucrado con una variedad de tareas entre las que se incluyen: razonamiento, la organización del contenido mental, el lenguaje, la planeación, el aprendizaje de las normas, la memoria espacial, memoria episódica, la motivación, la introspección, la divagación mental, la teoría de la mente y la memoria de trabajo verbal y no verbal (15, 16, 44-47).

La evaluación de pacientes con lesiones de la corteza frontopolar ha mostrado las limitaciones de estos para desenvolverse en situaciones de la vida cotidiana. A pesar de tener un desempeño aceptable en pruebas neuropsicológicas o medidas del coeficiente intelectual (48) y que sus habilidades sociales, de lenguaje y cognitivas se conservan, se ha descrito que tienen limitaciones específicas en el desarrollo de tareas múltiples de forma simultánea (*Multitasking*) y en situaciones en las que deben escoger entre diferentes comportamientos y el más apropiado no es aparente a simple vista (49, 50). De otro lado, el estudio de sujetos normales mediante técnicas de neuroimagen ha relevado una activación del área 10 en una variedad de tareas cognitivas, desde las más simples como los paradigmas condicionados clásicos hasta tareas más complejas que requieren la solución de problemas, la memoria o un juicio de valor. A pesar de esto se ha descrito cierto grado de especialización funcional entre las superficies medial, más activa durante el desarrollo de tareas que requieren mentalización y la superficie lateral más activa al desempeñar tareas que requiere de la memoria episódica o la memoria operativa (51, 52, 53).

Ramnani & Owen (2004), han propuesto condensar en tres las funciones de la corteza frontopolar. La primera de ellas daría cuenta de la recuperación de

información a partir de un estímulo externo, el cual se convertiría en un pensamiento consciente. La segunda función, llevada a cabo por la superficie medial, es la fijación de la atención, que permitiría mantener la información y las metas presentes mientras se realizan tareas secundarias. La tercera función de la que sería responsable el área 10 es la integración del conocimiento, de forma tal que se puedan cotejar de forma simultánea las relaciones entre los objetos y los pensamientos.

Por su parte Burgess y Col., (2005) agruparon las teorías sobre las funciones del área 10 en cuatro categorías. En primer lugar, su participación en la *Memoria Episódica* (54). En segundo lugar, *Metaconciencia*, en esta categoría agruparon las teorías que involucran al área 10 en la conciencia de nuestro propio estado mental y el de otros -*Teoría de la Mente*- (55) la evaluación, monitorización y manipulación de los pensamientos propios y el pensamiento dirigido a metas (56). La tercera categoría denominada *Adición de Procesos (Sum processes)* tiene dos subcategorías, una de procesamiento según la cual el área 10 es la encargada de mantener el objetivo principal presente mientras se exploran objetivos secundarios (57) y otra anatómica según la cual ejerce control cognitivo y selecciona entre procesos y metas a través de su interacción con las regiones dorso-laterales y ventro-laterales del lóbulo frontal (58). En la cuarta categoría se encuentra la *Hipótesis del Modo Basal (The Default Mode Hypothesis)*, según la cual en condiciones de reposo la superficie medial de la corteza frontopolar reúne y evalúa información del entorno y el medio interno, mientras que cuando se fija la atención,

particularmente si es en una tarea nueva, la actividad en esta región disminuye (59, 60).

### **2.3 Área 24**

El área 24 ocupa la porción más rostral del giro del cíngulo en la cara medial del lóbulo frontal (61), establece conexiones con áreas prefrontales de la superficie medial, orbitaria y con otras estructuras límbicas y paralímbicas (Vogt y Pandya 1987; Carmichael and Price 1996). Funcionalmente se le ha asociado con la regulación de la respuesta visceral y autonómica (Altman y Col., 2001), la expresión emocional, el procesamiento de errores y la representación de los requerimientos internos (Phan y Col., 2002; Vogt, 2005). Alteraciones estructurales y funcionales de esta región se han asociado a trastornos del estado de ánimo como la depresión mayor o el trastorno bipolar y con síndromes dolorosos crónicos y el dolor neuropático (62).

#### **2.3.1 Localización y Organización Citoarquitectónica**

El giro del cíngulo se distribuye en forma de arco alrededor del rostro, cuerpo y esplenio del cuerpo calloso y ha sido dividido en tres segmentos: anterior, medio y posterior (63). La región anterior del giro cíngulo incluye la porción de este que se encuentra por delante del rostro del cuerpo calloso hasta la porción de su cuerpo al nivel de la comisura blanca anterior (64). Según la descripción hecha por Brodmann (1909) el área 24 correspondía a la región ventral anterior del giro del cíngulo e

incluía la porción ventral de la mitad anterior de este por delante del cuerpo calloso, exceptuando una pequeña región del surco calloso que pertenecía al área 33 (18). En la actualidad se acepta que el área 24 ocupa la región anterior del cíngulo en la superficie medial de ambos lóbulos frontales sobre la mitad anterior del giro, limitada inferiormente por el surco del cuerpo calloso y superiormente por el surco del cíngulo, las áreas vecinas corresponden a la región septal (área 25) que se encuentra posterior e inferior, el área 32 dorsalmente y el área 23 en sentido caudal (64).

A partir de las diferencias encontradas en su organización citoarquitectónica y patrones de conectividad, la región anterior del cíngulo se ha dividido en tres subregiones, una ventral que corresponde a las áreas 25 y 33, otra rostral, áreas 24 y 32 y una porción más caudal que incluye la región más posterior de las áreas 24 y 32 y cuya notación es 24' y 32' respectivamente, el área 24' se puede distinguir de la 24 (más rostral) por tener una menor densidad neuronal y una lámina V más delgada. Adicionalmente la región anterior del cíngulo puede ser subdividida en una porción subgenual -inferior a la rodilla del cuerpo calloso- y otra pregenual -rostral y dorsal a la rodilla- (Gittins & Harrison, 2004, Palomero-Gallagher y Col., 2008) (68).

Histológicamente el área 24 carece de lámina IV por lo que se clasifica como corteza agranular. Atendiendo a criterios citoarquitectónicos ha sido subdividida en tres porciones 24a, 24b, 24c (Braak's, 1979). Las porciones 24a, 24b, 24'a, y 24'b se ubican sobre el giro cíngulo mientras que las porciones 24c y 24'c yacen sobre el surco del mismo nombre (63, 64, 65). En términos generales las áreas de la región anterior de cíngulo tienen una lámina V prominente, el área 24 en particular se

distingue por tener una Lámina Va densamente poblada de células piramidales y una lámina Vb con neuronas más dispersas, además, tiene unas láminas II y III que son claramente distinguibles. Las diferentes porciones de la región 24 (24a, 24b, 24c) se diferencian entre ellas por una mayor diferenciación laminar a medida que se alejan del cuerpo calloso. La región 24a tiene láminas supragranulares (II, III) claramente diferenciables, pero sin un límite preciso y una lámina Va más delgada, mientras que la región 24b exhibe una lámina II más delgada que la anterior pero más densa y láminas infragranulares (Va, VI) con una mayor densidad neuronal. La región 24c, que puede ser subdividida en una porción dorsal (d24c) y otra ventral (v24c), tiene una lámina II gruesa y una lámina III con células piramidales uniformes de tamaño mediano, densamente empacadas en la parte profunda de la lámina. Además de las diferencias descritas, se han documentado diferencias en la citoarquitectura entre las porciones subgenual y pregenual de las divisiones 24a y 24b, que se distingue en general por una mayor diferenciación laminar y mayor densidad neuronal en las áreas pregenuales (Palomero-Gallagher y Col., 2008) (68). Una última porción del área 24, la porción 24c'g (Vogt et al., 1995) ubicada en la porción más caudal de la región anterior del cíngulo, adyacente al surco, se ha distinguido por contener células piramidales gigantes en la lámina Vb, que recuerdan a las células gigantes de Betz de la lámina V en la corteza motora primaria (66-68).

La utilización de anticuerpos dirigidos contra las proteínas atrapadoras de calcio, Calbindina (CB), Calretinina (CR) y Parvoalbúmina (PV) ha contribuido en la caracterización citoarquitectónica la región del cíngulo (94). El área 24a se

caracteriza por la presencia de células pequeñas, bipolares inmunoreactivas para PV en las láminas II y III, mientras que en la lámina V y VI se encuentran células multipolares de mayor tamaño, la tinción del neuropilo -que es mayor en las láminas profundas- muestra dos bandas separadas localizadas en las láminas III y V. El área 24b tiene un patrón de distribución celular similar al área 24a en las láminas supragranulares, sin embargo, en la lámina III las células bipolares tienen un mayor tamaño, además, la densidad celular es mayor en la lámina V. La densidad neuronal en el área 24c es mayor en todas las láminas respecto del área 24b y en la región 24c' (sobre el surco del cíngulo) la inmunoreactividad para PV es mayor, hay células multipolares en la lámina II, la banda de neuropilo marcada en su lámina III es mayor que la que se encuentra en el área 24b mientras que la de la lámina V es similar. La inmunoreactividad para CB tiene lugar sobre todo en las láminas supragranulares mientras que en la lámina VI es escasa o inexistente. En el área 24a se encuentran células ovoides y pequeñas en las láminas II y III, en el área 24b la densidad neuronal es considerablemente mayor y muchas neuronas tiene la morfología de neuronas en doble bouquet, en la lámina III profunda es posible encontrar además células multipolares de mayor tamaño, el patrón de inmunoreactividad en el área 24b es bastante similar al área 24c excepto por la presencia de una mayor densidad neuronal en esta última. En términos generales, la corteza del giro cíngulo muestra una gran inmunoreactividad para CR, el área 24a exhibe una mayor densidad neuronal en las láminas supragranulares que en las infragranulares, en el área 24b hay una menor densidad en las láminas al compararla con las áreas 24a y 24c, es frecuente encontrar grandes células multipolares inmunoreactivas para CR en la lámina I de la corteza del giro cíngulo en humanos (94, 95).

### **2.3.2 Conectividad**

La región anterior del cíngulo se conecta con una gran variedad de regiones corticales y subcorticales (75). Recibe aferencias de varios núcleos talámicos (en una mayor proporción que otras regiones corticales), además de aferencias serotoninérgicas, noradrenérgicas y dopaminérgicas, desde los núcleos del rafe, el locus coeruleus y el área tegmental ventral respectivamente. Existe, también, una segregación en términos de la conectividad de las subregiones de la región anterior del cíngulo (ventral, rostral y caudal) (64).

Las porciones ventral y rostral de la región anterior del cíngulo están vinculadas con regiones cerebrales que participan en funciones autonómicas y visceromotoras. El área 25 envía fibras directas a núcleos en el tallo cerebral (Bacon & Smith, 1993) (78, 82) como el núcleo del tracto solitario, el núcleo ambiguo y el núcleo motor dorsal del vago, mientras que las áreas rostro-ventrales en conjunto (áreas 24, 25 y 32) podrían incidir en la función autonómica de forma indirecta a través de sus relaciones recíprocas con la ínsula (Mesulam & Mufson, 1982), la amígdala (Mesulam & Mufson, 1982; Ongür & Price, 2000) y otras regiones que participan de la regulación autonómica como la sustancia gris periacueductal (An y Col., 1998), el hipotálamo (Öngür y Col., 1998), la corteza orbitofrontal y el estriado ventral (Porrino y Col., 1981; Vogt & Pandya, 1987) (77, 80, 81), además de las relaciones bidireccionales con estructuras de la región parahipocampal y la corteza auditiva.

Por su parte las aferencias y eferencias de la porción caudal de la región anterior del cíngulo -área 24c- están segregadas entre la porción de esta que se encuentra sobre el surco del cíngulo y la que está sobre el giro. La región sobre el surco se

asocia con la función motora (Patrick y Col., 2001), recibe aferencias de núcleos talámicos relacionados con el cerebelo al igual que las áreas somatosensoriales secundarias -áreas 5 y 7- el área premotora y el área 46. Se proyecta de forma directa a la médula espinal (Dum & Strick, 1991; He et al, 1993) el núcleo ventral lateral del tálamo (Clarke & Boggon, 1933) y los núcleos de la base -N. caudado y Putamen- (70, 76), adicionalmente, tiene comunicaciones recíprocas con las áreas motoras primaria y secundaria. La región sobre el giro recibe aferencias del núcleo ventral posterior del tálamo (Vogt & Sikes, 2000) encargada de relevar información nociceptiva a la corteza cerebral proveniente desde la médula espinal a través del tracto espinotalámico lateral, a su vez, la región anterior del cíngulo se proyecta a la sustancia gris periacueductal de forma directa y a través del núcleo Parafascicular -intralaminar-. Además del patrón de conectividad descrito, la gran densidad de receptores para opioides que se han documentado en la región anterior del cíngulo (Jones et al., 1991; Vogt et al., 1995) la vinculan con el procesamiento del dolor (71-73). Las conexiones intrínsecas de la región anterior del cíngulo son copiosas entre al interior de cada subregión, pero no entre ellas (Jones y Col., 2005), si bien las conexiones entre la región ventral y rostral al igual que aquellas entre la porción sobre el surco y el giro de la región caudal son abundantes, no se ha encontrado evidencia de que haya una comunicación similar entre estas subregiones (83).

### 2.3.3 Aspectos Funcionales

En 1878 Broca describió *Le Grand Lobe Limbique*, conjunto de estructuras que incluían el giro del cíngulo y que él vinculó con la olfacción, posteriormente se le vincularía con la emoción (Papez, 1937), la actividad autonómica y el reconocimiento de la expresión facial (Smith, 1945) (61). Recientemente Vogt (Vogt, 1993; Vogt y Col., 2005) a partir de la información recolectada respecto a la organización estructural del giro cíngulo y sus conexiones han propuesto un modelo neurobiológico que divide esta área en 4 regiones: la región anterior del cíngulo, el cíngulo medio, una región posterior y la región retrosplenial (69, 84). En términos generales la región medial del cíngulo ha sido asociado con funciones motoras, la interacción social y la predicción de errores (85), la región posterior del giro cíngulo se vincula con la orientación del cuerpo en el espacio, funciones visuoespaciales (Olson y Col., 1993, 1996), la memoria autobiográfica y la regulación del foco de atención (86-88) mientras que la región posterior se relaciona con la navegación topoquinética, la orientación visuoespacial y la visualización de la memoria (89, 90).

Por su parte la región anterior del cíngulo se ha vinculado con la regulación autonómica y la emoción. De acuerdo con James (1878) los estados emocionales son el resultado de la interacción entre las emociones y la retroalimentación visceral/autonómica desde estructuras periféricas al sistema nervioso central. Las aferencias y eferencias descritas de la región anterior del giro cíngulo la convierten en el sitio ideal para servir como sustrato anatómico de esta interacción (61). La estimulación eléctrica de esta región desencadena cambios en la frecuencia respiratoria, cardíaca y en la presión arterial, adicionalmente, se asocia a midriasis,

piloerección, rubor (Pool, 1954; Escobedo y Col., 1973; Talairach y Col., 1973) y cambios gastrointestinales como náuseas, vómito y relajación del esfínter anal y vesical (Pool & Ransohoff, 1949; Meyer y Col., 1973) (77, 82, 91). Se ha demostrado también en estudios imagenológicos una mayor actividad de la región anterior del cíngulo en el procesamiento emocional (George y Col., 1995; Mayberg y Col., 1999) el reconocimiento de caras que expresan un contenido emocional (George y Col., 1993) y el procesamiento del dolor (65, 92, 93).

## **2.4 Lámina VI**

El estudio de la lámina VI de la corteza cerebral ha recibido mucho menos atención que el de las láminas supragranulares o incluso la lámina V tanto en el hombre como en otros animales, de otro lado, la información existente proviene principalmente del estudio del área somatosensorial primaria de diferentes especies, hay pocos estudios disponibles en áreas motoras, asociativas o en corteza cerebral humana (96). Histológicamente, la lámina VI se caracteriza por una gran variedad de tipos neuronales (97), hay en ella diferentes tipos de células piramidales que pueden ser distinguidas por el patrón de arborización de su dendrita apical, células excitatorias de morfología no piramidal y una variedad de interneuronas.

La lámina VI es la primera en formarse en la neocorteza (Marín-Padilla, 1978) (98, 99), de igual forma, las neuronas piramidales de esta lámina que hacen parte del circuito cortico-talámico son de las primeras en aparecer, justo después de las proyecciones provenientes de la lámina V (Miller y Col., 1993) (100, 101). Además

de las células piramidales con proyección hacia el tálamo (CT), que constituyen aproximadamente el 30-50% de la población glutamatérgica, hay una población de piramidales que envían sus axones a la misma corteza cerebral (CC), (102). En la corteza somatosensorial primaria de la rata se ha descrito que las neuronas de proyección al tálamo se caracterizan por tener vértice apical que se proyectan hacia láminas superficiales, con poca arborización local y colaterales que hacen contacto sináptico en la lámina IV de forma preferencial, mientras que las neuronas piramidales que se proyectan a la corteza tienen una morfología más variada que incluye células bipolares y piramidales de vértice apical o invertido (103, 104). En líneas generales se ha documentado que las células piramidales de proyección talámica tienen un patrón de disparo tónico mientras que las de proyección cortical es fásico (105).

Respecto a las interneuronas de la lámina VI se sabe menos en comparación con las células piramidales. Se ha estimado que la proporción de interneuronas en la lámina VI varía entre el 10 y el 20%. Morfológicamente se han identificado células en cesta, ubicadas en la porción superior de la lámina VI e interneuronas similares a las células en cesta *-basket like cells-* que morfológicamente corresponden a interneuronas multipolares, además de estas, se han descrito células en candelabro, doble bouquet y Martinotti. La mayor parte de interneuronas en la lámina VI hacen contacto sináptico con otras células al interior de la misma lámina (97).

La lámina VI recibe aferencias excitatorias tanto corticales como talámicas. Las aferencias corticales provienen fundamentalmente de las láminas V y VI y en menor

proporción de las láminas II, III y IV. Las células piramidales tanto CT, como CC forman circuitos intralaminares, mientras que las células CT hace contacto sináptico principalmente con interneuronas, las células CC lo hacen con otras células piramidales. -la mayor proporción de contactos inhibitorios que reciben las interneuronas de la lámina VI provienen de células en la propia lámina (105, 106). A diferencias de sus aferencias excitatorias, las aferencias inhibitorias hacia la lámina VI provenientes de la lámina IV son mucho mayores, particularmente de las células en cesta y doble bouquet de esta lámina, la lámina VI a su vez le envía aferencias tanto excitatorias como inhibitorias a la lámina IV, las últimas a través de células en cesta grandes, mientras que las células de Martinotti de esta lámina probablemente inervan las láminas VI a I (107).

## **2.5 Interneuronas Gabaérgicas de la Corteza Cerebral**

La actividad cortical es el resultado del sinergismo entre la excitación y la inhibición, por ejemplo, estímulos simples como una línea vertical en el campo visual desencadenan de forma simultánea actividad excitatoria e inhibitoria en la corteza visual primaria (Anderson y Col., 2000) (108, 109). Otro ejemplo de la estrecha relación entre la actividad cortical y la actividad inhibitoria es la disminución observada en la concentración cortical del neurotransmisor GABA -principal neurotransmisor inhibitorio- en la corteza visual primaria (Jones, 1993) cuando se bloquea la transmisión sináptica a través del nervio óptico (110) o en la corteza somatosensorial (Kaas, 1994) después de la sección de nervio mediano (111).

Mientras que las células piramidales son en general responsables de la actividad excitatoria, la inhibición es el resultado de la actividad de las interneuronas, efecto que es mediado por la actividad del neurotransmisor Ácido Gamma-Aminobutírico - GABA- (112). El GABA es sintetizado en el citosol de las interneuronas a partir del glutamato mediante la acción de la enzima ácido glutámico descarboxilasa y posteriormente es trasladado hasta la membrana presináptica por transportadores vesiculares (*vGAT por sus siglas en inglés*), una vez en la membrana es liberado en la hendidura sináptica por un mecanismo dependiente de calcio. Diferentes subpoblaciones de interneuronas expresan proteínas atraparoras calcio como Calbindina (CB), Calretinina y Parvoalbúmina las cuales tiene sitios de unión para el Ca<sup>+</sup> y actúan como buffer molecular (113, 114).

Las interneuronas, descritas por primera en la corteza cerebral y el hipocampo por Santiago Ramón y Cajal (1893, 1911) con la utilización de la tinción argéntica (115), representan entre el 20 y el 25% de las neuronas corticales en los homínidos (Somogyi y Col.,1998), se distribuyen de forma irregular a lo largo de la corteza cerebral (Schwartz y Col., 1988), su densidad es mayor en las cortezas agranulares o disgranulares en las que representan entre el 44 y el 50%, que en las granulares donde solo representan alrededor del 37% (Ong & Garey,1991) (119, 127), se ha descrito también (Hormung & Tribolet, 1994) una mayor proporción de interneuronas en las láminas supragranulares que en las infragranulares, con una proporción hasta del 88.94% en la lámina I y del 16.1% en la lámina VI de la corteza prefrontal dorsolateral (119, 120). Las interneuronas pertenecen al grupo de neuronas no piramidales, morfológicamente se caracterizan por tener procesos dendríticos

bipolares o multipolares con pocas o ninguna espina dendrítica, somas más pequeños que el de neuronas piramidales y -salvo algunas excepciones- un axón corto que se proyecta sobre su columna de origen o las más cercanas (116). Funcionalmente se ha planteado que proveen estabilidad a las células piramidales a través de la inhibición *feedforward* o *feedback*, que logran a través de contactos somato-dendríticos, axo-somáticos o dendro-dendríticos con estas células o con otras interneuronas (117, 118), se ha demostrado que las interneuronas participan de los procesos de aprendizaje (Donato y Col., 2013) (1667), los patrones de actividad cortical rítmica u oscilaciones gamma (Silberberg & Markram, 2007; Sohal y Col., 2009; Buzsaki & Wang, 2012) (163, 165, 166) y la integración de la información entre distintas áreas corticales (Fu y Col., 2014; Chen y Col., 2015) (167, 168). Adicionalmente, la disfunción de las interneuronas se ha asociado a enfermedades neurológicas o psiquiátricas como la esquizofrenia (Rogasch y Col., 2014), depresión, trastorno bipolar (Levinson y Col., 2007) y algunas formas de epilepsia (Powell y Col., 2003; Cobos y Col., 2005;) (169, 170, 171, 172).

La población de interneuronas es más diversa que la de células piramidales y su diversidad se expresa no sólo en su morfología, sino también en sus características bioquímicas, eléctricas y sus patrones de conectividad (123-126, 129, 133), se cree que esta variación en sus características da cuenta de su diversidad funcional y de la forma en que la actividad inhibitoria ayuda a moldear la actividad cortical (108, 122, 128, 130). Debido a esta diversidad, se ha hecho necesario establecer un sistema de clasificación de uso general que facilite el intercambio de información y la comparación de resultados entre los investigadores respecto al estudio de las

interneuronas. Los investigadores del grupo Petilla para la nomenclatura de las interneuronas (*PING*, por sus en inglés) han propuesto agrupar las interneuronas de acuerdo a sus características morfológicas, moleculares y electrofisiológicas (131, 132), en las **figuras 2 y 3** se resumen las categorías propuestas por el *PING*, además de esta, otras iniciativas como *The Neuroscience Information Framework (NIF)*, *The International Neuroinformatics Coordinating Facility (INCF)* y *Neuron Registrative Initiative* se ha propuesto establecer un marco de referencia internacional para el estudio de las interneuronas (134). A continuación, se describen subtipos de interneuronas gabaérgicas corticales atendiendo a su morfología e inmunoreactividad para las proteínas atrapadoras de calcio Calbindina, Calretinina y Parvoalbúmina.

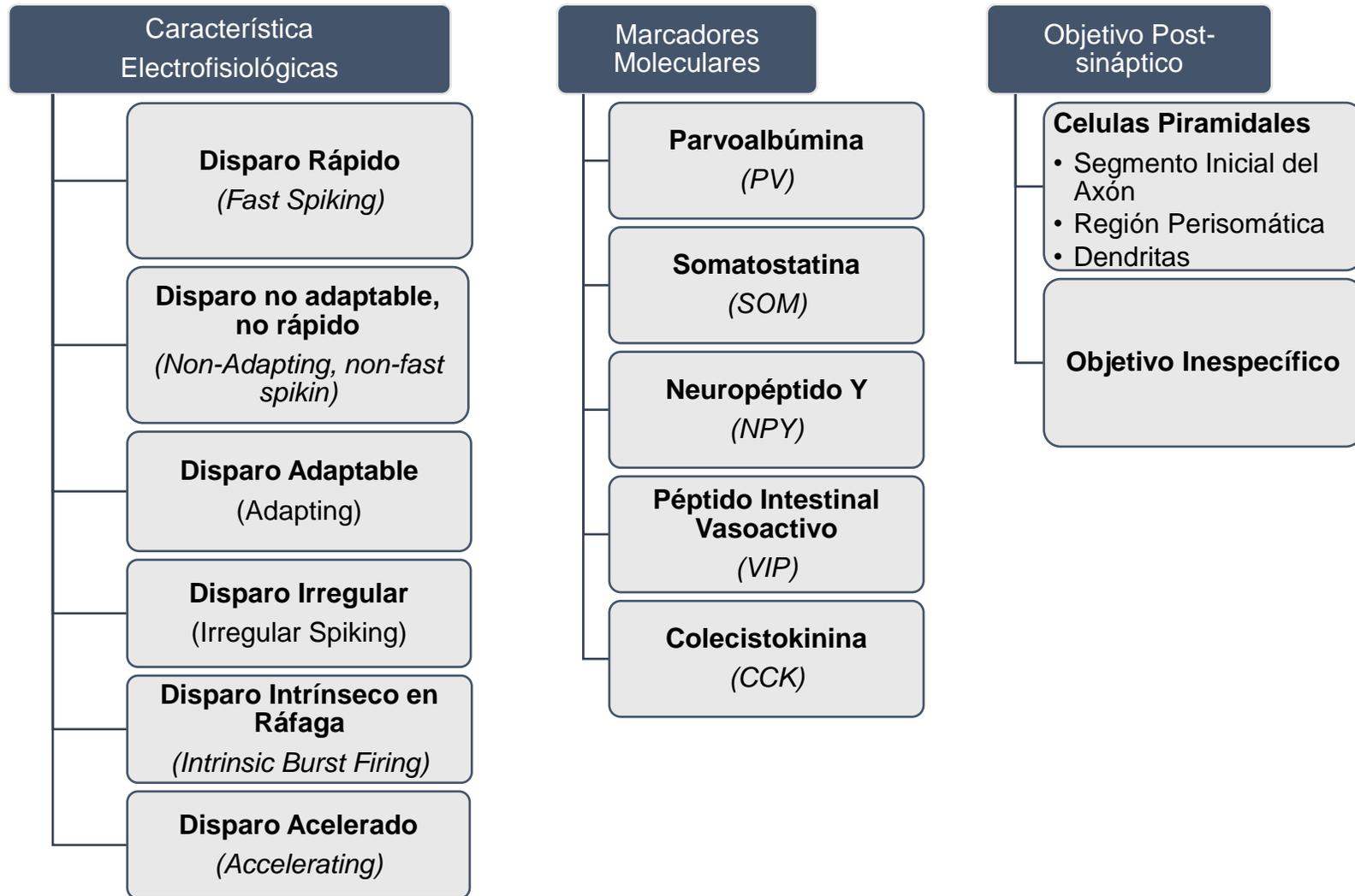
**Células Horizontales de Cajal - Retzius:** Descritas a finales del siglo XIX (Ramón y Cajal, 1891; Retzius, 1893), estas células son las primeras en aparecer durante la neocorticogénesis (Zecevic & Racik, 2001) y su población disminuye considerablemente después del nacimiento, hecho que sumado a su expresión de la proteína de matriz extracelular *Reelina*, ha permitido proponer un rol importante para estas células en la organización laminar de la corteza cerebral (136, 137). Su soma, de morfología aplanada y ovoide se localiza en la lámina I, al igual que sus procesos -axón y dendritas- que se extienden horizontalmente en la lámina I sin abandonarla y hacen contacto sináptico con la dendrita apical de las neuronas piramidales que ascienden hasta esta lámina (137, 138). Molecularmente se distinguen por su inmunoreactividad para calbindina principalmente y una pequeña proporción para parvalbúmina (139).

**Células en Cesta:** Son las más abundantes de las interneuronas, representan aproximadamente el 50% de estas y pueden encontrarse en todas las láminas corticales excepto en la lámina I. Su axón presenta largas colaterales que se distribuyen en la región perisomática de las células piramidales formando nidos o cestos (123,126, 140). A partir de las diferencias en la morfología de su axón y dendritas se han descrito tres tipos principales de células en cesta, *Células en Cesta Pequeñas* (15 – 20  $\mu\text{m}$ ), *Células en Cesta Grandes* (30 – 49  $\mu\text{m}$ ) (Marín Padilla, 1969) y *Células en Cesta Nido - Nest Basket Cells* (Wang y Col., 2002) (141, 142).

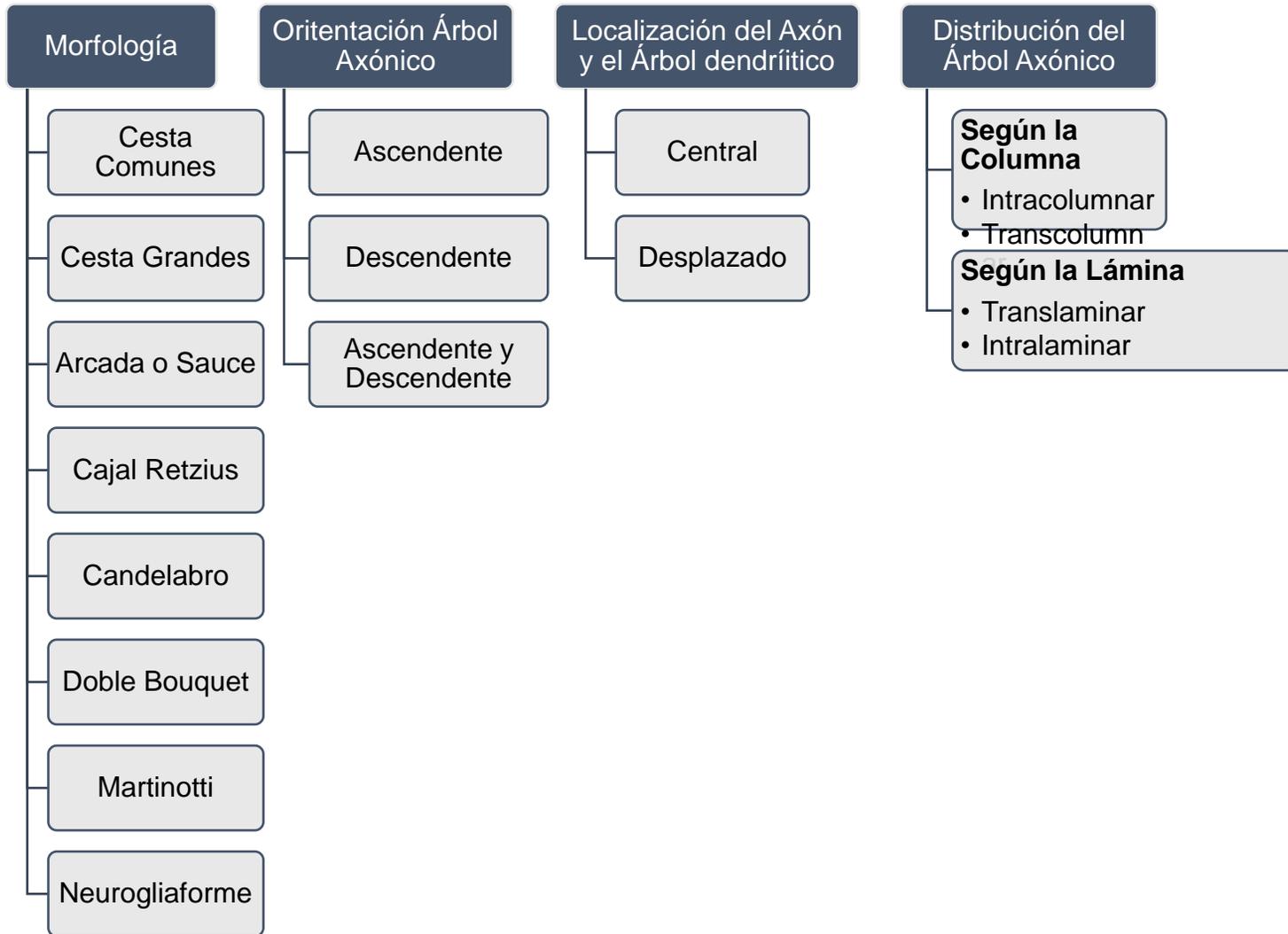
Son células multipolares, sus dendritas no poseen espinas y tienen un axón muy ramificado en sentido horizontal y vertical, que en el caso de las células en cesta grandes puede prolongarse hasta 900-1000 $\mu\text{m}$  desde el pericarión por lo que su acción es translaminar y transcolumnar (129). Las células en cesta son inmunoreactivas para CB y PV, además de expresar distintos neuropéptidos como CCK, NPY, SOM y VIP), según su patrón de disparo se ha descrito un subgrupo inmunoreactivo para PV y de disparo rápido y otro inmunoreactivo para CCK y de disparo no rápido (143, 144, 145). Se ha propuesto que la inhibición perisomática de las células en cesta sumado a su profusa arborización les permiten regular la actividad sincronizada y oscilatoria de grandes grupos de neuronas piramidales (Freund & Katona, 2007).

**Células en Candelabro:** Las ramas terminales de los axones de estas células forman botones sinápticos dispuestos en hileras verticales -candiles- por lo que han sido llamadas de esta forma (146).

**Figura 2. Clasificación de Interneuronas Gabaérgicas – Características Fisiológicas.**



**Figura 3. Clasificación de Interneuronas Gabaérgicas – Características Morfológicas.**



Su morfología puede ser bipolar o bipenachada y se localizan principalmente en las láminas II y III, aunque también se han descrito en las láminas Vb y VI. Ejercen su acción exclusivamente sobre el segmento proximal del axón de las neuronas piramidales por lo que se las denomina axo-axónicas (Somogyi, 1977, 1982) (147, 148). Las células en candelabro son inmunoreactivas principalmente para PV y en menor proporción para CB, se ha documentado además que expresan el factor liberador de corticotropina y eléctricamente su patrón de disparo es rápido (146, 149-150). Funcionalmente se ha descrito actividad tanto inhibitoria como excitatoria (Szabadics y Col., 2006; Spampanato y Col., 2016) (151) y se cree que tienen un papel importante en la prevención de la excitación excesiva en las redes neuronales (Zhu y Col., 2004) (152).

***Células en Doble Bouquet o Bipenachada:*** Estas células de peculiar morfología han recibido también el nombre de neuronas tipo 3 (Jones, 1975;) o cola de caballo (Szentagothai, 1973) (153). Su soma, de localización usualmente supragranular, es pequeño -entre 12 y 18  $\mu\text{m}$ - de forma ovalada y orientación vertical, su axón se distribuye verticalmente, perpendicular a la pía madre, desde la lámina II a la lámina VI, formando haces compactos, y sus colaterales tienen múltiples varicosidades (Valverde, 1978) (154, 155). Su blanco sináptico son las dendritas apicales o basales de las células piramidales (Somogyi & Cowey, 1981) y parecen influir sobre el flujo de información interlaminar y en las eferencias corticales. Su disparo eléctrico es adaptable, de espigas regulares o en ráfaga, son inmunoreactivas para CB o CR y además co-expresan VIP y CCK (123, 156).

**Células Bipolares:** En ocasiones confundidas con las células en doble bouquet, se diferencian de estas por tener un pericarión más pequeño -entre 10 y 12  $\mu\text{m}$ - y procesos dendríticos más largos y dispersos (Peters & Kimerer, 1981) (157). Se ubican en las láminas II a VI con predominio infragranular, su soma es ovoide o en forma de huso y con una dendrita que emerge de cada extremo de este, que luego se ramifica atravesando la corteza cerebral desde la lámina I hasta la VI y un axón que típicamente nace del segmento proximal de una dendrita. Sus contactos sinápticos se realizan sobre dendritas basales de neuronas piramidales, que pueden ser excitatorias o inhibitorias y reciben aferencias excitatorias de fibras talamocorticales y colaterales recurrentes de neuronas piramidales profundas. Su patrón de disparo es adaptable, de espigas regulares o en ráfaga, molecularmente son inmunoreactivas para CR y co-expresan VIP (Connor & Peters, 1984) (129, 140, 158, 159).

**Células de Martinotti:** Descritas por primera vez en 1889 por Carlo Martinotti, fue Ramón y Cajal quien las nombraría en reconocimiento a él (Ramón y Cajal, 1891). La Células de Martinotti se distribuyen de forma ubicua en la corteza cerebral y representan alrededor del 15% de la población de las interneuronas, tienen morfología casi siempre bipolar -alrededor del 90%- pero también se encuentran algunas multipolares. Su soma, ovoide o en forma de huso, puede encontrarse en las láminas II a VI, aunque son más frecuentes en las láminas II/III (123, 129) y su arborización dendrítica es la más extensa entre las interneuronas, sin embargo, su característica morfológica más particular es que sin importar en que lámina se encuentre su soma, su axón apical siempre asciende hasta la lámina I donde se

extiende en sentido horizontal hasta 2000  $\mu\text{m}$  (Wang y Col., 2004) (160). Hacen contacto sináptico sobre las dendritas apicales de las neuronas piramidales y con menor frecuencia en las dendritas de otras interneuronas, además, se han descrito contactos sinápticos de tipo eléctrico entre ellas (Hestrin & Galarreta, 2005) (161). Su patrón de disparo es adaptable, de espigas regulares o en ráfaga, molecularmente se caracterizan por su inmunoreactividad para somatostatina (SOM) y los patrones de co-expresión más frecuentes son SOM + CB, SOM + NPY y SOM + CCK (160, 162). Funcionalmente median la inhibición disináptica (Silberberg & Markram, 2007) entre neuronas piramidales vecinas en las láminas II/III y V (163) y se ha reconocido su importancia para determinar la velocidad de procesamiento cortical (Krishnamurthy y Col., 2012) (164).

**Células Neurogliaformes:** Por su tamaño y patrón de arborización, Ramón y Cajal las llamó también células enanas o células aracnoides (Ramón y Cajal, 1904). Estas células se ubican desde la lámina I a la VI, sin embargo, su número es mayor en las láminas infragranulares. Morfológicamente se caracterizan por tener un soma pequeño y redondeado, que da lugar a múltiples procesos cortos y finos. Su árbol dendrítico se distribuye de forma radial en un diámetro de 100 a 200  $\mu\text{m}$  alrededor del soma lo que les da su apariencia esférica característica, su axón, también fino y con múltiples ramificaciones, puede nacer desde el segmento proximal de una dendrita o cualquier lugar del soma y alejarse hasta a 400  $\mu\text{m}$  de este (123, 129). Hacen contacto sináptico sobre las dendritas tanto de interneuronas como de células piramidales, en la lámina IV contactan el soma y las dendritas de las neuronas estrelladas espinosas por lo que se les ha involucrado en la modulación

de las aferencias tálamo corticales (173). Además de las sinapsis químicas, las neuronas neurogliaformes establecen contactos sinápticos de tipo eléctrico no solo entre ellas sino también con otras interneuronas, el contacto sináptico con las células piramidales es de tipo químico (Simons y Col., 2005; Zsiros & MacCaferrri, 2005) (174, 175). Eléctricamente pertenecen a la categoría de espiga tardía y desencadenan potenciales postsinápticos inhibitorios lentos (Oláh y Col., 2007) (176, 177), su patrón de disparo es adaptable, de espigas regulares o en ráfaga. Molecularmente se distinguen por su inmunoreactividad para CB y la presencia de Acetil-Colin Transferasa, NPY y óxido nítrico (178, 179).

### 3. JUSTIFICACIÓN

El estudio del diseño de los seres vivos sugiere que existe una muy estrecha relación entre la estructura y la función, bien sea que la estructura determine la función o viceversa. (180, 181). En el marco teórico se ha establecido que las áreas 10 y 24 de la corteza cerebral prefrontal humana están involucradas, entre otras, en las funciones mentales superiores y la regulación del comportamiento social y emocional, además, que el principal sustrato para el desarrollo de estas funciones son las neuronas y las conexiones que se establecen entre ellas. En este sentido, el estudio de la organización celular, tanto de neuronas piramidales como de interneuronas de la corteza prefrontal, se hace necesario en la medida en que da respuesta a la organización de la estructura y es útil como punto de partida para explorar el funcionamiento cerebral.

Desde las primeras descripciones de interneuronas hechas por Santiago Ramón y Cajal a principios del siglo XX hasta hoy, nuestro conocimiento sobre ellas ha crecido exponencialmente. Aunque, hay muchos aspectos que aún escapan a nuestra comprensión sobre esta población celular, sabemos ahora que son muy importantes para el funcionamiento normal del cerebro, además, alteraciones morfológicas y funcionales de estas células son fundamentales en la fisiopatología de enfermedades neurológicas y psiquiátricas.

Entre los aspectos de la organización celular de la corteza prefrontal humana, uno de los menos documentados es la organización citoarquitectónica de las interneuronas gabaérgicas de las láminas infragranulares en el tejido cerebral sano.

Este trabajo pretende sumar información a nuestro conocimiento sobre las características citomorfológicas de las interneuronas de la lámina VI de las áreas 10o y 24 de la corteza prefrontal humana, con la intención de que dicho conocimiento permita plantear la distribución de los circuitos y por ende las funciones de la misma, además, de proporcionar un patrón de referencia sobre la organización normal de esta población celular que permita una mejor interpretación de los hallazgos derivados del tejido cerebral de pacientes con enfermedades mentales o neurológicas.

## **4. OBJETIVOS**

### **4.1 Objetivo General**

Describir las características morfológicas de las interneuronas de la lámina VI de las áreas 10o y 24a de la Corteza Prefrontal Humana.

### **4.2 Objetivos Específicos**

- a) Cuantificar las subpoblaciones de interneuronas inmunoreactivas para, Calbindina (CB), Calretinina (CR) y Parvoalbúmina (PV) en la lámina VI de las áreas 10o y 24a de la Corteza Prefrontal Humana.
- b) Establecer el tamaño, forma del soma, número de procesos primarios en las neuronas de la lámina VI identificadas con anticuerpos Anti-CB, Anti-CR y Anti-PV en la lámina VI de las áreas 10o y 24a de la Corteza Prefrontal Humana.
- c) Determinar si hay diferencias estadísticamente significativas en la distribución de las interneuronas inmunoreactivas para CB, CR y PV en la lámina VI entre las áreas 10o y 24a de un mismo hemisferio
- d) Determinar si existen diferencias estadísticamente significativas en la densidad y características morfológicas de las subpoblaciones identificadas entre los dos hemisferios cerebrales en la lámina VI de las áreas 10o y 24a de la Corteza Prefrontal Humana.

## 5. MATERIALES Y MÉTODOS

### 5.1 Origen del Tejido Cerebral

El tejido cerebral utilizado en este estudio fue obtenido *post-mortem* de 5 sujetos humanos a través de un convenio interinstitucional entre el Grupo Centro de Estudios Cerebrales y el Instituto Nacional de Medicina Legal y Ciencias Forenses, regional Bogotá. A través del convenio se obtuvieron 10 cerebros de personas sin antecedente de enfermedad neurológica o psiquiátrica y que no presentaron signos de trauma craneoencefálico o edema cerebral, de entre los cuales fueron seleccionados los 5 sujetos incluidos en el presente estudio. En la **tabla 1** se resumen la edad, sexo, el mecanismo de lesión que ocasionó la muerte y el tiempo transcurrido (en horas) desde la hora de la muerte hasta la obtención de la muestra.

**Tabla 1.** Características de los sujetos estudiados

<b>Sujeto</b>	<b>Sexo</b>	<b>Edad (años)</b>	<b>IPM (horas)</b>	<b>Mecanismo de Lesión</b>
<b>C3</b>	M	52	20	Herida por arma de fuego en abdomen
<b>C5</b>	M	37	18	Politraumatismo
<b>C9</b>	M	45	15	Herida Precordial
<b>C10</b>	M	47	23	Politraumatismo
<b>C11</b>	M	26	13	Herida por arma cortopunzante en región precordial

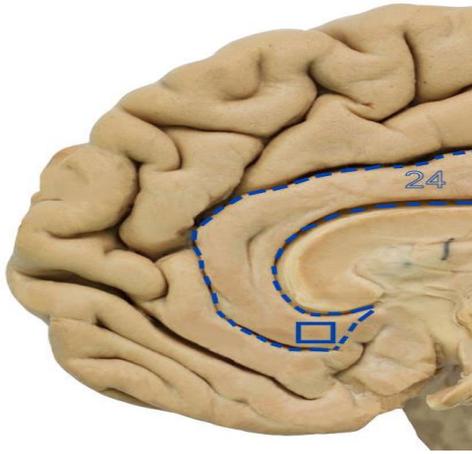
*IPM: Intervalo entre la hora de muerte y la obtención de la muestra. M: Masculino*

## 5.2 Localización de las áreas 10o y 24 y toma de muestras

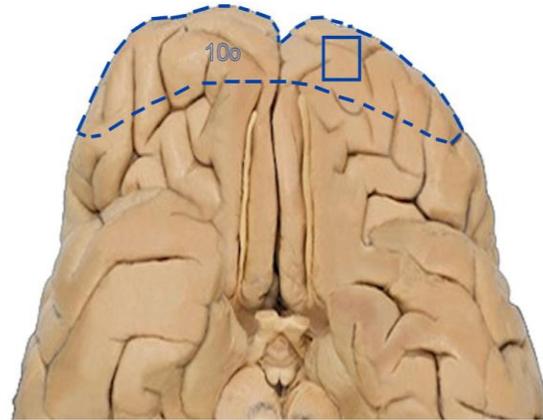
Luego de identificar el polo frontal y las superficies dorsolateral, orbital y medial del lóbulo frontal en ambos hemisferios, se localizaron las áreas 10o (10 orbital) y 24 teniendo en cuenta los criterios de localización topográfica y subdivisión citoarquitectónica propuestos por Öngür y Price en el 2013 (20), **figura 4**. Luego de localizada el área de interés, se realizaron cortes perpendiculares a la superficie cortical para la obtención de las muestras, en todos los casos el corte se hizo sobre las crestas de los giros corticales hasta la sustancia blanca subyacente, extrayendo bloques de 1 cm<sup>3</sup>, los bloques obtenidos se sumergieron durante 10 minutos en solución salina al 10% para remover el exceso de sangre y posteriormente se depositaron en recipientes individuales con una mezcla de paraformaldehído, lisina y meta periodato de sodio, con pH de 7,4 a 4°C para su fijación por un período de 10 días. Posteriormente, a los bloques de 1 cm<sup>3</sup> de tejido cerebral se le realizaron cortes de 50 µm de espesor en sentido coronal utilizando un vibrátomo (Lancer Vibratome Series 1000®), a los primeros cortes de cada bloque se les realizó una tinción rápida con azul de toluidina para comprobar la adecuada orientación del corte y la integridad del tejido. En cada uno de los 5 cerebros estudiados se tomaron muestras de las áreas 10o y 24 de ambos hemisferios, de cada muestra se obtuvieron tres cortes para procesamiento simultáneo procurando así homogeneidad en el procesamiento de los mismos.

**Figura 4. Localización macroscópica de las áreas 24 y 10o.**

**A.**



**B.**



*Superficie medial (A) y orbital (B) de la corteza frontal humana, los recuadros representan la ubicación de la cual fueron tomadas las muestras de las áreas 24 y 10o.*

### **5.3 Procedimiento inmunohistoquímico**

Las series de cortes consecutivos de cada área cortical en cada hemisferio se sometieron al siguiente proceso:

1. Inmersión en solución de metanol absoluto al 30% y peróxido de hidrógeno al 0,3% durante 12 minutos para evitar la actividad de la peroxidasa endógena.
2. Lavado con solución PBS (Phosphate Buffer Saline, con pH de 7,4) 3 veces, por 5 minutos cada vez.
3. Inmersión en suero normal de caballo al 1,5% (Vectastain Elite ABC – Elite PK – 6102 Mouse IgG, Vector Laboratories ®) en PBS, durante 40 minutos para bloquear la adhesión a antígenos inespecíficos.

4. Lavado con solución PBS (Phosphate Buffer Saline, con pH de 7,4) 3 veces, por 5 minutos cada vez.
5. Incubación del tejido por 18 horas en los anticuerpos primarios, los cuales fueron diluidos en PBS con Tritón X-100 al 0,5% así:
  - a. Anti-NeuN (Monoclonal Antineuronal Nuclei, Chemicon International – MAB377®) – dilución 1:2500: este anticuerpo reconoce antígenos específicos presentes en las células neuronales, proporciona una marcación selectiva de los núcleos y somas de dichas células (Mullen y Col., 1992) (27). La proteína NeuN (*Neuronal Nuclei*), es una proteína asociada al ADN nuclear de las neuronas y su patrón de inmunoreactividad permite caracterizar la morfología celular y la disposición laminar de la corteza cerebral.
  - b. Anti-Parvoalbúmina (Monoclonal Anti-Parvalbumin antibody, Sigma St. Louis – PARV-19 P-3088) – dilución 1:5000: Anticuerpo dirigido contra la proteína atrapadora de calcio parvoalbúmina, la cual permite la identificación de cierto subtipo de interneuronas como células en cesta o en candelabro (DeFelipe, 1993; Hof y Col., 1999) (94, 182).
  - c. Anti-Calbindina (Policlonal Anti-Calbindin antibody, Sigma St. Louis – Clon CB-955. G9848) – dilución 1:5000: Dirigido contra la proteína atrapadora de calcio Calbindina, expresada por células en doble bouquet y candelabro (DeFelipe, 1993; Hof y Col., 1999) (94, 182).
  - d. Anti-Calretinina (Policlonal Anti-Calretinin antibody, Chemicon International – clon AB-149) – dilución 1:500: Dirigido contra la

proteína atrapadora de calcio Calretinina, expresada por células bipolares, doublé bouquet DeFelipe, 1993; Hof y Col., 1999) (94, 182).

6. Lavado con solución PBS (Phosphate Buffer Saline, con pH de 7,4) 3 veces, por 5 minutos cada vez.
7. Incubación en el anticuerpo secundario biotinilado -dilución 1:200- (Kit ABC Vectastain – Elite PK – 6102 Mouse IgG, Vector Laboratories ®) durante 40 minutos.
8. Lavado con solución PBS (Phosphate Buffer Saline, con pH de 7,4) 3 veces, por 5 minutos cada vez.
9. Inmersión en la solución Avidina-Biotina-HRP (Kit ABC Vectastain – Elite PK – 6102 Mouse IgG, Vector Laboratories®) durante 40 minutos.
10. Lavado con solución PBS (Phosphate Buffer Saline, con pH de 7,4) 3 veces, por 5 minutos cada vez.
11. Incubación en una solución con Diaminobencidina al 4%, peróxido de hidrógeno al 2% y níquel al 2% en PBS (Kit Peroxidase Substrate; DAB sk-4100, Vector Laboratories ®) durante 8 minutos.

Una vez completado el proceso, el tejido se montó sobre placas de vidrio cromoaluminadas, secadas a temperatura ambiente y posteriormente deshidratadas progresivamente por inmersión en alcoholes y xiloles con diferentes concentraciones. Finalmente, el tejido fue cubierto con un medio de montaje histológico (Fisher Permount Mounting Media®) y laminillas cubreobjetos. El procedimiento antes descrito se realizó en el laboratorio de inmunohistoquímica del departamento de morfología con una temperatura 25°C.

Las placas histológicas, que contenían cada una tres cortes del tejido procesado, fueron observadas con un microscopio de luz convencional (Olympus CH2 – CHS®) con el objetivo de 10x y se escogieron para su estudio aquellas en las que se comprobó que el tejido tuviera una marcación homogénea, pocos accidentes anatómicos (vasos sanguíneos) y que no hubiera sobreexposición del agente revelador.

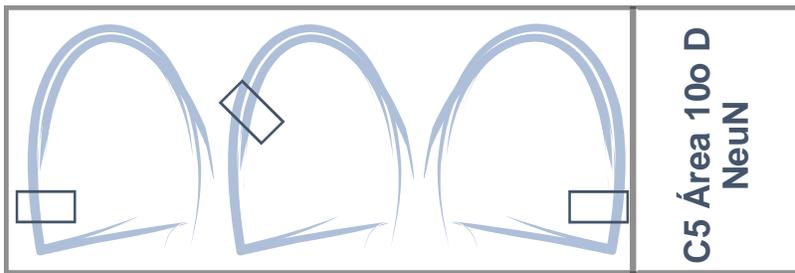
#### **5.4 Registro Fotográfico**

Se hizo un registro fotográfico de las placas histológicas con una cámara digital (Power Shot A85 Canon ®) acoplada a un microscopio de luz (Olympus CH2 – CHS®) con objetivo de 10x y con la cámara digital Axio Cam HRc Zeiss® acoplada a un microscopio de fluorescencia (Axio Scope A1 Zeiss) con objetivo de 40x. En el caso de las fotografías tomadas a 10x primero se seleccionó un segmento de cada corte de tejido cerebral en la placa, después, en cada segmento se tomaron fotos consecutivas en sentido vertical desde la superficie pial hasta la sustancia blanca, finalmente, se hizo una fusión de la sucesión de fotografías con la asistencia del programa PhotoStitch (versión 3.11, Canon 2000®) de forma tal que se obtuvo una reconstrucción digital de un segmento completo de la corteza cerebral, **figura 5**. Para cada uno de los 5 sujetos incluidos en el estudio se hicieron 3 registros fotográficos por cada anticuerpo (NeuN, CB, CR, PV) en ambos hemisferios.

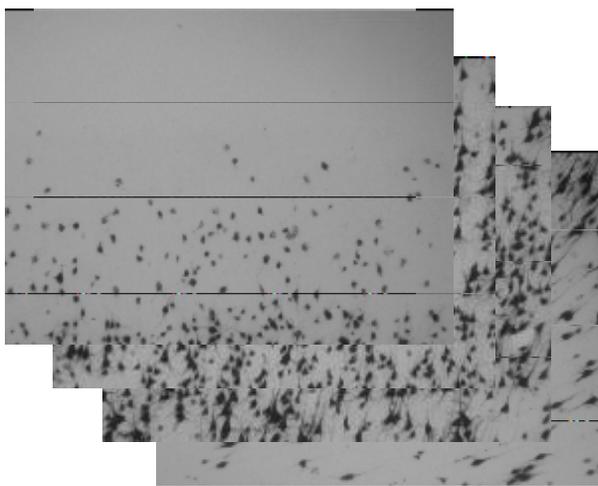
### 5.4.1 Análisis de Imágenes

En las reconstrucciones digitales a 10x de las placas histológicas se realizó la medición de espesor cortical total y espesor laminar (marcación NeuN) y la cuantificación de los somas neuronales (marcación para proteínas atrapadoras de calcio CB, CR y PV). En las imágenes capturadas con el objetivo de 40x se obtuvieron las mediciones del tamaño neuronal y se describieron la forma y número de procesos de las neuronas.

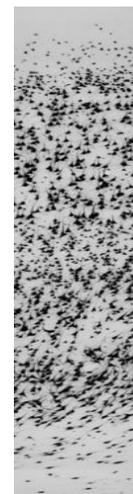
**Figura 5. Ilustración de una placa histológica**



*Representación de placa histológica con tres cortes de tejido cerebral, los recuadros en cada sección representan el segmento en que se haría el registro fotográfico.*



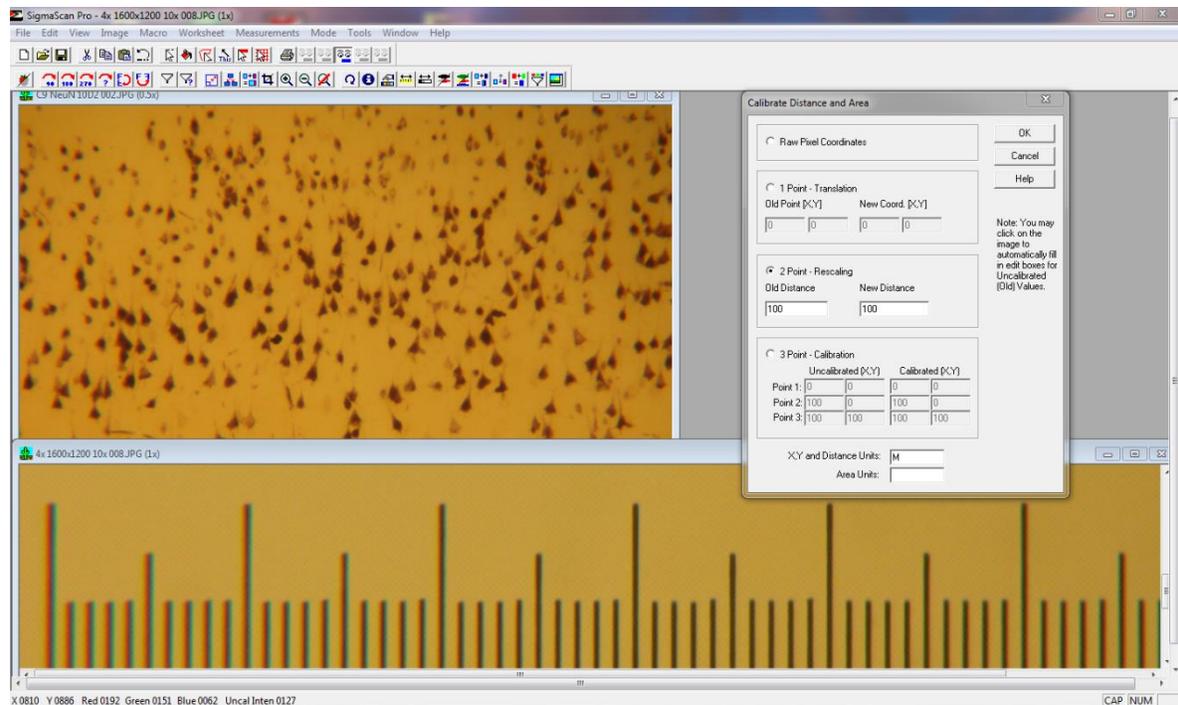
*Fotos consecutivas, objetivo 10x.*



*Fusión de las fotografías*

El análisis morfométrico sobre las micrografías se hizo con la asistencia del programa Sigma Scan-Pro 5 (SPSS Sciencie, 2000®), previo al análisis la herramienta de medición del programa fue calibrada a partir de la medición de una distancia conocida, imágenes de un micrómetro de portaobjetos -Stage micrometer objective NIKON®, type A, MBM 11100- tomadas en las mismas condiciones de las micrografías estudiadas, **Figura 6**.

**Figura 6. Calibración de la herramienta de medida**



*Calibración de la herramienta de medida con la ayuda de una distancia conocida, reglilla en la porción inferior de la imagen.*

A continuación, se describen las variables morfométricas consideradas:

- a. *Espesor Cortical Total*: Distancia comprendida entre la porción superficial de la lámina I y el límite entre la lámina VI y la sustancia blanca subcortical, en cada micrografía se realizaron tres mediciones, en el extremo izquierdo,

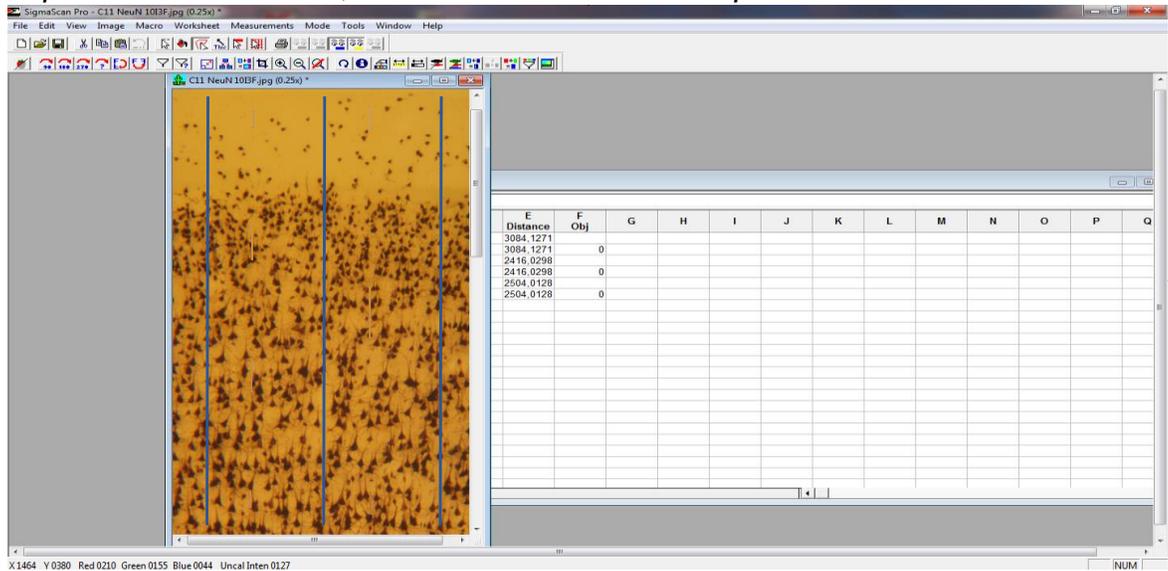
centro y extremo derecho de la imagen. Esta medición se hizo en las micrografías con la marcación para NeuN a 10X, **figura 7A**.

- b. *Espesor Laminar*: Los límites entre las láminas corticales se establecieron identificando los cambios en la forma y densidad celular en cada lámina. En cada micrografía se realizaron tres mediciones, en el extremo izquierdo, centro y extremo derecho de la imagen. Esta medición se hizo en las micrografías con la marcación para NeuN a 10X, **figura 7B**. Para cada uno de los 5 sujetos se hicieron 3 registros fotográficos, 3 medidas repetidas en cada registro para cada una de las 6 láminas en los 2 hemisferios para un total de 540 observaciones.
- c. *Número de Neuronas*: se contó el número de somas neuronales que hubiera en una cuadrícula de conteo de 300  $\mu\text{m}$  de ancho por 100  $\mu\text{m}$  de alto ubicado en el centro de cada lámina cortical. Esta medición se hizo en las micrografías con las neuronas inmunoreactivas para las proteínas atrapadoras de calcio CB, CR y PV a 10X, **figura 8**. Para cada uno de los 5 sujetos se hicieron 3 registros fotográficos por cada uno de los 3 anticuerpos y los 2 hemisferios para un total de 90 observaciones
- d. *Tamaño del soma y número de procesos*: se midió el área del pericarión en dos dimensiones en todas las neuronas contabilizadas, adicionalmente se cuantificó el número de procesos primarios originados desde el soma de cada interneurona. Estos parámetros se evaluaron en las micrografías de las placas histológicas con marcación para las proteínas atrapadoras de calcio a 40X, **figura 9**. Las técnicas de inmunohistoquímica utilizadas no permiten distinguir entre dendritas y axones. Adicionalmente al tamaño del soma el

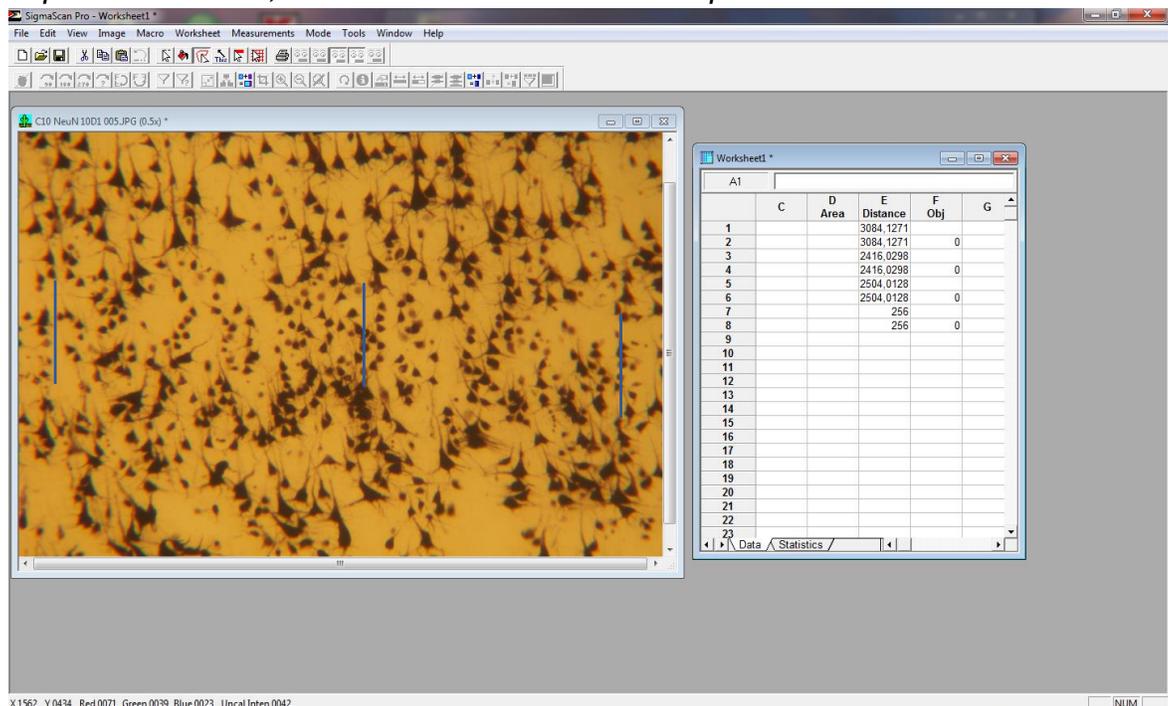
programa utilizado para el estudio morfométrico (Sigma Scan-Pro 5 - SPSS Science, 2000®) calculaba de forma automática el grado de esfericidad del área medida -*shape factor*-.

**Figura 7.** Medición del espesor cortical total y el espesor laminar, asistencia del programa SigmaScan Pro 5 (SPSS Science, 2000®).

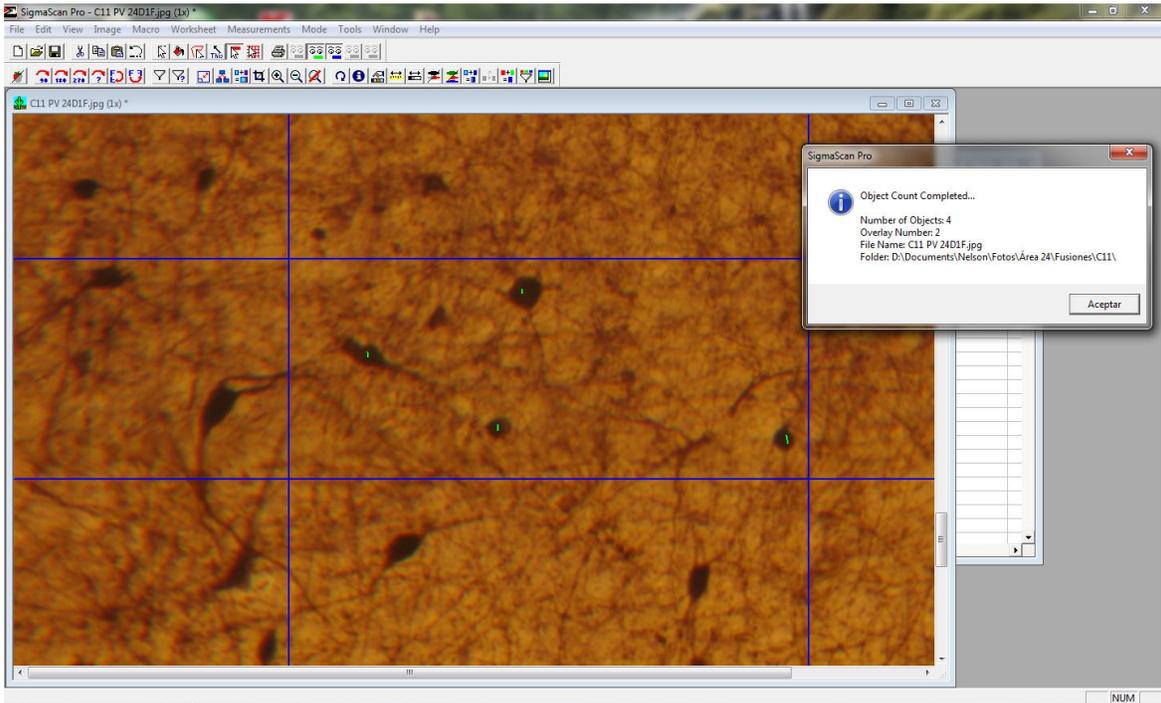
**A.** *Espesor cortical total, cada línea vertical representa una medida.*



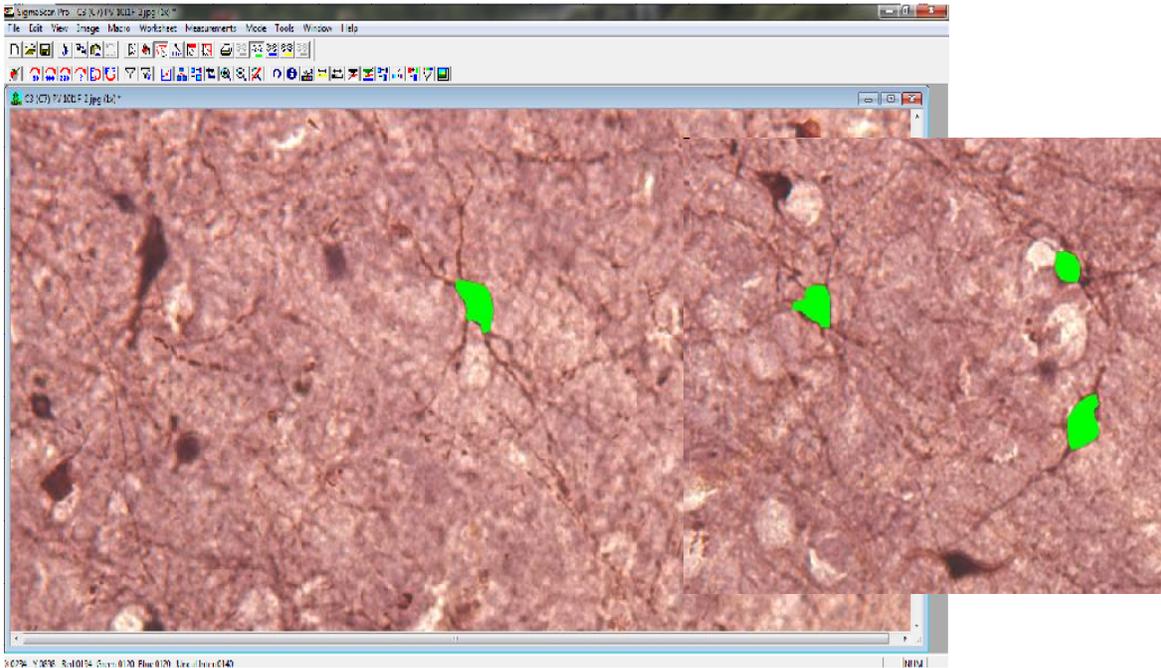
**B.** *Espesor laminar, cada línea vertical representa una medida.*



**Figura 8.** *Conteo neuronal en campo de 100 x 300  $\mu$ m, micrografía a 10X, neuronas inmunoreactivas para PV.*



**Figura 9.** *Medición del área neuronal y cuantificación del número de procesos, micrografía a 40X, neuronas inmunoreactivas para PV.*



## 5.5 Análisis Estadístico

En la **tabla 2** se resumen las variables consideradas en el estudio, el análisis estadístico de estas variables se hizo con la asistencia del programa GraphPad Prism Versión 4.0 (©2016 GraphPad Software, Inc.). Las variables cuantitativas continuas se presentan mediante la media y su respectiva desviación estándar, las variables cuantitativas discretas se presentan mediante la mediana y su intervalo de confianza al 95%.

**Tabla 2. Variables en estudio**

<b>Variable</b>	<b>Definición</b>	<b>Tipo</b>	<b>Unidad de Medida</b>
<i>Espesor Cortical Total</i>	Distancia comprendida entre la porción superficial de la lámina I y el límite entre la lámina VI y la sustancia blanca subcortical	Cuantitativa Continua	μm
<i>Espesor Laminar</i>	límites entre las láminas corticales establecidos según los cambios en la forma y densidad celular en cada lámina.	Cuantitativa Continua	μm
<i>Espesor Laminar Relativo</i>	Proporción de espesor laminar respecto al espesor cortical total	Cuantitativa Continua	Porcentaje
<i>Población Neuronal</i>	Número de neuronas cuantificadas para cada inmunomarcador	Cuantitativa Discreta	# Neuronas
<i>Densidad Neuronal</i>	Número de neuronas cuantificadas en una cuadrícula de 100 x 300 μm dividido entre 0.03	Cuantitativa Continua	# Neuronas/μm <sup>2</sup>
<i>Tamaño del Soma</i>	Área del pericarión de la célula delimitado en una imagen bidimensional	Cuantitativa Continua	μm <sup>2</sup>
<i>Número de Procesos</i>	Procesos originados del soma de la neurona	Cuantitativa Discreta	# Procesos
<i>Grado de esfericidad</i>	Indicador cuantitativo de la forma del soma neuronal, dado por la relación entre su área y su perímetro según la fórmula: $\frac{4\pi \times \text{Área del Soma}}{\text{Perímetro del Soma}}$ Un valor de 1 representa una forma completamente circular y un valor de 0 una línea recta.	Cuantitativa continua	-----

Para el análisis inferencial de los datos se realizaron pruebas de normalidad (Shapiro Wilk Test), de acuerdo a los resultados de dichas pruebas se utilizó una prueba t de student o U de Mann Whitney para el análisis bivariado a dos colas, se estableció un nivel de significancia en 0,05. En el análisis bivariado se hicieron comparaciones entre ambos hemisferios para una misma área cortical y entre áreas corticales, para las características citomorfológicas (tamaño del soma, número de procesos primarios, grado de esfericidad) se compararon las tres subpoblaciones neuronales entre hemisferios para una misma área cortical y entre áreas corticales. Después del análisis bivariado se evaluó la relación entre variables con el fin de clasificar la población de interneuronas de acuerdo a sus características morfológicas la marcación inmunohistoquímica, para lo cual se hizo un análisis de conglomerado jerárquico de promedio entre grupos con la asistencia del programa NCSS versión 11.0 (Statistical Software, LLC. Kaysville, Utah, USA), además, un modelo de regresión lineal para evaluar la relación entre variables morfológicas.

## **5.6 Consideraciones Éticas**

La presente investigación hace parte del proyecto ***“Organización Citoarquitectónica de la Lámina II en la Corteza Prefrontal Humana”***, el cual fue sometido al Comité de Ética Humana de la Facultad de Salud de la Universidad del Valle y cuenta con el aval del mismo. El riesgo potencial de este trabajo sería la pérdida de la privacidad de los sujetos incluidos en el estudio, sin embargo, esto no es posible ya que solo se cuenta con los datos sociodemográficos básicos de cada uno de ellos.

## 6. Resultados

### 6.1 Organización Laminar de las áreas 10o y 24

La marcación con el anticuerpo NeuN permitió observar la organización laminar general de las áreas 10o y 24, además, el reconocimiento de neuronas tanto no piramidales (células granulares en la lámina IV del área 10<sup>o</sup>) y piramidales modificadas (en la lámina VI de las áreas 10o y 24). A nivel celular, la marcación con Anti-NeuN es intensa en el núcleo neuronal, mientras que el citoplasma y sus procesos tiene un aspecto más pálido.

En relación a la organización laminar, el área 10o es hexalaminar, con una lámina IV delgada pero claramente distinguible, una lámina III prominente y una lámina V desarrollada en la que es posible distinguir dos subláminas, una superficial con neuronas de soma más pequeño pero mayor densidad neuronal y otra profunda, menos poblada, pero con células de un mayor tamaño, la lámina VI es heterogénea, sus células tienen morfología y tamaño variado, es posible distinguir además neuronas piramidales modificadas de disposición horizontal. Por su parte el área 24 adolece de lámina IV, es un área agranular, la lámina III está menos desarrollada que en el área 10o y su límite con la lámina II es menos preciso, en la transición entre la lámina III y la lámina V es posible apreciar algunas células granulares dispersas, la lámina V está bien desarrollada y al igual que en el área 10o sublaminada, con una mayor densidad en la lámina V superficial que disminuye hacia la transición con la lámina VI, que es densa y con una población neuronal heterogénea, con predominio de neuronas piramidales modificadas cuyos procesos no tienen una orientación específica y un límite claro y regular con la sustancia

blanca subcortical adyacente. De acuerdo a la organización observada con la marcación Anti-NeuN, esta correspondería a la subregión 24a (Braak's, 1979; Palomero-Gallagher y Col., 2008) (68). En las tablas 3 y 4 se resumen los valores de espesor cortical y laminar en ambos hemisferios de las áreas 10o y 24 respectivamente, en las figuras 10 y 11 se observa la organización celular de dichas áreas de acuerdo con la marcación anti-NeuN.

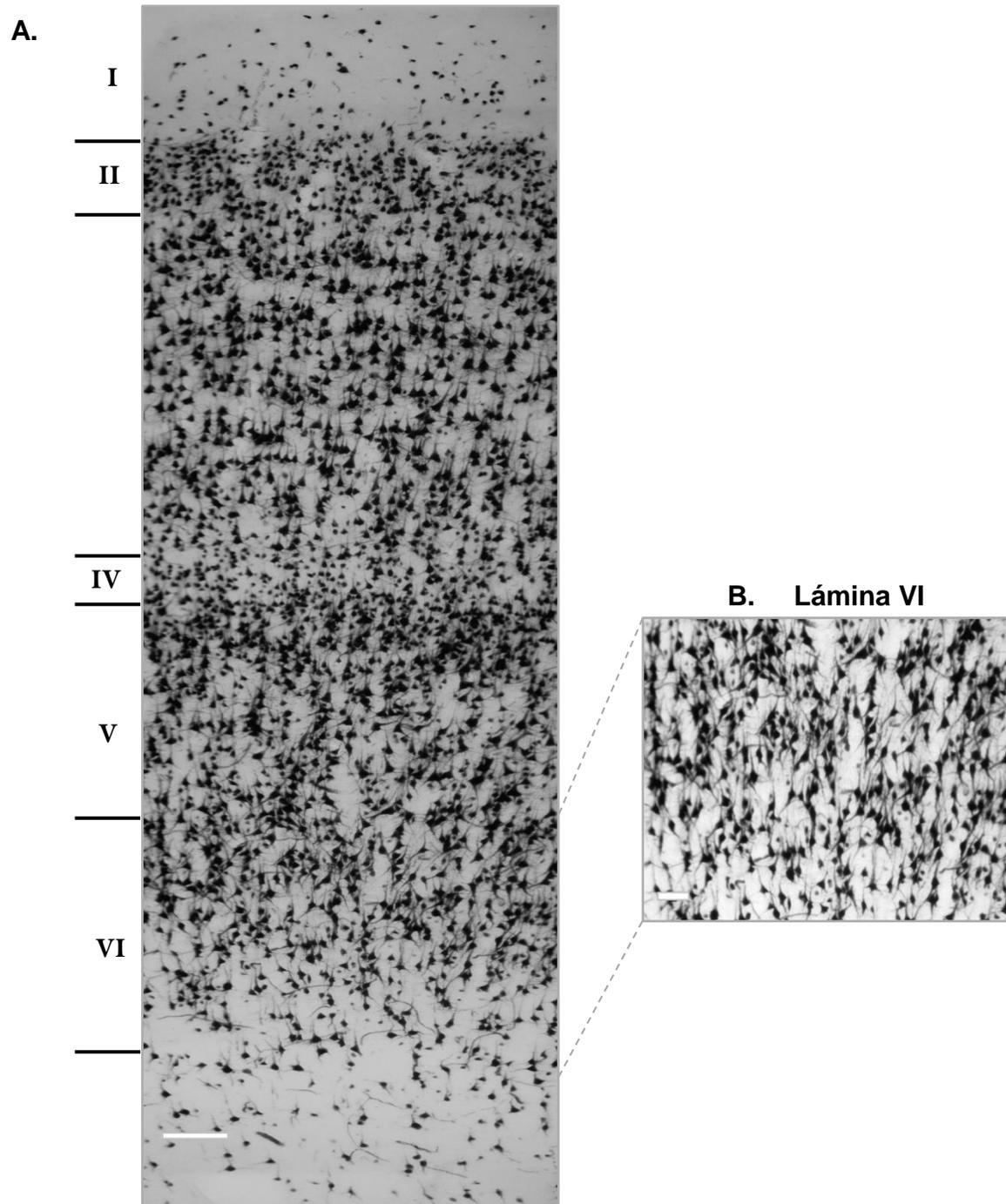
**Tabla 3. Espesor Cortical y Laminar Área 10o.**

<b>Espeor Cortical Total y Laminar Área 10o</b>				
<b>Lámina</b>	<b>Hemisferio Derecho</b>		<b>Hemisferio Izquierdo</b>	
	<b>Espeor Laminar (µm)</b>	<b>Espeor Relativo (%)</b>	<b>Espeor Laminar (µm)</b>	<b>Espeor Relativo (%)</b>
<i>I</i>	287,428 +/- 65,18	13,93 +/- 7,02	282,95 +/- 30,35	12,67 +/- 3,02
<i>II</i>	126,67 +/- 15,77	6,14 +/- 1,69	131,18 +/- 12,99	5,87 +/- 1,29
<i>III</i>	833,48 +/- 139,72	40,41 +/- 15,05	882,62 +/- 88,37	39,51 +/- 8,79
<i>IV</i>	112,33 +/- 16,39	5,44 +/- 1,75	120,92 +/- 18,92	5,41 +/- 1,80
<i>V</i>	352,59 +/- 85,95	17,09 +/- 9,26	400,01 +/- 96,61	17,90 +/- 9,61
<i>VI</i>	350,29 +/- 83,40	16,98 +/- 8,98	416,43 +/- 108,65	18,64 +/- 10,81
<b>Espeor Cortical Total</b>	2157,53 +/- 176,09	100	2254,00 +/- 223,7	100

**Tabla 4. Espesor Cortical y Laminar Área 24.**

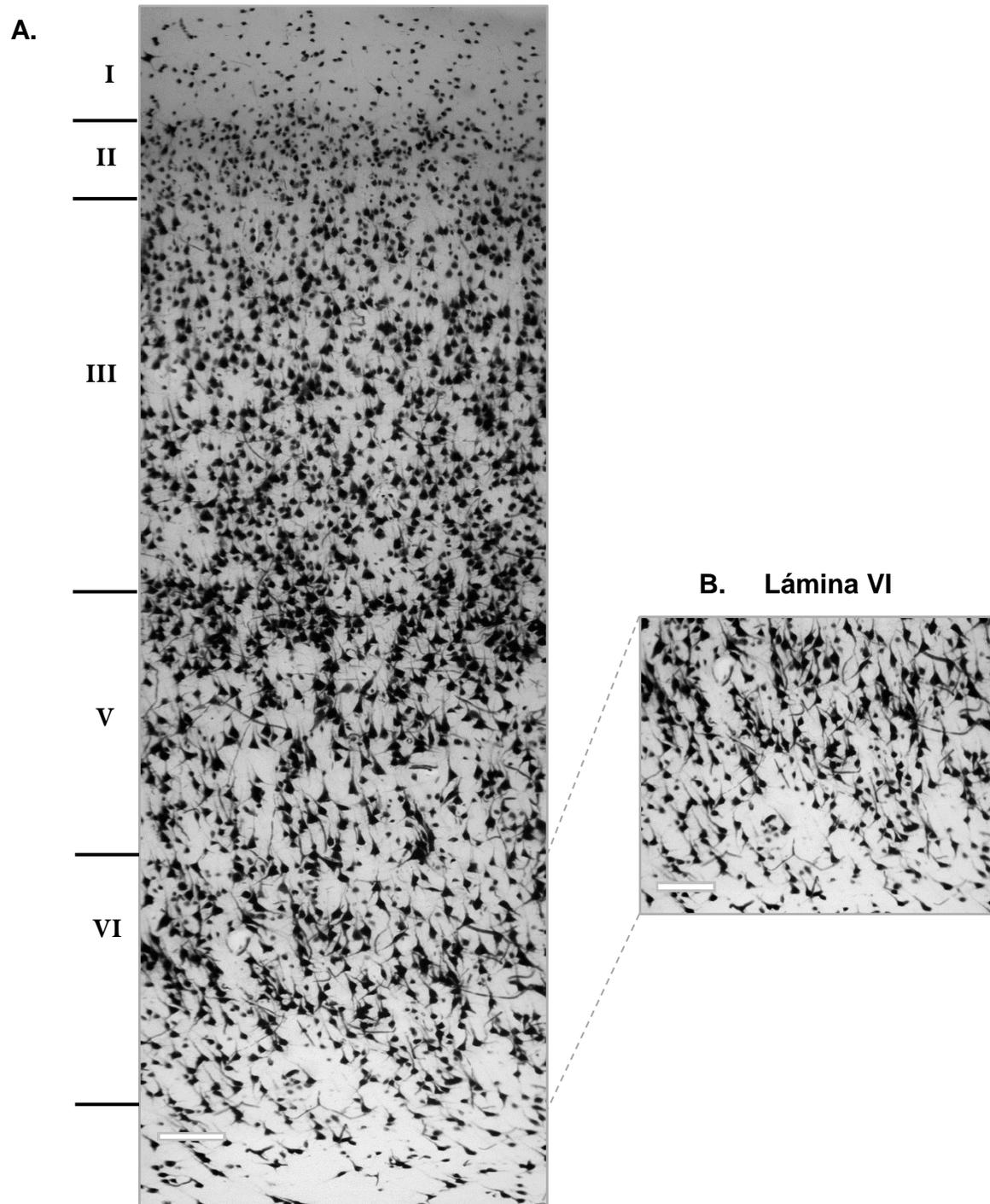
<b>Espeor Cortical Total y Laminar Área 24</b>				
<b>Lámina</b>	<b>Hemisferio Derecho</b>		<b>Hemisferio Izquierdo</b>	
	<b>Espeor Laminar (µm)</b>	<b>Espeor Relativo (%)</b>	<b>Espeor Laminar (µm)</b>	<b>Espeor Relativo (%)</b>
<i>I</i>	325,00 +/- 78,66	11,56 +/- 6,21	293,90 +/- 55,45	10,98 +/- 4,60
<i>II</i>	130,90 +/- 25,30	4,65 +/- 1,99	137,20 +/- 29,73	5,12 +/- 2,47
<i>III</i>	1020,00 +/- 128,30	36,27 +/- 10,14	957,70 +/- 132,70	35,79 +/- 11,02
<i>V</i>	683,30 +/- 128,70	24,30 +/- 10,17	609,90 +/- 78,07	22,80 +/- 6,45
<i>VI</i>	652,90 +/- 101,50	23,22 +/- 8,02	676,90 +/- 64,43	25,30 +/- 5,35
<b>Espeor Cortical Total</b>	2862,00 +/- 126,90	100	2744,00 +/- 202,80	100

**Figura 10. Marcación con Anti-NeuN área 10o, ampliación de la lámina VI.**



Micrografía a 10x, corte coronal desde la superficie pial hasta la sustancia blanca subcortical (A) del área 10o, se señalan los límites entre las láminas (la barra corresponde a 100  $\mu$ m). Ampliación de la lámina VI (B), se observa la heterogeneidad morfológica de las neuronas en dicha lámina (la barra corresponde a 50  $\mu$ m). *Ver texto para descripción.*

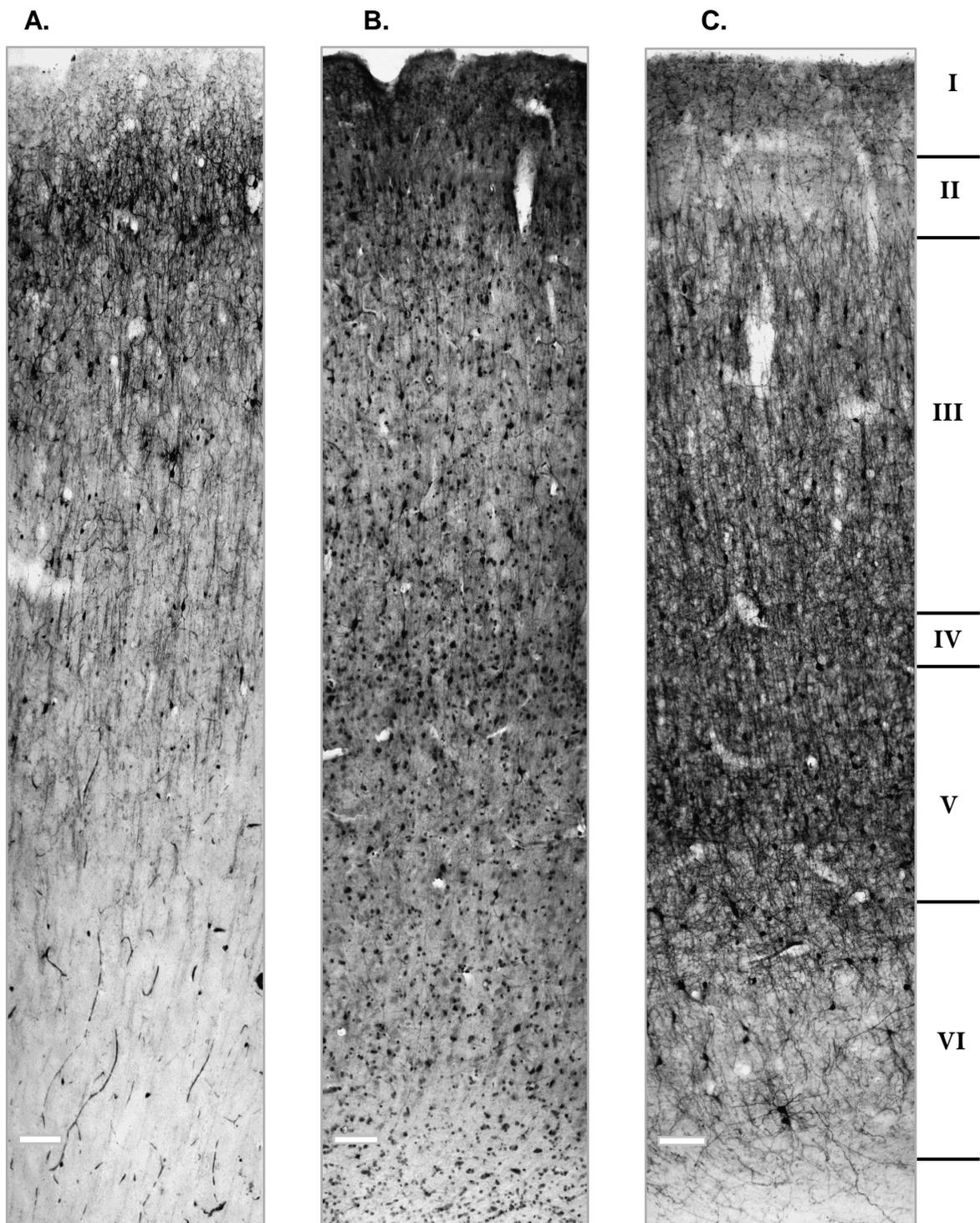
**Figura 11. Marcación con Anti-NeuN área 24, ampliación de la lámina VI.**



Micrografía a 10x, corte coronal desde la superficie pial hasta la sustancia blanca subcortical (A) del área 24, se señalan los límites entre las láminas. Ampliación de la lámina VI (B), se observa la heterogeneidad morfológica de las neuronas en dicha lámina (en ambos casos la barra corresponde a 100  $\mu$ m). *Ver texto para descripción.*

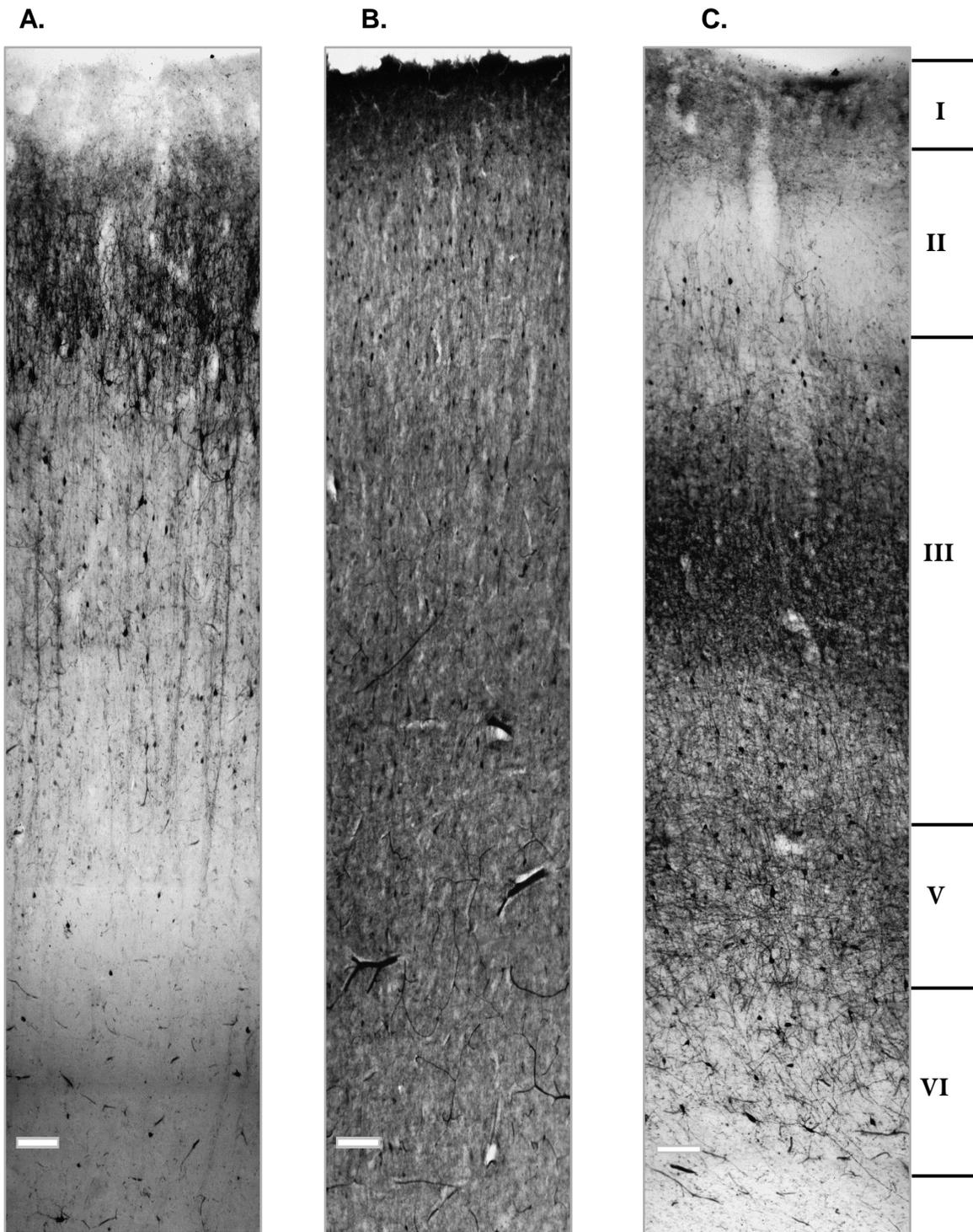
Los anticuerpos Anti-Calbindina (Anti-CB), Anti-Calretinina (Anti-CR) y Anti-Parvoalbúmina (Anti-PV) dirigidos contra proteínas atrapadoras de calcio permitieron la identificación de subpoblaciones de interneuronas gabaérgicas en ambas áreas corticales. Mientras que las neuronas marcadas con Anti-CB y Anti-CR se distribuyen fundamentalmente en las láminas supragranulares, la marcación con Anti-PV tiene una distribución más homogénea, aunque ligeramente mayor en las láminas supragranulares, esta distribución es similar en ambas áreas corticales, en general, no se observan neuronas inmunoreactivas para CB, CR o PV en la lámina I del área 10o y 24. En el caso de la marcación para CB, se observa una mayor intensidad en la coloración en la lámina II/III debido a una mayor inmunoreactividad del neuropilo, la marcación para PV muestra dos bandas de mayor intensidad, una hacia la lámina III y otra hacia la lámina V, por su parte la marcación con Anti-CR tienen una intensidad homogénea entre las láminas. Las láminas de mayor intensidad en la marcación para CB y PV son similares entre el área 10o y el área 24, ver figuras 12 y 13.

**Figura 12. Inmunoreactividad CB, CR y PV, área 10o.**



Micrografía a 10x, corte coronal desde la superficie pial hasta la sustancia blanca subcortical, área 10o, marcación con Anti-CB (A), Anti-CR (B) y Anti-PV (C) (en las tres imágenes la barra corresponde a 100  $\mu$ m). *Ver texto para descripción.*

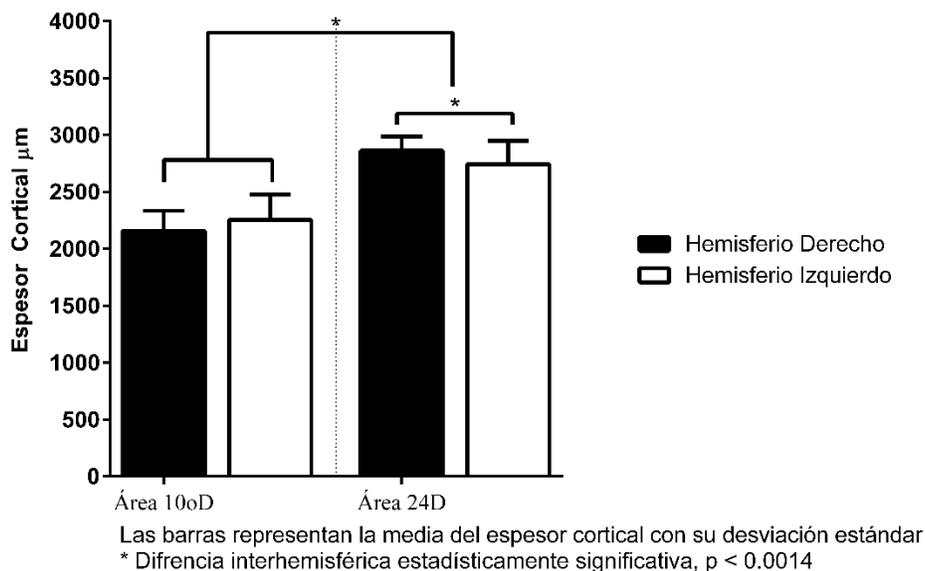
**Figura 13. Inmunoreactividad CB, CR y PV, área 24.**



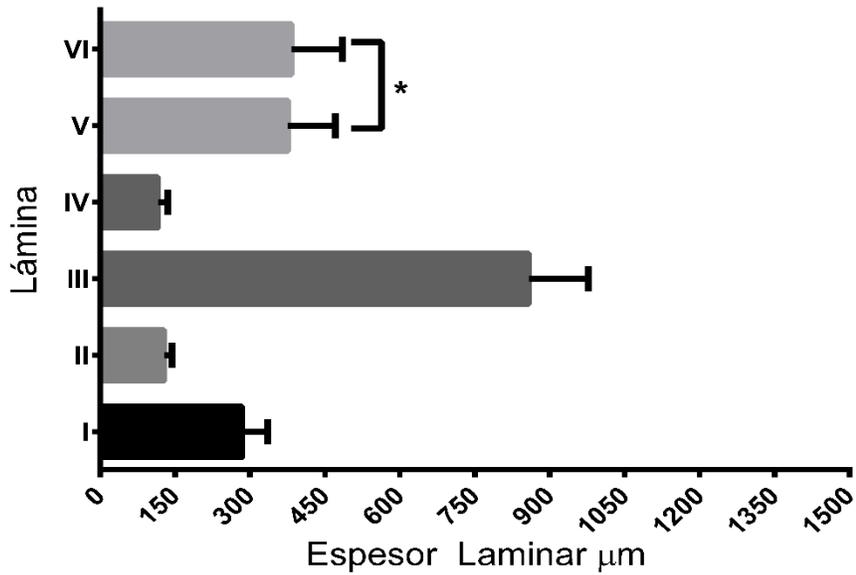
Micrografía a 10x, corte coronal desde la superficie pial hasta la sustancia blanca subcortical, área 24, marcación con Anti-CB (A), Anti-CR (B) y Anti-PV (C) (en las tres imágenes la barra corresponde a 100  $\mu$ m). *Ver texto para descripción.*

La variable espesor cortical total tuvo una distribución no normal (prueba Shapiro-Wilks  $p > 0.001$ , ver anexo 1), en ambas áreas corticales y ambos hemisferios, por lo que dichos valores se compararon mediante la prueba de Mann-Whitney. Mientras que las diferencias interhemisféricas en el espesor cortical del área 10o no fueron significativas ( $p = 0,1859$ ) las diferencias entre hemisferios en el área 24 si lo fueron ( $p = 0.0014$ ), **figura 14**, de otro lado el mayor tamaño observado en el espesor cortical del área 24 respecto al área 10o fue estadísticamente significativo ( $p < a 0.0001$ ), **figura 14** (Anexo 2). En relación al espesor laminar, la lámina III es la más voluminosa tanto en el área 10o como en el área 24, 39% y 36% respectivamente, siendo la diferencia entre áreas estadísticamente significativa ( $p < a 0.0001$ ), hubo diferencias estadísticamente significativas entre las láminas de una misma área cortical en cada hemisferio, excepto entre la lámina V y VI en ambas áreas corticales (Media Espesor Lamina V Vs Media de Espesor Lamina VI,  $p > a 0.999$  para las áreas 10o y 24), **figuras 15 y 16**.

**Figura 14. Espesor Cortical, áreas 10o y 24**



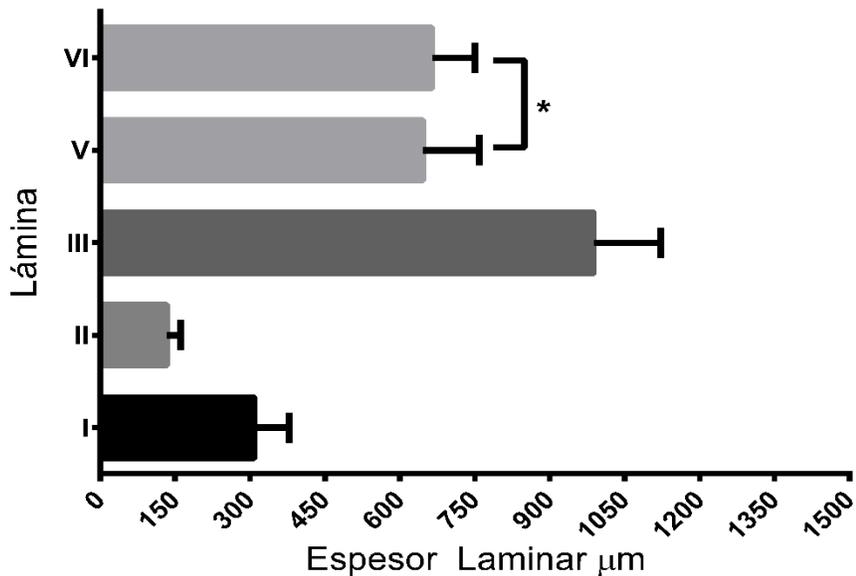
**Figura 15. Espesor Laminar, área 10o**



Esesor laminar relativo del área 10o, las barras representan la media y la desviación estándar para ambos hemisferios de esta área.

\* La diferencia en el esesor de estas dos láminas no fue estadísticamente significativo ( $p > 0.9999$ ) mientras que para las otras láminas si lo fue.

**Figura 16. Espesor Laminar, área 24**

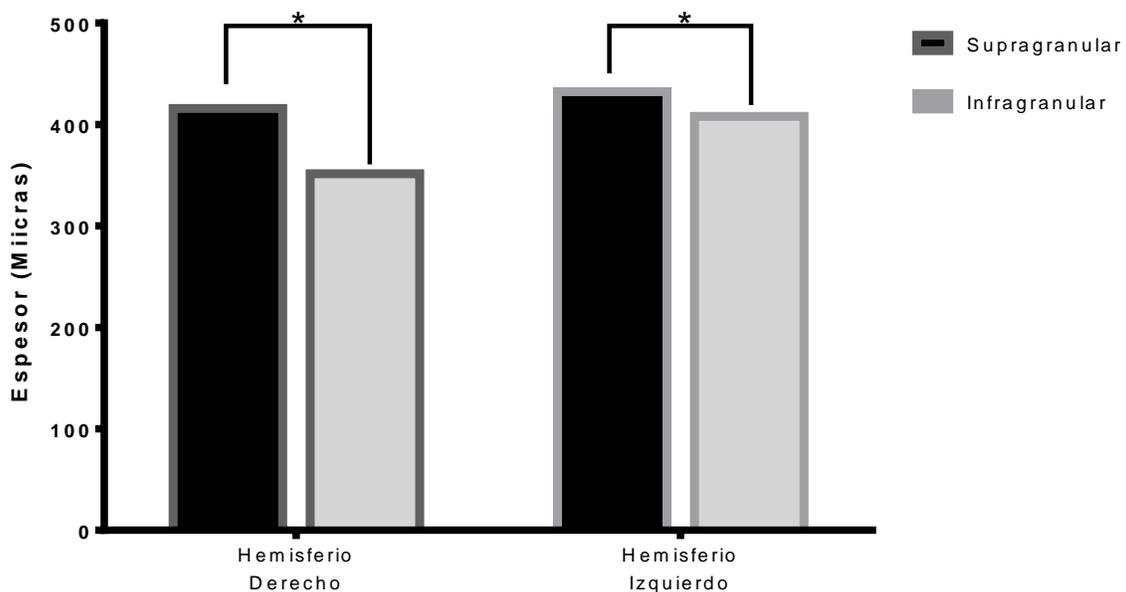


Esesor laminar relativo del área 24, las barras representan la media y la desviación estándar para ambos hemisferios de esta área.

\* La diferencia en el esesor de estas dos láminas no fue estadísticamente significativo ( $p > 0.9999$ ) mientras que para las otras láminas si lo fue.

Al agrupar las capas corticales con respecto a la lámina IV, se observa que en el área 10o las capas supragranulares (láminas II-III) tiene un espesor mayor que las infragranulares (láminas V-VI), **figura 17**, mientras que en el área 24 se invierte la relación con un mayor espesor en las láminas infragranulares, **figura 18**, en ambos casos las diferencias fueron estadísticamente significativas, **anexo 3**. Al realizar la comparación entre áreas corticales, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre el espesor de las láminas supragranulares del área 10o (424,10  $\mu\text{m}$ ) y el área 24 (477,4 micras) ( $p = a 0.081$ ), pero si entre las infragranulares con una media de espesor de 379,80  $\mu\text{m}$  para las láminas infragranulares del área 10, y de 655.90 para las láminas infragranulares del área 24 ( $p < 0.0001$ ), **figura 19**, **anexo 4**.

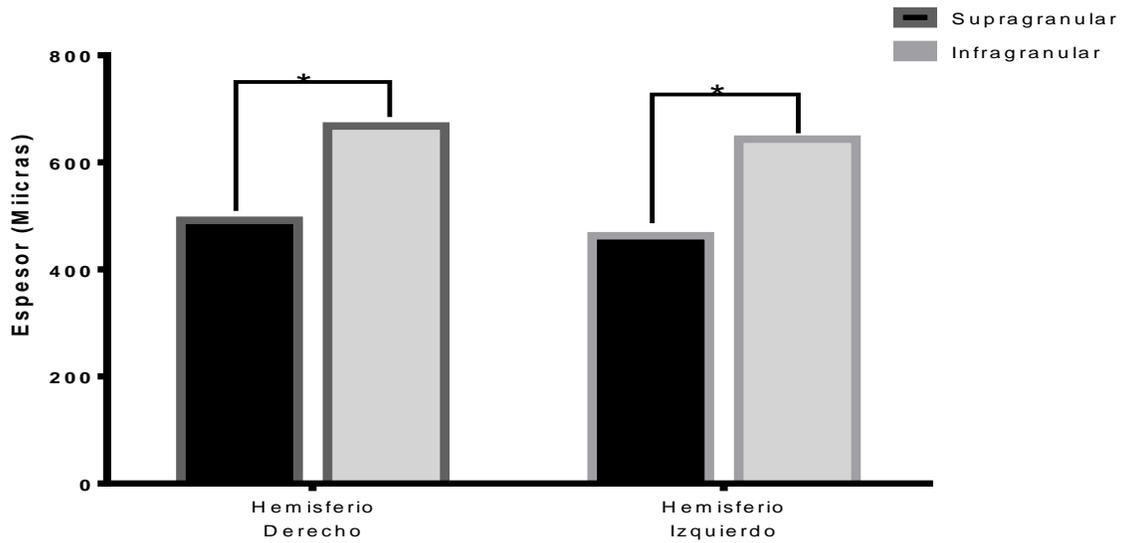
**Figura 17. Espesor de las láminas supra e infragranulares del área 10o**



Espesor de las láminas supra e infragranulares del área 10o, las barras representan la media del espesor de cada subgrupo en micras para cada hemisferio.

\* Para ambos hemisferios la diferencia fue estadísticamente significativa, Mann Whitney test:  $p < 0.0492$  para el hemisferio derecho y  $0.0002$  para el hemisferio izquierdo, prueba a dos colas.

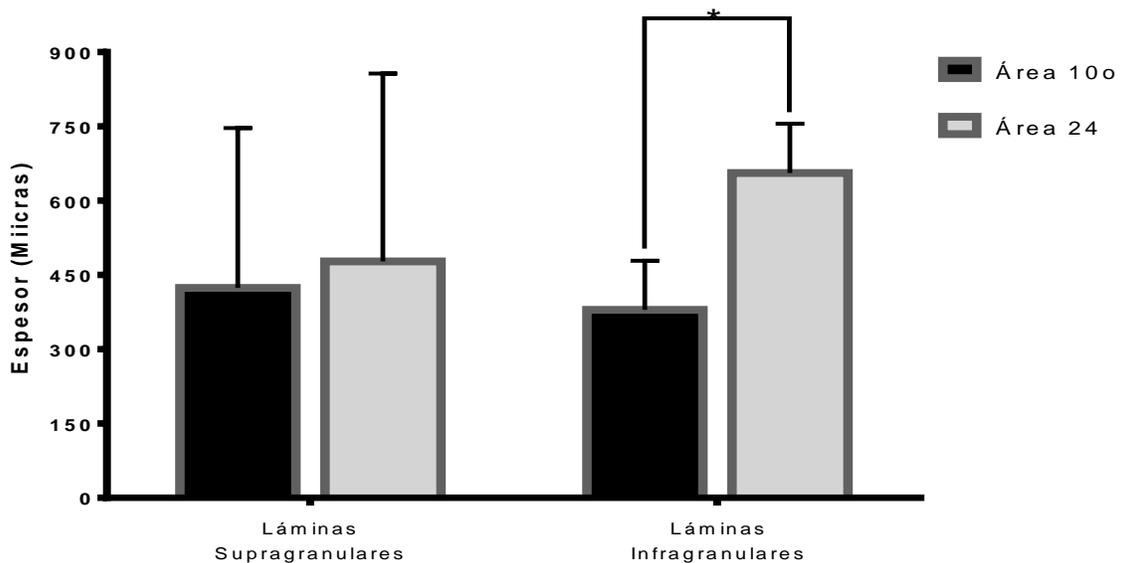
**Figura 18. Espesor de las láminas supra e infragranulares del área 24**



Espesor de las láminas supra e infragranulares del área 24, las barras representan la media del espesor de cada subgrupo en micras para cada hemisferio.

\* Para ambos hemisferios la diferencia fue estadísticamente significativa, Mann Whitney test:  $p < 0.0001$  para el hemisferio derecho y  $0.0001$  para el hemisferio izquierdo, prueba a dos colas.

**Figura 19. Comparación del espesor de las láminas supra e infragranulares entre las áreas 10o y 24.**



Las barras representan la media del espesor de cada subgrupo y su desviación estándar.

\* La diferencia entre las láminas infragranulares del área 10o y el área 24 fue estadísticamente significativa, Kruskal-Wallis test:  $p < 0.0001$ .

## 6.2 Organización Celular de la Lámina VI áreas 10o

La densidad neuronal (neuronas inmunoreactivas para NeuN) de la lámina VI en el área 10 orbital es de 1422 +/- 318,40 neuronas x mm<sup>2</sup> y 1351 +/- 235,00 mm<sup>2</sup> para el hemisferio derecho e izquierdo respectivamente, diferencia que no fue estadísticamente significativa ( $p = 0,4922$ ). En conjunto, las interneuronas inmunoreactivas para CB, CR y PV representan el 10,08% de la población de neuronas de la lámina VI, siendo las neuronas PV + las más abundantes, 7.39% de la población neuronal total, *tabla 5*.

**Tabla 5. Composición Celular de la lámina VI**

<b>Composición Neuronal Lamina VI - Área 10o</b>			
<b>Hemisferio Derecho</b>			
<b>Marcador</b>	<b># Neuronas (IC 95%) *</b>	<b>% Población Total **</b>	<b>Densidad Neuronal (IC 95%) ***</b>
<b>NeuN</b>	<b>44 (32 - 52)</b>	<b>100</b>	<b>1422 +/- 318,40</b>
<b>CB</b>	<b>0 (0 - 2)</b>	<b>1,20 +/- 2,06</b>	<b>17,78 (2,38 - 33,17)</b>
<b>CR</b>	<b>1 (0 - 1)</b>	<b>1,49 +/- 1,32</b>	<b>20,00 (10,64 - 29,36)</b>
<b>PV</b>	<b>3 (3 - 3)</b>	<b>7,39 +/- 2,24</b>	<b>102,20 (85,91 - 118,50)</b>
<b>Hemisferio Izquierdo</b>			
<b>Marcador</b>	<b># Neuronas (IC 95%) *</b>	<b>% Población Total **</b>	<b>Densidad Neuronal (IC 95%) ***</b>
<b>NeuN</b>	<b>42 (33 - 47)</b>	<b>100</b>	<b>1351 +/- 235,00</b>
<b>CB</b>	<b>0 (0 - 1)</b>	<b>1,11 +/- 1,50</b>	<b>15,56 (3,74 - 27,37)</b>
<b>CR</b>	<b>0 (0 - 1)</b>	<b>1,02 +/- 1,61</b>	<b>15,56 (1,83 - 29,28)</b>
<b>PV</b>	<b>2 (2 - 4)</b>	<b>7,17 +/- 3,36</b>	<b>93,33 (118,50 - 114,50)</b>

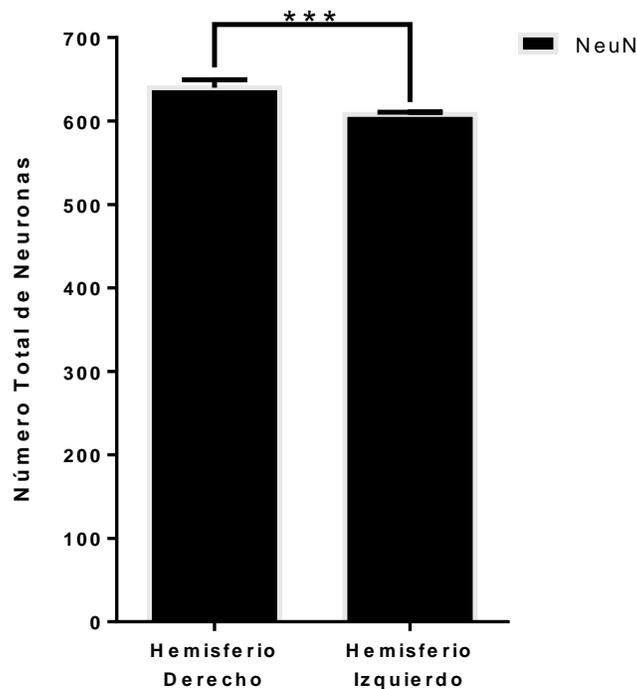
\* El # de neuronas corresponde a la mediana de neuronas contabilizadas para cada marcador en los 5 sujetos estudiados y su respectivo intervalo de confianza al 95%.

\*\* El % de la población total corresponde al total de neuronas a la proporción de neuronas inmunoreactivas para cada marcador dividido por el total de neuronas (total de neuronas inmunoreactivas para cada marcador / total de neuronas NeuN positivas x 100).

\*\*\* Cantidad de neuronas en un área de 1 mm<sup>2</sup>, se obtiene de dividir el número de neuronas en una cuadrícula de conteo (300 µm de ancho x 100 µm de alto) entre 0.03.

En el análisis bivariado no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre el número de neuronas inmunoreactivas para **NeuN** (prueba t de student,  $p = 0.4922$ ), **CB** (prueba de Mann-Whitney,  $p > 0.9999$ ), **CR** (prueba de Mann-Whitney,  $p = 0.4086$ ) o **PV** (prueba de Mann-Whitney,  $p = 0.3668$ ) entre el hemisferio derecho e izquierdo en el área 10o, pero si entre subpoblaciones de interneuronas siendo mayor el número de células PV+, **figuras 19 y 20**.

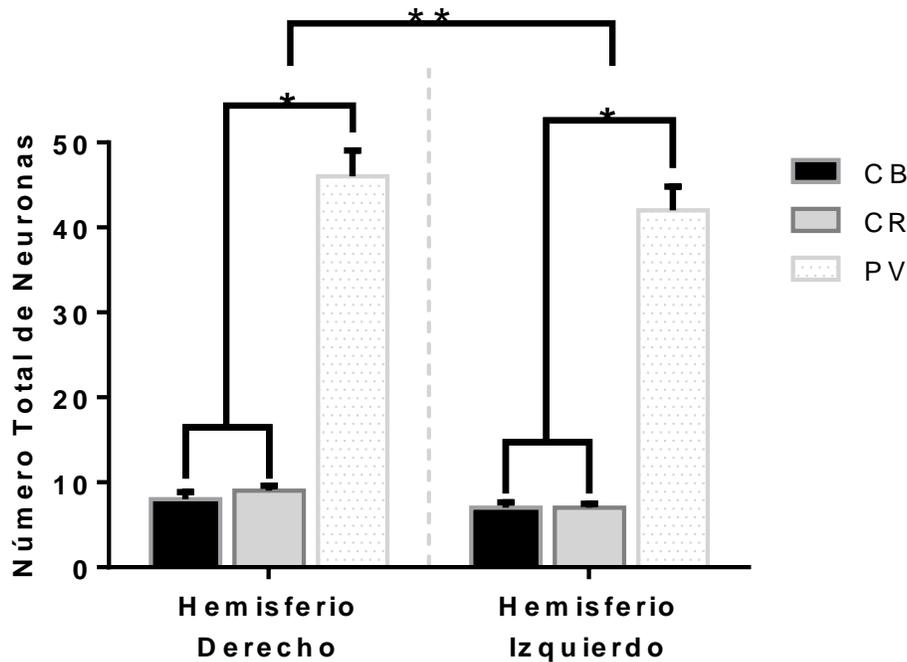
**Figura 20. Número total de Neuronas Inmunoreactivas para NeuN, área 10o**



Las barras representan el número total de neuronas inmunoreactivas para NeuN entre los 5 sujetos estudiados y su desviación estándar

\*\*\* No hubo diferencias estadísticamente significativas en el número de neuronas inmunoreactivas para NeuN entre hemisferios.

**Figura 21. Número total de Neuronas Inmunoreactivas para CB, CR y PV, área 10o.**



Las barras representan el número total de neuronas inmunoreactivas para CB, CR y PV entre los 5 sujetos estudiados y su desviación estándar

\* Las diferencias encontradas entre el número de neuronas inmunoreactivas para PV respecto a CB y CR en cada hemisferio fueron estadísticamente significativas (prueba de Mann-Whitney,  $p < 0.005$ )

\*\* No hubo diferencias estadísticamente significativas entre el número de neuronas inmunoreactivas para cada marcador entre los hemisferios.

### 6.3 Organización Celular de la Lámina VI área 24

La densidad neuronal (neuronas inmunoreactivas para NeuN) de la lámina en el área 24 es de  $1164 \pm 258,00$  neuronas  $\times$   $\text{mm}^2$  y  $1051 \pm 176,30$   $\text{mm}^2$  para el hemisferio derecho e izquierdo respectivamente, diferencia que no fue estadísticamente significativa ( $p = 0,3928$ ). En conjunto las neuronas inmunoreactivas para CB, CR y PV representan el 15,66% de la población de neuronas de la lámina VI, siendo las neuronas PV + la más abundantes, 10,66% de la población neuronal total, **tabla 6**.

**Tabla 6. Composición Celular de la lámina VI**

<b>Composición Neuronal Lámina VI - Área 24</b>			
<b>Hemisferio Derecho</b>			
<b>Marcador</b>	<b># Neuronas (IC 95%) *</b>	<b>% Población Total **</b>	<b>Densidad Neuronal (IC 95%) ***</b>
<b>NeuN</b>	<b>33 (31 - 36)</b>	<b>100</b>	<b>1164 +/- 258,00</b>
<b>CB</b>	<b>1 (0 - 1)</b>	<b>2,14 +/- 2,63</b>	<b>33,33 (0,00 - 33,33)</b>
<b>CR</b>	<b>1 (0 - 1)</b>	<b>1,72 +/- 1,87</b>	<b>33,33 (0,00 - 33,33)</b>
<b>PV</b>	<b>3 (3 - 4)</b>	<b>9,45 +/- 3,93</b>	<b>100,00 (100,00 - 133,30)</b>
<b>Hemisferio Izquierdo</b>			
<b>Marcador</b>	<b># Neuronas (IC 95%) *</b>	<b>% Población Total **</b>	<b>Densidad Neuronal (IC 95%) ***</b>
<b>NeuN</b>	<b>31 (27 - 36)</b>	<b>100</b>	<b>1051 +/- 176,30</b>
<b>CB</b>	<b>1 (0 - 1)</b>	<b>2,40 +/- 1,96</b>	<b>33,33 (0 - 33,33)</b>
<b>CR</b>	<b>1 (0 - 1)</b>	<b>2,60 +/- 1,75</b>	<b>33,33 (0 - 33,33)</b>
<b>PV</b>	<b>3 (2 - 4)</b>	<b>10,66 +/- 4,70</b>	<b>100,00 (66,67 - 133,30)</b>

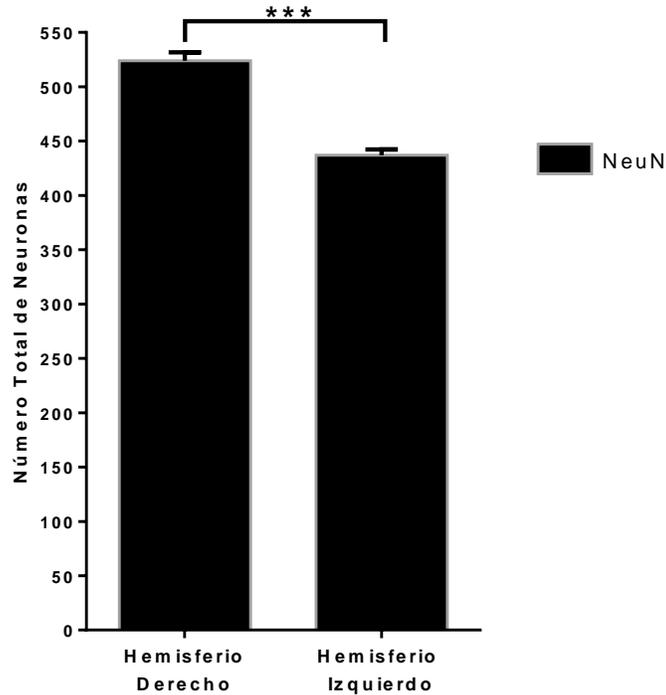
\* El # de neuronas corresponde a la mediana de neuronas contabilizadas en una cuadrícula de conteo para cada marcador en los 5 sujetos estudiados y su respectivo intervalo de confianza al 95%.

\*\* El % de la población total corresponde al total de neuronas a la proporción de neuronas inmunoreactivas para cada marcador dividido por el total de neuronas (total de neuronas inmunoreactivas para cada marcador / total de neuronas NeuN positivas x 100).

\*\*\* Cantidad de neuronas en un área de 1 mm<sup>2</sup>, se obtiene de dividir el número de neuronas en una cuadrícula de conteo (300 µm de ancho x 100 µm de alto) entre 0.03.

En el análisis bivariado no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre el número de neuronas inmunoreactivas para NeuN (prueba de Mann-Whitney, p = 0,3928), **CB** (prueba de Mann-Whitney, p = 0,5384), **CR** (prueba de Mann-Whitney, p = 0,3971), **PV** (prueba de Mann-Whitney, p = 0,9537) entre el hemisferio derecho e izquierdo en el área 24, pero si entre subpoblaciones de interneuronas en un mismo hemisferio, siendo más mayor el número de células PV+, **figuras 21 y 22.**

**Figura 22. Número total de Neuronas Inmunoreactivas para NeuN, área 24**



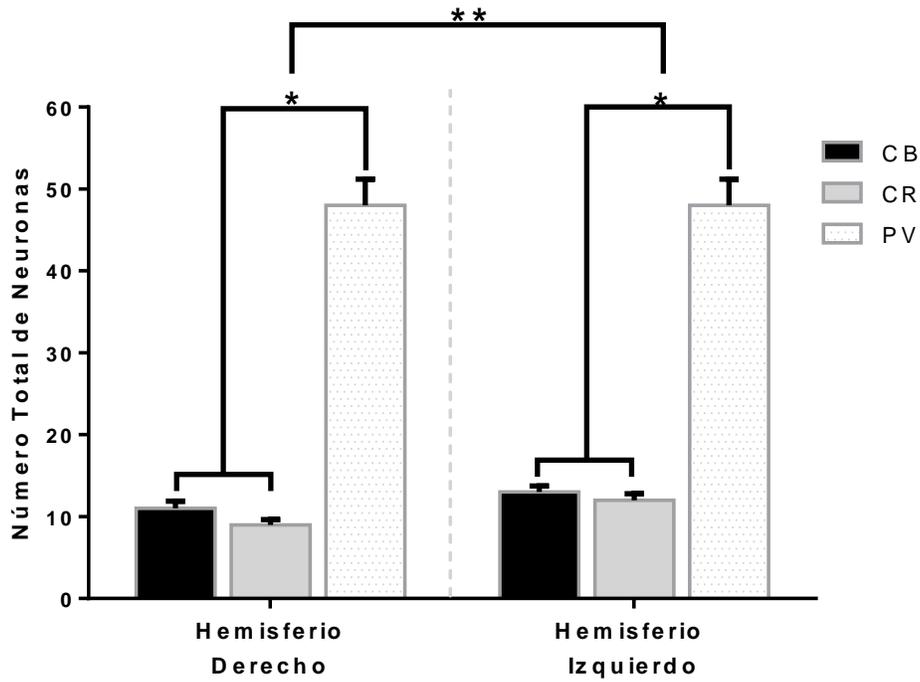
Las barras representan el número total de neuronas inmunoreactivas para NeuN entre los 5 sujetos estudiados y su desviación estándar

\*\*\* No hubo diferencias estadísticamente significativas en el número de neuronas inmunoreactivas para NeuN entre hemisferios.

#### **6.4 Análisis bivariado Área 10o Vs. Área 24**

Tanto el número total de neuronas inmunoreactivas para NeuN como su densidad fue significativamente mayor en el área 10 que en el área 24, **figura 23**, en relación a las neuronas inmunoreactivas para CB, CR y PV si bien tanto su número total como su densidad fue mayor en el área 24 respecto el área 10o estas diferencias no fueron estadísticamente significativas, **figura 24**.

**Figura 23. Número total de Neuronas Inmunoreactivas para CB, CR y PV, área 24.**

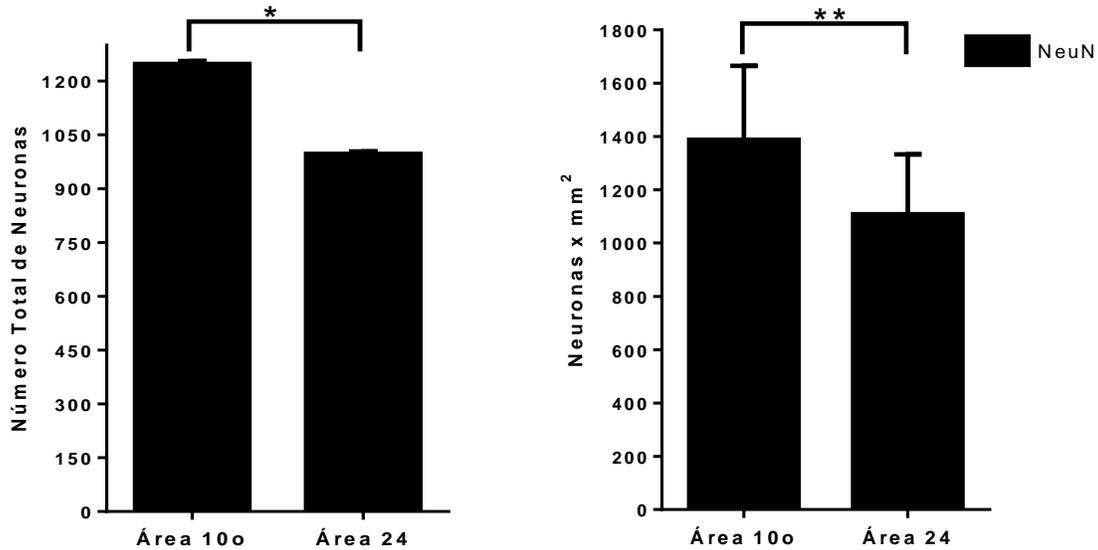


Las barras representan el número total de neuronas inmunoreactivas para CB, CR y PV entre los 5 sujetos estudiados y su desviación estándar

\* Las diferencias encontradas entre el número de neuronas inmunoreactivas para PV respecto a CB y CR en cada hemisferio fueron estadísticamente significativas (prueba de Mann-Whitney,  $p < 0.005$ )

\*\* No hubo diferencias estadísticamente significativas entre el número de neuronas inmunoreactivas para cada marcador entre los hemisferios.

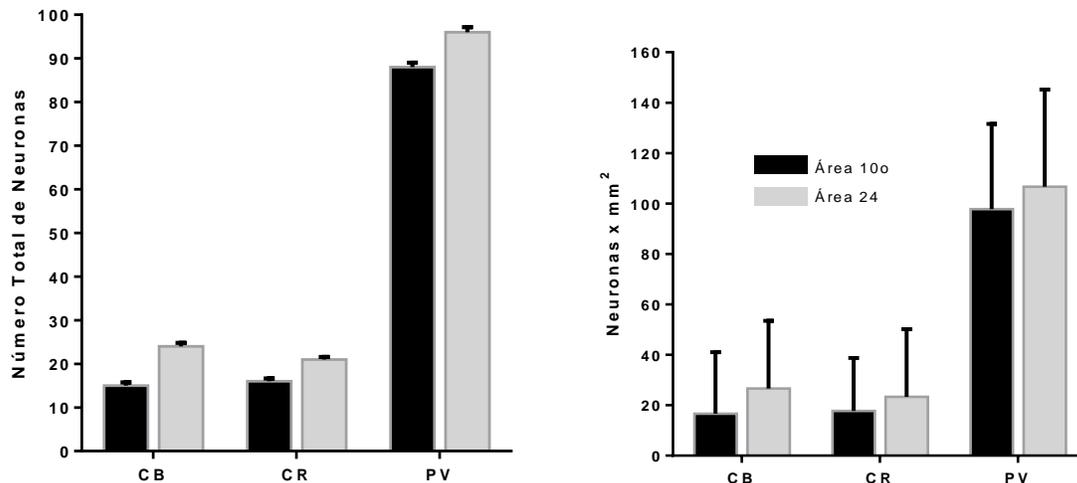
**Figura 24. Análisis bivariado número de neuronas inmunoreactivas para NeuN y su densidad, áreas 10o y 24.**



\*Las barras representan el número total de neuronas inmunoreactivas para NeuN y su desviación estándar en el área 10o y el área 24. La diferencia en el número de neuronas entre las áreas es estadísticamente significativa, prueba de Mann-Whitney,  $p = 0.0001$ .

\*\*Las barras representan la media de la densidad neuronal (número de neuronas en un mm<sup>2</sup>) y su desviación estándar en el área 10o y el área 24. La diferencia entre las áreas es estadísticamente significativa, prueba de Mann-Whitney,  $p = 0.0001$ .

**Figura 25. Análisis bivariado número de neuronas inmunoreactivas para CB, CR, PV y su densidad, áreas 10o y 24.**



Las barras representan el número total de neuronas inmunoreactivas para cada anticuerpo su desviación estándar y la media de la densidad y su desviación estándar en el área 10o y el área 24. Para ninguno de los dos parámetros las diferencias son estadísticamente significativas (prueba de Mann-Whitney  $p > 0.05$ ).

## 6.5 Caracterización morfológica de las interneuronas en la lámina VI de las áreas 10o y 24.

Se estudió el tamaño del soma, número de procesos y grado de esfericidad de un total de 260 interneuronas, 119 en el área 10o y 141 en el área 24, como se mencionó antes, la mayoría de ellas corresponde a interneuronas gabaérgicas inmunoreactivas para parvalbúmina, **tabla 7**. Tanto en el área 10o como en el área 24 la subpoblación de interneuronas de mayor tamaño (área del pericarión en  $\mu\text{m}^2$ ) fueron aquellas inmunoreactivas para PV, seguidas de interneuronas inmunoreactivas para CR y CB, **tabla 8**, el mayor tamaño de las interneuronas PV+ respecto de las otras dos subpoblaciones fue estadísticamente significativo en ambas áreas mientras que la diferencia entre la población de células CB+ y CR+ solo lo fue en el área 24. En ninguna de las dos áreas se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre hemisferios, **tablas 9 y 10**.

**Tabla 7. Distribución de neuronas inmunoreactivas para CB, CR y PV en las áreas 10o y 24.**

<i>Marcador</i>	<i>Distribución Neuronas Inmunoreactivas CB, CR y PV</i>			
	<i>Área 10o</i>		<i>Área 24</i>	
	<i>Cantidad Neta*</i>	<i>Cantidad Relativa (%)**</i>	<i>Cantidad Neta*</i>	<i>Cantidad Relativa (%)**</i>
<b>CB</b>	15	10,37 +/- 14,68	24	14,14 +/- 13,00
<b>CR</b>	16	11,10 +/- 12,86	21	13,35 +/- 11,46
<b>PV</b>	88	78,53 +/- 24,35	96	72,51 +/- 22,40
<b>Total</b>	<b>119</b>	<b>100</b>	<b>141</b>	<b>100</b>

\* Número total de células inmunoreactivas para cada anticuerpo en los dos hemisferios del área respectiva.

\*\* Media del porcentaje de células inmunoreactivas para cada anticuerpo respecto del total de interneuronas contabilizada en cada área cortical y su desviación estándar.

**Tabla 8. Características morfológicas de neuronas inmunoreactivas para CB, CR y PV en las áreas 10o y 24.**

**Características Morfológicas Neuronas Inmunoreactivas para  
CB, CR y PV Área 10o**

<b>Hemisferio Derecho</b>			
<b>Marcador</b>	<b>Tamaño (<math>\mu\text{m}^2</math>) *</b>	<b>Número de Procesos (IC 95%)**</b>	<b>Grado de Esfericidad***</b>
<b>CB</b>	80,71 +/- 27,49	2 (1 - 4)	0.844 +/- 0.062
<b>CR</b>	89,18 +/- 23,76	2 (2 - 2)	0.746 +/- 0.113
<b>PV</b>	122,50 +/- 45,49	3 (2 - 3)	0.786 +/- 0,109
<b>Hemisferio Izquierdo</b>			
<b>Marcador</b>	<b>Tamaño (<math>\mu\text{m}^2</math>)</b>	<b>Número de Procesos (IC 95%)</b>	<b>Grado de Esfericidad</b>
<b>CB</b>	73,61 +/- 23,58	2 (1 - 4)	0.808 +/- 0.122
<b>CR</b>	97,13 +/- 25,13	2 (1 - 3)	0,752 +/- 0.075
<b>PV</b>	117,90 +/- 39,40	2 (2 - 3)	0,802 +/- 0,105

**Características Morfológicas Neuronas Inmunoreactivas para  
CB, CR y PV Área 24**

<b>Hemisferio Derecho</b>			
<b>Marcador</b>	<b>Tamaño (<math>\mu\text{m}^2</math>)</b>	<b>Número de Procesos (IC 95%)</b>	<b>Grado de Esfericidad</b>
<b>CB</b>	65,09 +/- 14,03	1 (1 - 2)	0,841 +/- 0,082
<b>CR</b>	105,30 +/- 42,29	2 (1 - 2)	0,728 +/- 0,104
<b>PV</b>	128,00 +/- 56,73	3 (3 - 3)	0,747 +/- 0,130
<b>Hemisferio Izquierdo</b>			
<b>Marcador</b>	<b>Tamaño (<math>\mu\text{m}^2</math>)</b>	<b>Número de Procesos (IC 95%)</b>	<b>Grado de Esfericidad</b>
<b>CB</b>	77,70 +/- 53,06	2 (1 - 2)	0,850 +/- 0.059
<b>CR</b>	84,19 +/- 15,14	2 (2 - 2)	0,745 +/- 0.114
<b>PV</b>	129,70 +/- 45,62	3 (2 - 4)	0,765 +/- 0,131

\* Media del tamaño del soma y su desviación estándar.

\*\* Mediana del número de procesos de cada subpoblación de interneuronas y el intervalo de confianza al 95%.

\*\*\* Media del grado de esfericidad de cada subpoblación de interneuronas y su desviación estándar.

**Tabla 9. Comparación entre hemisferios de las variables morfológicas, área 10o.**

**Análisis Bivariado Variables Morfológicas Interneuronas Área 10o  
Hemisferio Derecho Vs Hemisferio Izquierdo - Mann Whitney Test**

<b>Marcador</b>	<b>Variable</b>	<b>Valor P</b>	<b>Significativo</b>	<b>Dos Colas</b>	<b>Mann Whitney U</b>
<b>CB</b>	Área	0,8354	No	Si	26,00
	Número de Procesos	0,9461	No	Si	26,50
	Grado de Esfericidad	> 0,9999	No	Si	28,00
<b>CR</b>	Área	0,5976	No	Si	26,00
	Número de Procesos	0,5644	No	Si	27,50
	Grado de Esfericidad	0,7789	No	Si	28,50
<b>PV</b>	Área	0,6670	No	Si	914,00
	Número de Procesos	0,1745	No	Si	812,00
	Grado de Esfericidad	0,4428	No	Si	873,50

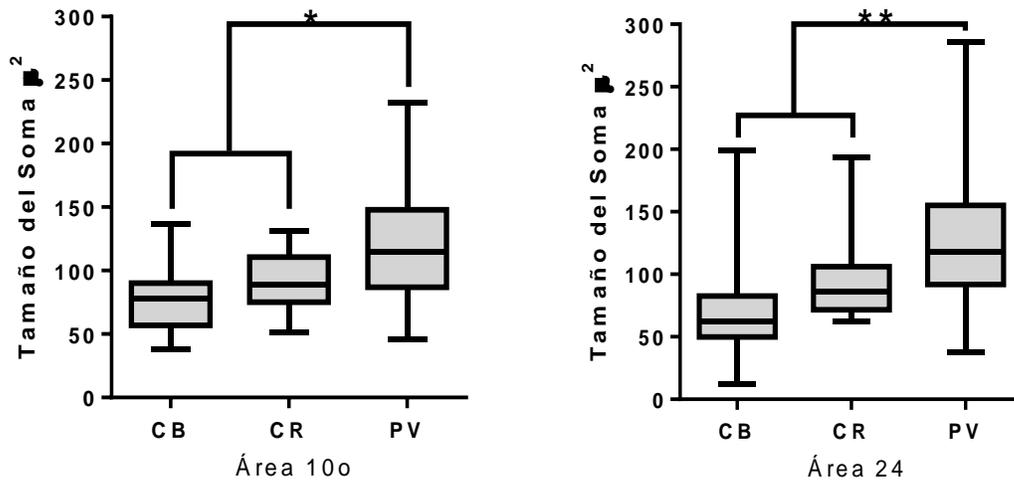
**Tabla 10. Comparación entre hemisferios de las variables morfológicas, área 24.**

**Análisis Bivariado Variables Morfológicas Interneuronas Área 24  
Hemisferio Derecho Vs Hemisferio Izquierdo - Mann Whitney Test**

<b>Marcador</b>	<b>Variable</b>	<b>Valor P</b>	<b>Significativo</b>	<b>Dos Colas</b>	<b>Mann Whitney U</b>
<b>CB</b>	Área	0,8306	No	Si	55,00
	Número de Procesos	0,1830	No	Si	40,50
	Grado de Esfericidad	0,9227	No	Si	57,00
<b>CR</b>	Área	0,3791	No	Si	41,00
	Número de Procesos	0,3310	No	Si	39,00
	Grado de Esfericidad	0,7154	No	Si	48,50
<b>PV</b>	Área	0,4337	No	Si	1045,00
	Número de Procesos	0,8980	No	Si	1135,00
	Grado de Esfericidad	0,4358	No	Si	1045,00

Otra característica que diferencia a la población de interneuronas inmunoreactivas para PV es la heterogeneidad respecto a su tamaño que en el área 10o se distribuye en el rango entre 46,16  $\mu\text{m}^2$  y 232,40  $\mu\text{m}^2$  mientras que en el área 24 este rango va desde 37,99  $\mu\text{m}^2$  hasta 285,70  $\mu\text{m}^2$ , **figura 25**.

**Figura 26. Tamaño del soma neuronas inmunoreactivas para CB, CR y PV, áreas 10o y 24.**



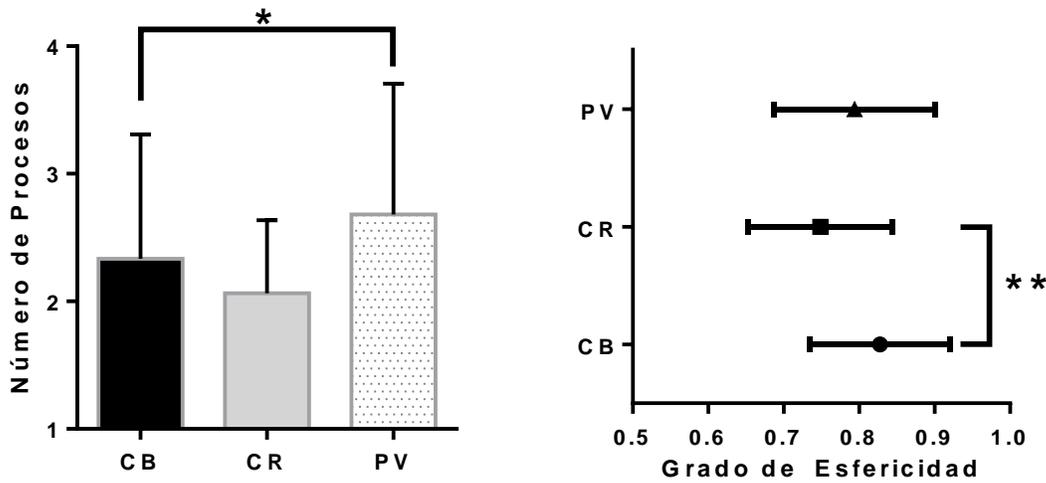
Media del tamaño del soma en micras y su desviación estándar.

\*El tamaño de las neuronas inmunoreactivas para PV es significativamente mayor (Prueba de Mann-Whitney: CB Vs. CR  $p = 0.1124$ ; PV Vs. CR  $p = 0.0138$ ; PV Vs. CB  $p < 0.0001$ ).

\*\*El tamaño de las interneuronas inmunoreactivas para PV es significativamente mayor (Prueba de Mann-Whitney: CB Vs. CR  $p = 0.1124$ ; PV Vs. CR  $p = 0.0138$ ; PV Vs. CB  $p < 0.0001$ ).

Respecto a las otras dos variables morfológicas consideradas, en el área 10o no hubo diferencias estadísticamente significativas en el número de procesos entre las tres subpoblaciones estudiadas, en relación al grado de esfericidad, las interneuronas CB+ tuvieron una media significativamente mayor que I (prueba Mann-Whitney,  $p = 0.0167$ ), es decir, una forma más redondeada, **figura 26**. En el área 24 el número de procesos por neurona fue significativamente mayor en las células PV+ respecto de las inmunoreactivas para CB y CR (prueba Mann-Whitney,  $p < 0.0001$  en ambas comparaciones) en relación al grado de esfericidad tanto las neuronas CB+ como las CR+ tiene una forma más redondeada que las neuronas inmunoreactivas para PV, **figura 27**.

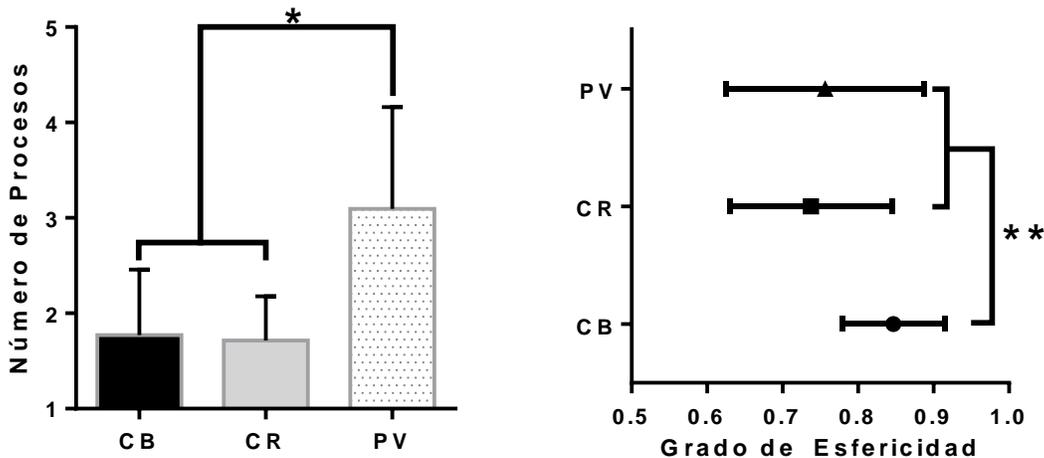
**Figura 27. Número de procesos y grado de esfericidad neuronas inmunoreactivas para CB, CR y PV, áreas 10o.**



\*Se presenta la media del número de procesos de y su desviación estándar, la diferencias entre grupos no fue estadísticamente significativa.

\*\*Se presenta la media del grado de esfericidad y su desviación estándar, las neuronas inmunoreactivas para CB son significativamente más redondeadas que el grupo de neuronas CR+, prueba Mann-Whitney p 0,0167 prueba a dos colas.

**Figura 28. Número de procesos y grado de esfericidad neuronas inmunoreactivas para CB, CR y PV, área 24.**

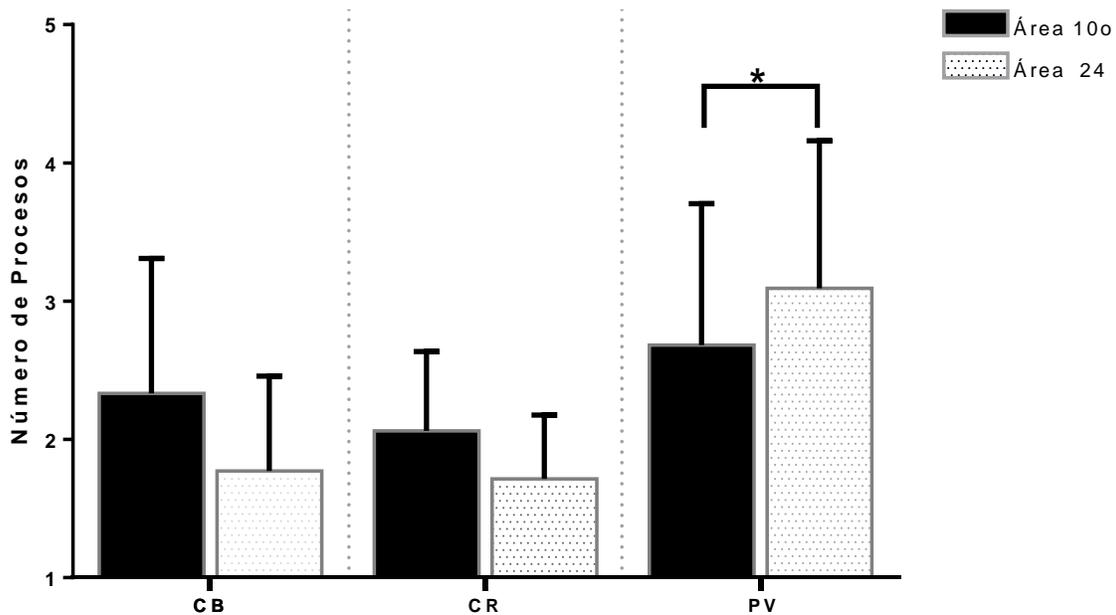


\*Se presenta la media del número de procesos y su desviación estándar, el número de procesos de las células PV+ es mayor que el de las neuronas CB+ ( $p < 0.0001$ ) y CR+ ( $p < 0.0001$ ).

\*\*Se presenta la media del grado de esfericidad de cada subpoblación de neuronas y su desviación estándar, las neuronas inmunoreactivas para CB son significativamente más redondeadas que el grupo de neuronas CR+ ( $p = 0.0002$ ) y PV+ ( $p = 0.0010$ )

Al comparar el tamaño del soma, número de procesos y grado de esfericidad de las tres subpoblaciones de interneuronas del área 10o con las del área 24 solo se encontraron diferencias estadísticamente significativas en el número de procesos de las neuronas inmunoreactivas para PV, siendo mayor en las del área 24, **figuras 28, 29, 30 y anexo 5.**

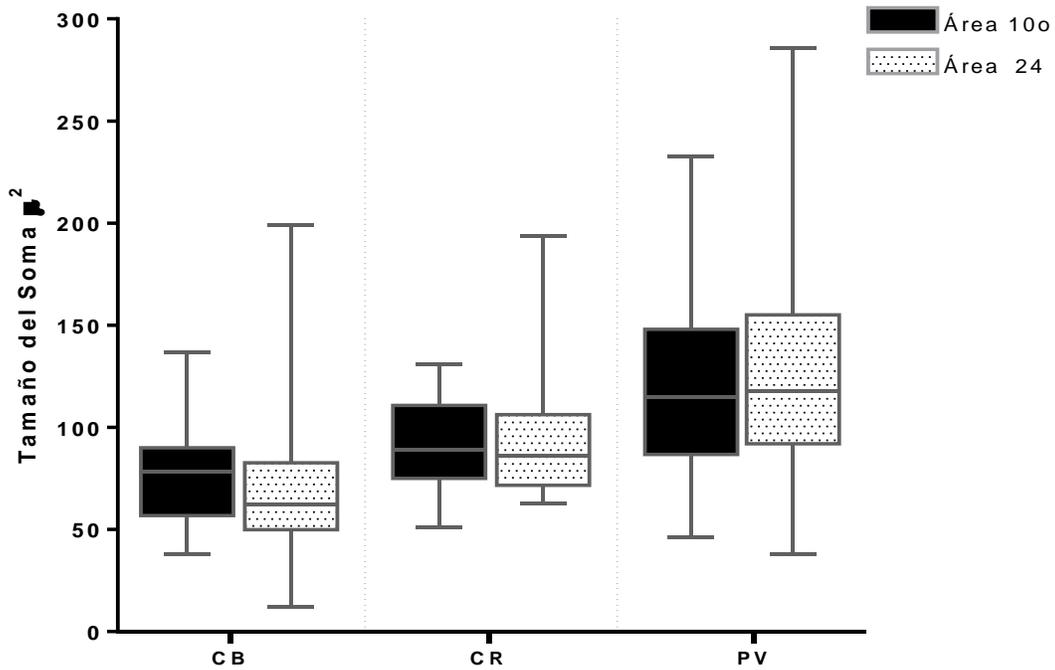
**Figura 29. Número de procesos primarios de las interneuronas del área 10o Vs. Área 24.**



Las barras representan la media del número de procesos primarios de cada subpoblación de interneuronas y su desviación estándar.

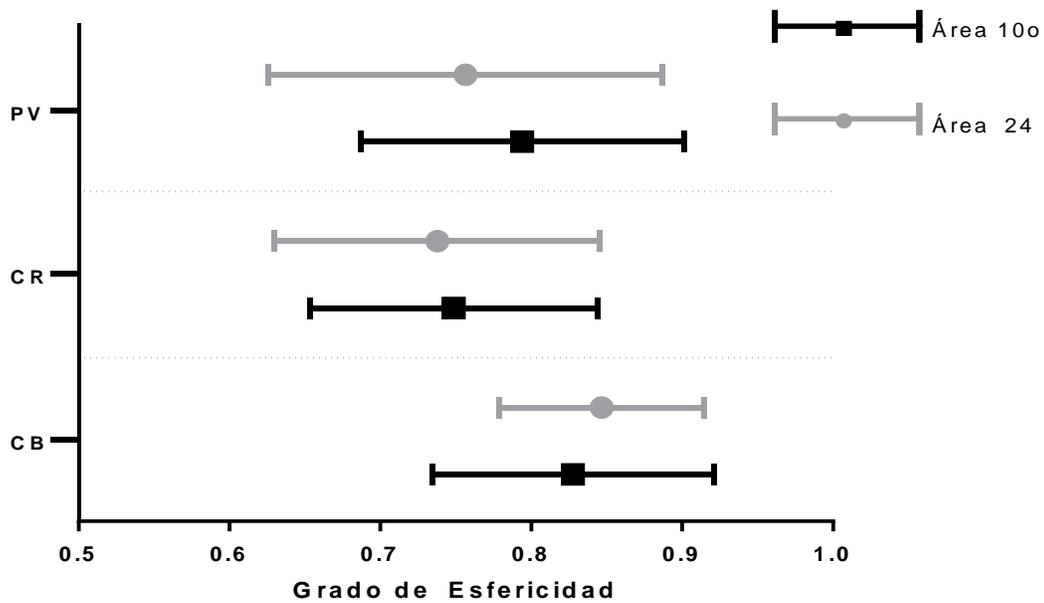
\*El número de procesos primarios de las neuronas inmunoreactivas para PV fue significativamente mayor en el área 24 que en el área 10o (prueba de Mann-Whitney,  $p = 0.0085$ ).

**Figura 30. Área del soma de las interneuronas del área 10o Vs. Área 24.**



Medía del tamaño del soma en micras y su desviación estándar. Las diferencias en los subgrupos entre áreas corticales no son estadísticamente significativas.

**Figura 30. Área del soma de las interneuronas del área 10o Vs. Área 24.**



Medía del tamaño del grado de esfericidad y su desviación estándar. Las diferencias en los subgrupos entre áreas corticales no son estadísticamente significativas.

## **6.6 Clasificación de las interneuronas inmunoreactivas para CB, CR y PV en las áreas 10o y 24**

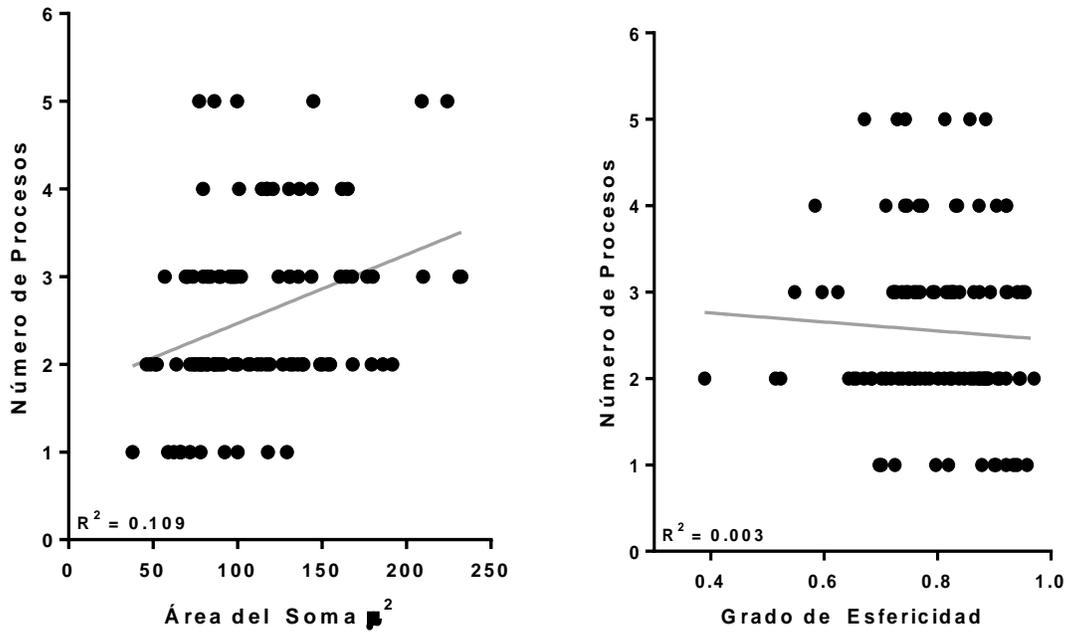
A partir de los datos obtenidos respecto a las características morfológicas de las interneuronas de ambas áreas no fue posible proponer un sistema de clasificación no supervisado (*a priori*), dada la homogeneidad encontrada entre las subpoblaciones de neuronas inmunoreactivas para CB y CR y el hecho de que las neuronas PV+ se distinguían de las otras solo por su tamaño.

Con el fin de establecer una posible relación entre las variables morfológicas y la inmunoreactividad a cada uno de los marcadores utilizados para las proteínas atrapadoras de calcio se hizo un modelo de regresión lineal y un análisis de conglomerados jerárquico. En el modelo de regresión lineal se cotejó el número de procesos con el área del soma y el grado de esfericidad de las neuronas, sin que se encontrara una relación en ninguno de los dos casos, **figuras 31 y 32, anexo 6.**

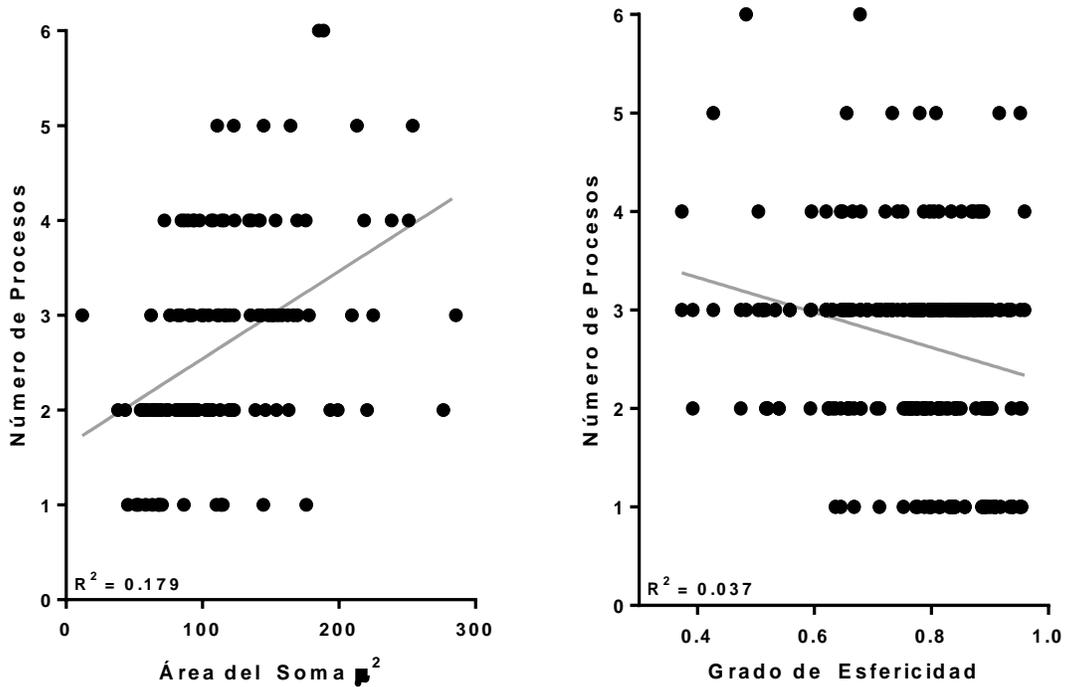
En relación al análisis de conglomerados se incluyeron en este las variables morfológicas área del soma, número de procesos primarios, grado de esfericidad y el marcador inmunohistoquímico de cada interneurona, dando como resultado 7 grupos (conglomerados), sin embargo, dada la heterogeneidad de los grupos no se consideró que los grupos tuvieran un valor predictivo, **anexo 7.**

En ambas áreas corticales las neuronas inmunoreactivas para CB y CR en la lámina VI tienen forma ovoide o circular y su tinción es tenue, las neuronas PV+ más voluminosas tiene forma poligonal o ahusada, su tinción es más intensa y en ambas áreas corticales es posible distinguir estructuras que probablemente corresponden a los cartuchos de células en candelabro **figuras 33 a 36.**

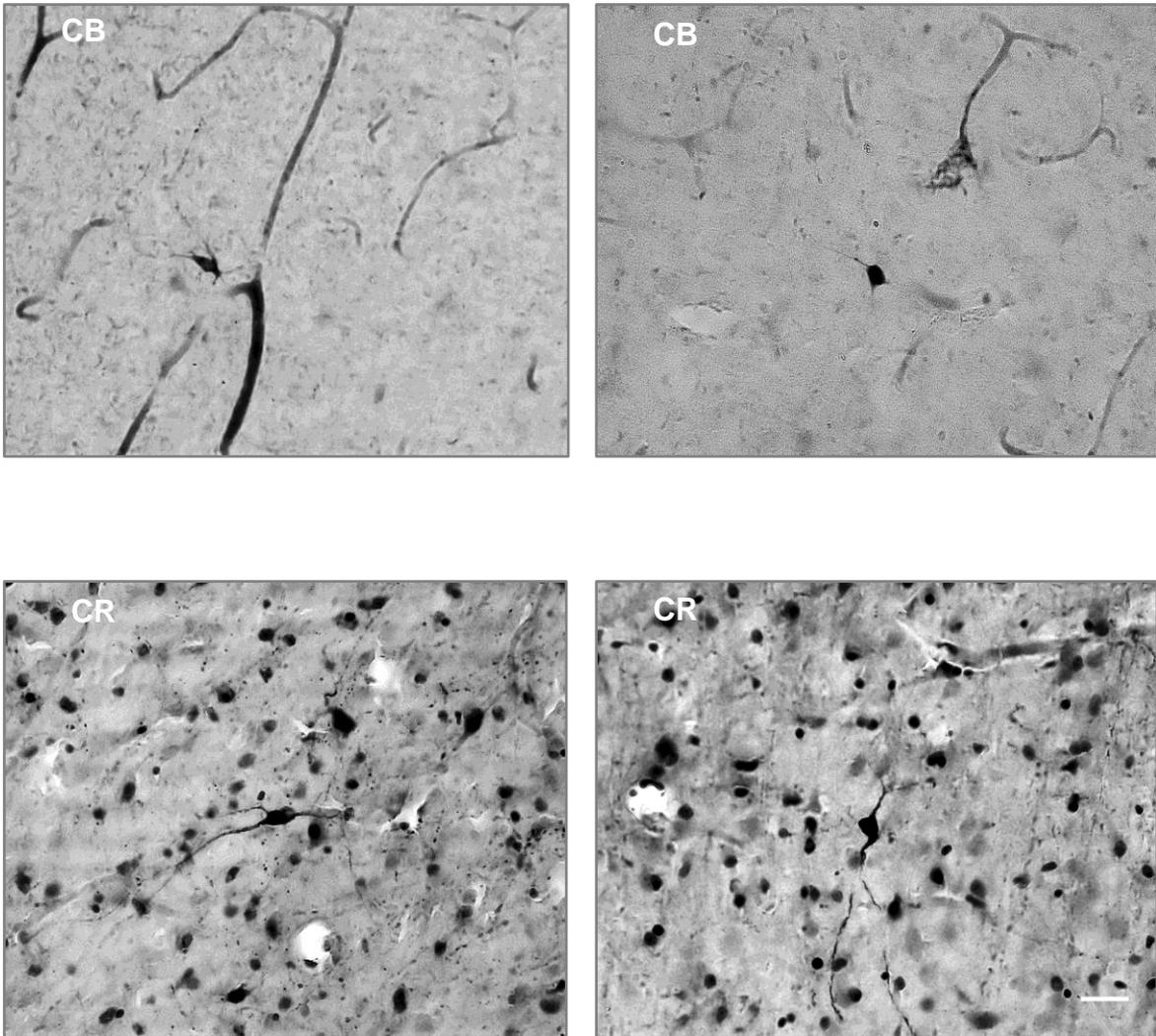
**Figura 31. Modelo de regresión lineal, área del soma y número de procesos – grado de esfericidad y número de procesos, área 10o.**



**Figura 32. Modelo de regresión lineal, área del soma y número de procesos – grado de esfericidad y número de procesos, área 10o.**

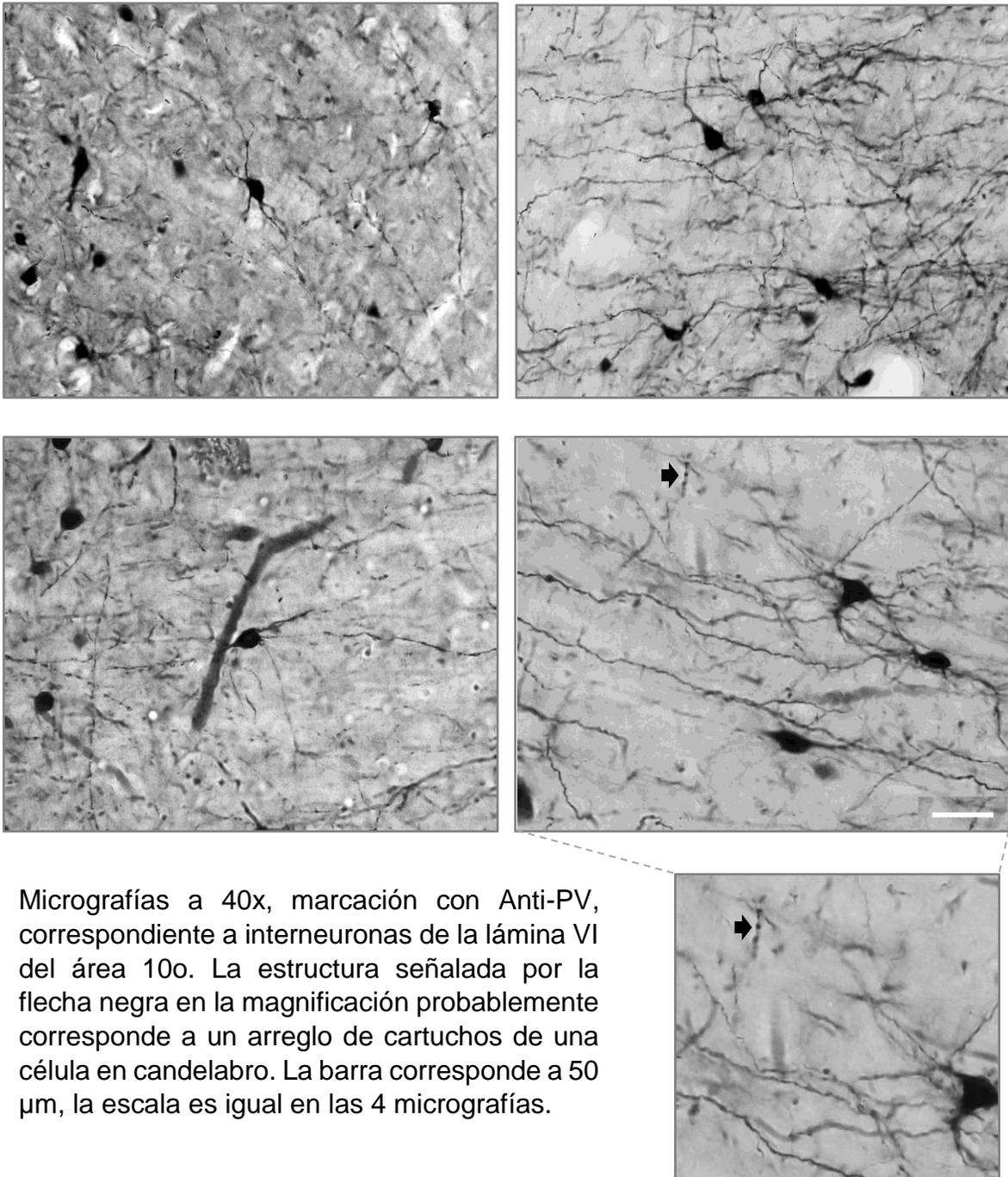


**Figura 33. Interneuronas positivas para CB y CR de la lámina VI, área 10o**



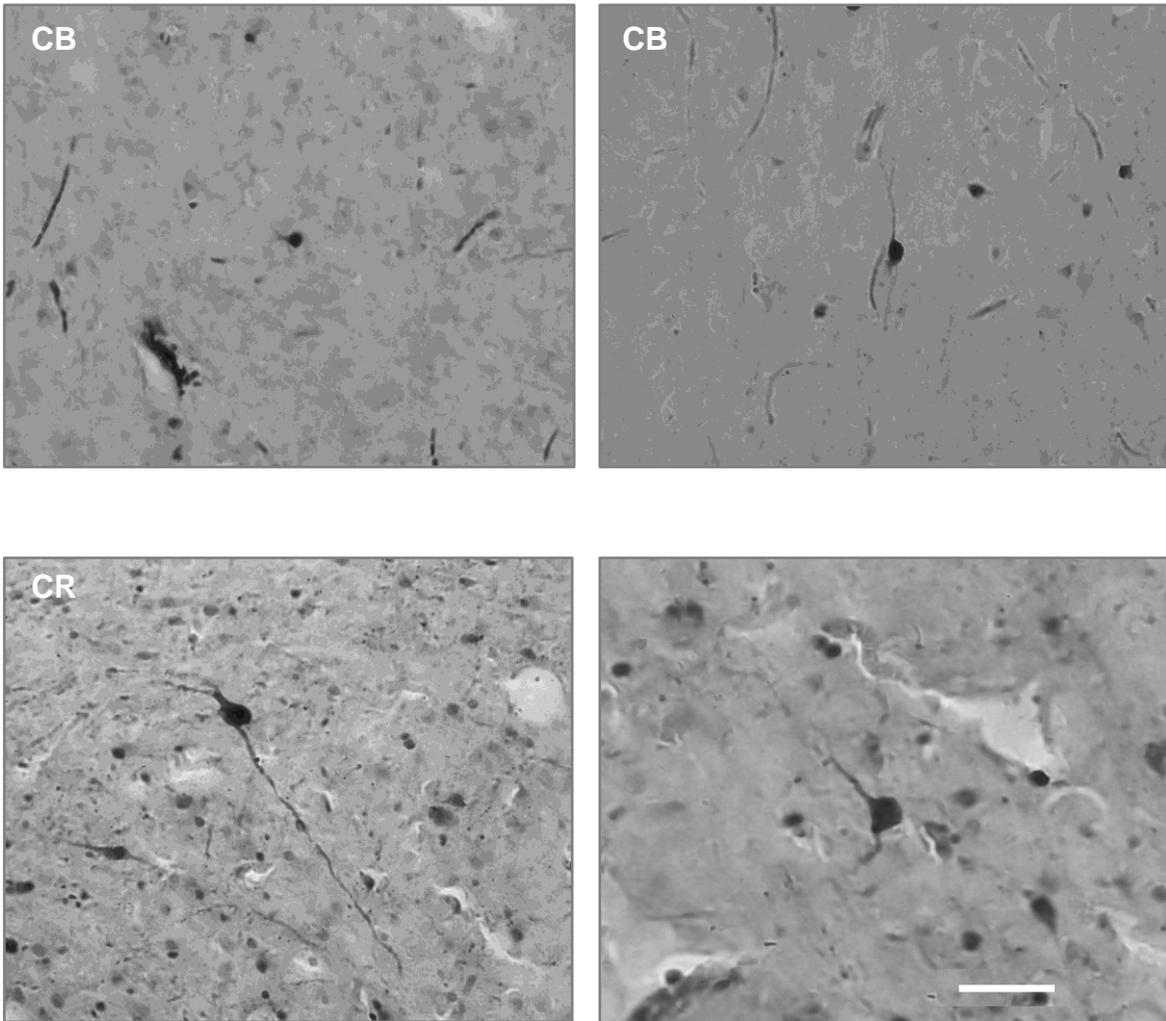
Micrografías a 40x, marcación con Anti-CB y Anti-CR, correspondiente a interneuronas de la lámina VI del área 10o. La barra corresponde a 50  $\mu$ m, la escala es igual en las 4 micrografías.

**Figura 34. Interneuronas positivas para PV de la lámina VI, área 10o**



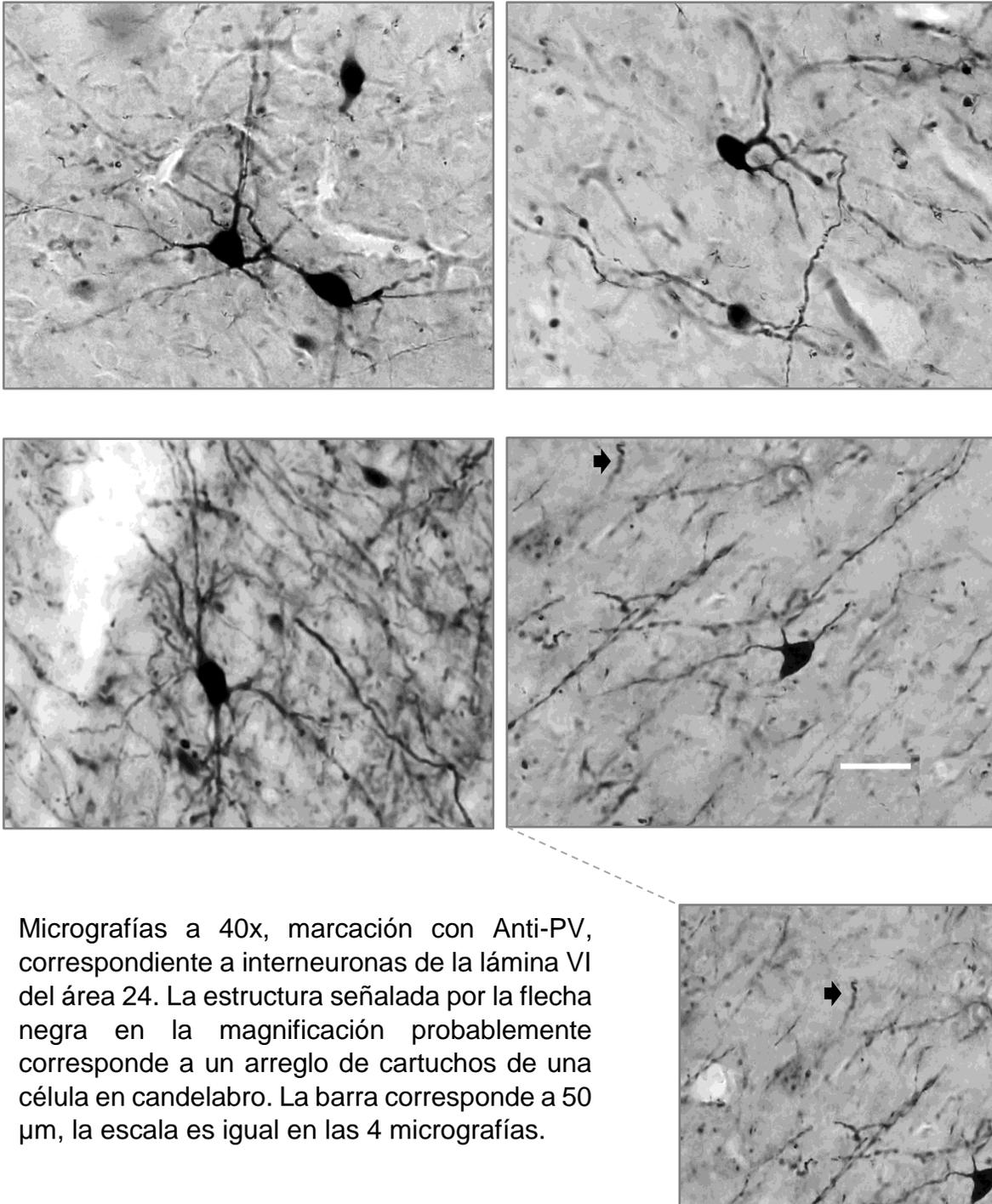
Micrografías a 40x, marcación con Anti-PV, correspondiente a interneuronas de la lámina VI del área 10o. La estructura señalada por la flecha negra en la magnificación probablemente corresponde a un arreglo de cartuchos de una célula en candelabro. La barra corresponde a 50  $\mu\text{m}$ , la escala es igual en las 4 micrografías.

**Figura 35. Interneuronas positivas para CB y CR de la lámina VI, área 24**



Micrografías a 40x, marcación con Anti-CB y Anti-CR, correspondiente a interneuronas de la lámina VI del área 24. La barra corresponde a 50  $\mu$ m, la escala es igual en las 4 micrografías.

**Figura 34. Interneuronas positivas para PV de la lámina VI, área 10o**



Micrografías a 40x, marcación con Anti-PV, correspondiente a interneuronas de la lámina VI del área 24. La estructura señalada por la flecha negra en la magnificación probablemente corresponde a un arreglo de cartuchos de una célula en candelabro. La barra corresponde a 50  $\mu\text{m}$ , la escala es igual en las 4 micrografías.

## 7. DISCUSIÓN

### 7.1 Tejido Cerebral

El desarrollo de las técnicas de neuroimagen ha permitido una exploración no invasiva cada vez más detallada de la anatomía cerebral. Recientemente el uso experimental de resonadores magnéticos de alta resolución espacial a 9.4 teslas permite obtener imágenes *in vivo* del tejido nervioso o de muestras fijadas en formalina en las que es posible identificar el patrón de organización laminar de la corteza cerebral (183, 184). Pese a este avance técnico, los estudios histológicos siguen siendo el patrón de oro para el estudio de la organización microscópica del sistema nervioso, ya que son los únicos que proporcionan la resolución espacial necesaria para la caracterización del tejido al nivel celular y los circuitos específicos formados por las neuronas.

En la actualidad la única forma de obtener tejido cerebral normal para estudios histológicos es mediante la consecución de muestras *postmortem* de personas que hayan fallecido por razones distintas a patologías propias del sistema nervioso. Este hecho limita la posibilidad de contar con grandes muestras para estudio, lo que en el presente trabajo se refleja en el uso de muestras de tejido cerebral de 5 sujetos y la utilización de pruebas no paramétricas para el análisis inferencial de las variables morfológicas consideradas. Sin embargo, el número de sujetos incluidos es similar al reportado por otros investigadores en el estudio de primates humanos y no humanos (Dombrowski y Col., 2001; Semenderifi y Col., 2001; Öngür y Col., 2003; Bludau y Col, 2004; Palomero-Gallagher y Col., 2008) (12,20,23,185,68), al

respecto otra fortaleza de este estudio es la utilización de muestras de tejido cerebral de ambos hemisferios cerebrales de cada sujeto.

Además del número de muestras de tejido cerebral disponibles, debe considerarse la forma en que las características propias del sujeto, mecanismo de muerte (tiempo de agonía antes de morir, pH cerebral) y procesamiento de las muestras (almacenamiento, tiempo transcurrido entre la muerte y la fijación del tejido, la técnica de fijación) pueden alterar las propiedades y características del tejido (186, 187). Los sujetos incluidos en el estudio fallecieron por lesiones traumáticas que no comprometían el encéfalo, el intervalo post mortem fue menor a 24 horas período de tiempo durante el cual se ha reportado no hay alteraciones significativas en el tejido cerebral (188), adicionalmente en el análisis de la organización laminar de ambas áreas corticales se consideró no solamente los valores absolutos, sino también los relativos, ya que se ha documentado que el procesos de fijación del tejido puede alterar el espesor cortical pero no la proporción entre las láminas corticales (187). Una variable que no se pudo evaluar en este estudio fue el impacto del pH sobre la organización laminar y neuronal, ya que no se contaba con esta información, en algunos estudios sobre la citoarquitectura de la corteza cerebral se ha reportado una correlación negativa entre el valor del pH cerebral y el tamaño y la forma de las neuronas particularmente en las láminas supragranulares (67, 189,190).

## **7.2 Organización Laminar del área 10o**

El uso de anticuerpos contra la *Proteína Nuclear Neuronal* (NeuN) permite la marcación de células neuronales maduras tanto piramidales como no piramidales

con algunas excepciones (27, 191) y su uso para el estudio de la citoarquitectura cortical ya ha sido validado respecto a técnicas más tradicionales como la tinción de Nissl (67). Adicionalmente, por tratarse de una proteína nuclear marca preferencialmente el núcleo y el pericarión de la célula, no así el neuropilo, hecho que lo hace un marcador ideal para la cuantificación neuronal y estimación de la forma del soma (192). Otra consideración metodológica es la utilización en este estudio del conteo bidimensional, el cual a pesar de tener limitaciones es comparable a las técnicas tridimensionales para el conteo neuronal y el estudio de relaciones espaciales entre células (193,194).

El área 10o tiene una organización hexalaminar, su lámina IV, aunque delgada, es fácilmente distinguible, se destaca en esta área además el gran desarrollo de las láminas supragranulares -particularmente de la lámina III- que en conjunto son más voluminosas que las infragranulares y de la lámina V en la que es posible distinguir una lámina superficial más densa (Va) y otra profunda (Vb) menos poblada, pero con células más grandes., finalmente una lámina VI con predominio de células piramidales modificadas y un límite claro y regular con la sustancia blanca subcortical adyacente. La descripción cualitativa de la organización laminar de esta área coincide con la hecha previamente por otros autores respecto a la porción basal del área 10 o porción orbital del área 10 polar (Semendeferi y Col., 2001; Öngür y Col., 2003) (23, 20) y permite clasificarla como una corteza granular, eulaminada de tipo I (Dombrowski y Col., 2001; Öngür y Col., 2003) (14, 29). Respecto a los datos cuantitativos, hay poca información publicada sobre la organización cuantitativa de la superficie orbital del área 10. El espesor cortical total

y el espesor cortical relativo encontrados coinciden con los reportados en la literatura (23, 194) y con los hallazgos previos reportados por otros investigadores en el Centro de Estudios Cerebrales (195, 196). En relación a la densidad neuronal de la lámina VI en el área 10o solo se encontró en la literatura el reporte hecho por Rajkowska y Col., (1999) (194) para la porción rostral de la región orbital, sin embargo, en su metodología usaron un disector óptico para conteo celular tridimensional y expresaron la densidad en número de células por  $\text{mm}^3$ , por lo que sus datos no son comparables con los obtenidos en esta investigación, sin embargo, el hallazgo es similar al encontrado por Buriticá y Col. (2007), en la regiones lateral y medial del área 10 polar (197). Al segregar las láminas en supragranulares (láminas II-III) e infragranulares (V-VI) la proporción del espesor cortical es mayor para las supragranulares que las infragranulares, lo que ya había sido reportado por Semendeferi y Col. (2001) y en las caras lateral y medial de la misma área (197).

Por otra parte, el dato encontrado respecto a la simetría en la organización laminar entre hemisferios no puede ser comparada con otros trabajos ya que como se mencionó en general estos solo incluían un hemisferio cerebral por cada sujeto estudiado. En este estudio no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en el espesor cortical o composición laminar entre hemisferios en el área 10o, la simetría entre ambos hemisferios indica que las muestras estudiadas corresponden a áreas homólogas en ambos hemisferios y refuerza la hipótesis propuesta por Rosen (1996) (199) de que las asimetrías funcionales entre áreas corticales no están en relación a diferencias en su tamaño sino a la organización intrínseca del área en cuestión.

Este estudio ofrece información cuantitativa útil para la caracterización citoarquitectónica de la región orbital del polo frontal. Al brindar datos sobre la organización celular de esta área cortical que en comparación a otras regiones prefrontales no ha sido caracterizada con detalle, además, sirve como punto de referencia anatómico para entender los patrones de conectividad de esta región, la interpretación de los datos de citoarquitectura y función obtenidos por técnicas de neuroimagen, así como los cambios que pudieran ocurrir en condiciones patológicas.

Se ha propuesto que en la corteza cerebral el procesamiento de la información ocurre de forma jerárquica, es decir, que se hace más abstracta desde las cortezas primarias que reciben información de los núcleos específicos del tálamo hasta las cortezas asociativas y multimodales (15, 24), en este sentido al área 10 se le ha vinculado con la integración de información en el grado más alto de abstracción como los estados mentales (Burgess y Col., 2005). Según los datos del presente estudio, el área 10o exhibe láminas supragranulares más prominentes, particularmente la lámina III que es en general la de mayor tamaño, este hallazgo sirve de sustento anatómico para las afirmaciones hechas sobre la función de esta área, ya que apunta a un predominio de aferencias y eferencias cortico-corticales, esto coincide con estudios de conectividad en los que se ha reportado que el área 10o establece conexiones recíprocas con otras áreas prefrontales o con áreas supramodales de la corteza temporal anterior y la región anterior del cíngulo (Barbas & Pandya, 1989; Cabada y Col., 200) (13, 36).

Otra consideración respecto a la organización laminar del área 10o y sus implicaciones funcionales tiene que ver con su patrón de conectividad. De acuerdo

al modelo planteado por Barbas & Rempel-Clover (1997) la estructura laminar de un área cortical predice los patrones de conectividad cortico-corticales. Según el modelo, en las áreas con nivel 4 de definición laminar -como el área 10o -las fibras de proyección hacia regiones con nivel 3 de definición laminar -áreas 11 y 14- se originan en las láminas supragranulares y hacen sinapsis en las láminas infragranulares de dichas áreas, mientras que las proyecciones recíprocas tienen un patrón opuesto. Öngür & Price (2000) propusieron que la corteza orbitofrontal debía considerarse parte de un circuito de la Corteza Orbitomedial Prefrontal (*OMPFC, por sus siglas en inglés*), mientras que la porción medial del circuito es el origen de la mayoría de las eferencias corticales a estructuras visceromotoras en el hipotálamo y el tallo cerebral la porción orbital recibe aferencias sensoriales de diferentes modalidades (40, 200). La participación del área 10o en este circuito *OMPFC* daría una explicación al predominio de láminas supragranulares encontrado en este estudio para esta área, dado que en ellas se originarían las eferencias hacia las áreas 11 y 14 y a ella llegarían las aferencias provenientes de dichas áreas corticales.

### **7.3 Organización laminar del área 24**

El área 24 adolece de lámina IV, es decir es agranular, tiene láminas II y III menos desarrolladas entre las cuales no es posible establecer un límite preciso, la lámina VI, más desarrollada, esta subdividida en una lámina Va superficial más delgada pero más densamente poblada que la lámina V que es más amplia, pero con una población neuronal más dispersa, finalmente la lámina VI está bien desarrollada y su espesor aunque ligeramente inferior al de la lámina V, no fue estadísticamente

significativo, su población neuronal es heterogénea y menos densa que la de la lámina V, sin embargo, es posible apreciar en ella agregados neuronales, el límite entre esta última lámina y la sustancia blanca subcortical adyacente es claro y regular.

Esta descripción cualitativa coincide con la descripción de la subregión 24a hecha por Braak's (1979), Vogt (1995), Öngür & Price (2003) y Palmero-Gallagher y Col. (2008) (69, 20, 65). A diferencia del área 10o, en el área las láminas infragranulares son más prominentes, tal como lo habían descrito los autores ya mencionados, sin embargo, ninguno de ellos hizo una descripción cuantitativa sobre el espesor cortical o la distribución laminar de esta área, Bouras y Col., (2001) (203) reportaron los siguientes valores de para el espesor laminar en mm para el área 24a, lámina II:  $0.24\pm 0.10$ , lámina III:  $0.65\pm 0.36$ , lámina V:  $0.86\pm 0.27$ , lámina VI:  $0.35\pm 0.15$ , los datos presentados por estos investigadores difieren significativamente de los encontrados en esta investigación, llama la atención también que describen una lámina V significativamente más gruesa que la lámina VI mientras que en las descripciones cualitativas citadas se señalan igual de desarrolladas, estas discrepancias podrían deberse a que estos investigadores utilizaron anticuerpos dirigidos dcontra la proteína asociada a microtúbulos MAP-2 para la cuantificación de las proporciones laminares. Por su parte, Cotter y Col., (2001) reportaron en los sujetos control de un estudio sobre cambios citoarquitectónicos en la región anterior del cíngulo un espesor cortical relativo para la lámina I de 10,8%, lámina II: 10,3%, lámina III: 25,2%, lámina V: 26,5%, lámina VI: 26.7% (189), en el presente estudio los valores obtenidos fueron los siguientes: la lámina I de 11,22%, lámina II: 4,84%, lámina III: 36,03%, lámina V: 24,30%, lámina VI: 25.30%. La discrepancia tan notoria

en la proporción de las láminas II y III entre las reportadas por Cotter y Col. y las encontradas en el presente estudio probablemente se deba a la subregión específica estudiada, aunque que los autores no hacen una descripción cualitativa de la misma en su metodología, señalan haber estudiado la subdivisión 24b de la región anterior del cíngulo. Estudios cualitativos previos han reportado que la mayor diferencia entre las subdivisiones 24a y 24b de la región anterior del cíngulo es que en esta última se encuentra una lámina II mucho más desarrollada y gruesa, y que el límite entre esta y la lámina III es mucho más preciso. En relación a la densidad neuronal Gittins & Harrison (2004) publicaron un estudio cuantitativo sobre la densidad, tamaño y forma de las neuronas en la región anterior del cíngulo, en dicho estudio, reportaron una densidad de 75 y 92 neuronas x mm<sup>2</sup> para la tinción de Nissl y la marcación con Anti-NeuN respectivamente, la discrepancia tan marcada respecto a la densidad encontrada en este estudio -1107 neuronas x mm<sup>2</sup>- podría explicarse por dos cosas, primero el tejido cerebral estudiado por los investigadores tenía un tiempo de fijación hasta de 4 meses, lo que alteraría no el conteo celular pero si el volumen de ellas y del tejido alterando así la densidad, segundo a pesar de que en ambos estudios se hizo un conteo bidimensional de las células Gittins & Harrison hicieron una corrección de los valores obtenidos según la metodología propuesta por Abercrombie (1946) para la estimación de poblaciones nucleares a partir de secciones de micrótomos (201), dicha corrección termina por disminuir la densidad estimada en un conteo bidimensional. En el estudio publicado por Benes y Col., (2001) (202) también reportan la densidad neuronal por láminas en el área 24a pero con la corrección ya descrita por lo que sus datos tampoco son comparables.

De acuerdo a los datos obtenidos en el presente estudio, desde el punto de vista de la organización laminar las características más sobresalientes del área 24 son la presencia de una lámina V bien desarrollada, incluso sublamina, con una lámina Va densamente poblada y el predominio de las láminas infragranulares sobre las supragranulares, sumados, estos datos sugieren que funcionalmente se trata de una región efectora o ejecutora, en este sentido recuerda la descripción de Braak's (1976) del campo de células gigante-piramidales en la región anterior del giro cíngulo y su símil con las células gigantes de Betz (204) del área motora primaria - otra área efectora-. Además, este patrón de distribución laminar daría cuenta de las profusas aferencias del área 24 no solo a regiones anatómicamente cercanas como la corteza orbitofrontal y el estriado ventral (Porrino y Col., 1981; Vogt & Pandya, 1987), sino también hasta estructuras más apartadas como la sustancia gris periacueductal (An y Col., 1998) e incluso núcleos autonómicos del tallo cerebral como el núcleo motor dorsal del vago o el núcleo parabraquial (77, 80, 81). De otro lado, de acuerdo al modelo de Barbas & Rempel-Clower (1997) las aferencias provenientes de áreas prefrontales harían contacto sináptico en las láminas infragranulares del área 24. Esta convergencia espacial de las aferencias de áreas asociativas con las aferencias hacia núcleos autonómicos podría servir como sustrato anatómico a la interfase entre las emociones y la retroalimentación autonómica periférica. De acuerdo a la explicación de los estados emocionales propuesta inicialmente por James (1878) las emociones son el resultado de la interpretación cortical de un estado visceral particular, la hipótesis de que la región anterior del cíngulo, particularmente el área 24, es el asiento anatómico de esta

asociación se sustenta no sólo en su patrón de aferencias y eferencias sino también, en estudios electrofisiológicos. La estimulación eléctrica del área 24 evoca manifestaciones fisiológicas tales como cambios en la frecuencia cardíaca y respiratoria, en la presión arterial, midriasis, piloerección y rubor (Pool, 1954; Escobedo y Col., 1973; Talairach y Col., 1973), además, los sujetos experimentales hicieron reportes verbales como “tenía miedo y mi corazón empezó a latir” (Bancaud & Talairach, 1992) (77, 82, 91).

De acuerdo a la revisión bibliográfica hecha no hay estudios publicados en los que se haga un análisis citomorfológico de las asimetrías interhemisféricas en el área 24. No es posible por lo tanto comparar de forma directa el hallazgo en este estudio de un mayor espesor cortical en el área 24 del hemisferio derecho con respecto al izquierdo, sin embargo, en estudio morfométricos por resonancia nuclear magnética Fernández-Jaén y Col., (2015) reportaron un mayor espesor cortical en la región anterior del cíngulo del hemisferio derecho en individuos sanos que sirvieron como control en un estudio sobre la relación entre el genotipo DAT1 del transportador de dopamina y el trastorno por déficit de atención e hiperactividad (205). Previamente en una evaluación de la anatomía macroscópica de la región anterior del cíngulo, también por resonancia nuclear magnética, Yücel y Col., (2001), reportaron un mayor volumen de esta región en el hemisferio derecho (206), aunque los investigadores no hicieron una evaluación directa del espesor cortical, Im y Col., (2008) reportaron una relación débil, pero positiva entre el tamaño cerebral y el espesor cortical, es decir, que cerebros más voluminosos se asociaban a un mayor espesor cortical (207).

La asimetría morfológica entre hemisferios en el área 24 -mayor espesor cortical en el hemisferio derecho- podría dar cuenta de las diferencias de conectividad y funcionales documentadas en humanos mediante técnicas de neuroimagen, fundamentalmente por resonancia nuclear magnética. Yan y Col., (2009) reportaron una mayor conectividad del hemisferio derecho con la corteza dorsolateral prefrontal, el lóbulo parietal del hemisferio ipsilateral y algunas regiones del cerebelo contralateral (208). Adicionalmente, en estudios funcionales se ha registrado una mayor actividad de la región anterior del cíngulo del hemisferio derecho durante pruebas relacionadas con detección de errores (*error processing*), la monitorización de conflictos (*conflict monitoring*) (209).

#### **7.4 Diferencias entre el Área 10o y el área 24**

Dos características distinguen al área 10o del área 24 respecto a su organización laminar de acuerdo a los datos obtenidos en el presente estudio. Primero, la mayor densidad neuronal observada en la lámina VI del área 10o, segundo, el mayor espesor cortical total del área 24.

Las diferencias en la organización histológica entre áreas corticales se reconocen desde los mapas corticales elaborados por Brodman (1909) y otros a principios del siglo pasado. Vogt (1910) propuso que, según su organización laminar, las áreas corticales fueran divididas en isocorteza -neocorteza- y allocorteza -paleocorteza y arquicorteza-. De acuerdo a esta descripción el área 10o por su organización hexalaminar hace parte de la isocorteza, el área 24 de otro lado, es catalogada como proisocorteza (Vogt & Vogt, 1956) -transición entre isocorteza y allocorteza- ya que carece de lámina granular interna -lámina IV- (210). Atendiendo a la

clasificación histológica descrita, Pakkengeberg & Gundersen (1997) reportaron que el espesor de las áreas allocorticales era siempre mayor en las áreas allocorticales respecto a las isocorticales (211), el hallazgo de un mayor espesor cortical en este estudio se ajusta a la descripción hecha por los autores. Al segregar las láminas, se observa que la diferencia entre áreas se debe a que las láminas V-VI tienen un mayor espesor en el área 24 que en el área 10o, mientras que la diferencia entre las láminas II-III no es significativa entre las áreas. La diferencia entre áreas respecto al espesor de las láminas infragranulares, estaría en relación a la descripción hecha del área 24 como un área ectora.

Pese a tener un menor espesor cortical total, el área 10o tiene un mayor número absoluto de neuronas y una mayor densidad neuronal respecto al área 24, esta discrepancia podría deberse a que el área 10o pese a tener un menor espesor cortical tuviera un mayor volumen, variable que no fue medida en este estudio. De acuerdo con los datos presentados por, Im y Col., (2008) sobre la estructura cortical en cerebros humanos adultos, un mayor volumen cortical sería resultado de un aumento en el tamaño y número de neuronas, no de un mayor espesor cortical (207). De acuerdo a la teoría planteada por Van Essen (1997) el crecimiento celular ocurriría preferencialmente en el eje tangencial a la superficie pial, ya que el eje radial ofrecería una resistencia mecánica, de otro lado, también se ha propuesto (Rakic, 1988, 2004) que un mayor número de neuronas resultaría en una expansión de la superficie cortical y no en el espesor cortical (212, 213).

## 7.5 Neuronas Gabaérgicas de la lámina VI

En el presente estudio se identificaron neuronas inmunoreactivas para Calbindina (CB), Calretinina (CR) y Parvoalbúmina (PV) en la lámina VI de las áreas corticales 10o y 24, si bien el número de interneuronas positivas para cada proteína atrapadora de calcio (*CaBP*, por sus siglas en inglés) fue ligeramente mayor en el área 24 que en el área 10o esta diferencia no fue estadísticamente significativa, Dombrowski y Col. (2001) reportaron solamente una mayor densidad de neuronas CB+ en el área 24 que en el área 10 medial, sin embargo, en su reporte no discriminaron la densidad por láminas (14). Tanto en el área 10o como en el área 24, en ambos hemisferios cerebrales, el número de interneuronas inmunoreactivas para PV fue mayor que el de las inmunoreactivas para CB o CR, además de su mayoría numérica, las neuronas PV + tuvieron un mayor tamaño. Las subpoblaciones de interneuronas CB+ y CR+ son homogéneas respecto a su número, tamaño y número de procesos primarios en ambas áreas corticales, distinguiéndose solamente por que las neuronas inmunoreactivas para CB se caracterizaron por tener una forma más esférica, en el área 24 las neuronas inmunoreactivas para CB mostraron un grado de esfericidad significativamente mayor que el de la población de neuronas PV +.

La gran mayoría de neuronas PV+ respecto a las neuronas CB+ y CR+ observadas en la lámina VI coincide con la descripción cualitativa hecha por Öngür y Price (2003), previamente Hof y Col., (1995) habían reportado la densidad de neuronas inmunoreactivas para CB y PV en la corteza orbitofrontal en  $\text{mm}^3$ , si bien los valores no son directamente comparables ya que en el presente estudio la densidad fue estimada en  $\text{mm}^2$ , los autores reportaron una mayor densidad de neuronas

inmunoreactivas para CR en las láminas supragranulares, particularmente la lámina II y valores similares para las células CR+ y PV+ en las láminas infragranulares (29, 20), sin embargo, no discriminaron las láminas V y VI y presentaron la densidad sumada de ambas láminas para cada marcador lo que explicaría porque no encontraron diferencia entre las dos subpoblaciones. Beasley & Reynolds (1997) reportaron un menor número de células por mm<sup>2</sup> en la lámina VI del área 10 del humano a la encontrada en el presente estudio, sin embargo, los autores no precisan la porción del área 10 estudiada lo que podría explicar la diferencia, ya que se ha reportado que la cantidad de neuronas positivas para PV en la lámina VI difiere entre las regiones medial, lateral y orbital del área 10 (214, 198).

En estudios cuantitativos sobre la distribución de interneuronas inmunoreactivas para CB, CR y PV en la corteza prefrontal dorsolateral del humano, Beasley y Col., (2002), Hashimoto y Col., (2003), Tooney & Chahl (2004), han reportado un patrón de distribución similar al encontrado en el presente estudio entre las interneuronas en la lámina VI, es decir, una proporción mucho mayor de neuronas PV+ (215 – 217).

De acuerdo a la descripción cualitativa hecha por Hof y Col., (1993), Vogt y Col. (1995) y Nimchinsky y Col., (1997) respecto a la distribución de las interneurona gabaérgicas identificadas de acuerdo a su expresión de las proteínas atrapadoras de calcio, la gran mayoría de las células inmunoreactivas para CB se encuentran en la porción superficial de la lámina II y la porción superficial de la lámina III, mientras que en las láminas profundas son casi inexistentes. Las células inmunoreactivas para CR se encuentran principalmente en las láminas II y III mientras que su densidad en las láminas V y VI es significativamente menor. Las neuronas

inmunoreactivas para PV en cambio se distribuyen en las láminas tanto supragranulares como infragranulares, mientras que en las láminas I y II se encuentran pequeñas células de forma bipolar u ovoide en las láminas V y VI hay una población e neuronas multipolares de mayor tamaño (94, 69, 95).

Además del estudio publicado por Cotter y Col., (2002) sobre la densidad y distribución espacial de interneuronas inmunoreactivas para CB, CR y PV en la región anterior del cíngulo en trastornos del estado de ánimo y esquizofrenia (218) no se encontraron otros estudios en los que se cuantificara la población de interneuronas del área 24 en general o de la lámina VI en particular. De acuerdo con los investigadores, la densidad de las tres poblaciones de interneuronas es significativamente menor en la lámina VI que en las otras y que entre ellas la mayor proporción corresponde a neuronas PV+, de otro lado esta subpoblación de interneuronas también corresponde a las de mayor tamaño, seguidas de las neuronas CR+ y en último lugar las neuronas CB+. Si bien los datos presentados por Cotter y Col., (2002) no son directamente comparables con los resultados obtenidos en este estudio ya que ellos los presentan en  $\text{mm}^3$  y no en  $\text{mm}^2$ , los resultados del presente estudio coinciden con el reporte de los investigadores de una mayor proporción y mayor tamaño de interneuronas parvoalbúmina positivas en la lámina VI.

## **7.6 Consideraciones Funcionales**

¿Qué implicaciones funcionales tiene para la lámina VI que la mayor proporción de interneuronas presentes en ella sean inmunoreactivas para parvoalbúmina?

Parvoalbúmina hace parte de la familia de las proteínas atrapadoras de calcio y es expresada principalmente por interneuronas que morfológicamente corresponden a células en candelabro y células en cesta (DeFelipe, 1997) (182). Estas neuronas se caracterizan por tener un patrón de disparo eléctrico rápido “*fast spiking*” y establecen conexiones sinápticas preferencialmente de tipo químico, pero también se ha documentado sinapsis de tipo eléctrico (219), el blanco sináptico de estas células corresponde al soma o al segmento proximal del axón o la dendrita de las neuronas piramidales. Se ha documentado que las neuronas inmunoreactivas para PV pueden ser blanco sináptico de neuronas CR+ que hacen contacto principalmente sobre el soma de estas células (Gabbot & Bacon, 1996).

De otro lado, entre la diversidad de la población neuronal de la lámina VI se distinguen unas neuronas piramidales cortas o de proyección cortico-cortical que hacen contacto sináptico principalmente en la lámina IV y piramidales altas o de proyección cortico-talámica que hace sinapsis principalmente en núcleos talámicos específicos (105, 106). De esta forma, la lámina VI ayuda a establecer un circuito que integraría la información procedente de núcleos específicos del tálamo (lámina IV) con la modulación cortical sobre la actividad talámica (Eferencia desde la lámina VI hacia el tálamo). La actividad inhibitoria perisomática de las interneuronas inmunoreactivas para parvoalbúmina (células en cesta), que de acuerdo a los resultados de este estudio representan la gran mayoría de la población de interneuronas de la lámina VI, las ubica en lugar privilegiado para la regulación de los circuitos cortico-talámicos a través de la modulación de la actividad de la de las neuronas piramidales de proyección cortico-talámica de la lámina VI.

Adicionalmente, se ha documentado que algunas células en cesta de la lámina VI hacen contacto sináptico con piramidales de la lámina IV (Lund y Col., 1988; Kumar & Ohana, 2008), lo que permitiría una mayor integración en el circuito. El circuito descrito estaría involucrado en la selección de estímulos o en fijar la atención.

## 8. CONCLUSIONES

Las áreas 10o y 24 hacen parte de momentos evolutivos diferentes de la corteza cerebral. Mientras que el área 10o exhibe la distribución hexalaminar típica de la neocorteza -aunque con una menor definición de la lámina IV que las áreas prefrontales de la cara dorsolateral- el área 24 adolece de una lámina granular interna y su definición de lámina II es pobre, al igual que su transición con la lámina III, lo que la ubica como un área de transición entre la isocorteza y la allocorteza. Además, dada la diferencia en la proporción de láminas supragranulares e infragranulares entre las áreas, el área 10o podría considerarse un área fundamentalmente asociativa, mientras que el área 24 es un área efectora o ejecutora.

Con base en su homogeneidad, es probable que las tres subpoblaciones de interneuronas (CB+, CR+ y PV+) participen de circuitos similares indistintamente del área cortical o el hemisferio en el que se encuentre, ya que no se encontraron diferencias significativas en las características morfológicas evaluadas en las tres subpoblaciones de interneuronas entre áreas corticales o entre hemisferios en una misma área cortical.

La participación de la lámina VI en el circuito cortico-talámico y el predominio de las células inmunoreactivas para parvoalbúmina en esta lámina sugieren un rol importante de estas neuronas en la modulación de dicho circuito, lo que las involucraría con los procesos atencionales y la selección de estímulos sensitivos.

## 9. BIBLIOGRAFÍA

1. Mazzarello, P. (1999). A unifying concept: the history of cell theory. *Nat Cell Biol*, 1(1), E13–E15.
2. Rovetto, P. (2008). Ideas Médicas: Una mirada histórica (1st ed.). Cali: Programa Editorial Universidad del Valle.
3. Peters, A., & Jones, E. G. (1985). Cerebral Cortex (1st ed.). New York: Plenum.
4. Zilles, K., & Amunts, K. (2012). The Human Nervous System. The Human Nervous System. Elsevier.
5. Fuster JM. (1997). The Prefrontal Cortex: Anatomy, Physiology and Neuropsychology of the Frontal Lobe. Philadelphia: Lippincott-Raven.
6. Fuster, J. M. (2008). The Prefrontal Cortex. Los Ángeles: Elsevier.
7. Passingham, R. (1993). The Frontal Lobes and Voluntary Actions (1st ed.). New York: Oxford University Press.
8. Petrides, M., & Pandya, D. N. (2012). The Human Nervous System. The Human Nervous System. Elsevier. <http://doi.org/10.1016/B978-0-12-374236-0.10026-4>
9. Koechlin, E., Ody, C., & Kouneiher, F. (2003). The Architecture of Cognitive Control in the Human Prefrontal Cortex. *Science*, 302(5648), 1181–1185.
10. Lewis, D. A., Melchitzky, D. S., & Burgos, G.-G. (n.d.). Specificity in the functional architecture of primate prefrontal cortex. *Journal of Neurocytology*, 31(3), 265–276. <http://doi.org/10.1023/A:1024174026286>

11. Petrides, M. (2005). Lateral prefrontal cortex: architectonic and functional organization. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 360(1456), 781–795.
12. Barbas, H., & Rempel-Clower, N. (1997). Cortical structure predicts the pattern of corticocortical connections. *Cerebral Cortex*, 7 (7), 635–646.
13. Barbas, H., & Pandya, D. N. (1989). Architecture and intrinsic connections of the prefrontal cortex in the rhesus monkey. *The Journal of Comparative Neurology*, 286(3), 353–375.
14. Dombrowski, S. M., Hilgetag, C. C., & Barbas, H. (2001). Quantitative Architecture Distinguishes Prefrontal Cortical Systems in the Rhesus Monkey. *Cerebral Cortex*, 11 (10), 975–988.
15. Ramnani, N., & Owen, A. M. (2004). Anterior prefrontal cortex: insights into function from anatomy and neuroimaging. *Nat Rev Neurosci*, 5(3), 184–194.
16. Buriticá-Ramírez, E., & Pimienta-Jiménez, H. J. (2007). Corteza frontopolar humana: área 10. *Revista Latinoamericana de Psicología*.
17. Dumontheil, I., Burgess, P. W., & Blakemore, S.-J. (2008). Development of rostral prefrontal cortex and cognitive and behavioural disorders. *Developmental Medicine & Child Neurology*, 50(3), 168–181.
18. Brodmann, K. (2006). Brodmann's Localisation in the Cerebral Cortex. (T. Garey, L.J., *Translator*) (1st ed.). Springer US.
19. Carmichael, S. T., & Price, J. L. (1994). Architectonic subdivision of the orbital and medial prefrontal cortex in the macaque monkey. *The Journal of Comparative Neurology*, 346(3), 366–402.

20. Öngür, D., Ferry, A. T., & Price, J. L. (2003). Architectonic subdivision of the human orbital and medial prefrontal cortex. *The Journal of Comparative Neurology*, 460(3), 425–449.
21. Petrides, M., & Pandya, D. N. (1999). Dorsolateral prefrontal cortex: comparative cytoarchitectonic analysis in the human and the macaque brain and corticocortical connection patterns. *The European Journal of Neuroscience*, 11(3), 1011–1036.
22. Petrides, M., & Pandya, D. N. (2002). Comparative cytoarchitectonic analysis of the human and the macaque ventrolateral prefrontal cortex and corticocortical connection patterns in the monkey. *The European Journal of Neuroscience*, 16(2), 291–310.
23. Semendeferi, K., Armstrong, E., Schleicher, A., Zilles, K., & Van Hoesen, G. W. (2001). Prefrontal cortex in humans and apes: a comparative study of area 10. *American Journal of Physical Anthropology*, 114(3), 224–241.
24. Jacobs, B., Schall, M., Prather, M., Kapler, E., Driscoll, L., Baca, S., Trembl, M. (2001). Regional dendritic and spine variation in human cerebral cortex: a quantitative golgi study. *Cerebral Cortex*, 11(6), 558–571.
25. Perlaza Lozano, O. I., Buriticá Ramírez, E., Umbarila Prieto, J., Arteaga Díaz, G., & Pimienta Jiménez, H. J. (2010). Corteza Prefrontal Humana: Áreas 10m, 11o Y 46d Citoarquitectura E Implicaciones Funcionales. *Revista Salud UIS*, 37 (1).
26. Hof, P. R., Mufson, E. J., & Morrison, J. H. (1995). Human orbitofrontal cortex: cytoarchitecture and quantitative immunohistochemical parcellation. *The Journal of Comparative Neurology*, 359(1), 48–68.

27. Mullen, R. J., Buck, C. R., & Smith, A. M. (1992). NeuN, a neuronal specific nuclear protein in vertebrates. *Development (Cambridge, England)*, 116(1), 201–211.
28. Baimbridge, K. G., Celio, M. R., & Rogers, J. H. (1992). Calcium-binding proteins in the nervous system. *Trends in Neurosciences*, 15(8), 303–308.
29. Hof, P. R., Glezer, I. I., Conde, F., Flagg, R. A., Rubin, M. B., Nimchinsky, E. A., & Vogt Weisenhorn, D. M. (1999). Cellular distribution of the calcium-binding proteins parvalbumin, calbindin, and calretinin in the neocortex of mammals: phylogenetic and developmental patterns. *Journal of Chemical Neuroanatomy*, 16(2), 77–116.
30. Arteaga, G., Buritica, E., Escobar, M. I., & Pimienta, H. (2015). Human prefrontal layer II interneurons in areas 46, 10 and 24. *Colombia Médica*; Vol 46, No 1 (2015).
31. Arteaga D, Gabriel; Pimienta J, Hernán; Escobar B, M. (2004). Neuronas Inmunoreactivas a Parvalbúmina y Calbindina en la Corteza Prefrontal Dorsolateral de Sujetos Humanos. *Acta Neurol Colomb*, 20(3), 105–118.
32. McGuire, P. K., Bates, J. F., & Goldman-Rakic, P. S. (1991). Interhemispheric integration: I. Symmetry and convergence of the corticocortical connections of the left and the right principal sulcus (PS) and the left and the right supplementary motor area (SMA) in the rhesus monkey. *Cerebral Cortex*, 1(5), 390–407.
33. Bachevalier, J., Meunier, M., Lu, X. M., & Ungerleider, G. L. (n.d.). Thalamic and temporal cortex input to medial prefrontal cortex in rhesus monkeys. *Experimental Brain Research*, 115(3), 430–444.

34. Zeki, S., & Shipp, S. (1988). The functional logic of cortical connections. *Nature*, 335(6188), 311–317.
35. Bates, J. F., & Goldman-Rakic, P. S. (1993). Prefrontal connections of medial motor areas in the rhesus monkey. *The Journal of Comparative Neurology*, 336(2), 211–228.
36. Cavada, C., Company, T., Tejedor, J., Cruz-Rizzolo, R. J., & Reinoso-Suarez, F. (2000). The anatomical connections of the macaque monkey orbitofrontal cortex. A review. *Cerebral Cortex*, 10(3), 220–242.
37. Morecraft, R. J., & Van Hoesen, G. W. (1993). Frontal granular cortex input to the cingulate (M3), supplementary (M2) and primary (M1) motor cortices in the rhesus monkey. *The Journal of Comparative Neurology*, 337(4), 669–689.
38. Hackett, T. A., Stepniewska, I., & Kaas, J. H. (1999). Prefrontal connections of the parabelt auditory cortex in macaque monkeys. *Brain Research*, 817(1-2), 45–58.
39. Ferry, A. T., Ongur, D., An, X., & Price, J. L. (2000). Prefrontal cortical projections to the striatum in macaque monkeys: evidence for an organization related to prefrontal networks. *The Journal of Comparative Neurology*, 425(3), 447–470.
40. Ongur, D., & Price, J. L. (2000). Ongu within the orbital and medial prefrontal cortex of rats, monkeys and humans. *Cerebral Cortex*, 10(3), 206–219.
41. Xiao, D., & Barbas, H. (2002). Pathways for emotions and memory: I. Input and output zones linking the anterior thalamic nuclei with prefrontal cortices in the rhesus monkey. *Thalamus & Related Systems*, 2(1), 21–32.

42. Schmahmann, J. D., & Pandya, D. N. (1997). Anatomic Organization of the Basilar Pontine Projections from Prefrontal Cortices in Rhesus Monkey. *The Journal of Neuroscience*, 17 (1), 438–458.
43. Ghashghaei, H. T., & Barbas, H. (2002). Pathways for emotion: interactions of prefrontal and anterior temporal pathways in the amygdala of the rhesus monkey. *Neuroscience*, 115(4), 1261–1279.
44. Burgess, P. W., Gilbert, S. J., & Dumontheil, I. (2007). Function and localization within rostral prefrontal cortex (area 10). *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, 362(1481), 887–899.
45. Sanides, f. (1964). The Cyto-Myeloarchitecture Of The Human Frontal Lobe And Its Relation To Phylogenetic Differentiation Of The Cerebral Cortex. *Journal Fur Hirnforschung*, 7, 269–282.
46. Fuster, J. M. (2000). Executive frontal functions. *Experimental Brain Research*, 133(1), 66–70.
47. Fuster, J. M. (2000). Memory networks in the prefrontal cortex. *Progress in Brain Research*, 122, 309–316.
48. Shallice, T., & Burgess, P. W. (1991). Deficits in strategy application following frontal lobe damage in man. *Brain : A Journal of Neurology*, 114 ( Pt 2), 727–741.
49. Burgess, P. W. (2000). Strategy application disorder: the role of the frontal lobes in human multitasking. *Psychological Research*, 63(3-4), 279–288.
50. Goel, V., & Grafman, J. (2000). Role of the right prefrontal cortex in ill-structured planning. *Cognitive Neuropsychology*, 17(5), 415–436.

51. Cabeza, R., & Nyberg, L. (2000). Imaging cognition II: An empirical review of 275 PET and fMRI studies. *Journal of Cognitive Neuroscience*, 12(1), 1–47.
52. Braver, T. S., Barch, D. M., Kelley, W. M., Buckner, R. L., Cohen, N. J., Miezin, F. M., Petersen, S. E. (2001). Direct comparison of prefrontal cortex regions engaged by working and long-term memory tasks. *NeuroImage*, 14(1 Pt 1), 48–59.
53. Zysset, S., Huber, O., Samson, A., Ferstl, E. C., & von Cramon, D. Y. (2003). Functional specialization within the anterior medial prefrontal cortex: a functional magnetic resonance imaging study with human subjects. *Neuroscience Letters*, 335(3), 183–186.
54. Rugg, M. D., Fletcher, P. C., Frith, C. D., Frackowiak, R. S., & Dolan, R. J. (1996). Differential activation of the prefrontal cortex in successful and unsuccessful memory retrieval. *Brain: A Journal of Neurology*, 119 ( Pt 6), 2073–2083.
55. Frith, U., & Frith, C. D. (2003). Development and neurophysiology of mentalizing. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, 358(1431), 459–473.
56. Johnson, S. C., Baxter, L. C., Wilder, L. S., Pipe, J. G., Heiserman, J. E., & Prigatano, G. P. (2002). Neural correlates of self-reflection. *Brain: A Journal of Neurology*, 125(Pt 8), 1808–1814.
57. Koechlin, E., Corrado, G., Pietrini, P., & Grafman, J. (2000). Dissociating the role of the medial and lateral anterior prefrontal cortex in human planning. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(13), 7651–7656.

58. Fletcher, P. C., & Henson, R. N. (2001). Frontal lobes and human memory: insights from functional neuroimaging. *Brain: A Journal of Neurology*, 124(Pt 5), 849–881.
59. Gusnard, D. A., Raichle, M. E., & Raichle, M. E. (2001). Searching for a baseline: functional imaging and the resting human brain. *Nature Reviews. Neuroscience*, 2(10), 685–694.
60. Raichle, M. E., & Snyder, A. Z. (2007). A default mode of brain function: a brief history of an evolving idea. *NeuroImage*, 37(4), 1083–1089.
61. Allman, J. M., Hakeem, A., Erwin, J. M., Nimchinsky, E., & Hof, P. (2001). The anterior cingulate cortex. The evolution of an interface between emotion and cognition. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 935, 107–117.
62. Yücel, M., Wood, S. J., Fornito, A., Riffkin, J., Velakoulis, D., & Pantelis, C. (2003). Anterior cingulate dysfunction: ¿Implications for psychiatric disorders? *Journal of Psychiatry and Neuroscience*, 28(5), 350–354.
63. Vogt, G. (1993). *Neurobiology of Cingulate Cortex and Limbic Thalamus* (1st ed.). New York: Birkhäuser Basel.
64. Casey, B. J., Yeung, N., & Fossella, J. (2002). Anterior Cingulate Cortex - Ramachandran, V.S. BT - *Encyclopedia of the Human Brain* (pp. 145–157). New York: Academic Press.
65. Vogt, B. A., & Palomero-Gallagher, N. (2012). Chapter 25 - Cingulate Cortex A2 - Mai, Jürgen K. In G. B. T.-T. H. N. S. (Third E. Paxinos (Ed.)), (pp. 943–987). San Diego: Academic Press.
66. Vogt, B. A. (2015). Mapping Cingulate Subregions A2 - Toga, Arthur W. BT - *Brain Mapping* (pp. 325–339). Waltham: Academic Press.

67. Gittins, R., & Harrison, P. J. (2004). Neuronal density, size and shape in the human anterior cingulate cortex: a comparison of Nissl and NeuN staining. *Brain Research Bulletin*, 63(2), 155–160.
68. Palomero-Gallagher, N., Mohlberg, H., Zilles, K., & Vogt, B. A. (2008). Cytology and Receptor Architecture of Human Anterior Cingulate Cortex. *The Journal of Comparative Neurology*, 508(6), 906–926.
69. Vogt, B. A., Nimchinsky, E. A., Vogt, L. J., & Hof, P. R. (1995). Human cingulate cortex: surface features, flat maps, and cytoarchitecture. *The Journal of Comparative Neurology*, 359(3), 490–506.
70. Picard, N., & Strick, P. L. (2001). Imaging the premotor areas. *Current Opinion in Neurobiology*, 11(6), 663–672.
71. Jones, A. K. P., Qi, L. Y., Fujirawa, T., Luthra, S. K., Ashburner, J., Bloomfield, P. Jones, T. (1991). In vivo distribution of opioid receptors in man in relation to the cortical projections of the medial and lateral pain systems measured with positron emission tomography. *Neuroscience Letters*, 126(1), 25–28.
72. Vogt, B. A., Wiley, R. G., & Jensen, E. L. (1995). Localization of Mu and Delta Opioid Receptors to Anterior Cingulate Afferents and Projection Neurons and Input/Output Model of Mu Regulation. *Experimental Neurology*, 135(2), 83–92.
73. Navratilova, E., Xie, J. Y., Meske, D., Qu, C., Morimura, K., Okun, A., Porreca, F. (2015). Endogenous Opioid Activity in the Anterior Cingulate Cortex Is Required for Relief of Pain. *The Journal of Neuroscience*, 35(18), 7264–7271.
74. Clark, W. E. L. G., & Boggon, R. H. (1935). The Thalamic Connections of the Parietal and Frontal Lobes of the Brain in the Monkey. *Philosophical*

Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences, 224(515), 313–359.

75. Beckmann, M., Johansen-Berg, H., & Rushworth, M. F. S. (2009). Connectivity-based parcellation of human cingulate cortex and its relation to functional specialization. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 29(4), 1175–1190.
76. Picard, N., & Strick, P. L. (1996). Motor areas of the medial wall: a review of their location and functional activation. *Cerebral Cortex (New York, N.Y.: 1991)*, 6(3), 342–353.
77. Critchley, H. D., Mathias, C. J., Josephs, O., O'Doherty, J., Zanini, S., Dewar, B.-K., Dolan, R. J. (2003). Human cingulate cortex and autonomic control: converging neuroimaging and clinical evidence. *Brain: A Journal of Neurology*, 126(Pt 10), 2139–2152.
78. Porrino, L. J., & Goldman-Rakic, P. S. (1982). Brainstem innervation of prefrontal and anterior cingulate cortex in the rhesus monkey revealed by retrograde transport of HRP. *The Journal of Comparative Neurology*, 205(1), 63–76.
79. Vogt, B. A., Finch, D. M., & Olson, C. R. (1992). Functional heterogeneity in cingulate cortex: the anterior executive and posterior evaluative regions. *Cerebral Cortex (New York, N.Y.: 1991)*, 2(6), 435–443.
80. Medford, N., & Critchley, H. D. (2010). Conjoint activity of anterior insular and anterior cingulate cortex: awareness and response. *Brain Structure & Function*, 214(5-6), 535–549.

81. Seeley, W. W., Menon, V., Schatzberg, A. F., Keller, J., Glover, G. H., Kenna, H., Greicius, M. D. (2007). Dissociable Intrinsic Connectivity Networks for Salience Processing and Executive Control. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 27(9), 2349–2356.
82. Verberne, A. J., & Owens, N. C. (1998). Cortical modulation of the cardiovascular system. *Progress in Neurobiology*, 54(2), 149–168.
83. Jones, B. F., Groenewegen, H. J., & Witter, M. P. (2005). Intrinsic connections of the cingulate cortex in the rat suggest the existence of multiple functionally segregated networks. *Neuroscience*, 133(1), 193–207.
84. Vogt, B. A., & Laureys, S. (2005). Posterior cingulate, precuneal and retrosplenial cortices: cytology and components of the neural network correlates of consciousness. *Progress in Brain Research*, 150, 205–217.
85. Apps, M. A. J., Lockwood, P. L., & Balsters, J. H. (2013). The role of the midcingulate cortex in monitoring others' decisions. DOI=10.3389/fnins.2013.00251.
86. Maddock, R. J., Garrett, A. S., & Buonocore, M. H. (2001). Remembering familiar people: the posterior cingulate cortex and autobiographical memory retrieval. *Neuroscience*, 104(3), 667–676.
87. Brewer, J. A., & Garrison, K. A. (2014). The posterior cingulate cortex as a plausible mechanistic target of meditation: findings from neuroimaging. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1307, 19–27.
88. Leech, R., & Sharp, D. J. (2014). The role of the posterior cingulate cortex in cognition and disease. *Brain : A Journal of Neurology*, 137(Pt 1), 12–32.

89. Sugar, J., Witter, M. P., van Strien, N. M., & Cappaert, N. L. M. (2011). The Retrosplenial Cortex: Intrinsic Connectivity and Connections with the (Para)Hippocampal Region in the Rat. An Interactive Connectome. *Frontiers in Neuroinformatics*, 5, 7. <http://doi.org/10.3389/fninf.2011.00007>
90. Nelson, A. J. D., Hindley, E. L., Haddon, J. E., Vann, S. D., & Aggleton, J. P. (2014). A novel role for the rat retrosplenial cortex in cognitive control. *Learning & Memory (Cold Spring Harbor, N.Y.)*, 21(2), 90–97.
91. Luu, P., & Posner, M. I. (2003, October). Anterior cingulate cortex regulation of sympathetic activity. *Brain: A Journal of Neurology*. England.
92. Bush, G., Luu, P., & Posner, M. I. (2000). Cognitive and emotional influences in anterior cingulate cortex. *Trends in Cognitive Sciences*, 4(6), 215–222.
93. Vogt, B. A. (2005). Pain and Emotion Interactions in Subregions of the Cingulate Gyrus. *Nature Reviews. Neuroscience*, 6(7), 533–544.
94. Hof, P. R., Lüth, H.-J., Rogers, J. H., & Celio, M. R. (1993). Calcium-Binding Proteins Define Subpopulations of Interneurons in Cingulate Cortex BT- *Neurobiology of Cingulate Cortex and Limbic Thalamus: A Comprehensive Handbook*. In B. A. Vogt & M. Gabriel (Eds.), (pp. 181–205). Boston, MA: Birkhäuser Boston.
95. Nimchinsky, E. A., Vogt, B. A., Morrison, J. H., & Hof, P. R. (1997). Neurofilament and calcium-binding proteins in the human cingulate cortex. *The Journal of Comparative Neurology*, 384(4), 597–620.
96. Thomson, A. M. (2010). Neocortical Layer 6, A Review. *Frontiers in Neuroanatomy*, 4, 13. <http://doi.org/10.3389/fnana.2010.00013>

97. Briggs, F. (2010). Organizing Principles of Cortical Layer 6. *Frontiers in Neural Circuits*, 4, 3. <http://doi.org/10.3389/neuro.04.003.2010>
98. Gilmore, E. C., & Herrup, K. (1997). Cortical development: Layers of complexity. *Current Biology*, 7(4), R231–R234.
99. Marin-Padilla, M. (1979.). Dual origin of the mammalian neocortex and evolution of the cortical plate. *Anatomy and Embryology*, 152(2), 109–126.
100. Grant, E., Hoerder-Suabedissen, A., & Molnár, Z. (2012). Development of the Corticothalamic Projections. *Frontiers in Neuroscience*, 6, 53.
101. Miller, B., Chou, L., & Finlay, B. L. (1993). The early development of thalamocortical and corticothalamic projections. *The Journal of Comparative Neurology*, 335(1), 16–41.
102. Velez-Fort, M., Rousseau, C. V, Niedworok, C. J., Wickersham, I. R., Rancz, E. A., Brown, A. P. Y., ... Margrie, T. W. (2014). The stimulus selectivity and connectivity of layer six principal cells reveals cortical microcircuits underlying visual processing. *Neuron*, 83(6), 1431–1443.
103. Bourassa, J., & Deschenes, M. (1995). Corticothalamic projections from the primary visual cortex in rats: a single fiber study using biocytin as an anterograde tracer. *Neuroscience*, 66(2), 253–263.
104. Killackey, H. P., & Sherman, S. M. (2003). Corticothalamic projections from the rat primary somatosensory cortex. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 23(19), 7381–7384.
105. Mercer, A., West, D. C., Morris, O. T., Kirchhecker, S., Kerkhoff, J. E., & Thomson, A. M. (2005). Excitatory connections made by presynaptic

- cortico-cortical pyramidal cells in layer 6 of the neocortex. *Cerebral Cortex* (New York, N.Y.: 1991), 15(10), 1485–1496.
106. West, D. C., Mercer, A., Kirchhecker, S., Morris, O. T., & Thomson, A. M. (2006). Layer 6 cortico-thalamic pyramidal cells preferentially innervate interneurons and generate facilitating EPSPs. *Cerebral Cortex* (New York, N.Y.: 1991), 16(2), 200–211.
107. Lund, J. S., Hawken, M. J., & Parker, A. J. (1988). Local circuit neurons of macaque monkey striate cortex: II. Neurons of laminae 5B and 6. *The Journal of Comparative Neurology*, 276(1), 1–29.
108. Isaacson, J. S., & Scanziani, M. (2011). How Inhibition Shapes Cortical Activity. *Neuron*, 72(2), 231–243.
109. Anderson, J. S., Carandini, M., & Ferster, D. (2000). Orientation tuning of input conductance, excitation, and inhibition in cat primary visual cortex. *Journal of Neurophysiology*, 84(2), 909–926.
110. Jones, E. G. (1993). GABAergic neurons and their role in cortical plasticity in primates. *Cerebral Cortex* (New York, N.Y.: 1991), 3(5), 361–372.
111. Garraghty, P. E., Hanes, D. P., Florence, S. L., & Kaas, J. H. (1994). Pattern of peripheral deafferentation predicts reorganizational limits in adult primate somatosensory cortex. *Somatosensory & Motor Research*, 11(2), 109–117.
112. Shipp, S. (2007). Structure and function of the cerebral cortex. *Current Biology*, 17(12), R443–R449.

113. Rowley, N. M., Madsen, K. K., Schousboe, A., & Steve White, H. (2012). Glutamate and GABA synthesis, release, transport and metabolism as targets for seizure control. *Neurochemistry International*, 61(4), 546–558.
114. Olah, S., Fule, M., Komlosi, G., Varga, C., Baldi, R., Barzo, P., & Tamas, G. (2009). Regulation of cortical microcircuits by unitary GABA-mediated volume transmission. *Nature*, 461(7268), 1278–1281.
115. Andres-Barquin, P. J. (2001). Ramón y Cajal: a century after the publication of his masterpiece. *Endeavour*, 25(1), 13–17.
116. Jinno, S. (2009). Structural Organization of Long-Range GABAergic Projection System of the Hippocampus. *Frontiers in Neuroanatomy*, 3, 13.
117. Somogyi, P., Tamas, G., Lujan, R., & Buhl, E. H. (1998). Salient features of synaptic organisation in the cerebral cortex. *Brain Research. Brain Research Reviews*, 26(2-3), 113–135.
118. DeFelipe, J. (2002). Chapter 17 Cortical interneurons: from Cajal to 2001. In B. T.-P. in B. Research (Ed.), *Changing Views of Cajal's Neuron* (Vol. Volume 136, pp. 215–238). Elsevier.
119. Ong, W. Y., & Garey, L. J. (1991). Distribution of GABA and neuropeptides in the human cerebral cortex. A light and electron microscopic study. *Anatomy and Embryology*, 183(4), 397–413.
120. Hornung, J.-P., & De Tribolet, N. (1995). Neurotransmitters in the Human Brain. In D. J. Tracey, G. Paxinos, & J. Stone (Eds.), (pp. 41–60). Boston, MA: Springer US.

121. Hornung, J.-P., & De Tribolet, N. (1994). Distribution of GABA-containing neurons in human frontal cortex: a quantitative immunocytochemical study. *Anatomy and Embryology*, 189(2), 139–145.
122. Lovett-Barron, M., & Losonczy, A. (2014). Behavioral consequences of GABAergic neuronal diversity. *Current Opinion in Neurobiology*, 26, 27–33.
123. Markram, H., Toledo-Rodriguez, M., Wang, Y., Gupta, A., Silberberg, G., & Wu, C. (2004). Interneurons of the neocortical inhibitory system. *Nature Reviews. Neuroscience*, 5(10), 793–807.
124. Yuste, R. (2005, November). Origin and classification of neocortical interneurons. *Neuron*. United States.
125. Gupta, A., Wang, Y., & Markram, H. (2000). Organizing principles for a diversity of GABAergic interneurons and synapses in the neocortex. *Science (New York, N.Y.)*, 287(5451), 273–278.
126. Staiger, J. F. (2015). Cortical GABAergic Neurons A2 - Toga, Arthur W. BT - Brain Mapping (pp. 69–80). Waltham: Academic Press.
127. Schwartz, M. L., Zheng, D. S., & Goldman-Rakic, P. S. (1988). Periodicity of GABA-containing cells in primate prefrontal cortex. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 8(6), 1962–1970.
128. Kepecs, A., & Fishell, G. (2014). Interneuron Cell Types: Fit to form and formed to fit. *Nature*, 505(7483), 318–326.
129. Druga, R. (2009). Neocortical inhibitory system. *Folia Biologica*, 55(6), 201–217.

130. Ko, J., Choi, G., & Um, J. W. (2015). The balancing act of GABAergic synapse organizers. *Trends in Molecular Medicine*, 21(4), 256–268.
131. Ascoli, G. A., Alonso-Nanclares, L., Anderson, S. A., Barrionuevo, G., Benavides-Piccione, R., Burkhalter, A., ... Yuste, R. (2008). Petilla terminology: nomenclature of features of GABAergic interneurons of the cerebral cortex. *Nature Reviews. Neuroscience*, 9(7), 557–568.
132. DeFelipe, J., Lopez-Cruz, P. L., Benavides-Piccione, R., Bielza, C., Larranaga, P., Anderson, S., ... Ascoli, G. A. (2013). New insights into the classification and nomenclature of cortical GABAergic interneurons. *Nature Reviews. Neuroscience*, 14(3), 202–216.
133. Benes, F. M., & Berretta, S. (2001). GABAergic interneurons: implications for understanding schizophrenia and bipolar disorder. *Neuropsychopharmacology: Official Publication of the American College of Neuropsychopharmacology*, 25(1), 1–27.
134. Hamilton, D. J., Shepherd, G. M., Martone, M. E., & Ascoli, G. A. (2012). An ontological approach to describing neurons and their relationships. *Frontiers in Neuroinformatics*, 6, 15. <http://doi.org/10.3389/fninf.2012.00015>
135. <https://www.incf.org/>. Consultada el 3 de mayo de 2016.
136. Zecevic, N., & Rakic, P. (2001). Development of layer I neurons in the primate cerebral cortex. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 21(15), 5607–5619.
137. Mienville, J.-M. (1999). Feature Article: Cajal–Retzius Cell Physiology: Just in Time to Bridge the 20th Century. *Cerebral Cortex* 9 (8 ), 776–782.

138. Meyer, G., Goffinet, A. M., & Fairén, A. (1999). Feature Article: What is a Cajal–Retzius cell? A Reassessment of a Classical Cell Type Based on Recent Observations in the Developing Neocortex. *Cerebral Cortex*, 9 (8 ), 765–775.
139. Huntley, G. W., & Jones, E. G. (1990). Cajal-Retzius neurons in developing monkey neocortex show immunoreactivity for calcium binding proteins. *Journal of Neurocytology*, 19(2), 200–212.
140. Valverde, F. (2002). [Structure of the cerebral cortex. Intrinsic organization and comparative analysis of the neocortex]. *Revista de neurologia*, 34(8), 758–780.
141. Marin-Padilla, M. (1969). Origin of the pericellular baskets of the pyramidal cells of the human motor cortex: a Golgi study. *Brain Research*, 14(3), 633–646.
142. Wang, Y., Gupta, A., Toledo-Rodriguez, M., Wu, C. Z., & Markram, H. (2002). Anatomical, physiological, molecular and circuit properties of nest basket cells in the developing somatosensory cortex. *Cerebral Cortex (New York, N.Y.: 1991)*, 12(4), 395–410.
143. McBain, C. J. (2012). Cortical inhibitory neuron basket cells: from circuit function to disruption. *The Journal of Physiology*, 590(Pt 4), 667.
144. Armstrong, C., & Soltesz, I. (2012). Basket cell dichotomy in microcircuit function. *The Journal of Physiology*, 590(Pt 4), 683–94.
145. Bartos, M., & Elgueta, C. (2012). Functional characteristics of parvalbumin- and cholecystokinin-expressing basket cells. *The Journal of Physiology*, 590(Pt 4), 669–681.

146. DeFelipe, J. (1999). Chandelier cells and epilepsy. *Brain*, 122(10), 1807–1822.
147. Somogyi, P. (1977). A specific “axo-axonal” interneuron in the visual cortex of the rat. *Brain Research*, 136(2), 345–350.
148. Somogyi, P., Freund, T. F., & Cowey, A. (1982). The axo-axonic interneuron in the cerebral cortex of the rat, cat and monkey. *Neuroscience*, 7(11), 2577–2607.
149. Woodruff, A. R., Anderson, S. A., & Yuste, R. (2010). The Enigmatic Function of Chandelier Cells. *Frontiers in Neuroscience*, 4, 201. <http://doi.org/10.3389/fnins.2010.00201>
150. Howard, A., Tamas, G., & Soltesz, I. (2005). Lighting the chandelier: new vistas for axo-axonic cells. *Trends in Neurosciences*, 28(6), 310–316.
151. Spampanato, J., Sullivan, R. K. P., Perumal, M. B., & Sah, P. (2016). Development and physiology of GABAergic feedback excitation in parvalbumin expressing interneurons of the mouse basolateral amygdala. *Physiological Reports*, 4(1).
152. Zhu, Y., Stornetta, R. L., & Zhu, J. J. (2004). Chandelier cells control excessive cortical excitation: characteristics of whisker-evoked synaptic responses of layer 2/3 nonpyramidal and pyramidal neurons. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 24(22), 5101–5108.
153. DeFelipe, J., Ballesteros-Yanez, I., Inda, M. C., & Munoz, A. (2006). Double-bouquet cells in the monkey and human cerebral cortex with special reference to areas 17 and 18. *Progress in Brain Research*, 154, 15–32.

154. Somogyi, P; Cowey, A. (1984). Double Bouquet Cells. In E. Jones (Ed.), *Cerebral Cortex*, vol 1 (pp. 337–360). New York: Plenum.
155. Valverde, F. (1978). The organization of area 18 in the monkey. *Anatomy and Embryology*, 154(3), 305–334.
156. Kawaguchi, Y., & Kondo, S. (2002). Parvalbumin, somatostatin and cholecystokinin as chemical markers for specific GABAergic interneuron types in the rat frontal cortex. *Journal of Neurocytology*, 31(3-5), 277–287.
157. Peters, A., & Kimerer, L. M. (1981). Bipolar neurons in rat visual cortex: A combined Golgi-electron microscope study. *Journal of Neurocytology*, 10(6), 921–946.
158. Peters, A., & Kimerer, L. M. (1981). Bipolar neurons in rat visual cortex: A combined Golgi-electron microscope study. *Journal of Neurocytology*, 10(6), 921–946.
159. Connor, J. R., & Peters, A. (1984). Vasoactive intestinal polypeptide-immunoreactive neurons in rat visual cortex. *Neuroscience*, 12(4), 1027–1044.
160. Wang, Y., Toledo-Rodriguez, M., Gupta, A., Wu, C., Silberberg, G., Luo, J., & Markram, H. (2004). Anatomical, physiological and molecular properties of Martinotti cells in the somatosensory cortex of the juvenile rat. *The Journal of Physiology*, 561(Pt 1), 65–90.
161. Hestrin, S., & Galarreta, M. (2005). Electrical synapses define networks of neocortical GABAergic neurons. *Trends in Neurosciences*, 28(6), 304–309.

162. Cottam, J. C. H. (2009). Identifying the functional role of Martinotti cells in cortical sensory processing. *Journal of Neurophysiology*, 102(1), 9–11.
163. Silberberg, G., & Markram, H. (2007). Disynaptic inhibition between neocortical pyramidal cells mediated by Martinotti cells. *Neuron*, 53(5), 735–746.
164. Krishnamurthy, P., Silberberg, G., & Lansner, A. (2012). A cortical attractor network with Martinotti cells driven by facilitating synapses. *PloS One*, 7(4), e30752.
165. Sohal, V. S., Zhang, F., Yizhar, O., & Deisseroth, K. (2009). Parvalbumin neurons and gamma rhythms enhance cortical circuit performance. *Nature*, 459(7247), 698–702.
166. Donato, F., Rompani, S., & Caroni, P. (2013). Parvalbumin-expressing basket-cell network plasticity induced by experience regulates adult learning. *Nature*. (C) 2013 Nature Publishing Group: (1) Friedrich Miescher Institut, Maulbeerstrasse 66, CH-4058 Basel, Switzerland.
167. Fu, Y., Tucciarone, J. M., Espinosa, J. S., Sheng, N., Darcy, D. P., Nicoll, R. A., ... Stryker, M. P. (2016). A Cortical Circuit for Gain Control by Behavioral State. *Cell*, 156(6), 1139–1152.
168. Chen, N., Sugihara, H., & Sur, M. (2015). An acetylcholine-activated microcircuit drives temporal dynamics of cortical activity. *Nature Neuroscience*, 18(6), 892–902.
169. Powell, E. M., Campbell, D. B., Stanwood, G. D., Davis, C., Noebels, J. L., & Levitt, P. (2003). Genetic disruption of cortical interneuron development causes region- and GABA cell type-specific deficits, epilepsy,

and behavioral dysfunction. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 23(2), 622–631.

170. Cobos, I., Calcagnotto, M. E., Vilaythong, A. J., Thwin, M. T., Noebels, J. L., Baraban, S. C., & Rubenstein, J. L. R. (2005). Mice lacking *Dlx1* show subtype-specific loss of interneurons, reduced inhibition and epilepsy. *Nature Neuroscience*, 8(8), 1059–1068.
171. Levinson, A. J., Young, L. T., Fitzgerald, P. B., & Daskalakis, Z. J. (2007). Cortical inhibitory dysfunction in bipolar disorder: a study using transcranial magnetic stimulation. *Journal of Clinical Psychopharmacology*, 27(5), 493–497.
172. Rogasch, N. C., Daskalakis, Z. J., & Fitzgerald, P. B. (2014). Cortical Inhibition, Excitation, and Connectivity in Schizophrenia: A Review of Insights From Transcranial Magnetic Stimulation. *Schizophrenia Bulletin*, 40(3), 685–696.
173. Chittajallu, R., Pelkey, K. A., & McBain, C. J. (2013). Neurogliaform cells dynamically regulate somatosensory integration via synapse-specific modulation. *Nature Neuroscience*, 16(1), 13–15.
174. Simon, A., Olah, S., Molnar, G., Szabadics, J., & Tamas, G. (2005). Gap-junctional coupling between neurogliaform cells and various interneuron types in the neocortex. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 25(27), 6278–6285.
175. Zsiros, V., & Maccaferri, G. (2005). Electrical coupling between interneurons with different excitable properties in the stratum lacunosum-moleculare of the juvenile CA1 rat hippocampus. *The Journal of*

Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience, 25(38), 8686–8695.

176. Olah, S., Komlosi, G., Szabadics, J., Varga, C., Toth, E., Barzo, P., & Tamas, G. (2007). Output of neurogliaform cells to various neuron types in the human and rat cerebral cortex. *Frontiers in Neural Circuits*, 1, 4.
177. Povysheva, N. V, Zaitsev, A. V, Kroner, S., Krimer, O. A., Rotaru, D. C., Gonzalez-Burgos, G., ... Krimer, L. S. (2007). Electrophysiological differences between neurogliaform cells from monkey and rat prefrontal cortex. *Journal of Neurophysiology*, 97(2), 1030–1039.
178. Armstrong, C., Krook-Magnuson, E., & Soltesz, I. (2012). Neurogliaform and Ivy Cells: A Major Family of nNOS Expressing GABAergic Neurons. *Frontiers in Neural Circuits*, 6, 23.
179. Kalinichenko, S. G., Pushchin, I. I., & Dyuizen, I. V. (2006). Neurochemical diversity of neurogliaform cells in the human primary motor cortex. *Journal of Chemical Neuroanatomy*, 31(4), 304–310.
180. Weibel, E. R., Taylor, C. R., & Hoppeler, H. (1991). The concept of symmorphosis: a testable hypothesis of structure-function relationship. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 88(22), 10357–10361.
181. Abbot, E. S. (1916). The Causal Relations between Structure and Function in Biology. *The American Journal of Psychology*, 27(2), 245–250.
182. DeFelipe, J. (1997). Types of neurons, synaptic connections and chemical characteristics of cells immunoreactive for calbindin-D28K,

- parvalbumin and calretinin in the neocortex. *Journal of Chemical Neuroanatomy*, 14(1), 1–19.
183. Fatterpekar, G. M., Naidich, T. P., Delman, B. N., Aguinaldo, J. G., Gultekin, S. H., Sherwood, C. C., Fayad, Z. A. (2002). Cytoarchitecture of the human cerebral cortex: MR microscopy of excised specimens at 9.4 Tesla. *AJNR. American Journal of Neuroradiology*, 23(8), 1313–1321.
184. Van der Kolk, A. G., Hendrikse, J., Zwanenburg, J. J. M., Visser, F., & Luijten, P. R. (2016). Clinical applications of 7T MRI in the brain. *European Journal of Radiology*, 82(5), 708–718.
185. Bludau, S., Eickhoff, S. B., Mohlberg, H., Caspers, S., Laird, A. R., Fox, P. T., Amunts, K. (2014). Cytoarchitecture, probability maps and functions of the human frontal pole. *NeuroImage*, 93, Part 2, 260–275.
186. Lewis, D. A. (2002). The human brain revisited: opportunities and challenges in postmortem studies of psychiatric disorders. *Neuropsychopharmacology: Official Publication of the American College of Neuropsychopharmacology*, 26(2), 143–154.
187. Overgaard, K., & Meden, P. (2000). Influence of different fixation procedures on the quantification of infarction and oedema in a rat model of stroke. *Neuropathology and Applied Neurobiology*, 26(3), 243–250.
188. Blair, J. A., Wang, C., Hernandez, D., Siedlak, S. L., Rodgers, M. S., Achar, R. K., Lee, H. (2016). Individual Case Analysis of Postmortem Interval Time on Brain Tissue Preservation. *PLoS ONE*, 11(3), e0151615.

189. Cotter, D., Mackay, D., Landau, S., Kerwin, R., & Everall, I. (2001). Reduced glial cell density and neuronal size in the anterior cingulate cortex in major depressive disorder. *Archives of General Psychiatry*, 58(6), 545–553.
190. Cotter, D., Mackay, D., Chana, G., Beasley, C., Landau, S., & Everall, I. P. (2002). Reduced Neuronal Size and Glial Cell Density in Area 9 of the Dorsolateral Prefrontal Cortex in Subjects with Major Depressive Disorder. *Cerebral Cortex*, 12 (4), 386–394.
191. Sarnat, H. B., Nochlin, D., & Born, D. E. (1998). Neuronal nuclear antigen (NeuN): a marker of neuronal maturation in early human fetal nervous system. *Brain & Development*, 20(2), 88–94.
192. Lyck, L., Dalmau, I., Chemnitz, J., Finsen, B., & Schrøder, H. D. (2008). Immunohistochemical Markers for Quantitative Studies of Neurons and Glia in Human Neocortex. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 56(3), 201–221.
193. Todtenkopf, M. S., Vincent, S. L., & Benes, F. M. (2005). A cross-study meta-analysis and three-dimensional comparison of cell counting in the anterior cingulate cortex of schizophrenic and bipolar brain. *Schizophrenia Research*, 73(1), 79–89.
194. Benes, F. M., & Lange, N. (2001). Two-dimensional versus three-dimensional cell counting: a practical perspective. *Trends in Neurosciences*, 24(1), 11–17.
195. Rajkowska, G., Miguel-Hidalgo, J. J., Wei, J., Dilley, G., Pittman, S. D., Meltzer, H. Y., ... Stockmeier, C. A. (1999). Morphometric evidence for

neuronal and glial prefrontal cell pathology in major depression\*. *Biological Psychiatry*, 45(9), 1085–1098.

196. Umbarila, J., Pimienta, HJ. Organización del Área 10p Orbital de la Corteza Cerebral del Humano: Citoarquitectura y Asimetrías. Trabajo de grado de Maestría en Ciencias Biomédicas, realizada en el Centro de Estudios Cerebrales de la Facultad de Salud de la Universidad del Valle. Cali – Colombia, 2006.
197. Gaitán O., Buriticá E. Estudio Citomorfológico de las Interneuronas del Área 10 Orbital de la Corteza Prefrontal Humana. Trabajo de grado de Maestría en Ciencias Biomédicas, realizada en el Centro de Estudios Cerebrales de la Facultad de Salud de la Universidad del Valle. Cali – Colombia, 2014.
198. Buriticá E. Organización Neuronal de las Regiones Lateral y Medial del Área 10p de la Corteza Prefrontal del Humano. Trabajo de grado de Maestría en Ciencias Biomédicas, realizada en el Centro de Estudios Cerebrales de la Facultad de Salud de la Universidad del Valle. Cali – Colombia, 2007.
199. Rosen, G. D. (1996). Cellular, morphometric, ontogenetic and connective substrates of anatomical asymmetry. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 20(4), 607–615.
200. Kringelbach, M. L., & Rolls, E. T. (2004). The functional neuroanatomy of the human orbitofrontal cortex: evidence from neuroimaging and neuropsychology. *Progress in Neurobiology*, 72(5), 341–372.
201. Abercrombie, M. (1946). Estimation of nuclear population from microtome sections. *The Anatomical Record*, 94, 239–247.

202. Benes, F. M., Vincent, S. L., & Todtenkopf, M. (2001). The density of pyramidal and nonpyramidal neurons in anterior cingulate cortex of schizophrenic and bipolar subjects. *Biological Psychiatry*, 50(6), 395–406.
203. Bouras, C., Kovari, E., Hof, P. R., Riederer, B. M., & Giannakopoulos, P. (2001). Anterior cingulate cortex pathology in schizophrenia and bipolar disorder. *Acta Neuropathologica*, 102(4), 373–379.
204. Pauc, R., & Young, A. (2010). Little-known neurons of the medial wall: a literature review of pyramidal cells of the cingulate gyrus. *Journal of Chiropractic Medicine*, 9(3), 115–120.
205. Fernández-Jaén, A., López-Martín, S., Albert, J., Fernández-Mayoralas, D. M., Fernández-Perrone, A. L., de La Peña, M. J., ... Muñoz-Jareño, N. (2015). Cortical thickness differences in the prefrontal cortex in children and adolescents with ADHD in relation to dopamine transporter (DAT1) genotype. *Psychiatry Research: Neuroimaging*, 233(3), 409–417.
206. Yücel, M., Stuart, G. W., Maruff, P., Velakoulis, D., Crowe, S. F., Savage, G., & Pantelis, C. (2001). Hemispheric and Gender-related Differences in the Gross Morphology of the Anterior Cingulate/Paracingulate Cortex in Normal Volunteers: An MRI Morphometric Study. *Cerebral Cortex*, 11 (1), 17–25.
207. Im, K., Lee, J.-M., Lyttelton, O., Kim, S. H., Evans, A. C., & Kim, S. I. (2008). Brain Size and Cortical Structure in the Adult Human Brain. *Cerebral Cortex*, 18 (9), 2181–2191.
208. Yan, H., Zuo, X.-N., Wang, D., Wang, J., Zhu, C., Milham, M. P., Zang, Y. (2009). Hemispheric asymmetry in cognitive division of anterior cingulate

- cortex: a resting-state functional connectivity study. *NeuroImage*, 47(4), 1579–1589.
209. Lutcke, H., & Frahm, J. (2008). Lateralized anterior cingulate function during error processing and conflict monitoring as revealed by high-resolution fMRI. *Cerebral Cortex* (New York, N.Y.: 1991), 18(3), 508–515.
210. Zilles, K., & Amunts, K. (2012). Chapter 23 - Architecture of the Cerebral Cortex- Mai, Jürgen K. In G. B. T.-T. H. N. S. (Third E. Paxinos (Ed.), (pp. 836–895). San Diego: Academic Press.
211. Pakkenberg, B., & Gundersen, H. J. (1997). Neocortical neuron number in humans: effect of sex and age. *The Journal of Comparative Neurology*, 384(2), 312–320.
212. Rakic, P. (2004). Neuroscience. Genetic control of cortical convolutions. *Science* (New York, N.Y.), 303(5666), 1983–1984.
213. Van Essen, D. C. (1997). A tension-based theory of morphogenesis and compact wiring in the central nervous system. *Nature*, 385(6614), 313–318.
214. Beasley, C. L., & Reynolds, G. P. (1997). Parvalbumin-immunoreactive neurons are reduced in the prefrontal cortex of schizophrenics. *Schizophrenia Research*, 24(3), 349–355.
215. Beasley, C. L., Zhang, Z. J., Patten, I., & Reynolds, G. P. (2002). Selective deficits in prefrontal cortical GABAergic neurons in schizophrenia defined by the presence of calcium-binding proteins. *Biological Psychiatry*, 52(7), 708–715.

216. Hashimoto, T., Volk, D. W., Eggan, S. M., Mirnics, K., Pierri, J. N., Sun, Z., ... Lewis, D. A. (2003). Gene Expression Deficits in a Subclass of GABA Neurons in the Prefrontal Cortex of Subjects with Schizophrenia. *The Journal of Neuroscience*, 23 (15 ), 6315–6326.
217. Tooney, P. A., & Chahl, L. A. (2004). Neurons expressing calcium-binding proteins in the prefrontal cortex in schizophrenia. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry*, 28(2), 273–278.
218. Cotter, D., Landau, S., Beasley, C., Stevenson, R., Chana, G., MacMillan, L., & Everall, I. (2002). The density and spatial distribution of GABAergic neurons, labelled using calcium binding proteins, in the anterior cingulate cortex in major depressive disorder, bipolar disorder, and schizophrenia. *Biological Psychiatry*, 51(5), 377–386.
219. Galarreta, M., & Hestrin, S. (2002). Electrical and chemical synapses among parvalbumin fast-spiking GABAergic interneurons in adult mouse neocortex. *Proceedings of the National Academy of Sciences* , 99 (19 ), 12438–12443.

## 10. ANEXOS

### Anexo 1. Análisis de Normalidad – Shapiro-Wilks

SHAPIRO-WILKS NORMALITY TEST	ÁREA 100 HD	ÁREA 100 HI	ÁREA 24 HD	ÁREA 24 HI
W	0,9064	0,8686	0,9371	0,7782
P VALUE	0,0015	0,0001	0,0168	< 0,0001
PASSED NORMALITY TEST (ALPHA=0.05)	No	No	No	No
P VALUE SUMMARY	**	***	*	****

\*HD: Hemisferio Derecho, HI: Hemisferio Izquierdo

### Anexo 2. Análisis Intergrupos Espesor Láminar

TUKEY'S MULTIPLE COMPARISONS TEST	MEAN DIFF,	95% CI OF DIFF,	ADJUSTED P VALUE
ÁREA 100D VS. ÁREA 100I	-96,03	-197,7 to 5,636	0,0717
ÁREA 100D VS. ÁREA 24D	-704	-805,7 to - 602,4	< 0,0001
ÁREA 100D VS. ÁREA 24I	-586,4	-688,1 to - 484,7	< 0,0001
ÁREA 100I VS. ÁREA 24D	-608	-709,7 to - 506,4	< 0,0001
ÁREA 100I VS. ÁREA 24I	-490,4	-592,0 to - 388,7	< 0,0001
ÁREA 24D VS. ÁREA 24I	117,7	15,99 to 219,3	0,0161

\*10od: Área 10 Orbital Hemisferio Derecho, 10oi: Área 10 Orbital Hemisferio Izquierdo, 24d: Área 24 Hemisferio Derecho, 24i: Área Hemisferio.

**Anexo 3. Análisis por láminas supragranulares e infragranulares para ambos hemisferios, áreas 10o y 24.**

**LÁMINAS SUPRAGRANULARES VS LÁMINAS INFRAGRANULARES  
MANN WHITNEY TEST**

<b>ÁREA 100 HEMISFERIO DERECHO</b>	
<b>P VALUE</b>	0,0492
<b>EXACT OR APPROXIMATE P VALUE?</b>	Exact
<b>P VALUE SUMMARY</b>	*
<b>SIGNIFICANTLY DIFFERENT? (P &lt; 0.05)</b>	Yes
<b>ONE- OR TWO-TAILED P VALUE?</b>	Two-tailed
<b>MANN-WHITNEY U</b>	5135
<b>ÁREA 100 HEMISFERIO IZQUIERDO</b>	
<b>P VALUE</b>	0,0002
<b>EXACT OR APPROXIMATE P VALUE?</b>	Exact
<b>P VALUE SUMMARY</b>	***
<b>SIGNIFICANTLY DIFFERENT? (P &lt; 0.05)</b>	Yes
<b>ONE- OR TWO-TAILED P VALUE?</b>	Two-tailed
<b>MANN-WHITNEY U</b>	4317
<b>ÁREA 24 HEMISFERIO DERECHO</b>	
<b>P VALUE</b>	< 0,0001
<b>EXACT OR APPROXIMATE P VALUE?</b>	Exact
<b>P VALUE SUMMARY</b>	****
<b>SIGNIFICANTLY DIFFERENT? (P &lt; 0.05)</b>	Yes
<b>ONE- OR TWO-TAILED P VALUE?</b>	Two-tailed
<b>MANN-WHITNEY U</b>	4045
<b>ÁREA 24 HEMISFERIO IZQUIERDO</b>	
<b>P VALUE</b>	< 0,0001
<b>EXACT OR APPROXIMATE P VALUE?</b>	Exact
<b>P VALUE SUMMARY</b>	****
<b>SIGNIFICANTLY DIFFERENT? (P &lt; 0.05)</b>	Yes
<b>ONE- OR TWO-TAILED P VALUE?</b>	Two-tailed
<b>MANN-WHITNEY U</b>	4004

**Anexo 4. Comparación del espesor de las láminas supra e infragranulares entre las áreas 10o y 24.**

**LÁMINAS SUPRAGRANULARES E INFRAGRANULARES - ÁREA 100  
VS ÁREA 24  
KRUSKAL-WALLIS TEST**

<b>GRUPOS</b>	<b>Promedio Diferencia de Rangos</b>	<b>Significativo</b>	<b>Valor P</b>
<b>A100 SUPRA VS. A100 INFRA</b>	-31,34	No	> 0,9999
<b>A100 SUPRA VS. A24 SUPRA</b>	-34,25	No	0,7555
<b>A100 SUPRA VS. A24 INFRA</b>	-250,4	Si	< 0,0001
<b>A100 INFRA VS. A24 SUPRA</b>	-2,906	No	> 0,9999
<b>A100 INFRA VS. A24 INFRA</b>	-219	Si	< 0,0001
<b>A24 SUPRA VS. A24 INFRA</b>	-216,1	Si	< 0,0001

**Anexo 5. Análisis Bivariado Características Morfológicas de las Interneuronas del Área 10o Vs. las Interneuronas Área 24 - Mann Whitney Test\*.**

**Análisis Bivariado Características Morfológicas de las Interneuronas del Área 10o Vs. las Interneuronas Área 24 - Mann Whitney Test\***

<b>Variable</b>	<b>Marcador</b>	<b>Valor P</b>	<b>Mann Whitney U</b>
<b>Procesos Primarios</b>	CB	0.0817	111,00
	CR	0,0650	118,50
	PV**	0.0085	3319,00
<b>Área del Soma</b>	CB	0.2220	125,00
	CR	0.6561	153,00
	PV	0,3257	3869,00
<b>Grado Esfericidad</b>	CB	0,5769	146,50
	CR	> 0,9999	168,00
	PV	0,0930	3618,00

\*Prueba a dos colas.

\*\* Las neuronas inmunoreactivas para PV del área 24 tienen una media de procesos primarios significativamente mayor que las del área 10.

**Anexo 6. Modelo de regresión lineal Áreas 10o y 24.**

<b>Área 10o</b>	<b>Modelo de Regresión Lineal Área del Soma - Número de Procesos</b>	<b>Modelo de Regresión Lineal Grado de Esfericidad - Número de Procesos</b>
<b>Pendiente</b>	0,007846 ± 0,002073	-0,5184 ± 0,8677
<b>Intersección en Y</b>	1,683 ± 0,2459	2,965 ± 0,6932
<b>Intersección en X</b>	-214,5	5,72
<b>Intervalo de Confianza al 95%</b>		
<b>Pendiente</b>	0,003739 to 0,01195	-2,237 to 1,200
<b>Intersección en Y</b>	1,195 to 2,170	1,592 to 4,339
<b>Intersección en X</b>	-573,5 to -101,2	1,930 to +infinity
<b>R<sup>2</sup></b>	0,1091	0,0030
<b>F</b>	14,32	0,357
<b>Datos</b>		
<b>Número de Valores de X</b>	119	119
<b>Número Max de Val de Y Repetidos</b>	1	1
<b>Número Total de Valores</b>	119	119
<b>Datos Perdidos</b>	0	0
<b>Ecuación</b>	<b>Y = 0,007846*X + 1,683</b>	<b>Y = -0,5184*X + 2,965</b>
<b>Área 24</b>	<b>Modelo de Regresión Lineal Área del Soma - Número de Procesos</b>	<b>Modelo de Regresión Lineal Grado de Esfericidad - Número de Procesos</b>
<b>Pendiente</b>	0,009216 ± 0,001685	-1,777 ± 0,7644
<b>Intersección en Y</b>	1,621 ± 0,2118	4,041 ± 0,5945
<b>Intersección en X</b>	-175,9	2,274
<b>Intervalo de Confianza al 95%</b>		
<b>Pendiente</b>	0,005914 to 0,01252	-3,275 to -0,2787
<b>Intersección en Y</b>	1,206 to 2,036	2,876 to 5,206
<b>Intersección en X</b>	-339,6 to -97,61	1,581 to 10,37
<b>R<sup>2</sup></b>	0,1793	0,0380
<b>F</b>	29,93	5,404
<b>Datos</b>		
<b>Número de Valores de X</b>	139	139
<b>Número Max de Val de Y Repetidos</b>	1	1
<b>Número Total de Valores</b>	139	139
<b>Datos Perdidos</b>	0	0
<b>Ecuación</b>	<b>Y = 0,009216*X + 1,621</b>	<b>Y = -1,777*X + 4,041</b>

