

Universidad Autónoma de Madrid

Facultad de Medicina

**EL COMPLEJO AMIGDALINO
HUMANO: ARQUITECTURA
CELULAR E INERVACIÓN
DOPAMINÉRGICA**

TESIS DOCTORAL

María García-Amado Sancho

Madrid, 2013

**EL COMPLEJO AMIGDALINO
HUMANO: ARQUITECTURA CELULAR
E INERVACIÓN DOPAMINÉRGICA**

Tesis Doctoral presentada por

MARÍA GARCÍA-AMADO SANCHO

Directora:

Lucía Prensa Sepúlveda

Doctora en Medicina y Cirugía

Departamento de Anatomía, Histología y Neurociencia

Facultad de Medicina

Universidad Autónoma de Madrid

Madrid, 2013

A Moisés, a Julia y a Luis

A mis padres y hermanos

Agradecimientos

Una vez finalizado este trabajo de tesis doctoral, quiero agradecer a todas aquellas personas que han participado de algún modo para que haya podido llevarse a cabo. En primer lugar, quiero agradecer a mi directora, la Dra. Lucía Prensa por la enorme cantidad de tiempo dedicada a la dirección de esta tesis y a la corrección de este volumen y de las publicaciones. Durante estos años, ha sido para mí un gran ejemplo de trabajo y esfuerzo, sabiendo al mismo tiempo dar la debida importancia a los demás aspectos de la vida; quiero agradecerle sobre todo su cercanía, sencillez claridad y sus consejos siempre que los he necesitado. En segundo lugar, quiero agradecer al Dr. Giménez Amaya el haber confiado en mí para iniciar la tesis doctoral en el departamento y por el tiempo dedicado a la dirección del Diploma de Estudios Avanzados; los dos años bajo su dirección fueron enormemente provechosos para mi formación, permitiéndome hacer una estancia predoctoral en la Universidad de Aarhus que tanto me ha servido para esta tesis doctoral y colaborar con el laboratorio de la Clínica Universitaria de Navarra. Ambos, Lucía y José Manuel, habéis sido ejemplos para mí durante estos años y habéis hecho una gran labor para mi formación tanto científica como personal.

Quiero agradecer también a todos los profesores del departamento de Anatomía, Histología y Neurociencia por su ayuda, cariño y ánimo para avanzar en el conocimiento científico. Al Dr. Reinoso y al Dr. Llamas, por ser ejemplos de trabajo incansable y de excelencia científica, así como por su simpatía y ánimo constante, por sus trabajos en el complejo amigdalino sobre los que se ha cimentado esta tesis doctoral; por los útiles esquemas del Dr. Llamas para la delimitación de los núcleos amigdalinos. Al Dr. Avendaño, por su cercanía, por haberme transmitido la importancia de ser riguroso en el trabajo científico, por su disposición ante cualquier duda acerca de la metodología estereológica que tanto me ha servido para esta tesis y por permitirme participar en los cursos de estereología, que tan entretenidos resultan. A la Dra. Margarita Rodrigo, por su simpatía y sus sabios consejos para cualquier aspecto de la vida incluido el científico, y por animar las comidas en la burbuja en los últimos tiempos. A la Dra. Isabel de Andrés por el enorme esfuerzo dedicado a la gestión del doctorado en Neurociencia del departamento, estando siempre a disposición de los doctorandos, y también por su cariño y ánimo para avanzar y

terminar las tesis. Al Dr. Ángel Núñez, compañero de despacho, por su generoso servicio como director de departamento, su simpatía, optimismo y su motivación para terminar la tesis lo antes posible. A la Dra. Cavada, por su disposición durante los años en que fue directora del departamento y sus impecables trabajos del sistema dopaminérgico que tanto me han servido para la realización de esta tesis. Al Dr. Francisco Clascá por su enorme ímpetu para desarrollar nuevos proyectos científicos, y su constancia para que los provechosos *journal clubs* sigan celebrándose a pesar de la pereza, en algunas ocasiones, de los participantes. Agradecerle también el haberme permitido colaborar en los trabajos de investigación talamocorticales, así como la visita improvisada a Ginebra y por promover esporádicas salidas del grupo de “circuitos cerebrales” al mesón del champiñón. Al Dr. Miguel Garzón, por su simpatía y ser de igual modo inspiración como científico. Quiero agradecer también a las biólogas, las Dras. Mar Pérez, Pilar Gómez Ramos, Asún Martín y Amelia Caballero, por su amabilidad y su interés en cómo van creciendo Julia y Luis, a los histólogos, en especial al Dr. Santamaría, por permitirme también colaborar en los cursos de estereología. A las técnicas de laboratorio, Rosa, Gema, Begoña por su disposición siempre que he necesitado ayuda con protocolos, manejo en el laboratorio, etc... y en especial a Marta Callejo, por su ayuda con las tinciones histológicas, las veces que hemos dado vueltas y vueltas a los protocolos hasta entender los cálculos, su gran capacidad de servicio a los demás, y su amistad. A Basilio y Toñi agradecer su disposición y amabilidad siempre que los he necesitado para las cuestiones de secretaría. A Ana y Lola del Servicio de Microscopía Confocal, agradecer su ayuda y consejos para obtener fotografías de gran calidad.

Quiero agradecer a todos los compañeros que han pasado por el A-39 desde que aterricé en el departamento, y en especial a Javier e Ibone, Silvano y Tamara por su ayuda generosa siempre que lo he necesitado, su cariño y buen humor, a la generación posterior, Ana, Marian y Claudia, agradecer vuestro cariño y apoyo para realizar este trabajo, a cada una con vuestras peculiaridades, despistes, desastres y vuestra gran motivación por la investigación. Ya fuera del A-39, agradecer a César su cercanía, sencillez, disposición para cualquier necesidad o para tomar un café siempre que se acompañe de algo sólido; has sido un gran apoyo durante estos años de tesis como becario mayor; también a Yasmina, por su simpatía y apoyo, a Pilar por sus consejos como madre o investigadora indistintamente, a Eduardo, por sus divertidas

anécdotas, a Pepo, Ximena, Jos, Tania, Esther, Agi, Marina por vuestro cariño y tantos buenos ratos en la burbuja. A la nueva hornada de becarios o investigadores, dignos herederos de la generación anterior con vuestra simpatía, cariño y una gran motivación, a Javi y Angélica, sufridores del newCAST, a Diana, Julia, Jesús, Natali, Andrea, Chus, Laura, David Fdez. de Sevilla; y a todos los que habéis pasado por el departamento durante estos años.

A Moisés por ser un compañero indispensable en la vida y haber intensificado sus labores de padre durante estos meses finales de tesis soportando estoicamente momentos de estrés y de mal humor. A Julia y a Luis, aunque aún no saben leer, agradecerles el haber sido, más que un obstáculo, una gran motivación para terminar este trabajo de tesis a pesar de la falta de sueño. A mis padres, por haberme enseñado a ver siempre lo bueno y lo trascendente de la vida y a ser felices en medio de las dificultades. A mi padre, por su sencillez, buen ánimo y haber sido responsable sin buscarlo de mi interés por la Neurociencia; a mi madre por su total entrega a nosotros renunciando a una carrera profesional y por su generosa disposición para cuidar a sus nietos permitiendo que yo haya podido sacar más tiempo para terminar esta tesis doctoral. A mis hermanos, Pablo, David, Isabel y Manuel por haber sido siempre un apoyo indispensable, por vuestro interés en cuándo iba a acabar esta tesis de una vez, y vuestra generosa ayuda y cariño para cuidar a Julia y a Luis siempre que ha hecho falta, especialmente Isabel. Agradecer también a Dionisio y Margarita su ayuda y cariño tanto a mí como a sus nietos siempre que lo hemos necesitado, y al resto de mi familia, abuelos, tíos, primos, compañeros de carrera y amigos, su apoyo e interés durante el desarrollo de esta tesis doctoral y de los demás aspectos de la vida.

Quiero agradecer también a los Drs. Daniel García Ovejero y Josué García Yagüe, grandes neurocientíficos, por haber sido fuente de inspiración para realizar la tesis doctoral y a los Drs. Nyengaard y Dorph-Petersen su acogida en el laboratorio de Estereología de la Universidad de Aarhus y su ayuda durante los meses de estancia allí. Por último, agradecer también a las instituciones que han donado el tejido cerebral humano para este trabajo, el Banco de Tejidos Neurológicos de Navarra y del Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Ramón y Cajal de Madrid. Este trabajo ha sido financiado por una beca FPI-UAM 2009, y los proyectos FIS-PI070199 y de la Fundación Eugenio Rodríguez Pascual.

Contenido

1. INTRODUCCIÓN.....	17
1.1. Organización nuclear del CA.....	21
1.2. Poblaciones celulares del CA	27
1.2.1. Poblaciones neuronales del CA.....	27
1.2.2. Poblaciones de células de glía	32
1.2.3. Células endoteliales.....	32
1.3. Volumen del CA.....	33
1.4. Número y densidad de células en el CA	33
1.4.1. Neuronas	34
1.4.2. Células de glía.....	36
1.4.3. Células endoteliales.....	37
1.5. Alteraciones morfológicas del CA en condiciones patológicas.....	37
1.5.1. Alteraciones en el volumen.....	37
1.5.2. Alteraciones en el número de células	37
1.6. Cambios morfológicos del CA en el envejecimiento.....	39
1.7. Flujo de la información nerviosa a través del CA.....	39
1.7.1. Conexiones intrínsecas	39
1.7.2. Conexiones extrínsecas	42
1.8. La innervación dopaminérgica del CA	50
2. PLANTEAMIENTO Y OBJETIVOS	57
3. MATERIAL Y MÉTODOS	61
3.1. Obtención, corte y almacenamiento del tejido humano	63
3.2. Procesamiento del tejido	65
3.2.1. Tinciones de Nissl, acetilcolinesterasa y Gallyas	65
3.2.2. Tinciones inmunohistoquímicas	68

3.2.3. Tinciones de doble inmunofluorescencia.....	74
3.3. Análisis del material	76
3.3.1. Delimitación de los núcleos del CA	76
3.3.2. Estimaciones estereológicas.....	77
3.3.3. Análisis de la distribución de interneuronas	88
3.3.4. Análisis de la distribución de fibras DAT+.....	89
3.3.5. Microscopía confocal	89
4. RESULTADOS.....	91
4.1. Delimitación de los grupos nucleares, núcleos y subdivisiones nucleares del CA.....	93
4.1.1. Área periamigdalina.....	93
4.1.2. Grupo basolateral.....	94
4.1.3. Grupo central.....	96
4.1.4. Grupo corticomedia l.....	96
4.1.5. Área de transición córtico-amigdalina.....	97
4.2. Número de neuronas, células de glía y endoteliales.....	100
4.3. Densidad de neuronas, glía y células endoteliales del CA.....	102
4.3.1. Volumen regional.....	102
4.3.2. Densidad celular	105
4.4. Correlación de la edad de fallecimiento de los donantes con el volumen regional y con el número y densidad celular en el CA	107
4.5. Estimación del número, densidad y porcentaje con respecto al total de neuronas, de las IN PV+ del CA	111
4.6. Estimación del número, densidad y porcentaje con respecto al total de neuronas, de las IN CR+ del CA	116
4.7. Distribución relativa de las IN PV+ y las CR+ en el CA	120
4.8. Distribución de fibras DAT+ en el CA	122

4.9. Longitud absoluta y densidad de longitud de fibras DAT+ del CA.....	125
4.10. Longitud de fibras DAT+ por neurona en el CA.....	131
4.11. Relación topográfica entre las fibras DAT+ y las IN PV+ y las IN CR+	135
4.12. Relación topográfica entre fibras TH+ e IN PV+	138
5. DISCUSIÓN	139
5.1. Consideraciones metodológicas	142
5.2. Volúmenes regionales y número y densidad de células en el CA	144
5.2.1. Volumen regional del CA y sus subdivisiones territoriales	144
5.2.2. Número y densidad de neuronas, glía y células endoteliales.....	146
5.2.3. Efecto de la edad en el volumen regional y el número de neuronas, glía y células endoteliales.....	150
5.3. Distribución y número de las interneuronas PV+ y las CR+ del CA.....	150
5.4. Longitud y distribución de fibras DAT+ en el CA	154
5.5. Relación topográfica entre las fibras dopaminérgicas y las IN PV+ y las CR+ en el CA.....	162
6. CONCLUSIONES	165
7. ABREVIATURAS	171
8. BIBLIOGRAFÍA.....	178

1. INTRODUCCIÓN

La amígdala fue descrita por primera vez por Burdach a principios del siglo XIX como una masa de sustancia gris en forma de almendra -de ahí su nombre- que aparecía en la porción anterior del lóbulo temporal (Burdach, 1819-1822). Hoy en día sabemos que este autor sólo se refería a una parte de lo que hoy se conoce como amígdala o complejo amigdalino (CA), el grupo o complejo nuclear basolateral.

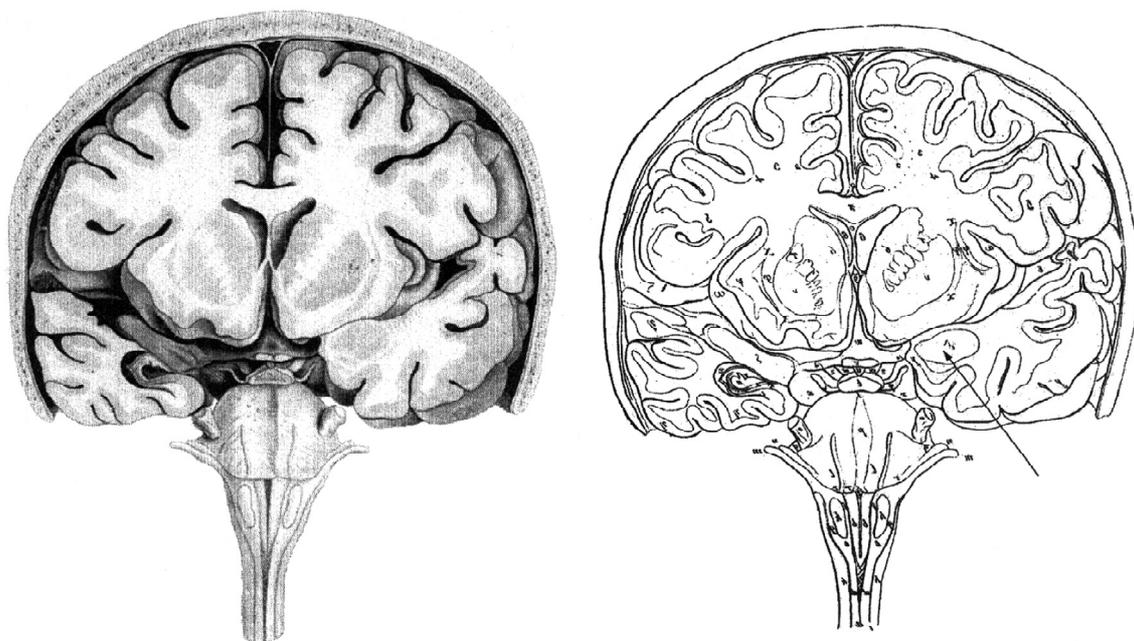


Figura 1. Primera ilustración del “núcleo amigdalino” (Mandelkern) en el cerebro humano. A la izquierda se muestra un corte coronal en un nivel anterior del complejo amigdalino y a la derecha la correspondiente ilustración del corte. La flecha a la derecha indica lo que Burdach definió como amígdala, que hoy se sabe que corresponde solamente al complejo basolateral. Más tarde se añadieron los núcleos central, medial y cortical (y la corteza olfatoria adyacente) y recientemente otras regiones como el núcleo del lecho de la estria terminal o partes de la sustancia innominada (modificación por Swanson y Petrovich, 1998, de Burdach, 1819-22).

Más tarde, Meynert (1867) propuso que la amígdala de Burdach era una extensión ventral del claustró en el lóbulo temporal y a continuación surgieron otros autores que afirmaban que la amígdala formaba parte del núcleo lenticular y que estaba limitada ventralmente por la corteza olfatoria del lóbulo piriforme (Meyer, 1971). Fue Johnston en el año 1923 quien describió por primera vez el CA al estudiar esta región en distintas especies de mamíferos, incluidos embriones humanos, y en otros vertebrados no mamíferos y quien dio nombre a los principales núcleos que lo constituían en función de su posición dentro del mismo. Sin embargo, hay autores que piensan que el CA no conforma ninguna unidad ni estructural ni funcional, sino que

es una agrupación arbitraria de núcleos con distintos orígenes embriológicos y pertenecientes a diferentes sistemas funcionales (Swanson y Petrovich, 1998).

El CA recibe información sensorial muy integrada de todas las modalidades y es necesario para la asociación de los estímulos sensoriales con su apropiado significado emocional y motivacional (Aggleton y cols., 1980; Nishijo y cols., 2008); además, está implicado en la expresión de respuestas autónomas y endocrinas ante dichos estímulos. Chapman y cols. describieron en 1954 que la estimulación directa del CA en humanos producía una percepción subjetiva de miedo y ansiedad, así como un aumento de la frecuencia cardíaca, de la presión sanguínea y una dilatación pupilar. En este sentido, existen numerosísimos estudios que relacionan al CA con la percepción del miedo y la generación de las respuestas afectivas apropiadas a ese tipo de estímulos (Falls y cols., 1992; Lu y cols., 2001; Fanselow y Gale, 2003; Maren y Quirk, 2004; Herry y cols., 2008; Ciocchi y cols., 2010; Pare y Duvarci, 2012; Maren y cols., 2013). Sin embargo, también se ha visto en humanos (Straube y cols., 2008; Garavan y cols., 2001; Davey y cols., 2011), así como en primates no humanos (Nishijo y cols., 2008), que la actividad de la amígdala aumenta en respuesta a estímulos emocionales positivos. De cualquier modo, el CA es necesario para la adquisición, consolidación y extinción de las memorias relacionadas con el miedo, así como para la reaparición o recuperación de las mismas tras su desaparición. El proceso de extinción o desaparición de la memoria de miedo tiene una relevancia clínica obvia en trastornos de ansiedad, ya que algunas terapias como las llamadas de exposición se basan en este proceso para impedir que el estímulo que produce aversión desencadene la ansiedad (Maren y cols., 2013).

La lesión bilateral del lóbulo temporal medial conteniendo al CA produce lo que se denomina una desconexión visual-límbica (Jones y Mishkin, 1972) o una disociación sensorial-afectiva (Geschwind, 1965). Estas alteraciones parecen estar presentes en el síndrome de Klüver-Bucy, que fue descrito al realizar una lobectomía temporal bilateral en monos rhesus (*Macaca mulatta*) (Klüver y Bucy, 1939), y está caracterizado por los siguientes síntomas: una exploración compulsiva de cualquier objeto a su alcance sin tener en cuenta su utilidad o significado emocional (lo que se llamó “ceguera psíquica”), una mayor tendencia a examinar los objetos con la boca en vez de con las manos, profundos cambios emocionales tales como la ausencia de conductas asociadas con el miedo y la agresividad, y por último, un aumento de la

actividad sexual. Posteriormente, otros autores comprobaron que la mayoría de estos síntomas también estaban presentes cuando la lesión afectaba exclusivamente al CA, ya que en el estudio de Klüver-Bucy la lesión afectaba también a parte del polo anterior del lóbulo temporal, no sólo al CA (Weiskrantz, 1956; Kling y Cornell, 1971; Aggleton y Passingham, 1981). En el hombre, este síndrome presenta una variada patología bitemporal y puede estar asociado con afasia, demencia o amnesia (Lilly y cols., 1983). Sin embargo, cuando la lesión en la amígdala es unilateral, no se modifica la actividad en la corteza visual ipsi o contralateral ante estímulos emocionalmente significativos, ya sean adversos o placenteros, según un estudio reciente de neuroimagen, a pesar de que se creía que la amígdala era imprescindible en la modulación del procesamiento visual ante dichos estímulos (Edmiston y cols., 2013).

Recientemente se ha descubierto que el CA está implicado en los procesos de cataplejía de la narcolepsia, ya que su núcleo central tiene conexiones con regiones del tronco del encéfalo que controlan el tono muscular durante el sueño REM. Más aún, dichos procesos de cataplejía suelen estar desencadenados por estados emocionalmente positivos (y de vigilia muy activa), que el CA procesa y en función de los cuales elabora una respuesta (Burgess y cols., 2013).

1.1. Organización nuclear del CA humano

Los numerosos estudios acerca de la clasificación nuclear del CA en primates (Völsch, 1906; Völsch, 1910; Johnston, 1923; Holmgren, 1928; Huber y Crosby, 1929; Äriens Kappers y cols., 1936; Brockhaus, 1938; Price y cols., 1987; Sims y Williams, 1990; Amaral y cols., 1992; Ledo-Varela y cols., 2007) y la falta de límites precisos entre algunos de sus núcleos han supuesto un obstáculo a la hora de llegar a un consenso para la delimitación y clasificación de dichos núcleos y sus subdivisiones. Uno de los primeros autores en describir la organización citoarquitectónica del CA de primates fue Völsch (1906, 1910). Más tarde, Brockhaus publicó una detallada descripción de la arquitectura de la amígdala humana con tinciones de Nissl y de mielina simplificando las complejas clasificaciones existentes hasta el momento (Brockhaus, 1938). Sin embargo, ésta seguía siendo compleja, y la nomenclatura propuesta por Crosby y Humphrey unos años después (1941, 1944), la cual está basada en la clasificación propuesta por Johnston, es la más utilizada en la actualidad.

Todos estos autores observaron que en el CA humano estaban presentes los mismos núcleos que en otros mamíferos y la mayoría de ellos, exceptuando el núcleo del tracto olfatorio lateral, están mucho más desarrollados en nuestra especie. Johnston (1923) diferenció en el CA dos grupos nucleares: un grupo engloba a los núcleos central, medial y cortical, incluyendo al núcleo del tracto olfatorio lateral, caracterizados por ser filogenéticamente más antiguos, por experimentar un menor incremento de tamaño que el resto de los núcleos en humanos, y estar asociados al sistema olfatorio, mientras que el otro grupo nuclear incluye los núcleos lateral y basal que han experimentado un enorme desarrollo en humanos y aparecieron posteriormente en la evolución.

Los autores Crosby y Humphrey (1941) diferenciaron cuatro grupos nucleares: el grupo baso-lateral (núcleos lateral, basal y accesorio basal), el grupo córtico-medial (incluyendo los núcleos cortical, medial, central y el núcleo del tracto olfatorio lateral), el área amigdalina anterior y el área de transición córtico-amigdalina. Posteriormente, Swanson y Petrovich (1998) distinguieron tres porciones en el CA en relación con su origen embriológico: una expansión ventromedial del estriado (núcleos central y medial, y área amigdalina anterior), otra considerada corteza olfatoria caudal (núcleo del tracto olfatorio lateral, núcleo cortical y áreas amigdalinas postpiriforme y amígdalo-piriforme), y otra que sería una extensión ventromedial del claustro (núcleos basal, lateral y posterior).

Al tratar de la organización nuclear del CA es oportuno definir el término acuñado por Alheid y Heimer (1988) de la “amígdala extendida”, que comprende a los núcleos central y medial del CA. Esta entidad incluye además al núcleo del lecho de la estría terminal y a unas neuronas que mantienen la comunicación entre estas estructuras a través de la cápsula interna y que quedan asociadas a la estría terminal. Ya desde el trabajo de Johnston en 1923 se establece así una dicotomía entre la llamada amígdala córtico-basolateral (que incluye al grupo basolateral y al núcleo cortical del CA) y la amígdala extendida, que sigue vigente en la actualidad (Cho y Fudge, 2010). Estas dos regiones del CA presentan sistemas de neurotransmisión distintos: las neuronas de proyección de la amígdala centro-medial, al igual que en el estriado, son GABAérgicas, mientras que las de la amígdala córtico-basolateral, igual que las de la corteza cerebral, son glutamatérgicas (McDonald, 1992; Esclapez y cols.,

1993; McDonald y Augustine, 1993; Pitkanen y Amaral, 1994; Swanson y Petrovich, 1998).

Los estudios clásicos de delimitación nuclear del CA realizados a partir de cortes de Nissl se han ido complementando con datos de trabajos en los que se utilizaron otros tipos de marcadores regionales como las enzimas acetilcolinesterasa o nicotinamida adenina dinucleótido diaforasa (Ishii y Friede, 1967) o las tinciones de Golgi y de lipopigmentos (Braak y Braak, 1983). En la mayoría de los núcleos del CA pueden distinguirse varias subdivisiones en base a la morfología de sus células visualizadas con Nissl, a la intensidad de la tinción con las enzimas mencionadas anteriormente, o en función de las diferentes proyecciones de las mismas según estudios con trazadores axonales. En la Tabla 1 se detallan las clasificaciones y nomenclatura de las parcelaciones del CA adoptadas por los principales autores de las tres últimas décadas y la que se ha seguido en el presente trabajo; además, la Tabla 2 de Sorvari y cols. (1995) recoge otras clasificaciones más antiguas, desde la de Brockhaus (1938) hasta la propuesta por Sims y Williams (1990).

El grupo basolateral, muy desarrollado en la especie humana, consta de tres núcleos: lateral, basal y accesorio basal. El núcleo lateral ocupa dos tercios del CA y hay mucha variación entre los distintos autores en el número de subdivisiones en las que se divide: desde ninguna (Crosby y Humphrey, 1941; Brady y cols., 1992), dos (Price y cols., 1987; Sorvari y cols., 1995), hasta cuatro (Sims y Williams, 1990) o cinco (Mai y cols., 2004), en base a las diferencias en el tamaño y empaquetamiento de sus células. En el núcleo basal las neuronas presentan un gradiente de tamaño, de forma que son de menor tamaño en regiones mediales o ventrales y más grandes en regiones más laterales o dorsales. En función de este criterio morfológico y del distinto contenido de acetilcolinesterasa, Crosby y Humphrey (1941) distinguieron dos subdivisiones del núcleo basal – lateral (magnocelular) y medial (parvocelular)-, pero la mayoría de los autores incluyen una subdivisión intermedia entre estas dos (Price y cols., 1987; Sims y Williams, 1990; Brady y cols., 1992; Sorvari y cols., 1995). Bien es cierto que Crosby y Humphrey (1941) consideraron dentro de la subdivisión medial otras dos porciones, superficial y profunda, ésta última quedando a continuación del área de transición córtico-amigdalina. El trabajo de Mai y cols. (2004) diferenció hasta cinco regiones dentro del núcleo basal. Por último, el núcleo accesorio basal ha sido dividido bien en dos regiones con diferentes nombres - medial y lateral, dorsal y

ventral o magno y parvocelular - (Crosby y Humphrey, 1941; Sims y Williams, 1990; Brady y cols., 1992), o en tres regiones añadiendo una porción ventromedial (Price y cols., 1987) o en cuatro según el atlas de Mai y cols. (2004). Esta tercera subdivisión ventromedial parece exclusiva de primates (Pitkanen y Amaral, 1998), muy probablemente por la mayor especificidad de las conexiones. Según algunos autores este núcleo amigdalino está ausente en algunas especies como el gato (Fox, 1940; Crosby y Humphrey, 1941).

Dentro del grupo corticomedial todos los autores distinguen el núcleo cortical del medial. El primero de ellos se ha subdividido a su vez en dos regiones que según autores se nombran como lateral y medial (Sims y Williams, 1990) o dorsal y ventral (Brady y cols., 1992), o bien en una región anterior y otra posterior (Price y cols., 1987; Sorvari y cols., 1995; Kemppainen y Pitkanen, 2000; Mai y cols., 2004). Mai y cols. (2004) además distinguen una porción dorsal y otra ventral dentro del núcleo cortical anterior y una porción anterior dentro del núcleo medial. La mayoría de los autores mencionados (Price y cols., 1987; Sorvari y cols., 1995; Kemppainen y Pitkanen, 2000) describen la llamada corteza periamigdalina, dentro de la cual distinguen varias subdivisiones que varían ligeramente según el autor: corteza periamigdalina 1, 2 y 3 y porción sulcal. La mayor parte de la corteza periamigdalina estaría incluida dentro del núcleo cortical y el área de transición córtico-amigdalina del resto de los autores; de hecho, la porción sulcal de la corteza periamigdalina coincide prácticamente con la región de transición córtico-amigdalina.

En cuanto al grupo o núcleo central, la mayor parte de los autores distinguen una subdivisión medial y otra lateral, excepto Sims y Williams (1990) que describen hasta cinco subdivisiones parceladas en función de sus propiedades citoarquitectónicas (Nissl), y su tinción para acetilcolinesterasa y Gallyas.

Otras regiones de menor tamaño que se incluyen en el CA son el área de transición córtico-amigdalina, también llamada de transición cortical o de transición parahipocampal-amigdalina, que en el caso de Price y cols. (1987) coincidiría con la porción sulcal de la corteza periamigdalina, y el área amigdalina anterior, descrita por todos los autores aunque su delimitación no es consistente entre todos ellos. Algunos trabajos distinguen además un área amígdalo-hipocampal, en niveles del CA posteriores y ventromediales, aunque no superficiales (Price y cols., 1987; Amaral y

cols., 1992; Sorvari y cols., 1995; Mai y cols., 2004). Por último, la mayoría de los autores destacan la presencia de grupos de neuronas muy empaquetadas ubicadas entre los núcleos del CA que reciben distintos nombres, desde neuronas intercaladas a núcleos intercalados o grupos celulares intercalados.

La tarea de subdividir el CA adecuadamente es importante porque cada uno de sus núcleos o grupos nucleares además de poseer un particular origen embriológico y unas proyecciones concretas, codifica para distintos aspectos del miedo (Fanselow y Gale, 2003). Así, por ejemplo, el grupo basolateral, y especialmente el núcleo lateral, procesa el significado emocional de los estímulos en general, no sólo relacionados con el miedo, permitiendo a otras estructuras el acceso a esta información, y está implicado en la supresión de las respuestas al miedo y en su reaparición una vez extinguidas (Fanselow y Gale, 2003; Maren y Quirk, 2004; Herry y cols., 2006). El núcleo central es activado por el grupo basolateral y es capaz de iniciar comportamientos para defenderse de las amenazas específicas de especie que hacen peligrar su supervivencia (Kapp y cols., 1979; Fanselow y Gale, 2003; Maren y Quirk, 2004; Ciochi y cols. 2010). Los núcleos del grupo corticomédial, aunque también el núcleo lateral, se activan ante la presentación de caras con expresión de miedo (Gamer y cols., 2010).

Tabla 1. Parcelación nuclear del CA según distintos autores y en nuestro estudio

Sims y Williams, 1990	¹ Brady, 1992	² Price y cols., 87; Sorvari y cols., 1995; Pitkänen y Kemppainen, 2002	Mai y cols., 2004	Nuestro estudio
		NÚCLEOS PROFUNDOS	GRUPO BASOLATERAL (BL)	
<u>LATERAL</u> • Externo • Dorsal • Lateral • Medial	<u>LATERAL</u>	<u>LATERAL</u> • Lateral • Medial	<u>LATERAL</u> • Dorsolateral • Dorsomedial • Dorsal anterior • Intermedio • Ventral	<u>LATERAL (L)</u> • Externo (Lex) • Dorsal (Ld) • Lateral (Ll) • Medial (Lm)
<u>BASAL</u> • Lateral • Central • Medial	<u>BASAL</u> • Magnocelular • Intermedio • Parvocelular	<u>BASAL</u> • Magnocelular • Intermedio • Parvicelular	<u>BASOLATERAL</u> • Dorsal • Intermedio • Ventrolateral • Ventromedial • Paralaminar	<u>BASAL (B)</u> • Magnocelular (Bmc) • Intermedio (Bint) • Parvocelular (Bpc)
<u>ACCESORIO BASAL</u> • Dorsal • Ventral	<u>ACCESORIO BASAL</u> • Magnocelular • Parvocelular	<u>ACCESORIO BASAL</u> • Magnocelular • Parvicelular • Ventromedial	<u>BASOMEDIAL</u> • Dorsomedial • Centromedial • Ventromedial • Dorsolateral	<u>ACCESORIO BASAL (AB)</u> • Dorsal (ABd) • Ventral (ABv)
		<u>PARALAMINAR</u> • Medial* • Lateral*		
GRUPO CÓRTICO-MEDIAL (CM)		NÚCLEOS Y/O ÁREAS SUPERFICIALES	GRUPO CÓRTICO-MEDIAL (CM)	
<u>CÓRTICAL</u> • Medial • Lateral	<u>CÓRTICAL</u> • Ventral • Dorsal	<u>CÓRTICAL</u> • Anterior • Posterior	<u>CÓRTICAL</u> • Anterior --porción dorsal --porción ventral • Posterior	<u>CÓRTICAL (Co)</u> • Medial (Com) • Lateral (Col)
<u>MEDIAL</u>	<u>MEDIAL</u>	<u>MEDIAL</u>	<u>MEDIAL</u> • Anterior	<u>MEDIAL (Me)</u>
		CORTEZA PERIAMIGDALINA		
		NÚCLEO DEL TRACTO OLFATORIO LATERAL		
		NÚCLEOS Y/O ÁREAS RESTANTES	GRUPO CENTRAL (Ce)	
<u>CENTRAL</u> • Medial • Lateral • Dorsolateral • Ventrolateral • Intersticial	<u>CENTRAL</u> • Medial • Lateral	<u>CENTRAL</u> • Medial • Lateral	<u>CENTRAL</u> • Medial • Lateral	<u>CENTRAL (Ce)</u> • Medial (Cem) • Lateral (Cel)
ÁREA DE TRANSICIÓN CÓRTICO-AMIGDALINA	ÁREA DE TRANSICIÓN CORTICAL		ÁREA DE TRANSICIÓN PARAHIPOCAMPAL-AMIGDALINA	ÁREA DE TRANSICIÓN CÓRTICO-AMIGDALINA (CTA)
ÁREA AMIGDALINA ANTERIOR	ÁREA AMIGDALINA ANTERIOR	ÁREA AMIGDALINA ANTERIOR	ÁREA AMIGDALINA ANTERIOR	
			CLAÚSTRO PREAMIGDALINO	ÁREA PERIAMIGDALINA (PA)
			ÁREA PERIAMIGDALINA	
GRUPOS CELULARES INTERCALADOS	NEURONAS INTERCALADAS	NÚCLEOS INTERCALADOS		
		ÁREA AMÍGDALO-HIPOCAMPAL	ÁREA AMÍGDALO-HIPOCAMPAL	

*Subdivisiones añadidas en la clasificación de Pitkänen y Kemppainen (2002) con respecto a la de Price y cols. (1987). En paréntesis se indican las abreviaturas usadas en este estudio. ¹ Clasificación realizada en *Saimiri*

sciureus y humano; ² Clasificación realizada en *Macaca fascicularis*. El resto de trabajos se refieren a la especie humana.

1.2. Poblaciones celulares del CA

El CA contiene básicamente tres poblaciones celulares: neuronas, células de glía y células endoteliales. La morfología, el número y la densidad de las dos primeras poblaciones en los diferentes núcleos del CA y sus posibles alteraciones en patologías como la esquizofrenia o el autismo han sido objeto de numerosos estudios durante los últimos años (Pakkenberg, 1990; Bowley y cols., 2002; Hamidi y cols., 2004; Schumann y Amaral, 2005; Schumann y Amaral, 2006; Berretta y cols., 2007; Bezchlibnyk y cols., 2007; Kreczmanski y cols., 2007).

1.2.1. Poblaciones neuronales del CA

Los estudios centrados en analizar con el método de Golgi la morfología de las neuronas del CA de roedores, gato, pulpo y humano concluyeron que el grupo basolateral contiene tres tipos principales de neuronas que fueron denominadas como de clase I, II y III en roedores (McDonald, 1982; Millhouse y DeOlmos, 1983; McDonald, 1984;), pulpo (McDonald y Culberson, 1981) y humano (Braak y Braak, 1983) o neuronas de tipos P y S en el gato (Hall, 1972). Las neuronas de clase I (o espinosas) son células de tipo piramidal similares a las existentes en la corteza cerebral que conforman la población mayoritaria del CA (alrededor de un 70 %). Tienen una dendrita apical dirigida hacia el polo rostral del CA y dan una apariencia estrellada en el plano coronal debido a que su plexo dendrítico basal está orientado en dicho plano; estas neuronas corresponden a las descritas como células P en el gato, presentan de 3 a 5 dendritas primarias con una de ellas más gruesa con apariencia de dendrita apical, y otras dendritas secundarias con menos espinas que las principales. En general, todos los autores coinciden en que el tamaño de esta clase neuronal varía según el núcleo del CA estudiado, y por otro lado, que las dendritas raramente cruzan los bordes entre los núcleos. Las neuronas de clase II son mucho menos frecuentes y recuerdan a las células estrelladas, no espinosas, de la corteza cerebral; corresponden a las neuronas de tipo S del gato (Hall, 1972). El soma de estas neuronas es sólo ligeramente menor que el de las de clase I, no presentan espinas ni una dendrita apical aparente y su axón se ramifica profusamente cerca del soma, por lo que se sugirió que se trata de una población de neuronas locales (Millhouse y DeOlmos, 1983). En el cerebro humano, la cantidad de pigmento contenido por estas neuronas sirvió de criterio para

subdividir las en dos clases (Braak y Braak, 1983): II (mucho pigmento) y III (poco o nulo). Otras poblaciones celulares menos numerosas descritas hasta el momento en el CA son: las llamadas “neuronas extendidas” grandes, caracterizadas por tener dendritas largas y gruesas no muy numerosas, con escasas espinas, que se localizan en la porción rostral del núcleo basal y sus dendritas quedan en el límite entre los núcleos basal y lateral (Millhouse y DeOlmos, 1983); las células estrelladas pequeñas y sin espinas dendríticas (denominadas células neurogliaformes por Tombol y Szafranska-Kosmal (1972), McDonald (1982) y McDonald (1984) y las llamadas células “cono” por la forma en cono de sus plexos de dendritas moderadamente espinosas (Millhouse y DeOlmos, 1983).

Tanto en el grupo central (McDonald, 1982) como en los núcleos intercalados (Millhouse, 1986) y en el medial (Dall'Oglio y cols., 2012) la composición celular varía con respecto a la descrita en el grupo basolateral. El núcleo central presenta distintos tipos neuronales según la región considerada. Así, en la subdivisión medial se encontraron dos grupos de neuronas: unas con soma ovoideo, piriforme o fusiforme, con 3-4 dendritas primarias no espinosas que se ramifican en otras dendritas que sí presentan espinas, y cuyo axón abandona el núcleo tras dejar escasas colaterales; las otras neuronas, también consideradas de proyección, están situadas ventralmente y presentan un soma grande y dendritas gruesas no espinosas. En la subdivisión lateral se describió una población homogénea de neuronas espinosas de mediano tamaño y de morfología estrellada que se asemejan a las del estriado (Hall, 1972; McDonald, 1982a); del soma emergen de 3 a 5 dendritas primarias que a medida que se dividen en dendritas de mayor orden aparecen pobladas de una mayor cantidad de espinas. Al igual que ocurría en la subdivisión medial, el axón de estas neuronas generalmente abandona el núcleo tras dejar alguna colateral en él. Por otro lado, las neuronas situadas en la periferia de esta subdivisión del núcleo central tienden a extender sus dendritas paralelamente al perímetro de la misma, sin rebasar sus límites. En el núcleo medial humano se han descrito hasta cinco tipos morfológicos de neuronas; todas son multipolares y su cuerpo celular puede ser de forma redondeada, ovoidea, fusiforme o angular (Dall'Oglio y cols., 2012), siendo el fenotipo más común el fusiforme y no encontrándose neuronas de morfología típica piramidal, como ocurre en el grupo basolateral. Las neuronas de tipo fusiforme presentan espinas de diferentes morfologías tanto en las dendritas como en el cuerpo celular y se ha visto que las

espinas se localizan en ramificaciones dendríticas medias y distales, y no en dendritas proximales (Dall'Oglio y cols., 2012).

Además, se ha visto que las neuronas de los núcleos central y medial son similares a las de las subdivisiones medial y lateral del núcleo del lecho de la estría terminal (McDonald, 1983); esto contribuye a la idea de que ambas subdivisiones de este núcleo y los núcleos central y medial están relacionados anatómicamente aunque estén separados físicamente por la cápsula interna y situadas en extremos opuestos de la estría terminal.

1.2.1.1. Poblaciones de interneuronas

Las interneuronas (IN) o neuronas locales del CA están conectadas tanto con neuronas de proyección (McDonald y cols., 2005; Muller y cols., 2006) como con IN (Muller y cols., 2003; Muller y cols., 2005). Las neuronas locales pueden subdividirse en distintas poblaciones caracterizadas histoquímicamente y electrofisiológicamente (véase Mascagni y cols. (2009)). Cada tipo de IN presenta patrones característicos de actividad eléctrica, se relaciona con dominios subcelulares concretos de las neuronas de proyección y está modulado de forma específica por estímulos sensoriales externos (Bienvenu y cols., 2012).

En roedores se han descrito al menos cuatro poblaciones de IN químicamente bien definidas: (1) IN parvalbumina (PV) positivas (+) (80 % de las cuales contienen calbindina (CB) (Kemppainen y Pitkanen, 2000; McDonald y Betette, 2001; McDonald y Mascagni, 2001), (2) IN somatostatina (SOM)+ (67-91 % de las cuales expresan también CB y la mayoría de ellas neuropéptido Y (McDonald y Pearson, 1989; McDonald y Mascagni, 2002; McDonald y cols., 2012), (3) IN colecistoquinina+ (30-40 % de las cuales contienen CB) (Mascagni y McDonald, 2003) y (4) IN calretinina (CR)+/péptido intestinal vasoactivo+ (lo contienen un 66-71 % del total de CR+)/ colecistoquinina+ (10-31 % del total de CR+) (Kemppainen y Pitkanen, 2000; McDonald y Mascagni, 2001; Mascagni y McDonald, 2003). En primates también se han identificado cuatro poblaciones de IN químicamente definidas, aunque serían necesarios nuevos estudios de colocalización para asegurar que son poblaciones realmente independientes y no se solapan entre ellas: (1) IN PV+ (25 % de las cuales contienen CB) (Pitkanen y Amaral, 1993b; Sorvari y cols., 1995; Pantazopoulos y cols., 2006; Mascagni y cols., 2009), (2) IN CB+ (30-35 % de las

cuales contienen PV) (Pitkanen y Amaral, 1993a; Sorvari y cols., 1996b; Mascagni y cols., 2009), (3) IN SOM+ (Amaral y cols., 1989; Desjardins y Parent, 1992; McDonald y cols., 1995; Mascagni y cols., 2009), (4) IN CR+ (Sorvari y cols., 1996c; Mascagni y cols., 2009). De estos estudios, solamente algunos se refieren al CA humano y no son suficientes para definir con certeza el número de poblaciones de IN existentes ni las cantidades relativas de cada una en los distintos núcleos del CA.

De las poblaciones de IN del CA de primates que contienen proteínas ligadoras de calcio, las PV+ y las CR+ son las más abundantes y no se solapan entre sí (Mascagni y cols., 2009). Se cree que todas o la gran mayoría de las IN PV y CR+ son GABAérgicas; en primates no humanos se ha visto que un 90-94 % de las PV+ lo son (Mascagni y cols., 2009), y en el caso de las CR+, a pesar de que no existen estudios de colocalización en primates, está descrito que la mayoría presentan una morfología no piramidal propia de neuronas locales (McDonald, 1994). En el CA humano no existen datos que determinen si las neuronas que contienen estas proteínas ligadoras de calcio expresan GABA, aunque por su morfología se piensa que la mayoría son IN (Sorvari y cols., 1996a; Sorvari y cols., 1996c; Pantazopoulos y cols., 2006).

Las IN PV+ del CA han sido caracterizadas morfológicamente como células en cesto o en candelabro (Pitkanen y Amaral, 1993b; Sorvari y cols., 1995; Sorvari y cols., 1996a); estos nombres se deben a la morfología de los terminales axónicos de estas neuronas, que, o bien forman una cesta que envuelve a neuronas piramidales, o bien forman unos “cartuchos” constituidos por filas paralelas de botones que se sitúan sobre el segmento inicial del axón de neuronas piramidales formando sinapsis simétricas. La densidad de estos cartuchos en el núcleo lateral llega a ser de 148 cartuchos/mm², y esta gran cantidad sugiere que estas IN deben desempeñar un importante papel inhibitorio sobre las neuronas de proyección (Sorvari y cols., 1996a). Por otro lado, el trabajo de Pantazopoulos y cols. (2006) en el CA humano diferencia cuatro subpoblaciones de IN que contienen PV: una población que también expresa CB (18 %), otra caracterizada por estar envuelta en “cestas perineuronales” (31 %), otra que expresa CB y al mismo tiempo está envuelta en dichas cestas (7 %), y el 44 % restante que no expresa ninguna de las dos cosas. Se cree que cada subpoblación de IN desempeña una función diferente en el procesamiento de la información que ocurre en el CA.

En cuanto a la distribución de las poblaciones de IN en el CA, las PV+ se restringen prácticamente al grupo basolateral, mientras que las CR+ y las CB+ se distribuyen ampliamente y de forma homogénea en todo el CA, incluyendo el grupo córtico-medial y el central que no contienen apenas IN PV+. Cabe destacar que las neuronas CR+ son muy abundantes en el núcleo accesorio basal, a diferencia de las PV+, que abundan en el núcleo lateral pero disminuyen radicalmente hacia regiones más mediales del grupo basolateral (Sorvari y cols., 1995; Sorvari y cols., 1996b; Sorvari y cols., 1996c; Pantazopoulos y cols., 2006).

Funcionalmente las IN PV+ son especialmente importantes por su capacidad de regular la actividad de las neuronas piramidales de proyección por medio de su innervación perisomática o dendrítica (Sorvari y cols., 1996a; Rainnie y cols., 2006; Woodruff y Sah, 2007a; Woodruff y Sah, 2007b). Al mismo tiempo, estas IN PV+ reciben entradas excitadoras de colaterales axónicas de neuronas piramidales locales, lo cual forma una potente inhibición *feedback* sobre las de proyección (Woodruff y Sah, 2007a). Se piensa que las conexiones entre las IN PV+ y las neuronas de proyección son el substrato anatómico para la generación de oscilaciones rítmicas sincronizadas en el complejo basolateral relacionadas con la vigilia y la memoria emocional (Paré y Gaudreau, 1996; Muller y cols., 2006). A diferencia de las IN PV+, la bibliografía referida a la función de las neuronas CR+ en el CA es prácticamente inexistente.

El estudio de Rainnie y cols. (2006) describe cuatro patrones electrofisiológicos distintos de las IN del CA, y analiza la morfología y el contenido en péptidos o proteínas ligadoras de calcio de estos cuatro tipos de IN. Mientras que las IN PV+ se asocian con dos de esos patrones, los de disparo “rápido” y “en ráfaga”, las IN CR+ presentan un patrón de disparo “regular”. Las IN de disparo “rápido” responden de forma característica a las corrientes despolarizantes con un tren de potenciales de acción de alta frecuencia que no se adapta hasta pasado un tiempo determinado (750 ms); las de disparo “en ráfaga”, a su vez, presentan, sin ningún estímulo exógeno, ráfagas espontáneas de potenciales de acción debidas a la sumación de corrientes excitatorias postsinápticas; las de disparo “regular” se diferencian del resto de patrones por presentar una mayor resistencia de membrana en reposo que el resto de patrones, y, al igual que las de disparo “en ráfaga”, responden a las corrientes despolarizantes con una corta ráfaga de potenciales de acción seguida de un patrón de actividad relativamente rítmico. Según estos datos, y teniendo en cuenta que no se ha

demostrado la existencia de contactos directos entre las IN CR+ y las neuronas de proyección del CA, a diferencia de lo que ocurre con las PV+, la función de cada una de estas dos poblaciones de IN, CR+ y PV+, en el CA será probablemente muy distinto.

1.2.2. Poblaciones de células de glía

Los trabajos centrados en estudiar las poblaciones de glía en el CA son escasos (Dall'Oglio y cols., 2012; Johnson y cols. 2012) y la mayor parte se ha ocupado de analizar los astrocitos visualizados mediante inmunohistoquímica frente a la proteína fibrilar ácida de la glía. El trabajo de Dall'Oglio y cols. (2012) pone de manifiesto la existencia de distintos patrones de ramificación de los astrocitos en el núcleo medial del CA, pudiendo esta heterogeneidad morfológica estar relacionada con una específica contribución en las llamadas sinapsis tripartitas (Araque y cols., 1999).

El estudio estereológico de Chareyron y cols. (2011) demostró que la densidad de células de glía en el CA disminuye en el mono con respecto a la rata, aunque esta disminución no es tan acusada como la que afecta a las neuronas. Mediante la técnica de Nissl estos autores distinguen morfológicamente los astrocitos de los oligodendrocitos en el mono rhesus, pero no les es posible diferenciar estas dos poblaciones gliales en la rata debido a su menor tamaño, por lo que no pudieron determinar si la menor densidad de glía en primates frente a roedores es debida al descenso de una sola o de ambas poblaciones gliales (Chareyron y cols., 2011).

Numerosos estudios han puesto de manifiesto que la glía experimenta cambios cuantitativos en varias enfermedades psiquiátricas (véase el apartado 1.5.2.2.), y el trabajo de Hamidi y cols. (2004) destaca la importancia de diferenciar en el CA los astrocitos, oligodendrocitos y la microglía para poder estudiar su función específica en esta región cerebral y su posible alteración en este tipo de enfermedades psiquiátricas.

1.2.3. Células endoteliales

Las células endoteliales constituyen otro grupo celular presente en el CA. Aunque los datos existentes son bastante escasos, sí se han realizado algunos estudios de cuantificación en primates no humanos y en el cerebro humano centrados en analizar la cantidad de células endoteliales, además de las neuronas y la glía, o la longitud de los microvasos, con el fin de evaluar el efecto que sobre el número de

células pueda tener la medicación con antipsicóticos o la posible alteración en la microcirculación sanguínea en los enfermos esquizofrénicos (Konopaske y cols., 2007; Kreczmanski y cols., 2009).

1.3. Volumen del CA

El volumen del CA y de algunos de sus núcleos ha sido determinado tanto en cerebros de individuos sanos como en el de pacientes psiquiátricos (Heckers y cols., 1990; Pakkenberg, 1990; Chance y cols., 2002; Schumann y Amaral, 2006; Berretta y cols., 2007; Kreczmanski y cols., 2007) y los valores de las estimaciones de volumen de los individuos controles varían enormemente entre los estudios existentes. Así, Schumann y Amaral (2006) estimaron que el CA en su conjunto ocupaba 1380 mm^3 , al igual que Heckers y cols. (1990), que estimaron un volumen de alrededor de 1200 mm^3 , mientras que Chance y cols. (2002) obtuvieron un volumen para el CA de 630 mm^3 . En cuanto al volumen de los núcleos del CA, el núcleo lateral ocupaba un volumen de entre 250 mm^3 (Berretta y cols., 2007) y $400 - 450 \text{ mm}^3$ (Schumann y Amaral, 2006; Kreczmanski y cols., 2007); el basal desde 150 (Berretta y cols., 2007) ó 200 mm^3 (Pakkenberg, 1990; Kreczmanski y cols., 2007) hasta 343 mm^3 (Schumann y Amaral, 2006); el accesorio basal ocupaba desde 70 mm^3 (Berretta y cols., 2007; Kreczmanski y cols., 2007) hasta 150 mm^3 (Schumann y Amaral, 2006); y el central tan solo ocupaba 34 mm^3 (Schumann y Amaral, 2006). Gran parte de estas diferencias entre estudios parecen deberse a una distinta delimitación del CA y de sus núcleos, aunque también podrían haber influido las diferencias en el procesamiento del tejido o en la metodología empleada para estimar el volumen.

1.4. Número y densidad de células en el CA

En los últimos años se han realizado numerosos estudios centrados en cuantificar el número de neuronas y de glía en el CA de diversas especies. A continuación describiremos los datos existentes en la literatura acerca del número y la densidad de neuronas, glía y células endoteliales, centrándonos especialmente, aunque no exclusivamente, en la información obtenida en primates no humanos y en el hombre.

1.4.1. Neuronas

El número y la densidad de neuronas del CA procedente de sujetos humanos controles, es decir, fallecidos sin ningún diagnóstico de enfermedad neurológica o psiquiátrica, ha sido analizado en numerosos trabajos (Pakkenberg, 1990; Bowley y cols., 2002; Schumann y Amaral, 2005; Bezchlibnyk y cols., 2007; Kreczmanski y cols., 2007). Estos estudios cuantitativos se realizaron usando técnicas estereológicas sobre cortes del CA teñidos con Nissl, que es una tinción que permite diferenciar neuronas de células de glía, pero no distinguir entre neuronas de proyección e IN. Los resultados de estos estudios pusieron de manifiesto una cierta heterogeneidad en cuanto a la densidad neuronal existente en los distintos núcleos del CA, siendo ésta mayor en los núcleos central (10.600 neuronas/ mm^3), cortical (9.200 neuronas/ mm^3) y algo menor en el lateral, basal y accesorio basal (alrededor de $8.500 - 9.000$ neuronas/ mm^3). En primates no humanos el núcleo lateral presenta mayor densidad neuronal (42.000 neuronas/ mm^3) que el resto de los núcleos del CA, por encima incluso del central (37.000 neuronas/ mm^3) y el accesorio basal (36.000 neuronas/ mm^3) (Chareyron y cols., 2011).

Algunos de los estudios mencionados anteriormente calcularon también el número absoluto de neuronas encontrando que el CA completo en la especie humana contiene unos 12 millones y el núcleo lateral, que es región amigdalina que mayor número de neuronas presenta, alrededor de 4 millones (Schumann y Amaral, 2005). También en primates no humanos, el núcleo lateral contiene el mayor número de neuronas del CA entre 1,3 y 1,6 millones, seguido por el basal, con 1,2 millones aproximadamente o el accesorio basal con unas 500.000 a 800.000 neuronas (Carlo y cols., 2010; Chareyron y cols., 2011). En el caso del núcleo basal, los datos cuantitativos de la cantidad de neuronas varían considerablemente entre los distintos estudios debido a la inclusión o no dentro del núcleo de la región paralamina, de gran densidad neuronal (Chareyron y cols., 2011).

El estudio estereológico de Chareyron y cols. (2011), centrado en analizar la cantidad de neuronas y de glía en el CA de roedores y primates, ha demostrado que pese a que el número de neuronas del CA en primates es muy superior al de roedores, la densidad neuronal es unas 3 veces menor en primates no humanos que en roedores, y unas 3,8 veces menor en humanos que en primates no humanos. El descenso en la densidad neuronal en el CA de primates va acompañado de un aumento en la

cantidad de neuropilo (Chareyron y cols., 2011). También se ha visto que el aumento del número de neuronas de roedores a primates en los núcleos del grupo basolateral es proporcional al aumento en el número de neuronas que experimenta el CA considerado en su conjunto; sin embargo, el incremento en cantidad neuronal observado en los núcleos central y medial, cuando se comparan roedores y primates, es mucho menos marcado y no es proporcional al del CA en su conjunto (Carlo y cols., 2010).

Los estudios cuantitativos que diferencian poblaciones específicas de neuronas del CA suelen referirse a poblaciones GABAérgicas consideradas como IN. Estos trabajos no utilizan técnicas estereológicas de conteo, y en algunos casos utilizan métodos de cuantificación sesgados, pero proporcionan una valiosa información acerca de la distribución de los distintos tipos de neuronas en el CA. De esta forma, existen estudios centrados en la distribución y densidad de neuronas que contienen proteínas ligadoras de calcio como la PV (Sorvari y cols., 1995; Pantazopoulos y cols., 2006), la CR (Sorvari y cols., 1996c) ó la CB (Sorvari y cols., 1996b) en los distintos núcleos del CA humano. Así mismo, se han realizado estudios al respecto en otras especies como la rata (Kemppainen y Pitkanen, 2000). En el grupo basolateral del primate, las neuronas PV+ constituyen entre un 29 y un 38 % del total de células GABAérgicas, las CR+ suponen entre un 23 y un 27 %, y las CB+ entre un 30 y 46 % en las subdivisiones dorsal/intermedia del núcleo lateral y en la magnocelular del núcleo basal, respectivamente (Mascagni y cols., 2009). En el CA de la rata, del total de neuronas GABAérgicas en las subdivisiones ventromedial del núcleo lateral y en las subdivisiones posterior y anterior del basolateral, las PV+ suponen el 19, el 36 y el 43 %, las CR+ el 20, 21 y 17 % y las CB+ el 41, 58 y 56 %, respectivamente (Kemppainen y Pitkanen, 2000). En conjunto, estas tres poblaciones conforman un 80 % de las neuronas GABAérgicas totales en el núcleo basolateral anterior, mientras que solamente suponen un 58 % en el núcleo lateral, porción ventromedial. Además, las neuronas SOM+ constituyen entre un 11-18 % de las neuronas GABAérgicas del CA de la rata (McDonald y Mascagni, 2002), aunque recientemente se ha demostrado la existencia de neuronas de proyección no piramidales que contienen SOM y GABA, por lo que este porcentaje puede incluir a este tipo de neuronas (McDonald y cols., 2012).

1.4.2. Células de glía

Los estudios dedicados a determinar el número y la densidad de células de glía en el CA son menos numerosos que los centrados en neuronas (Pakkenberg, 1990; Bowley y cols., 2002; Hamidi y cols., 2004; Bezchlibnyk y cols., 2007), y solamente uno de ellos analiza estos aspectos diferenciando los núcleos amigdalinos (Bezchlibnyk y cols., 2007), en lugar de estimarlos en el conjunto del CA. El análisis por núcleos puso de manifiesto que existen ligeras diferencias tanto en la densidad como en el tamaño de las células de glía entre los núcleos del grupo basolateral (Bezchlibnyk y cols., 2007), siendo el núcleo basal el que mayor densidad de glía presenta. El estudio de Hamidi y cols. (2004) realizado en cerebros humanos es el único que diferencia las tres poblaciones de células de glía utilizando técnicas inmunohistoquímicas, y proporcionó datos de densidad del conjunto de poblaciones de glía, unas 60.000 células/mm³, de astrocitos y oligodendrocitos por separado, entre 24.700 - 25.500 células/mm³, y de la microglía, unas 3.500 células/mm³. El estudio de Chareyron y cols. (2011) analiza la densidad y el número de células de glía en el mono rhesus en comparación con la rata, y diferencia astrocitos de oligodendrocitos. Los resultados de este estudio indican que los números de estas dos poblaciones gliales difieren en los distintos núcleos del AC, existiendo mayor cantidad de una población u otra según el núcleo amigdalino estudiado. Así, los núcleos central y medial contienen una menor cantidad de oligodendrocitos que astrocitos, mientras que en el lateral y el basal sucede al contrario, habiendo mayor cantidad de oligodendrocitos (Chareyron y cols., 2011). La mayor cantidad de oligodendrocitos puede estar relacionada con el considerable desarrollo del grupo basolateral del primate, y la consecuente mayor cantidad de conexiones que parten o llegan a sus núcleos lateral y basal y requieren de los oligodendrocitos para transmitir la información de manera más eficiente.

Chareyron y cols. (2011) describen en su estudio un ratio glía-neurona en el CA que es mucho mayor en humanos que en el resto de primates. Además, este ratio en el CA excede al que hay en diferentes regiones de la corteza cerebral, lo cual parece deberse a la menor densidad neuronal en el CA en comparación con las distintas regiones neocorticales, quizás relacionada con la gran cantidad de conexiones intrínsecas y extrínsecas que atraviesan el CA. También se ha visto que este ratio glía-neurona aumenta a lo largo de la escala filogenética, principalmente por el incremento en el número de glía; así, en el CA humano el ratio es de 5,36 (Hamidi y cols., 2004;

Schumann y Amaral, 2005), mientras que en mono es de 1,55 y en la rata de 0,86 (Chareyron y cols., 2011), por lo que la mayor cantidad de glía por neurona está relacionada con una mayor complejidad en esta región cerebral.

1.4.3. Células endoteliales

En la literatura no existen trabajos dedicados a cuantificar las células endoteliales en el CA. El estudio realizado por Kreczmanski y cols. (2009) (Kreczmanski y cols., 2009) se centró en estimar en el núcleo lateral del CA humano la longitud absoluta, densidad de longitud y longitud por neurona de microvasos, demostrando que en este núcleo la densidad de longitud es de alrededor de 600 mm/mm³. En la corteza parietal de macacos, el estudio de Konopaske y cols. (2007) estimó el número de células endoteliales en 25.000 cells/mm³.

1.5. Alteraciones morfológicas del CA en condiciones patológicas

1.5.1. Alteraciones en el volumen

Las variaciones del volumen del CA en enfermedades psiquiátricas como la esquizofrenia, el trastorno bipolar o la depresión, y en el autismo han sido objeto de numerosos estudios (Heckers y cols., 1990; Pakkenberg, 1990; Chance y cols., 2002; Schumann y Amaral, 2006; Berretta y cols., 2007; Kreczmanski y cols., 2007). De estos trabajos, sólo el de Kreczmanski y cols. (2007) y el de Berretta y cols. (2007) consiguieron demostrar una modificación del tamaño del CA. Así, el primero de estos estudios demostró que en pacientes esquizofrénicos el volumen del núcleo basal del CA disminuye aproximadamente un 11 % y el del núcleo lateral entre un 12 y un 17 % (Kreczmanski y cols., 2007). Por su parte, Berretta y cols. (2007) describieron una disminución de un 29 % en el volumen del núcleo lateral en pacientes con trastorno bipolar.

1.5.2. Alteraciones en el número de células

1.5.2.1. Neuronas

Los estudios que han comparado el número y la densidad de neuronas en el CA de individuos controles y aquellos con esquizofrenia o trastorno bipolar y autismo han puesto de manifiesto una disminución significativa del número absoluto de neuronas en el núcleo lateral amigdalino, que puede llegar a ser del 23 % en pacientes

esquizofrénicos (Berretta y cols., 2007; Kreczmanski y cols., 2007), de un 13 % en sujetos autistas (Schumann y Amaral, 2006), y del 41 % en individuos con trastorno bipolar (Berretta y cols., 2007). En este último trabajo se observó también una disminución de la densidad neuronal en los núcleos lateral y accesorio basal, y en el de Schumann y Amaral (2006) una disminución del número absoluto de neuronas en el CA en conjunto. Bien es cierto que algunos de estos resultados, en concreto el de los pacientes esquizofrénicos del estudio del grupo de Berretta, dejaron de ser significativos cuando se tuvo en cuenta la influencia que el tratamiento con antipsicóticos pudiera tener en estos cambios; y esto a pesar de que el estudio del grupo de Konopaske y cols. (2007) demuestra que la exposición crónica a antipsicóticos no afecta al número de neuronas del CA. Este mismo estudio, realizado en macacos, demuestra sin embargo que los antipsicóticos producen una disminución en el volumen de sustancia blanca, el número de células de glía (lo cual parece deberse a una disminución específica de astrocitos (Konopaske y cols., 2008)), y un aumento en la densidad neuronal. El estudio de Bezchlibnyk y cols. (2007) demuestra la existencia de una disminución en el tamaño del soma neuronal en los núcleos lateral y accesorio basal (porción parvocelular) de pacientes con trastorno bipolar; sin embargo, la metodología utilizada lleva implícito un posible sesgo por la orientación de los cortes histológicos.

1.5.2.2. Células de glía

Los estudios dedicados a comparar la cantidad de células gliales en el CA procedente de sujetos controles y de pacientes con depresión mayor demuestran que hay una reducción de un 24-29 % en la densidad glial y de un 36 % en el ratio glía-neurona (Bowley y cols., 2002; Hamidi y cols., 2004), la cual parece deberse a una disminución en el número de oligodendrocitos (Hamidi y cols., 2004). Sin embargo, otros trabajos realizados en cerebros procedentes de enfermos con trastorno bipolar (Bowley y cols., 2002; Hamidi y cols., 2004) o esquizofrenia (Pakkenberg, 1990) no encontraron ninguna variación significativa en la cantidad de glía.

1.5.2.3. Células endoteliales

El único trabajo existente en la literatura relacionado con los posibles cambios que las células endoteliales pueden sufrir en condiciones patológicas se centra en comparar entre sujetos controles y esquizofrénicos la longitud de los microvasos en el

núcleo lateral del CA, no pudiendo demostrar ninguna variación (Kreczmanski y cols, 2009). En cambio, sí se ha visto que el tratamiento con antipsicóticos aumenta la densidad de células endoteliales, al menos en la corteza parietal de macacos (Konopaske y cols., 2007).

1.6. Cambios morfológicos del CA en el envejecimiento

Aunque no existen investigaciones centradas en analizar los posibles cambios en la cantidad de neuronas del CA entre individuos jóvenes y ancianos, sí se ha demostrado una reducción en el número de neuronas neocorticales durante el envejecimiento (Pakkenberg y Gundersen, 1997). Una investigación llevada a cabo en roedores analizó el número de neuronas y de células gliales en el núcleo basolateral del CA de la rata desde un periodo previo a su destete hasta que alcanzan una edad avanzada, demostrando un incremento del número de células de glía y una hipertrofia dendrítica según aumenta la edad (Rubinow y cols., 2009a; Rubinow y cols., 2009b; Rubinow y Juraska, 2009). También se ha visto en un estudio de resonancia magnética funcional que con la edad disminuye la conectividad funcional del CA (St Jacques y cols., 2009), cambio que podría estar relacionado con una pérdida de neuronas en esta región.

1.7. Flujo de la información nerviosa a través del CA

El CA proyecta y recibe proyecciones de muchas estructuras del sistema nervioso central, desde la médula espinal hasta regiones corticales frontales, insulares, temporales y occipitales. Además, los diversos núcleos del CA están conectados por numerosas proyecciones intrínsecas, que serán las primeras que tratemos en este capítulo.

1.7.1. Conexiones intrínsecas

Las conexiones entre los distintos núcleos del CA se organizan de tal forma que el flujo de la información es principalmente unidireccional desde los núcleos laterales a los más mediales (Price y cols., 1987; Amaral y cols., 1992; Pitkanen y Amaral, 1998; Freese y Amaral, 2009). Según lo descrito en monos, las conexiones intraamigdalinas de los núcleos del grupo basolateral se dirigen fundamentalmente a los núcleos medial, cortical anterior y posterior y a la subdivisión medial del núcleo central (Price y cols., 1987). A su vez, el núcleo central, siendo el que recibe la

mayoría de las proyecciones intraamigdalinas, apenas proyecta a ningún núcleo del CA (Price y Amaral, 1981; Pitkanen y Amaral, 1998). Además de las conexiones entre los núcleos amigdalinos, existen numerosas conexiones entre las propias subdivisiones de un mismo núcleo, las cuales reflejan en muchos casos que el flujo de la información a través del CA es en gran parte unidireccional (Freese y Amaral, 2009).

Grupo basolateral

El núcleo lateral proyecta a todos los demás núcleos del CA, aunque con diferente intensidad. De este núcleo emergen importantes proyecciones a todas las subdivisiones de los núcleos basal y accesorio basal y a la corteza periamigdalina (Aggleton, 1985; Pitkanen y Amaral, 1991; Amaral y Insausti, 1992; Pitkanen y Amaral, 1998), y otras menores hacia los núcleos paralamina, medial, corticales anterior y posterior, central (Smith y Paré, 1994) (esta proyección no llega a la subdivisión medial como ocurre desde otros núcleos), al núcleo del tracto olfatorio lateral, área amigdalina anterior, área amígdalo-hipocampal y a los núcleos intercalados (Price y Amaral, 1981; Aggleton, 1985; Pitkanen y Amaral, 1998). De todas estas conexiones solamente son recíprocas, y es ésta una proyección pequeña, las que se establecen entre el núcleo lateral y la subdivisión parvocelular del accesorio basal (Russchen, 1982; Aggleton, 1985). Existen además abundantes conexiones intrínsecas entre las propias subdivisiones del núcleo lateral, desde sus regiones dorsales, donde terminan las aferencias neocorticales, hacia sus subdivisiones ventrales (Pitkanen y Amaral, 1998).

El núcleo basal recibe una importante proyección del núcleo lateral (Pitkanen y Amaral, 1991). Dentro del núcleo basal existe un flujo de información en sentido dorsoventral, que parte de su subdivisión magnocelular y haciendo relevo en la subdivisión intermedia llega a la parvocelular (Price y cols., 1987). Desde todas las subdivisiones de este núcleo parten conexiones principalmente a los núcleos medial, central (fundamentalmente a su subdivisión medial), cortical anterior y al área amígdalo-hipocampal, así como proyecciones menores a los núcleos lateral y accesorio basal y a la corteza periamigdalina.

El núcleo accesorio basal, como ya se ha dicho, recibe una gran proyección del núcleo lateral (Pitkanen y Amaral, 1991), además de algunas fibras de los núcleos basal, central y medial y de la corteza periamigdalina (Krettek y Price, 1978b;

Russchen, 1982; Aggleton, 1985; Pitkanen y Amaral, 1998; Fudge y Tucker, 2009). Además, presenta conexiones bidireccionales entre sus dos subdivisiones, magnocelular y parvocelular, las cuales a su vez proyectan intensamente a la subdivisión medial del núcleo central (Price y Amaral, 1981), así como a los núcleos corticales anterior y posterior, medial, a la corteza periamigdalina, al área amígdalo-hipocampal y a los núcleos intercalados (Aggleton, 1985).

Grupo corticomedial

El núcleo medial de primates proyecta al núcleo central, al tercio dorsal del núcleo accesorio basal, al núcleo cortical anterior, a la corteza periamigdalina y al área amígdalo-hipocampal y recibe proyecciones del basal, accesorio basal y de la corteza periamigdalina (Aggleton, 1985; Everitt, 1995; Freese y Amaral, 2009).

En primates, el núcleo cortical anterior recibe proyecciones de los núcleos lateral, accesorio basal, central y medial (Price y Amaral, 1981; Price y cols., 1987; Pitkanen y Amaral, 1998). Las conexiones intraamigdalinas del núcleo cortical posterior se han descrito junto con las del área amígdalo-hipocampal por la dificultad de distinguir ambas regiones. Estas regiones proyectan al núcleo medial (Ottersen, 1982; Price y cols., 1987), a la corteza periamigdalina y al núcleo accesorio basal.

La corteza periamigdalina de primates proyecta a los núcleos basal (subdivisión parvocelular), accesorio basal, central, medial y cortical posterior (Price y Amaral, 1981) y recibe fibras de los núcleos lateral, basal, accesorio basal, medial y central (Price y Amaral, 1981; Aggleton, 1985).

Grupo central

Es el núcleo que recibe el mayor número de proyecciones del resto de núcleos del CA, y a su vez, se cree que tiene pocas proyecciones de retorno, salvo algunas al núcleo cortical anterior, a la corteza periamigdalina, al área amígdalo-hipocampal, al área amigdalina anterior y proyecciones muy pequeñas al lateral, al basal (subdivisión parvocelular) y al accesorio basal (subdivisión parvocelular) (Price y Amaral, 1981; Aggleton, 1985). La subdivisión medial recibe conexiones de prácticamente todos los núcleos amigdalinos (especialmente del basal y accesorio basal), mientras que las proyecciones aferentes que llegan a la subdivisión lateral principalmente provienen del área de transición córtico-amigdalina (Fudge y Tucker, 2009) y del núcleo lateral, el

cual no proyecta directamente a la subdivisión medial (Smith y Paré, 1994). Entre las subdivisiones del núcleo central existe una proyección de la subdivisión lateral a la medial (Pitkanen y cols., 1997).

Otras regiones

El área amigdalina anterior recibe aferencias de los núcleos lateral y central mientras que los núcleos intercalados reciben proyecciones de los núcleos lateral y accesorio basal (Aggleton, 1985; Pitkanen y Amaral, 1998).

1.7.2. Conexiones extrínsecas

Clásicamente se distinguen tres vías principales de comunicación del CA con el resto de regiones cerebrales: la estría terminal, la vía amigdalífuga ventral y la estría olfatoria lateral, siendo ésta la única vía exclusivamente aferente. Hay autores que opinan que es más correcto pensar en las dos primeras vías como dos componentes de una sola, dividida en dos por la cápsula interna (Price y cols., 1987). La vía amigdalífuga ventral recoge fibras que se agrupan a lo largo del borde dorsomedial del CA en toda su extensión rostrocaudal, mientras que la estría terminal agrupa fibras de regiones ventromediales del CA en niveles caudales (Freese y Amaral, 2009). Además de esta organización clásica de las conexiones, hoy se sabe que estas vías no llevan distintos tipos de información, sino que muchas proyecciones cruzan de una vía a otra y que hay fibras que desde la misma región pueden utilizar ambos caminos para llegar al mismo destino. Existen muchas conexiones neocorticales de entrada y salida al CA que no utilizan estos grandes haces de fibras sino que forman pequeños fascículos dentro de la sustancia blanca subcortical, como los que conectan regiones occipitales y temporales con el CA (Freese y Amaral, 2005).

1.7.2.1. Conexiones aferentes

De la corteza cerebral: el CA recibe conexiones de regiones uni- y polimodales de la corteza frontal, cingular, insular y temporal. Las proyecciones desde la corteza inferotemporal rostral al surco occípito-temporal y posterior al uncus, que es un área de procesamiento visual de alto nivel, constituyen la principal vía de entrada de información visual al CA y llegan principalmente al núcleo lateral (regiones dorsales), con ligeras proyecciones a los núcleos basal (subdivisión magnocelular) y accesorio basal y al área amigdalina anterior (Aggleton y cols., 1980; Ghashghaei y Barbas,

2002; Freese y Amaral, 2009). De las regiones auditivas de la corteza temporal solamente llegan proyecciones aferentes al CA desde regiones rostrales de la circunvolución temporal superior (Kosmal y cols., 1997; Yukie, 2002), consideradas como corteza auditiva asociativa unimodal (Pandya y Yeterian, 1985). A diferencia de las proyecciones de la corteza visual, éstas terminan sobre la porción ventrolateral del núcleo lateral.

El CA recibe también proyecciones de regiones asociativas multimodales del lóbulo temporal como la corteza perirrinal, la corteza parahipocampal, la región polisensorial de la circunvolución temporal superior y del labio dorsal del surco temporal superior; estas proyecciones inervan la mayoría de los núcleos amigdalinos (Amaral y Insausti, 1992; Ghashghaei y Barbas, 2002; Stefanacci y Amaral, 2002). La corteza orbitofrontal y la prefrontal medial proyectan moderadamente al CA, especialmente a los núcleos lateral, basal, accesorio basal, medial, corticales anterior y posterior, central y a la corteza periamigdalina (Carmichael y Price, 1995; Cavada y cols., 2000; Stefanacci y Amaral, 2002). Por último, de la corteza prefrontal lateral (Amaral y cols., 1992; Ghashghaei y Barbas, 2002) y de la corteza premotora (Avendano y cols., 1983) parten ligeras proyecciones que terminan en el núcleo basal. La corteza cingular anterior proyecta moderadamente a los núcleos lateral y basal (Pandya y cols., 1973; Amaral y Insausti, 1992; Stefanacci y Amaral, 2000; Stefanacci y Amaral, 2002). La conectividad funcional y estructural entre la corteza cingular anterior y el CA está alterada en los pacientes con trastorno bipolar (Wang y cols., 2009).

La proyección de la corteza insular es una de las entradas corticales al CA más importantes; así, la ínsula rostral proyecta densamente a la porción dorsomedial del núcleo lateral, la subdivisión parvocelular del basal, y el núcleo central (Aggleton y cols., 1980; Amaral y Insausti, 1992; Carmichael y Price, 1995; Stefanacci y Amaral, 2000; Stefanacci y Amaral, 2002). La proyección desde la corteza insular caudal es mucho menos densa y llega al núcleo central y a la subdivisión dorsal intermedia del lateral (Aggleton y cols., 1980; Friedman y cols., 1986; Amaral y Insausti, 1992; Stefanacci y Amaral, 2000; Stefanacci y Amaral, 2002), siendo esta última la mayor ruta de entrada de información somatosensorial al CA, ya que el área somestésica secundaria está conectada recíprocamente con las cortezas insulares granular y disgranular, que proyectan al lateral. El opérculo fronto-parietal, un área gustativa

cortical, proyecta a la porción dorsomedial del núcleo lateral (Van Hoesen, 1981). Todas estas proyecciones entre la corteza insular y el CA parecen ser una ruta para el procesamiento de la información gustativa y autónoma en el CA (Freese y Amaral, 2009).

Se han descrito también proyecciones desde la corteza entorrinal que llegan a los núcleos lateral y basal y la corteza periamigdalina (Van Hoesen, 1981; Aggleton, 1986; Stefanacci y Amaral, 2000).

Del sistema olfatorio: tanto el bulbo olfatorio como la corteza piriforme proyectan al núcleo del tracto olfatorio lateral, al núcleo cortical anterior y a la corteza periamigdalina, estructuras consideradas corteza olfatoria primaria (Price, 1973; Turner y cols., 1978; Carmichael y cols., 1994).

Del prosencéfalo basal: el núcleo basal de Meynert, con una pequeña contribución de los núcleos horizontal y vertical de la banda diagonal, proyecta densamente a la subdivisión magnocelular del núcleo basal (Amaral y Bassett, 1989), y al núcleo del tracto olfatorio lateral (Aggleton y cols., 1980; Mesulam y cols., 1983).

De la formación del hipocampo: estas proyecciones son mucho menos abundantes que las que van en sentido opuesto, se originan principalmente en regiones rostrales del hipocampo (CA1), y llegan a los núcleos basal, accesorio basal, cortical, paralamina y corteza periamigdalina (Rosene y Van Hoesen, 1977; Van Hoesen, 1981; Aggleton, 1986; Saunders y cols., 1988). Además, existe una proyección desde neuronas situadas en el límite del subículo con CA1 a la subdivisión parvocelular del núcleo basal y a la corteza periamigdalina.

Del tálamo: el núcleo mediodorsal del tálamo, a pesar de ser el más inervado por el CA, no proyecta a su vez a éste. Sí lo hacen los núcleos de la línea media, en concreto sobre los núcleos amigdalinos central y basal (en su porción magnocelular) (Aggleton y cols., 1980; Mehler, 1980). Al menos en la rata y en el gato, la porción parvocelular del núcleo ventral posteromedial, que es el área de relevo de información gustativa o visceral del tronco del encéfalo y que a su vez está conectada con la corteza gustativa primaria, proyecta al CA; estas fibras del tálamo curiosamente terminan en una región del núcleo lateral que a su vez está conectada, en el gato, con esa corteza gustativa o visceral (Ottersen y Ben-Ari, 1979; Yasui y cols., 1987). También suponen

una aferencia substancial al CA las fibras que parten del tálamo posterior, dentro y alrededor del núcleo geniculado medial, que inervan los núcleos lateral, accesorio basal, medial y central (Mehler, 1980; Russchen, 1982; LeDoux y cols., 1990b). Estas regiones talámicas reciben proyecciones auditivas a su vez del colículo inferior, por lo que la vía tálamo-amigdalina parece estar implicada en la generación de respuestas emocionales condicionadas a estímulos auditivos (LeDoux y cols., 1990a; LeDoux y cols., 1990b). Por último, se ha descrito una pequeña proyección desde el núcleo medial del complejo pulvinar que llega al núcleo lateral (Jones y Burton, 1976; Aggleton y cols., 1980).

Del hipotálamo: en relación con la enorme proyección amígdalo-hipotalámica, las conexiones del hipotálamo con el CA son muy escasas. Éstas se originan en el núcleo ventromedial y en regiones caudales del área hipotalámica lateral y se dirigen principalmente a la subdivisión medial del núcleo central, y a los núcleos medial y accesorio basal (subdivisión parvocelular), así como a la subdivisión parvocelular del núcleo basal (Mehler, 1980; Amaral y cols., 1982). Estas proyecciones son bilaterales, aunque la contralateral es mucho más pequeña (Amaral y cols., 1982).

Del tronco del encéfalo: muchos de los núcleos troncoencefálicos a los que proyecta el núcleo central proyectan a su vez al CA (Mehler, 1980; Norita y Kawamura, 1980). Así, el núcleo peripeduncular del mesencéfalo envía una fuerte proyección a los núcleos lateral y medial del CA (Jones y cols., 1976; Aggleton y cols., 1980; Mehler, 1980; Amaral y Insausti, 1992). También proyectan al CA el núcleo linearis y el núcleo dorsal del rafe (Mehler, 1980; Price y cols., 1987); la sustancia gris periacueductal proyecta a los núcleos accesorio basal, central y medial (Aggleton y cols., 1980; Hasue y Shammah-Lagnado, 2002). El núcleo parabraquial proyecta principalmente a los núcleos central y medial (Mehler, 1980; Norita y Kawamura, 1980; Cho y Fudge, 2010). También se sabe que existe una gran proyección noradrenérgica desde el locus coeruleus hacia todos los núcleos del CA, aunque ésta es más intensa sobre los núcleos central y basal (Cho y Fudge, 2010). Las proyecciones dopaminérgicas desde el mesencéfalo ventral, en concreto del área tegmental ventral (A10), la sustancia negra (A9) y el área retrorubral (A8) inervan intensamente el núcleo central, y la mayoría de los núcleos del CA (Aggleton y cols., 1980; Mehler, 1980; Cho y Fudge, 2010) (véase el apartado 1.8. *La inervación dopaminérgica del complejo amigdalino*).

1.7.2.2. Conexiones eferentes

La estría terminal tiene su origen principalmente en el grupo corticomedial mientras que la vía amigdalífuga ventral, el principal haz eferente del que dispone el CA, tiene su origen en los grupos basolateral y central, y según donde nazca, seguirá un recorrido u otro. Un pequeño número de fibras de esta vía se une a la estría medular del tálamo y con ella entra en dicha estructura.

Proyecciones corticales: el CA inerva a un extenso territorio de la neocorteza, regulando de esta forma tanto los primeros estadios del procesamiento de la información sensorial como los procesos cognitivos de más alto nivel.

El CA inerva todas las regiones temporales y occipitales relacionadas con el procesamiento visual (V1, V2, V3 y V4 y la región visual temporal media); así, la subdivisión magnocelular del núcleo basal proyecta a la corteza visual primaria y a la corteza preestriada de primates (Amaral y Price, 1984; Iwai y Yukie, 1987; Weller y cols., 2002; Amaral y cols., 2003; Freese y Amaral, 2005), y todo el complejo basolateral proyecta a la mayoría de la corteza temporal inferior. Es importante tener en cuenta que el núcleo lateral, que recibe principalmente la entrada de la información visual, no proyecta de vuelta a la corteza visual, sino que es el núcleo basal el que lo hace, el cual no recibe apenas proyecciones visuales directas. El CA envía proyecciones a la corteza auditiva primaria y a regiones auditivas asociativas adyacentes a ésta situadas en la parte caudal de la circunvolución temporal superior que se originan en la porciones magnocelular e intermedia del núcleo basal, así como a regiones más anteriores desde los núcleos lateral, basal y accesorio basal (Amaral y Price, 1984; Yukie, 2002). En general, la inervación de la corteza auditiva es mucho menos abundante que la que llega a la corteza visual.

Las proyecciones del CA a la corteza perirrinal parte del complejo basolateral y de la corteza periamigdalina, y en menor medida de los núcleos medial y corticales anterior y posterior (Amaral y Price, 1984; Iwai y Yukie, 1987; Morán y cols., 1987; Stefanacci y cols., 1996; Yukie, 2002). La amígdala proyecta a la corteza parahipocampal desde la subdivisión magnocelular del núcleo basal principalmente (Amaral y Price, 1984; Stefanacci y cols., 1996).

Dentro de la corteza frontal, el CA envía proyecciones a la corteza orbitofrontal y mediolateral, con ligeras aferencias a la corteza prefrontal dorsolateral

(Llamas y cols., 1977; Porrino y cols., 1981; Amaral y Price, 1984; Llamas y cols., 1985; Barbas y De Olmos, 1990; Carmichael y Price, 1995; Ghashghaei y Barbas, 2002). Las proyecciones desde la corteza prefrontal al CA son más extensas e incluyen más núcleos amigdalinos que las que van en sentido opuesto (Cavada y cols., 2000). El núcleo de origen de la mayoría de estas proyecciones es el basal, con una menor contribución de los núcleos lateral y accesorio basal en la corteza orbitofrontal, y los núcleos medial, corticales anterior y posterior y accesorio basal en la prefrontal medial. En la corteza orbitofrontal las proyecciones del CA son muy densas en regiones más caudales, aunque llegan hasta el polo frontal. El CA puede actuar sobre la corteza prefrontal a través de sus proyecciones al núcleo mediodorsal del tálamo, íntimamente relacionado con esa corteza (Krettek y Price, 1977; Porrino y cols., 1981; Aggleton y Mishkin, 1984); además, se ha demostrado que las células amigdalinas que proyectan a la corteza orbitaria directamente o a través del núcleo mediodorsal están conectadas entre sí. La amígdala envía también una proyección a la corteza premotora, que parte de regiones caudales de la subdivisión magnocelular del núcleo basal y es mucho menor que las demás proyecciones a la corteza frontal (Llamas y cols., 1977; Avendano y cols., 1983; Llamas y cols., 1985; Amaral y Price, 1984).

El CA envía proyecciones de regreso a la corteza insular, sobre todo a sus regiones anteriores que se originan en los núcleos lateral, basal, accesorio basal, medial, cortical anterior, corteza periamigdalina y área amigdalina anterior (Amaral y Price, 1984; Carmichael y Price, 1995). Las proyecciones eferentes que llegan a regiones caudales de la corteza insular provienen exclusivamente de los núcleos basal y accesorio basal, y algo del lateral; además, algunas fibras que parten del basal y del accesorio basal terminan en el opérculo fronto-parietal y en la corteza peri-insular (Amaral y Price, 1984).

El CA envía una gran proyección sobre la corteza cingular anterior, y no la posterior, que se origina en los núcleos basal y accesorio basal con una pequeña contribución del núcleo lateral (Porrino y cols., 1981; Amaral y Price, 1984; Vogt y cols., 1987).

La mayor cantidad de fibras a la corteza entorrinal proviene del núcleo lateral. La parte rostral de esta corteza recibe proyecciones de los núcleos lateral, accesorio basal, cortical anterior, medial, paralamina y de la corteza periamigdalina (Aggleton,

1986; Amaral, 1986; Insausti y cols., 1987; Pitkanen y cols., 2002), además de una pequeña entrada procedente del núcleo basal (porción parvocelular).

Proyección estriatal: es una de las conexiones más prominentes del CA e inerva muy abundantemente al estriado ventral, sobre todo el núcleo accumbens y el tubérculo olfatorio, así como al caudado y el putamen (Nauta, 1962; Parent y cols., 1983; Russchen y cols., 1985b; Fudge y cols., 2002). Esta proyección se origina principalmente en los núcleos basal y accesorio basal, con una menor contribución de los núcleos lateral, medial, central y corticales anterior y posterior, de la corteza periamigdalina y del área de transición amígdalo-hipocampal (Parent y cols., 1983; Russchen y cols., 1985b), y está topográficamente organizada de tal forma que la subdivisión parvocelular del núcleo basal proyecta sobre todo al núcleo accumbens medial, mientras que la magnocelular lo hace al cuerpo y cola del caudado y al putamen; siendo la región lateral del accumbens el lugar de solapamiento de las fibras procedentes de ambas subdivisiones (Russchen y cols., 1985b).

Proyección al prosencéfalo basal: los núcleos basal de Meynert y del brazo horizontal de la banda diagonal reciben una importante inervación que se origina principalmente en la subdivisión parvocelular y la parte caudal de la magnocelular del núcleo basal (esta última región a su vez recibe la mayor cantidad de proyecciones del prosencéfalo basal), la subdivisión magnocelular del accesorio basal y el núcleo central (Price y Amaral, 1981; Russchen y cols., 1985a). También llegan ligeras proyecciones del CA al núcleo vertical de la banda diagonal y al pálido ventral, pero no a los núcleos septales (Price y Amaral, 1981; Russchen y cols., 1985a).

Proyección talámica: la mayor conexión se origina en la subdivisión parvocelular del núcleo basal e inerva la porción magnocelular del núcleo mediodorsal del tálamo (Porrino y cols., 1981; Aggleton y Mishkin, 1984; Russchen y cols., 1987; Reardon y Mitrofanis, 2000); también contribuyen a esta proyección el resto del grupo basolateral, la corteza periamigdalina y el área de transición amígdalo-hipocampal (Aggleton y Mishkin, 1984). Las aferencias amigdalinas al núcleo mediodorsal terminan en regiones que a su vez proyectan a regiones corticales orbitarias y prefrontales mediales, las cuales reciben también aferencias directas del CA (Porrino y cols., 1981; Aggleton y Mishkin, 1984; Goldman-Rakic y Porrino, 1985; Russchen y cols., 1987).

Los núcleos central y medial del CA proyectan a los núcleos talámicos de la línea media y el núcleo central también proyecta al núcleo pulvinar medial (Price y Amaral, 1981; Aggleton y Mishkin, 1984). Recientemente se han descubierto importantes proyecciones desde los núcleos basal y cortical del CA al núcleo reticular del tálamo (Zikopoulos y Barbas, 2012).

Proyecciones al bulbo olfatorio: tienen su origen en la corteza periamigdalina (y el núcleo del tracto olfatorio lateral en primates no humanos) (Carmichael y cols., 1994).

Proyecciones al núcleo del lecho de la estría terminal y al hipotálamo: el núcleo del lecho de la estría terminal recibe información de la mayoría de los núcleos del CA y proporciona una estación de relevo para las proyecciones de la amígdala al tronco del encéfalo o al hipotálamo. Así, la subdivisión magnocelular del núcleo basal proyecta sobre la división lateral del núcleo del lecho, mientras que los núcleos medial y cortical posterior y el área amígdalo-hipocampal lo hacen sobre la división medial (Krettek y Price, 1978a; Weller y Smith, 1982); los núcleos central y accesorio basal y la subdivisión parvocelular del basal proyectan a ambas subdivisiones (Price y Amaral, 1981; Price y cols., 1987).

Desde los núcleos cortical anterior y medial parten fibras que terminan en el área hipotalámica anterior y en el área preóptica, y algunas en los núcleos paraventricular y supraóptico (Price, 1986; Price y cols., 1987). Especialmente abundante es la proyección sobre el núcleo ventromedial y los núcleos mamilares, que parte de las mismas regiones en el CA (Price, 1986; Price y cols., 1987). Los núcleos medial, accesorio basal y corticales anterior y posterior terminan en los núcleos premamilares dorsal y ventral y supramamilar. El núcleo basal en el mono envía una fuerte proyección al núcleo tuberal lateral, que es complementaria a la del núcleo central, ya que éste sólo proyecta alrededor del núcleo, evitando la zona de mayor densidad celular (Price, 1986); el núcleo basal proyecta también al núcleo subfornical (Price y cols., 1987). Por último, desde el núcleo central del CA parten fibras a regiones del hipotálamo lateral como el núcleo dorsomedial, la región perifornical, el área supramamilar, a la tuberomamilar y, especialmente, a regiones caudales del núcleo paramamilar (Price y Amaral, 1981).

Proyecciones a la formación del hipocampo: la subdivisión magnocelular del núcleo accesorio basal y el núcleo cortical posterior proyectan a CA3, CA2 y CA1 en toda su

extensión rostrocaudal. Otra proyección de la subdivisión parvocelular del basal junto con algunas fibras de la corteza periamigdalina termina en la región límite entre el subículo y CA1. Esta subdivisión también proyecta a todo el subículo, con una pequeña contribución de los núcleos basal (porción magnocelular), cortical y accesorio basal (Aggleton, 1986; Saunders y Rosene, 1988). La subdivisión parvocelular del basal también inerva al parasubículo, junto con fibras del núcleo lateral, y al presubículo (Aggleton, 1986; Amaral, 1986).

Proyecciones al tronco del encéfalo: el núcleo central del CA es el único que proyecta al mesencéfalo, puente y bulbo raquídeo, al igual que lo hace el núcleo del lecho de la estría terminal, e inerva estructuras implicadas en el control autónomo. En el mesencéfalo, este núcleo proyecta al área tegmental ventral, a la sustancia negra, en concreto a la parte lateral de su porción compacta, al área retrorubral, al núcleo peripeduncular, a la formación reticular mesencefálica, a la sustancia gris periacueductal y al núcleo mesencefálico del trigémino (Hopkins, 1975; Price y Amaral, 1981; Price, 1986). Más caudalmente, el núcleo central envía proyecciones a los núcleos parabraquiales medial y lateral, al locus coeruleus y subcoeruleus, al núcleo motor del vago, a la formación reticular pontina, al núcleo del tracto solitario, al núcleo de la comisura posterior, a los núcleos del rafe y al núcleo cuneiforme (Price y Amaral, 1981; Price, 1986), llegando hasta niveles cervicales de la médula espinal (Mizuno y cols., 1985).

1.8. La inervación dopaminérgica del CA

El CA recibe una intensa inervación dopaminérgica en la rata (Ciliax y cols., 1995; Asan, 1997; Asan, 1998; Brinley-Reed y McDonald, 1999; Pinard y cols., 2008), en primates no humanos (Sadikot y Parent, 1990; Freedman y Shi, 2001; Cho y Fudge, 2010), y en el hombre (Ciliax y cols., 1999), y esta inervación es necesaria para la adquisición, consolidación y desaparición de memorias de miedo, así como para generar respuestas afectivas apropiadas ante los estímulos adversos (Nader y LeDoux, 1999; Rosenkranz y Grace, 1999; Rosenkranz y Grace, 2001; Rosenkranz y Grace, 2002b; Bissiere y cols., 2003; LeDoux, 2007). Se cree que la causa, o al menos uno de los mecanismos patogénicos subyacentes, de enfermedades psiquiátricas como la esquizofrenia (Akil y cols., 1999; Winterer, 2006) y otros trastornos relacionados con el estrés (Venator y cols., 1999; Heidbreder y cols., 2000) puede estar relacionada con

la disfunción del sistema dopaminérgico; de hecho, el fenotipo hiperdopaminérgico en ratones que genéticamente carecen del transportador de dopamina es similar al de los pacientes esquizofrénicos cuando experimentan los llamados síntomas positivos (Giros y cols., 1996).

Las células dopaminérgicas que proyectan al CA están localizadas en el llamado *tier dorsal* (Haber y cols., 1995), que comprende la porción dorsal de la sustancia negra *pars compacta* (grupo dopaminérgico A9), el área tegmental ventral (grupo A10) (Aggleton y cols., 1980; Mehler, 1980; Norita y Kawamura, 1980), y el área retrorubral (grupo A8) (Cho y Fudge, 2010). Recientemente, el estudio de Cho y Fudge (2010) ha demostrado que el CA en primates recibe también una importante inervación del *tier ventral* o porción ventral de la sustancia negra *pars compacta*, algo que no ocurre en roedores.

La mayoría de los estudios que demuestran la presencia de inervación dopaminérgica en el CA emplean la enzima tirosina hidroxilasa (TH) como marcador de este neurotransmisor, sin tener en cuenta que esta proteína está presente también en fibras noradrenérgicas y adrenérgicas. De hecho, distintos trabajos en tejido *post-mortem* de origen humano (Goldstein y cols., 1974; Farley y Hornykiewicz, 1977), de primates no humanos (Sadikot y Parent, 1990; Freedman y Shi, 2001), y de ratas (Zhang y cols., 2013) han revelado fibras noradrenérgicas en la mayoría de los núcleos del CA y adrenérgicas solamente en el núcleo central. Todos los núcleos del CA de primates reciben inervación de los grupos noradrenérgicos A5 y A7 (Cho y Fudge, 2010).

No existen datos en la literatura acerca de las dianas postsinápticas específicas de las fibras dopaminérgicas que inervan el CA humano. Varios estudios en roedores han demostrado que estas fibras hacen sinapsis tanto con neuronas de proyección (Asan, 1997; Asan, 1998; Muller y cols., 2009) como con IN (Brinley-Reed y McDonald, 1999; Pinard y cols., 2008; Muller y cols., 2009). Si bien son las neuronas de proyección las que reciben un mayor número de sinapsis de fibras dopaminérgicas (Muller y cols., 2009), también las IN PV+ y las CR+ son inervadas por estas fibras, especialmente las que contienen PV (Pinard y cols., 2008). En el trabajo del grupo de Pinard y cols. (2008) se estimó que las IN CR+ suponen tan solo un 6 % de todas las dianas de las sinapsis de los terminales dopaminérgicos, mientras que las IN PV+

representaban el 40 %. En los núcleos basal y central, así como en los grupos intercalados paracapsulares se ha visto que los terminales dopaminérgicos tienden a formar con mayor frecuencia sinapsis simétricas, aunque también se han descrito algunas sinapsis asimétricas en los núcleos central y basal, especialmente en la subdivisión medial del central (Asan, 1997; Asan, 1998; Pinard y cols., 2008; Muller y cols., 2009). Los trabajos realizados por Asan (1997, 1998) demostraron que un 20 % de las sinapsis de los terminales dopaminérgicos en el CA se hacían sobre espinas dendríticas y el otro 80 % lo hacía sobre el tallo dendrítico de neuronas presumiblemente de proyección. Este autor también demostró que los terminales que provienen de la corteza, del tálamo, del sistema colinérgico del prosencéfalo basal ventral y del núcleo lateral del CA terminan principalmente en el árbol dendrítico distal de esas mismas neuronas, siendo dichas sinapsis susceptibles al efecto modulador de la dopamina liberada en las regiones más proximales de las dendritas (Asan, 1997). Más recientemente los estudios de los grupos de Muller (2009) y Pinard (2008) han demostrado que los terminales dopaminérgicos en el núcleo basolateral anterior terminan preferentemente sobre segmentos dendríticos distales y espinas dendríticas de las neuronas piramidales o de las IN PV+ y CR+ (Pinard y cols., 2008; Muller y cols., 2009). Las diferencias encontradas en los trabajos de Asan (1997) y Muller y cols. (2009) en relación a la ubicación de las sinapsis de las aferentes dopaminérgicas sobre los segmentos dendríticos proximales o distales de las neuronas amigdalinas pueden deberse, por una parte, a que estos estudios no se realizan exactamente en los mismos núcleos del CA, ya que Asan analiza además del núcleo basal, el central y los grupos intercalados, y por otra, a la diferente metodología usada en el análisis ultraestructural.

La dopamina modula la entrada de información al CA a través del grupo basolateral y, como ya se ha mencionado, su acción es necesaria para la adquisición del condicionamiento de miedo (Guarraci y cols., 1999; Guarraci y cols., 2000) (Rosenkranz y Grace, 2002b). Existen estudios anatómicos que demuestran que los terminales dopaminérgicos se encuentran frecuentemente en contacto o en la vecindad de terminales no dopaminérgicos y hacen sinapsis sobre las mismas estructuras que éstos (Asan, 1997; Muller y cols., 2009), reforzando la idea del efecto modulador de la dopamina. En estos trabajos se vio además que de estos terminales no dopaminérgicos, un 85 % eran putativamente excitadores, ya que, o bien formaban

sinapsis excitadoras o contenían marcadores de neuronas de proyección, y un 15 % formaban sinapsis simétricas.

El efecto de la dopamina liberada en el CA, y en concreto en el núcleo lateral, se basa en la inducción de mecanismos de potenciación a largo plazo suprimiendo para ello la inhibición *feedforward* que ejercen las IN sobre las neuronas de proyección (Bissiere y cols., 2003); según el trabajo de Chu y cols. (2012), la dopamina impediría la liberación de GABA desde las IN PV+ hasta las neuronas de proyección actuando sobre receptores presinápticos de tipo D₂, preservando la liberación de GABA desde esta población de IN sobre otros tipos de neuronas locales. Alternativamente, el efecto de la dopamina mediado por receptores D₁ es necesario para la generación de la actividad espontánea inhibitoria en el CA y consecuentemente para la supresión de la potenciación a largo plazo producida por asociaciones aleatorias (Bissiere y cols., 2003). El bloqueo de cualquiera de esos dos tipos de receptores en el grupo basolateral impide la adquisición del condicionamiento del miedo (Greba y Kokkinidis, 2000; Guarraci y cols., 2000; Greba y cols., 2001). Es interesante indicar también que solamente las lesiones en el núcleo lateral y en el central impiden la adquisición del condicionamiento de miedo auditivo (Nader y cols., 2001).

Las fibras dopaminérgicas que llegan a la subdivisión lateral del núcleo central terminan en las cabezas de espinas adyacentes a las terminales excitadoras, presumiblemente procedentes de la corteza cerebral o el grupo basolateral (Asan, 1997; Asan, 1998); de hecho se ha demostrado que existen conexiones tanto desde los núcleos lateral, basal y accesorio basal, así como desde la corteza al núcleo central (Pitkanen y cols., 1997). La dopamina liberada produce un aumento de la excitabilidad neuronal que amplifica la entrada sensorial que llega al CA, de igual forma que potencia las respuestas afectivas a estímulos sensoriales (Rosenkranz y Grace, 2002a). En el estriado sensorimotor, la entrada dopaminérgica regula la especificidad del sistema a las conexiones aferentes referentes a cada parte del cuerpo y la falta de dopamina produce una alteración en el movimiento (Freedman y Shi, 2001). De manera similar, la entrada dopaminérgica al núcleo central podría modular la especificidad del CA a los estímulos emocionales, ya que un bloqueo en la transmisión de dopamina a esta estructura del CA impide que se lleven a cabo las respuestas condicionadas de miedo en la rata (Guarraci y cols., 1999; Guarraci y cols., 2000; Nader y cols., 2001).

La regulación de los niveles extracelulares de dopamina se realiza mediante distintos mecanismos dependiendo de las regiones cerebrales. Así, en el estriado dorsal y en el núcleo accumbens existen mayores tasas de captación del neurotransmisor que en el CA y en la corteza prefrontal, siendo la tasa de liberación de la dopamina en estas dos estructuras mayor que la del estriado (Garris y Wightman, 1994); estos hallazgos concuerdan con el hecho de que en el estriado hay una mayor cantidad del transportador de dopamina (DAT) que en el CA y la corteza prefrontal (Ciliax y cols., 1999). El estudio de Giros y cols. (1996) muestra que en ausencia del DAT, el cual se suprime genéticamente en los ratones estudiados en este trabajo, la dopamina puede permanecer en el espacio extracelular por un período de tiempo cien veces mayor que en condiciones normales y la difusión es el único mecanismo para la eliminación del transportador. Los ratones que carecen del gen que codifica para el DAT mostraban hiperlocomoción e indiferencia a la cocaína y a la anfetamina (Giros y cols., 1996; Jones y cols., 1998).

Varios trabajos se han centrado en analizar la distribución de las fibras que contienen el DAT en el CA humano. El estudio de Ciliax y cols. (1999) puso de manifiesto una cantidad relativamente grande de fibras varicosas positivas para el DAT en el núcleo basolateral del CA humano - que corresponde al núcleo basal de otros autores como Sims y Williams (1990) - y en el núcleo central. Estos autores también describieron fibras DAT+ dispersas en los núcleos basomedial - el accesorio basal de Sims y Williams (1990) y el lateral. Otro estudio realizado en primates no humanos reveló también cantidades significativas de fibras DAT+ en los núcleos basal y central, además de algunas fibras en el núcleo medial (Freedman y Shi, 2001). Además, en algunos de estos núcleos se han encontrado diferencias substanciales en la cantidad de fibras DAT+ entre sus subdivisiones. Ciliax y cols. (1999) describieron en el núcleo lateral una cantidad considerablemente mayor de estas fibras en su región dorsolateral que en el resto del núcleo. Por su parte, Freedman y Shi (2001) destacaron la mayor abundancia de fibras DAT+ en la región lateral del núcleo central. Además, estos dos trabajos destacan el mayor contenido de fibras DAT+ en la subdivisión magnocelular del basal que en las subdivisiones parvocelular e intermedia de este núcleo.

No se conoce con detalle la localización subcelular ni la función del DAT en el CA de primates, sin embargo, sí existen algunos estudios ultraestructurales en la

corteza cerebral o el tálamo. Lewis y cols. (2001) observaron que la mayoría de los perfiles marcados con DAT en la corteza cerebral de primates eran axones finos no mielinizados que raramente formaban sinapsis, mientras que los perfiles TH+ presentaban mayor variedad de grosores y las varicosidades contenían abundantes vesículas que con frecuencia formaban sinapsis. Por ello, estos autores concluyeron que el DAT podría restringirse a los espacios intervaricosos. Un patrón similar al de las fibras TH en la corteza se encontró en el núcleo caudado para los perfiles DAT+, por lo que parece que la localización y función del DAT es específica de cada región. En el tálamo de monos, el estudio de García-Cabezas y cols. (2009) reveló que el número de axones DAT+ en los cuales existen sinapsis es bastante reducido (2 %), y que en estos axones el inmunoprecipitado de DAT estaba localizado lejos de la sinapsis. Estos hallazgos apoyan la idea de que la dopamina tiende a difundirse en la matriz extracelular, ejerciendo su acción de manera extrasináptica en estas regiones.

2. PLANTEAMIENTO Y OBJETIVOS

El CA es uno de los componentes clave en el circuito central de la emoción. Se trata de una estructura muy heterogénea desde el punto de vista morfológico y funcional, compuesta por varios grupos nucleares que engloban, a su vez, varios núcleos y sus subdivisiones. Entre los sistemas monoaminérgicos aferentes al CA destaca la inervación dopaminérgica, la cual ejerce un efecto modulador de las sinapsis entre los distintos tipos celulares y esta inervación es necesaria para que se lleven a cabo los procesos de aprendizaje relacionados con el miedo. La alteración del sistema dopaminérgico del CA en sujetos humanos subyace a enfermedades tan incapacitantes como la esquizofrenia, los trastornos de ansiedad, o el estrés post-traumático.

Con el fin de conocer con mayor profundidad la anatomía del CA humano control, es decir procedente de individuos fallecidos sin patología neurológica o psiquiátrica, y proporcionar información detallada que pueda servir para detectar posibles alteraciones de esta estructura en diversas patologías psiquiátricas y neurodegenerativas, en este trabajo nos hemos centrado en estudiar cualitativa y cuantitativamente la composición celular y la distribución de la inervación dopaminérgica en el CA humano en su conjunto y en cada una de sus subdivisiones nucleares.

Los objetivos del presente trabajo de investigación en el CA humano son los siguientes:

1. Estimar el número y la densidad de neuronas, glía y células endoteliales en los grupos nucleares, núcleos y subdivisiones nucleares del CA, y determinar cómo afecta la edad de fallecimiento de los donantes en estas estimaciones celulares.
2. Estimar el número y la densidad de las poblaciones de interneuronas inmunorreactivas para las proteínas parvalbúmina y calretinina, así como el porcentaje de las mismas con respecto al total de neuronas, en los grupos nucleares, núcleos y subdivisiones nucleares del CA.

3. Estimar la longitud absoluta y la densidad de longitud de las fibras dopaminérgicas que contienen el transportador de dopamina (DAT) en los grupos nucleares, núcleos y subdivisiones nucleares del CA, y determinar la relación entre la longitud absoluta de fibras DAT positivas y el número de neuronas.

4. Analizar mediante microscopía confocal la relación topográfica de las fibras positivas para DAT con respecto al dominio somatodendrítico de las interneuronas inmunorreactivas para la parvalbúmina y la calretinina del CA humano.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. Obtención, corte y almacenamiento del tejido humano

Las muestras humanas de tejido post mórtem fueron obtenidas de ocho individuos adultos (cinco hombres y tres mujeres) de diferentes edades sin evidencia clínica o patológica de enfermedad neurológica o psiquiátrica (Tabla 2). Este tejido procedió del Banco de Tejidos Neurológicos de Navarra y del Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Ramón y Cajal de Madrid. Las muestras biológicas se obtuvieron tras la aprobación de nuestro proyecto investigador por los correspondientes Comités de Ética de ambas instituciones y de la Universidad Autónoma de Madrid, donde se ha llevado a cabo el proyecto. Estas muestras estaban identificadas con un código numérico que permitía acceder a los datos necesarios en este estudio, reflejados en la Tabla 2, pero sin conocer la identidad de los donantes. Los cerebros fueron cortados en fresco, o, en algunos casos tras unas horas de fijación por inmersión en paraformaldehído al 4 % (*Solución 1*), en bloques coronales de 0,5-1 cm de grosor que posteriormente se fijaron por inmersión de nuevo en paraformaldehído al 4 % a 4 °C durante 4-5 días. Estos bloques se sumergieron en tampón fosfato (PB; 0,1M; pH 7,4) con sacarosa primero al 15 % y luego al 30 % hasta que se hundieron por completo, cambiando la solución cada tres días para evitar el crecimiento de hongos. Tras esto, los bloques se cortaron en un microtomo de congelación en secciones de 50 µm de grosor que fueron almacenadas en placas de ELISA con una solución anticongelante (*Solución 2*). Estas placas se almacenaron a -20 °C sin peligro de que se congelasen los cortes (Fig. 2).

Tabla 2. Datos clínicos de los casos utilizados en este estudio y objetivos para los que se han usado

Caso	Hemisferio	Edad (años)	Sexo	Tiempo post mórtem (h)	Peso (gr)*	Causa del fallecimiento	Objetivos
1	I	20	F	2	1100	Ataque cardíaco/fibrosis quística	1
2	---	50	M	5	1250	Carcinoma epidermoide	1
3	I	50	M	4	---	Fallo hepático/hipertiroidismo y fallo tiroideo	1, 3
4	I	75	F	3	1450	Taponamiento cardíaco	1, 2, 3, 4
5	I	68	M	16	1289	Cardiomiopatía dilatada	1
6	D	56	M	5	1200	Fallo cardiorrespiratorio	1, 2, 3, 4
7	D	46	F	7	1165	Ingestión de amoníaco y lejía/envenenamiento	1, 2, 3, 4
8	D	68	M	5	1280	Mieloma múltiple	3

*F, femenino; M, masculino; D, derecho; I, izquierdo; *Peso del cerebro completo en fresco*

Solución 1: Se disolvió paraformaldehído en polvo a una concentración del 8 % en agua destilada previamente calentada a 60 °C, se añadieron unas gotas de hidróxido sódico hasta que la mezcla se tornó transparente. A esta solución, una vez filtrada, se añadió tampón fosfato 0,2 M (pH 7,4) a partes iguales.

Solución 2: Se mezcló etilenglicol al 30 % y glicerol al 30 % en tampón fosfato 0,05 M.

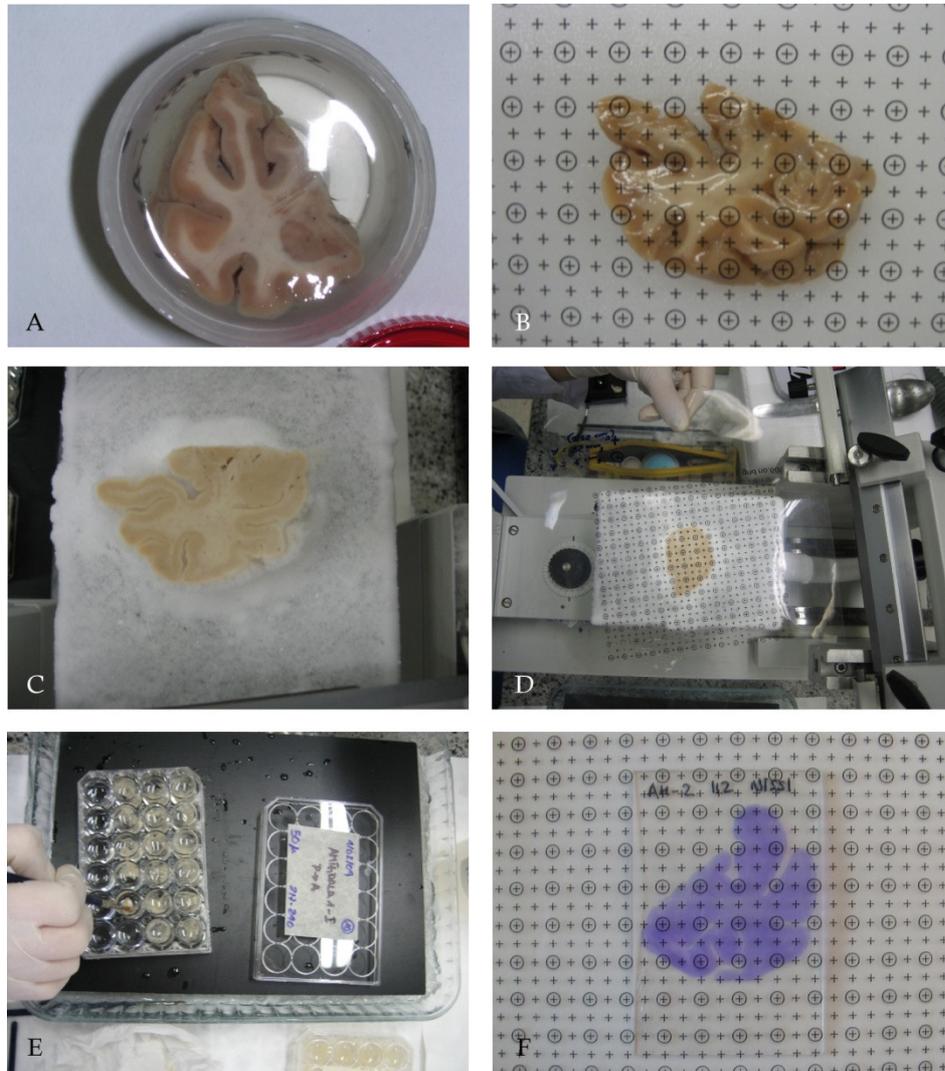


Figura 2. Procesamiento del tejido y análisis de su encogimiento. A. Bloque de tejido del lóbulo temporal humano que contiene el CA sumergido en sacarosa al 15 %. B. Retícula de puntos superpuesta sobre la cara posterior del bloque de tejido tras ser sumergido en sacarosa al 30 %. C. Tejido congelado sobre la platina del microtomo de congelación. D. Retícula de puntos superpuesta sobre el bloque de tejido congelado; se realizaron contajes de puntos cada 0,6 mm de grosor. E. Almacenamiento de las secciones de 50 µm en pocillos con la solución anticongelante. F. Retícula de puntos superpuesta sobre una sección de tejido teñida con Nissl y montada y cubierta con DePex.

3.2. Procesamiento del tejido

Los cortes que contenían el CA fueron seleccionados y teñidos en el laboratorio con distintas técnicas. Independientemente de la tinción que se fuera a hacer, los cortes de tejido fueron lavados con el tampón correspondiente para eliminar los restos de la solución anticongelante, y se procesaron en flotación.

3.2.1. Tinciones de Nissl, acetilcolinesterasa y Gallyas

Estas tinciones se han utilizado para la delimitación de los núcleos y subdivisiones nucleares del CA humano, y se llevaron a cabo en series de secciones adyacentes entre sí, que a su vez eran adyacentes a las procesadas para visualizar las fibras DAT+ y las poblaciones de IN PV+ y CR+.

La tinción citoarquitectónica tradicional de Nissl se utilizó, además de para la delimitación de las regiones del CA, para la visualización de las neuronas, glía y células endoteliales (objetivo 1). Para ello, se seleccionaron secciones separadas por 1,05 mm, eligiendo la primera al azar dentro de un primer tramo de secciones de 1,05 mm que contenían el CA y se tiñeron con Nissl según se describe a continuación (Nissl, 1913). Este método histológico básico tiñe los ácidos nucleicos de la cromatina y los polirribosomas citoplasmáticos (gránulos de Nissl) debido a su afinidad por los colorantes catiónicos, en este caso, se utilizó el violeta de cresilo. Ello nos permitió distinguir los límites de los diversos núcleos amigdalinos según el tamaño del citoplasma de sus células y la densidad neuronal de cada núcleo. El protocolo detallado de esta tinción fue el siguiente: los cortes seleccionados se montaron en portas gelatinizados y se dejaron secar; posteriormente se sumergieron en etanol (EtOH) 100 % y cloroformo (1:1) durante una noche. Al día siguiente, se aclararon los cortes en agua destilada mediante dos lavados breves. Tras esto, se procedió a teñirlos en la solución del colorante violeta de cresilo durante 5 a 20 minutos (*Solución 3*) y se aclararon brevemente con dos lavados en agua destilada. A continuación, los cortes se sumergieron durante 1 minuto en EtOH 70 %, 1 minuto en EtOH 95 %, 10 minutos en cloroformo 100 % en agitación y brevemente en EtOH 95 %. Los cortes se diferenciaron en alcohol acético (960 ml de EtOH 95 % y 17 ml de ácido acético glacial), controlándolos visualmente hasta conseguir una adecuada diferenciación. Después, los cortes fueron sumergidos en EtOH 100 % durante 1 minuto, se realizaron

6 aclarados en xileno de 10 minutos cada uno y se cubrieron con el medio de montaje DePeX (SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Alemania).

El protocolo de acetilcolinesterasa (AChE) empleado en el presente estudio es una modificación del protocolo propuesto por Geneser-Jensen y Blackstad (1971), y consiste en la incubación de los cortes en una solución de acetilcolina, sulfato de cobre, glicina, y etopropacina. La acetilcolina es el sustrato de la enzima, la cual va a desencadenar la reacción en el tejido, y la etopropacina es un inhibidor de colinesterasas inespecíficas. Una vez incubados los cortes el tiempo suficiente, se procedió al revelado de la actividad enzimática por medio de una solución de ferricianuro potásico. El desarrollo completo de esta técnica de detección enzimática fue el siguiente: los cortes seleccionados se lavaron en agua destilada un mínimo de 30 minutos; posteriormente, se situaron en la solución de incubación (*Solución 4*) durante un tiempo que osciló entre las 3 y las 5 horas. El modo de saber si la reacción había tenido efecto era observar el cambio de aspecto del tejido, ya que las zonas ricas en AChE con esta solución se vuelven opacas. Tras la incubación, los cortes fueron sumergidos en la solución de revelado (*Solución 5*), donde permanecieron unos segundos hasta que adquirieron la coloración adecuada. Tras esto, los cortes volvieron a ser lavados con agua destilada y fueron montados en PB 0,1 M diluido tres veces. Los portaobjetos empleados tenían unas dimensiones de 50 por 70 mm, y todos los cortes fueron montados con la misma orientación (dorsal arriba, lateral a la derecha) para facilitar el estudio de los cortes adyacentes. Los portaobjetos habían sido previamente gelatinizados para favorecer la adherencia del tejido. Después de ser montados, los cortes se dejaron secar a temperatura ambiente durante un mínimo de una noche, y fueron deshidratados en alcoholes de concentración creciente permaneciendo 3 minutos en cada una de las cubetas con alcohol etílico al 70 %, 80 %, 95 % y 100 %, repitiendo en otra con esta última concentración. Para desengrasar las preparaciones, se empleó xilol, realizándose seis pases de 10 minutos cada uno. Por último, los cortes fueron cubiertos con DePeX, y se dejaron durante al menos 48 horas a temperatura ambiente antes de proceder a su análisis.

Para visualizar las fibras mielínicas se realizó una tinción de Gallyas en una de las series de cortes adyacentes a los teñidos con Nissl y AChE. El protocolo utilizado fue una modificación del protocolo original (Gallyas, 1979) llevada a cabo por Sánchez Lozano y Cavada. Esta técnica está basada en la impregnación de las fibras

mielínicas como producto de la precipitación de sales de nitrato de plata debida a la capacidad reductora de la mielina en el tejido. El protocolo detallado se describe a continuación; todos los pasos fueron realizados en agitación y en campana: los cortes seleccionados se lavaron en agua destilada durante 3 minutos para eliminar los productos químicos de la solución de almacenamiento y se incubaron posteriormente en una solución de piridina y ácido acético (*Solución 6*) durante un mínimo de 30 min. Posteriormente, se hicieron dos lavados rápidos y un lavado de 3 minutos en agua destilada y se incubaron en la *Solución de impregnación (Solución 7)* durante 45 minutos en oscuridad. Después, los cortes fueron sumergidos 3 veces durante 3 minutos en ácido acético al 0,5 % para detener la reacción y eliminar el exceso de plata. Tras esto, se incubaron en la *Solución de desarrollo (Solución 8)* durante 1 hora y 40 minutos para estabilizar la reacción. Se sumergieron entonces en ácido acético al 1 % durante 5 minutos y se lavaron rápidamente en agua destilada. Después se lavaron los cortes en ácido acético al 1 % y en agua destilada. Por último, se fijaron en una solución de tiosulfato al 5 % sumergiendo los cortes 5 y 30 minutos cambiando la solución; en este paso se limpiaron los cortes de restos de plata que no se hubiesen fijado y se estabilizaron aquellos que sí. Por último, se hicieron dos lavados rápidos en agua destilada y se montaron y cubrieron los cortes tal y como se ha explicado para los cortes teñidos para AChE salvo por la utilización de una solución de montaje específica de pH bajo (*Solución 9*).

Solución 3: se disolvió el colorante violeta de cresilo al 0,1 % en agua destilada y se añadieron unas gotas de ácido acético glacial.

Solución 4: se mezcló etopropazina al 0,023 %, acetiltiocolina al 0,1 %, glicina al 0,075 %, sulfato de cobre al 0,05 % y acetato sódico al 0,41 % en agua destilada. Se ajustó el pH a 5 añadiendo ácido acético glacial.

Solución 5: se disolvió ferricianuro potásico al 10 % de en agua destilada.

Solución 6: se mezclaron piridina y ácido acético glacial a una concentración de 2:1.

Solución 7: se disolvieron por orden en agua destilada nitrato amónico (al 0,1 %) y nitrato de plata (al 0,1 %), para evitar su precipitación. Se añadió hidróxido de sodio 1 M, lentamente, hasta ajustar a un pH de 7,5.

Solución 8: se mezclaron lentamente y en orden tres soluciones: A, B y C, en una proporción 2:1:1. La solución A contenía agua destilada y carbonato sódico al 5 %; la B

agua destilada, nitrato amónico al 0,2 %, nitrato de plata al 0,2 % y ácido silicotúngstico al 10 % (este ácido vira de color) y la C se prepara añadiendo a la solución B una concentración del 0,75 % de paraformaldehído al 35 %.

Solución 9: se mezclaron 100 ml de una solución A (13,68 % de acetato sódico en agua destilada), 95 ml de otra solución B (3,65 % de ácido clorhídrico en agua destilada) y agua destilada, resultando en una solución de tampón acetato 0,2 M, pH 3,33.

3.2.2. Tinciones inmunohistoquímicas

En este trabajo se realizaron técnicas inmunohistoquímicas frente a cuatro proteínas diferentes, empleando un protocolo muy similar para todas ellas. El fundamento de estas técnicas consiste en la detección de la presencia de una determinada proteína, y no de su actividad. Para ello, se utilizan anticuerpos dirigidos frente a una cadena de aminoácidos específica de la proteína que se quiere detectar. Para evitar alteraciones en el anticuerpo y amplificar la señal de marcaje, las técnicas inmunohistoquímicas más empleadas son las indirectas, aquéllas en las que se añade un anticuerpo primario que se une a la proteína de interés, un anticuerpo secundario biotinilado que se une al primario, y unos complejos enzimáticos que se unen a las biotinas del secundario y a través de los cuales se visualiza la detección. Los complejos empleados en las técnicas descritas en este trabajo son los avidina-biotina-peroxidasa (ABC), según describieron Hsu y Ranie (1981). Así, aunque el anticuerpo primario se una a la proteína que se quiere detectar en una proporción 1:1, los anticuerpos secundarios se unen al primario en gran número por medio de su cadena constante, y a través de sus biotinas también pueden unirse a muchos complejos ABC. Esto produce la amplificación de señal mencionada anteriormente. El revelado se produce aprovechando la actividad de la enzima peroxidasa de los complejos ABC, ya que la solución de revelado consta del sustrato de esta enzima (peróxido de hidrógeno), y un cromógeno que forma un precipitado marrón por la acción de la peroxidasa sobre su sustrato.

El protocolo inmunohistoquímico general utilizado fue el siguiente: todo el procesamiento se hizo en flotación hasta el montaje de los cortes en el portaobjetos previo a la deshidratación. Tras tres lavados en PB, se llevó a cabo un proceso de desenmascaramiento de antígenos sumergiendo a los cortes en tampón citrato sódico (0,05M; pH 6) durante 30 minutos dentro de tubos Falcon que se sumergieron en un

baño a 80 °C. Este procedimiento mejoró la intensidad de la tinción resultante. Una vez atemperados los cortes, se incubaron durante 30-45 minutos, a temperatura ambiente, en una solución que contenía 2:3 de peróxido de hidrógeno (H₂O₂; 3 %) y 1:3 de etanol (50 %) para inactivar las peroxidasas endógenas presentes en el tejido, y de nuevo se lavaron bien con PB con Tritón X-100 al 0,2 %. Después, los cortes se bloquearon durante 3 horas en una solución de PB salino (PBS) con Tritón X-100 al 0,2 % y un 3 % de suero normal procedente de la especie en la cual se hubiese obtenido el anticuerpo secundario utilizado. Entonces, se incubaron los cortes durante una o dos noches a 4 °C en una solución de PBS con los correspondientes anticuerpos primarios (véanse las especificaciones en la Tabla 3), Tritón X-100 al 0,2 % y 3 % suero normal.

Los cortes se lavaron de nuevo tres veces en PBS con Tritón X-100 al 0,2 % y después se incubaron durante 90 minutos a temperatura ambiente en una solución compuesta por el correspondiente anticuerpo secundario biotinilado a una concentración de 1:250, 2 % de suero normal y 0,2 % de Tritón X-100 en PBS. Después de tres lavados más en PBS, los cortes se incubaron durante 90 minutos en avidina-biotina al 0,8 % (ABC Elite, Vector, Burlingame, California), se lavaron dos veces en PBS y una en tampón Tris (TB; 0.05M; pH 7,6). La peroxidasa unida se reveló incubando las secciones en un medio que contenía 0,05 % de 3,3 -diaminobenzidina (DAB, Sigma) y 0,003 % de H₂O₂ (30 %) en TB a temperatura ambiente. La reacción se paró lavando los cortes abundantemente en TB y posteriormente en PBS. Los cortes fueron montados y cubiertos tal y como se ha descrito para la tinción histoquímica de la AChE.

3.2.2.1. Proteína de núcleo neuronal

El protocolo seguido para visualizar la proteína de núcleo neuronal (NeuN) fue idéntico al protocolo general explicado anteriormente. Esta tinción inmunohistoquímica se realizó en una serie de secciones del CA del caso 7 que estaban separadas entre sí por 1,05 mm y en la cual la primera sección había sido elegida al azar dentro del intervalo de tejido de 1,05 mm más anterior. Las características de los anticuerpos primario y secundario utilizados, así como el tiempo de incubación y concentración utilizada se especifican en la Tabla 3. NeuN es una proteína de unión a ADN que se localiza específicamente en el núcleo y nucleolo de

las neuronas; el anticuerpo primario utilizado para detectarla reconocía 2-3 bandas en el rango de 46-48 kDa y posiblemente otra banda de 66 kDa en los análisis de *Western Blot* (información provista en la hoja de especificaciones del proveedor). Los controles negativos se realizaron omitiendo el anticuerpo primario, no observando ningún tipo de marcaje en esas secciones.

3.2.2.2. Parvalbúmina y calretinina

Dos series de secciones adyacentes a las teñidas para Nissl, con inicio al azar y una distancia constante de separación de 1,05 mm fueron teñidas una para PV y otra para CR, para visualizar cada una de esas poblaciones de IN (Fig. 3A, B). El procedimiento fue idéntico al descrito como protocolo general de inmunohistoquímica. Las características, tiempo de incubación y concentración de los anticuerpos se indican en la Tabla 3. Se realizaron controles negativos omitiendo el anticuerpo primario en cada caso y se comprobó que no había marcaje.

El anticuerpo contra PV reconoce a esta proteína en su forma dependiente de iones Ca^{2+} . No reacciona con otros miembros de la familia con dominios de mano EF como la calmodulina, la proteína intestinal de unión a calcio, S100A2 (S100L), S100A6 (calciolina), la cadena α of S-100 (información provista por el fabricante) y entre otras especies, reacciona contra el tejido cerebral humano. El antisero contra CR fue producido en conejos por inmunización con la CR humana recombinante que contenía una señal 6-his en el extremo N-terminal. El anticuerpo reacciona específicamente con la CR del tejido procedente de humano, mono, rata, ratón, cerdo de guinea, pollo y pez. El antisero no presenta reacciones cruzadas con CB ni con otras proteínas ligadoras de calcio conocidas, tal y como se determinó por *Western blot* y por la distribución en el cerebro (información provista por el fabricante).

3.2.2.3. Transportador de dopamina

Esta tinción se utilizó para visualizar fibras dopaminérgicas y se realizó en una serie de secciones que contenían el CA y que eran adyacentes a las teñidas para Nissl, AChE y Gallyas. La primera sección de la serie fue elegida al azar y las siguientes estuvieron separadas por una distancia constante entre ellas que varió entre 1,75 y 2,01 mm según el tamaño del CA de cada caso, de forma que se procesasen 5-7 secciones por cerebro. El protocolo inmunohistoquímico para DAT fue ligeramente diferente al

protocolo general y similar al utilizado previamente en tejido de mono y humano (Sanchez-Gonzalez y cols., 2005; Garcia-Cabezas y cols., 2009). Todos los lavados se realizaron en TB; la inactivación de las peroxidasas endógenas se realizó incubando los cortes 30 minutos en una solución que contenía H₂O₂ al 1,25 % en TB. El desenmascaramiento de antígenos se llevó a cabo introduciendo los cortes en tampón citrato sódico durante 25 minutos dentro de un baño a 95 °C. Los cortes fueron bloqueados durante 3 horas en una solución con 0,4 % Tritón X-100, 20 % de suero normal de conejo, 5 % de albúmina de suero bovino y TBS. El anticuerpo primario utilizado reconocía una banda difusa de aproximadamente 70-85 kDa del N-terminal del DAT humano fusionado con Glutación S-transferasa, tal y como se vió con *Western blot* en extractos de caudado, putamen y núcleo accumbens humano (Miller y cols., 1997). La solución de incubación del anticuerpo primario contenía 0,2 % de Tritón X-100, 20 % suero normal de conejo y 5 % de albúmina de suero bovino en TBS (véase la Tabla 3). Se hicieron controles negativos omitiendo el anticuerpo primario para DAT en un corte del mismo bloque que contenía el CA, no observando marcaje; la incubación en la solución de bloqueo con una altísima concentración de suero, albúmina y Tritón X-100 fue un paso crítico para obtener secciones controles completamente libres de fondo. El protocolo de desenmascaramiento de antígenos, de igual modo, mejoró notablemente la inmunorreacción y fue un paso crítico para revelar el DAT en tejido humano (Fig. 3C, D).

La solución del anticuerpo secundario contenía 20 % de suero normal de conejo y 0,2 % de Triton X-100 en TBS. Los cortes fueron incubados durante 90 minutos en avidina-biotina al 1 %. La peroxidasa unida se reveló en este caso utilizando un método combinado de glucosa oxidasa-DAB-níquel que aumentaba la sensibilidad de la reacción de revelado y que está especialmente indicada para la visualización de fibras y terminales nerviosos (Shu y cols., 1988). Este método está basado en la adición a la solución de revelado de la enzima glucosa oxidasa, su sustrato, la D-glucosa, y sulfato de níquel de forma que se produce la oxidación de la glucosa y se libera una gran cantidad de peróxido de hidrógeno que favorece el depósito de DAB y de níquel en los lugares donde se habían unido previamente las peroxidasas de los complejos avidina-biotina. Como paso previo al revelado, los cortes se lavaron dos veces en tampón acetato (0,1 M; pH 6). La incubación en la solución de revelado (*Solución 10*) se llevó a cabo en agitación suave durante aproximadamente 5

minutos a temperatura ambiente y bajo control microscópico. Finalmente, se paró la reacción lavando en tampón acetato y posteriormente se lavaron los cortes en PB. Los cortes de montaron y cubrieron tal y como se ha descrito anteriormente.

Solución 10: se prepararon dos soluciones A y B que se mezclaron en proporción 1:1, se filtraron y se les añadió la enzima glucosa oxidasa al 0,003 %. La solución A contiene tampón acetato 0,2 M (pH 6) con sulfato de níquel 6-hidrato al 2,41 %, D-glucosa al 0,2 % y cloruro de amonio al 0,04 %. La solución B contiene DAB al 0,033 % en agua destilada.

Tabla 3. Anticuerpos empleados en las técnicas inmunohistoquímicas para la detección de las distintas proteínas

Proteína	Anticuerpo primario				Anticuerpo secundario			
	Animal	Fuente	Dilución	Tiempo de incubación	Animal	Fuente	Dilución	Tiempo de incubación
NeuN	Ratón	Millipore (MAB377B)	1:100	1 noche	Caballo	Vector (BA2000)	1:250	90 min
PV	Ratón	Sigma (PARV-19)	1:2500	1 noche	Caballo	Vector (BA2000)	1:250	90 min
CR	Conejo	Swant 7699/4,	1:2500	1 noche	Cabra	Vector (BA1000)	1:250	90 min
DAT	Rata	DAT-Nt (4F8)	1:250	2 noches	Conejo	Vector (BA4000)	1:400	120 min

NeuN: proteína nuclear neuronal; PV: parvalbúmina; CR: calretinina; DAT: transportador de dopamina.

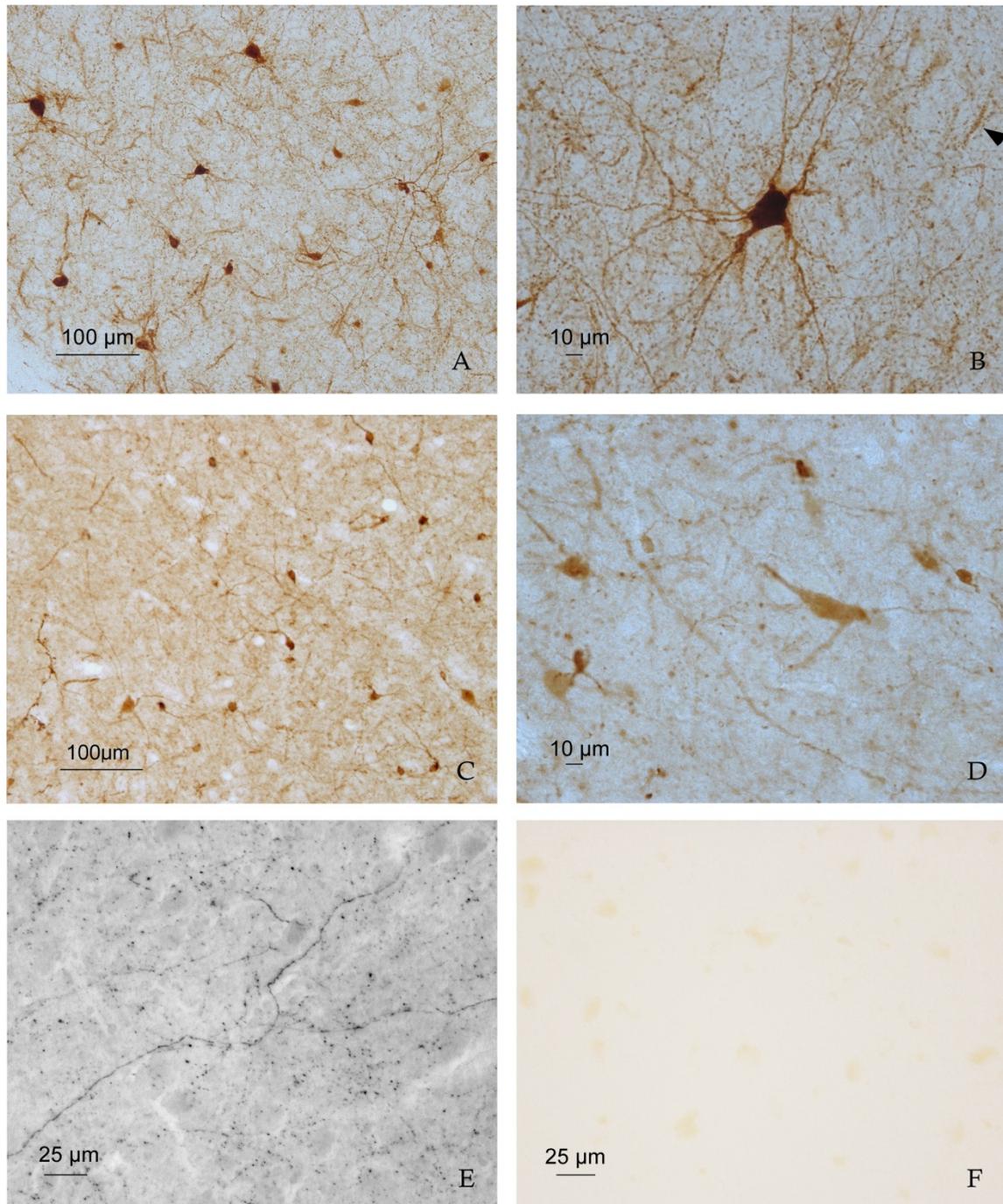


Figura 3. Tinciones inmunohistoquímicas para PV, CR y DAT en el CA humano. A. Fotomicrografía mostrando interneuronas PV+ en el núcleo lateral. **B.** Imagen a mayor aumento de una interneurona PV+ con morfología multipolar del núcleo lateral. La punta de flecha señala a una de las estructuras con forma de bastón típicas de las IN PV+ en candelabro. **C.** Neuronas CR+ en el núcleo accesorio basal. **D.** Fotomicrografía a mayor aumento de varias neuronas CR+ en el núcleo accesorio basal. **E.** Fibras DAT+ en el núcleo central. Obsérvense las terminales DAT+ muy finas, cortas y varicosas entremezcladas con fibras largas algo más gruesas. **F.** Fotomicrografía de un corte control procesado para DAT omitiendo el anticuerpo primario.

3.2.3. Tinciones de doble inmunofluorescencia

3.2.3.1. *Transportador de dopamina y parvalbúmina o calretinina*

Con el fin de observar la relación topográfica de las fibras DAT+ con las poblaciones de IN PV+ y CR+, se realizaron dobles tinciones de inmunofluorescencia en varias secciones anteroposteriores del CA de los casos 4, 6 y 7.

El protocolo seguido para la doble tinción de inmunofluorescencia fue muy parecido al de las inmunohistoquímicas simples con las siguientes modificaciones: la solución de bloqueo contenía Tritón X-100 al 0,4 %, 20 % de suero normal de burro (la especie donde se generó el anticuerpo para DAT) y suero de cabra (la especie donde se generaron los anticuerpos para PV y CR), 5 % de albúmina de suero bovino y PBS. Los cortes fueron entonces incubados con los dos anticuerpos primarios: DAT y PV o DAT y CR; que fueron los mismos usados para las inmunohistoquímicas simples (Tabla 4). La solución de incubación contenía también 0,2 % de Tritón X-100, 20 % de suero normal de burro y suero de cabra, 5 % de albúmina de suero bovino y PBS. La solución del anticuerpo secundario estaba formada por 0,2 % de Tritón X-100, 20 % de suero normal de burro y suero de cabra, 2 % de albúmina de suero bovino en PBS, y los cortes se incubaron durante 90 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad. Los anticuerpos secundarios del tipo Alexa Fluor se especifican en la Tabla 4.

Tras varios lavados en PBS y un lavado de 5 minutos en etanol (EtOH) al 70 %, los cortes fueron tratados con el producto *Autofluorescence Eliminator Reagent* (Merck Millipore, Darmstadt, Alemania) para reducir o eliminar la autofluorescencia emitida por la lipofucsina sin afectar negativamente al resto del marcaje fluorescente en los cortes. Tras esto, se lavaron las secciones tres veces durante 3 minutos en etanol (EtOH) al 70 %, se montaron en portaobjetos gelatinizados desde una solución de PB diluido 1:3 en agua destilada y se dejaron secar al aire durante 1 hora. Finalmente, las secciones se cubrieron con la solución que evita la pérdida de fluorescencia DABCO (Peterson, 2004).

Los controles de estas técnicas de doble inmunofluorescencia que permitieron asegurar que no se produjeran uniones cruzadas entre anticuerpos primarios y secundarios no correspondientes (que de ser específicos no deberían unirse) fueron los siguientes: 1. varios cortes de tejido se incubaron con el anticuerpo primario para

detectar CR y otros cortes con el anticuerpo primario frente a la PV y en todos ellos se añadió el anticuerpo secundario que reconocía al anticuerpo primario de DAT; 2. otros cortes de tejido se incubaron con el anticuerpo primario de DAT y uno de los anticuerpos secundarios utilizados para revelar la CR o la PV. En ninguno de estos cortes controles se observaron fibras o neuronas teñidas.

3.2.3.2. Tirosina hidroxilasa y parvalbúmina

Una sección del CA fue procesada para visualizar simultáneamente las proteínas TH y PV con el objetivo de analizar la relación topográfica de las IN que contienen esta proteína ligadora de calcio y las fibras positivas para TH.

El protocolo utilizado fue muy similar al de DAT y PV. Los cortes fueron incubados durante 48 horas a 4 °C con los anticuerpos frente a TH (conejo) y PV (ratón) y posteriormente con los anticuerpos secundarios del tipo Alexa Fluor frente a las especies de conejo y ratón, especificados en la Tabla 4. El resto del protocolo fue idéntico al de las dobles inmunotinciones DAT/PV y DAT/CR. Como controles se realizaron dos combinaciones: 1. un corte se incubó con el anticuerpo primario para TH y luego se añadió el secundario usado para revelar la PV; 2. otro corte se incubó con el anticuerpo primario para PV y el secundario para revelar la TH. En ninguno de esos cortes se observó algún tipo de tinción, indicando que no se producían inmunorreacciones cruzadas.

El anticuerpo anti-TH fue purificado a partir de células PC12, del clon LNC1. Reconoce un epítipo del exterior del dominio regulador del extremo N-terminal de una proteína de aproximadamente 59-61 kDa (*Western blot*). No reacciona con ninguna de las siguientes proteínas en *Western blot*: dopamina-beta-hidroxilasa, fenilalanina hidroxilasa, triptófano hidroxilasa, dehidropteridina reductasa, sepiapterina reductasa o fenetanolamina (phenethanolamine)-N-metil transferasa (PNMT) (información proporcionada por el fabricante).

Tabla 4. Anticuerpos empleados en las técnicas inmunofluorescentes para la detección simultánea de fibras DAT+ y TH+ con IN PV+ y CR+

Proteína	Anticuerpo primario				Anticuerpo secundario			
	Animal	Fuente	Dilución	Tiempo de incubación	Animal	Fuente	Dilución	Tiempo de incubación
TH	Conejo	Merck Millipore (MAB318)	1:250	2 noches	Cabra	Invitrogen (Alexa Fluor 488) A-11008	1:250	90 min
DAT	Rata	DAT-Nt (4F8)	1:250	2 noches	Burro	Invitrogen (Alexa Fluor 488) A-21208	1:250	90 min
PV	Ratón	Sigma (PARV-19)	1:2500	2 noches	Cabra	Invitrogen (Alexa Fluor 568) A-11031	1:250	90 min
CR	Conejo	Swant 7699/4,	1:2500	2 noches	Cabra	Invitrogen (Alexa Fluor 546) A-11035	1:250	90 min

3.3. Análisis del material

3.3.1. Delimitación de los núcleos del CA

El contorno del conjunto del CA, de sus núcleos y subdivisiones nucleares fueron dibujados con el objetivo PlanApo 1,25X (Olympus, Tokio, Japón) en cada uno de los cortes coronales incluidos en el presente estudio siguiendo criterios similares al de Sims y Williams (1990), Schumann y Amaral (2005) o Ledo-Varela y cols. (2007). Previamente, los cortes teñidos con Nissl habían sido fotografiados con una cámara digital Nikon DXM1200F (Nikon, Tokyo, Japón) conectada a una lupa SMZ1500 (Nikon, Tokyo, Japón) a 0,75X; los límites del CA fueron dibujados sobre las imágenes de los cortes de Nissl impresas observando los cortes adyacentes teñidos para Nissl, AChE and Gallyas. Cuando fue necesario se utilizó el microscopio Nikon Eclipse 80i (Nikon, Japón) para determinar los límites de algunas de las subdivisiones nucleares. Para la delimitación de las divisiones nucleares en los cortes procesados para DAT, PV o CR se utilizaron cortes adyacentes o muy próximos teñidos con Nissl, AChE y Gallyas y los dibujos realizados sobre los cortes de Nissl y de DAT, según se ha descrito previamente.

3.3.2. Estimaciones estereológicas

Todas las estimaciones se realizaron con un microscopio óptico Olympus BX61 (Olympus, Tokyo, Japón) equipado con un *microcator* Heidenhahn MT 12 (0,5 μm de resolución), una platina motorizada en X-Y-Z para las muestras (ProScan II, Prior Scientific, Cambridge, Reino Unido), y una cámara digital Olympus DP-71 conectada a un PC con dos monitores provisto del programa de estereología newCAST (Visiopharm, Hørsholm, Dinamarca).

3.3.2.1. Encogimiento del tejido

Debido a que los volúmenes de las diversas divisiones territoriales del CA fueron calculados a partir de las áreas de las mismas estimadas en los cortes teñidos con Nissl (véase el apartado *Estimación del volumen de referencia dentro del apartado 3.3.2.3. Estimación de la densidad de células*), fue necesario tener en cuenta el posible encogimiento del tejido en las dimensiones x e y (encogimiento de área) durante el procesamiento. Para ello, el encogimiento del tejido se calculó desde que los bloques se sumergían en sacarosa hasta que los cortes se teñían y estaban listos para observarse en el microscopio; el encogimiento producido por la fijación en paraformaldehído no pudo ser calculado debido a que los bloques que contenían el CA habían sido fijados previamente por las instituciones que donaron el tejido. El área de los cortes fue estimada en tres pasos a lo largo del procesamiento: 1. antes y después de que los bloques fueran sumergidos en sacarosa al 30 % (se estimó el área de las caras anterior y posterior del bloque) (Fig. 2B), 2. una vez que los bloques fueron congelados en la platina del microtomo de congelación (se estimó el área de un corte cada 0,6 mm) (Fig. 2D), y 3. una vez que los cortes habían sido teñidos en Nissl, deshidratados y cubiertos (se estimó el área de un corte cada 1,05 mm) (Fig. 2F). Para la estimación del área, se superponía una cuadrícula de puntos impresa en un folio transparente sobre el bloque o corte y se contaban los puntos que caían dentro del tejido; el área se obtenía multiplicando el número de puntos por el área asociada a cada punto. Para mayor precisión en los límites entre regiones, los puntos estaban representados por cruces y se contaban todas aquellas cruces cuyo ángulo superior derecho caía por completo dentro del tejido. Este análisis mostró que el área no cambiaba significativamente en ninguno de aquellos pasos del procesamiento del tejido (la máxima diferencia de área observada fue de un 1 %); un hallazgo que coincide con

estudios previos (Hatton y von Bartheld, 1999; Dorph-Petersen y cols., 2001; Schmitz y cols., 2001). También se estimó el volumen en tres pasos: 1. antes y después de que los bloques fueran sumergidos en sacarosa al 30 % (por desplazamiento de líquido), 2. durante el corte del bloque de tejido en el microtomo de congelación, y 3. en los cortes teñidos, deshidratados y cubiertos. En los dos últimos pasos, el volumen fue estimado a partir de las áreas estimadas previamente (véase también *Estimación del volumen de referencia dentro del apartado 3.3.2.3. Estimación de la densidad de células*). El volumen no cambió significativamente en ninguno de los pasos analizados.

A pesar de la ausencia de encogimiento de área, es bien sabido que los cortes en congelación sufren una importante compresión en el eje z en los últimos pasos del procesamiento. Con el objetivo de determinar cuáles eran los pasos que producían el mayor encogimiento, el grosor de los cortes fue medido con el microscopio y un *microcator* instalado dentro del mismo, usando el programa newCAST justo después de que los cortes fuesen cortados en el microtomo de congelación y una vez que los cortes fuesen teñidos con la técnica de Nissl, deshidratados y cubiertos. Se observó una reducción del grosor del 8 % tras el corte en el microtomo y una reducción del 70 % en el grosor final, concluyendo que la mayoría del encogimiento en z ocurre durante los pasos finales de tinción y deshidratación de los cortes. Esta reducción se tuvo en cuenta para la estimación de los números de células con el fraccionador y no afectó a las estimaciones de volumen, que se hicieron a partir del área de los cortes.

3.3.2.2. Estimación del número de células con el fraccionador óptico

El diseño del fraccionador óptico, (West y Gundersen, 1990), una combinación del disector óptico (Sterio, 1984) con un modelo de muestreo de fraccionador, fue el método escogido para estimar los números absolutos (N) de neuronas, células de glía y endoteliales, así como los de IN PV y CR+ en cada uno de los grupos nucleares, núcleos y subdivisiones nucleares del CA.

Así, cada región fue sistemática, uniforme y aleatoriamente (con inicio al azar) muestreada en el plano de los cortes (el plano x-y) y a través del grosor de los cortes (el eje z), superponiendo para ello una cuadrícula de disectores ópticos tridimensionales sobre las imágenes microscópicas observadas con el objetivo de inmersión UPlanSApo de 100X (Olympus, Tokyo, Japón). En el caso de las IN PV+, debido a su baja

densidad, el muestreo se realizó con el objetivo UPlanSApo de 40X e inmersión en aceite (Olympus, Tokyo, Japón).

El muestreo en el eje z se realizó dejando una zona de guarda superior fija, de 3 μm de extensión, y una zona de guarda inferior, por debajo del disector óptico, que variaba según el grosor del corte en cada posición en la que caía un disector. El uso de la zona de guarda es necesario para evitar el sesgo derivado de la pérdida de información que se produce en las superficies superior e inferior del corte, el llamado efecto “lost caps” (Andersen y Gundersen, 1999); esta pérdida de información puede ser física, por la eliminación de partículas durante el corte en el micrótopo, u óptica, debida a la dificultad de identificar correctamente las partículas. Con el fin de analizar la distribución de células a lo largo de la extensión en el eje z del disector, y también para asegurar que la extensión de las zonas de guarda superior e inferior utilizadas en el estudio fuera suficiente para evitar este efecto, se analizó la coordenada del eje z de 5.422 células en todas las secciones utilizadas para la estimación de células de tres de los casos incluidos en este estudio y se comprobó que su distribución a lo largo de la altura del disector era bastante homogénea (Fig. 4A). Además, en un corte de un caso elegido al azar, se analizó la coordenada z de 400 células a lo largo del grosor completo del corte, sin zonas de guarda, observando que el número de células disminuía desde el centro hacia la periferia del corte, y esta disminución se producía fundamentalmente fuera de la altura del disector (Fig. 4B).

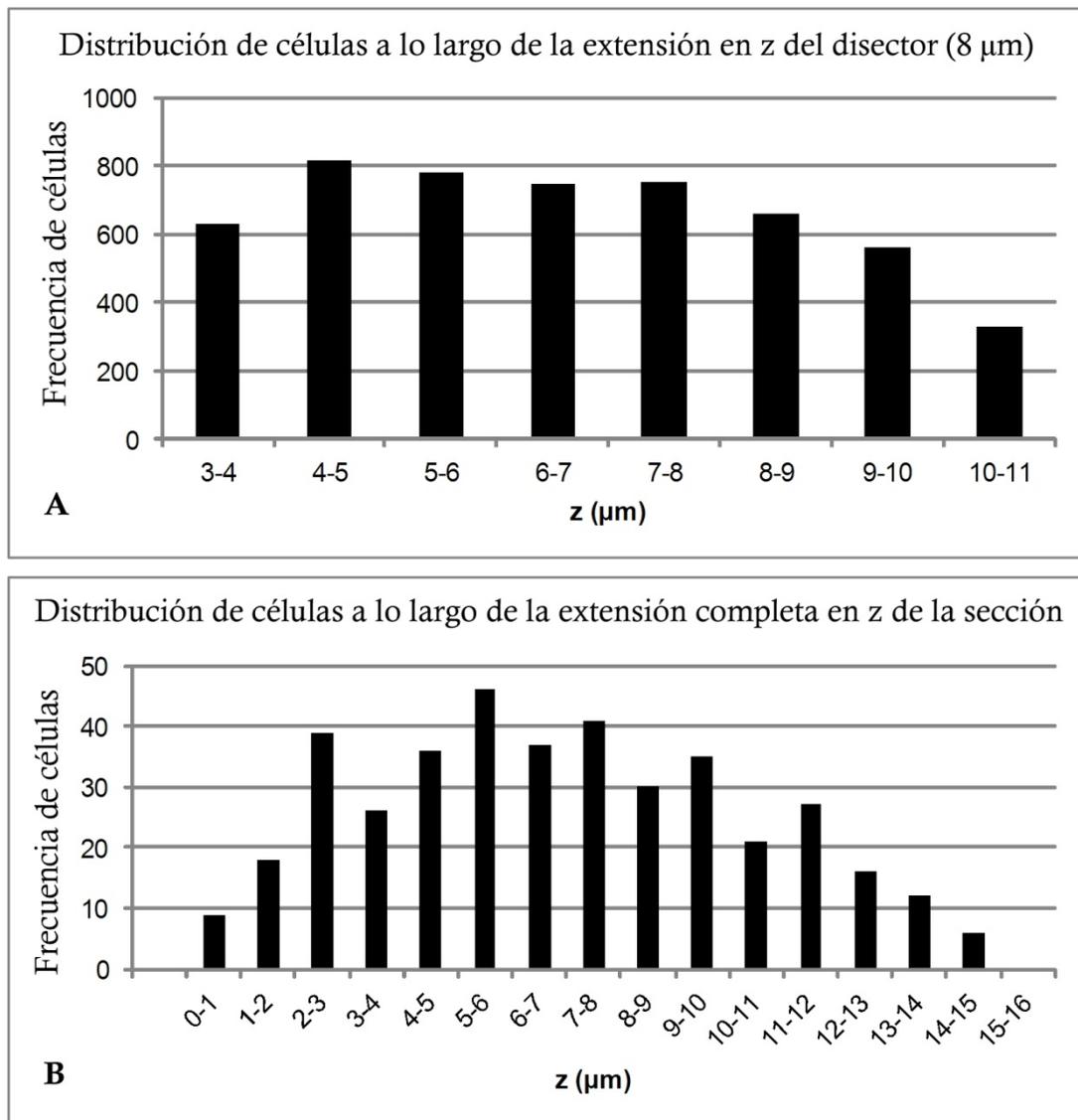


Figura 4. Distribución de células en el eje z. **A.** Análisis de la distribución de las células dentro de la extensión en z del disector óptico obtenido tras el conteo de 5.422 células del CA en todas las secciones muestreadas de tres sujetos incluidos en el estudio. **B.** Análisis de distribución de células dentro de la extensión completa en z de un corte del CA, tras cuantificar un total de 400 células.

Para la estimación del número de neuronas, glía y células endoteliales en el CA, se utilizaron las secciones teñidas con la técnica de Nissl y la identificación de cada uno de los tipos celulares se hizo siguiendo un criterio morfológico (Konopaske y cols., 2008). Las neuronas se distinguían de la glía en base a su tamaño, la presencia de eucromatina en el núcleo, un nucleolo claramente visible y citoplasma alrededor de dicho núcleo (Fig. 5A). Sin embargo las células de glía contenían heterocromatina en el núcleo y no se apreciaba su citoplasma alrededor del núcleo (Fig. 5A). Las células

endoteliales se distinguían a menudo formando parte de un vaso sanguíneo o tenían una forma curva (Fig. 5A). El nucleolo se utilizó como unidad de conteo en el caso de las neuronas; en las células de glía y endoteliales, ya que esta estructura no era claramente visible, consideramos el ecuador del núcleo para este fin.

La tinción de NeuN se realizó en una serie de secciones del caso 7 adyacente a otra serie teñida con Nissl con el fin de realizar un conteo de las neuronas NeuN+ en varios núcleos del CA y comparar la cantidad obtenida con la estimada haciendo el mismo tipo de conteo neuronal en secciones de Nissl. De esta manera comprobamos antes de comenzar el conteo en las secciones de Nissl que la identificación de las neuronas fue correcta. Así, se cuantificó el número de neuronas identificadas en las secciones teñidas para NeuN usando los mismos parámetros estereológicos (las fracciones de muestreo y la unidad de conteo) que en los conteos con las tinciones de Nissl.

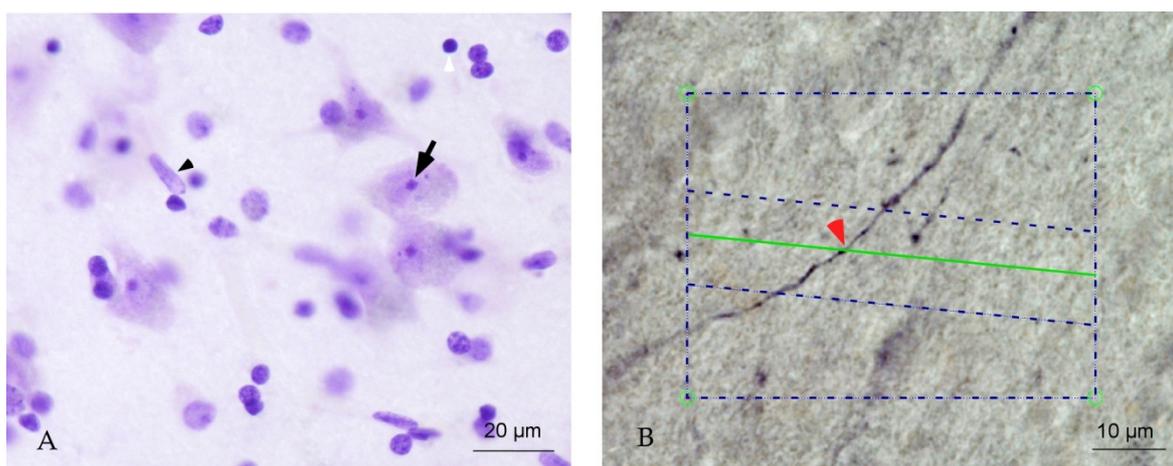


Figura 5. A. Fotomicrografía tomada con el objetivo de inmersión en aceite de 100X que muestra distintos tipos celulares en un corte del CA teñido con Nissl. La flecha negra señala al nucleolo de una neurona, la punta de flecha blanca a una célula de glía y la punta de flecha negra al núcleo de una célula endotelial. **B.** Plano isotrópico virtual superpuesto sobre una microfotografía tomada a 100X de un corte del CA teñido para el DAT (plano focal de una caja de muestreo 3D). La línea verde indica la intersección del plano isotrópico con el plano focal. Las líneas azules discontinuas son la proyección de la primera y última líneas de inclusión, localizadas en las posiciones -3 y -12 μm del eje z, y que engloban el área del plano en la cual los perfiles de fibras DAT+ podían ser contados. La punta de flecha señala una intersección entre la fibra en foco y el plano.

Se realizó un estudio piloto previo al conteo de cada uno de los tipos celulares, y en base a éste se establecieron los parámetros adecuados para contar al menos 100 células por región estudiada en cada individuo, lo cual fue suficiente para conseguir un coeficiente de error (*CE*) debido al conteo que estuviese por debajo de 0,1. Los parámetros para cada tipo celular comunes a todas las regiones del CA se resumen en la Tabla 5 y la distancia entre disectores en las diferentes regiones del CA en la Tabla 6.

La gran variabilidad observada en las medidas de grosor dentro de un mismo corte y entre distintos cortes indicaba que la compresión del eje z no se produce de forma uniforme; por esta razón, calculamos el grosor medio de corte ponderado por el número de células, \bar{t}_Q (Dorph-Petersen y cols., 2001; Bermejo y cols., 2003); este valor aporta información acerca de si muchas o pocas células estaban situadas en pocas/muchas gruesas/finas posiciones, proporcionando una estimación del número de células más sólida. Por este motivo, el grosor del corte se midió con el objetivo UPlanSApo de 100X e inmersión en aceite (Olympus, Tokyo, Japón) en uno de cada tres disectores, siempre que contuviesen al menos una célula.

Como se ha dicho anteriormente, la unidad de conteo en cada tipo de células fue: el nucleolo en las neuronas y el núcleo en el caso de las células de glía, endoteliales y de las IN; más concretamente se consideraba el ecuador del nucleolo o del núcleo. Cuando el ecuador del nucleolo o núcleo aparecía en foco dentro del volumen del disector, se contaba, siempre que no tocase ni el plano de foco superior del disector ni los lados derecho e inferior del marco de conteo.

El número de cada tipo celular correspondiente fue estimado por medio de la fórmula 1:

$$1) \quad N := \frac{1}{ssf} \times \frac{1}{asf} \times \frac{1}{hsf} \times \sum Q^-$$

donde *ssf* es la fracción de muestreo de secciones, *asf* la fracción de muestreo de área, *hsf* la fracción de muestreo de altura y $\sum Q^-$ el número de células contadas en

cada región; *ssf* se calcula como $\frac{BA}{T}$, donde *BA* es el avance del bloque o el grosor elegido en el microtomo de congelación (50 μm en todos los casos) y *T* la distancia

entre cortes; asf se calcula como $\frac{a}{(D_x \times D_y)}$, donde a es el área del marco de contaje (área del disector) y D_x y D_y la distancia entre disectores en x e y respectivamente; hsf se calcula como $\frac{h}{\bar{t}_Q}$ donde \bar{t}_Q es el grosor de corte ponderado por número de células (fórmula 2) y h la altura del disector.

$$2) \quad \bar{t}_Q = \frac{\sum (t_i \times q_i^-)}{\sum q_i^-}$$

donde t_i es el grosor local del corte en el i-ésimo marco de contaje con un contaje correspondiente a ese disector de q_i^- .

3.3.2.3. Estimación de la densidad de células

La densidad de cada tipo celular (N_V) (fórmula 3), ya sean neuronas, células de glía o endoteliales, se calculó dividiendo el número absoluto de células obtenido con el fraccionador óptico entre el volumen de cada región amigdalina calculado según el principio de Cavalieri, tal y como se explica a continuación.

$$3) \quad N_V := \frac{N}{V}$$

Estimación del volumen de referencia

Para la estimación del volumen (V) de los grupos nucleares, núcleos y subdivisiones nucleares del CA se utilizó el principio de Cavalieri (Gundersen y Jensen, 1987) en los 7 casos incluidos en este estudio. Para ello, se utilizaron las secciones teñidas con Nissl, que tal y como se explicó en el apartado 3.2.1. *Tinciones de Nissl, acetilcolinesterasa y Gallyas*, fueron seleccionadas con inicio al azar y distanciadas 1,05 mm, a lo largo de toda la extensión del CA (resultando en 8-13 secciones dependiendo del tamaño del CA en cada caso). Posteriormente, sobre las imágenes microscópicas de las secciones de Nissl seleccionadas, observadas con el objetivo de 1,25X, se delimitaron todos los núcleos y subdivisiones nucleares del CA, se superpuso una cuadrícula de puntos y se contó el número de puntos que caían dentro de cada uno de esos núcleos y subdivisiones. El volumen resultó del producto de la distancia entre secciones ($T=1,05$ mm), el área por punto de la cuadrícula ($a=0,59$ mm²) y el sumatorio de puntos contados; tal y cómo aparece en la fórmula 4. Para

mayor precisión en los límites entre regiones, los puntos de la cuadrícula estaban representados por cruces y solamente se consideraban aquellas cruces cuyo ángulo superior derecho caía completamente dentro del área de interés.

No se utilizaron los cortes teñidos con PV, CR ni DAT para calcular el volumen debido a que se vio que sufrían cierto encogimiento de área, lo cual subestimaría las estimaciones de volumen. De hecho este encogimiento llegó a ser de un 17 % de reducción de área en el caso de los cortes de DAT, debido al proceso de desenmascaramiento de antígenos, por la alta temperatura a la que se veía sometido el tejido. Tal y como se expone en el apartado 3.3.2.1 de *Encogimiento del tejido*, los cortes de Nissl no sufrieron reducción de área durante el procesamiento.

$$4) \quad V := T \times a \times \sum P$$

3.3.2.4. Porcentaje de interneuronas con respecto al número total de neuronas

El porcentaje de IN PV+ o CR+ con respecto al número total de neuronas se calculó usando la fórmula 5.

$$5) \quad \% \text{ IN/NEURONAS TOTALES} = (N_{\text{IN}} / N_{\text{NEURONAS TOTALES}}) \times 100$$

3.3.2.5. Estimación de la longitud absoluta de fibras DAT+

La longitud total de fibras DAT+ ($L_{\text{DAT+}}$) se estimó mediante el método de muestreo de los planos virtuales isotrópicos (Larsen y cols., 1998). Esta técnica puede aplicarse a cortes orientados en una dirección particular del espacio, ya que la sonda estereológica es rotada aleatoriamente en todas las direcciones en el interior de los cortes gruesos mediante el uso del programa informático VIS, el módulo newCAST (Visiopharm, Hørsholm, Dinamarca) instalado en un ordenador conectado al microscopio en el que se visualizan los cortes de DAT. De esta forma se evita el sesgo derivado de observar estructuras que poseen una orientación preferente, como puede ser el caso de las fibras DAT+ en cortes coronales.

Para abordar este objetivo, se utilizó el mismo equipo que para el resto de las estimaciones descritas hasta ahora. Las regiones se delimitaron en los cortes de DAT seleccionados tal y como se explica en el apartado 3.2.2.3. *Transportador de dopamina*, separados entre sí 1,75 ó 2,1 mm con inicio al azar (resultando en 5-7 secciones por caso dependiendo del volumen del CA), observándolos con el objetivo PlanApo de

1,25X (Olympus, Tokio, Japón) y se dibujaron sobre las fotografías de los mismos cortes impresas en papel. Estas regiones fueron muestreadas con el objetivo UPlanSApo de 100X e inmersión en aceite (Olympus, Tokyo, Japón) por planos virtuales isotrópicos equidistantes y paralelos integrados en “cajas de muestreo” 3-D (Fig. 5B) y se contaron las intersecciones entre los planos y las fibras DAT+. Para ello, se siguió el siguiente criterio de contaje: se contaron aquellos perfiles de fibras que aparecían en foco e intersecaban con los planos virtuales dentro de la altura de la caja de muestreo ($h=10\ \mu\text{m}$), siempre que no tocasen los planos por encima del disector y permaneciesen en contacto con éstos dentro del mismo. En los casos en los que un perfil cortaba con la línea de exclusión superior (las líneas representan el corte del plano virtual con el plano de foco, de exclusión fuera de la altura del disector y de inclusión dentro), a continuación desaparecía del plano de foco y de nuevo intersecaba con la línea de inclusión en subsecuentes planos focales, era considerado para el contaje. Por último, si la estructura se mantiene en foco tocando la línea de inclusión durante varios planos de foco, sólo se cuenta una vez. La intersección del plano virtual con el plano de foco se representa por una línea verde dentro de dicha altura (Fig. 5B), y por encima y por debajo de la misma, la línea aparece en rojo. Al igual que en las estimaciones del número de células, utilizamos una zona de guarda superior de $3\ \mu\text{m}$.

Tabla 5. Parámetros estereológicos utilizados en las estimaciones realizadas

Parámetros del contaje comunes para todas las regiones del CA	Número de neuronas, células de glía y endoteliales	Número de interneuronas PV+	Número de interneuronas CR+	Longitud absoluta de fibras DAT+
Área del disector (a)/caja de muestreo (DAT)	$1760\ \mu\text{m}^2$	$13.381\ \mu\text{m}^2$	$2139\ \mu\text{m}^2$	$1457\ \mu\text{m}^2$
Altura del disector (h) (zona de guarda superior)	$8\ \mu\text{m}$ ($3\ \mu\text{m}$)	$10\ \mu\text{m}$ ($3\ \mu\text{m}$)	$8\ \mu\text{m}$ ($3\ \mu\text{m}$)	$10\ \mu\text{m}$ ($3\ \mu\text{m}$)
Grosor medio de los cortes (\bar{t}_Q^-)	$13,6\ \mu\text{m}$	$16,4\ \mu\text{m}$	$14,5\ \mu\text{m}$	$17,3\ \mu\text{m}$
Distancia entre cortes (T)	$1,05\ \text{mm}$	$1,05\ \text{mm}$	$1,05\ \text{mm}$	$1,85-2,01\ \text{mm}$

Tabla 6. Distancia entre disectores (D_x/D_y) usada en cada región del CA para cada una de las estimaciones realizadas

Región	Número de neuronas, células de glía y endoteliales	Número de interneuronas PV+	Número de interneuronas CR+	Longitud de fibras DAT+
CA	*	*	*	*
BL	*	*	*	*
L	1000	275	500	400
Lex	1000	275	500	400
Li	1000	275	500	400
Lm	1000	275	500	400
Ld	500	275	500	400
B	900	260	400	400
Bpc	900	260	400	400
Bint	900	260	400	400
Bmc	900	260	400	400
AB	800	260	400	400
ABd	800	260	400	400
ABv	800	260	400	400
CM	*	*	*	*
Co	700	260	300	260
Col	700	260	300	260
Com	700	260	300	260
Me	500	260	300	260
Ce	700	260	300	400
Cem	700	260	300	400
Cel	700	260	300	400
PA	500	260	300	300
CTA	500	260	300	260

* No se especifica la distancia entre disectores porque en estas regiones el número de células o de longitud de fibras se calcula sumando directamente el número obtenido en sus subdivisiones y no es necesario estimarlo a partir de la fórmula 2.

La longitud total de fibras DAT+ fue estimada siguiendo un esquema de muestreo de fraccionador (Drojdahl y cols., 2010) (fórmula 6), similar a la utilizada para la cuantificación de neuronas, glía y células endoteliales.

$$6) L_{\text{DAT}^+} := \left(\frac{1}{\text{ssf}}\right) \cdot \left(\frac{1}{\text{asf}}\right) \cdot \left(\frac{1}{\text{hsf}}\right) \cdot d \cdot 2 \cdot \text{sumQ}^-$$

donde d es la distancia entre los planos virtuales (20 μm) y el resto de los términos han sido descritos previamente en el apartado 3.3.2.2. *Estimación del número de células con el fraccionador óptico.*

3.3.2.6. Estimación de la densidad de fibras DAT+

La densidad de longitud de fibras DAT+ ($L_V \text{ DAT+}$) (fórmula 7) se estimó dividiendo la longitud absoluta $L_{\text{DAT+}}$ por el volumen (V) de cada grupo nuclear, núcleo o subdivisión nuclear del CA, calculado según la fórmula 4.

$$7) L_V \text{ DAT+} := \frac{L_{\text{DAT+}}}{V}$$

3.3.2.7. Estimación de la longitud absoluta de fibras DAT+ por neurona

El ratio entre la longitud absoluta de fibras DAT+ y el número total de neuronas (ratio $L_{\text{DAT+}}/N_{\text{NEU}}$) fue calculado para cada grupo nuclear, núcleo o subdivisión nuclear del CA en los casos 3, 4, 6 y 7 (Tabla 2). Este cociente refleja la cantidad de fibras DAT+ que existe por cada neurona, y permite comparar esta información entre las diversas divisiones nucleares del CA.

3.3.2.8. Precisión de las estimaciones estereológicas

Se calculó el CE debido al método de muestreo tanto para las estimaciones del volumen como para las de números de neuronas en cada caso por separado según las ecuaciones de Gundersen y Jensen (1987) y Gundersen y cols. (1999). El CE medio de todos los casos (\hat{CE}) se obtuvo según la fórmula 8, donde n es el número de casos. En algunas regiones pequeñas o que contenían densidades muy bajas de los tipos celulares estudiados, como el área periamigdalina, el área de transición córtico-amigdalina o las subdivisiones más pequeñas de ciertos núcleos, el CE de los contajes de células fue mayor de 0,1; sin embargo, aumentar el número de cortes o la intensidad de muestreo en esas regiones tan pequeñas habría supuesto un tiempo excesivo de contaje en el microscopio y más aún cuando la densidad de células era tan baja. El CE de las estimaciones de densidad es el mismo que el de las estimaciones de número de células, ya que la densidad se calcula a partir del número.

$$8) \hat{CE} = \sqrt{\frac{\sum CE^2}{n}}$$

3.3.2.9. Análisis estadístico

Dentro del objetivo 1, se estudió la correlación existente entre la edad de los individuos donantes de las muestras en el momento del fallecimiento y el número y la

densidad de cada tipo celular (neuronas, células de glía y endoteliales). Para ello, se ha empleado un test estadístico basado en el cálculo del coeficiente de correlación de Spearman con la ayuda del programa estadístico *SPSS* (versión 19, IBM, Armonk, New York, Estados Unidos). Se consideraron diferencias significativas cuando el valor de p estaba entre 0,05 y 0,01, y muy significativas por debajo de 0,01. En los casos en los que la correlación fue significativa, se realizaron gráficos de correlación lineal con el programa *GraphPad Prism* (versión 5.0, CA, Estados Unidos).

Dentro del objetivo 3, se analizaron estadísticamente las estimaciones de la longitud de fibras DAT+ con la ayuda del programa *SPSS*. En primer lugar, se estimó la media y desviación estándar de: a) la longitud absoluta y la densidad de fibras DAT+, b) el ratio entre la longitud de fibras DAT+ y el número de neuronas, y c) el volumen de los territorios del CA en los casos utilizados para el objetivo 3 (casos 3, 4, 6, 7 y 8). Además, se realizó un análisis estadístico de la varianza (ANOVA o Kruskal-Wallis según las muestras mostrasen una distribución normal o no, respectivamente) para establecer las posibles diferencias entre las distintas regiones del CA en la densidad de fibras DAT+ y en el ratio entre la longitud absoluta de fibras y el número de neuronas. Cuando las varianzas de las muestras fueron homogéneas, según el test de Levene, se utilizó el test *a posteriori* de Tukey HSD para múltiples comparaciones; mientras que si no lo eran, se aplicó el test de Tamahane. En el caso de que hubiese que comparar dos muestras independientes, se utilizaron las pruebas t-Student o Mann-Whitney, según las muestras siguiesen o no una distribución normal, respectivamente. Se consideraron diferencias significativas cuando el valor de la p estaba entre 0,05 y 0,01, y muy significativas por debajo de 0,01.

3.3.3. Análisis de la distribución de interneuronas

Durante la estimación del número de IN PV+ y CR+ en el programa de estereología, de cada IN contada se guardaban las coordenadas en las que localizaba, así como las posiciones de cada disector de la cuadrícula de muestreo. De esta forma, con el programa Excel (Office 2007, Microsoft) se pudieron realizar esquemas para representar la distribución de la muestra de IN contadas dentro del contorno de las regiones del CA en distintos niveles de su extensión anteroposterior. Estos esquemas fueron útiles para representar gráficamente la distribución de cada población de IN y poder compararlas, pero no para estimar sus cantidades, ya que éstas dependen de la

intensidad de muestreo aplicada durante el contaje en cada región para obtener un coeficiente de error aceptable.

3.3.4. Análisis de la distribución de fibras DAT+

De los cortes teñidos para DAT de uno de los casos (caso 1), se eligieron tres que fuesen representativos de tres niveles anteroposteriores del CA, y analizamos en ellos la distribución espacial de las fibras DAT+ en el CA. Para ello, las fibras se dibujaron con la ayuda de un microscopio Nikon ECLIPSE 50i (Nikon, Tokyo, Japón) equipado con una cámara clara (Nikon Y-IDT) utilizando el objetivo de 20X y, cuando se necesitó observar con más detalle, el de 40X. Los dibujos fueron escaneados con un escáner convencional, digitalizados con el programa Canvas (versión X Build 925; ACD Systems Inc., Seattle, Washington, Estados Unidos) y superpuestos sobre fotografías de los cortes teñidos para DAT tomadas en la lupa SMZ1500 (Nikon, Tokyo, Japón) con el objetivo de 0,75X.

3.3.5. Microscopía confocal

Los cortes teñidos con doble inmunofluorescencia fueron examinados en un microscopio Leica TCS SP5 utilizando los objetivos de 20X, 40X y 63X; estos dos últimos de inmersión en glicerol. La relación topográfica entre las fibras DAT+ y las TH+ y los somas y dendritas primarias de las IN CR+ y las PV+ fue analizada utilizando series de imágenes separadas por 1 μm en el eje z, de forma que por cada corte grueso de 50 μm se obtenían unas 11-15 imágenes planas en cada posición, debido a la compresión producida en el eje z durante el procesamiento (véase el apartado 3.3.2.1. *Encogimiento del tejido*). En cada corte analizado se fotografiaron todas las regiones que contenían alguna fibra DAT+ o TH+ y al menos una IN (PV+ o CR+ según la tinción realizada en el corte) ubicada en sus proximidades, haciendo un barrido cuidadoso en todos los núcleos del CA.

4. RESULTADOS

4.1. Delimitación de los grupos nucleares, núcleos y subdivisiones nucleares del CA

Para poder acometer cada uno de los objetivos del presente trabajo, fue necesario establecer previamente una delimitación consistente de los grupos nucleares, núcleos y subdivisiones nucleares del CA humano. Las divisiones nucleares y la nomenclatura utilizada en este estudio, detalladas en la Tabla 7, son muy similares a las propuestas por Sims y Williams (1990) y Ledo-Varela y cols. (2007) y se asemejan también a la utilizada por Schumann y Amaral (2005) y Sorvari y cols. (1995); todas ellas en la especie humana. Para ilustrar la delimitación nuclear, se han utilizado series adyacentes de secciones coronales teñidas para AChE, Nissl and Gallyas en cuatro niveles del CA en secuencia anteroposterior del CA, numerados del 1 al 4, tal y como muestran las Figuras 6 y 7. A continuación se describe la delimitación de cada una de las regiones del CA consideradas en este trabajo.

Tabla 7. Divisiones regionales y nomenclatura del CA humano

COMPLEJO AMIGDALINO (CA)	
GRUPO BASOLATERAL (BL)	GRUPO CENTRAL (Ce)
<u>LATERAL (L)</u> • Externo (Lex) • Dorsal (Ld) • Lateral (Ll) • Medial (Lm)	<u>CENTRAL (Ce)</u> • Medial (Cem) • Lateral (Cel)
<u>BASAL (B)</u> • Magnocelular (Bmc) • Intermedio (Bint) • Parvocelular (Bpc)	ÁREA DE TRANSICIÓN CÓRTICO-AMIGDALINA (CTA)
<u>ACCESORIO BASAL (AB)</u> • Dorsal (ABd) • Ventral (ABv)	ÁREA PERIAMIGDALINA (PA)
GRUPO CÓRTICO-MEDIAL (CM) <u>CORTICAL (Co)</u> • Medial (Com) • Lateral (Col)	
<u>MEDIAL (Me)</u>	

4.1.1. Área periamigdalina

El área amigdalina anterior descrita por Sims y Williams (1990) aparece en el polo más anterior del CA y permanece en una posición dorsal y medial al núcleo lateral más caudalmente. Debido a que los límites de esta región son bastante difusos, especialmente en su porción más medial, en este estudio sólo hemos incluido la región

más lateral de este área, a la cual hemos denominado área periamigdalina. Esta región corresponde de forma aproximada al claustro preamigdalino descrito por Mai y cols. (2004) o a la región lateral del área amigdalina anterior descrita por Sims y Williams (1990). El límite lateral del área periamigdalina fue definido por el primer haz de fibras mielínicas de la cápsula externa que separa a esta región del claustro temporal siguiendo una dirección de ventromedial a dorsolateral (Fig. 6A, B); los límites restantes de esta región se definieron por carecer de fibras mielínicas y presentar una tinción de AChE mucho más intensa, que el resto del área amigdalina anterior (Fig. 6A, B). El área periamigdalina desaparece a niveles rostrocaudales intermedios del CA.

4.1.2. Grupo basolateral

4.1.2.1. Núcleo lateral

El núcleo lateral del grupo basolateral fue identificado claramente en las secciones teñidas para Nissl, Gallyas y AChE (Fig. 6A-C) como una estructura ovalada que aparece ligeramente posterior al área periamigdalina y está parcialmente atravesado por fibras mielínicas. A niveles anteriores este núcleo presenta una tinción de AChE muy intensa (Fig. 6A) y hacia niveles medios y posteriores esta tinción se vuelve más moderada (Figs. 6D; 7A). El límite con el núcleo basal se identificó fácilmente a niveles medios y posteriores del CA debido a la intensa tinción de AChE de dicho núcleo (Figs. 6D; 7A). Sin embargo, a nivel anterior la intensidad de esta tinción es muy similar en ambos núcleos, y el límite entre ellos se trazó gracias a la mayor densidad celular en el núcleo basal comparado con el lateral observada en los cortes teñidos con Nissl. La subdivisión externa del núcleo lateral aparece inmediatamente anterior a las subdivisiones lateral y medial, mientras que la más pequeña subdivisión dorsal ocupa una pequeña región a niveles anteroposteriores intermedios del núcleo lateral (Figs. 6C, F; 7C, F). Estas subdivisiones no se diferenciaban con AChE, excepto en el nivel intermedio 3 en el que la subdivisión lateral mostraba una tinción de AChE más intensa que las subdivisiones externa y medial (Fig. 7A). En el borde ventral del núcleo lateral aparecen dos pequeños surcos entre las subdivisiones externa y lateral, y lateral y medial (véanse las puntas de flechas en Figs. 6A, B, D, E; 7A, B), que junto con algunos vasos sanguíneos localizados en los límites de estas tres subdivisiones y algunas diferencias en la

densidad celular observadas con Nissl, permiten trazar líneas longitudinales que delimitan estas subdivisiones desde su borde ventral al dorsal.

Con la tinción de Nissl, la subdivisión externa del núcleo lateral se caracteriza por contener células de tamaño medio teñidas intensamente, la subdivisión lateral posee células débilmente teñidas de tamaño más pequeño, y la subdivisión medial está poblada de células de pequeño tamaño densamente empaquetadas, aunque la densidad celular no llegaba a ser tan alta como la observada en las subdivisiones dorsal del núcleo lateral o la parvocelular del basal. La tinción de Nissl en la subdivisión dorsal del núcleo lateral muestra células mucho más pequeñas y empaquetadas que las de las otras subdivisiones, y es fácilmente identificable por su posición dorsal a la subdivisión medial y medial a la región más dorsal de la subdivisión lateral (Fig. 6F).

4.1.2.2. Núcleo basal

El núcleo basal aparece ligeramente posterior y en posición medial al extremo más anterior del núcleo lateral (Fig. 6A-C). Su fuerte tinción de AChE permite trazar los límites de este núcleo con los núcleos accesorio basal y lateral en los niveles intermedios y caudal. La delimitación de las subdivisiones magnocelular, intermedia y parvocelular de este núcleo se hizo observando su marcaje de AChE y el tamaño de las neuronas teñidas con Nissl, que aumentó considerablemente desde la subdivisión parvocelular a la magnocelular. La subdivisión parvocelular es la subdivisión del núcleo que aparece a niveles más anteriores (Fig. 6C), seguida por las subdivisiones intermedia y magnocelular. La region paralamina ha sido incluida dentro de la subdivisión parvocelular del núcleo basal debido a que sus límites eran difusos y difíciles de trazar en todos los cortes.

4.1.2.3. Núcleo accesorio basal

El núcleo accesorio basal aparece inmediatamente posterior al comienzo de los núcleos lateral y basal y se sitúa medial al núcleo basal del que se distingue por su baja actividad AChE (Fig. 6D, F). Medialmente lindaba con el extremo lateral de los núcleos cortical y medial del grupo corticomedia. Aparte de algunas diferencias en el marcaje de AChE, estos dos núcleos se diferencian del accesorio basal por una pequeña región débilmente teñida con Gallyas (véanse las flechas negras en Figs. 6E; 7E). El límite entre el núcleo accesorio basal y el central en los niveles intermedios 2 y

3 se definió por la ausencia (nivel 2) o la baja intensidad (nivel 3) de tinción AChE en el núcleo central comparado con el accesorio basal (Figs. 6D; 7A). En el nivel más caudal, una estrecha banda positiva para la tinción de Gallyas demarca el límite entre ambos núcleos de forma más nítida (véase el asterisco en la Fig. 7E).

Las subdivisiones dorsal y ventral del núcleo accesorio basal se pueden distinguir en los niveles intermedios y caudal por los diferentes tamaños de sus neuronas teñidas con Nissl (Figs. 6F; 7C, F); de hecho, las subdivisiones dorsal y ventral se consideran magnocelular y parvocelular, respectivamente. La tinción de AChE es ligeramente más fuerte en la subdivisión dorsal que en la ventral, y especialmente en el nivel anteroposterior más caudal (Fig. 7D).

4.1.3. Grupo central

El núcleo central aparece dorsal al núcleo accesorio basal en el nivel intermedio anteroposterior 2 y ocupa la misma región que el área amigdalina anterior a niveles más posteriores (Fig. 6C, F); la transición de esas dos regiones en el eje anteroposterior se definió por un marcaje Gallyas positivo localizado entre el final del área amigdalina anterior y el comienzo del núcleo central. El marcaje de AChE del núcleo central es bastante complejo ya que varía de tal forma que algunos autores han distinguido hasta cinco subdivisiones dentro de este núcleo a lo largo del eje anteroposterior según su distinta actividad de AChE (Sims y Williams, 1990). En el nivel intermedio 2 el núcleo central no muestra marcaje de AChE, mientras que esta tinción aparece en el nivel 3 y aumenta de intensidad en el nivel más caudal (Figs. 6D; 7A, D). Las subregiones medial y lateral del núcleo central consideradas en este estudio se distinguen con la tinción de Nissl en base al mayor tamaño celular y a la mayor intensidad de tinción en la subdivisión medial comparada con la lateral.

4.1.4. Grupo corticomedial

4.1.4.1. Núcleo cortical

El comienzo del núcleo cortical coincide con el nivel anteroposterior en el que el giro semilunar se hace patente en la superficie dorsomedial del CA (Figs. 6F; 7C, F). El marcaje de AChE de este núcleo es muy débil en el nivel intermedio 2 y aumentó progresivamente hacia los niveles 3 y 4 (Figs. 6D; 7A, D).

Las divisiones medial (ventral) y lateral (más dorsal) de este núcleo se diferencian en su actividad de AChE y en la densidad y distribución de las neuronas teñidas con Nissl. La subdivisión lateral muestra un marcaje AChE más intenso que la subdivisión medial y las neuronas de la subdivisión lateral se organizan en capas mientras que las de la medial aparecen más dispersas y sin una organización laminar (Figs. 6D-F; 7A-F).

4.1.4.2. Núcleo medial

Este núcleo se localiza dorsolateral al núcleo cortical, dorsomedial al núcleo accesorio basal y medioventral al núcleo central (Figs. 6F; 7C, F). Se diferencia de estos núcleos por tener muy escasa o incluso nula actividad de AChE, y de los territorios que quedan dorsales fuera del CA por la presencia de una región muy rica en fibras miélicas, tal y como se observa con la tinción de Gallyas (Figs. 6D, E; 7A, B, 7D, E).

4.1.5. Área de transición córtico-amigdalina

Esta región del CA fue descrita por Sims y Williams (1990) como un grupo de células localizado en la profundidad del surco semianular que separa la subdivisión medial del núcleo cortical de la corteza piriforme medialmente y de la subdivisión parvocelular del núcleo basal ventrolateralmente (Figs. 6F; 7C, F). La tinción de Nissl así como su moderada actividad AChE permiten delimitar este área de las regiones circundantes (Figs. 6D, F; 7A-C, D, F).

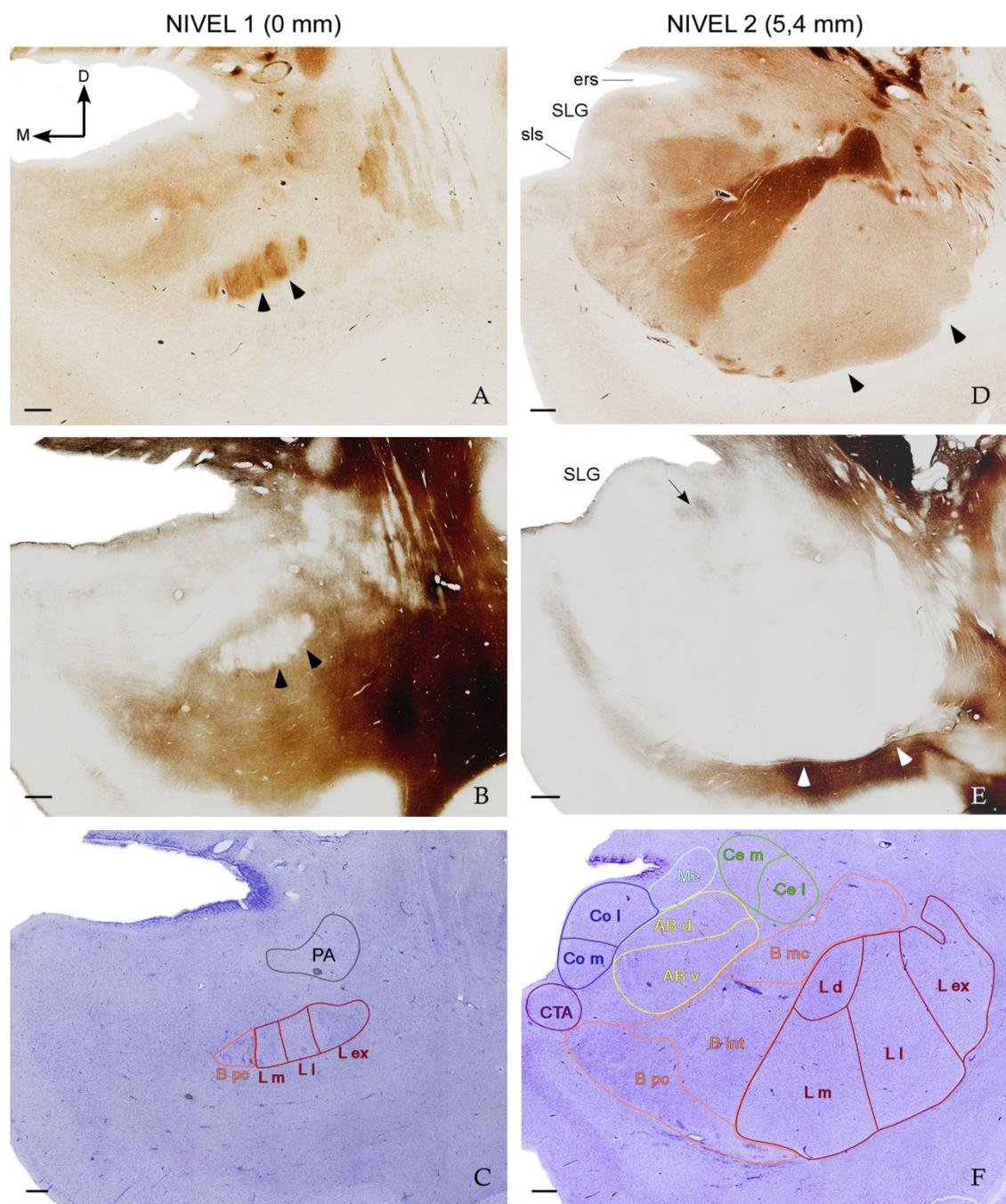


Figura 6. Delimitación regional del CA (I). Secciones coronales adyacentes teñidas para acetilcolinesterasa (A, D), Gallyas (B, E) y Nissl (C, F) en dos niveles del CA humano en secuencia anteroposterior (niveles 1 y 2). Las distancias desde cada nivel a la comisura anterior según el atlas de Mai y cols. (2004) están indicadas en la parte superior de la figura. Los núcleos y subdivisiones nucleares del CA, detallados en la Tabla 7, han sido delimitados sobre las secciones teñidas con Nissl. Las puntas de flecha en A, B, D y E indican los límites entre las subdivisiones externa, lateral y medial del núcleo lateral. La flecha en E indica el límite entre el núcleo accesorio basal y el grupo corticomedial. Abreviaturas: D, dorsal; ers: surco endorrinal; M, medial; SLG, giro semilunar; sls, surco semilunar (semianular). Para otras abreviaturas véase la Tabla 7 o la lista de abreviaturas. Barra de calibración: 1 mm.

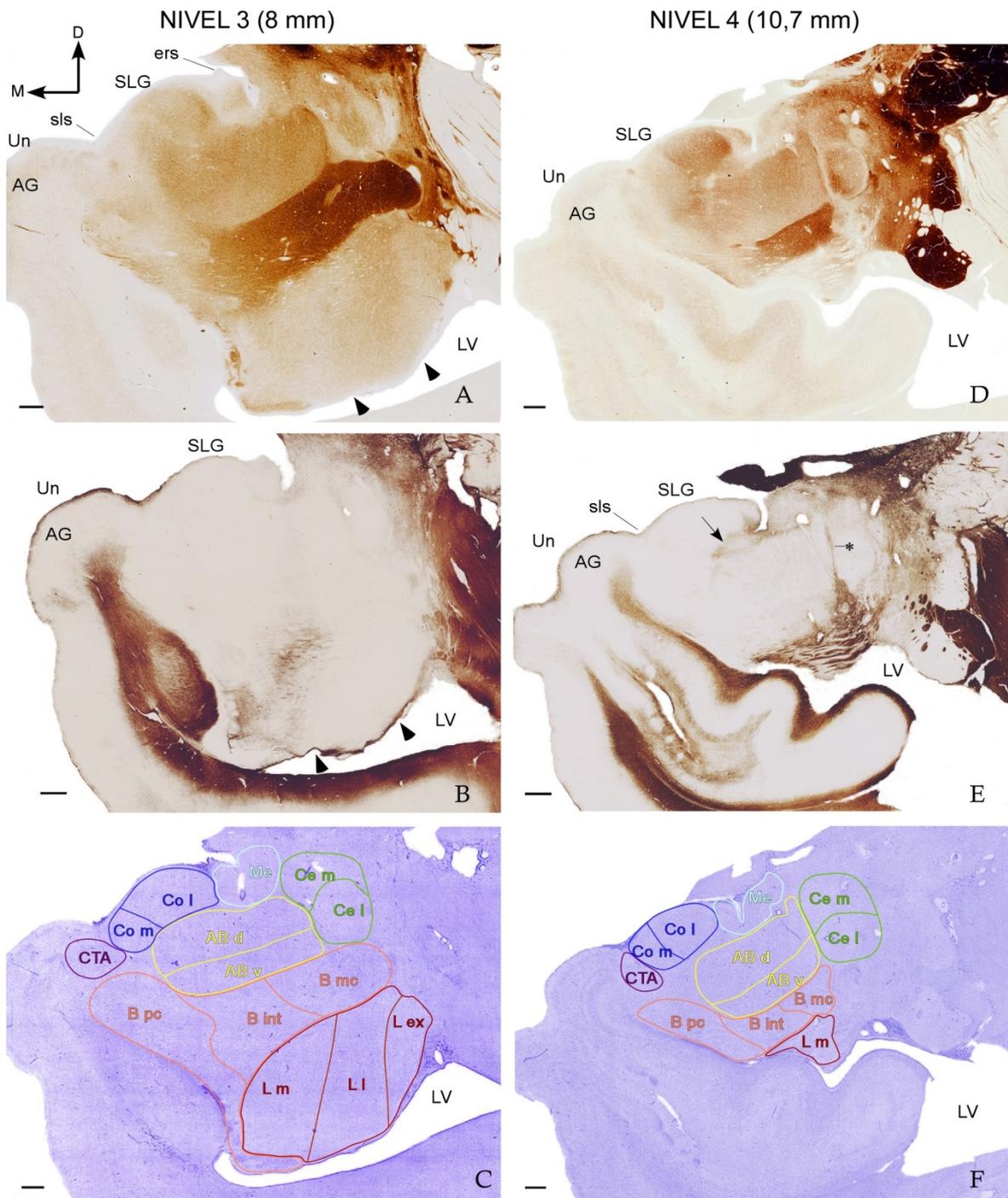


Figura 7. Delimitación regional del CA (II). Secciones coronales adyacentes teñidas para acetilcolinesterasa (A, D), Gallyas (B, E) y Nissl (C, F) en dos niveles del CA humano en secuencia anteroposterior (niveles 3 y 4). Las distancias desde cada nivel a la comisura anterior según el atlas de Mai y cols. (2004) están indicadas en la parte superior de la figura. Los núcleos y subdivisiones nucleares del CA, detallados en la Tabla 7, han sido delimitados sobre las secciones teñidas con Nissl. Las puntas de flecha en A y B indican los límites entre las subdivisiones externa, lateral y medial del núcleo lateral. La flecha en E indica el límite entre el núcleo accesorio basal y el grupo corticomedial. El asterisco en E indica el límite entre los núcleos accesorio basal y central. Abreviaturas: AG, giro ambiens; D, dorsal; ers: surco

endorrinal; LV, ventrículo lateral; M, medial; SLG, giro semilunar; sls, surco semilunar (semianular), Un, uncus. Para otras abreviaturas véase la Tabla 7 o la lista de abreviaturas. Barra de calibración: 1 mm.

4.2. Número de neuronas, células de glía y endoteliales

El contaje del número absoluto de neuronas, glía y endoteliales se realizó en secciones de Nissl, diferenciando cada población celular tal y como se ha detallado en el apartado 3.3.2.2. *Estimación del número de células con el fraccionador óptico*. Antes de acometer el contaje de células en las secciones de Nissl, y con el fin de asegurar que la diferenciación entre neuronas y glía era correcta (por su morfología las células endoteliales se distinguen fácilmente de los otros dos tipos celulares; véase la Figura 5A), se realizó un contaje en dos series de secciones teñidas una de ellas con NeuN y la otra con Nissl en el caso 7 (Tabla 2). Los resultados de estos contajes se muestran en la Tabla 8. En esa Tabla también se indica el porcentaje de la diferencia del número de neuronas contado con la tinción de Nissl y NeuN y, como se puede observar, en todas las regiones del CA excepto en el complejo nuclear accesorio basal esos valores son inferiores al 10 %, lo que indica que la identificación de las neuronas con Nissl es bastante fiable.

Tabla 8. Número de neuronas estimadas en secciones del CA teñidas con Nissl y NeuN

Estructura neural	N neuronas (CE)		Diferencia Nissl-NeuN (%)
	Nissl	NeuN	
CA	11.502.303 (0,03)	11.366.732 (0,03)	+ 1 %
BL	9.555.073 (0,08)	9.430.883 (0,07)	+ 1 %
L	4.027.785 (0,08)	4.091.742 (0,07)	- 2 %
B	4.116.402 (0,07)	3.743.678 (0,05)	+ 9 %
AB	1.410.886 (0,08)	1.595.463 (0,08)	- 12 %
CM	1.247.700 (0,1)	1.153.659 (0,09)	- 4%
Co	802.531 (0,1)	734.006 (0,1)	+ 9 %
Me	445.169 (0,1)	419.653 (0,08)	+ 6 %
Ce	743.999 (0,1)	699.646 (0,08)	+ 6 %

N: número; CE: coeficiente de error. Para otras abreviaturas véase la Tabla 7 o la lista de abreviaturas.

Los valores correspondientes a la media, desviación estándar y coeficiente de error del número de neuronas, células de glía y endoteliales en el CA completo, sus grupos nucleares, núcleos y subdivisiones nucleares se muestran en la Tabla 9. La

cantidad media de neuronas, células de glía y endoteliales ($\times 10^6$) en el CA completo es de $15,39 \pm 3,50$, $60,01 \pm 12,04$, y $16,81 \pm 8,58$, respectivamente. El número de neuronas constituye alrededor de un cuarto del número de células de glía en el CA completo y en sus grupos nucleares, de tal forma que hay cuatro veces más células de glía que neuronas en el CA. El número de células endoteliales es muy similar al de neuronas en cada región del CA estudiada. Del total de células del CA, los porcentajes de neuronas, glía y células endoteliales son un 16 %, 65 % y 17 %, respectivamente, y esos porcentajes se mantienen aproximadamente en cada grupo nuclear, núcleo y subdivisión nuclear del CA.

Tabla 9. Número de neuronas, células de glía y endoteliales en los grupos nucleares, núcleos y subdivisiones nucleares del CA

Estructura neural	N neuronas ($\times 10^6$)			N glía ($\times 10^6$)			N células endoteliales ($\times 10^6$)			N células totales ($\times 10^6$)		
	Media	DT	CE	Media	DT	CE	Media	DT	CE	Media	DT	CE
CA	15,39	3,50	0,03	60,01	12,04	0,02	16,81	8,58	0,03	92,20	17,64	0,03
BL	12,23	2,64	0,07	49,83	10,72	0,04	13,63	7,76	0,07	75,69	15,66	0,06
L	5,48	1,58	0,07	26,17	5,30	0,03	6,93	5,11	0,06	38,58	8,72	0,06
Lex	1,39	0,64	0,13	8,36	2,10	0,06	1,86	1,23	0,14	11,61	4,41	0,11
LI	1,72	0,54	0,12	8,60	1,13	0,05	2,49	1,87	0,11	12,81	2,37	0,10
Lm	2,05	0,64	0,11	8,08	2,10	0,05	2,16	1,23	0,11	12,29	2,70	0,09
Ld	0,34	0,11	0,13	1,40	0,32	0,07	0,39	0,24	0,13	2,14	0,53	0,11
B	5,02	0,98	0,06	16,64	4,53	0,03	4,11	2,11	0,07	25,69	6,14	0,06
Bpc	3,04	0,52	0,08	6,51	1,82	0,05	1,45	0,66	0,12	10,99	2,43	0,09
 Bint	1,30	0,36	0,12	5,80	1,88	0,06	1,48	0,93	0,13	8,58	2,52	0,11
Bmc	0,66	0,22	0,17	4,32	1,20	0,07	1,18	0,63	0,14	6,17	1,68	0,13
AB	1,73	0,39	0,09	7,02	1,62	0,05	2,49	0,90	0,08	11,24	2,21	0,07
Abd	0,83	0,15	0,13	3,69	1,09	0,06	1,30	0,54	0,11	5,83	1,39	0,11
Abv	0,90	0,28	0,13	3,33	0,68	0,07	1,19	0,47	0,12	5,42	1,10	0,11
CM	1,64	0,54	0,11	4,64	1,00	0,07	1,74	0,54	0,09	8,02	1,55	0,09
Co	1,14	0,43	0,10	3,18	0,64	0,06	1,37	0,39	0,09	5,70	1,09	0,08
Col	0,77	0,27	0,12	2,23	0,49	0,07	0,05	0,01	0,09	3,95	0,84	0,09
Com	0,37	0,17	0,17	0,96	0,21	0,10	0,04	0,01	0,17	1,74	0,36	0,15
Me	0,50	0,12	0,12	1,45	0,52	0,08	0,37	0,20	0,16	2,32	0,70	0,13
Ce	0,82	0,25	0,10	3,34	0,78	0,06	0,89	0,35	0,10	5,05	1,12	0,09
Cem	0,39	0,06	0,15	1,69	0,40	0,08	0,47	0,22	0,14	2,55	0,47	0,13
Cel	0,43	0,20	0,15	1,65	0,41	0,08	0,42	0,15	0,15	2,50	0,68	0,13
PA	0,37	0,22	0,16	1,46	0,51	0,08	0,28	0,19	0,20	2,11	0,86	0,16
CTA	0,33	0,14	0,17	0,72	0,22	0,12	0,28	0,13	0,19	1,32	0,38	0,16

N: número; DT: desviación típica; CE: coeficiente de error. Para otras abreviaturas véase la Tabla 7 o la lista de abreviaturas.

En la Figura 8 se muestran los números de neuronas, glía y células endoteliales obtenidos en cada uno de los siete casos estudiados en este trabajo con el fin de ilustrar la gran variabilidad observada. El efecto de la edad de fallecimiento de los donantes del tejido en estos resultados se describirá en el apartado 4.4 de los Resultados.

4.3. Densidad de neuronas, glía y células endoteliales del CA

La densidad de cada tipo celular (neuronas, glía y endoteliales) se estimó en cada región del CA con la ratio del número absoluto de células y el volumen de esa región estimado por el método de Cavalieri. A continuación se muestran los resultados de las estimaciones del volumen de cada región amigdalina, que luego fueron usados para calcular las densidades celulares.

4.3.1. Volumen regional

Los valores medios del volumen del CA completo y de sus grupos nucleares, núcleos y subdivisiones nucleares estimados en los 7 casos analizados se muestran en la Tabla 10. En esta tabla también se especifica la desviación estándar y el coeficiente de error de estas estimaciones. El grupo basolateral ocupa casi un 80 % del volumen total del CA, mientras que los grupos corticomédial y central en conjunto ocupan solamente el 16 %. Dentro del enorme grupo basolateral (cuyo volumen medio es de 759 mm³), el núcleo lateral es el que tiene un mayor volumen, disminuyendo progresivamente en los núcleos basal y accesorio basal, teniendo este último un tercio del volumen del núcleo lateral. En el caso del grupo nuclear corticomédial (cuyo volumen medio es de 94 mm³), el núcleo cortical ocupa casi el 70 % de su volumen, siendo la subdivisión lateral del núcleo cortical el doble de grande que la subdivisión medial. El volumen del grupo central (60 mm³) se reparte en proporciones iguales entre sus subdivisiones medial y lateral.

La Figura 9 muestra los valores de volumen de cada territorio del CA estimados en cada uno de los 7 casos incluidos en este estudio, y el efecto de la edad de fallecimiento de los donantes en las estimaciones del volumen se describen en el apartado 4.4 de los Resultados.

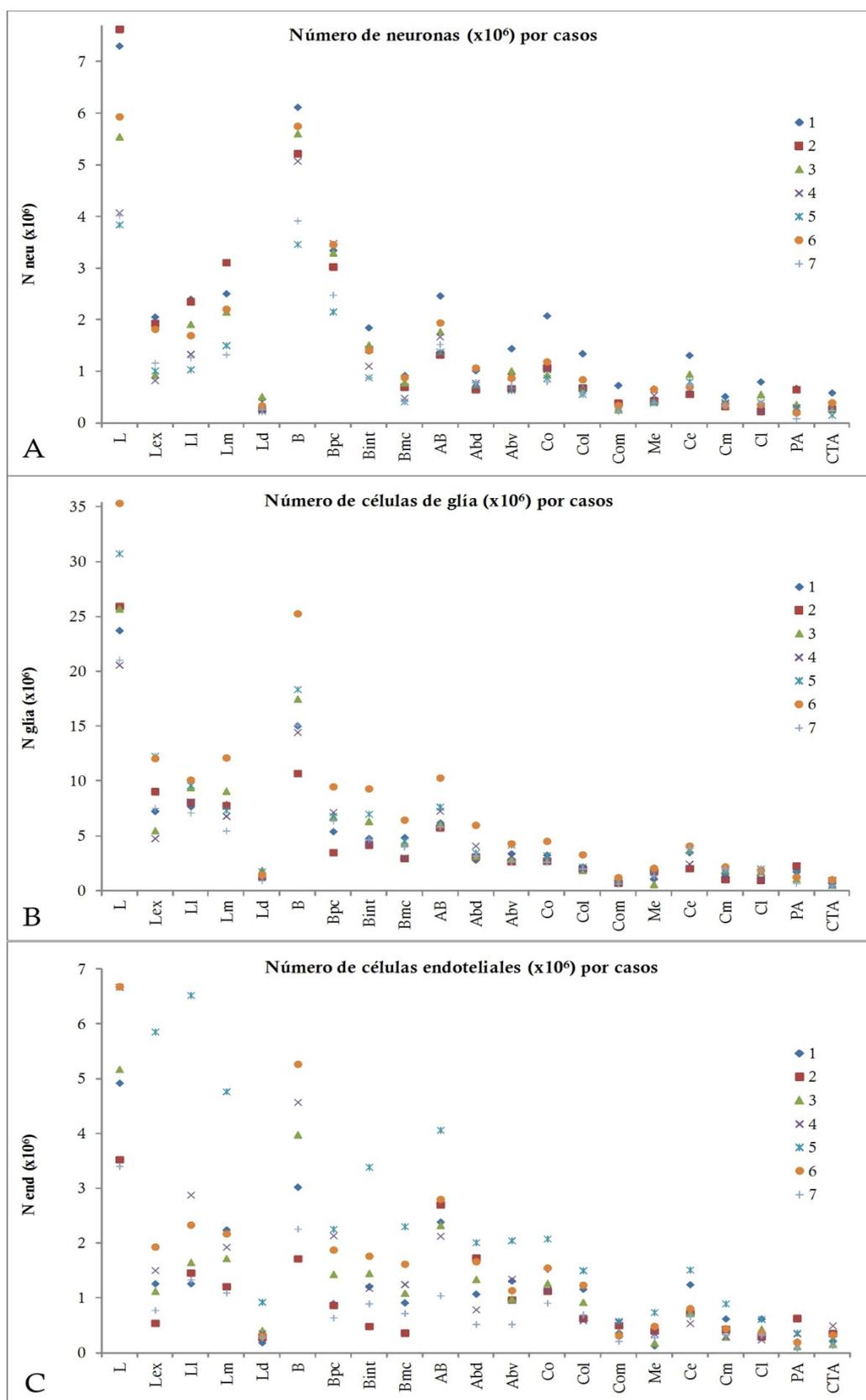


Figura 8. Número de neuronas (A), glía (B) y células endoteliales (C) en los núcleos y subdivisiones nucleares del CA de los 7 casos analizados. Para las abreviaturas de las estructuras véase la Tabla 7 o la lista de abreviaturas.

Tabla 10. Volumen del CA, sus grupos nucleares, núcleos y subdivisiones nucleares

Estructura neural	Volumen (mm ³)		
	Media	DT	CE
CA	956	149	0,01
BL	759	111	0,02
L	376	68	0,01
Lex	97	24	0,02
LI	128	16	0,02
Lm	132	24	0,03
Ld	24	7	0,06
B	259	40	0,02
Bpc	110	22	0,03
Bint	89	13	0,03
Bmc	60	10	0,04
AB	123	21	0,02
Abd	63	14	0,04
Abv	61	8	0,04
CM	94	17	0,05
Co	69	13	0,03
Col	49	9	0,04
Com	22	4	0,07
Me	28	5	0,05
Ce	60	8	0,04
Cem	30	6	0,05
Cel	29	4	0,05
PA	21	9	0,06
CTA	20	14	0,08

DT: desviación típica; CE: coeficiente de error. Para otras abreviaturas véase la Tabla 7 o la lista de abreviaturas.

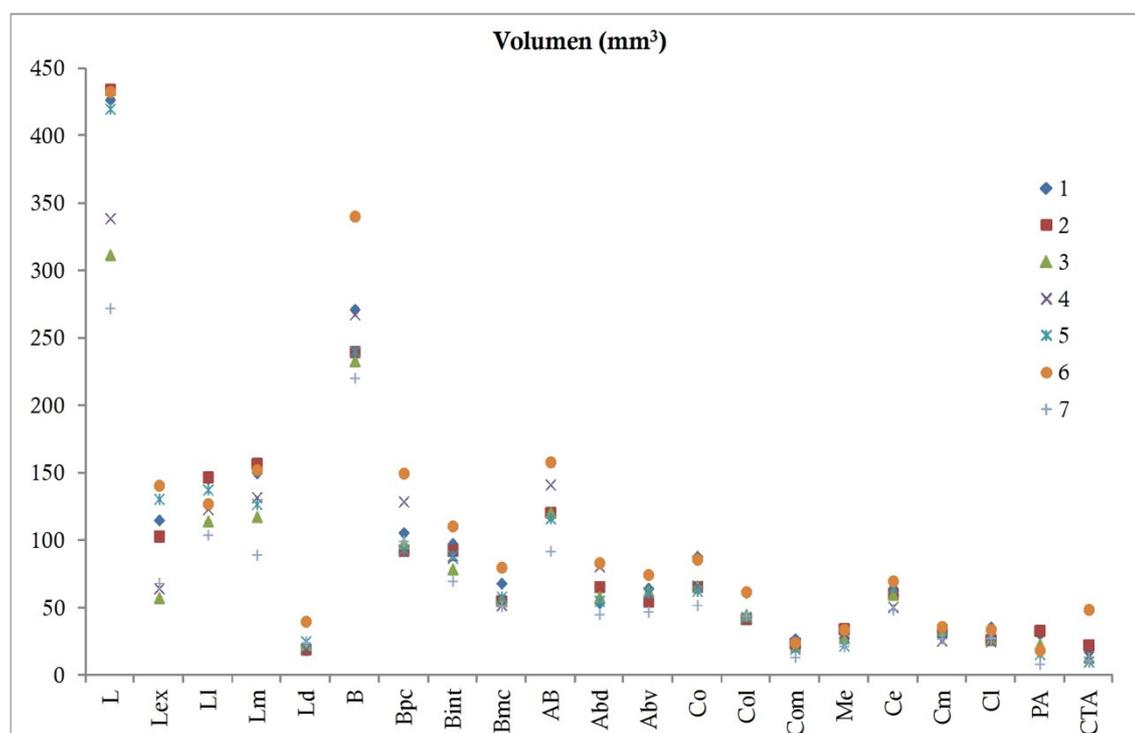


Figura 9. Volumen (mm³) de los núcleos y subdivisiones nucleares del CA de los 7 casos analizados. Para las abreviaturas de las estructuras véase la Tabla 7 o la lista de abreviaturas.

4.3.2. Densidad celular

Los valores de la media, desviación típica y coeficiente de error de la densidad de neuronas, glía, células endoteliales y células totales en el CA completo, sus grupos nucleares, núcleos y subdivisiones nucleares se muestran en la Tabla 11 y se representan gráficamente en la Figura 10. La densidad media de neuronas, glía y células endoteliales ($\times 10^3$) en el CA completo es de $16,09 \pm 2,84$, $62,79 \pm 8,85$ y $17,60 \pm 8,82$, respectivamente. La densidad de neuronas es bastante uniforme en todas las regiones del CA (Fig. 10A, B), excepto en la subdivisión parvocelular del núcleo basal donde la densidad es muy alta debido al pequeño tamaño de las neuronas en esta región (Fig. 10B). La densidad de células endoteliales también se mantiene bastante homogénea en todas las regiones del CA (Fig. 10); a diferencia de la densidad de células de glía, que es notablemente mayor en regiones laterales del CA como la subdivisión externa del núcleo lateral o el área periamigdalina (Fig. 10A). Este aumento en la densidad de glía probablemente se debe al gran número de fibras miélicas que atraviesan estas regiones del CA.

Tabla 11. Densidad de neuronas, células de glía y endoteliales en los grupos nucleares, núcleos y subdivisiones nucleares del CA

Estructura neural	Nv neuronas (x 1000) (cells/mm3)		Nv glía (x 1000) (cells/mm3)		Nv endoteliales (x 1000) (cells/mm3)		Nv células totales (x 1000) (cells/mm3)	
	Media	DT	Media	DT	Media	DT	Media	DT
CA	16,09	2,84	62,79	8,85	17,60	8,82	96,80	13,33
BL	16,36	3,19	65,81	10,16	17,87	9,68	99,87	14,92
L	14,61	3,23	70,16	11,21	18,46	11,52	102,93	16,00
Lex	14,49	3,22	85,26	12,55	18,86	9,50	120,64	19,14
LI	13,28	3,44	67,53	11,24	19,59	13,26	100,47	17,52
Lm	15,20	3,22	60,75	12,55	16,85	9,50	93,48	14,91
Ld	15,23	6,63	61,07	17,24	16,76	9,80	93,06	27,01
B	19,51	3,44	64,13	12,61	16,15	8,32	99,16	17,51
Bpc	28,20	4,49	59,26	12,03	13,35	5,85	100,54	14,26
Bint	14,62	3,47	64,96	16,83	17,01	10,23	96,21	23,52
Bmc	10,93	2,65	71,37	10,99	19,98	10,33	101,93	16,82
AB	14,18	3,50	56,73	7,81	20,16	7,46	91,07	11,49
Abd	13,65	3,51	58,68	9,87	21,07	9,08	93,40	14,10
Abv	14,80	4,02	54,75	7,27	19,41	7,19	88,95	11,99
CM	16,75	3,80	47,35	8,89	17,99	6,86	85,97	11,11
Co	16,21	4,06	45,41	5,47	19,73	6,09	82,24	8,21
Col	15,53	3,17	45,94	5,84	19,83	7,13	81,30	8,72
Com	16,99	4,81	44,73	7,82	19,08	6,21	80,80	9,84
Me	16,80	3,67	52,67	21,08	13,63	9,52	84,15	30,15
Ce	13,71	3,85	56,40	13,89	14,68	4,76	84,83	17,57
Cem	13,17	3,34	58,05	20,53	15,64	6,14	82,30	15,01
Cel	14,43	5,37	55,83	11,15	13,89	4,03	84,41	17,71
PA	16,73	4,32	81,03	17,81	14,09	7,16	106,07	29,20
CTA	17,79	7,25	40,60	15,22	16,19	11,24	77,96	22,73

Nv: número por volumen (densidad); DT: desviación típica. Para otras abreviaturas véase la Tabla 7 o la lista de abreviaturas.

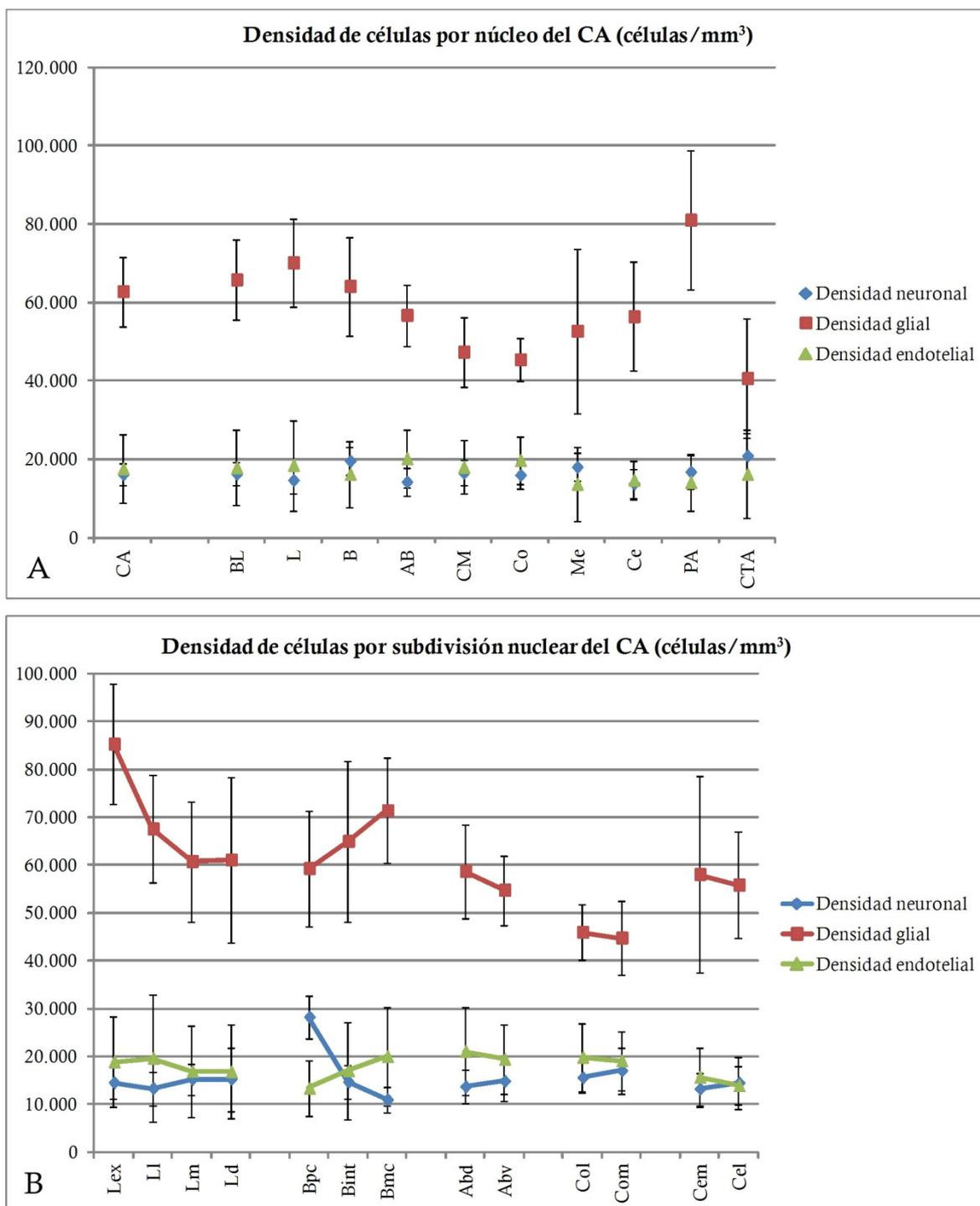


Figura 10. Densidad de neuronas, glía y células endoteliales (células/mm³). **A.** Media y desviación típica de la densidad de neuronas (azul), glía (rojo) y células endoteliales (verde) en el CA completo y en sus grupos nucleares y núcleos. **B.** Media y desviación típica de la densidad de neuronas (azul), glía (rojo) y células endoteliales (verde) en las subdivisiones nucleares del CA. Para las abreviaturas de las regiones del CA véase la Tabla 7.

4.4. Correlación de la edad de fallecimiento de los donantes con el volumen regional y con el número y densidad celular en el CA

Los coeficientes de correlación (*rho* de Spearman) de la edad de fallecimiento de los donantes del tejido con cada una de las estimaciones estereológicas realizadas en cada región del CA se muestran en la Tabla 12. El volumen del CA total o de cualquiera de sus grupos nucleares, núcleos y subdivisiones nucleares no se correlaciona con la edad de fallecimiento de los individuos; la mayor correlación positiva se obtuvo en el núcleo accesorio basal, pero ésta no llegó a ser estadísticamente significativa (véase la Tabla 12).

Los coeficientes de correlación entre el número de neuronas y la edad de fallecimiento de los individuos fueron negativos, en todas las regiones del CA excepto en la subdivisión parvocelular del núcleo basal, en la que el coeficiente resultó positivo (Tabla 12); los valores de correlación fueron moderados y altos y no alcanzaron en ningún caso la significación estadística. En la Figura 10A se representa gráficamente la correlación y las líneas de regresión lineal obtenidas en el CA completo y en el grupo basolateral. Los coeficientes de correlación entre el número de células de glía y la edad son positivos y moderados en la mayoría de los territorios del CA, y en la subdivisión dorsal del núcleo accesorio basal esta correlación fue estadísticamente significativa (Tabla 12). El número de células endoteliales muestra altos coeficientes de correlación positivos con la edad en la mayoría de las regiones del CA, y en el CA completo, el grupo basolateral, el núcleo lateral (y específicamente en sus subdivisiones lateral y dorsal) y en la subdivisión parvocelular del núcleo basal las correlaciones fueron estadísticamente significativas (véase la Tabla 12 y la Fig. 11B). Estos resultados en su conjunto indican que el número de células endoteliales en el CA aumenta substancialmente durante el envejecimiento (Fig. 11B), y que los números de neuronas (Fig. 11A) y de glía muestran una tendencia moderada a disminuir y a aumentar, respectivamente. Los coeficientes de correlación entre el número total de células y la edad de fallecimiento de los individuos fueron positivos en la mayoría de las regiones del CA y en la subdivisión dorsal del núcleo accesorio basal esta correlación es estadísticamente significativa ($p < 0.05$) (véase la Tabla 12).

La densidad neuronal muestra una correlación negativa con la edad de fallecimiento de los donantes que fue estadísticamente significativa en el CA completo (Fig. 11C), el grupo basolateral (Fig. 11C) y la subdivisión externa del núcleo lateral; en el resto de regiones del CA las correlaciones obtenidas están muy próximas a la significación estadística. La densidad de glía no alcanzó la significación estadística en ninguna región del CA. Sin embargo, la densidad de células endoteliales en la mayoría

de las regiones del CA muestra altos coeficientes de correlación positivos (Fig. 11D) que en el núcleo lateral (subdivisión lateral), el núcleo basal (subdivisiones parvocelular y magnocelular) y el grupo corticomedia del CA alcanzaron la significación estadística. Finalmente, los coeficientes de correlación entre la densidad de células totales y la edad de fallecimiento de los individuos son positivos en todos los territorios del CA excepto en el núcleo central, pero ninguno alcanzó la significación estadística.

Tabla 12. Coeficientes de correlación de cada variable estudiada con la edad de fallecimiento de los donantes para cada grupo nuclear, núcleo y subdivisión nuclear del CA

Estructura neural	Volumen	N neuronas	N glía	N células endoteliales	N células totales	Nv neuronas	Nv glía	Nv endoteliales	Nv células totales
CA	0,02	-0,51	0,38	0,76*	0,29	-0,78*	0,34	0,72	0,38
BL	0,02	-0,51	0,25	0,76*	0,38	-0,85*	0,31	0,72	0,38
L	0,05	-0,41	0,16	0,76*	0,38	-0,67	0,20	0,76*	0,47
Lex	0,05	-0,69	0,09	0,61	0,05	-0,76*	-0,11	0,65	0,18
LI	-0,05	-0,56	0,69	0,96**	0,72	-0,65	0,34	0,85*	0,65
Lm	0,09	-0,27	-0,19	0,31	0,25	-0,60	0,09	0,14	0,04
Ld	0,37	-0,29	0,58	0,78*	0,36	-0,43	0,04	0,60	0,04
B	0,23	-0,45	0,18	0,70	0,32	-0,51	0,16	0,76*	0,38
Bpc	0,14	0,32	0,74	0,83*	0,61	-0,38	0,27	0,87*	0,63
Bint	0,02	-0,41	0,14	0,36	0,32	-0,69	0,31	0,38	0,16
Bmc	-0,02	-0,45	-0,13	0,70	0,05	-0,47	-0,02	0,81*	0,22
AB	0,49	-0,29	0,58	0,29	0,63	-0,69	0,20	0,04	-0,09
Abd	0,67	-0,25	0,78*	0,32	0,81*	-0,72	-0,02	-0,05	-0,05
Abv	0,02	-0,36	0,41	0,60	0,45	-0,70	0,20	0,49	0,27
CM	0,05	-0,54	0,32	0,32	0,23	-0,14	0,38	0,76*	0,16
Co	-0,12	-0,18	0,23	0,32	0,23	-0,43	0,56	0,36	0,20
Col	-0,35	-0,32	-0,18	-0,04	-0,20	-0,22	0,67	0,00	0,38
Com	-0,18	-0,07	0,11	0,58	0,20	-0,63	0,38	0,60	0,38
Me	0,22	-0,20	0,40	0,70	0,58	-0,34	0,27	0,47	0,27
Ce	0,16	-0,49	-0,02	-0,13	-0,23	-0,56	-0,27	-0,45	-0,56
Cem	0,16	-0,14	-0,11	-0,05	0,04	-0,51	-0,36	-0,27	-0,51
Cel	-0,45	-0,49	-0,11	-0,41	-0,29	-0,63	-0,14	-0,40	-0,18
PA	-0,35	-0,31	0,02	0,41	0,02	-0,07	0,69	0,74	0,65
CTA	-0,09	-0,20	0,05	0,69	-0,04	-0,25	0,52	0,70	0,36

*N: número; Nv: densidad. Para otras abreviaturas véase la Tabla 7 o la lista de abreviaturas. * Coeficientes de correlación significativos ($p < 0.05$) y ** muy significativos ($p < 0.01$).*

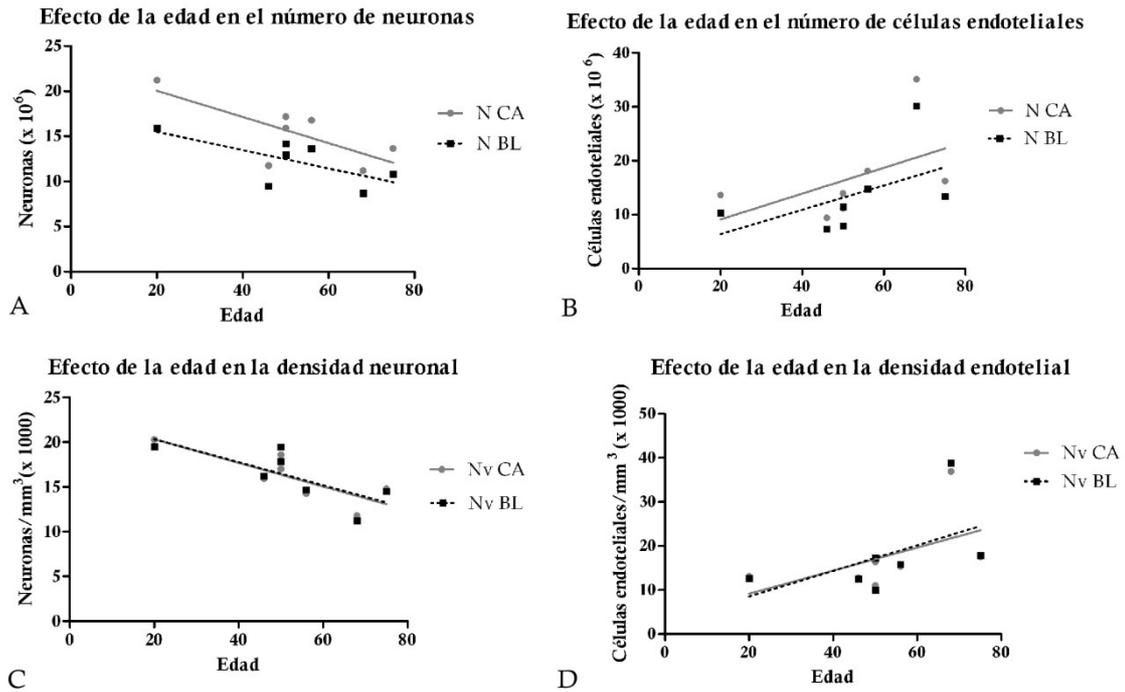


Figura 11. Efecto de la edad de fallecimiento de los donantes en el número y densidad de neuronas y de células endoteliales. A-D. Representación gráfica de la correlación (líneas de regresión lineal) en el CA en su conjunto (línea continua gris) y en el complejo basolateral (BL) (línea discontinua negra) entre la edad de fallecimiento y: (A) el número de neuronas (N), (B) el número de células endoteliales (N), (C) la densidad de neuronas (Nv) y (D) la densidad de células endoteliales (Nv).

Con el fin de comprobar que las correlaciones entre la densidad de neuronas y células endoteliales y la edad de fallecimiento de los donantes que resultaron estadísticamente significativas no estuvieran forzadas por los casos 1 (20 años) y 5 (68 años; Tabla 2), cuyos valores se alejaban mucho de la media de la muestra (véase la Figura 11C para ver la desviación del caso 1 en el número de neuronas y la 11D para ver la desviación del caso 5 en el número de células endoteliales), los análisis de correlación del número y densidad de neuronas se repitieron excluyendo el caso 1 (Fig. 12A, C), y los del número y densidad de células endoteliales excluyendo el caso 5 (Fig. 12B, D). Los resultados de este análisis demostraron que las tendencias de correlación positiva o negativa observadas con el conjunto de los siete casos se seguían apreciando aún excluyendo esos dos casos (Fig. 12).

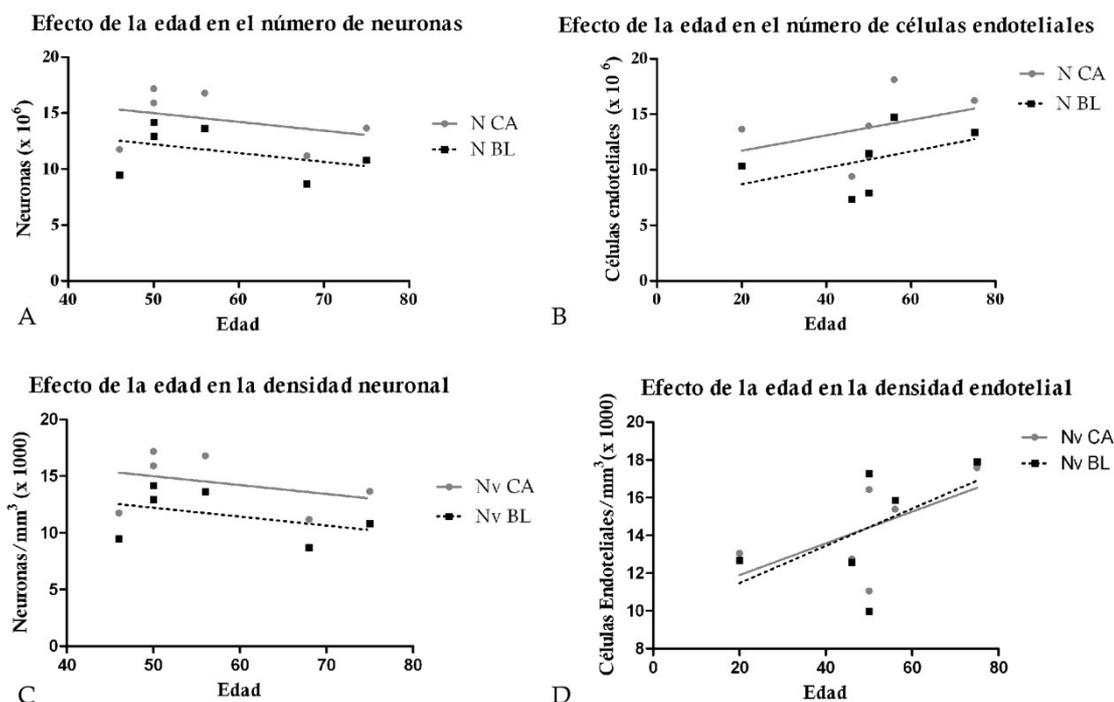


Figura 12. Efecto de la edad de fallecimiento de los donantes en el número y densidad de neuronas y células endoteliales excluyendo los casos 1 y 5. A-D. Representación gráfica de la correlación (líneas de regresión lineal) en el CA (línea continua gris) y en el complejo basolateral (BL) (línea discontinua negra) entre la edad de fallecimiento y: (A) el número de neuronas (N) excluyendo del análisis el caso 1, (B) el número de células endoteliales (N) excluyendo del análisis el caso 5, (C) la densidad de neuronas (Nv) excluyendo del análisis el caso 1 y (D) la densidad de células endoteliales (Nv) excluyendo del análisis el caso 5.

4.5. Estimación del número, densidad y porcentaje con respecto al total de neuronas, de las IN PV+ del CA

El estudio cuantitativo de las IN del CA, tanto el de las PV+ como el de las CR+, se realizó en los casos 4, 6 y 7 (Tabla 2). La media, desviación típica y el coeficiente de error (*CE*) del número absoluto de IN PV+, así como la media y la desviación típica de la densidad de IN PV+ y del porcentaje que esta población de IN representa con respecto a las neuronas totales del CA se muestran en la Tabla 13; el *CE* debido al conteo afecta tanto al número como a la densidad y al porcentaje con respecto a las neuronas totales de las IN PV+. El número de IN PV+ contabilizado en cada uno de los tres casos analizados se representa gráficamente en la Figura 13. Las Figuras 14 y 15 muestran la densidad de IN PV+ y el porcentaje de éstas con respecto a las neuronas totales, respectivamente.

Tabla 13. Número (N_{PV+}), densidad (N_{VPV+}) y porcentaje con respecto a las neuronas totales ($\% IN_{PV+} / N_{neu}$) de las IN PV+ del CA

Estructura neural	N_{PV+}			N_{VPV+}		$\% IN_{PV+} / N_{neu}$	
	Media	DT	CE	Media	DT	Media	DT
CA	34.746	10.158	0,08	37,15	14,95	0,26	0,10
BL	34.366	9.599	0,08	45,74	18,47	0,32	0,12
L	26.166	4.502	0,09	71,06	25,21	0,59	0,20
Lex	7.336	600	0,16	85,51	27,90	0,63	0,20
LI	4.396	2.538	0,13	112,67	49,12	0,94	0,43
Lm	3.156	1.822	0,21	44,30	24,28	0,29	0,14
Ld	280	130	0,9	16,49	6,04	0,09	0,04
B	6.786	6.061	0,2	25,77	22,81	0,14	0,12
Bpc	893	1.272	0,83	6,94	9,88	0,03	0,04
Bint	2.886	3.265	0,35	33,58	37,51	0,26	0,29
Bmc	3.010	1.613	0,27	54,90	36,09	0,60	0,40
AB	1.790	1.034	0,52	10,38	12,39	0,08	0,11
Abd	375	244	0,74	5,52	2,91	0,05	0,03
Abv	1.039	1.551	0,83	17,09	25,63	0,12	0,17
CM	-	-	-	-	-	-	-
Co	380	659	0,45	5,74	9,95	0,04	0,06
Col	913	304	0,5	7,06	12,22	0,04	0,08
Com	228	76	1	5,68	9,85	0,02	0,04
Me	0	-	-	-	-	-	-
Ce	0	-	-	-	-	-	-
Cem	0	-	-	-	-	-	-
Cel	0	-	-	-	-	-	-
PA	0	-	-	-	-	-	-
CTA	0	-	-	-	-	-	-

N, número; *N_v*, densidad; *DT*: desviación típica; *CE*: coeficiente de error. Para otras abreviaturas véase la Tabla 7 o la lista de abreviaturas.

Las IN PV+ se restringen prácticamente al grupo basolateral, ya que fuera de éste solamente se han visto algunas neuronas de este tipo en el núcleo cortical (y éstas se observaron exclusivamente en uno de los tres casos analizados) (Tabla 13; Fig. 13). Dentro del grupo basolateral, la mayoría de las IN PV+ se encuentran en el núcleo lateral (75 %), mientras que el núcleo basal y el accesorio basal contienen sólo el 20 y el 5 %, respectivamente; estos datos deben interpretarse teniendo en cuenta que el núcleo lateral es el que ocupa el mayor volumen del grupo basolateral.

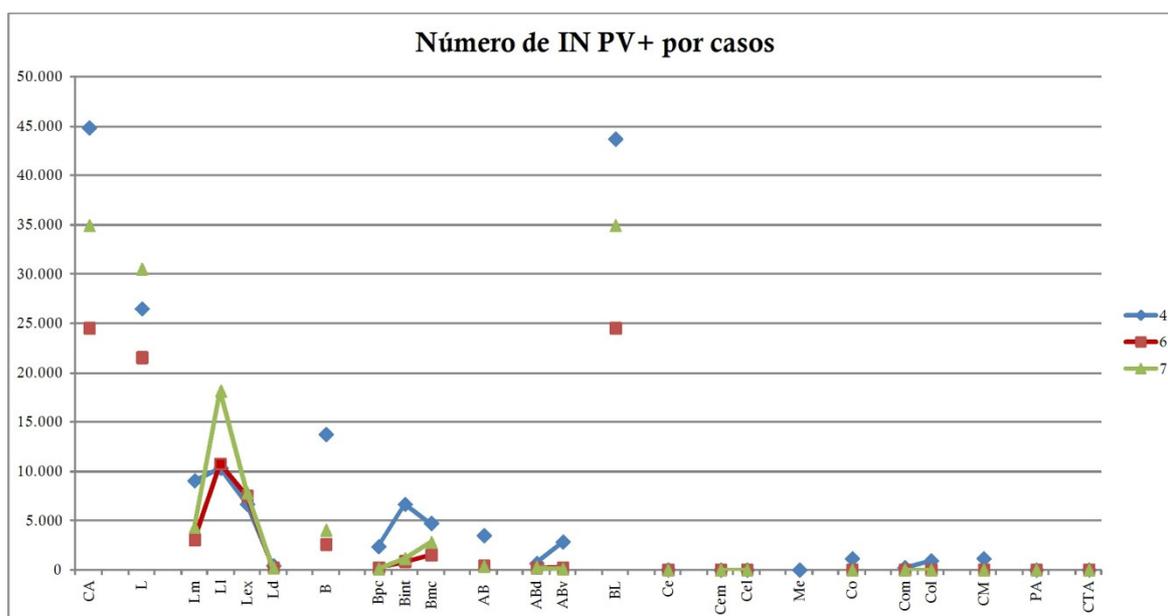


Figura 13. Número de IN PV+ en el CA completo y en el grupo basolateral de los tres casos utilizados en este estudio. Nótese cómo la mayoría de IN PV+ del CA se encuentran en el grupo basolateral y solamente en el caso 4 se encontraron algunas IN de este tipo en el grupo corticomedial. Para las abreviaturas véase la Tabla 7 o el apartado de abreviaturas.

La densidad de IN PV+ en cada región del CA se estimó dividiendo el número absoluto de IN en esa región entre el volumen regional, permitiendo así comparar la cantidad de IN que hay en las distintas subdivisiones del CA sin tener en cuenta su volumen. Atendiendo a la densidad de las IN PV+ en los núcleos del CA, en el grupo basolateral se observa un claro gradiente decreciente en sentido lateromedial, teniendo el núcleo lateral una densidad de 71 IN/mm³ y el accesorio basal una densidad de 10 IN/mm³ (Fig. 14A). La mayor densidad de IN PV+ se observa en la subdivisión lateral del núcleo lateral (112,6 IN/mm³), seguida por las subdivisiones externa (85,5 IN/mm³), medial (44,3 IN/mm³) y dorsal (16,49 IN/mm³) de este núcleo (Fig. 14A); sin embargo, en el caso 4 se observó una mayor densidad de estas IN en la subdivisión externa que en la lateral (Fig. 14B). En los tres casos analizados el núcleo basal mostró un marcado gradiente decreciente en sentido dorsoventral (Fig. 14B), con una densidad media de 54,9 IN/mm³ en la subdivisión magnocelular y 6,9 IN/mm³ en la parvocelular (Fig. 14A). En el núcleo accesorio basal la densidad de IN PV+ es muy baja, y debido a ello, el CE del conteo resultó ser muy alto y no permitió comparar los datos de densidad obtenidos en las dos subdivisiones del núcleo.

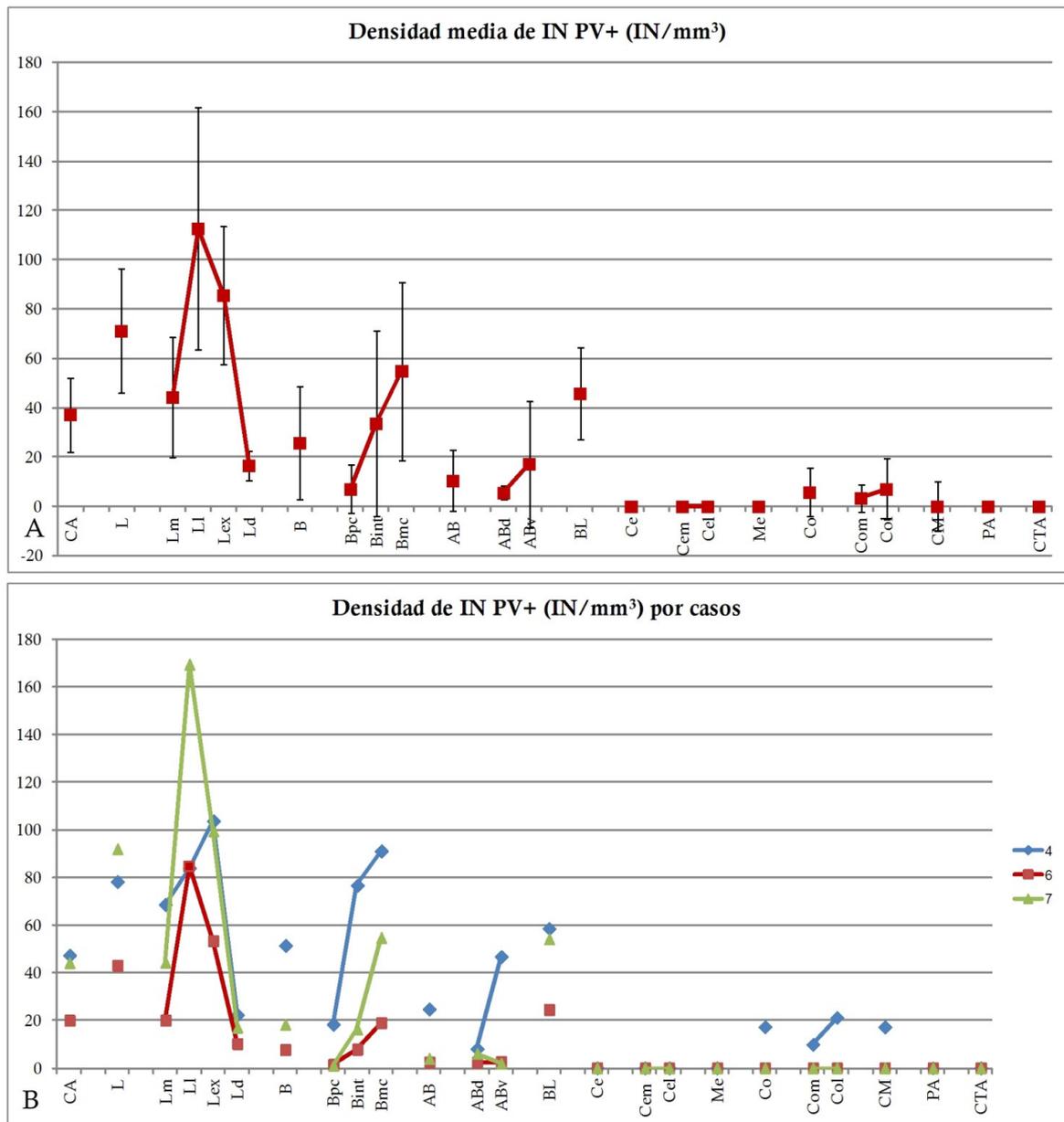


Figura 14. Densidad de IN PV+ en el CA en su conjunto y en sus grupos nucleares, núcleos y subdivisiones nucleares. A. Media y desviación típica de la densidad de IN PV+. B. Densidad de IN PV+ de los tres casos utilizados en este estudio. Para las abreviaturas véase la Tabla 7 o el apartado de abreviaturas.

El mayor porcentaje de IN PV+ con respecto a las neuronas totales del CA se observa en el núcleo lateral (0,59 %) y el menor en el núcleo cortical (0,04 %), por debajo del accesorio basal, donde las IN PV+ constituyen solamente un 0,08 % de las neuronas totales (Fig. 15). Si analizamos las variaciones de este porcentaje dentro de los distintos núcleos, en el núcleo lateral la subdivisión que mayor porcentaje presenta es la lateral (0,94 % de IN PV+/neuronas totales), seguida por las subdivisiones externa, medial y dorsal, teniendo esta última subdivisión un porcentaje de IN PV+

especialmente bajo (0,09 %). Dentro del núcleo basal se observa un gradiente decreciente en sentido dorsoventral con un porcentaje de IN PV+ de 0,60 % en la subdivisión magnocelular frente a solamente el 0,03 % en la parvocelular; este gradiente se mantuvo en los tres casos estudiados (Fig. 15B). La distribución de estos porcentajes de IN PV+ en las regiones amigdalinas fue análoga a la observada para la densidad (Figs. 14; 15), con algunas diferencias como la acentuación del gradiente decreciente dorsoventral del núcleo basal en el caso del porcentaje de IN PV+ (Figs. 14A; 15A), debida probablemente al mayor tamaño de las neuronas de la porción magnocelular del núcleo basal.

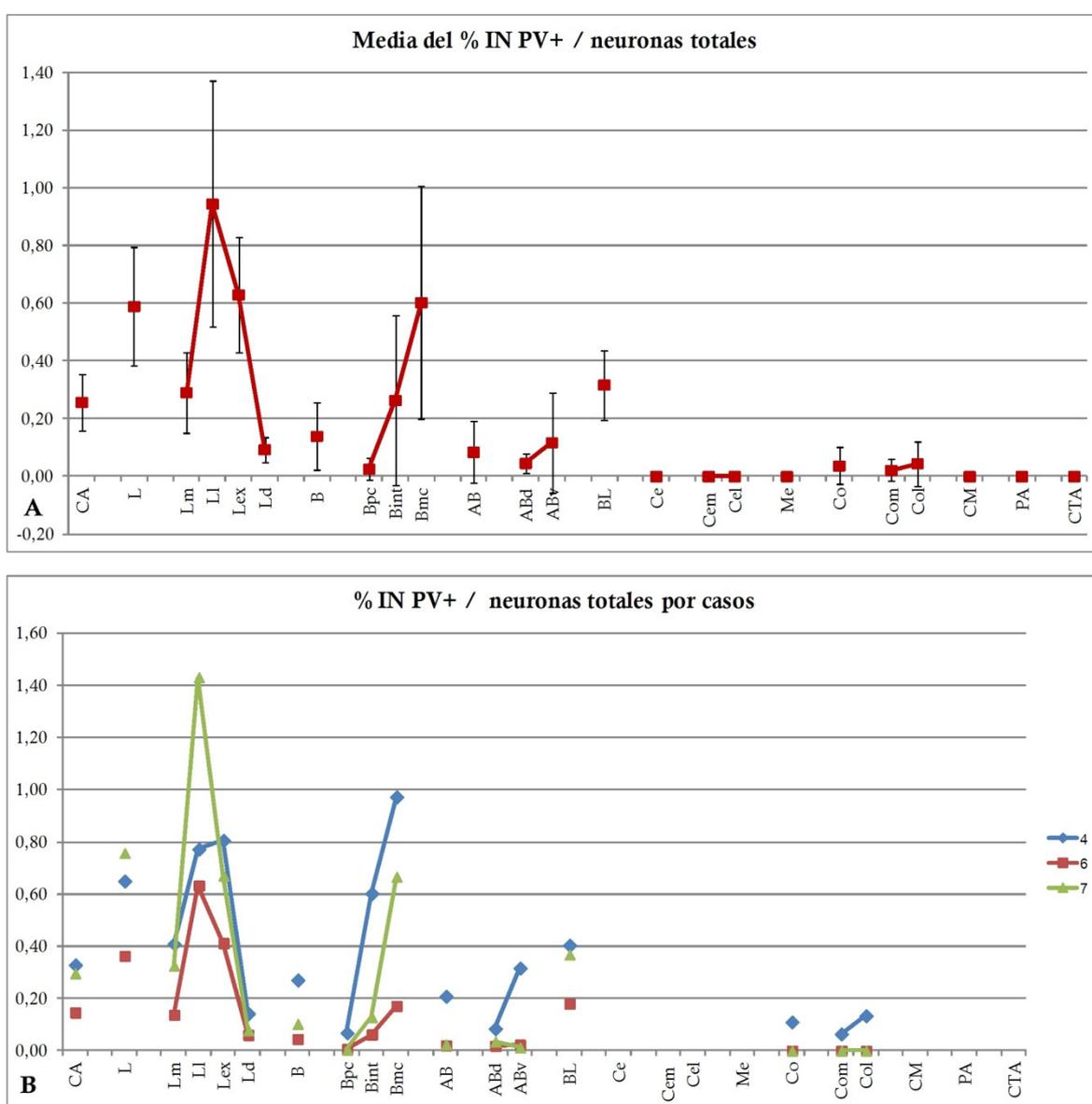


Figura 15. Porcentaje de IN PV+ con respecto a las neuronas totales en el CA en su conjunto y en sus grupos nucleares, núcleos y subdivisiones nucleares. **A.** Media y desviación típica del porcentaje de IN PV+/N neuronas. **B.** Porcentaje de IN PV+/N

neuronas de los tres casos utilizados en este estudio. Para las abreviaturas véase la Tabla 7 o el apartado de abreviaturas.

4.6. Estimación del número, densidad y porcentaje con respecto a las neuronas totales de las IN CR+ del CA

La media, desviación típica y el coeficiente de error del número absoluto de IN CR+, así como la media y la desviación típica de la densidad de IN CR+ y del porcentaje de estas IN con respecto a las neuronas totales del CA se muestran en la Tabla 14. El número de IN CR+ en cada uno de los tres casos analizados se representa gráficamente en la Figura 16, la densidad de IN CR+ en la Figura 17 y el porcentaje de éstas con respecto a las neuronas totales en la Figura 18.

Tabla 14. Número (N_{CR+}), densidad ($N_{V CR+}$) y porcentaje de IN CR+ con respecto a las neuronas totales ($\% IN_{CR+} / N_{neu}$) en el CA

Estructura neural	$N_{CR+} (x 10^3)$			$N_{V CR+}$		$\% IN_{CR+} / N_{neu}$	
	Media	DT	CE	Media	DT	Media	DT
CA	1.887	511	0,04	1988	188	13,30	1,36
BL	1.428	428	0,08	1870	211	12,47	1,40
L	688	196	0,08	1928	272	14,60	1,04
Lex	176	73	0,17	1872	27	13,87	1,09
LI	185	43	0,16	1585	571	13,37	4,78
Lm	280	118	0,14	2160	531	16,23	2,24
Ld	25	2	0,28	1627	413	8,43	0,88
B	422	164	0,08	1504	262	8,46	1,98
Bpc	146	58	0,15	1145	286	4,64	1,51
Bint	165	52	0,14	1837	162	14,41	1,30
Bmc	112	55	0,17	1772	370	18,40	1,21
AB	326	110	0,1	2463	221	18,70	4,59
Abd	192	76	0,13	2718	370	21,57	6,43
Abv	134	36	0,16	2190	258	15,82	2,89
CM	309	78	0,08	3170	655	20,34	4,80
Co	215	44	0,08	3090	342	21,51	3,61
Col	164	28	0,10	3324	281	23,82	4,14
Com	54	16	0,18	2735	729	17,44	4,41
Me	94	36	0,14	3430	1436	18,12	7,08
Ce	65	10	0,15	1212	380	9,54	2,31
Cem	32	5	0,21	1250	433	9,00	1,02
Cel	32	6	0,21	1142	373	10,15	4,65
PA	38	12	0,20	2789	502	21,12	5,86
CTA	38	4	0,19	2596	481	12,03	1,65

N, número; *N_v*, densidad; *DT*: desviación típica; *CE*: coeficiente de error. Para otras abreviaturas véase la Tabla 7 o la lista de abreviaturas.

A diferencia de la IN PV+, las IN CR+ se distribuyen ampliamente por todo el CA; además de en el grupo basolateral, se observa un gran número de estas IN en los núcleos cortical, medial, central y en las áreas periamigdalina y de transición córtico-amigdalina (Fig. 16). El número de IN CR+ es mucho mayor que el de las IN PV+ en cualquier región del CA, pudiendo haber 55 veces más neuronas CR+ que PV+ en el CA en su conjunto, 40 veces más en el grupo basolateral, 26 veces en el núcleo lateral, 62 en el núcleo basal y 180 veces en el accesorio basal.

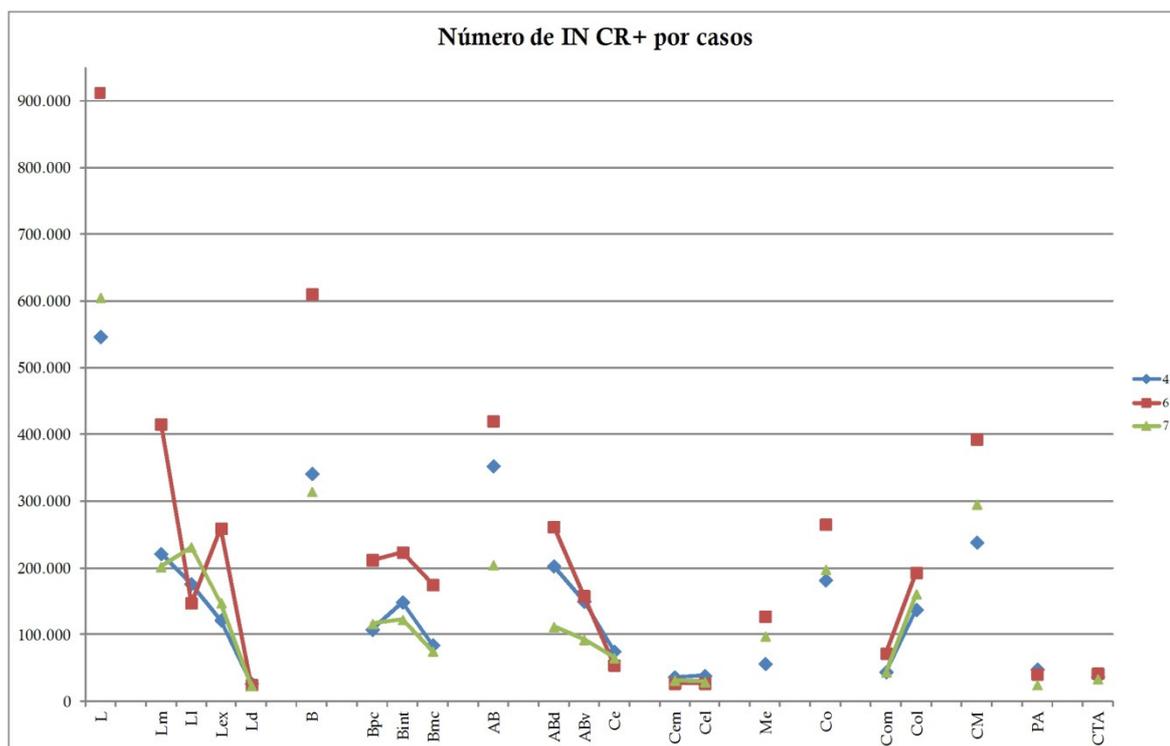


Figura 16. Número de IN CR+ en los tres casos utilizados en este estudio. Nótese la gran variabilidad en el número de IN CR+ entre los tres casos humanos analizados. Para las abreviaturas véase la Tabla 7 o el apartado de abreviaturas.

La mayor densidad de IN CR+ se encontró en el grupo corticomedial (3.170 IN/mm^3), y específicamente en el núcleo medial del mismo (3.430 IN/mm^3) (Fig. 17A). A diferencia de las IN PV+, las IN CR+ no se ajustan a ningún gradiente claro de densidad en sentido mediolateral o dorsoventral en ningún núcleo del CA (Fig. 17A, B). Dentro del núcleo basal, la subdivisión parvocelular contiene una densidad media de IN CR+ significativamente menor que las otras dos subdivisiones más dorsales, intermedia y magnocelular (1145 IN/mm^3 en la subdivisión parvocelular frente a 1837 y 1772 en las subdivisiones intermedia y magnocelular) (Fig. 17A).

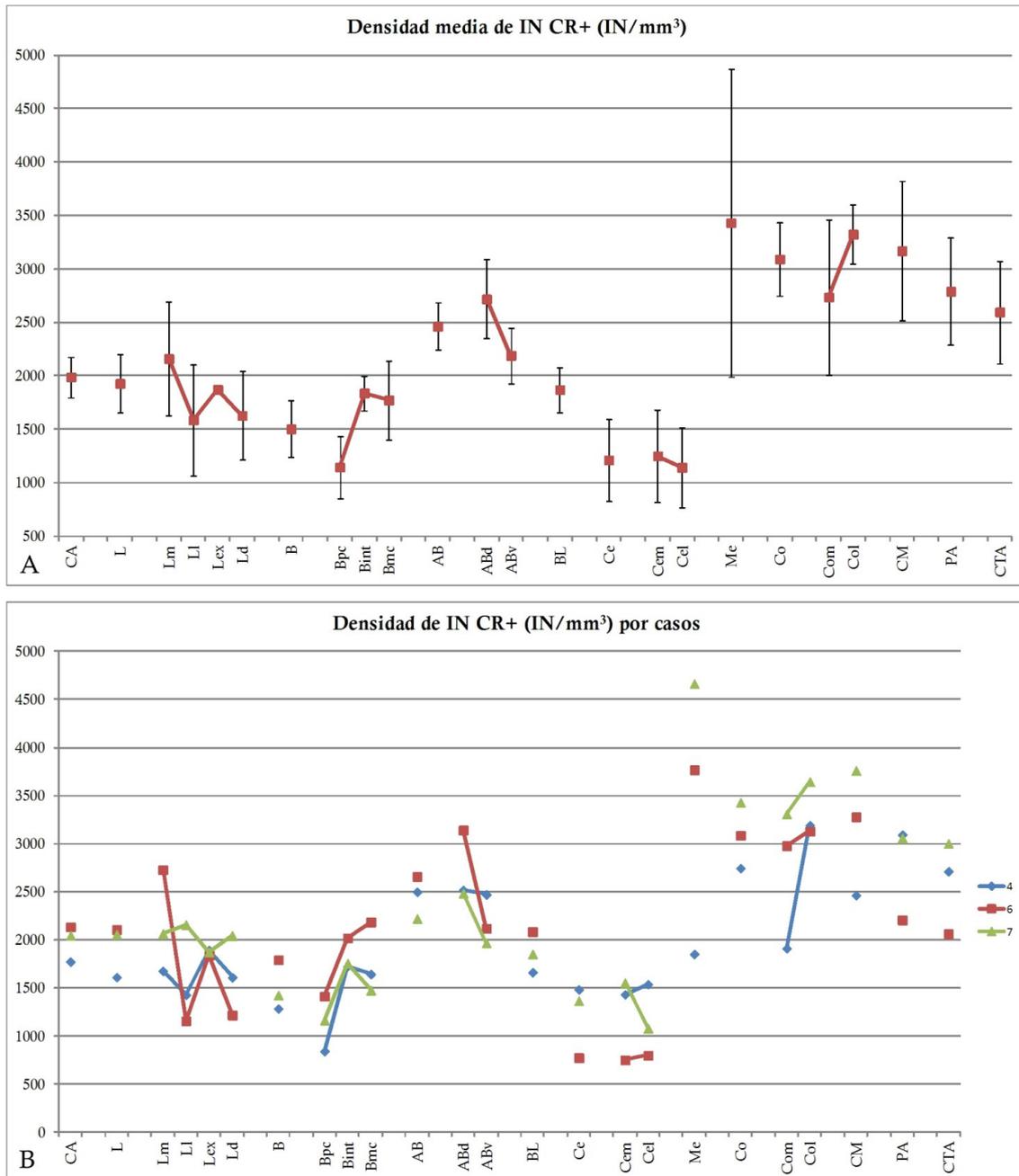


Figura 17. Densidad de IN CR+ en el CA en su conjunto y en sus grupos nucleares, núcleos y subdivisiones nucleares. A. Media y desviación típica de la densidad de IN CR+. B. Densidad de IN CR+ de los tres casos utilizados en este estudio. Para las abreviaturas véase la Tabla 7 o el apartado de abreviaturas.

El porcentaje de IN CR+ con respecto al número total de neuronas totales varía entre 4,64 % en la subdivisión parvocelular del núcleo basal y 23,82 % en la subdivisión lateral del núcleo cortical (Fig. 18); estas regiones de mínimo y máximo porcentaje no son las que presentan la menor y mayor densidad de IN CR+, lo que indica que la densidad de IN CR+ por volumen no refleja necesariamente la proporción de estas IN dentro de las neuronas totales de la región del CA analizada.

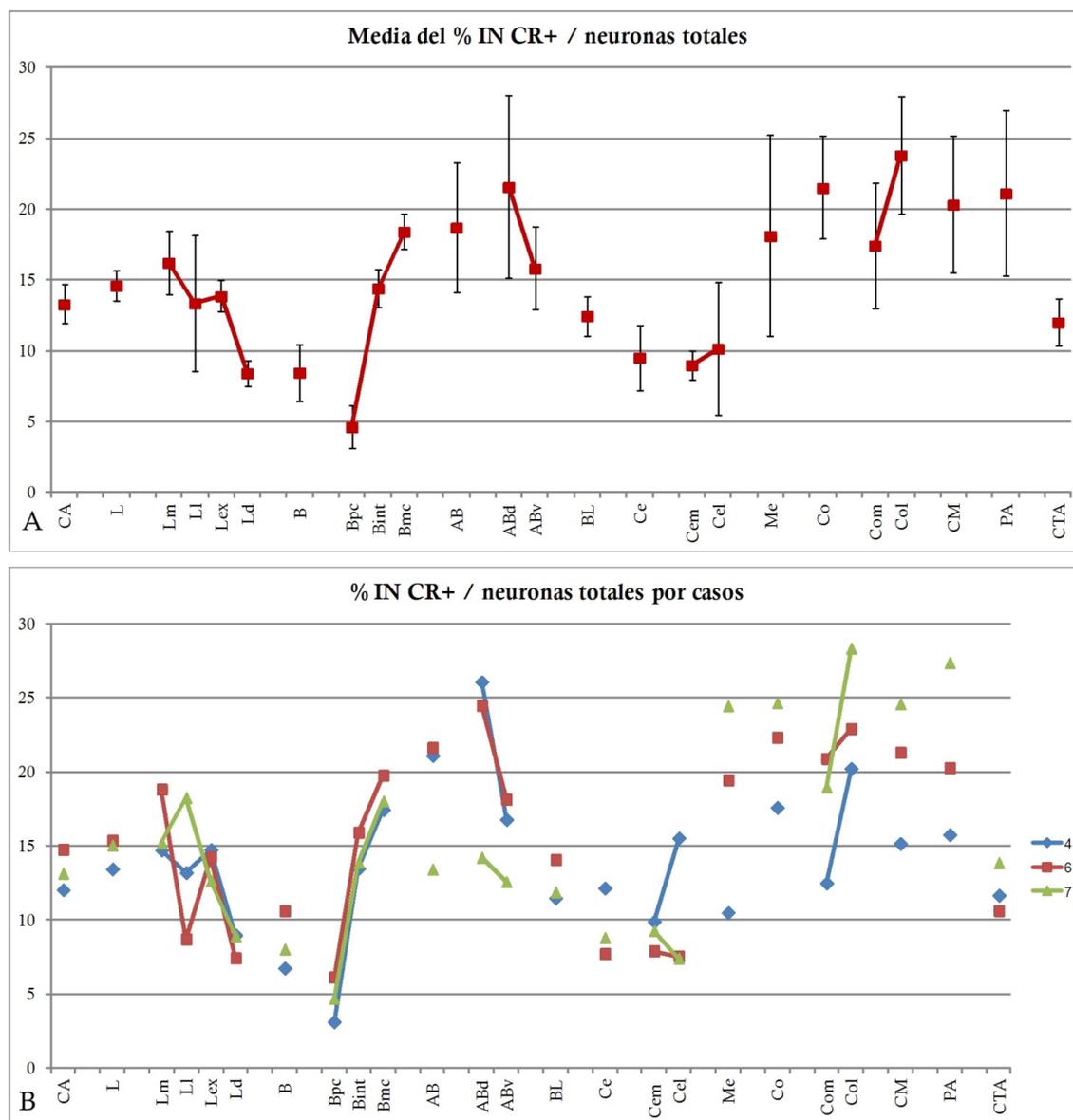


Figura 18. Porcentaje de IN CR+ con respecto a las neuronas totales en el CA en su conjunto y en sus grupos nucleares, núcleos y subdivisiones nucleares. A. Media y desviación típica del porcentaje de IN CR+/N neuronas. **B.** Porcentaje de IN CR+/N neuronas de los tres casos utilizados en este estudio. Para las abreviaturas véase la Tabla 7 o el apartado de abreviaturas.

La Figura 19 representa en un gráfico circular el porcentaje de IN PV+ y CR+ con respecto al total de neuronas en los principales núcleos del CA en uno de los casos analizados, el caso 4.

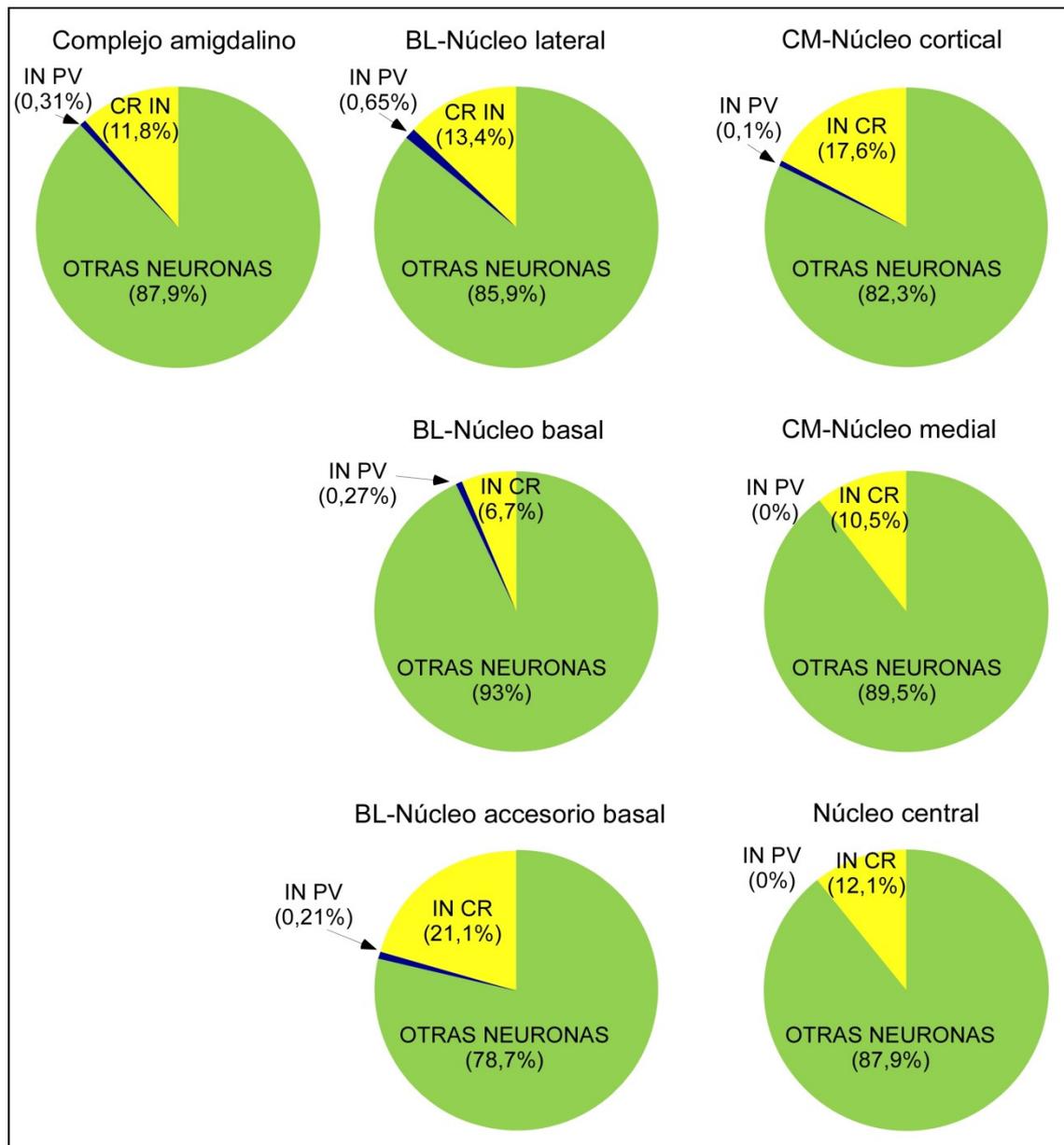


Figura 19. Porcentajes de las dos poblaciones de IN, las CR+ en amarillo y las PV+ en azul, con respecto a las neuronas totales en los principales núcleos del CA. Para las abreviaturas véase la Tabla 7 o la lista de abreviaturas.

4.7. Distribución relativa de las IN PV+ y las CR+ en el CA

La distribución de las dos poblaciones de IN, las PV+ y las CR+, se representa en la Figura 20. En general, las IN PV+ se restringen al grupo basolateral, aunque también pueden encontrarse algunas IN aisladas en los núcleos cortical y medial (Fig. 20A); las IN CR+, sin embargo, se distribuyen en todos los núcleos del CA (Fig. 20B). Considerando la distribución en todo el CA, las IN CR+ son más abundantes en los núcleos amigdalinos mediales que en los laterales mientras que las PV+ abundan en

los núcleos situados lateralmente y son muy escasas en los núcleos mediales, como ya se ha apuntado en el apartado de densidad de IN.

En la Figura 20 se observa cómo las IN PV+ son escasas a niveles posteriores del CA, especialmente en el núcleo lateral (Fig. 20A), mientras que las CR+ están presentes en todos los núcleos y a todos los niveles anteroposteriores (Fig. 20B). Obsérvese también que el área periamigdalina contiene IN CR+ pero ninguna IN que contenga PV.

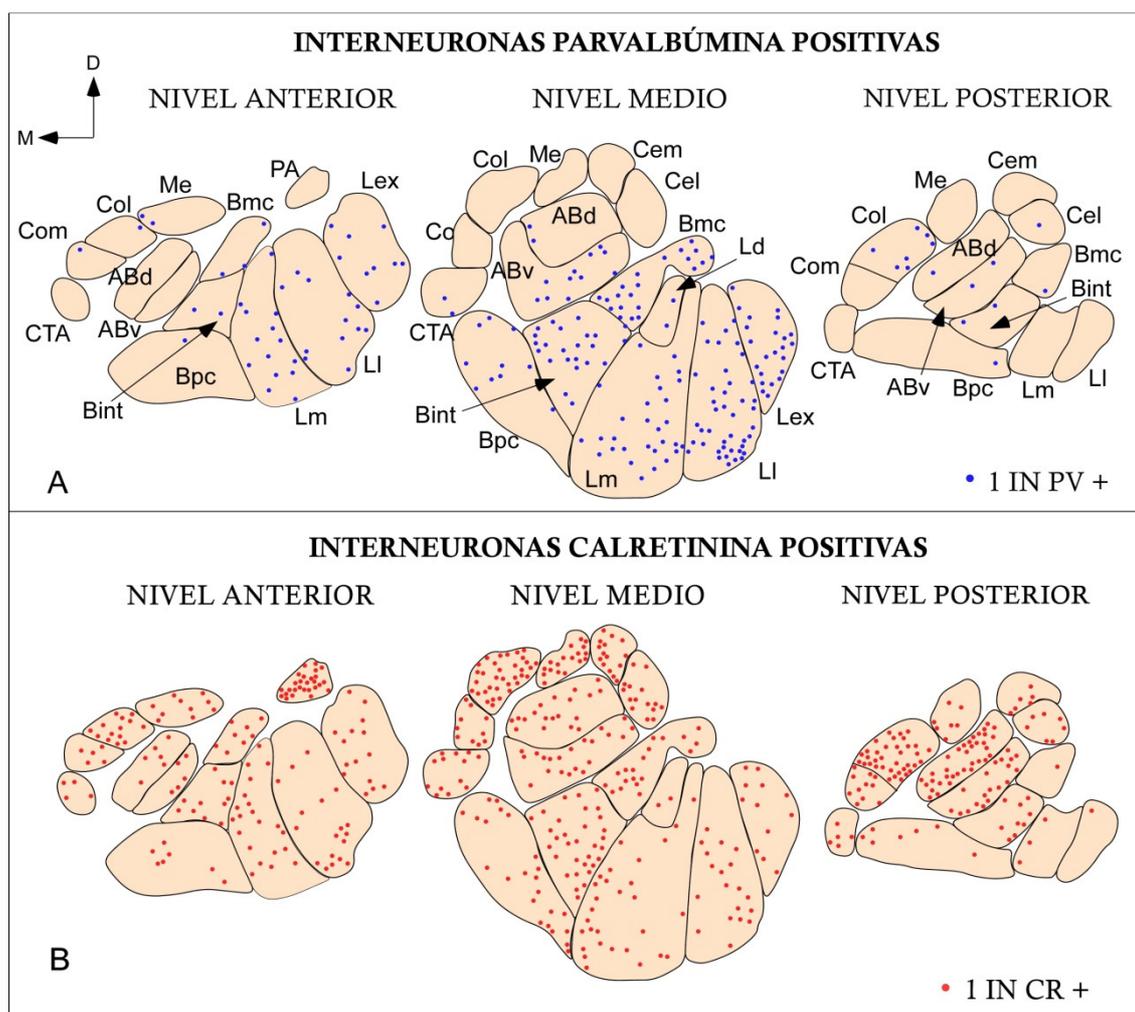


Figura 20. Distribución de las IN PV+ y CR+ en el CA. Esquemas de tres niveles anteroposteriores del CA vistos en el plano coronal que muestran la distribución de las IN PV+ (A) y CR+ (B); los puntos rojos o azules de cada nivel representan el total de IN contadas en tres secciones. Para las abreviaturas véase la Tabla 7 o la lista de abreviaturas.

4.8. Distribución de fibras DAT+ en el CA

El protocolo utilizado en este trabajo para visualizar DAT reveló una densa y extensa red de axones DAT+ distribuida heterogéneamente entre y dentro de los núcleos del CA. La mayoría de las fibras DAT+ en el CA son finas y varicosas (véase la Fig. 3E *de Material y Métodos*), pero existen otras fibras ligeramente más gruesas y lisas, que se entremezclan con las que son finas varicosas, localizadas principalmente en los límites de los núcleos y en raras ocasiones dentro de los núcleos del CA.

El análisis de la distribución de los axones DAT+ en el CA humano pone de manifiesto que éstos inervan de forma heterogénea los núcleos y que la mayor concentración de estas fibras se encuentra en el núcleo central (Figs. 21F; 22A, B). A niveles anteriores del CA (Fig. 21A, B), las fibras DAT+ se distribuyen de forma bastante homogénea en el grupo basolateral con algunas áreas pequeñas ubicadas ventralmente en la subdivisión parvocelular del núcleo basal más ricamente inervadas. Estas áreas ricas en inmunotinción de DAT corresponden con regiones que contienen mucha AChE. El área periamigdalina también contiene numerosas fibras DAT+ que son especialmente abundantes en su sector dorsolateral (Fig. 21B). A niveles medios, existe una gran inervación DAT+ y la cantidad de fibras varía entre los distintos núcleos y subdivisiones del CA. Así, las fibras DAT+ se concentran hacia regiones dorsolaterales del CA, incluyendo la porción dorsal del núcleo lateral y la subdivisión magnocelular del basal. En estas regiones, las fibras DAT+ finas y varicosas son especialmente abundantes en pequeños parches que podrían corresponder con los *núcleos o islas intercaladas* descritos previamente por otros autores (Sims y Williams, 1990; Sorvari y cols., 1995) (véanse las puntas de flecha en la Fig. 21C, D), los cuales son fácilmente reconocibles por su intensa tinción de AChE. Una pequeña cantidad de fibras DAT+ aparece en el complejo corticomedia, estando el núcleo cortical menos inervado que el núcleo medial. Inmediatamente ventral al núcleo cortical aparece el área de transición córtico-amigdalina con una cantidad de fibras inmunoteñidas para el DAT significativamente mayor que este núcleo (Fig. 21C, D). Esta región de transición mostró un parche con una alta concentración de fibras DAT+ en su porción más medial que coincide con una zona rica en AChE (Fig. 21C).

A niveles posteriores del CA la inmunorreactividad de DAT sigue siendo abundante (Fig. 21E, F). El núcleo central es el más rico en axones y, a pesar de que se observan fibras DAT+ en todos los sectores del núcleo, su densidad parece seguir

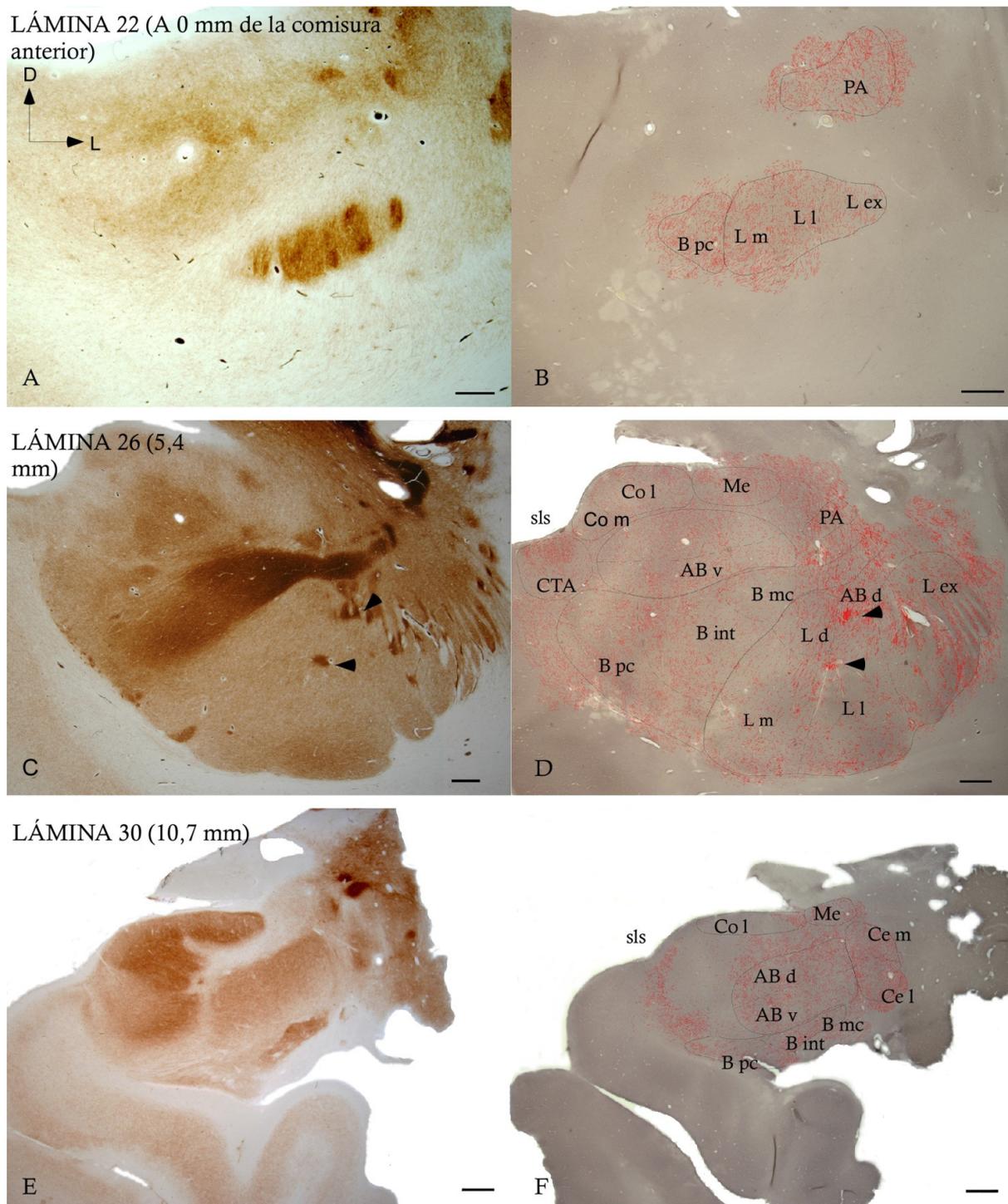


Figura 21. Distribución de fibras DAT+ en el CA humano. Series de secciones coronales próximas entre sí teñidas para AChE (A, C, E) y DAT (B, D, F) en tres niveles anteroposteriores del CA, con las correspondientes láminas del atlas de Mai y cols. (2004) indicadas en la parte superior izquierda de cada nivel. El punteado en B, D y F representa los axones DAT+ dibujados con la cámara lúcida a un aumento de 20X y superpuestos sobre los mismos cortes teñidos para DAT. Las puntas de flecha en C y D indican los parches ricos en DAT o en AChE. Para las abreviaturas véase la Tabla 7 o la lista de abreviaturas. Escala: 1 mm.

un gradiente decreciente mediolateral (Fig. 22A), tal y como luego confirmaron los resultados de las estimaciones cuantitativas. En el núcleo cortical se encontraron muy pocas fibras DAT+; además, se pueden observar algunos axones en la región correspondiente al área de transición córtico-amigdalina, aunque a niveles tan posteriores los límites de esta región no se distinguen claramente (Fig. 21F).

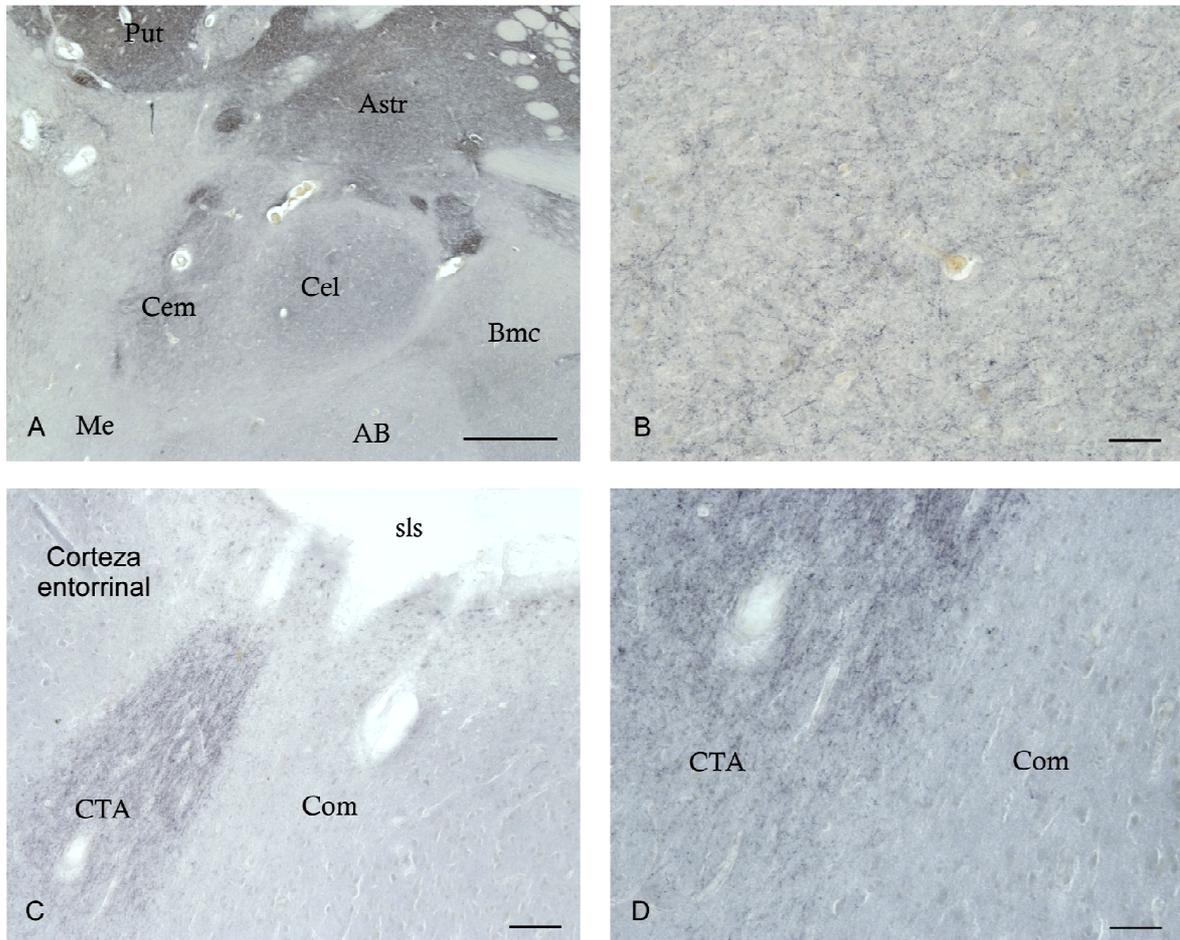


Figura 22. Inmunotinción de DAT en el núcleo central y en el área de transición córtico-amigdalina. **A.** Fotografía a bajos aumentos que muestra la mayor intensidad de inmunotinción frente al DAT en el núcleo central comparado con los territorios amigdalinos circundantes, como son los núcleos basal, accesorio basal y medial. **B.** Imagen a mayor aumento de las fibras DAT+ en la subdivisión medial del núcleo central. **C, D,** inmunotinción de DAT en el núcleo cortical y en el área de transición córtico-amigdalina. Obsérvese la mayor cantidad de fibras DAT+ en el área de transición córtico-amigdalina en comparación con el núcleo cortical. Para las abreviaturas véase la Tabla 7 o la lista de abreviaturas. Barra de calibración: A, 1 mm; B: 50 μ m; C, 100 μ m; D, 50 μ m.

4.9. Longitud absoluta y densidad de longitud de fibras DAT+ del CA

La Tabla 15 muestra la media, desviación típica y el coeficiente de error de la longitud absoluta y la densidad de longitud de las fibras DAT+ en el CA. Estas estimaciones se realizaron en los casos 3, 4, 6, 7 y 8 (Tabla 2). La media de longitud absoluta de fibras DAT+ en el CA completo estimada en los cinco cerebros es de 518 metros (Tabla 15). La mayoría de esas fibras se localizan dentro del complejo basolateral, el cual contiene 385 metros, lo que corresponde a un 75 % del total de longitud de los axones dentro del CA. Dentro del grupo central se cuantificaron 87 m de fibras inmunorreactivas para DAT, una cantidad que equivale a un 17 % del total de longitud de fibras DAT+ en el CA. En el grupo corticomedial, así como en el area periamigdalina y en el área de transición córtico-amigdalina, las fibras inmunorreactivas para el DAT fueron muy escasas, y la suma de la longitud de axón de todas esas regiones no llegó al 9 % del axón total DAT+ del CA (Tabla 15). La longitud absoluta de fibras DAT+ en los cinco casos analizados se representa en la Figura 23 y la densidad de longitud de fibras DAT+ en la Figura 24.

Tabla 15. Longitud absoluta (m) y densidad de longitud (mm/mm³) de fibras DAT+ en el CA en su conjunto y en sus grupos nucleares, núcleos y subdivisiones nucleares

Estructura neural	L _{DAT+}			L _{V DAT+}		Número de secciones
	Media	DT	CE	Media	DT	
CA	518	157	0,03	547	159	6
BL	385	122	0,06	520	160	5
L	157	45	0,06	461	115	4
Lex	62	19	0,08	792	227	4
LI	54	14	0,09	406	115	4
Lm	35	18	0,11	288	132	4
Ld	8	4	0,22	272	123	4
B	170	71	0,05	622	254	5
Bpc	65	31	0,08	532	243	5
Bint	52	24	0,09	580	239	5
Bmc	53	20	0,09	863	321	5
AB	58	24	0,08	449	174	5
ABd	33	17	0,11	488	235	5
ABv	25	12	0,12	419	175	5
CM	21	13	0,13	220	135	5
Co	13	10	0,13	199	156	5
Col	9	7	0,15	199	150	5
Com	4	4	0,23	200	170	4
Me	8	3	0,14	273	110	4
Ce	87	21	0,07	1388	284	4
Cem	50	15	0,09	1686	373	4
Cel	37	13	0,10	1111	217	4
PA	17	9	0,14	898	438	2
CTA	9	3	0,14	580	197	3

DT: desviación típica; CE: coeficiente de error. Para otras abreviaturas véase la Tabla 7 o la lista de abreviaturas.

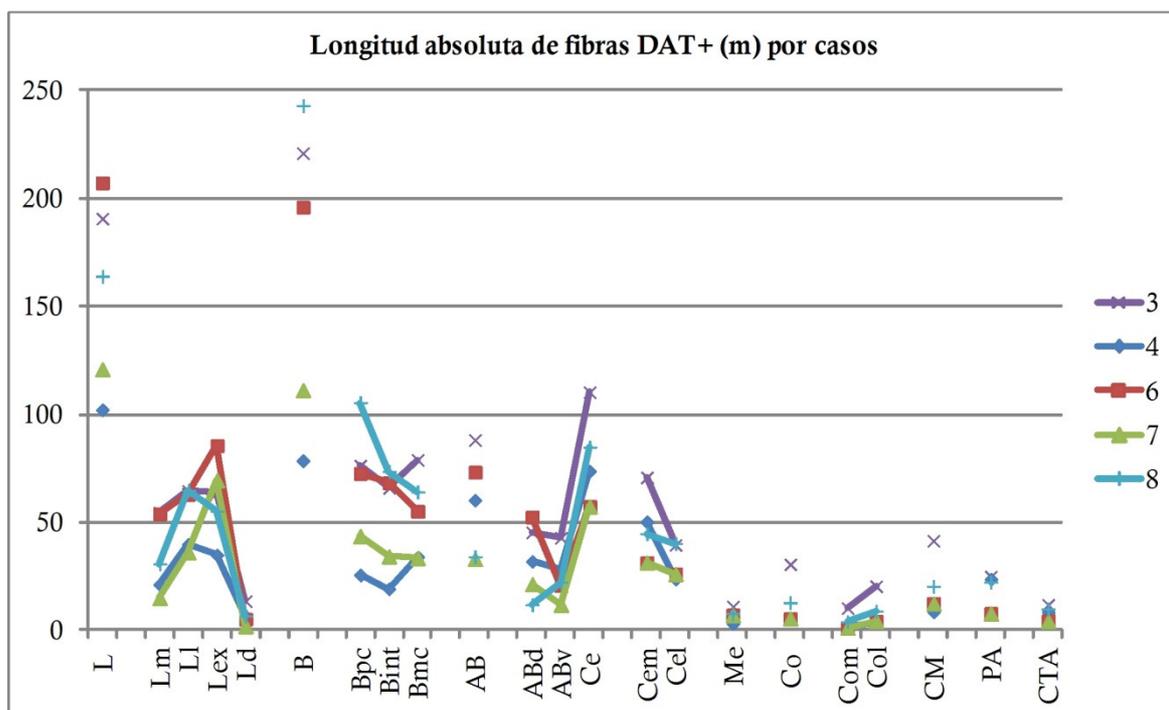


Figura 23. Longitud absoluta de fibras DAT+ (m) en los cinco casos analizados en este estudio. Nótese cómo la longitud de fibras es notablemente mayor dentro del grupo basolateral que en el resto del CA. Para las abreviaturas véase la Tabla 7 o la lista de abreviaturas.

Con el fin de determinar las variaciones regionales en la cantidad de fibras DAT+, se estimó la densidad de fibras (Tabla 15; Fig. 23). Las regiones del CA más inervadas por fibras DAT+ son el grupo central y el área periamigdalina, siendo la densidad existente en el núcleo central más del doble de la que hay en cualquier otro núcleo del CA, exceptuando el área periamigdalina. El análisis estadístico demostró que las variaciones en la densidad de fibras entre el núcleo central y el resto de los grupos nucleares (Tabla 16) o los núcleos (Tabla 17) del CA fueron estadísticamente significativas ($p = 0,00$ en ambos casos). También fue significativa la diferencia entre la densidad de fibras del área periamigdalina y del grupo corticomedial (Tabla 16) y a nivel de núcleos, entre el área periamigdalina y el núcleo medial (Tabla 17). Dentro del núcleo central, la densidad de fibras DAT+ fue notablemente mayor en la subdivisión medial que en la lateral y esta diferencia fue estadísticamente significativa (Fig. 24; $P = 0,018$).

En relación al grupo basolateral, el núcleo basal está ligeramente más inervado por fibras DAT+ que los núcleos lateral y accesorio basal. Dentro del núcleo lateral la inervación DAT+ se ajustó a un claro gradiente decreciente lateromedial en la

densidad, al igual que ocurre con la longitud absoluta de fibras (Tabla 15; Fig. 24A). Así, la densidad de longitud DAT+ en la subdivisión externa (792 mm/mm^3) fue más del doble de la encontrada en la subdivisión medial (288 mm/mm^3) y estas diferencias fueron estadísticamente significativas (Tabla 18).

La densidad de fibras DAT+ en el caso del núcleo basal se ajusta a un gradiente decreciente dorsoventral, siendo de 863 mm/mm^3 en la subdivisión magnocelular y de 532 mm/mm^3 en la subdivisión parvocelular (Tabla 15; Fig. 24). También en el núcleo accesorio basal la densidad de fibras DAT+ decrece desde su subdivisión dorsal (488 mm/mm^3) a la ventral (419 mm/mm^3) (Fig. 24). Sin embargo, a diferencia de lo que ocurre en el núcleo lateral estas variaciones intranucleares de los núcleos basal y accesorio basal no fueron estadísticamente significativas.

Tabla 16. Medias de las diferencias en la densidad de axones DAT+ entre los grupos nucleares del CA

Grupos nucleares del CA	BL	Ce	CM	PA	CTA
BL		-868,31**	300,08	-378,08	-59,63
Ce	868,31**		1168,39**	490,23	808,68**
CM	-300,08	-1168,39**		-678,16**	-359,71
PA	378,08	-490,23	678,16**		318,45
CTA	59,63	-808,68**	359,71	-318,45	

Diferencias significativas (*, $0,05 > p > 0,01$) o muy significativas (**, $p < 0,01$). Para las abreviaturas véase la Tabla 7 o la lista de abreviaturas.

Tabla 17. Medias de las diferencias en la densidad de axones DAT+ entre los núcleos del CA

Núcleos del CA	L	B	AB	Co	Me	Ce	PA	CTA
L		-161,26	11,40	261,46	187,40	-927,60**	-437,37	-118,92
B	161,26		172,66	422,73	348,66	-766,34**	-276,11	42,34
AB	-11,40	-172,66		250,06	176,00	-939,00**	-448,77	-130,32
Co	-261,46	-422,73	-250,06		-74,06	-1189,07**	-698,84	-380,39
Me	-187,40	-348,66	-176,00	74,06		-1115,00**	-624,77**	-306,32
Ce	927,60**	766,34**	939,00**	1189,07**	1115,00**		490,23	808,68**
PA	437,37	276,11	448,77	698,84	624,77**	-490,23		318,45
CTA	118,92	-42,34	130,32	380,39	306,32	-808,68**	-318,45	

Diferencias significativas (*, $0,05 > p > 0,01$) o muy significativas (**, $p < 0,01$). Para las abreviaturas véase la Tabla 7 o la lista de abreviaturas.

Tabla 18. Medias de las diferencias en la densidad de axones DAT+ entre las subdivisiones del núcleo lateral

Núcleo lateral	Lm	LI	Lex	Ld
Lm		-118,30	504,05**	16,24
LI	118,30		-385,76**	134,54
Lex	504,05**	385,75**		520,30**
Ld	-16,24	-134,54	-520,30**	

Diferencias significativas (*, $0,05 > p > 0,01$) o muy significativas (**, $p < 0,01$). Para las abreviaturas véase la Tabla 7 o la lista de abreviaturas.

El grupo corticomedial y el área de transición córtico-amigdalina fueron las regiones del CA menos inervadas por fibras DAT+ con un ligero aumento en la cantidad de fibras en el núcleo medial comparado con el cortical; pero esta diferencia no alcanzó la significación estadística ($p = 1,00$). El área de transición córtico-amigdalina se diferencia de la subdivisión medial del núcleo cortical por la presencia de un contenido mayor, aunque moderado, de inervación DAT+ (Figs. 21D; 22C, D).

Todos estos resultados en conjunto reflejan que la cantidad de fibras DAT+ aumenta progresivamente desde regiones ventromediales a dorsolaterales del CA (véase la Fig. 21D), siendo el núcleo central el más densamente inervado por fibras DAT+ seguido del área periamigdalina.

El análisis de la densidad de inervación DAT+ de cada uno de los cinco casos humanos por separado puso de manifiesto las mismas variaciones en la cantidad de fibras DAT+ entre los grupos nucleares, núcleos y subdivisiones nucleares que las observadas con los valores medios de los cinco casos (Fig. 24B), exceptuando las diferencias dorsoventrales en el núcleo accesorio basal, que no fueron constantes en todos los casos (Fig. 24B). El análisis por casos individuales mostró también una gran variabilidad interindividual en la densidad de fibras DAT+ en el área periamigdalina, resultado de las grandes variaciones obtenidas entre los individuos en la longitud absoluta de fibras DAT+ y en el volumen de esta región.

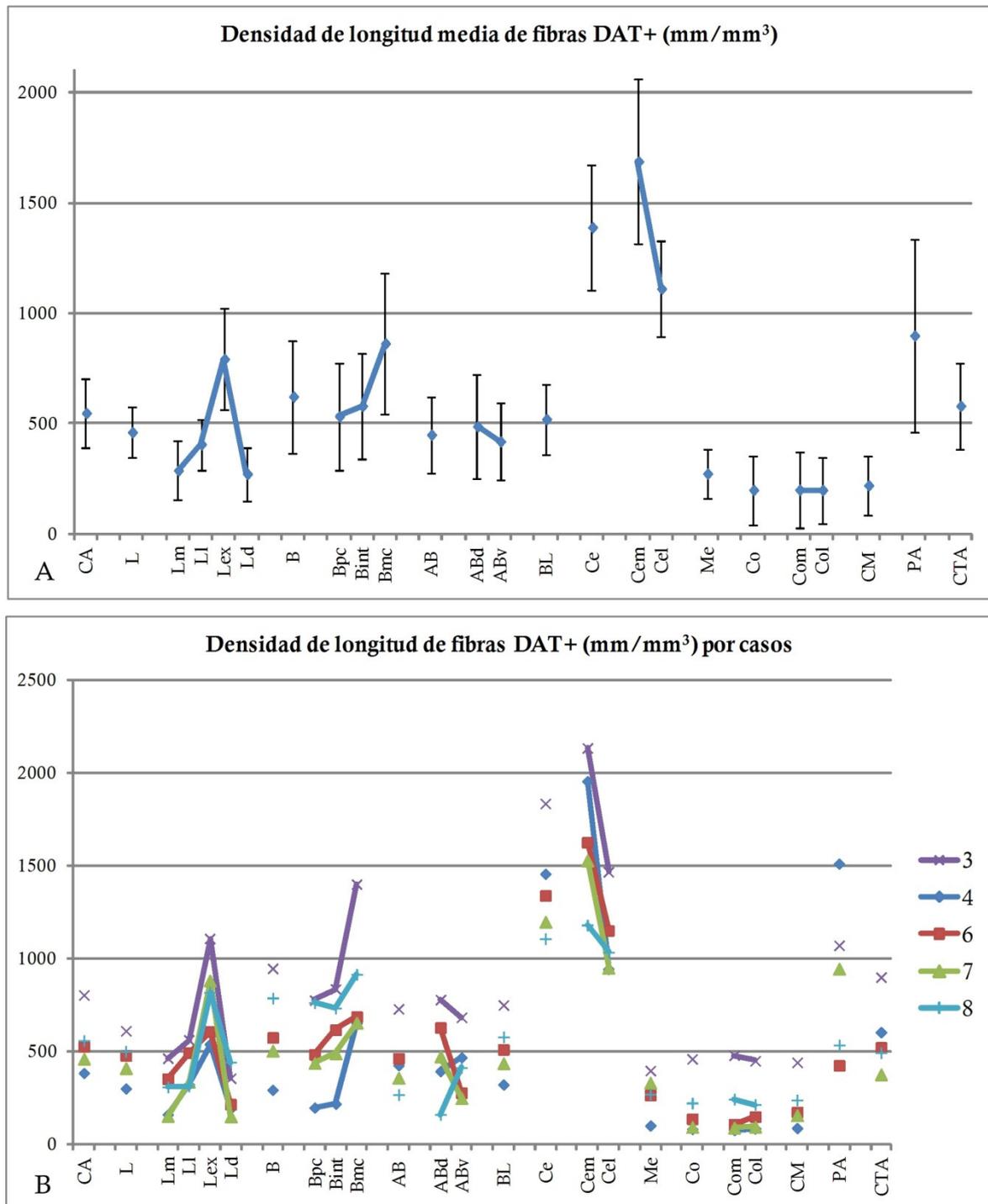


Figura 24. Densidad de fibras DAT+ en cada grupo nuclear, núcleo y subdivisión nuclear del CA humano. A. Densidad media de fibras DAT+ entre los cinco casos incluidos en el presente estudio. Las barras de error en A representan la desviación típica. **B.** Densidad de fibras DAT+ por casos. Para las abreviaturas véase la Tabla 7 o la lista de abreviaturas.

4.10. Longitud de fibras DAT+ por neurona en el CA

La media y desviación típica del ratio entre la longitud absoluta de fibras DAT+ y el número total de neuronas (ratio $L_{\text{DAT+}}/N_{\text{NEU}}$) para los grupos nucleares, núcleos y subdivisiones nucleares del CA se muestran en la Tabla 19 y se representan gráficamente en la Figura 25. Los resultados de los números de neuronas de los cuatro casos utilizados (casos 3, 4, 6 y 7; Tabla 2) para calcular este ratio se han descrito previamente en el apartado 4.2. *Número de neuronas, células de glía y endoteliales.*

Tabla 19. Ratio entre la longitud absoluta de fibras DAT+ y el número de neuronas totales (ratio $L_{\text{DAT+}}/N_{\text{neu}}$) ($\mu\text{m}/\text{neurona}$) en los grupos nucleares, núcleos y subdivisiones nucleares del CA

Estructura neural	Ratio $L_{\text{DAT+}}/N_{\text{NEU}}$	
	Media	DT
CA	34,39	7,40
BL	27,12	7,52
L	32,34	4,88
Lex	60,96	6,92
LI	33,10	3,03
Lm	18,88	20,64
Ld	17,10	8,22
B	30,61	10,43
Bpc	17,71	7,08
Bint	38,30	14,23
Bmc	85,70	23,50
AB	36,18	11,45
ABd	44,05	13,71
ABv	28,35	11,24
CM	14,49	11,12
Co	13,61	12,76
Col	13,45	11,38
Com	14,07	16,33
Me	16,24	8,79
Ce	111,85	26,85
Cem	144,10	40,73
Cel	83,71	21,70
PA	82,90	46,15
CTA	27,16	8,82

DT: desviación típica. Para otras abreviaturas véase la Tabla 7 o la lista de abreviaturas.

Como puede observarse en la Tabla 19, el ratio $L_{\text{DAT+}}/N_{\text{NEU}}$ fue cuatro veces mayor en el grupo central que en el grupo basolateral, y ocho veces mayor que el

grupo corticomedial (Tabla 19), pero solamente 1,3 veces el del área periamigdalina. Al igual que ocurre con la densidad de longitud de fibras DAT+, el núcleo central y el área periamigdalina mostraron diferencias significativas con el resto de regiones del CA cuando se comparaban los grupos nucleares entre sí, no existiendo diferencias entre ellos mismos (Tablas 20 y 21); sin embargo, al comparar los núcleos del CA entre sí, solamente se vieron diferencias entre el central y los núcleos cortical y medial, y no entre el central y los núcleos del complejo basolateral, a pesar de las grandes diferencias vistas entre estas regiones para la densidad de fibras DAT+ (véase la Tabla 17).

Al analizar este ratio ($L_{\text{DAT}+}/N_{\text{NEU}}$) dentro de cada núcleo del CA se vio que la longitud de fibras DAT+ por neurona dentro del núcleo central es mucho mayor en la subdivisión medial que en la lateral (144 frente a 83 $\mu\text{m}/\text{neurona}$) ($p = 0,040$). Dentro del núcleo basal, la cantidad de fibras DAT+ por neurona fue mucho mayor en la subdivisión magnocelular que en la parvocelular (Fig. 25A; Tablas 19 y 22; $p = 0,001$), debido probablemente a que el tamaño neuronal es mucho mayor en la subdivisión magnocelular que en la parvocelular. El ratio $L_{\text{DAT}+}/N_{\text{NEU}}$ (Fig. 25A, B) reveló la misma distribución intranuclear y variaciones y gradientes similares entre los núcleos del CA que la densidad de fibras DAT+ (Fig. 24).

Tabla 20. Media de las diferencias en el ratio de longitud de axón DAT+ frente al número total de neuronas entre los grupos nucleares del CA

Grupos nucleares del CA	BL	Ce	CM	PA	CTA
BL		-84,73**	12,62	-55,78*	-0,037
Ce	84,73**		97,35**	28,94	84,69**
CM	-12,62	-97,35**		-68,41*	-12,66
PA	55,78*	-28,94	68,41*		55,75*
CTA	0,037	-84,69**	12,66	-55,75*	

Diferencias significativas (*, $0,05 > p > 0,01$) o muy significativas (**, $p < 0,01$). Para las abreviaturas véase la Tabla 7 o la lista de abreviaturas.

Tabla 21. Media de las diferencias en el ratio de longitud de axón DAT+ frente al número total de neuronas entre los núcleos del CA

Núcleos del CA	L	B	AB	Co	Me	Ce	PA	CTA
L		1,73	-3,84	18,73	16,10	-79,51	-50,56	5,18
B	-1,73		-5,57	16,99	14,37	-81,23	-52,29	3,45
AB	3,84	5,57		22,57	19,94	-75,67	-46,72	9,02
Co	-18,73	-16,99	-22,57		-2,62	-98,24*	-69,29	-13,54
Me	-16,10	-14,37	-19,94	2,62		-95,60*	-66,66	-10,91
Ce	79,51	81,23	75,67	98,24*	95,60*		28,94	84,69
PA	50,56	52,29	46,72	69,29	66,66	-28,94		55,74
CTA	-5,18	-3,45	-9,02	13,54	10,91	-84,69	-55,74	

Diferencias significativas (*, $0.05 > p > 0,01$) o muy significativas (**, $p < 0,01$). Para las abreviaturas véase la Tabla 7 o la lista de abreviaturas.

Tabla 22. Media de las diferencias en el ratio de longitud de axón DAT+ frente al número total de neuronas entre las subdivisiones del núcleo lateral del CA

Núcleo basal	Bpc	Bint	Bmc
Bpc		-20,59	-67,99*
Bint	20,59		-47,39
Bmc	67,99*	47,39	

Diferencias significativas (*, $0.05 > p > 0,01$) o muy significativas (**, $p < 0,01$). Para las abreviaturas véase la Tabla 7 o la lista de abreviaturas.

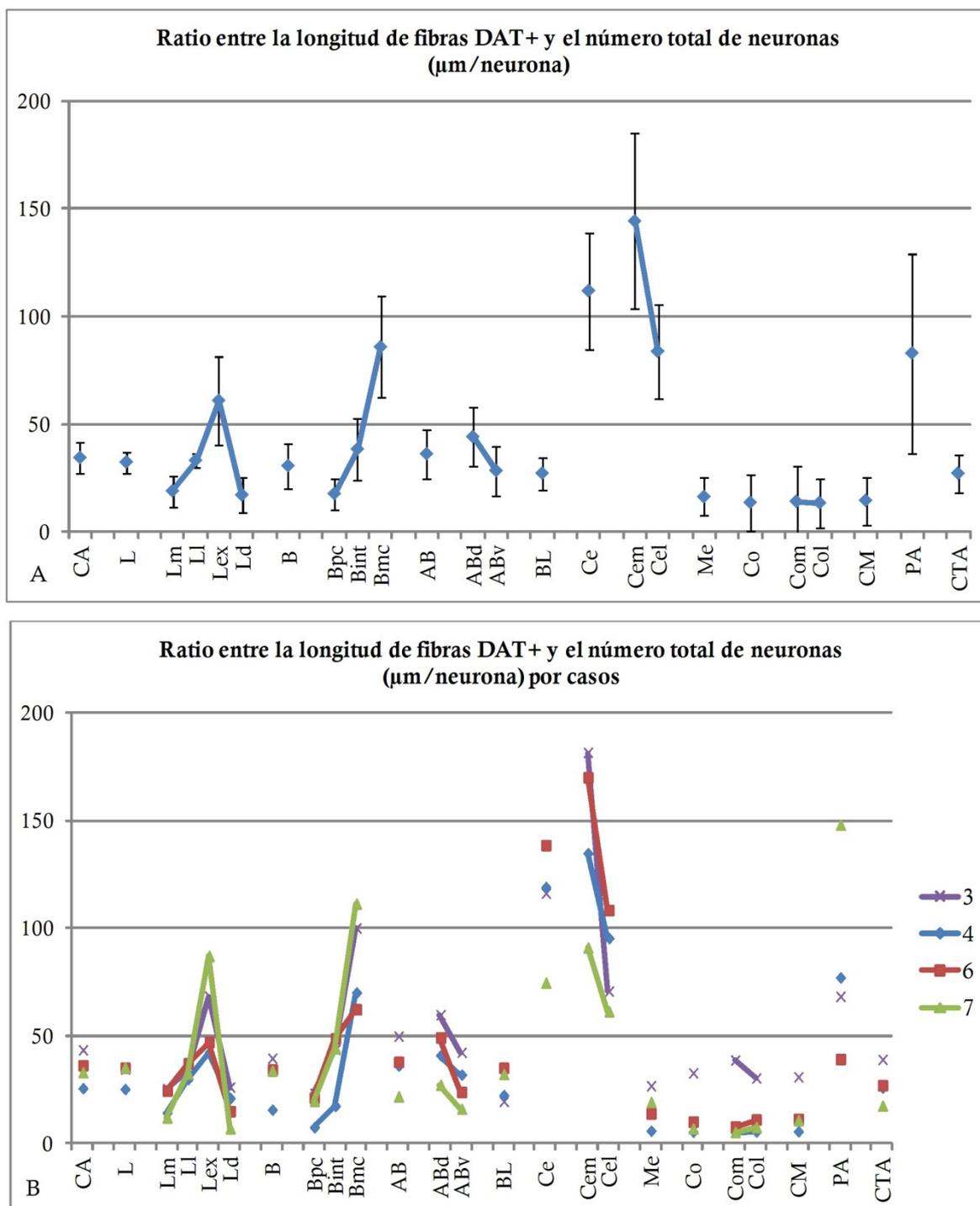


Figura 25. Ratio entre la longitud absoluta de fibras DAT+ y el número de neuronas (ratio L_{DAT+}/N_{neu} ; $\mu\text{m}/\text{neurona}$) en los grupos nucleares, núcleos y subdivisiones nucleares del CA. **A.** Media del ratio L_{DAT+}/N_{neu} de los cuatro casos incluidos en este estudio; las barras de error representan la desviación típica. **B.** Ratio L_{DAT+}/N_{neu} de los cuatro casos incluidos en este estudio. Para las abreviaturas véase la Tabla 7 o la lista de abreviaturas.

4.11. Relación topográfica entre las fibras DAT+ y las IN PV+ y las IN CR+

El análisis con microscopía confocal de las secciones doblemente teñidas con DAT /PV y DAT /CR demostró que la presencia de fibras DAT+ en las proximidades del dominio somatodendrítico de cualquiera de los dos tipos de IN era poco frecuente en el CA. Además, en las regiones amigdalinas en las que había fibras DAT+ cerca de somas de IN PV+ o CR+ se observó que ambas estructuras no se localizaban en los mismos planos del eje z. Comparando ambas poblaciones de IN, los resultados mostraron que era mucho más frecuente encontrar alguna fibra DAT+ localizada en la proximidad del dominio somatodendrítico de las IN CR+ que en el de las IN PV+.

Con el fin de determinar si las fibras DAT+ contactaban físicamente con las IN PV+, en este estudio se han analizado con microscopía confocal un total de 48 IN PV+, ubicadas en los núcleos basal y lateral del CA, cuyo soma y/o dendritas primarias o secundarias se encontraban próximos a fibras DAT+. Para contabilizar un contacto, ambas estructuras debían aparecer juntas en el mismo plano focal (de 1 μm de grosor). Este estudio reveló 28 posibles contactos entre fibras DAT+ y el soma o las dendritas de IN PV+ (ratio contactos/neurona = 0,58) (véase la Figura 26), y de estos contactos alrededor de un 80 % fueron con dendritas y el 20 % restante con el soma de la IN.

En el caso de las IN CR+, se han analizado 71 neuronas cuyo soma y /o dendritas primarias o secundarias estaban próximos a fibras DAT+, ubicadas en los núcleos lateral, basal y accesorio basal del CA. En estos cortes teñidos con DAT y CR observamos muchos contactos entre el neuropilo CR+ y las fibras DAT+, pero al igual que en el caso de las IN PV+, solamente se consideraron aquellos que se producían entre fibras DAT+ y el soma o las dendritas que claramente procedían de una IN CR+, ya que no puede descartarse la posibilidad de que mucho neuropilo CR+ tuviera un origen extrínseco, tal y como se ha demostrado previamente (Sorvari y cols., 1996). Los resultados obtenidos han sido un total de 58 contactos (ratio contactos/neurona = 0,81) (véase la Figura 27) de los cuales alrededor de un 80 % fueron con dendritas y el otro 20 % con el soma.

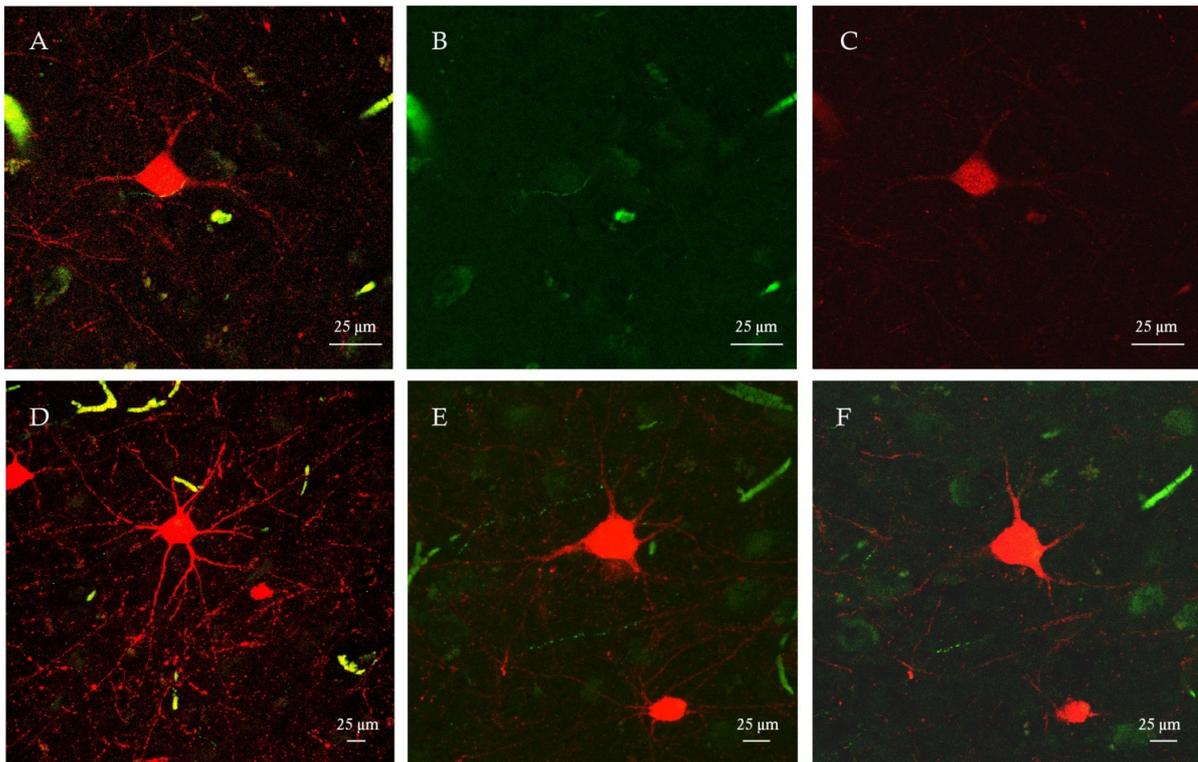


Figura 26. Fotografías de microscopía confocal de IN PV+ (rojo) y fibras DAT+ (verde). **A:** sección óptica de 1 µm de grosor de un corte doblemente teñido para PV y DAT mostrando un contacto entre el soma de una IN PV+ y una fibra DAT+. **B:** tinción de DAT del mismo campo mostrado en A donde se observa la fibra. **C:** tinción de PV del mismo campo mostrado en A donde se observa el soma de la IN. **D:** proyección máxima de secciones ópticas de 1 µm de un corte doblemente teñido para DAT y PV mostrando el dominio somatodendrítico de una IN PV+ sin apenas fibras DAT+ a su alrededor. **E:** proyección máxima de un corte doblemente teñido para DAT y PV mostrando una IN PV+ circundada por dos fibras DAT+. **F:** sección óptica de 1 µm de grosor del campo mostrado en E mostrando contactos entre las fibras DAT+ y las dendritas primarias de una IN PV+.

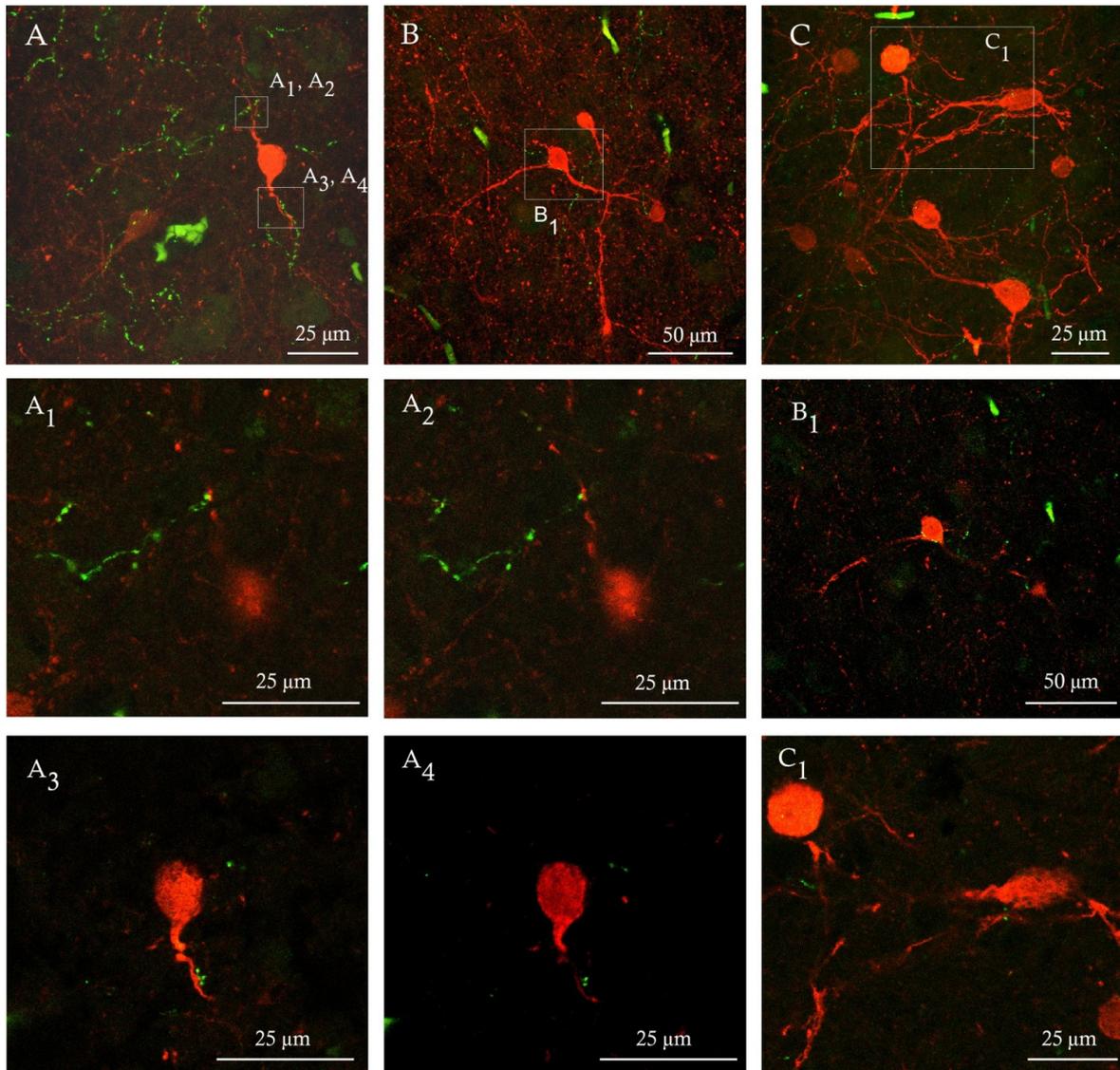


Figura 27. Fotografías de microscopía confocal de IN CR+ (rojo) y fibras DAT+ (verde). **A:** proyección máxima de secciones ópticas de 1 μm mostrando contactos entre las dendritas primarias de una IN CR+ y varias fibras DAT+; en A₁, A₂, A₃ y A₄ se muestran las secciones ópticas individuales de 1 μm de grosor ampliadas en las cuales se observan contactos axodendríticos. **B:** proyección máxima de un contacto axosomático entre una fibra DAT+ y una IN CR+; en B₁ se muestra este contacto en una sección óptica de 1 μm de grosor. **C:** proyección máxima de varias IN CR+ con fibras DAT+ alrededor de su dominio somatodendrítico; en C₁ se muestran en una sección óptica de 1 μm dos contactos entre fibras DAT+ y dendritas primarias de la IN CR+.

4.12. Relación topográfica entre fibras TH+ e IN PV+

En las secciones teñidas doblemente para TH y PV se encontró una mayor cantidad de contactos entre las fibras y el dominio somatodendrítico de la IN que en las teñidas con DAT y PV. Así, de 11 neuronas analizadas, se encontraron 11 contactos entre una fibra TH+ y el cuerpo celular o las dendritas primarias de las IN PV+ (ratio contactos /neurona = 1, frente a 0,58 en DAT-PV) (véase la Figura 28). Sin embargo, como ya se ha explicado en el apartado de *Material y Métodos*, no fue posible determinar en base a la morfología de las fibras si éstas eran dopaminérgicas, noradrenérgicas o adrenérgicas.

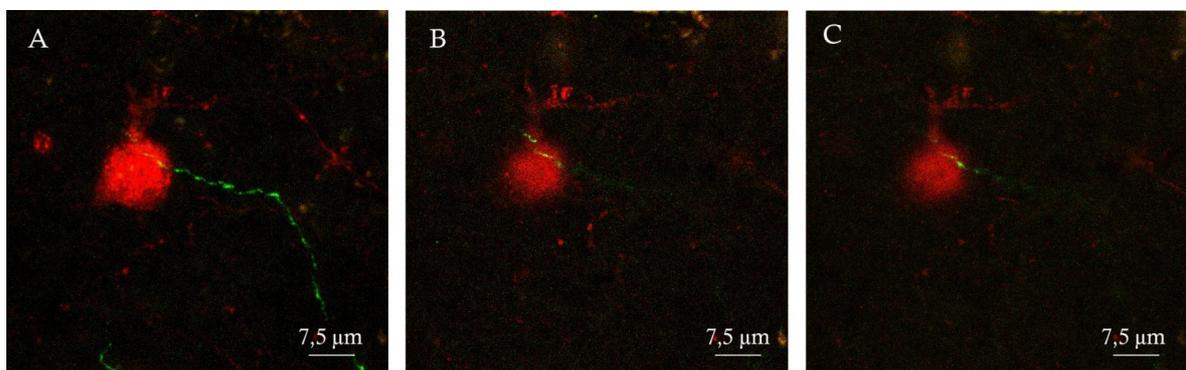


Figura 28. Fotografías de microscopía confocal de IN PV+ (rojo) y fibras TH+ (verde). **A:** proyección máxima de las secciones ópticas de 1 µm de un corte teñido para TH y PV mostrando contactos entre el soma de una IN PV+ y una fibra TH+. **B, C:** secciones ópticas consecutivas de 1 µm de grosor mostrando el solapamiento entre ambas estructuras.

5. DISCUSIÓN

El presente trabajo se ha centrado en el estudio cualitativo y cuantitativo de la composición celular del CA humano procedente de cerebros controles, de la innervación dopaminérgica que contiene el DAT existente en este complejo nuclear y de la relación entre dicha innervación y los tipos celulares del CA. Estos objetivos se han llevado a cabo teniendo presente todas las subdivisiones regionales de este heterogéneo complejo nuclear (cinco grupos nucleares, cinco núcleos y trece subdivisiones nucleares), los cuales han sido cuidadosamente delimitados siguiendo las directrices propuestas por estudios anatómicos previos.

La primera parte del trabajo consistió en cuantificar estereológicamente el número y la densidad de neuronas, células de glía y células endoteliales en cada uno de los grupos nucleares, núcleos y subdivisiones nucleares del CA en el cerebro humano control. Además, para determinar la densidad de células se estimó el volumen de cada una de estas divisiones territoriales amigdalinas. De esta manera, este estudio es el primero que aporta datos del volumen regional, y del número total y densidad de células de todas las subdivisiones territoriales del CA y, además, en las mismas muestras de tejido humano. Dentro de este objetivo del trabajo estudiamos también el efecto que la edad de fallecimiento de los donantes tenía en el volumen regional y en la cantidad de células del CA.

En el segundo objetivo del trabajo se realizó un estudio cuantitativo de dos poblaciones de neuronas locales del CA, las que contienen PV y las que contienen CR, y se estimó su número absoluto, su densidad y el porcentaje que suponen con respecto al total de neuronas en las 24 subregiones de la CA.

El tercer objetivo consistió en cuantificar en cada subdivisión del CA la longitud absoluta y la densidad de longitud de fibras inmunorreactivas para el DAT, como un indicador de la intensidad de innervación dopaminérgica, y en estimar el ratio entre la longitud absoluta de fibras DAT+ y el número total de neuronas con el fin de dar una aproximación de la cantidad de fibra DAT+ por neurona, contenida en cada territorio amigdalino.

Por último, en este trabajo se ha analizado mediante microscopía confocal la relación topográfica entre las fibras DAT+ y el dominio somatodendrítico de las IN PV+ y las CR+.

5.1. Consideraciones metodológicas

Los estudios cuantitativos orientados a determinar el volumen regional y la densidad celular o de fibras, como los que se han realizado en este trabajo, deben tener en cuenta las posibles modificaciones del tamaño de las muestras de cerebros que pueden ocurrir entre el fallecimiento del donante y el momento en el que se hacen las estimaciones estereológicas, y corregir esas deformaciones para aportar datos fiables, que puedan ser comparados con otros trabajos. Como primera medida para garantizar la mejor calidad de las muestras de tejido con las que íbamos a realizar este estudio establecimos solicitar a las instituciones donantes de cerebros muestras con un tiempo *postmortem* lo más corto posible, lo cual está relacionado con una mejor calidad del tejido (Stan, 2006; Waldvogel y cols., 2006). De esta manera, de los 8 cerebros incluidos en este estudio, 6 tienen sólo 5 horas de tiempo *postmortem*, otro 7 horas y el último 16 horas. Este último caso, a pesar de la diferencia tan notable en el tiempo *postmortem* con el resto de las muestras, no presentó grandes variaciones ni en el número de células, ni en el volumen regional de los núcleos amigdalinos, por lo que se mantuvo como caso experimental.

En este trabajo se ha demostrado que la congelación del tejido y su posterior corte en el microtomo no producen ningún encogimiento del área (ejes x e y) y que el encogimiento en el eje z ocurre principalmente en los pasos finales de deshidratación de las secciones. Así, las estimaciones del volumen regional que se han llevado a cabo podrían haberse visto afectadas solamente por el encogimiento que el tejido hubiera podido sufrir durante su fijación por inmersión en paraformaldehído (véase el apartado 3.3.2.1. de *Encogimiento del tejido en Material y Métodos*) y durante su inmersión en sacarosa al 15 %, que fueron las soluciones usadas por las instituciones donantes de las muestras. Existen estudios que han demostrado que la fijación con paraformaldehído no produce un encogimiento grande del tejido (Haug y cols., 1984) y se ha estimado en un 2,7 % el encogimiento máximo que este fijador puede producir en el volumen del tejido (Boonstra y cols., 1983). Las estimaciones del número de células con el fraccionador óptico no se ven afectadas por el encogimiento del tejido, por lo que las estimaciones de densidad, llevadas a cabo dividiendo el número por el volumen, estarán afectadas por el mismo encogimiento del tejido que las estimaciones de volumen.

En las estimaciones del número de células con el fraccionador óptico se ha respetado siempre una zona de guarda, que trata de evitar los sesgos en la cantidad de células debidos a la pérdida de partículas en las superficies de las secciones que pueden ocurrir durante su procesamiento histoquímico y, especialmente, al ser cortado en el microtomo de congelación. A este respecto, el estudio de Gardella y cols. (2003) demostró que la densidad de partículas en todo el espesor de las secciones que han sido cortadas en el microtomo de congelación era bastante uniforme, indicando que no existía una distorsión diferencial a lo largo del eje z. Sin embargo, estos autores sí observaron una tendencia a que la densidad de partículas aumentara en porciones medias del grosor del corte, hecho que asociaron, o bien a una ligera compresión de las superficies superior e inferior del corte, que no se produce en el centro, o bien a la pérdida de partículas en esas superficies externas, que sería uno de los fenómenos englobados en lo que se conoce como el efecto “lost caps” (Andersen y Gundersen, 1999). El trabajo de Berreta y cols. (2007) demostró que el número total de células estimadas en varios núcleos de CA sin mantener zonas de guarda fue de media un 25-27 % menor que el obtenido con un diseño de disector óptico que evitaba el contaje en esas zonas de guarda. El estudio de calibración que realizamos en este trabajo antes de comenzar la estimación del número de neuronas puso de manifiesto que la altura del disector y las zonas de guarda elegidas para este estudio eran apropiadas (véase la Figura 4). En la Figura 4 puede observarse que existe una cantidad de neuronas menor en las superficies superior e inferior del corte, hecho que concuerda con el estudio de calibración descrito en el trabajo de Dorph-Petersen y cols. (2008) e indica que la distribución de células en el eje z muestra un mayor grado de variabilidad que el descrito por Gardella y cols. (2003).

En los contajes de células usando el disector óptico se ha considerado como unidad de contaje el nucleolo siempre que éste fuera visible en la tinción, como en el caso del contaje del número total de neuronas visualizadas con Nissl, ya que el menor tamaño del nucleolo cumple los dos requisitos de la sonda del disector óptico: que cada célula pueda ser contada solamente una vez y que todas las células tengan la misma probabilidad de ser contadas (Boyce y cols., 2010). Cuando el nucleolo no era visible se ha usado el núcleo como unidad de contaje, como en el caso de las IN PV+ y CR+. Además, en lugar de utilizar la media común del grosor del corte, calculamos la media de las medidas de grosor de numerosos dissectores ponderada por el número

de células contadas en dichos disectores; esta medida del grosor proporciona una estimación más fiable del número de células en los casos en los que el corte se comprime siguiendo un patrón no uniforme, lo que ocurre en los últimos pasos del procesamiento en congelación (Dorph-Petersen y cols., 2001; Bermejo y cols., 2003).

Aunque las muestras de tejido humano utilizadas en este estudio estaban catalogadas como muestras controles por las instituciones donantes, las causas de fallecimiento son muy diversas (véase la Tabla 2) y algunas de ellas, especialmente los problemas cardíacos o de carcinoma, podrían haber influido en la cantidad de células del CA, y especialmente en las endoteliales. Otro punto crítico al estimar el número total de células en las subdivisiones del CA con el fraccionador óptico es la delimitación clara de dichas subdivisiones. En este aspecto hemos seguido con bastante aproximación los límites propuestos por Sims y Williams (1990) y Schumann y Amaral (2005), incorporando algunas variaciones que consideramos necesarias para evitar en lo posible ambigüedades o posibles confusiones en la delimitación nuclear.

Para estudiar la intensidad y la distribución de la inervación dopaminérgica del CA humano hemos utilizado la tinción inmunohistoquímica frente al DAT por dos motivos: 1. porque debido a la inestabilidad de la dopamina, su inmunodetección en tejido cerebral que no se ha fijado por perfusión inmediatamente después del fallecimiento del donante no es posible; 2. porque la enzima TH, muy habitualmente utilizada como marcador fenotípico de dopamina, es común para la síntesis de todas las catecolaminas y está presente también en fibras noradrenérgicas y adrenérgicas del CA (Goldstein y cols., 1974; Farley y Hornykiewicz, 1977; Sadikot y Parent, 1990; Freedman y Shi, 2001), y se sabe que los grupos noradrenérgicos A5 y A7 (Kemper y cols., 1987) proyectan a la mayoría de los núcleos amigdalinos de primates (Cho y Fudge, 2010).

5.2. Volúmenes regionales y número y densidad de células en el CA

5.2.1. Volumen regional del CA y sus subdivisiones territoriales

El volumen del CA humano es de aproximadamente 950 mm³, estando más del 80 % de ese volumen ocupado por el grupo basolateral, el 10 % por el grupo corticomedia y el 6 % por el central. Estas estimaciones de volumen obtenidas en el presente trabajo están dentro del rango de las descritas previamente por otros autores

(Heckers y cols., 1990; Pakkenberg, 1990; Chance y cols., 2002; Schumann y Amaral, 2006; Berretta y cols., 2007; Kreczmanski y cols., 2007), aunque en el caso del volumen total del CA, el valor estimado en nuestro estudio es menor que el que proporciona el trabajo de Schumann y Amaral (2006) (véase la Tabla 23). Esta diferencia muy probablemente es debida a que estos autores incluyen dentro del CA estructuras como el núcleo del tracto olfatorio lateral, el área amigdalina anterior, la corteza periamigdalina y el área amigdalohipocampal, las cuales no han sido incluidas en este estudio debido a la dificultad de delinear sus contornos de forma precisa y objetiva. En el caso de los volúmenes de los núcleos individuales del CA estimados por estos mismos autores los valores se acercaban más a los obtenidos en este trabajo, aunque seguían siendo aún algo mayores sobre todo en los núcleos basal y lateral. Existen en la literatura otros estudios (Chance y cols., 2002; Berretta y cols., 2007) que refieren estimaciones menores de volumen que las descritas en este trabajo, llegando a una diferencia de hasta un 35 %, y estas diferencias pueden ser debidas o bien a que el encogimiento del tejido durante su procesamiento fuera mayor que el nuestro o a una falta de equivalencia en la delimitación de los núcleos. En el caso de Chance y cols. (2002) las diferencias en volumen son aproximadamente de un 33 %, y podrían proceder del uso de parafina como medio de inclusión, ya que se sabe que este procedimiento produce un encogimiento en volumen de aproximadamente el 50 % (Dorph-Petersen y cols., 2001); la escasez de información que proporcionan estos autores en cuanto a su delimitación nuclear impide compararla con de nuestro estudio. En el trabajo de Berreta y cols. (2007), las diferencias de volumen con respecto a las descritas en este estudio son de un 38 % menores y podrían estar relacionadas con el hecho de que el tejido humano que utilizan fue sumergido en paraformaldehído durante tres semanas lo que pudo haber provocado un mayor grado de encogimiento que con nuestro protocolo de fijación, en el que solamente se sumergía el tejido en este fijador durante 4-5 días; además, aunque según los datos proporcionados por los autores la delimitación de los núcleos lateral y basal parece similar a la del presente estudio, los límites de los núcleos accesorio basal y cortical difieren bastante, sobre todo a niveles anteriores.

Los estudios anteriores al presente trabajo que han analizado el volumen del CA se han centrado en calcular el volumen del CA en su conjunto y en algunos de sus grupos nucleares, pero ninguna investigación hasta ahora había analizado el volumen

en todas las subdivisiones nucleares del CA humano. Estos datos pueden ser de gran utilidad para futuros estudios encaminados a detectar variaciones en el tamaño de territorios amigdalinos concretos que podrían ocurrir en patologías neurológicas o psiquiátricas, tales como el trastorno bipolar o la esquizofrenia. De hecho, existen numerosos estudios que han determinado el volumen del CA en trastornos psiquiátricos como la esquizofrenia, el trastorno bipolar o la depresión mayor (Heckers y cols., 1990; Pakkenberg, 1990; Chance y cols., 2002; Kreczmanski y cols., 2007; Hajek y cols., 2008) y se ha visto que el tamaño de esta estructura en los pacientes esquizofrénicos sufre variaciones a la baja estimadas en un 11 % en su núcleo basal y entre un 12 y un 17 % en su núcleo lateral (Kreczmanski y cols., 2007), y en pacientes con trastorno bipolar una reducción del núcleo lateral de hasta un 29 %.

Tabla 23. Estimaciones de volumen regional, y del número y densidad neuronal en estudios previos y en este trabajo

Estructura neural	Schumann y Amaral, 2006			Berreta y cols., 2007			Presente estudio		
	N	V	Nv	N	V	Nv	N	V	Nv
Lateral	4	452	8.980	2,07	243	8.598	5,48	376	14.608
Basal	3,24	343	9.380	1,23	151	8.173	5,02	259	19.510
Accesorio basal	1,28	152	8.600	0,59	69	8.519	1,73	123	14.178
Cortical	-	-	-	0,41	44	9.118	1,14	69	15.918
Central	0,36	34	10.610	-	-	-	0,82	60	13.713
CA total	12,21	1380	8.870	-	-	-	15,39	956	16.088

N: número de neuronas; V: volumen regional (mm³); Nv: densidad neuronal (neuronas/mm³); -: estimaciones no realizadas en estos trabajos.

5.2.2. Número y densidad de neuronas, glía y células endoteliales

El CA humano contiene aproximadamente 15 millones de neuronas con casi el 80 % dentro del grupo basolateral, el 10 % en el grupo corticomedia y el 5 % en el grupo central. El número de células endoteliales es bastante similar al de neuronas mientras que el número de células de glía es aproximadamente cuatro veces superior al de neuronas, y esta proporción se mantiene en la mayoría de las subdivisiones nucleares del CA. La proporción glía-neurona del CA difiere de la observada en la corteza cerebral humana, donde se ha estimado que oscila entre el 1,55 al 2,19 dependiendo del área cortical examinada (Sherwood y cols., 2006). En otras

estructuras subcorticales, se ha visto que este valor es de 3 en el núcleo accumbens y puede subir hasta 14 en el núcleo dorsomedial del tálamo y el pálido ventral (Pakkenberg, 1990). El trabajo de Dall'Oglio y cols. (2012) describe una proporción glía-neurona en el núcleo medial del CA humano bastante similar a la encontrada en el presente trabajo (2,65 frente a 3,13, respectivamente).

Varios estudios previos han proporcionado datos cuantitativos de neuronas o de células de glía en el CA pero casi ninguno analiza en el mismo trabajo ambos tipos celulares y solamente el trabajo descrito en este volumen estima datos de los tres tipos celulares: neuronas, glía y células endoteliales. En términos de número de neuronas, nuestras estimaciones son comparables, aunque ligeramente más elevadas, a las de Schuman y Amaral (2006) y Kreczmanski y cols. (2007) en los núcleos lateral, basal y accesorio basal, que son los núcleos analizados por estos autores (véase la Tabla 23). Sin embargo, Berreta y cols. (2007) en estos mismos núcleos encontraron números de neuronas considerablemente menores (véase la Tabla 23). Estas variaciones en el número de neuronas son probablemente debidas a las diferencias en la delimitación de los núcleos del CA, lo cual podría explicar también los menores volúmenes de los núcleos del CA estimados por estos autores en comparación con los nuestros. Un aspecto metodológico importante que afecta a los contajes de las células y puede ser el responsable de las variaciones en la cantidad de neuronas descritas en el presente trabajo y en los estudios previos es el hecho de que nosotros, a diferencia del resto, hemos calculado el grosor medio para cada corte teniendo en cuenta el número de neuronas en cada posición en la que se medía el grosor del corte (lo que se denomina grosor medio de la sección ponderado por número) (Dorph-Petersen y cols., 2001; Bermejo y cols., 2003), lo cual proporciona estimaciones de número más fiables en los casos en los que el grosor de los cortes se comprime siguiendo un patrón no uniforme, lo cual es bastante probable en tejido cortado en congelación y deshidratado. El resto de los estudios usaron para sus contajes el grosor medio sin ponderarlo por el número de células, introduciendo así un sesgo en la estimación del número total de células cuando el encogimiento en el eje z es muy heterogéneo.

En términos de densidad neuronal, nuestras estimaciones son bastante similares a las descritas por Bowley y cols. (2002) para el CA total (14.158 frente a 16.090 neuronas/mm³ estimadas en este trabajo) o a las de Kreczmanski y cols. (2007) para el núcleo lateral (11.000 frente a 14.610 neuronas/mm³ de este estudio). Sin

embargo, las densidades neuronales referidas por Schuman y Amaral (2006) o Berreta y cols. (2007) para el CA completo y para algunos de sus núcleos fueron menores que las obtenidas en nuestro estudio (véase la Tabla 23). En el caso del trabajo de Schuman y Amaral (2006) esas diferencias eran previsibles ya que, como se ha mencionado previamente, estos autores estimaron menores números de neuronas y mayores volúmenes regionales, comparados con los nuestros. Sin embargo, en el caso de la cuantificación realizada por Berreta y cols. (2007), sus valores comparados con los nuestros fueron menores tanto en el número de neuronas como en los volúmenes regionales, pero la diferencia en el número de neuronas es de aproximadamente el doble de la diferencia en los volúmenes regionales (véase la Tabla 23). Al comparar la densidad de neuronas entre los distintos núcleos del CA, las variaciones fueron consistentes con las referidas en los estudios previos excepto en que nuestros resultados indican que la mayor densidad neuronal se da en el núcleo basal y en los otros trabajos es mayor en el núcleo cortical o en el central. La mayor densidad neuronal del núcleo basal se explica por la altísima densidad que tiene su subdivisión parvocelular, la cual contiene el doble de densidad del resto de los núcleos del CA, y porque dentro de esta región incluimos el área paralamina, que alberga una agrupación numerosa de neuronas inmaduras en el cerebro adulto (Yachnis y cols., 2000; Zhang y cols., 2009; Decampo y Fudge, 2012). El trabajo de Dall'Oglio y cols. (2012) proporciona una densidad de neuronas y de células de glía en el núcleo medial mucho mayor que la estimada en este estudio (153.000 frente a 16.800 neuronas/mm³ y 406.000 frente a 52.670 células de glía/mm³). Esta gran diferencia se debe muy probablemente a que en sus estimaciones de densidad no tienen en cuenta las variaciones del volumen del tejido durante su procesamiento histológico, ya que utilizan el grosor del corte sin corregir su posible encogimiento y por ello consideran un volumen de tejido mucho menor que el original. En este estudio en particular el encogimiento puede ser especialmente grande debido a la larga fijación que realizan en paraformaldehído al 10 % (de 1 a 42 meses) y, sobre todo, al corte en el vibratomo, que se sabe que produce un encogimiento anisotrópico tanto en los ejes x-y como en el z de las secciones, y a los pasos finales de deshidratación del tejido previos a su observación (Dorph-Petersen y cols., 2001).

Recientemente, el estudio de Carlo y cols. (2010) ha analizado el número de neuronas y el volumen de distintos núcleos y subdivisiones nucleares del CA de varias

especies de primates no humanos: *Macaca mulatta* (mono rhesus), *Macaca nemestrina* (macaco cola de cerdo), *Macaca fascicularis* (macaco cangrejero), *Callithrix jacchus* (titi común), y *Cebus apella* (capuchino de cabeza dura). Aunque sus números y volúmenes son menores que los obtenidos en este estudio en el cerebro humano, las proporciones que describen entre núcleos y entre sus subdivisiones son muy similares a las nuestras. Además, estos autores encontraron que el volumen del núcleo central y su número de neuronas se incrementan a lo largo de la escala evolutiva de los primates de manera mucho menos acentuada que los del resto de núcleos del CA, especialmente los del grupo basolateral, que son los que experimentan la mayor tasa de crecimiento.

Los números y densidades de células de glía obtenidos en este estudio son consistentes con lo descrito en trabajos previos (Bowley y cols., 2002; Hamidi y cols., 2004). La alta densidad de glía encontrada en el núcleo lateral puede estar relacionada con las numerosos axones mielínicos que atraviesan este núcleo, probablemente debido a que esta región del CA es la entrada principal de fibras procedentes de cortezas asociativas sensoriales (Price, 2003; Freese y Amaral, 2009). Según esto, y ya que los oligodendrocitos son el tipo de célula glial cuyo número disminuye en algunas enfermedades psiquiátricas (Hamidi y cols., 2004), el núcleo lateral podría estar especialmente afectado en este sentido, al igual que lo está su densidad neuronal, volumen nuclear y el tamaño de las neuronas en la esquizofrenia, trastorno bipolar o autismo (Schumann y Amaral, 2006; Berretta y cols., 2007; Kreczmanski y cols., 2007).

En cuanto a las células endoteliales, en este estudio hemos visto que su número es similar al de las neuronas tanto en el CA completo como en sus núcleos y subdivisiones nucleares. Además, tal y como se discute más adelante, hemos observado que con la edad se produce un aumento en la densidad endotelial en algunos núcleos del CA. Hasta la fecha ningún otro estudio se ha centrado en determinar el número y la densidad de células endoteliales en el CA ni en situación control ni en condiciones patológicas. En la corteza parietal del mono, Konopaske y cols. (2008) estimaron 25.000 células endoteliales/mm³ y esta densidad aumentaba en monos que habían sido tratados con antipsicóticos.

5.2.3. Efecto de la edad en el volumen regional y el número de neuronas, glía y células endoteliales

La comprensión de los cambios celulares que puedan ocurrir en el CA durante el envejecimiento de un individuo sano es importante para poder diferenciar estas alteraciones de las ocasionadas por procesos patológicos de tipo neurológico o psiquiátrico. En el presente trabajo hemos aprovechado el amplio rango de edades de los casos experimentales para analizar cómo varían las cantidades de células del CA durante el envejecimiento, y nuestros resultados muestran que en edades avanzadas el número y la densidad de neuronas tiende a disminuir y el número y densidad de células endoteliales a aumentar. Este efecto se observó en la mayoría de regiones del CA, tal y como se ve en los elevados coeficientes de correlación del número o la densidad de estas células; sin embargo, solamente se alcanzó la significación estadística en regiones de gran tamaño como es el CA en su conjunto o el complejo nuclear basolateral. El hecho de no alcanzar la significación estadística puede deberse a un bajo poder del análisis estadístico por el reducido tamaño muestral utilizado y al hecho de que no se hayan incluido casos experimentales con una distribución de edades más equilibrada. Además, el hecho de que el efecto de la edad sobre el número absoluto de neuronas no sea significativo, y sí lo sea sobre la densidad neuronal, resulta paradójico debido a que la densidad se calcula a partir del número y el volumen y éste presentó coeficientes de correlación cercanos a cero en el CA y en el grupo basolateral. Aunque este trabajo demuestra una tendencia clara en las variaciones de la cantidad de neuronas y células endoteliales con la edad, se hace necesario abordar este estudio contando con una muestra de casos más amplia y cuidando que haya una distribución de edades más homogénea. En el caso de las células de glía, se observó un moderado aumento en la mayoría de regiones del CA que en ningún caso fue estadísticamente significativo.

Pakkenberg y Gundersen (1997) encontraron un 10 % de reducción en el número de neuronas en la neocorteza de individuos ancianos. Estos autores encontraron en los mismos individuos una reducción del volumen de sustancia blanca que pensaron que estaría relacionada con una degeneración de las fibras miélicas y que podría ser responsable de la pérdida de función cerebral según avanza la edad. Como se ha mencionado anteriormente, nuestros resultados indican que el número y densidad de células gliales en la sustancia gris de los núcleos del CA tienden a

aumentar moderadamente con la edad, lo cual podría ser un mecanismo compensatorio o una respuesta de la población glial a la pérdida neuronal. Tanto la gliosis como la pérdida de fibras mielínicas han sido descritas como procesos de distintas etapas de la degeneración que ocurre con la edad (Beach y cols., 1989); en las enfermedades neurodegenerativas ocurren mecanismos similares en los cuales los astrocitos aumentan tanto en tamaño como en número en la corteza cerebral (Kushner y cols., 1991; Muramori y cols., 1998; Burzynska y cols., 2010; Middeldorp y Hol, 2011).

Es interesante destacar que la subdivisión parvocelular del núcleo basal es la única región del CA que no mostró un coeficiente de correlación negativo entre el número de neuronas y la edad. Este resultado puede explicarse por el hecho de que esta subdivisión del núcleo basal incluye la región paralamina, la cual contiene una población de neuronas inmaduras en el cerebro adulto que podría contrarrestar la disminución del número de neuronas (Yachnis y cols., 2000; Zhang y cols., 2009).

En términos de densidad endotelial, las mayores correlaciones se encontraron en el CA y en los grupos basolateral y corticomedia. Por otro lado, se ha visto que el flujo sanguíneo en el CA disminuye en edades avanzadas (Asllani y cols., 2009) y que la exposición crónica a ambientes hipóxicos puede conllevar adaptaciones estructurales y funcionales de la microvasculatura cerebral, incluyendo un aumento en la densidad de capilares (LaManna y cols., 2004). Estos estudios defienden la hipótesis de que el aumento del número y densidad de células endoteliales en el CA y en la mayoría de sus núcleos durante el envejecimiento sería una adaptación para contrarrestar la disminución de flujo sanguíneo relacionada con la edad que tendría como objetivo mantener la oxigenación suficiente en esas regiones. Sin embargo, se sabe que esos mecanismos adaptativos también disminuyen con la edad (LaManna y cols., 2004), y dejarían de ser eficientes para contrarrestar la pérdida neuronal observada en los individuos de edad avanzada en nuestro estudio.

En cuanto a las variaciones del volumen del CA, varios estudios de neuroimagen indican que durante el envejecimiento se produce una disminución en el volumen de la sustancia gris del CA (Mu y cols., 1999; Grieve y cols., 2011). Sin embargo, nuestro trabajo no ha demostrado cambios estadísticamente significativos del volumen del CA en su conjunto ni del de ninguna de sus subdivisiones con la edad

de fallecimiento de los individuos. El volumen del núcleo accesorio basal, y específicamente el de su subdivisión dorsal, sí presentó un alto coeficiente de correlación positivo con la edad que probablemente se deba al aumento significativo de las células de glía que se observa en esta región del CA.

5.3. Distribución y número de las interneuronas PV+ y las CR+ del CA

Las IN del CA desempeñan una importante acción inhibitoria sobre las neuronas de proyección y cooperan en la actividad sincrónica de la amígdala y el hipocampo necesaria para la formación de memorias emocionales (Bienvenu y cols., 2012). De hecho, en algunas enfermedades como el trastorno de ansiedad o la depresión se ha visto una alteración en la expresión de las proteínas ligadoras de calcio contenidas por algunas IN del CA (Yilmazer-Hanke y cols., 2002) o de la corteza cerebral (Lewis, 2000; Lewis y cols., 2005; Helmeke y cols., 2008; Maciag y cols., 2010). Con el fin de conocer la distribución y la cantidad de IN en el CA humano, en este estudio nos hemos propuesto estudiar las poblaciones de IN del CA que contienen PV y CR, estimando su número absoluto y su densidad, aportando nuevos datos a la escasa bibliografía existente en el cerebro humano sobre este tema.

La distribución de las IN PV+ en el CA humano había sido analizada en los trabajos de Sorvari y cols. (1995) y Pantazopoulos y cols. (2006). Los resultados de estos autores concuerdan exactamente con los nuestros en que las IN PV+ se restringen prácticamente al grupo basolateral, existiendo sólo algunas IN aisladas en el grupo corticomedia. Dentro del grupo basolateral el mayor número de IN PV+ se localiza en la porción más lateral del núcleo lateral y disminuye en sentido lateromedial hasta llegar al núcleo accesorio basal donde su número es mucho menor. Además, en el núcleo basal el número de estas neuronas sigue un gradiente decreciente dorsoventral, con una densidad celular mucho mayor en la subdivisión magnocelular que en la intermedia (54,90 frente a 6,94 IN PV+/mm³). Aunque el significado funcional de estas diferencias en la densidad de IN PV+ no se sabe, es posible que tengan que ver con la magnitud de la inhibición que ejercen sobre las neuronas de proyección. Esta idea está basada en los resultados del trabajo de Sorvari y cols. (1996a) que demostraron que estas neuronas establecen sinapsis de tipo inhibitorio con las neuronas de proyección; en el núcleo lateral estas sinapsis se hacen

sobre el segmento inicial del axón de dichas neuronas y en el núcleo basal formando cestas perineuronales PV+ sobre el soma y dendritas primarias de las de proyección del CA. Los estudios existentes en roedores sobre las IN PV+ del CA (Kemppainen y Pitkanen, 2000; McDonald y Betette, 2001; McDonald y Mascagni, 2001) muestran, en términos generales, una distribución similar a la observada en el CA humano, lo que indica que puede tratarse de una población neuronal cuya función inhibitoria se halle muy conservada en todas las especies.

A diferencia de las IN PV+, las CR+ abundan en todos los núcleos amigdalinos y son muchísimo más numerosas. De acuerdo con nuestro estudio, la mayor densidad de IN CR+ ocurre en el el núcleo medial (3.430 IN CR+/mm³), seguido del núcleo cortical (3.090 IN CR+/mm³), y la menor densidad en el núcleo central (1.212 IN CR+/mm³). El resultado de la mayor densidad en el núcleo medial contrasta con el dato aportado por Sorvari y cols. (1996c) que indica que el núcleo medial tiene menor densidad celular que el núcleo cortical anterior, y esta discrepancia parece ser debida al hecho de que estos autores incluyen dentro del núcleo cortical anterior a una parte de lo que en nuestro estudio ha sido incluido dentro del núcleo medial. De cualquier modo, es evidente que la mayor cantidad de IN CR+ se encuentra en el grupo corticomedial del CA, donde podrían jugar un papel importante relacionado con el sistema olfatorio. Las proporciones de IN CR+ entre las subdivisiones de los núcleos basal y accesorio basal descrita en este estudio concuerdan con las publicadas por Sorvari y cols. (1996c), aunque según nuestras observaciones, la subdivisión parvocelular del núcleo basal apenas contiene IN CR+ y estos autores encuentran la misma densidad en las subdivisiones magnocelular y parvocelular. Esta diferencia puede deberse a que Sorvari y cols. (1996c), separan la región paralaminar, de baja densidad, de la subdivisión parvocelular, mientras que ambas regiones han sido consideradas como una sola en este trabajo. Por último, al igual que en nuestro estudio, estos autores encuentran gran cantidad de IN CR+ en el área amigdalina anterior y muy pocas en el grupo central.

Los estudios existentes en roedores sobre las IN CR+ del CA (Kemppainen y Pitkanen, 2000; McDonald y Mascagni, 2001) muestran una amplia distribución de estas neuronas en todos los núcleos del CA, al igual que ocurre en humanos. Sin embargo, las diferencias en densidad entre las distintas subdivisiones varían entre roedores y humanos; así, dentro del núcleo basal de la rata, la porción parvocelular es

la que más densidad de IN CR+ contiene y la magnocelular la que menos, mientras que en humanos hemos observado que la densidad es muy baja en esta región, siendo mayor la densidad en la porción intermedia y mucho mayor en la magnocelular.

Una peculiaridad encontrada en el CA humano con respecto a los roedores y primates no humanos se refiere al porcentaje de IN PV+ o CR+ con respecto al resto de IN, así como el porcentaje de cada tipo de IN con respecto al total de neuronas. En el grupo basolateral de roedores se ha descrito que las IN PV+ suponen entre un 19 y un 43 % de las IN totales y las CR+ entre un 17 y un 20 % (Kemppainen y Pitkanen, 2000) y en el de primates no humanos las IN PV+ suponen entre un 28 y un 37 % de la IN GABAérgicas mientras que las CR+ entre un 23 y un 27 % (Mascagni y cols., 2009). En rata, además, se ha estimado que las IN PV+ suponen un 6 % de las neuronas totales mientras que las CR+ un 4 % (Pinard y cols., 2008). Los datos del CA humano obtenidos en este trabajo indican que las IN PV+ fueron unas 40 veces menos abundantes que las CR en el grupo basolateral, y el porcentaje con respecto a las neuronas totales varió del 0,32 % para las IN PV+ al 12,5 % para las CR+; estos datos indican que las cantidades de ambas poblaciones de IN PV+ y CR+ disminuyen y aumentan, respectivamente, a lo largo de la escala filogenética, ganando notablemente en abundancia las IN CR+ sobre las PV+ en nuestra especie con respecto a roedores y primates no humanos. Estos hallazgos concuerdan en parte con las observaciones hechas en el estriado, donde la densidad de las IN PV+ se ha reducido mucho en la especie humana en comparación con el mono ardilla (que tiene mucha mayor densidad que la rata) y la rata (Wu y Parent, 2000); en el caso de las IN CR+ del estriado, su densidad es menor en humanos que en el mono ardilla y es similar a la de roedores. Estas diferencias sugieren que la función de cada una de las poblaciones de IN en el CA humano puede variar con respecto a la de otras especies animales, y que puede ser necesaria una mayor proporción de IN CR+ que de PV+ para desarrollar la acción inhibitoria de las IN sobre las neuronas de proyección.

5.4. Longitud y distribución de fibras DAT+ en el CA

Los resultados de este trabajo demuestran que el CA humano recibe una extensa, densa y heterogénea inervación dopaminérgica de fibras DAT+, cuya cantidad se ha determinado por primera vez en cada subdivisión de este complejo nuclear. Debido a que los grupos nucleares del CA poseen una gran variedad de

conexiones con la corteza cerebral, la formación del hipocampo, los ganglios basales, el tálamo, el hipotálamo y el tronco del encéfalo (para revisión véase Price y cols., 1987 y Freese y Amaral, 2009), conocer el contenido en axones DAT+ en cada uno de estos grupos nucleares se hace necesario para entender mejor la organización funcional interna de este complejo nuclear. Con este objetivo, en este estudio hemos estimado la longitud absoluta y la densidad de fibras DAT+ en los grupos nucleares, núcleos y subdivisiones nucleares del CA y, además, hemos calculado la relación entre la longitud absoluta de fibras DAT+ y el número total de neuronas (ratio $L_{\text{DAT+}}/N_{\text{NEU}}$) para tener una idea de la cantidad de fibras DAT+ por neurona que hay en cada territorio amigdalino.

Existen estudios previos que han analizado la distribución de la inmunorreactividad del DAT en el CA de primates, pero ninguno de ellos ha proporcionado datos cuantitativos de la cantidad de axones DAT+. La inmunorreactividad frente al DAT en el cerebro humano fue examinada inicialmente por Ciliax y cols. (1999), quienes observaron una cantidad relativamente alta de fibras varicosas en el núcleo basolateral del CA – que corresponde al núcleo basal del presente estudio – y en el núcleo central. Estos autores también describieron algunas fibras DAT+ más dispersas en el núcleo basomedial – que corresponde al núcleo accesorio basal del presente estudio – y en el núcleo lateral. Otros dos estudios llevados a cabo en primates no humanos pusieron de manifiesto la existencia de cantidades significativas de fibras TH+ o DAT+ en los núcleos basal (Sadikot y Parent, 1990; Freedman y Shi, 2001), central (Sadikot y Parent, 1990; Freedman y Shi, 2001) y lateral (Sadikot y Parent, 1990), además de algunas fibras TH+ dispersas en el núcleo accesorio basal y en otras regiones del CA como el área amigdalina anterior (de la cual una parte corresponde al área periamigdalina del presente estudio) o el área de transición corticoamigdalina (Sadikot y Parent, 1990). Nuestros resultados proporcionan datos acerca de la distribución de DAT en el CA humano, pero es difícil hacer comparaciones con los estudios citados anteriormente debido a las diferencias entre especies, y a que las descripciones de trabajos que utilizan TH como marcador de fibras no son comparables con las de trabajos que usan DAT. Nuestros datos muestran que los axones DAT+ en el CA humano inervan no solamente todo el complejo basolateral y el central, como se había descrito previamente (Ciliax y cols., 1999), sino también el complejo corticomédial del CA, así como el área

periamigdalina y el área de transición corticoamigdalina. Además, a diferencia de las descripciones previas (Ciliax y cols., 1999), nuestros datos indican que existe una cantidad muy similar de fibras DAT+ en los núcleos lateral, basal y accesorio basal del complejo basolateral. Estas observaciones cualitativas son además corroboradas por los datos cuantitativos del presente estudio, como se discutirá más adelante.

La distribución de los axones inmunoreactivos para el DAT en el CA humano es heterogénea no sólo cuando se compara la cantidad de esta proteína presente en los núcleos amigdalinos, lo que ya había sido anticipado en estudios previos, sino también entre las subdivisiones de un mismo núcleo. En este sentido, uno de los núcleos en los que hemos encontrado variaciones notables en la cantidad de inervación DAT+ es el lateral, donde la longitud de fibras DAT+ aumenta en sentido mediolateral desde unos 300 mm/mm³ en su subdivisión medial a 800 mm/mm³ en la subdivisión externa, que es la más lateral. Esta observación coincide con los resultados publicados por Ciliax y cols. (1999) en humanos y por Sadikot y Parent (1990) en primates no humanos que demostraron que dentro del núcleo lateral existe una distribución heterogénea tanto de fibras DAT como de fibras TH+, respectivamente, coincidiendo ambos en que éstas son especialmente abundantes en su región dorsolateral. El núcleo lateral es la diana principal de la información sensorial que proviene del exterior, y a su vez envía importantes proyecciones a los demás núcleos del CA (Pitkanen y cols., 1997; Pitkanen y Amaral, 1998). La subdivisión externa de este núcleo recibe la mayoría de estas proyecciones sensoriales, y el flujo de información continúa desde porciones laterales a mediales del núcleo, tal y como han demostrado estudios previos sobre las conexiones intraamigdalinas (Pitkanen y cols., 1997; Pitkanen y Amaral, 1998). Además, las neuronas del núcleo lateral que responden con menores latencias a estímulos sonoros asociados a un estímulo de miedo se cree que son aquellas que reciben proyecciones aferentes directas del tálamo auditivo y son las que más modifican su respuesta en el aprendizaje condicionado de miedo (Quirk y cols., 1995). La subdivisión medial del núcleo lateral, por otro lado, recibe información de áreas corticales de procesamiento de alto nivel (Ottersen, 1982; Berendse y cols., 1992; Phillips y LeDoux, 1992; Romanski y LeDoux, 1993). La cantidad de fibras DAT+ en las subdivisiones lateral y medial del núcleo lateral es claramente diferente y podría indicar que la inervación dopaminérgica es más abundante en el sector del núcleo implicado en recibir información sensorial. En el hipocampo, los axones DAT+

solamente están presentes en los dos tercios externos de la capa molecular del giro dentado, donde termina la vía perforante; lo que sugiere que la dopamina podría regular de forma rápida y selectiva la entrada desde la corteza entorrinal y los estadios tempranos del procesamiento de información en el hipocampo (Lewis y cols., 2001). De forma análoga, la dopamina liberada en los abundantes axones DAT+ del núcleo lateral, estaría regulando la entrada de información sensorial al CA.

A diferencia de lo que ocurre en los sectores medial y lateral del núcleo lateral, en este trabajo no hemos detectado variaciones significativas en la cantidad de fibras DAT+ entre las regiones anteriores y posteriores del mismo, lo que sí parece ocurrir en primates no humanos (Sadikot y Parent, 1990). Con respecto al núcleo basal, las observaciones cualitativas realizadas en humanos y en primates no humanos habían descrito una variación decreciente de regiones dorsomediales a ventrolaterales del núcleo (Sadikot y Parent, 1990; Ciliax y cols., 1999; Freedman y Shi, 2001) que coincide con los datos cuantitativos de nuestro trabajo, aunque estos autores definen además una gran densidad de terminales varicosas en la porción lateral de la subdivisión parvocelular del núcleo. Así, nuestros datos demuestran que la densidad de fibras DAT+ en el núcleo basal sigue un marcado gradiente decreciente en sentido dorsoventral, de forma que en la subdivisión magnocelular (dorsolateral) del núcleo basal hay un 40 % más de densidad que en la subdivisión parvocelular (ventromedial). Es importante destacar que al normalizar la longitud de axones DAT+ por el número total de neuronas en cada territorio del núcleo basal, la cantidad de fibras por neurona en la subdivisión magnocelular del núcleo basal es casi cuatro veces mayor que en la parvocelular. Dentro del núcleo basal existen numerosas conexiones entre sus subdivisiones (Pitkanen y cols., 1997; Pitkanen y Amaral, 1998) y el efecto fisiológico del DAT podría afectar a la conectividad entre las mismas. El contenido de fibras DAT+ del núcleo accesorio basal también disminuye de porciones dorsales a ventrales pero este gradiente es mucho menos acentuado.

El núcleo central recibe información del resto de núcleos amigdalinos y es una de las principales salidas del CA (Pitkanen y cols., 1997). Las proyecciones descendentes desde el núcleo central inervan amplios territorios ocupados por las células dopaminérgicas mesencefálicas (Price y Amaral, 1981), y a su vez, este núcleo es el que recibe la mayor inervación dopaminérgica inmunorreactiva frente al DAT de todo el territorio amigdalino. Si bien, se trata de una inervación heterogénea que

disminuye marcadamente en el eje mediolateral, lo que concuerda con el patrón de distribución de fibras TH+ descrito previamente en este núcleo (Sadikot y Parent, 1990). La gran cantidad de fibras que contienen DAT en el núcleo central es más del doble de la cantidad del complejo basolateral, la segunda estructura más densamente inervada del CA, indicando que las fibras DAT+ son más abundantes en las regiones de salida que en las principales entradas de este complejo nuclear. La cantidad de fibras DAT+ en el núcleo central se asemeja mucho a la del estriado; y de hecho, aunque no existen datos cuantitativos que confirmen estas observaciones, la densidad de este tipo de fibras en este núcleo del CA y en el putamen, cuando se observan en los mismos cortes de cerebro humano bajo el microscopio óptico, son muy similares.

La regulación de los niveles extracelulares de dopamina está controlada por mecanismos que difieren según las regiones cerebrales. Así, mientras que en el estriado y en el núcleo accumbens predomina la recaptación de dopamina, en la corteza prefrontal medial y en el CA se ha visto que la que la tasa de liberación supera a la de recaptación (Garris y Wightman, 1994); y estos hallazgos concuerdan con el hecho de que hay una mayor cantidad de DAT en el estriado que en las otras dos estructuras (Ciliax y cols., 1999).

En el núcleo central del CA del cerebro humano (Ciliax y cols., 1999) y del mono macaco (Freedman y Shi, 2001) se han descrito zonas parcheadas con una inmunorreactividad frente al DAT especialmente intensa. Al igual que estos autores, en este trabajo hemos observado zonas similares localizadas tanto dentro del núcleo central como en las regiones limítrofes entre los núcleos del grupo basolateral, y posiblemente se trate de las regiones conocidas como islas intercaladas (Sadikot y Parent, 1990; Sims y Williams, 1990; Sorvari y cols., 1995; Freedman y Shi, 2001; Cho y Fudge, 2010; Marcellino y cols., 2012). Al igual que en el estriado, las neuronas de proyección GABAérgicas del núcleo central y de otras regiones amigdalinas de tipo “estriatal” como las islas celulares intercaladas, que derivan todas ellas de la eminencia ganglionar lateral (Bupesh y cols., 2011), están sometidas a una intensa inervación dopaminérgica cuyo efecto puede estar regulado de forma rápida gracias a su contenido en DAT. Además, se ha descrito que las islas intercaladas del CA contienen una gran densidad de receptores dopaminérgicos de tipo D₁ y una moderada densidad de receptores D₂ (Maltais y cols., 2000).

Las proyecciones dopaminérgicas de estructuras corticales y subcorticales proceden principalmente del mesencéfalo ventral, el que, en primates, comprende dos grupos principales de células dopaminérgicas, las de los llamados *tier* dorsal y *tier* ventral (Haber y Fudge, 1997). Es importante destacar que no todas las neuronas dopaminérgicas expresan DAT y que dentro de los grupos dopaminérgicos mesencefálicos existe una población mezclada de neuronas dopaminérgicas DAT+ o DAT- (Haber y cols., 1995; Ciliax y cols., 1999; Sanchez-Gonzalez y cols., 2005). El CA recibe proyecciones primariamente desde el *tier* dorsal (Haber y cols., 1995), el cual está compuesto por células situadas en la sustancia negra *pars compacta* (SNpc, grupo dopaminérgico A9), el área tegmental ventral (ATV, grupo dopaminérgico A10) y el área retrorubral (RRF, grupo dopaminérgico A8) (Aggleton y cols., 1980; Mehler, 1980; Norita y Kawamura, 1980). En el mesencéfalo humano, la proteína DAT abunda en neuronas localizadas en el ATV lateral y en la SNpc, y es muy escasa en ATV medial (Ciliax y cols., 1999). En cuanto al ARN mensajero de DAT, éste es más abundante en el *tier* ventral que en el dorsal (Haber y cols., 1995). Recientemente, el estudio de Cho y Fudge (2010) en el mono macaco ha demostrado que el CA recibe una proyección aferente substancial del grupo A8 y de neuronas del *tier* ventral (que es una región que incluye la zona densocelular localizada dorsalmente a la sustancia negra *pars reticulata* (SNpr) y las columnas celulares dopaminérgicas que penetran en la profundidad de la SNpr). Los resultados de estos autores son especialmente novedosos en cuanto que, en contra de lo que comúnmente se piensa en base a las observaciones realizadas en roedores (Bjorklund y Dunnett, 2007), demuestran que el ATV no es la principal fuente de fibras dopaminérgicas al CA de primates, ya que éste recibe una amplia inervación dopaminérgica desde la SNpc y el RRF, y estas proyecciones podrían ser el origen de una parte importante de las fibras DAT+ observadas en el CA humano en este estudio.

El estudio de Cho y Fudge (2010) en primates no humanos ha demostrado que la amígdala extendida, que es una región que incluye, entre otras estructuras, a los núcleos central y medial, recibe una inervación dopaminérgica del mesencéfalo mayor que la que reciben los núcleos basal y accesorio basal. En sintonía con estos hallazgos, nuestros resultados han demostrado que la inervación DAT+ es mucho más abundante en el núcleo central de la amígdala extendida que en cualquier otra región del CA humano. Sin embargo, la densidad de fibras DAT+ en el núcleo medial es

muy escasa, con valores muy por debajo del resto de núcleos del CA con la excepción del núcleo cortical, lo que indica que la fuente de las proyecciones dopaminérgicas a los dos núcleos de la amígdala extendida en humanos debe ser distinta. La cantidad de axones DAT+ observada en los núcleos medial y cortical ha sido bastante similar, lo que sugiere que el grupo corticomediale en su conjunto pueda estar sometido a la misma regulación dopaminérgica. En el caso del núcleo central, nuestros resultados demuestran que sus subdivisiones medial y lateral son claramente distintas en cuanto a la cantidad de axones DAT+ que las inervan, reflejando una heterogeneidad funcional entre ambas subdivisiones. Se sabe que la subdivisión medial del núcleo central, a diferencia de la lateral, recibe proyecciones de todos los núcleos amigdalinos (Fudge y Tucker, 2009) y también del hipotálamo (Mehler, 1980; Amaral y cols., 1982). La gran abundancia en axones DAT+ de esta subdivisión medial podría reflejar que recibe una prominente proyección desde las neuronas de los *tier* dorsal y ventral, mientras que la proyección desde el mesencéfalo hacia la subdivisión lateral, así como hacia los núcleos basal y lateral, es notablemente menos abundante y se ha visto que no se origina en el *tier* ventral (Russchen, 1982; Cho y Fudge, 2010).

En su conjunto, nuestros resultados indican que los núcleos del CA humano que contienen una mayor abundancia de fibras DAT+ son los que reciben proyecciones desde el mesencéfalo ventral, tal y como se ha observado en primates (Cho y Fudge, 2010). Sin embargo, hemos observado que hay regiones como la subdivisión lateral del núcleo central que tienen una gran densidad de fibras DAT+ y que, de acuerdo con los datos existentes en la literatura, no reciben inervación desde el mesencéfalo ventral (Cho y Fudge, 2010). Estas regiones por tanto deben recibir proyecciones dopaminérgicas desde otras regiones fuera del mesencéfalo ventral. Una de estas posibles regiones es el núcleo parabraquial que inerva a los núcleos central y medial del CA (Mehler, 1980; Norita y Kawamura, 1980; Cho y Fudge, 2010) pero su contribución a la inervación DAT+ no parece probable puesto que se ha visto que alberga neuronas dopaminérgicas que no expresan el transportador (Sanchez-Gonzalez y cols., 2005); más aún, se ha visto que las neuronas que proyectan al CA no contienen la enzima TH (Cho y Fudge, 2010). La sustancia gris periacueductal también inerva al CA y sus neuronas dopaminérgicas (que corresponden con el grupo A11) expresan DAT (Sanchez-Gonzalez y cols., 2005) y proyectan a los núcleos central y medial (Aggleton y cols., 1980; Mehler, 1980; Norita y Kawamura, 1980;

Arsenault y cols., 1988; Kitahama y cols., 1998; Hasue y Shammah-Lagnado, 2002). Esta conexión dopaminérgica desde la sustancia gris periacueductal al CA puede ser de gran importancia funcional ya que se dirige específicamente hacia la subdivisión lateral del núcleo central, la cual conecta con la subdivisión medial del núcleo que a su vez proyecta de vuelta a la sustancia gris periacueductal controlando el comportamiento de “freezing” de los animales ante estímulos potencialmente peligrosos (Paré y Duvarci, 2012). En el núcleo dorsal del rafe existen también neuronas TH+ que proyectan al núcleo central del CA (Hasue y Shammah-Lagnado, 2002); pero queda todavía por determinar si estas neuronas expresan el DAT y, por lo tanto, pueden ser otra fuente de axones DAT+ al CA.

Hasta este momento no existen en la literatura estudios que se hayan centrado en analizar la localización ultraestructural del DAT en el CA de primates. Los datos existentes en la corteza cerebral indican que la mayoría de los perfiles DAT+ corresponden a axones finos no mielínicos que raramente forman sinapsis, mientras que los perfiles TH+ presentan diámetros más variables y las varicosidades que expresan TH contienen abundantes vesículas y tienden a formar sinapsis (Lewis y cols., 2001). Teniendo en cuenta estas observaciones, Lewis y cols. (2001) consideran que el DAT podría estar restringido a los segmentos axonales intervaricosos. Sin embargo, las características ultraestructurales de los perfiles DAT+ en el núcleo caudado se parecen mucho a las que presentan las fibras TH+ en la corteza cerebral, lo que indica que la localización y la función del DAT podría variar de unas regiones a otras. También es posible que las diferencias ultraestructurales entre los perfiles inmunorreactivos para TH y los que lo son para DAT se deban al hecho de que, a diferencia del DAT, la TH está presente no sólo en axones dopaminérgicos sino también en axones noradrenérgicos y adrenérgicos.

El estudio de trazado de conexiones combinada con electrofisiología realizado en ratones por Lammel y cols. (2008) demostró que las neuronas mesencefálicas que proyectan al grupo basolateral del CA y a la corteza cerebral presentan patrones de disparo diferentes y contienen menor cantidad de DAT que las que proyectan al núcleo accumbens. Sin embargo, en primates no humanos se ha calculado que un 92 % de las fibras que contienen TH en la corteza cerebral también expresan DAT, aunque éste se localice en regiones presuntamente no sinápticas (Lewis y cols., 2001). En el caso de la especie humana, el contenido en DAT de la corteza cerebral parece

ser menor que en primates no humanos (Ciliax y cols., 1999; Lewis y cols., 2001). Todo esto indica que el contenido en DAT de los axones dopaminérgicos varía mucho de una especie a otra y es necesario ser muy cuidadoso a la hora de extrapolar información de una especie a otra. Considerando la función de DAT como mecanismo de recaptación de la dopamina es importante tener en cuenta que este neurotransmisor también puede transportarse al interior de los terminales por medio del transportador de noradrenalina, tal y como se ha visto en la corteza prefrontal, la sustancia negra y en menor medida en el núcleo accumbens (Yamamoto y Novotney, 1998; Hoffman y Gerhardt, 1998). En la rata se ha visto que la inervación noradrenérgica del CA contiene el transportador (Zhang y cols., 2013) y podría ser responsable de la captación de la dopamina liberada en territorios amigdalinos que contengan poco DAT.

5.5. Relación topográfica entre las fibras dopaminérgicas y las IN PV+ y las CR+ en el CA

La última parte de este trabajo ha consistido en analizar a nivel de microscopía confocal si las fibras DAT+ que inervan los distintos núcleos del CA contactan con el dominio somatodendrítico de las dos poblaciones segregadas de IN, las que expresan PV y las que expresan CR. De acuerdo con estudios previos realizados en roedores, las fibras dopaminérgicas hacen contactos sinápticos tanto con neuronas de proyección (Asan, 1997; Asan, 1998; Muller y cols., 2009) como con IN (Brinley-Reed y McDonald, 1999; Pinard y cols., 2008; Muller y cols., 2009). En concreto, el estudio de Pinard y cols. (2008) demostró que las fibras dopaminérgicas establecen contactos sinápticos, habitualmente de tipo simétrico y de pequeño tamaño, con las poblaciones de IN PV+ y CR+ del CA; si bien el número de contactos con estas poblaciones de neuronas locales era considerablemente menor que el que se establece con neuronas de proyección. Estos autores también observaron que las fibras dopaminérgicas contactaban con las IN PV+ con mayor frecuencia que con las IN CR+, de forma que se calculó que las sinapsis de las fibras dopaminérgicas con las IN PV+ representaban un 40% de todas las sinapsis contabilizadas, mientras que con las CR+ este porcentaje disminuía a un 6%. El trabajo de Brinley-Reed y McDonald (1999) demostró que las fibras dopaminérgicas del CA forman unas cestas perineuronales en torno al soma de las neuronas de proyección y de las IN PV+ del CA y se ha visto que un 72 % de los

contactos que estas redes establecen sobre las IN PV+ son de tipo sináptico. La función de estas cestas perineuronales sobre las IN estaría relacionada con la fuerte inhibición observada en el grupo basolateral tras la liberación de la dopamina (Y Ben-Ari y Kelly, 1976; Loretan y cols., 2004) que afecta a la actividad de las neuronas de proyección. Brinley-Reed y McDonald (1999) calcularon que de un 10 a un 15 % de las IN PV+ recibían estas cestas perineuronales dopaminérgicas, las cuales no aparecían en otras poblaciones de IN como las que expresan el péptido intestinal vasoactivo, expresado por un 70 % de las IN CR+ en rata, o las que contienen el neuropéptido Y (Brinley-Reed y McDonald, 1999).

Los resultados descritos en el presente estudio indican que en el CA humano el número de contactos que las fibras DAT+ realizan con las IN CR+ es sensiblemente mayor que el que realizan con las IN PV+ (ratio contactos/neurona: 0,81 frente a 0,58); si bien es necesario completar este estudio a nivel de microscopía electrónica para determinar las características ultraestructurales de estos contactos. En cualquier caso, lo observado en el CA humano difiere de lo descrito en roedores y posiblemente esté relacionado con el hecho de que en esta especie las IN CR+ son mucho más abundantes que las IN PV+, y además están más homogéneamente distribuidas en todos los núcleos amigdalinos. Además, como se ha mencionado anteriormente, los porcentajes con respecto a las neuronas totales de las IN PV+ y las CR+ han disminuido y aumentado, respectivamente, en la especie humana en comparación con los primates no humanos y los roedores.

Los contactos que las fibras DAT+ establecen con las poblaciones de IN del CA pueden participar en la inducción de mecanismos de potenciación a largo plazo necesarios para la adquisición del condicionamiento del miedo, para los que se requiere la supresión de la inhibición *feedforward* que las IN gabaérgicas ejercen sobre las neuronas de proyección (Bissiere y cols., 2003). En el núcleo amigdalino lateral se ha visto que la dopamina tiene un efecto inhibitor sobre las IN de disparo rápido, que coinciden con las que expresan PV (Rainnie y cols. 2006), reduciendo así la inhibición sobre las neuronas de proyección. Se estima que cada una de estas IN pueden hacer contactos en cesto con el pericarion de hasta 100 neuronas de proyección (Rainnie y cols., 2006). Más recientemente, el trabajo de Chu y cols. (2012) ha demostrado que la dopamina bloquea la liberación de GABA desde las IN PV+ hasta las neuronas de proyección actuando sobre receptores presinápticos de tipo D₂, pero no afecta a la

liberación de GABA desde esta población de IN sobre otras neuronas locales. El bloqueo tanto de los receptores D_1 como D_2 en el grupo basolateral impide la adquisición del condicionamiento del miedo (Greba y Kokkinidis, 2000; Guarraci y cols., 2000; Greba y cols., 2001).

El significado funcional de la dopamina que se libera en las inmediaciones de las IN CR+ es mucho más desconocido que en el caso de las IN PV+. Las IN del CA que contienen CR presentan un patrón electrofisiológico de disparo “regular”, distinto del patrón de disparo “rápido” característico de las IN PV+ (Rainnie y cols., 2006). Además, no existe ningún estudio que haya demostrado que existan contactos sinápticos o aposiciones entre las IN CR+ y las neuronas de proyección, por lo que la innervación dopaminérgica de estas IN no debe tener un efecto tan directo sobre la actividad de las neuronas de proyección, como se ha visto con las PV+. El estudio de Sorvari y cols. (1998) en el núcleo lateral del CA humano demostró que las IN CR+ sinaptan con IN que contienen CB, las cuales sí establecen contactos sinápticos con las neuronas de proyección (Muller y cols., 2003). Estos autores proponen que, al igual que en el hipocampo (Gulyas y cols., 1992), las IN CR+ pueden participar en la sincronización y en la modulación de las proyecciones aferentes a las neuronas de proyección por medio de una desinhibición de las mismas mediada a través de otra población de IN, como son las CB+.

6. CONCLUSIONES

- 1) El CA humano contiene aproximadamente 15 millones de neuronas, una cantidad similar de células endoteliales y alrededor de cuatro veces más de células de glía. Estas proporciones entre las tres poblaciones celulares se mantienen prácticamente en todos los territorios amigdalinos. De la población total de neuronas del CA humano, el 80% se localiza en el grupo basolateral, el 10% en el grupo corticomedial y el 5% en el grupo central.
- 2) El CA humano en su conjunto tiene un volumen de 956 mm³, del que aproximadamente un 80 % corresponde al grupo basolateral, un 10 % al grupo corticomedial y un 6 % al grupo central.
- 3) La densidad media de neuronas, células de glía y endoteliales en todo el CA es de 16.000 neuronas/mm³, 17.500 células de glía/mm³ y 63.000 células endoteliales/mm³. La mayor densidad neuronal se encuentra en el núcleo basal, concretamente en su subdivisión parvocelular (28.000 neuronas/mm³), y la menor densidad neuronal en la subdivisión magnocelular del mismo núcleo (11.000 neuronas/mm³). En cuanto a la densidad de células de glía, el mayor valor se alcanza en la subdivisión externa del núcleo lateral (85.000 células de glía/mm³) y el menor en el área de transición córtico-amigdalina (40.600 células de glía/mm³). Por último, la mayor densidad de células endoteliales del CA se encuentra en la subdivisión dorsal del núcleo accesorio basal (21.000 células/mm³) y la menor en la subdivisión parvocelular del núcleo basal (13.500 células endoteliales/mm³).
- 4) El volumen del CA en su conjunto y de cada una de sus subdivisiones nucleares no se modifica con la edad de los individuos. Por el contrario, el número y la densidad de neuronas y de células endoteliales aumenta y disminuye, respectivamente, en función de la edad. La cantidad de células de glía, por el contrario, no se modifica significativamente aunque experimenta un leve aumento con la edad.
- 5) Las interneuronas inmunorreactivas para la proteína parvalbúmina se localizan mayoritariamente en el grupo basolateral, donde su densidad disminuye en sentido lateromedial, siendo de 71 neuronas/mm³ en el núcleo lateral y de 10 neuronas/mm³ en el accesorio basal. En los grupos corticomedial y central estas neuronas son

prácticamente inexistentes. El porcentaje que estas neuronas representan con respecto a las neuronas totales no alcanza el 1 % en ningún territorio amigdalino.

6) Las interneuronas inmunorreactivas para la proteína calretinina están distribuidas por todos los territorios amigdalinos, y su densidad varía de 3.400 neuronas/mm³ en el núcleo medial a 1.100 neuronas/mm³ tanto en la subdivisión lateral del núcleo central como en la subdivisión parvocelular del basal. El porcentaje que estas neuronas suponen con respecto a las neuronas totales varía de un 4 % a un 23 %, siendo mayor en la subdivisión lateral del núcleo cortical y menor en la subdivisión parvocelular del núcleo basal.

7) En los territorios del CA humano en los que coexisten ambas poblaciones de interneuronas, como son los núcleos del grupo basolateral, las calretinina positivas son hasta cuarenta veces más abundantes que las que contienen parvalbúmina. Esta proporción relativa de las dos poblaciones de interneuronas difiere de los datos descritos en el CA de roedores y de primates no humanos, donde las parvalbumina positivas son más abundantes que las que expresan calretinina. La variación en las proporciones de interneuronas observadas en el CA humano podría reflejar que el mecanismo inhibitorio sobre las neuronas de proyección es distinto al descrito en las otras especies.

8) Los axones inmunorreactivos para el DAT inervan todos los núcleos del CA, pero su cantidad varía notablemente en los núcleos y sus subdivisiones. De la longitud total de estos axones en el CA, el 75% se localizan en el complejo basolateral (con 385 metros), el 17 % en el grupo central (87 metros) y el 9 % restante se reparte entre el grupo corticomedial, el área periamigdalina y el área de transición córtico-amigdalina (47 metros).

9) La densidad de longitud de las fibras inmunorreactivas para el DAT muestra una gran variación entre los núcleos y sus subdivisiones. La mayor densidad de estos axones se encuentra en la subdivisión medial del núcleo central, con 1.700 mm/mm³, siendo este valor el doble del que existe en el grupo basolateral, que es el segundo grupo nuclear más inervado, y la menor densidad está en el núcleo cortical (200 mm/mm³). Dentro del grupo basolateral, la densidad es bastante homogénea en sus

tres núcleos pero varía notablemente entre las subdivisiones nucleares de cada uno de ellos. Así, entre las subdivisiones externa y medial del núcleo lateral, la densidad decrece de 800 a 300 mm/mm³, y de la subdivisión magnocelular a la parvocelular del núcleo basal disminuye de 860 a 530 mm/mm³. Algunas de las regiones del CA humano más inervadas por fibras DAT positivas, como son la subdivisión medial del núcleo central y el núcleo basal, reciben proyecciones abundantes del mesencéfalo ventral en primates no humanos. Sin embargo, el origen de los axones DAT+ de la subdivisión lateral del núcleo central podría estar en otras estructuras, como la sustancia gris periacueductal.

10) El valor de la longitud de fibras inmunorreactivas para el DAT con respecto al número total de neuronas en cada región amigdalina (ratio longitud absoluta de fibras DAT/número total de neuronas) varía entre los núcleos y sus subdivisiones de una manera bastante similar a como lo hace la densidad de inervación. En el núcleo central este ratio es cuatro veces mayor que el del grupo basolateral, ocho veces mayor que el del grupo corticomedia, y 1,3 veces mayor que el del área periamigdalina.

11) La gran densidad de fibras inmunorreactivas para el DAT en la subdivisión externa del núcleo lateral y en el núcleo central parece indicar que el efecto fisiológico de la dopamina está especialmente controlado en las principales estaciones de entrada y salida de información del CA. Por otra parte, la mayor inervación dopaminérgica de esos territorios puede estar asociada a que la liberación de dopamina es necesaria en el núcleo lateral para el condicionamiento de miedo y en el núcleo central para la generación de respuestas ante estímulos adversos.

12) Los axones dopaminérgicos inmunorreactivos para el DAT del CA contactan con el soma y con las dendritas de las interneuronas que contienen parvalbúmina y las que contienen calretinina, siendo más frecuentes los que se establecen con estas últimas. Aunque quedan por determinar las características ultraestructurales de estos contactos, es posible que a través de ellos estas fibras dopaminérgicas modulen la actividad de estas neuronas locales, las cuales a su vez inervan a las neuronas de proyección.

7. ABREVIATURAS

AB: núcleo accesorio basal

ABd: subdivisión dorsal del núcleo accesorio basal

ABv: subdivisión ventral del núcleo accesorio basal

AChE: acetilcolinesterasa

Astr: área de transición amigdaloesfiental

ATV: área tegmental ventral

B: núcleo basal

Bint: subdivisión intermedia del núcleo basal

BL: grupo basolateral

Bmc: subdivisión magnocelular del núcleo basal

Bpc: subdivisión parvocelular del núcleo basal

CA: complejo amigdalino

CB: calbindina

Ce: grupo central

Cel: subdivisión lateral del núcleo central

Cem: subdivisión medial del núcleo central

CM: grupo corticomedial

Co: núcleo cortical

Col: subdivisión lateral del núcleo cortical

Com: subdivisión medial del núcleo cortical

CR: calretinina

CTA: área de transición córtico-amigdalina

DAT: transportador de dopamina

IN: interneurona

L: núcleo lateral

Ld: subdivisión dorsal del núcleo lateral

Lex: subdivisión externa del núcleo lateral

Ll: subdivisión lateral del núcleo lateral

Lm: subdivisión medial del núcleo lateral

Me: núcleo medial

PA: área periamigdalina

PB: tampon fosfato

Put: putamen

PV: parvalvúmina

RRF: área retrorrubral

sls: surco semilunar (semiannular)

SNpc: sustancia negra *pars compacta*

SNpr: sustancia negra *pars reticulata*

SOM: somatostatina

TB: tampón Tris

TBS: tampón Tris salino

TH: tirosina hidroxilasa

8. BIBLIOGRAFÍA

- Aggleton J P (1985) A description of intra-amygdaloid connections in old world monkeys. *Exp Brain Res* 57(2): 390-9.
- Aggleton J P (1986) A description of the amygdalo-hippocampal interconnections in the macaque monkey. *Exp Brain Res* 64(3): 515-26.
- Aggleton J P, Burton M J y Passingham R E (1980) Cortical and subcortical afferents to the amygdala of the rhesus monkey (*Macaca mulatta*). *Brain Res* 190(2): 347-68.
- Aggleton J P y Mishkin M (1984) Projections of the amygdala to the thalamus in the cynomolgus monkey. *J Comp Neurol* 222(1): 56-68.
- Aggleton J P y Passingham R E (1981) Syndrome produced by lesions of the amygdala in monkeys (*Macaca mulatta*). *J Comp Physiol Psychol* 95(6): 961-77.
- Akil M, Pierri J N, Whitehead R E, Edgar C L, Mohila C, Sampson A R y Lewis D A (1999) Lamina-specific alterations in the dopamine innervation of the prefrontal cortex in schizophrenic subjects. *Am J Psychiatry* 156(10): 1580-9.
- Alheid G F y Heimer L (1988) New perspectives in basal forebrain organization of special relevance for neuropsychiatric disorders: the striatopallidal, amygdaloid, and corticopetal components of substantia innominata. *Neuroscience* 27(1): 1-39.
- Amaral D G (1986) Amygdalohippocampal and amygdalocortical projections in the primate brain. *Adv Exp Med Biol* 203: 3-17.
- Amaral D G, Avendano C y Benoit R (1989) Distribution of somatostatin-like immunoreactivity in the monkey amygdala. *J Comp Neurol* 284(2): 294-313.
- Amaral D G y Bassett J L (1989) Cholinergic innervation of the monkey amygdala: an immunohistochemical analysis with antisera to choline acetyltransferase. *J Comp Neurol* 281(3): 337-61.
- Amaral D G, Behniea H y Kelly J L (2003) Topographic organization of projections from the amygdala to the visual cortex in the macaque monkey. *Neuroscience* 118(4): 1099-120.
- Amaral D G e Insausti R (1992) Retrograde transport of D-[3H]-aspartate injected into the monkey amygdaloid complex. *Exp Brain Res* 88(2): 375-88.
- Amaral D G y Price J L (1984) Amygdalo-cortical projections in the monkey (*Macaca fascicularis*). *J Comp Neurol* 230(4): 465-96.
- Amaral D G, Price J L, Pitkanen A y Carmichael S T (1992). Anatomical organization of the primate amygdaloid complex. En J. P. Aggleton (ed): *The Amygdala: neurobiological aspects of emotion, memory and mental dysfunction*. Wiley-Liss, New York, pp. 1-66.
- Amaral D G, Veazey R B y Cowan W M (1982) Some observations on hypothalamo-amygdaloid connections in the monkey. *Brain Res* 252(1): 13-27.
- Andersen B B y Gundersen H J (1999) Pronounced loss of cell nuclei and anisotropic deformation of thick sections. *J Microsc* 196(Pt 1): 69-73.
- Araque A, Parpura V, Sanzgiri R P y Haydon P G (1999) Tripartite synapses: glia, the unacknowledged partner. *Trends Neurosci* 22(5): 208-15.

- Äriens Kappers C U, Huber G C y Crosby E C (1936). The comparative anatomy of the nervous system of vertebrates, including man. The Macmillan Company, New York.
- Arsenault M Y, Parent A, Seguela P y Descarries L (1988) Distribution and morphological characteristics of dopamine-immunoreactive neurons in the midbrain of the squirrel monkey (*Saimiri sciureus*). *J Comp Neurol* 267(4): 489-506.
- Asan E (1997) Ultrastructural features of tyrosine-hydroxylase-immunoreactive afferents and their targets in the rat amygdala. *Cell Tissue Res* 288(3): 449-69.
- Asan E (1998) The catecholaminergic innervation of the rat amygdala. *Adv Anat Embryol Cell Biol* 142: 1-118.
- Asllani I, Habeck C, Borogovac A, Brown T R, Brickman A M y Stern Y (2009) Separating function from structure in perfusion imaging of the aging brain. *Hum Brain Mapp* 30(9): 2927-35.
- Avendano C, Price J L y Amaral D G (1983) Evidence for an amygdaloid projection to premotor cortex but not to motor cortex in the monkey. *Brain Res* 264(1): 111-7.
- Barbas H y De Olmos J (1990) Projections from the amygdala to basoventral and mediodorsal prefrontal regions in the rhesus monkey. *J Comp Neurol* 300(4): 549-71.
- Beach T G, Walker R y McGeer E G (1989) Patterns of gliosis in Alzheimer's disease and aging cerebrum. *Glia* 2(6): 420-36.
- Ben-Ari Y y Kelly J S (1976) Dopamine evoked inhibition of single cells of the feline putamen and basolateral amygdala. *J Physiol* 256(1): 1-21.
- Berendse H W, Galis-de Graaf Y y Groenewegen H J (1992) Topographical organization and relationship with ventral striatal compartments of prefrontal corticostriatal projections in the rat. *J Comp Neurol* 316(3): 314-47.
- Bermejo P E, Jimenez C E, Torres C V y Avendano C (2003) Quantitative stereological evaluation of the gracile and cuneate nuclei and their projection neurons in the rat. *J Comp Neurol* 463(4): 419-33.
- Berretta S, Pantazopoulos H y Lange N (2007) Neuron numbers and volume of the amygdala in subjects diagnosed with bipolar disorder or schizophrenia. *Biol Psychiatry* 62(8): 884-93.
- Bezchlibnyk Y B, Sun X, Wang J F, MacQueen G M, McEwen B S y Young L T (2007) Neuron somal size is decreased in the lateral amygdalar nucleus of subjects with bipolar disorder. *J Psychiatry Neurosci* 32(3): 203-10.
- Bienvenu T C, Busti D, Magill P J, Ferraguti F y Capogna M (2012) Cell-type-specific recruitment of amygdala interneurons to hippocampal theta rhythm and noxious stimuli in vivo. *Neuron* 74(6): 1059-74.
- Bissiere S, Humeau Y y Luthi A (2003) Dopamine gates LTP induction in lateral amygdala by suppressing feedforward inhibition. *Nat Neurosci* 6(6): 587-92.
- Bjorklund A y Dunnett S B (2007) Dopamine neuron systems in the brain: an update. *Trends Neurosci* 30(5): 194-202.

- Boonstra H, Oosterhuis J W, Oosterhuis A M y Fleuren G J (1983) Cervical tissue shrinkage by formaldehyde fixation, paraffin wax embedding, section cutting and mounting. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol* 402(2): 195-201.
- Bowley M P, Drevets W C, Ongur D y Price J L (2002) Low glial numbers in the amygdala in major depressive disorder. *Biol Psychiatry* 52(5): 404-12.
- Boyce R W, Dorph-Petersen K A, Lyck L y Gundersen H J (2010) Design-based stereology: introduction to basic concepts and practical approaches for estimation of cell number. *Toxicol Pathol* 38(7): 1011-25.
- Braak H y Braak E (1983) Neuronal types in the basolateral amygdaloid nuclei of man. *Brain Res Bull* 11(3): 349-65.
- Brady D R, Carey R G y Mufson E J (1992) Reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-diaphorase (NADPH-d) profiles in the amygdala of human and New World monkey (*Saimiri sciureus*). *Brain Res* 577(2): 236-48.
- Brinley-Reed M y McDonald A J (1999) Evidence that dopaminergic axons provide a dense innervation of specific neuronal subpopulations in the rat basolateral amygdala. *Brain Res* 850(1-2): 127-35.
- Brockhaus H (1938) Zur normalen und pathologischen Anatomie des Mandelkerngebiets. *J Psychol Neurol* 49: 1-136.
- Bupesh M, Abellan A y Medina L (2011) Genetic and experimental evidence supports the continuum of the central extended amygdala and a multiple embryonic origin of its principal neurons. *J Comp Neurol* 519(17): 3507-31.
- Burdach K F (1819-1822). *Vom Baue und Leben des Gehirns*. Leipzig.
- Burgess C R, Oishi Y, Mochizuki T, Peever J H y Scammell T E (2013) Amygdala lesions reduce cataplexy in orexin knock-out mice. *J Neurosci* 33(23): 9734-42.
- Burzynska A Z, Preuschhof C, Backman L, Nyberg L, Li S C, Lindenberger U y Heekeren H R (2010) Age-related differences in white matter microstructure: region-specific patterns of diffusivity. *Neuroimage* 49(3): 2104-12.
- Carlo C N, Stefanacci L, Semendeferi K y Stevens C F (2010) Comparative analyses of the neuron numbers and volumes of the amygdaloid complex in old and new world primates. *J Comp Neurol* 518(8): 1176-98.
- Carmichael S T, Clugnet M C y Price J L (1994) Central olfactory connections in the macaque monkey. *J Comp Neurol* 346(3): 403-34.
- Carmichael S T y Price J L (1995) Limbic connections of the orbital and medial prefrontal cortex in macaque monkeys. *J Comp Neurol* 363(4): 615-641.
- Cavada C, Company T, Tejedor J, Cruz-Rizzolo R J y Reinoso-Suarez F (2000) The anatomical connections of the macaque monkey orbitofrontal cortex. A review. *Cereb Cortex* 10(3): 220-42.
- Ciliax B J, Drash G W, Staley J K, Haber S, Mobley C J, Miller G W, Mufson E J, Mash D C y Levey A I (1999) Immunocytochemical localization of the dopamine transporter in human brain. *J Comp Neurol* 409(1): 38-56.
- Ciliax B J, Heilman C, Demchyshyn L L, Pristupa Z B, Ince E, Hersch S M, Niznik H B y Levey A I (1995) The dopamine transporter: immunochemical characterization and localization in brain. *J Neurosci* 15(3 Pt 1): 1714-23.

- Ciocchi S, Herry C, Grenier F, Wolff S B, Letzkus J J, Vlachos I, Ehrlich I, Sprengel R, Deisseroth K, Stadler M B, Muller C y Luthi A (2010) Encoding of conditioned fear in central amygdala inhibitory circuits. *Nature* 468(7321): 277-82.
- Crosby E C y Humphrey T (1941) Studies of the vertebrate telencephalon, II. The nuclear pattern of the anterior olfactory nucleus. *J Comp Neurol* 74(2): 309-352.
- Chance S A, Esiri M M y Crow T J (2002) Amygdala volume in schizophrenia: post-mortem study and review of magnetic resonance imaging findings. *Br J Psychiatry* 180: 331-8.
- Chapman W P, Schroeder H R, Geyer G, Brazier M A, Fager C, Poppen J L, Solomon H C y Yakovlev P I (1954) Physiological evidence concerning importance of the amygdaloid nuclear region in the integration of circulatory function and emotion in man. *Science* 120(3127): 949-50.
- Chareyron L J, Banta Lavenex P, Amaral D G y Lavenex P (2011) Stereological analysis of the rat and monkey amygdala. *J Comp Neurol* 519(16): 3218-39.
- Cho Y T y Fudge J L (2010) Heterogeneous dopamine populations project to specific subregions of the primate amygdala. *Neuroscience* 165(4): 1501-18.
- Chu H Y, Ito W, Li J y Morozov A (2012) Target-Specific Suppression of GABA Release from Parvalbumin Interneurons in the Basolateral Amygdala by Dopamine. *J Neurosci* 32(42): 14815-20.
- Dall'Oglio A, Xavier L L, Hilbig A, Ferme D, Moreira J E, Achaval M y Rasia-Filho A A (2012) Cellular components of the human medial amygdaloid nucleus. *J Comp Neurol* 521(3): 589-611.
- Davey C G, Allen N B, Harrison B J y Yucel M (2011) Increased amygdala response to positive social feedback in young people with major depressive disorder. *Biol Psychiatry* 69(8): 734-41.
- Decampo D M y Fudge J L (2012) Where and what is the paralaminar nucleus? A review on a unique and frequently overlooked area of the primate amygdala. *Neurosci Biobehav Rev* 36: 520-535.
- Desjardins C y Parent A (1992) Distribution of somatostatin immunoreactivity in the forebrain of the squirrel monkey: basal ganglia and amygdala. *Neuroscience* 47(1): 115-33.
- Dorph-Petersen K A, Caric D, Saghafi R, Zhang W, Sampson A R y Lewis D A (2008) Volume and neuron number of the lateral geniculate nucleus in schizophrenia and mood disorders. *Acta Neuropathol* 117(4): 369-384.
- Dorph-Petersen K A, Nyengaard J R y Gundersen H J (2001) Tissue shrinkage and unbiased stereological estimation of particle number and size. *J Microsc* 204(Pt 3): 232-46.
- Drojda N, Nielsen H H, Gardi J E, Wree A, Peterson A C, Nyengaard J R, Eyer J y Finsen B (2010) Axonal plasticity elicits long-term changes in oligodendroglia and myelinated fibers. *Glia* 58(1): 29-42.
- Edmiston E K, McHugo M, Dukic M S, Smith S D, Abou-Khalil B, Eggers E y Zald D H (2013) Enhanced Visual Cortical Activation for Emotional Stimuli is

- Preserved in Patients with Unilateral Amygdala Resection. *J Neurosci* 33(27): 11023-31.
- Esclapez M, Tillakaratne N J, Tobin A J y Houser C R (1993) Comparative localization of mRNAs encoding two forms of glutamic acid decarboxylase with nonradioactive in situ hybridization methods. *J Comp Neurol* 331(3): 339-62.
- Everitt B (1995). Limbic lobe and olfactory pathways. En M. M. Berry, L. H. Bannistery, S. M. Standring: *Gray's anatomy*. Churchill Livingstone, London, pp. 1115-1141.
- Falls W A, Miserendino M J y Davis M (1992) Extinction of fear-potentiated startle: blockade by infusion of an NMDA antagonist into the amygdala. *J Neurosci* 12(3): 854-63.
- Fanselow M S y Gale G D (2003) The amygdala, fear, and memory. *Ann N Y Acad Sci* 985: 125-34.
- Farley I J y Hornykiewicz O (1977) Noradrenaline distribution in subcortical areas of the human brain. *Brain Res* 126(1): 53-62.
- Fox C A (1940) Certain basal telencephalic centers in the cat. *J Comp Neurol* 72: 1-62.
- Freedman L J y Shi C (2001) Monoaminergic innervation of the macaque extended amygdala. *Neuroscience* 104(4): 1067-84.
- Freese J L y Amaral D G (2005) The organization of projections from the amygdala to visual cortical areas TE and V1 in the macaque monkey. *J Comp Neurol* 486(4): 295-317.
- Freese J L y Amaral D G (2009). Neuroanatomy of the primate amygdala. En E. A. Phelps, P. J. Whalen: *The human amygdala*. The Guilford Press, New York, pp. 3-42.
- Friedman D P, Murray E A, O'Neill J B y Mishkin M (1986) Cortical connections of the somatosensory fields of the lateral sulcus of macaques: evidence for a corticolimbic pathway for touch. *J Comp Neurol* 252(3): 323-47.
- Fudge J L, Kunishio K, Walsh P, Richard C y Haber S N (2002) Amygdaloid projections to ventromedial striatal subterritories in the primate. *Neuroscience* 110(2): 257-75.
- Fudge J L y Tucker T (2009) Amygdala projections to central amygdaloid nucleus subdivisions and transition zones in the primate. *Neuroscience* 159(2): 819-841.
- Gallyas, F (1979) Silver staining of myelin by means of physical development. *Neurol Res* 1(2): 203-209.
- Gamer M, Zurowski B y Buchel C (2010) Different amygdala subregions mediate valence-related and attentional effects of oxytocin in humans. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107(20): 9400-5.
- Garavan H, Pendergrass J C, Ross T J, Stein E A y Risinger R C (2001) Amygdala response to both positively and negatively valenced stimuli. *Neuroreport* 12(12): 2779-83.

- Garcia-Cabezas M A, Martinez-Sanchez P, Sanchez-Gonzalez M A, Garzon M y Cavada C (2009) Dopamine innervation in the thalamus: monkey versus rat. *Cereb Cortex* 19(2): 424-34.
- Garcia-Cabezas M A, Rico B, Sanchez-Gonzalez M A y Cavada C (2007) Distribution of the dopamine innervation in the macaque and human thalamus. *Neuroimage* 34(3): 965-84.
- Gardella D, Hatton W J, Rind H B, Rosen G D, von Bartheld C S (2003) Differential tissue shrinkage and compression in the z-axis: implications for optical disector counting in vibratome-, plastic- and cryosections. *J Neurosci Methods* 124(1): 45-59.
- Garris P A y Wightman R M (1994) Different kinetics govern dopaminergic transmission in the amygdala, prefrontal cortex, and striatum: an in vivo voltammetric study. *J Neurosci* 14(1): 442-50.
- Geneser-Jensen F A y Blackstad T W (1971) Distribution of acetyl cholinesterase in the hippocampal region of the guinea pig. I. Entorhinal area, parasubiculum, and presubiculum. *Z Zellforsch Mikrosk Anat* 114(4): 460-81.
- Geschwind N (1965) Disconnexion syndromes in animals and man. *Brain* 88: 237-94.
- Ghashghaei H T y Barbas H (2002) Pathways for emotion: interactions of prefrontal and anterior temporal pathways in the amygdala of the rhesus monkey. *Neuroscience* 115(4): 1261-79.
- Giros B, Jaber M, Jones S R, Wightman R M y Caron M G (1996) Hyperlocomotion and indifference to cocaine and amphetamine in mice lacking the dopamine transporter. *Nature* 379(6566): 606-612.
- Goldman-Rakic P S y Porrino L J (1985) The primate mediodorsal (MD) nucleus and its projection to the frontal lobe. *J Comp Neurol* 242(4): 535-60.
- Goldstein M, Freedman L S, Ebstein R P y Park D H (1974) Studies on dopamine-beta-hydroxylase in mental disorders. *J Psychiatr Res* 11: 205-10.
- Greba Q, Gifkins A y Kokkinidis L (2001) Inhibition of amygdaloid dopamine D2 receptors impairs emotional learning measured with fear-potentiated startle. *Brain Res* 899(1-2): 218-26.
- Greba Q y Kokkinidis L (2000) Peripheral and intraamygdalar administration of the dopamine D1 receptor antagonist SCH 23390 blocks fear-potentiated startle but not shock reactivity or the shock sensitization of acoustic startle. *Behav Neurosci* 114(2): 262-72.
- Grieve S M, Korgaonkar M S, Clark C R y Williams L M (2011) Regional heterogeneity in limbic maturational changes: Evidence from integrating cortical thickness, volumetric and diffusion tensor imaging measures. *Neuroimage* 55(3): 868-79.
- Guarraci F A, Frohardt R J, Falls W A y Kapp B S (2000) The effects of intra-amygdaloid infusions of a D2 dopamine receptor antagonist on Pavlovian fear conditioning. *Behav Neurosci* 114(3): 647-51.
- Guarraci F A, Frohardt R J y Kapp B S (1999) Amygdaloid D1 dopamine receptor involvement in Pavlovian fear conditioning. *Brain Res* 827(1-2): 28-40.

- Gulyas A I, Miettinen R, Jacobowitz D M y Freund T F (1992) Calretinin is present in non-pyramidal cells of the rat hippocampus--I. A new type of neuron specifically associated with the mossy fibre system. *Neuroscience* 48(1): 1-27.
- Gundersen H J y Jensen E B (1987) The efficiency of systematic sampling in stereology and its prediction. *J Microsc* 147(Pt 3): 229-63.
- Gundersen H J, Jensen E B, Kieu K y Nielsen J (1999) The efficiency of systematic sampling in stereology--reconsidered. *J Microsc* 193(Pt 3): 199-211.
- Haber S N y Fudge J L (1997) The primate substantia nigra and VTA: integrative circuitry and function. *Crit Rev Neurobiol* 11(4): 323-42.
- Haber S N, Ryoo H, Cox C y Lu W (1995) Subsets of midbrain dopaminergic neurons in monkeys are distinguished by different levels of mRNA for the dopamine transporter: comparison with the mRNA for the D2 receptor, tyrosine hydroxylase and calbindin immunoreactivity. *J Comp Neurol* 362(3): 400-10.
- Hajek T, Kopecek M, Kozeny J, Gunde E, Alda M y Hoschl C (2008) Amygdala volumes in mood disorders--meta-analysis of magnetic resonance volumetry studies. *J Affect Disord* 115(3): 395-410.
- Hall E (1972) The amygdala of the cat: a Golgi study. *Z Zellforsch Mikrosk Anat* 134(4): 439-58.
- Hamidi M, Drevets W C y Price J L (2004) Glial reduction in amygdala in major depressive disorder is due to oligodendrocytes. *Biol Psychiatry* 55(6): 563-9.
- Hasue R H y Shammah-Lagnado S J (2002) Origin of the dopaminergic innervation of the central extended amygdala and accumbens shell: a combined retrograde tracing and immunohistochemical study in the rat. *J Comp Neurol* 454(1): 15-33.
- Hatton W J y von Bartheld C S (1999) Analysis of cell death in the trochlear nucleus of the chick embryo: calibration of the optical disector counting method reveals systematic bias. *J Comp Neurol* 409(2): 169-86.
- Haug H, Kuhl S, Mecke E, Sass N L y Wasner K (1984) The significance of morphometric procedures in the investigation of age changes in cytoarchitectonic structures of human brain. *J Hirnforsch* 25(4): 353-74.
- Heckers S, Heinsen H, Heinsen Y C y Beckmann H (1990) Limbic structures and lateral ventricle in schizophrenia. A quantitative postmortem study. *Arch Gen Psychiatry* 47(11): 1016-22.
- Heidbreder C A, Weiss I C, Domeney A M, Pryce C, Homberg J, Hedou G, Feldon J, Moran M C y Nelson P (2000) Behavioral, neurochemical and endocrinological characterization of the early social isolation syndrome. *Neuroscience* 100(4): 749-68.
- Helmeke C, Ovtscharoff W, Jr., Poeggel G y Braun K (2008) Imbalance of immunohistochemically characterized interneuron populations in the adolescent and adult rodent medial prefrontal cortex after repeated exposure to neonatal separation stress. *Neuroscience* 152(1): 18-28.
- Herry C, Ciocchi S, Senn V, Demmou L, Muller C y Luthi A (2008) Switching on and off fear by distinct neuronal circuits. *Nature* 454(7204): 600-6.

- Herry C, Trifilieff P, Micheau J, Luthi A y Mons N (2006) Extinction of auditory fear conditioning requires MAPK/ERK activation in the basolateral amygdala. *Eur J Neurosci* 24(1): 261-9.
- Hoffman A F y Gerhardt G A (1998) In vivo electrochemical studies of dopamine clearance in the rat substantia nigra: effects of locally applied uptake inhibitors and unilateral 6-hydroxydopamine lesions. *J Neurochem* 70(1): 179-89.
- Holmgren P (1928) Points of view concerning forebrain morphology in higher vertebrates. *Acta Zool* 6: 415-477.
- Hopkins D A (1975) Amygdalotegmental projections in the rat, cat and rhesus monkey. *Neurosci Lett* 1(5): 263-70.
- Hsu S M y Raine L (1981) Protein A, avidin, and biotin in immunohistochemistry. *J Histochem Cytochem* 29(11): 1349-53.
- Huber G C y Crosby E C (1929) The nuclei and fibers paths of the avian diencephalon, with consideration of the telencephalic and certain mesencephalic centers and connections. *J Comp Neurol* 48: 1-186.
- Insausti R, Amaral D G y Cowan W M (1987) The entorhinal cortex of the monkey: III. Subcortical afferents. *J Comp Neurol* 264(3): 396-408.
- Ishii T y Friede R L (1967) A comparative histochemical mapping of the distribution of acetylcholinesterase and nicotinamide adenine dinucleotide-diaphorase activities in the human brain. *Int Rev Neurobiol* 10: 231-75.
- Iwai E y Yukie M (1987) Amygdalofugal and amygdalopetal connections with modality-specific visual cortical areas in macaques (*Macaca fuscata*, *M. mulatta*, and *M. fascicularis*). *J Comp Neurol* 261(3): 362-87.
- Johnson R T, Schneider A, DonCarlos L L, Breedlove S M y Jordan C L (2012) Astrocytes in the rat medial amygdala are responsive to adult androgens. *J Comp Neurol* 520(11): 2531-44.
- Johnston J B (1923) Further contributions to the study of the evolution of the forebrain. *J Comp Neurol* 35(5): 337-481.
- Jones B y Mishkin M (1972) Limbic lesions and the problem of stimulus-reinforcement associations. *Exp Neurol* 36(2): 362-77.
- Jones E G y Burton H (1976) A projection from the medial pulvinar to the amygdala in primates. *Brain Res* 104(1): 142-7.
- Jones E G, Burton H, Saper C B y Swanson L W (1976) Midbrain, diencephalic and cortical relationships of the basal nucleus of Meynert and associated structures in primates. *J Comp Neurol* 167(4): 385-419.
- Jones S R, Gainetdinov R R, Wightman R M y Caron M G (1998) Mechanisms of amphetamine action revealed in mice lacking the dopamine transporter. *J Neurosci* 18(6): 1979-86.
- Kapp B S, Frysinger R C, Gallagher M y Haselton J R (1979) Amygdala central nucleus lesions: effect on heart rate conditioning in the rabbit. *Physiol Behav* 23(6): 1109-17.

- Kemper C M, O'Connor D T y Westlund K N (1987) Immunocytochemical localization of dopamine-beta-hydroxylase in neurons of the human brain stem. *Neuroscience* 23(3): 981-9.
- Kempainen S y Pitkanen A (2000) Distribution of parvalbumin, calretinin, and calbindin-D(28k) immunoreactivity in the rat amygdaloid complex and colocalization with gamma-aminobutyric acid. *J Comp Neurol* 426(3): 441-67.
- Kitahama K, Ikemoto K, Jouvet A, Nagatsu I, Sakamoto N y Pearson J (1998) Aromatic L-amino acid decarboxylase- and tyrosine hydroxylase-immunohistochemistry in the adult human hypothalamus. *J Chem Neuroanat* 16(1): 43-55.
- Kling A y Cornell R (1971) Amygdectomy and social behavior in the caged stump-tailed macaque (*Macaca speciosa*). *Folia Primatol (Basel)* 14(3): 190-208.
- Klüver H y Bucy P C (1939) Preliminary analysis of functions of the temporal lobes in monkeys. *Arch Neurol Psychiatry* 42: 979-1000.
- Konopaske G T, Dorph-Petersen K A, Pierri J N, Wu Q, Sampson A R y Lewis D A (2007) Effect of chronic exposure to antipsychotic medication on cell numbers in the parietal cortex of macaque monkeys. *Neuropsychopharmacology* 32(6): 1216-23.
- Konopaske G T, Dorph-Petersen K A, Sweet R A, Pierri J N, Zhang W, Sampson A R y Lewis D A (2008) Effect of chronic antipsychotic exposure on astrocyte and oligodendrocyte numbers in macaque monkeys. *Biol Psychiatry* 63(8): 759-65.
- Kosmal A, Malinowska M y Kowalska D M (1997) Thalamic and amygdaloid connections of the auditory association cortex of the superior temporal gyrus in rhesus monkey (*Macaca mulatta*). *Acta Neurobiol Exp (Wars)* 57(3): 165-88.
- Kreczmanski P, Heinsen H, Mantua V, Woltersdorf F, Masson T, Ulfing N, Schmidt-Kastner R, Korr H, Steinbusch H W, Hof P R y Schmitz C (2007) Volume, neuron density and total neuron number in five subcortical regions in schizophrenia. *Brain* 130(Pt 3): 678-92.
- Kreczmanski P, Heinsen H, Mantua V, Woltersdorf F, Masson T, Ulfing N, Schmidt-Kastner R, Korr H, Steinbusch H W, Hof P R y Schmitz C (2009) Microvessel length density, total length, and length per neuron in five subcortical regions in schizophrenia. *Acta Neuropathol* 117(4): 409-21.
- Krettek J E y Price J L (1977) The cortical projections of the mediodorsal nucleus and adjacent thalamic nuclei in the rat. *J Comp Neurol* 171(2): 157-91.
- Krettek J E y Price J L (1978a) Amygdaloid projections to subcortical structures within the basal forebrain and brainstem in the rat and cat. *J Comp Neurol* 178(2): 225-54.
- Krettek J E y Price J L (1978b) A description of the amygdaloid complex in the rat and cat with observations on intra-amygdaloid axonal connections. *J Comp Neurol* 178(2): 255-80.
- Kushner P D, Stephenson D T y Wright S (1991) Reactive astrogliosis is widespread in the subcortical white matter of amyotrophic lateral sclerosis brain. *J Neuropathol Exp Neurol* 50(3): 263-77.

- LaManna J C, Chavez J C y Pichiule P (2004) Structural and functional adaptation to hypoxia in the rat brain. *J Exp Biol* 207(Pt 18): 3163-9.
- Lammel S, Hetzel A, Hackel O, Jones I, Liss B y Roeper J (2008) Unique properties of mesoprefrontal neurons within a dual mesocorticolimbic dopamine system. *Neuron* 57(5): 760-73.
- Larsen J O, Gundersen H J y Nielsen J (1998) Global spatial sampling with isotropic virtual planes: estimators of length density and total length in thick, arbitrarily orientated sections. *J Microsc* 191(3): 238-248.
- Ledo-Varela M T, Gimenez-Amaya J M y Llamas A (2007) [The amygdaloid complex and its implication in psychiatric disorders]. *An Sist Sanit Navar* 30(1): 61-74.
- LeDoux J (2007) The amygdala. *Curr Biol* 17(20): R868-74.
- LeDoux J E, Cicchetti P, Xagoraris A y Romanski L M (1990a) The lateral amygdaloid nucleus: sensory interface of the amygdala in fear conditioning. *J Neurosci* 10(4): 1062-9.
- LeDoux J E, Farb C y Ruggiero D A (1990b) Topographic organization of neurons in the acoustic thalamus that project to the amygdala. *J Neurosci* 10(4): 1043-54.
- Lewis D A (2000) GABAergic local circuit neurons and prefrontal cortical dysfunction in schizophrenia. *Brain Res Brain Res Rev* 31(2-3): 270-6.
- Lewis D A, Hashimoto T y Volk D W (2005) Cortical inhibitory neurons and schizophrenia. *Nat Rev Neurosci* 6(4): 312-24.
- Lewis D A, Melchitzky D S, Sesack S R, Whitehead R E, Auh S y Sampson A (2001) Dopamine transporter immunoreactivity in monkey cerebral cortex: regional, laminar, and ultrastructural localization. *J Comp Neurol* 432(1): 119-36.
- Lilly R, Cummings J L, Benson D F y Frankel M (1983) The human Kluver-Bucy syndrome. *Neurology* 33(9): 1141-5.
- Llamas A, Avendano C y Reinoso-Suarez F (1977) Amygdaloid projections to prefrontal and motor cortex. *Science* 195(4280): 794-6.
- Llamas A, Avendano C y Reinoso-Suarez F (1985) Amygdaloid projections to the motor, premotor and prefrontal areas of the cat's cerebral cortex: a topographical study using retrograde transport of horseradish peroxidase. *Neuroscience* 15(3): 651-7.
- Loretan K, Bissiere S y Luthi A (2004) Dopaminergic modulation of spontaneous inhibitory network activity in the lateral amygdala. *Neuropharmacology* 47(5): 631-9.
- Lu K T, Walker D L y Davis M (2001) Mitogen-activated protein kinase cascade in the basolateral nucleus of amygdala is involved in extinction of fear-potentiated startle. *J Neurosci* 21(16): RC162.
- Maciag D, Hughes J, O'Dwyer G, Pride Y, Stockmeier C A, Sanacora G y Rajkowska G (2010) Reduced density of calbindin immunoreactive GABAergic neurons in the occipital cortex in major depression: relevance to neuroimaging studies. *Biol Psychiatry* 67(5): 465-70.

- Mai J K, Assheuer J y Paxinos G (2004). Atlas of the Human Brain. Elsevier Academic Press, San Diego.
- Maltais S, Coté S, Drolet G y Falardeau P (2000) Cellular colocalization of dopamine D1 mRNA and D2 receptor in rat brain using a D2 dopamine receptor specific polyclonal antibody. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 24(7): 1127-49.
- Marcellino D, Frankowska M, Agnati L, Perez de la Mora M, Vargas-Barroso V, Fuxe K y Larriva-Sahd J (2012) Intercalated and paracapsular cell islands of the adult rat amygdala: a combined rapid-Golgi, ultrastructural, and immunohistochemical account. *Neuroscience* 226: 324-47.
- Maren S, Phan K L y Liberzon I (2013) The contextual brain: implications for fear conditioning, extinction and psychopathology. *Nat Rev Neurosci* 14(6): 417-28.
- Maren S y Quirk G J (2004) Neuronal signalling of fear memory. *Nat Rev Neurosci* 5(11): 844-52.
- Mascagni F y McDonald A J (2003) Immunohistochemical characterization of cholecystinin containing neurons in the rat basolateral amygdala. *Brain Res* 976(2): 171-84.
- Mascagni F, Muly E C, Rainnie D G y McDonald A J (2009) Immunohistochemical characterization of parvalbumin-containing interneurons in the monkey basolateral amygdala. *Neuroscience* 158(4): 1541-50.
- McDonald A J (1982a) Cytoarchitecture of the central amygdaloid nucleus of the rat. *J Comp Neurol* 208(4): 401-18.
- McDonald A J (1982b) Neurons of the lateral and basolateral amygdaloid nuclei: a Golgi study in the rat. *J Comp Neurol* 212(3): 293-312.
- McDonald A J (1983) Neurons of the bed nucleus of the stria terminalis: a golgi study in the rat. *Brain Res Bull* 10(1): 111-20.
- McDonald A J (1984) Neuronal organization of the lateral and basolateral amygdaloid nuclei in the rat. *J Comp Neurol* 222(4): 589-606.
- McDonald A J (1992). Cell types and intrinsic connections of the amygdala. En J. Aggleton: *The Amygdala*. Wiley-Liss, New York, pp. 67-96.
- McDonald A J (1994) Calretinin immunoreactive neurons in the basolateral amygdala of the rat and monkey. *Brain Res* 667(2): 238-42.
- McDonald A J y Augustine J R (1993) Localization of GABA-like immunoreactivity in the monkey amygdala. *Neuroscience* 52(2): 281-94.
- McDonald A J y Betette R L (2001) Parvalbumin-containing neurons in the rat basolateral amygdala: morphology and co-localization of Calbindin-D(28k). *Neuroscience* 102(2): 413-25.
- McDonald A J y Culberson J L (1981) Neurons of the basolateral amygdala: a Golgi study in the opossum (*Didelphis virginiana*). *Am J Anat* 162(4): 327-42.
- McDonald A J y Mascagni F (2001) Colocalization of calcium-binding proteins and GABA in neurons of the rat basolateral amygdala. *Neuroscience* 105(3): 681-93.

- McDonald A J y Mascagni F (2002) Immunohistochemical characterization of somatostatin containing interneurons in the rat basolateral amygdala. *Brain Res* 943(2): 237-44.
- McDonald A J, Mascagni F y Augustine J R (1995) Neuropeptide Y and somatostatin-like immunoreactivity in neurons of the monkey amygdala. *Neuroscience* 66(4): 959-82.
- McDonald A J, Mascagni F, Mania I y Rainnie D G (2005) Evidence for a perisomatic innervation of parvalbumin-containing interneurons by individual pyramidal cells in the basolateral amygdala. *Brain Res* 1035(1): 32-40.
- McDonald A J, Mascagni F y Zaric V (2012) Subpopulations of somatostatin-immunoreactive non-pyramidal neurons in the amygdala and adjacent external capsule project to the basal forebrain: evidence for the existence of GABAergic projection neurons in the cortical nuclei and basolateral nuclear complex. *Front Neural Circuits* 6: 46.
- McDonald A J y Pearson J C (1989) Coexistence of GABA and peptide immunoreactivity in non-pyramidal neurons of the basolateral amygdala. *Neurosci Lett* 100(1-3): 53-8.
- Mehler W R (1980) Subcortical afferent connections of the amygdala in the monkey. *J Comp Neurol* 190(4): 733-62.
- Mesulam M M, Mufson E J, Levey A I y Wainer B H (1983) Cholinergic innervation of cortex by the basal forebrain: cytochemistry and cortical connections of the septal area, diagonal band nuclei, nucleus basalis (substantia innominata), and hypothalamus in the rhesus monkey. *J Comp Neurol* 214(2): 170-97.
- Meyer A (1971). *Historical Aspects of Cerebral Anatomy*. Oxford.
- Meynert A (1867) [Der Bau der Grosshirnrinde und seine örtlichen Verschiedenheiten, nebst einem pathologisch-anatomischen Corollarium]. *Vjschr Psychiat.* 1: 77-93, 126-170, 198-217.
- Middeldorp J y Hol E M (2011) GFAP in health and disease. *Prog Neurobiol* 93(3):421-43.
- Miller G W, Staley J K, Heilman C J, Perez J T, Mash D C, Rye D B y Levey A I (1997) Immunochemical analysis of dopamine transporter protein in Parkinson's disease. *Ann Neurol* 41(4): 530-9.
- Millhouse O E (1986) The intercalated cells of the amygdala. *J Comp Neurol* 247(2): 246-71.
- Millhouse O E y DeOlmos J (1983) Neuronal configurations in lateral and basolateral amygdala. *Neuroscience* 10(4): 1269-300.
- Mizuno N, Takahashi O, Satoda T y Matsushima R (1985) Amygdalospinal projections in the macaque monkey. *Neurosci Lett* 53(3): 327-30.
- Moran M A, Mufson E J y Mesulam M M (1987) Neural inputs into the temporopolar cortex of the rhesus monkey. *J Comp Neurol* 256(1): 88-103.
- Mu Q, Xie J, Wen Z, Weng Y y Shuyun Z (1999) A quantitative MR study of the hippocampal formation, the amygdala, and the temporal horn of the lateral ventricle in healthy subjects 40 to 90 years of age. *AJNR Am J Neuroradiol* 20(2): 207-11.

- Muller J F, Mascagni F y McDonald A J (2003) Synaptic connections of distinct interneuronal subpopulations in the rat basolateral amygdalar nucleus. *J Comp Neurol* 456(3): 217-36.
- Muller J F, Mascagni F y McDonald A J (2005) Coupled networks of parvalbumin-immunoreactive interneurons in the rat basolateral amygdala. *J Neurosci* 25(32): 7366-76.
- Muller J F, Mascagni F y McDonald A J (2006) Pyramidal cells of the rat basolateral amygdala: synaptology and innervation by parvalbumin-immunoreactive interneurons. *J Comp Neurol* 494(4): 635-50.
- Muller J F, Mascagni F y McDonald A J (2009) Dopaminergic innervation of pyramidal cells in the rat basolateral amygdala. *Brain Struct Funct* 213(3): 275-88.
- Muramori F, Kobayashi K y Nakamura I (1998) A quantitative study of neurofibrillary tangles, senile plaques and astrocytes in the hippocampal subdivisions and entorhinal cortex in Alzheimer's disease, normal controls and non-Alzheimer neuropsychiatric diseases. *Psychiatry Clin Neurosci* 52(6): 593-9.
- Nader K y LeDoux J (1999) The dopaminergic modulation of fear: quinpirole impairs the recall of emotional memories in rats. *Behav Neurosci* 113(1): 152-65.
- Nader K, Majidishad P, Amorapanth P y LeDoux J E (2001) Damage to the lateral and central, but not other, amygdaloid nuclei prevents the acquisition of auditory fear conditioning. *Learn Mem* 8(3): 156-63.
- Nauta W J (1962) Neural associations of the amygdaloid complex in the monkey. *Brain* 85: 505-20.
- Nishijo H, Hori E, Tazumi T y Ono T (2008) Neural correlates to both emotion and cognitive functions in the monkey amygdala. *Behav Brain Res* 188(1): 14-23.
- Nissl F (1913) [Die Grosshirnanteile des Kaninchens]. *Arch Psychiat Nerven*, 52: 867-953
- Norita M y Kawamura K (1980) Subcortical afferents to the monkey amygdala: an HRP study. *Brain Res* 190(1): 225-30.
- Ottersen O P (1982) Connections of the amygdala of the rat. IV: Corticoamygdaloid and intraamygdaloid connections as studied with axonal transport of horseradish peroxidase. *J Comp Neurol* 205(1): 30-48.
- Ottersen O P y Ben-Ari Y (1979) Afferent connections to the amygdaloid complex of the rat and cat. I. Projections from the thalamus. *J Comp Neurol* 187(2): 401-24.
- Pakkenberg B (1990) Pronounced reduction of total neuron number in mediodorsal thalamic nucleus and nucleus accumbens in schizophrenics. *Arch Gen Psychiatry* 47(11): 1023-8.
- Pakkenberg B y Gundersen H J (1997) Neocortical neuron number in humans: effect of sex and age. *J Comp Neurol* 384(2): 312-20.
- Pandya D N, Van Hoesen G W y Domesick V B (1973) A cingulo-amygdaloid projection in the rhesus monkey. *Brain Res* 61: 369-73.

- Pandya D N y Yeterian E H (1985). Architecture and connections of cortical association areas. En A. Peters, E. G. Jones: *Cerebral Cortex*. Plenum Press, New York, pp. 3-55.
- Pantazopoulos H, Lange N, Hassinger L y Berretta S (2006) Subpopulations of neurons expressing parvalbumin in the human amygdala. *J Comp Neurol* 496(5): 706-22.
- Paré D y Duvarci S (2012) Amygdala microcircuits mediating fear expression and extinction. *Curr Opin Neurobiol* 22(4): 717-23.
- Paré D y Gaudreau H (1996) Projection cells and interneurons of the lateral and basolateral amygdala: distinct firing patterns and differential relation to theta and delta rhythms in conscious cats. *J Neurosci* 16(10): 3334-50.
- Parent A, Mackey A y De Bellefeuille L (1983) The subcortical afferents to caudate nucleus and putamen in primate: a fluorescence retrograde double labeling study. *Neuroscience* 10(4): 1137-50.
- Peterson D A (2004). The use of fluorescent probes in cell-counting procedures (Chapter 4). En S. M. Evans: *Quantitative Methods in Neuroscience, a neuroanatomical approach*. Oxford University Press, New York, pp. 85-114.
- Phillips R G y LeDoux J E (1992) Differential contribution of amygdala and hippocampus to cued and contextual fear conditioning. *Behav Neurosci* 106(2): 274-85.
- Pinard C R, Muller J F, Mascagni F y McDonald A J (2008) Dopaminergic innervation of interneurons in the rat basolateral amygdala. *Neuroscience* 157(4): 850-63.
- Pitkanen A y Amaral D G (1991) Demonstration of projections from the lateral nucleus to the basal nucleus of the amygdala: a PHA-L study in the monkey. *Exp Brain Res* 83(3): 465-70.
- Pitkanen A y Amaral D G (1993a) Distribution of calbindin-D28k immunoreactivity in the monkey temporal lobe: the amygdaloid complex. *J Comp Neurol* 331(2): 199-224.
- Pitkanen A y Amaral D G (1993b) Distribution of parvalbumin-immunoreactive cells and fibers in the monkey temporal lobe: the amygdaloid complex. *J Comp Neurol* 331(1): 14-36.
- Pitkanen A y Amaral D G (1994) The distribution of GABAergic cells, fibers, and terminals in the monkey amygdaloid complex: an immunohistochemical and in situ hybridization study. *J Neurosci* 14(4): 2200-24.
- Pitkanen A y Amaral D G (1998) Organization of the intrinsic connections of the monkey amygdaloid complex: projections originating in the lateral nucleus. *J Comp Neurol* 398(3): 431-58.
- Pitkanen A, Kelly J L y Amaral D G (2002) Projections from the lateral, basal, and accessory basal nuclei of the amygdala to the entorhinal cortex in the macaque monkey. *Hippocampus* 12(2): 186-205.
- Pitkanen A, Savander V y LeDoux J E (1997) Organization of intra-amygdaloid circuitries in the rat: an emerging framework for understanding functions of the amygdala. *Trends Neurosci* 20(11): 517-23.

- Porrino L J, Crane A M y Goldman-Rakic P S (1981) Direct and indirect pathways from the amygdala to the frontal lobe in rhesus monkeys. *J Comp Neurol* 198(1): 121-36.
- Price J L (1973) An autoradiographic study of complementary laminar patterns of termination of afferent fibers to the olfactory cortex. *J Comp Neurol* 150(1): 87-108.
- Price J L (1986) Subcortical projections from the amygdaloid complex. *Adv Exp Med Biol* 203: 19-33.
- Price J L (2003) Comparative aspects of amygdala connectivity. *Ann N Y Acad Sci* 985: 50-8.
- Price J L y Amaral D G (1981) An autoradiographic study of the projections of the central nucleus of the monkey amygdala. *J Neurosci* 1(11): 1242-59.
- Price J L, Russchen F T y Amaral D G (1987). The limbic region. II. The amygdaloid complex. En A. Björkland, T. Hökfelt y L. W. Swanson: *Handbook of Chemical Neuroanatomy 5, Integrated Systems of the CNS, Part I*. Elsevier, Amsterdam, pp. 279-381.
- Quirk G J, Repa C y LeDoux J E (1995) Fear conditioning enhances short-latency auditory responses of lateral amygdala neurons: parallel recordings in the freely behaving rat. *Neuron* 15(5): 1029-39.
- Rainnie D G, Mania I, Mascagni F y McDonald A J (2006) Physiological and morphological characterization of parvalbumin-containing interneurons of the rat basolateral amygdala. *J Comp Neurol* 498(1): 142-61.
- Reardon F y Mitrofanis J (2000) Organisation of the amygdalo-thalamic pathways in rats. *Anat Embryol (Berl)* 201(1): 75-84.
- Romanski L M y LeDoux J E (1993) Information cascade from primary auditory cortex to the amygdala: corticocortical and corticoamygdaloid projections of temporal cortex in the rat. *Cereb Cortex* 3(6): 515-32.
- Rosene D L y Van Hoesen G W (1977) Hippocampal efferents reach widespread areas of cerebral cortex and amygdala in the rhesus monkey. *Science* 198(4314): 315-7.
- Rosenkranz J A y Grace A A (1999) Modulation of basolateral amygdala neuronal firing and afferent drive by dopamine receptor activation in vivo. *J Neurosci* 19(24): 11027-39.
- Rosenkranz J A y Grace A A (2001) Dopamine attenuates prefrontal cortical suppression of sensory inputs to the basolateral amygdala of rats. *J Neurosci* 21(11): 4090-103.
- Rosenkranz J A y Grace A A (2002a) Cellular mechanisms of infralimbic and prelimbic prefrontal cortical inhibition and dopaminergic modulation of basolateral amygdala neurons in vivo. *J Neurosci* 22(1): 324-37.
- Rosenkranz J A y Grace A A (2002b) Dopamine-mediated modulation of odour-evoked amygdala potentials during pavlovian conditioning. *Nature* 417(6886): 282-7.

- Rubinow M J, Drogos L L y Juraska J M (2009a) Age-related dendritic hypertrophy and sexual dimorphism in rat basolateral amygdala. *Neurobiol Aging* 30(1): 137-46.
- Rubinow M J, Hagerbaumer D A y Juraska J M (2009b) The food-conditioned place preference task in adolescent, adult and aged rats of both sexes. *Behav Brain Res* 198(1): 263-6.
- Rubinow M J y Juraska J M (2009) Neuron and glia numbers in the basolateral nucleus of the amygdala from preweaning through old age in male and female rats: a stereological study. *J Comp Neurol* 512(6): 717-25.
- Russchen F T (1982) Amygdalopetal projections in the cat. II. Subcortical afferent connections. A study with retrograde tracing techniques. *J Comp Neurol* 207(2): 157-76.
- Russchen F T, Amaral D G y Price J L (1985a) The afferent connections of the substantia innominata in the monkey, *Macaca fascicularis*. *J Comp Neurol* 242(1): 1-27.
- Russchen F T, Amaral D G y Price J L (1987) The afferent input to the magnocellular division of the mediodorsal thalamic nucleus in the monkey, *Macaca fascicularis*. *J Comp Neurol* 256(2): 175-210.
- Russchen F T, Bakst I, Amaral D G y Price J L (1985b) The amygdalostriatal projections in the monkey. An anterograde tracing study. *Brain Res* 329(1-2): 241-57.
- Sadikot A F y Parent A (1990) The monoaminergic innervation of the amygdala in the squirrel monkey: an immunohistochemical study. *Neuroscience* 36(2): 431-47.
- Sanchez-Gonzalez M A, Garcia-Cabezas M A, Rico B y Cavada C (2005) The primate thalamus is a key target for brain dopamine. *J Neurosci* 25(26): 6076-83.
- Saunders R C y Rosene D L (1988) A comparison of the efferents of the amygdala and the hippocampal formation in the rhesus monkey: I. Convergence in the entorhinal, prorrhinal, and perirhinal cortices. *J Comp Neurol* 271(2): 153-84.
- Saunders R C, Rosene D L y Van Hoesen G W (1988) Comparison of the efferents of the amygdala and the hippocampal formation in the rhesus monkey: II. Reciprocal and non-reciprocal connections. *J Comp Neurol* 271(2): 185-207.
- Schmitz C, Korr H, Perl D P y Hof P R (2001) Advanced use of 3-D methods for counting neurons. *Trends Neurosci* 24(7): 377-80.
- Schumann C M y Amaral D G (2005) Stereological estimation of the number of neurons in the human amygdaloid complex. *J Comp Neurol* 491(4): 320-9.
- Schumann C M y Amaral D G (2006) Stereological analysis of amygdala neuron number in autism. *J Neurosci* 26(29): 7674-9.
- Sherwood C C, Stimpson C D, Raghanti M A, Wildman D E, Uddin M, Grossman L I, Goodman M, Redmond J C, Bonar C J, Erwin J M y Hof P R (2006) Evolution of increased glia-neuron ratios in the human frontal cortex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103(37): 13606-11.
- Shu S Y, Ju G y Fan L Z (1988) The glucose oxidase-DAB-nickel method in peroxidase histochemistry of the nervous system. *Neurosci Lett* 85(2): 169-71.

- Sims K S y Williams R S (1990) The human amygdaloid complex: a cytologic and histochemical atlas using Nissl, myelin, acetylcholinesterase and nicotinamide adenine dinucleotide phosphate diaphorase staining. *Neuroscience* 36(2): 449-72.
- Smith Y y Paré D (1994) Intra-amygdaloid projections of the lateral nucleus in the cat: PHA-L anterograde labeling combined with postembedding GABA and glutamate immunocytochemistry. *J Comp Neurol* 342(2): 232-48.
- Sorvari H, Miettinen R, Soininen H y Pitkanen A (1996a) Parvalbumin-immunoreactive neurons make inhibitory synapses on pyramidal cells in the human amygdala: a light and electron microscopic study. *Neurosci Lett* 217(2-3): 93-6.
- Sorvari H, Miettinen R, Soininen H, Paljarvi L, Karkola K y Pitkanen A (1998) Calretinin-immunoreactive terminals make synapses on calbindin D28k-immunoreactive neurons in the lateral nucleus of the human amygdala. *Brain Res* 783(2): 355-8.
- Sorvari H, Soininen H, Paljarvi L, Karkola K y Pitkanen A (1995) Distribution of parvalbumin-immunoreactive cells and fibers in the human amygdaloid complex. *J Comp Neurol* 360(2): 185-212.
- Sorvari H, Soininen H y Pitkanen A (1996b) Calbindin-D28K-immunoreactive cells and fibres in the human amygdaloid complex. *Neuroscience* 75(2): 421-43.
- Sorvari H, Soininen H y Pitkanen A (1996c) Calretinin-immunoreactive cells and fibers in the human amygdaloid complex. *J Comp Neurol* 369(2): 188-208.
- St Jacques P, Dolcos F y Cabeza R (2009) Effects of aging on functional connectivity of the amygdala during negative evaluation: a network analysis of fMRI data. *Neurobiol Aging* 31(2): 315-27.
- Stan A D, Ghose S, Gao X M, Roberts R C, Lewis-Amezcu K, Hatanpaa K J y Tamminga C A (2006) Human postmortem tissue: what quality markers matter? *Brain Res* 1123(1): 1-11.
- Stefanacci L y Amaral D G (2000) Topographic organization of cortical inputs to the lateral nucleus of the macaque monkey amygdala: a retrograde tracing study. *J Comp Neurol* 421(1): 52-79.
- Stefanacci L y Amaral D G (2002) Some observations on cortical inputs to the macaque monkey amygdala: an anterograde tracing study. *J Comp Neurol* 451(4): 301-23.
- Stefanacci L, Suzuki W A y Amaral D G (1996) Organization of connections between the amygdaloid complex and the perirhinal and parahippocampal cortices in macaque monkeys. *J Comp Neurol* 375(4): 552-82.
- Sterio D C (1984) The unbiased estimation of number and sizes of arbitrary particles using the disector. *J Microsc* 134(Pt 2): 127-36.
- Straube T, Pohlack S, Mentzel H J y Miltner W H (2008) Differential amygdala activation to negative and positive emotional pictures during an indirect task. *Behav Brain Res* 191(2): 285-8.
- Swanson L W y Petrovich G D (1998) What is the amygdala? *Trends Neurosci* 21(8): 323-31.

- Tombol T y Szafranska-Kosmal A (1972) A golgi study of the amygdaloid complex in the cat. *Acta Neurobiol Exp (Wars)* 32(4): 835-48.
- Turner B H, Gupta K C y Mishkin M (1978) The locus and cytoarchitecture of the projection areas of the olfactory bulb in *Macaca mulatta*. *J Comp Neurol* 177(3): 381-96.
- Van Hoesen G W (1981). The differential distribution, diversity and sprouting of cortical projections to the amygdala in the rhesus monkey. En Y. Ben-Ari: *The Amygdaloid Complex*. Elsevier/North Holland Press, Amsterdam, pp. 77-90.
- Venator D K, Lewis D A y Finlay J M (1999) Effects of partial dopamine loss in the medial prefrontal cortex on local baseline and stress-evoked extracellular dopamine concentrations. *Neuroscience* 93(2): 497-505.
- Vogt B A, Pandya D N y Rosene D L (1987) Cingulate cortex of the rhesus monkey: I. Cytoarchitecture and thalamic afferents. *J Comp Neurol* 262(2): 256-70.
- Völsch M (1906) Zur vergleichenden Anatomie des Mandelkerns und seiner Nachbargebilde. I. Teil *Arch f mikr Anat* 68: 573-683.
- Völsch M (1910) Zur vergleichenden Anatomie des Mandelkerns und seiner Nachbargebilde. II. Teil *Arch f mikr Anat* 76: 373-523.
- Waldvogel H J, Curtis M A, Baer K, Rees M I y Faull R L (2006) Immunohistochemical staining of post-mortem adult human brain sections. *Nat Protoc* 1(6): 2719-32.
- Wang F, Kalmar J H, He Y, Jackowski M, Chepenik L G, Edmiston E E, Tie K, Gong G, Shah M P, Jones M, Uderman J, Constable R T y Blumberg H P (2009) Functional and structural connectivity between the perigenual anterior cingulate and amygdala in bipolar disorder. *Biol Psychiatry* 66(5): 516-21.
- Weiskrantz L (1956) Behavioral changes associated with ablation of the amygdaloid complex in monkeys. *J Comp Physiol Psychol* 49(4): 381-91.
- Weller K L y Smith D A (1982) Afferent connections to the bed nucleus of the stria terminalis. *Brain Res* 232(2): 255-70.
- Weller R E, Steele G E y Kaas J H (2002) Pulvinar and other subcortical connections of dorsolateral visual cortex in monkeys. *J Comp Neurol* 450(3): 215-40.
- West M J y Gundersen H J (1990) Unbiased stereological estimation of the number of neurons in the human hippocampus. *J Comp Neurol* 296(1): 1-22.
- Winterer G (2006) Cortical microcircuits in schizophrenia--the dopamine hypothesis revisited. *Pharmacopsychiatry* 39 Suppl 1: S68-71.
- Woodruff A R y Sah P (2007a) Inhibition and synchronization of basal amygdala principal neuron spiking by parvalbumin-positive interneurons. *J Neurophysiol* 98(5): 2956-61.
- Woodruff A R y Sah P (2007b) Networks of parvalbumin-positive interneurons in the basolateral amygdala. *J Neurosci* 27(3): 553-63.
- Wu Y y Parent A (2000) Striatal interneurons expressing calretinin, parvalbumin or NADPH-diaphorase: a comparative study in the rat, monkey and human. *Brain Res* 863(1-2): 182-91.

- Yachnis A T, Roper S N, Love A, Fancey J T y Muir D (2000) Bcl-2 immunoreactive cells with immature neuronal phenotype exist in the nonepileptic adult human brain. *J Neuropathol Exp Neurol* 59(2): 113-9.
- Yamamoto B K y Novotney S (1998) Regulation of extracellular dopamine by the norepinephrine transporter. *J Neurochem* 71(1): 274-80.
- Yasui Y, Itoh K, Sugimoto T, Kaneko T y Mizuno N (1987) Thalamocortical and thalamo-amygdaloid projections from the parvicellular division of the posteromedial ventral nucleus in the cat. *J Comp Neurol* 257(2): 253-68.
- Yilmazer-Hanke D M, Faber-Zuschratter H, Linke R y Schwegler H (2002) Contribution of amygdala neurons containing peptides and calcium-binding proteins to fear-potentiated startle and exploration-related anxiety in inbred Roman high- and low-avoidance rats. *Eur J Neurosci* 15(7): 1206-18.
- Yukie M (2002) Connections between the amygdala and auditory cortical areas in the macaque monkey. *Neurosci Res* 42(3): 219-29.
- Zhang J, Muller J F y McDonald A J (2013) Noradrenergic innervation of pyramidal cells in the rat basolateral amygdala. *Neuroscience* 228: 395-408.
- Zhang X-M, Cai Y, Chu Y, Chen E-Y, Feng J-C, Luo X-G, Xiong K, Struble R G, Clough R W, Patrylo P R, Kordower J H y Yan X-X (2009) Doublecortin-expressing cells persist in the associative cerebral cortex and amygdala in aged nonhuman primates. *Frontiers in Neuroanatomy* 3: 17.
- Zikopoulos B y Barbas H (2012) Pathways for emotions and attention converge on the thalamic reticular nucleus in primates. *J Neurosci* 32(15): 5338-50.