

Universidad Autónoma de Madrid

Facultad de Medicina
Departamento de Anatomía, Histología y Neurociencia

Ultraestructura y Conectividad de la Corteza Cerebral

Marta Turégano López

Tesis Doctoral
2022

Universidad Autónoma de Madrid

Facultad de Medicina
Departamento de Anatomía, Histología y Neurociencia

Ultraestructura y Conectividad de la Corteza Cerebral

Memoria presentada por
Marta Turégano López
Para optar al grado de Doctora en Neurociencia

Realizada en el Laboratorio Cajal de Circuitos Corticales (CSIC-UPM)
bajo la dirección del Dr. Angel Merchán Pérez y el Dr. Javier DeFelipe Oroquieta

Angel Merchán Pérez

Javier DeFelipe Oroquieta

Este trabajo es parte de los siguientes proyectos: proyecto de I+D+i PGC2018-094307-B-I00 (2019-2022) financiado por MCIN/AEI/10.13039/501100011033; Centro de Investigación en Red sobre Enfermedades Neurodegenerativas (CIBERNED, CB06/05/0066); Plataforma Interdisciplinar Cajal Blue Brain del CSIC y; the European Union's Horizon 2020 Framework Programme for Research and Innovation under the Specific grant agreement No. 785907 (Human Brain Project SGA2) and the Specific grant agreement No. 945539 (Human Brain Project SGA3).

Agradecimientos

Me gustaría agradecer, en primer lugar, a Javier. Gracias por haberme dado la oportunidad y haber confiado en mí desde el primer momento que entré en el laboratorio, desde el TFG hasta ahora. Eres un referente en lo creativo, en lo científico y en definitiva, en lo humano. También quiero agradecer a Ángel. Gracias por enseñarme todo lo que sabes. Gracias por forjar en mí una visión crítica y con perspectiva. Gracias por siempre tener una gracia preparada, por siempre estar atento a mis condiciones y ayudarme en el camino del doctorado, que no es nada sencillo. Hemos superado época COVID y mil y una dificultades, pero siempre con alegría y ganas de seguir adelante. Es una suerte que hayas sido mi supervisor, y esta vez también, mucho más allá del ámbito laboral.

Además, he tenido la gran suerte de coincidir en el laboratorio con personas increíbles. Por ejemplo, con Miriam, Lore y Carmen. Gracias por ayudarme absolutamente todas las veces que he pisado el laboratorio. Gracias a Isa, Silvia, Ana, Mamen, Sandra y Débora por preguntarme, escucharme y aconsejarme siempre desde vuestra experiencia, hacéis del laboratorio un hogar. Gracias a Alberto, Gonzalo y Diana porque siempre estáis dispuestos a ayudarme y atentos a mis avances. Gracias a Rodri por todas sus enseñanzas sobre microscopía. Por la emoción de ver muestras preciosas en el TEM. Gracias a las Lidias y a Paula por las comidas compartidas en el campito, por los mercadillos de ropa y, en definitiva, por hacer más divertido venir al laboratorio. Gracias a Ruth por creer en los talleres de divulgación y estar siempre al pie del cañón para hablar sobre ciencia. Mil gracias a Pilar y Javi por toda la ayuda que me habéis prestado en los temas más burocráticos. Gracias a Sergio y a Nico, porque siempre tienen palabras de ánimo y han vivido mis últimos años de tesis, lo cuál es un desafío. Quiero acordarme de ese equipo de estudiantes que me acogió al principio: Álex, Guille, Diana y Andrea. Gracias por las comidas con la puerta cerrada, las risas y los videos de tesis. Y en particular, gracias a Andrea, por enseñarme desde cero y adoptarme, por las dendritas 3D, las ilustraciones y por crear juntas. No me olvido, por supuesto, de Las Martas, incluida Marta de tarde. Gracias Marta D por los congresos y vivencias compartidas. Por dormir siempre juntas, por acabar con las reservas de vermut, por los buceitos y los aperitivos con el atardecer de la Azohía en nuestros ojos. Resumiendo, los autocuidados juntas sientan mejor. Gracias a Marta M por ser referente y ponerme unas preciosas gafas moradas, por las mañanas, tardes y noches en Colmenar y por hacernos mamis adoptivas de la Limuskis. Porque, aunque te vayas lejos, se que vas a estar cerca y yo, espero acompañarte. Gracias a Patri, porque siempre tenemos ganas de compartir, encontrarnos y aprender juntas. Gracias por las conversaciones pausadas, los viajes y los apoyos intercontinentales.

Quiero dar las gracias a mi familia elegida, mis amigas. Gracias a las Marishoshos, mis 4 fantásticas, por ser mi sitio de referencia, el lugar al que siempre quiero volver y del que nunca me quiero ir. Desde el cole, gracias a Miri, Miguel, Paula y Cibe. Gracias Miri, mi compañera de banco, de piso y de barrio. Porque hemos vivido mil cosas juntas, mano a mano, y me siento orgullosísima de seguir construyendo a tu lado. Gracias a Miguel por ser mi compañero fiel. Por estar en los mejores, y sobretodo, en los peores momentos. Por hacerme ver que soy capaz de lo que me proponga. Porque siempre eres un hogar allá donde vaya y porque me has acompañado en cada etapa, aguantado, aconsejado y reído a mi lado. Gracias a Paula por ese maravillosos reencuentro, se que nos esperan cosas bonitas. También a mi amiga Cibe, porque es la mejor compi de aventuras locas pero siempre cuidándome y aconsejándome. Gracias a mi amiga Inés, una isla preciosa que conocí durante mi viaje en la neurociencia. Gracias por transmitirme, día a día, el placer de aprender. Gracias por tu confianza plena y por la fuerza que transmites, nos das valor para cambiar el mundo a mejor. Gracias a Carlota, mi faro vital, esa persona que te llena de energía y te aporta diferentes perspectivas de la vida. Gracias por ser muy buena amiga, preocuparte y, a pesar de navegar por mil mares, siempre estar conectada a mí. Quiero recordar a mi amiga Mara, por las conversaciones profundas y por su atención y cariño. Gracias a mi grupo de consumo ecológico, por ser las mejores vecinas, compartir momentos huertiles, asambleas eternas y refrigerios varios. Pos ser atentas y hacer de la palabra cuidados algo superlativo.

También me gustaría agradecer a Javiroyo por ser el salvavidas en los últimos años de tesis. Porque me devolviste las ganas de seguir con mi trabajo, de divulgar y de disfrutar. Me has descubierto las mil y una posibilidades que hay en la vida para ser, simplemente, felices. Quiero acordarme de Carmen, por haber compartido muchas risas, cenas, bailoteos, vacaciones y piscineos. Y porque aunque somos muy diferentes nos encanta encontrarnos.

Gracias a Xevi, Carla, Miguel (master), personas que la vida ha puesto recientemente en mi camino pero que me han apoyado incondicionalmente.

Quiero mencionar especialmente a Pablis. Gracias por compartir la vida conmigo. Gracias por tu paciencia y dedicación. Porque nos hemos desarrollado y cambiado juntos, sin perdernos nunca de vista. Gracias por las ilusiones comunes, las risas compartidas y los desafíos superados.

Y por último, pero no menos importante, me gustaría acordarme de mi familia. Gracias a mis tíos por vuestro apoyo y cariño. En especial a mi tía Nines, porque siempre estás atenta y me apoyas en todos mis emprendimientos, y es que compartir momentos contigo es lo más. Gracias a mis abuelos, porque os habéis dedicado a mi en cuerpo y alma. Y finalmente, gracias a mis padres. Sin vosotros y sin vuestro apoyo no podría haber llegado hasta aquí. Gracias mamá por cuidarme siempre, estar en todo momento y ayudarme cuando las situaciones me sobrepasan. Gracias papá por la confianza ciega en mi y por tu cariño.

Índice

Índice de Figuras	13
Índice de Tablas	15
Abreviaturas	17
Resumen	18
Introducción	20
1. La corteza cerebral	22
1.1 Capas de la corteza cerebral.....	22
1.2 Organización columnar de la corteza cerebral.....	23
2. Componentes celulares de la corteza cerebral	24
2.1 Neuronas de naturaleza excitadora.....	24
2.2 Neuronas de naturaleza inhibitoria (interneuronas).....	25
2.3 Células gliales.....	27
3. La corteza somatosensorial	28
3.1 Aferencias.....	28
3.2 Eferencias.....	30
3.3 Interconexiones de la corteza somatosensorial con otras áreas corticales.....	30
4. Diferencias entre la corteza humana y la corteza de ratón	31
5. Sinapsis	32
5.1 Sinapsis eléctricas.....	32
5.2 Sinapsis químicas.....	33
5.3 Tipos de sinapsis químicas.....	33
5.4 Composición de la densidad postsináptica.....	35
5.5 Forma y tamaño de las sinapsis.....	36
6. Espinas dendríticas	36
7. El aparato de espina	39
8. El aporte energético en el sistema nervioso: las mitocondrias	40
9. Transporte, reciclaje y degradación de sustancias en el sistema nervioso: los cuerpos multivesiculares (CMVs)	42
9.1 CMVs en el sistema nervioso.....	43
9.2 Los CMVs y las sinapsis.....	43
9.3 Los CMVs y las mitocondrias.....	44
Objetivos	46
Materiales y Métodos	48
10. Preparación del tejido para microscopía electrónica	50
11. Adquisición de imágenes seriadas mediante microscopía electrónica de doble haz FIB-SEM	51
12. Alineamiento, visualización y segmentación de las sinapsis en las series de imágenes	52
13. Contaje e identificación del tipo de sinapsis	53
14. Identificación de las dianas postsinápticas	55
15. Identificación de los aparatos de Espina	55
16. Extracción de la superficie de la aposición sináptica	55
17. Distribución espacial de las sinapsis y de los cuerpos multivesiculares	57
18. Estereología de las mitocondrias	58
19. Análisis de los cuerpos multivesiculares	59
20. Análisis estadístico	60
Resultados	62
21. Estudio de la distribución de sinapsis en el neuropilo	64
21.1 Densidad de sinapsis y proporción de sinapsis asimétricas (SA) y simétricas (SS).....	64

Índice

21.2 Proporción de sinapsis en espinas y tallos dendríticos.....	67
21.3 Proporción de sinapsis en la cabeza y el cuello de las espinas dendríticas.....	71
21.4 Estudio de las espinas dendríticas y sus sinapsis.....	72
21.5 Espinas simples.....	73
21.6 Espinas ramificadas.....	73
22. Estudio del tamaño y la forma de las sinapsis.....	75
22.1 Área y perímetro de las uniones sinápticas en referencia a su naturaleza excitadora o inhibidora.....	75
22.2 Tamaño de las sinapsis en función de su diana postsináptica.....	80
22.3 Análisis de la forma de las uniones sinápticas.....	83
22.4 Relación entre la forma y el tamaño de las sinapsis.....	83
22.5 Relación entre las diferentes formas de sinapsis y su localización.....	88
23. El aparato de espina y su relación con las sinapsis.....	89
24. Análisis de la distribución espacial de las sinapsis.....	91
25. Análisis de las mitocondrias de la corteza somatosensorial.....	92
26. Cuantificación de los cuerpos multivesiculares (CMVs)	95
26.1 Densidad de los CMVs en el neuropilo.....	97
26.2 Localización de CMVs en axones, dendritas y elementos celulares no sinápticos.....	97
26.3 Relación entre los CMVs y las mitocondrias.....	99
26.4 CMVs con extensiones tubulares.....	99
26.5 Tamaño de los CMVs.....	99
26.6 Distribución espacial de los CMVs	104
Discusión.....	108
27. Estudio de la distribución de sinapsis en el neuropilo del ratón adulto.....	110
27.1 Densidad de sinapsis en el neuropilo.....	110
27.2 Proporción de sinapsis asimétricas y simétricas.....	111
27.3 Proporción de sinapsis en espinas y tallos dendríticos.....	112
27.4. Estudio de las espinas dendríticas y sus sinapsis.....	114
28. Estudio del tamaño y la forma de las sinapsis.....	114
28.1 Área y perímetro de las uniones sinápticas en referencia a su naturaleza excitadora o inhibidora.....	115
28.2 Tamaño de las sinapsis en función de su diana postsináptica.....	116
28.3 Análisis de la forma de las uniones sinápticas.....	116
28.4 Relación entre la forma y el tamaño de las sinapsis.....	117
29. El aparato de espina y su relación con las sinapsis.....	117
30. Análisis de la distribución espacial de las sinapsis.....	118
31. Análisis de las mitocondrias de la corteza somatosensorial	118
32. Cuantificación de los cuerpos multivesiculares (CMVs) en el ratón adulto.....	120
32.1 Densidad de los CMVs en el neuropilo.....	120
32.2 Localización de CMVs en axones, dendritas y elementos celulares no sinápticos.....	121
32.3 Relación entre los CMVs y las mitocondrias.....	121
32.4 CMVs con extensiones tubulares.....	121
32.5 Tamaño de los CMVs.....	122
32.6 Distribución espacial de los CMVs	122
Conclusiones.....	124
Bibliografía.....	130
Artículos Anexados.....	146

Índice de Figuras

Figura 1. Capas de la corteza cerebral del ratón.....	22
Figura 2. Estructura de una neurona piramidal típica.....	24
Figura 3. Interneuronas.....	25
Figura 4. Diversidad de interneuronas y sus dianas postsinápticas más comunes.....	26
Figura 5. La plasticidad astrocítica contribuye al mantenimiento de sinapsis activas.....	27
Figura 6. Esquema de las áreas corticales de la corteza cerebral del ratón.....	28
Figura 7. Conectividad de la isocorteza.....	29
Figura 8. Diagrama esquemático de las neuronas de proyección talamocorticales.....	29
Figura 9. La isocorteza se organiza en áreas, capas y columnas pobladas por una gran diversidad de tipos neuronales excitadores e inhibidores.....	30
Figura 10. Isocorteza humana y del ratón.....	31
Figura 11. Propiedades funcionales de las sinapsis eléctricas.....	33
Figura 12. La maquinaria de las sinapsis.....	34
Figura 13. Diferencias entre las densidades postsinápticas de las sinapsis excitadoras e inhibitoras.....	35
Figura 14. La célula piramidal y las espinas dendríticas.....	37
Figura 15. Las espinas se distribuyen en un continuo de morfologías y funciones.....	38
Figura 16. Diagramas que ilustran los aparatos de espina de la corteza cerebral.....	39
Figura 17. Estimación de la energía usada en la corteza cerebral.....	40
Figura 18. La traducción local de ARNm es esencial para la supervivencia de las mitocondrias y a su vez las mitocondrias son las proveedoras de la energía para este proceso.....	41
Figura 19. Representación esquemática de la participación de los cuerpos multivesiculares (CMVs) en la vía endocítica y en los procesos de autofagia.....	42
Figura 20. Distribución de los diferentes tipos de endosomas y sus marcadores moleculares en diferentes regiones de las dendritas.....	43
Figura 21. Los CMVs y las mitocondrias.....	44
Figura 22. Esquema paso a paso del procedimiento para la obtención de las imágenes de microscopía electrónica.....	50
Figura 23. Panorámicas de la región de la corteza cerebral de donde se han obtenido las pilas de imágenes analizadas.....	51
Figura 24. Captura de pantalla para ilustrar el programa Espina.....	52
Figura 25. Visualización de la pila de imágenes de microscopía electrónica y la aplicación del marco de conteo.....	53
Figura 26. Ejemplo de una serie de imágenes obtenidas con microscopía FIB-SEM de una muestra marcada con el transportador vesicular de GABA (VGAT).....	54
Figura 27. Herramienta de trazado de esqueletos del programa Espina.....	56
Figura 28. Extracción de las superficies de aposición sináptica (SAS).....	57
Figura 29. Método de Cavalieri para la estimación de la fracción de volumen mitocondrial.....	58
Figura 30. Densidad y proporción de SA (verde) y SS (rojo) en el neuropilo.....	64
Figura 31. Las espinas dendríticas y el aparato de espina.....	67
Figura 32. Proporción de sinapsis según su diana postsináptica (espina o tallo dendrítico) en el neuropilo de las capas corticales.....	68
Figura 33. Porcentajes de SA y SS establecidas en espinas dendríticas (axoespinosas) y en tallos dendríticos (axodendríticas).....	69
Figura 34. Porcentajes de SA y SS establecidas en tallos con espinas y sin espinas.....	70
Figura 35. Representación esquemática de la distribución de las SA (verde) y SS (rojo) según su localización postsináptica en todas las capas corticales.....	72
Figura 36. Espinas simples y ramificadas.....	72
Figura 37. Porcentaje de espinas sin sinapsis, con una sinapsis, con dos sinapsis y con más de dos sinapsis en espinas simples (A) y ramificadas (B) en cada capa cortical.....	73

Índice de Figuras

Figura 38. Área de las SA (en tonos verdes) y SS (en tonos rojos) en los diferentes animales estudiados.....	76
Figura 39. Área de las sinapsis SA y SS en las diferentes capas corticales.....	77
Figura 40. Distribución del tamaño de las superficies de aposición sináptica (SAS) de las SA y SS.....	78
Figura 41. Distribución de frecuencia del área de las SAS de SA (A) y SS (B)	78
Figura 42. El perímetro sináptico.....	78
Figura 43. Correlación entre la densidad de sinapsis y el tamaño de las superficies de aposición sináptica (SAS).....	79
Figura 44. Correlación negativa de la densidad de sinapsis y el área de las sinapsis, desglosada entre SA y SS.....	80
Figura 45. Localización de las sinapsis y su tamaño.....	81
Figura 46. Diferentes morfologías sinápticas.....	84
Figura 47. Porcentajes y tamaños de las sinapsis según su forma (macular, perforada, en herradura o fragmentada).....	86
Figura 48. Ejemplos de SA (verde) y SS (rojo) con áreas de diferentes tamaños.....	87
Figura 49. Porcentaje de sinapsis en espinas dendríticas con y sin aparato de espina.....	90
Figura 50. Ejemplos de análisis de la distribución espacial de sinapsis en tres nubes de puntos que representan las posiciones de las SA reconstruidas en tres pilas de imágenes.....	93
Figura 51. Distribución de las mitocondrias.....	94
Figura 52. Porcentaje y distribución de mitocondrias en los diferentes compartimentos subcelulares.....	95
Figura 53. Gráfico de correlación entre la densidad de sinapsis y la fracción de volumen mitocondrial en cada muestra estudiada (21 puntos correspondientes a 21 pilas de imágenes).....	95
Figura 54. Diversidad en los CMVs.....	96
Figura 55. Correlación de densidad de CMVs y densidad de sinapsis en las muestras de todas las capas corticales.....	97
Figura 56. Localización de los CMVs en las dendritas con espinas y sin espinas, en las seis capas corticales.....	97
Figura 57. Densidad y distribución de los CMVs en el neuropilo.....	98
Figura 58. Porcentaje y distribución de CMVs asociados a mitocondrias.....	100
Figura 59. Porcentaje y distribución de los CMVs con túbulos.....	101
Figura 60. Distribución de frecuencia del volumen del total de CMVs (azul).....	102
Figura 61. Tamaño de los CMVs.....	103
Figura 62. Tamaño de los CMVs en las dendritas.....	104
Figura 63. Análisis de la distribución espacial de los CMVs.....	106

Índice de Tablas

Tabla 1. Porcentaje de SA y SS en las muestras marcadas con VGAT.....	54
Tabla 2. Coeficientes de error obtenidos en tres condiciones diferentes (en las que se han variado los parámetros área por punto y frecuencia de imágenes analizadas) para optimizar el estudio estereológico en las tres series de imágenes analizadas en el estudio piloto.....	59
Tabla 3. Densidad de SA y SS en las capas de la corteza	65
Tabla 4. Distribución de sinapsis en espinas y tallos dendríticos, para cada una de las capas de la corteza cerebral.....	68
Tabla 5. Distribución de SA en espinas y tallos dendríticos, para cada una de las capas de la corteza cerebral.....	69
Tabla 6. Distribución de SS en espinas y tallos dendríticos, para cada una de las capas de la corteza cerebral.....	69
Tabla 7. Tabla de contingencia de las SA y simétricas (SS) localizadas en espinas y tallos dendríticos	70
Tabla 8. Tabla de contingencia de las SA y SS localizadas en tallos dendríticos con espinas y sin espinas.....	71
Tabla 9. Distribución de SA y SS en la cabeza de las espinas dendríticas, en el cuello de las espinas y en los tallos dendríticos, para cada una de las capas de la corteza cerebral.....	71
Tabla 10. Distribución porcentual de espinas simples y ramificadas en las capas de la corteza cerebral.....	73
Tabla 11. Distribución porcentual de la distribución de sinapsis en espinas simples en las capas de la corteza cerebral.....	74
Tabla 12. Distribución porcentual del número de sinapsis en espinas ramificadas en las capas de la corteza cerebral.....	74
Tabla 13. Parámetros de la distribución log-normal que mejor se ajusta a la distribución de tamaños de las superficies de aposición sináptica (SAS).....	75
Tabla 14. Comparaciones dos a dos del área de las SAS de las SA y SS de las diferentes capas corticales.....	77
Tabla 15. Tamaño promedio de las SA y SS de las distintas capas corticales (I a VI) clasificadas según su diana postsináptica.....	82
Tabla 16. Sinapsis clasificadas por su forma (macular, perforada, herradura, fragmentada) y su naturaleza (SA o excitadora y SS o inhibitoria), en las diferentes capas corticales.....	85
Tabla 17. Tabla de contingencia de las SA y SS con forma perforada y en herradura.....	85
Tabla 18. Área y perímetro de las superficies de aposición sináptica (SAS) de las sinapsis maculares, perforadas, en herradura y fragmentadas.....	87
Tabla 19. Tablas de contingencia en las que se muestra la distribución de las sinapsis que se localizan en los tallos y en las espinas dendríticas según su morfología (maculares, perforadas y en herradura).....	88
Tabla 20. Porcentaje de sinapsis SA y SS en espinas con/sin aparato de espina por cada capa cortical.....	89
Tabla 21. Tabla de contingencia de las SA y SS que se establecen sobre espinas con y sin aparato de espina.....	91
Tabla 22. Fracción de volumen mitocondrial en todas las capas corticales.....	92
Figura 57. Densidad y distribución de los CMVs en el neuropilo.....	98
Tabla 24. Distribución de los CMVs asociados a mitocondrias en dendritas, axones y elementos no sinápticos en las seis capas de la corteza y la media de todas las capas (I-VI).....	99
Tabla 25. Tamaño de los CMVs localizados en dendritas, axones y elementos no sinápticos en las seis capas del córtex y la media para todas las capas (I-VI).....	104

Abreviaturas

AMPA: ácido α -amino-3-hidroxi-5-metilo-4-isoxazolpropiónico
ANOVA: *analysis of variance*; análisis de la varianza
ARN: ácido ribonucleico
ARNm: ácido ribonucleico mensajero
ATP: adenosín trifosfato
CaCl₂: cloruro de calcio
CE: coeficiente de error
CMVs: cuerpos multivesiculares
CV: coeficiente de variación
DAB: diaminobencidina
FGL: proteína de tipo fibrinógeno 1
FIB/SEM: *Focused Ion Beam/Scanning Electron Microscopy*; Haz de iones de galio/microscopio electrónico de barrido.
GABA: ácido γ -aminobutírico
GRIP: *glutamate receptor interacting protein*; Receptor de glutamato de interacción con proteínas
GTPasas: guanosina trifosfatasa
ILVs: *intra-luminal vesicles*; Vesículas intraluminales
KS: prueba de Kolmogorov-Smirnov
KW: prueba de Kruskal-Wallis
LAMP1: *lysosomal-associated membrane protein 1*; Proteína de membrana lisosomal 1
LTD: *long term depression*; Depresión a largo plazo
LTP: *long term potentiation*; Potenciación a largo plazo
MAGUK: *membrane-associated guanylate kinases*; Guanilato kinasas asociadas a membrana
MDV: *mitochondrial derived vesicles*; vesículas derivadas de mitocondria
mGluR: receptores metabotrópicos de glutamato
MW: prueba de Mann-Whitney
NMDA: ácido N-metil-D-aspartico
OsO₄: tetróxido de osmio
PFA: paraformaldehído
PINK 1: *PTEN-induced kinase 1*; kinasa PTEN (fosfatidilinositol-3,4,5-trisfosfato 3-fosfatasa) inducido 1
PSD: *postsynaptic density*; Densidad postsináptica
S1: corteza somatosensorial primaria
S2: corteza somatosensorial secundaria
SA: sinapsis asimétrica
SS: sinapsis simétrica
SAS: superficie de aposición sináptica
SAP: *synapse-associated protein*; Proteína asociada a sinapsis
SNC: sistema nervioso central
S1HL: corteza somatosensorial primaria del miembro inferior (*hindlimb*)
VGAT: transportador vesicular de GABA
Vm: fracción volumen mitocondrial
VPL: ventral posterior lateral
VPM: ventral posterior medial
3D: tridimensional
 χ^2 : prueba chi cuadrado

Resumen

El estudio de la corteza cerebral es el tema preferido por muchos científicos teóricos y experimentalistas por su implicación directa en diversos aspectos del comportamiento de los mamíferos y porque es la estructura más “humana” del sistema nervioso del ser humano. El objetivo de la presente tesis doctoral es contribuir al conocimiento de la microanatomía de la corteza cerebral, uno de los pasos esenciales para conocer su funcionamiento.

Este estudio se ha realizado en el neuropilo de la corteza somatosensorial del ratón adulto. Hemos estudiado, en primer lugar, el número, la distribución, la forma y el tamaño de las sinapsis en las diferentes capas corticales. En segundo lugar, hemos cuantificado la fracción de volumen mitocondrial y establecido su localización en axones, dendritas y elementos no sinápticos. En tercer lugar, hemos estudiado la distribución de los cuerpos multivesiculares, como representantes de la vía endocítica, responsable del transporte, mantenimiento y reciclaje de sustancias. Para llevar a cabo este estudio se han utilizado técnicas de microscopía electrónica tridimensional y técnicas estereológicas.

Nuestros resultados indican que la densidad de sinapsis del ratón es más alta que en la rata y que en el humano, siendo las sinapsis asimétricas o excitadoras predominantes respecto a las simétricas o inhibitoras. Además, las sinapsis asimétricas muestran preferencia por las espinas dendríticas, mientras que las sinapsis simétricas se establecen preferentemente en los tallos dendríticos. A pesar de ello, en los tallos dendríticos predominan las sinapsis asimétricas sobre las simétricas. Por otra parte, existen diferencias significativas en el tamaño y forma de los diferentes tipos de sinapsis. En nuestras muestras, un 8% de volumen del tejido está ocupado por mitocondrias, localizándose mayoritariamente en las dendritas. Algunas capas corticales (I, IV y VI) muestran una correlación entre la densidad de sinapsis y la fracción de volumen mitocondrial. Además, los cuerpos multivesiculares también muestran una correlación positiva con la densidad sináptica y se localizaron predominantemente en los axones.

Tomado en su conjunto, nuestro estudio nos ha permitido reconocer, en gran detalle, las diferencias microanatómicas existentes entre las capas corticales. Los análisis que hemos realizado ayudan a comprender la organización funcional del cerebro a través de su diseño estructural, y a correlacionarlo con las características moleculares y fisiológicas de la región que hemos estudiado. De este modo, el estudio de las sinapsis y de los orgánulos más relevantes en el mantenimiento de la función sináptica nos permitirá entender mejor la estructura de los microcircuitos que componen la corteza cerebral.

Introducción

1. La corteza cerebral

La información procedente del mundo que nos rodea es conducida hacia el cerebro a través de un complicado sistema sensorial consistente en receptores de diversas clases que actúan como transductores; estos transforman los estímulos físicos y químicos del ambiente en impulsos nerviosos que el cerebro puede interpretar y darles un significado. El estudio de la corteza cerebral es el tema preferido por muchos científicos teóricos y experimentalistas por su implicación directa en diversos aspectos del comportamiento de los mamíferos y porque es la estructura más “humana” del sistema nervioso del ser humano.

La corteza cerebral está presente en el cerebro de todos los vertebrados, aunque con distintas características, ya que muestra notables diferencias citoarquitectónicas en cuanto al número de capas y su grosor, así como en la distribución de los distintos tipos morfológicos y funcionales de las células que constituyen la corteza cerebral. En los mamíferos, podemos dividir la corteza en dos tipos principales, atendiendo a sus características estructurales: la isocorteza y la aloccorteza. La isocorteza o neocorteza está formada típicamente por seis capas, y se encuentra representada, por ejemplo, en el área somatosensorial primaria, objeto de esta tesis, además de en otras áreas primarias y asociativas. La aloccorteza, formada en general por tres capas, se corresponde con la corteza olfatoria y el hipocampo (Palomero-Gallagher & Zilles 2015). Existen, además, regiones con características transicionales entre la isocorteza y la aloccorteza que reciben el nombre de perialocorteza.

La corteza cerebral deriva de la vesícula telencefálica. Más concretamente, la isocorteza deriva del palio dorsal, y está rodeada por el palio medial (formación hipocampal) y el palio lateral (corteza olfativa) (Puelles et al. 2008; Watson et al. 2011). Durante el desarrollo, la inervación talámica es fundamental para la correcta organización funcional y anatómica de la corteza (Watson et al. 2011). De esta forma, para la organización de la corteza son importantes tanto los genes de desarrollo que promueven patrones específicos (protomapa), como la correcta inervación por

parte del tálamo (protocorteza). La actividad aferente interviene en el desarrollo postnatal de la corteza ya que las aferencias compiten por la representación cortical de una forma dependiente de la actividad temprana (Cadwell et al. 2019).

En general, en la isocorteza se pueden distinguir las capas organizadas horizontalmente, a la vez que pueden definirse columnas corticales, organizadas verticalmente, en las que participan diferentes tipos celulares de naturaleza excitadora e inhibitora. El circuito que comprende la isocorteza recibe aferencias del tálamo, otras regiones corticales de ambos hemisferios y estructuras subcorticales. Las eferencias se dirigen a otras regiones de la corteza, ganglios basales, tálamo, tronco del encéfalo y médula espinal (Kandel et al. 2021; Watson et al. 2011).

1.1 Capas de la corteza cerebral

Una característica distintiva de la isocorteza es su organización en seis capas horizontales, históricamente definidas como supragranulares (capa I, II y III), granular (IV) e infragranulares (V y VI) (Lodato & Arlotta 2015) (Figura 1).

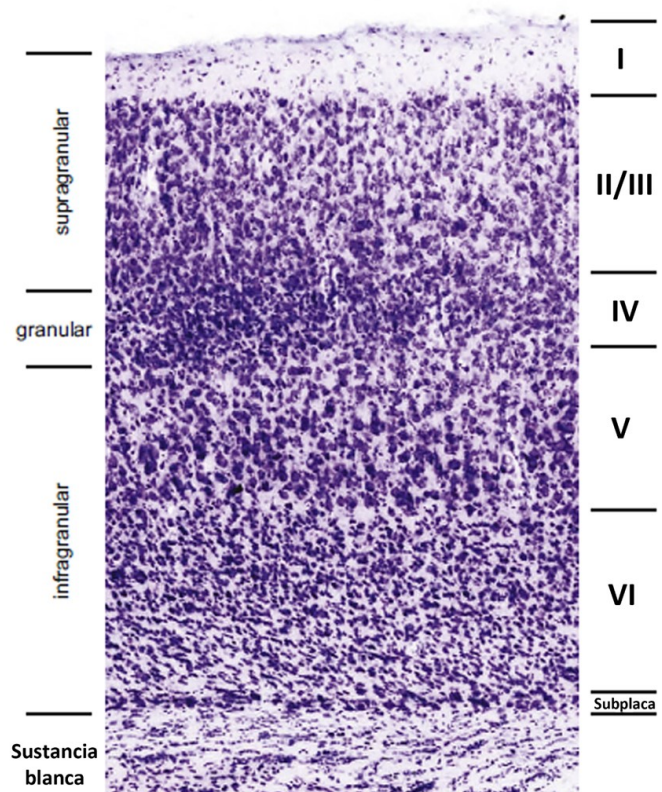


Figura 1. Capas de la corteza cerebral del ratón. La sección ha sido teñida con el método de Nissl. Nótese la diversidad del tamaño y densidad celular en las distintas capas. Modificado de (Watson et al. 2011).

La capa I es la más superficial y también se denomina capa molecular. Está formada principalmente por dendritas apicales de neuronas piramidales localizadas en capas más profundas, axones procedentes de neuronas locales y de neuronas de proyección (que viajan a través de esta capa para hacer conexiones en otras áreas de la corteza cerebral), neuronas inhibitoras y células gliales. Los somas neuronales son escasos, correspondiendo a diversos tipos de neuronas inhibitoras. Las neuronas inhibitoras localizadas en las capas I, II, III y V envían axones a la capa I para establecer allí sinapsis mayoritariamente con las dendritas apicales de las neuronas piramidales de capas más profundas (Watson et al. 2011).

Las capas II y III contienen neuronas piramidales pequeñas. La capa II es la llamada capa granular externa y la capa III es la capa piramidal externa. Los axones de las neuronas piramidales de las capas II y III proyectan localmente a neuronas de la misma área cortical y a otras áreas corticales mediante proyecciones intracorticales, mientras que las neuronas de la capa III proyectan también al hemisferio contrario a través del cuerpo calloso (Kandel et al. 2021; Watson et al. 2011). En comparación con los primates, los ratones tienen capas supragranulares más estrechas y menos diferenciadas, por lo que las capas II y III suelen considerarse como una sola, la capa II/III. Sin embargo, hay indicios de segregación funcional dentro de ella, ya que el circuito lemniscal involucra a la capa III y el paralemniscal a la capa II, aunque ambos convergen finalmente en la capa II (Bureau et al. 2006).

La capa IV es la capa granular interna, en la que se encuentran las células estrelladas con espinas. Es la capa con mayor densidad celular y recibe de forma mayoritaria las aferencias procedentes del tálamo. Esta capa es más gruesa en las áreas sensoriales primarias, como la corteza visual primaria, donde la capa IV es muy prominente. Las áreas con una notable capa IV son llamadas cortezas granulares, entre las que se encuentra la corteza somatosensorial primaria (Triarhou 2006). En esta capa también se encuentran las dendritas apicales de las neuronas piramidales que se localizan en las capas V y VI, y las dendritas basales de la capa III, permitiendo una respuesta

rápida a la información procedente del tálamo (Watson et al. 2011).

La capa V es la capa piramidal interna, que contiene neuronas piramidales más grandes que aquellas que se encuentran en la capa III. Las neuronas piramidales de la capa V están implicadas en las principales vías eferentes que proyectan a estructuras subcorticales como el estriado, los núcleos pontinos, el mesencéfalo y médula espinal. En base a dichas proyecciones, esta capa es frecuentemente subdividida en Va, de la que proceden las eferencias corticoestriatales, y Vb, de la que se originan las eferencias corticoespinales (Kandel et al. 2021; Watson et al. 2011).

Las neuronas de la capa VI tienen morfologías muy heterogéneas, por ello esta capa fue denominada capa polimórfica por Cajal (DeFelipe & Jones 1988). La capa VI es donde se originan el grueso de fibras corticotalámicas, y recibe una fuerte proyección talámica de retorno. También se establecen proyecciones hacia regiones corticales adyacentes y lejanas de forma ipsilateral y a células locales de otras capas, lo que puede modular la actividad talámica de entrada a la corteza. La capa VI es gruesa y ocupa una gran fracción de volumen de la corteza cerebral (Watson et al. 2011).

1.2 Organización columnar de la corteza cerebral

Cada capa cortical tiene su propia individualidad, dada por los componentes celulares específicos y por sus conexiones, pero ha de ponerse de manifiesto que dichas capas no operan de forma aislada, una característica bien conocida desde los tiempos de Cajal. De hecho, tras las primeras descripciones detalladas de la arquitectura celular y de las conexiones neuronales de la corteza cerebral realizados por Cajal que dieron lugar a los primeros diagramas detallados de circuitos corticales, diversos científicos trataron de trazar circuitos cada vez más completos.

Estos diagramas alcanzaron su nivel más alto de refinamiento tras las investigaciones de uno de los discípulos más sobresalientes de Cajal, Lorente de Nó, quien trató de reducir la complejidad anatómica a diagramas sencillos para desarrollar argumentos teóricos sobre el flujo de información. Así, Lorente de Nó introdujo en 1938 el concepto fundamental de “unidad cortical elemental de operación” que más tarde sirvió para elaborar la hipótesis de la columna cortical como elemento unitario, y que actualmente representa la principal hipótesis sobre la organización funcional de la corteza cerebral. Esta hipótesis propone que la corteza cerebral está formada por la repetición ordenada de microcircuitos contenidos en un cilindro de tejido cortical o columna cortical (revisado en (DeFelipe et al. 2012)). Esta teoría fue ampliamente desarrollada por Mountcastle (Mountcastle 1957), quien definió las columnas corticales como grupos de neuronas distribuidas a lo largo de las capas corticales que interactúan sinápticamente. Cada columna tiene entre 300 y 600 μm de diámetro, y este tamaño apenas varía entre especies, de modo que un aumento del volumen cortical implica un mayor número de columnas.

2. Componentes celulares de la corteza cerebral

Los principales elementos que presentan las áreas corticales son neuronas excitadoras, interneuronas inhibitoras y glía.

2.1 Neuronas de naturaleza excitadora

- Células piramidales, células principales o células de proyección:

Se trata de las neuronas más abundantes de la corteza, ya que suponen entre el 70% y el 85% del total (DeFelipe & Fariñas 1992) y se encuentran en todas las capas corticales salvo en la I. Son neuronas excitadoras que utilizan glutamato como neurotransmisor. Estructuralmente se caracterizan por tener un soma grande de forma piramidal de cuyo vértice superior parte una gruesa dendrita apical que asciende verticalmente y que se ramifica de forma oblicua (Figura 2). Esta dendrita se dirige hacia capas más superficiales donde termina en un penacho, alcanzando

en ocasiones la capa I, aunque en la corteza del ratón lo más frecuente es que las dendritas de las células más profundas terminen en las capas II/III y IV (Watson et al. 2011). De la zona basal del soma parten radialmente las dendritas basales con dirección horizontal o hacia capas más profundas. Todas las dendritas están recubiertas por pequeñas protuberancias llamadas espinas dendríticas, excepto en la parte más próxima al soma de la dendrita apical y las basales (Figura 2). De la zona basal del soma surge el axón, que proyecta hacia zonas corticales, subcorticales y subcerebrales. Estos axones forman parte de circuitos de proyección, pero no exclusivamente, puesto que en su recorrido dejan numerosas colaterales que se integran en diferentes circuitos. Las células piramidales que proyectan a otras áreas corticales o a centros subcorticales están localizadas en capas específicas; de esta forma, aquellas que proyectan a otras zonas del mismo hemisferio cerebral, o al hemisferio contralateral a través del cuerpo caloso, se encuentran preferentemente en las capas II y III, mientras que aquellas que proyectan a centros subcorticales, como el tálamo o la médula espinal, residen en las capas V y VI, como han demostrado numerosos estudios llevados a cabo con distintos trazadores y técnicas en diferentes áreas corticales en el ratón y otros mamíferos (Lodato & Arlotta 2015; Valverde 2002).

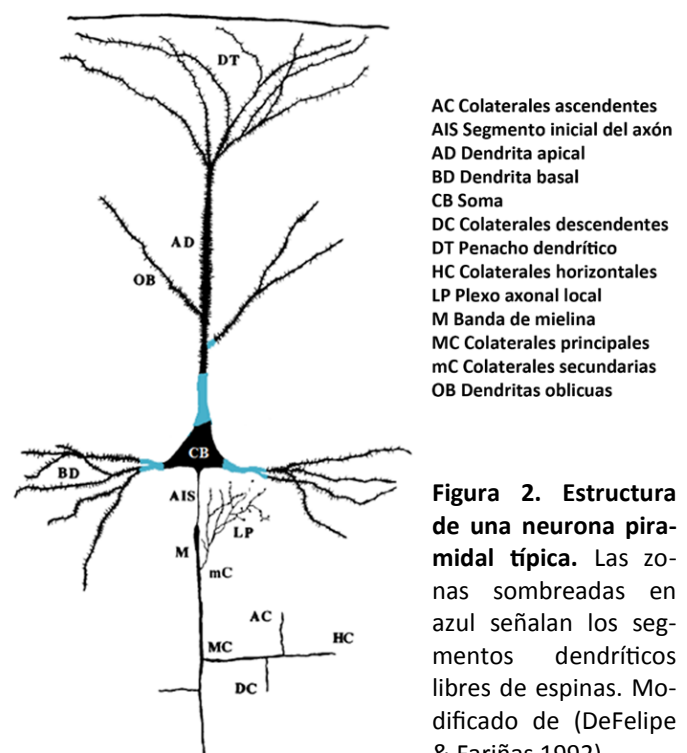


Figura 2. Estructura de una neurona piramidal típica. Las zonas sombreadas en azul señalan los segmentos dendríticos libres de espinas. Modificado de (DeFelipe & Fariñas 1992).

- **Células estrelladas con espinas:**
Estas células tienen una morfología muy parecida a las células piramidales pero carecen de dendrita apical. Se distribuyen en la capa IV de las áreas sensoriales primarias, como en la corteza somatosensorial del ratón, donde constituyen hasta el 50% de las células de esta capa (Valverde 2002). Cuando se analizan las aferencias de estas células, entre el 10 y el 20% son talamocorticales, y el resto proviene de las células piramidales de la capa VI y de otras neuronas estrelladas con espinas. El axón de estas células desciende primero para luego formar un arco y ascender hacia las capas más superficiales (Watson et al. 2011).

2.2 Neuronas de naturaleza inhibidora (interneuronas)

Las interneuronas conforman entre el 20 y el 25% de las neuronas (Kandel et al. 2021; Markram et al. 2004). Están distribuidas por todas las capas de la corteza del ratón, su neurotransmisor principal es el ácido γ -aminobutírico (GABA) y sus axones inervan densamente neuronas excitadoras e inhibidoras. Comúnmente no tienen espinas dendríticas o tienen muy pocas, y la mayoría de ellas tienen axones cortos que se ramifican de forma local. Algunas de las interneuronas hacen conexiones dendrodendríticas entre neuronas del mismo tipo, mediadas por uniones comunicantes. Hay una gran diversidad en este tipo neuronal, en su morfología (Figura 3), propiedades fisiológicas y destinos de inervación (Feldmeyer et al. 2018), aunque numéricamente son mucho menos abundantes que las células piramidales (para una revisión (The Petilla Interneuron Nomenclature Group (PING) 2008). Dado que su

morfología es muy diversa, el proceso de clasificación de las interneuronas en diferentes tipos es muy complejo (Mihaljević et al. 2018, 2019). Los árboles dendríticos varían enormemente, por lo que las clasificaciones morfológicas se suelen hacer en base a la distribución del axón. Sus axones normalmente arborizan dentro de la columna cortical donde se establece el soma y pueden proyectar lateralmente atravesando varias columnas.

- **Células en cesto:**
Son las interneuronas inhibitoras más comunes (hasta el 50% de ellas). Se encuentran en todas las capas menos en la capa I. Tienen entre cuatro y diez dendritas que se ramifican radialmente y tangencialmente extendiéndose en algunos casos por todas las capas corticales (Figura 3). Sus axones ascienden y descienden dejando colaterales horizontales que acaban en ramas terminales, también pueden formar plexos en las capas superficiales. Estos axones pueden inervar espinas y tallos dendríticos, pero específicamente inervan selectivamente el soma y dendritas proximales de neuronas excitadoras, donde contribuyen a formar un complejo denso de terminaciones parecido a un cesto (Figura 4). La actividad de descarga rápida hace que tengan una gran influencia sobre las neuronas piramidales, suprimiendo la excitación procedente de sinapsis axoespinosas. Las aferencias que reciben son tanto inhibitoras como excitadoras de neuronas talamocorticales y corticocorticales. Además, redes de neuronas en cesto se interconectan mediante uniones comunicantes y sinapsis GABAérgicas produciendo eventos de sincronización. Expresan parvalbumina y calbindina (Fishell & Kepecs 2020; Markram et al. 2004).

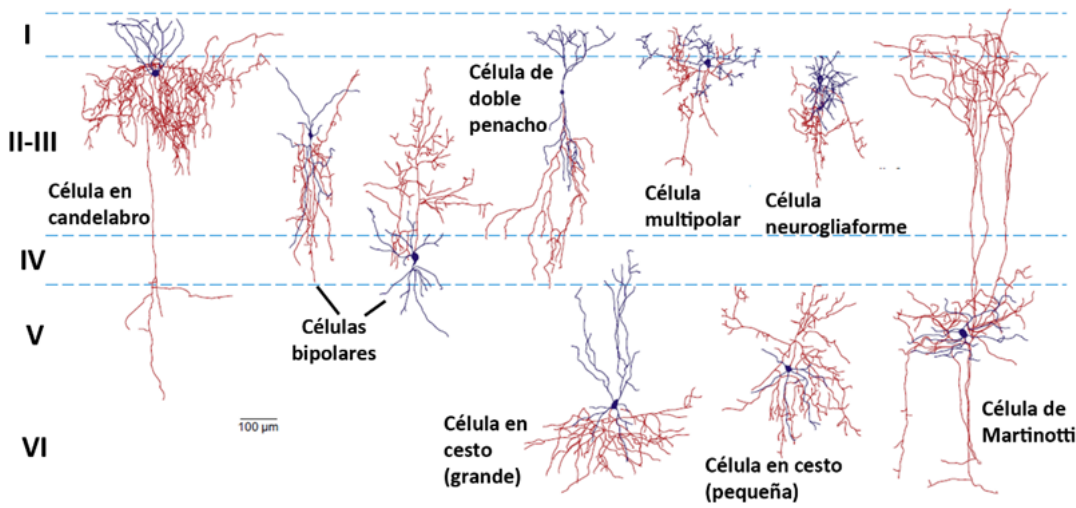


Figura 3: Interneuronas. Morfologías representativas de las interneuronas de la corteza del ratón. Los axones se han representado en rojo y las dendritas en azul. Modificado de (Watson et al. 2011).

- **Células en candelabro:**

Estas células se caracterizan por las porciones terminales del axón, que forman cortas hileras de botones dispuestos verticalmente que recuerdan los clásicos candelabros, de ahí su nombre (chandelier cells), dado por János Szentágothai, quien las descubrió en 1974 (Szentágothai y Arbid, 1974). Son más abundantes en las capas II/III y en el borde entre las capas V y VI (Markram et al. 2004; Taniguchi et al. 2013). Sus cuerpos celulares son pequeños y redondos y sus árboles dendríticos varían entre árboles multipolares y bifurcados (Figura 3). Sus dendritas pueden extenderse abarcando desde la capa I a la IV. Los axones se originan en la parte baja del cuerpo celular, y pueden ascender o descender desarrollando colaterales que establecen sinapsis muy especializadas con el segmento inicial del axón de las neuronas piramidales (Fishell & Kepecs 2020) (Figura 4). Las células en candelabro representan virtualmente la única fuente de sinapsis con el segmento inicial del axón de las células piramidales.

- **Células de Martinotti:**

Son neuronas que se localizan desde la capa II/III hasta la capa VI (Figura 3). Su axón asciende hasta la capa I, donde se ramifica y contacta con las células piramidales (Figura 4). Son de respuesta rápida y de activación espontánea y establecen uniones comunicantes con las células en cesto y las células en candelabro.

- **Células neurogliaformes:**

Fueron identificadas por Cajal y Lorente de Nó. Se han descrito en todas las capas corticales, y parecen ser especialmente abundantes en la capa I (Feldmeyer et al. 2018). Su axón y su dendrita se superponen (Figura 3). Sus dendritas reciben sinapsis excitadoras desde las capas II/III a la V y sinapsis locales inhibitoras. Sus axones se bifurcan en fibras finas que inhiben dendritas cercanas. Son una fuente de inhibición “lenta”.

- **Células bipolares:**

Son interneuronas con dos dendritas principales ubicadas arriba y debajo del cuerpo celular que se empiezan a ramificar a cierta distancia del soma (Figura 3). Son muy comunes en el cerebro de los roedores y parecen estar distribuidas uniformemente en la corteza, cada una cuenta con su dominio columnar de 30 mm de ancho. El cuerpo celu-

lar puede encontrarse en todas las capas excepto en la I. Se distinguen de las de doble penacho por que la bifurcación de las dendritas no ocurre en regiones proximales al soma. El soma y las dendritas reciben sinapsis excitadoras e inhibitoras incluyendo sinapsis talamocorticales y de las células en cesto. Por otro lado, las células bipolares inervan neuronas piramidales y cuerpos celulares y dendritas de interneuronas (Figura 4).

- **Células de doble penacho:**

También conocidas como células double bouquet, son interneuronas con un cuerpo celular pequeño y ovoide que se caracterizan por tener dos penachos dendríticos en los polos opuestos del soma, y que reciben sinapsis corticocorticales y talamocorticales (Figura 3). Su axón forma un plexo que se propaga difusamente (Markram et al. 2004) y puede estar mielinizado en algunos casos (Keller & White 1987; Peters & Proskauer 1980). En primates y humanos el axón de estas células establece sinapsis inhibitoras en los tallos dendríticos, y en espinas de células piramidales y estrelladas (DeFelipe 1997).

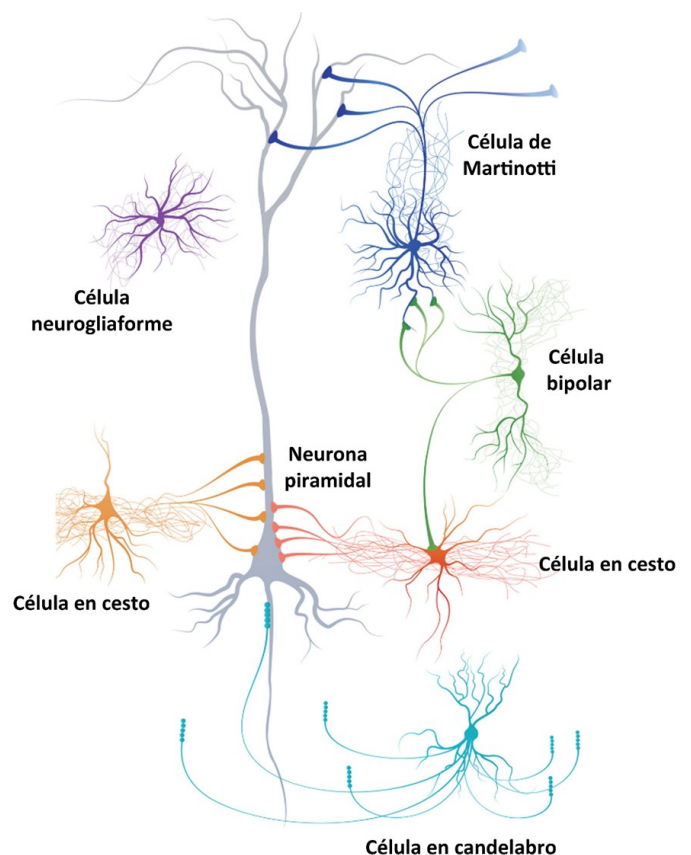


Figura 4. Diversidad de interneuronas y sus dianas postsinápticas más comunes. Algunas de ellas contactan con neuronas piramidales, ya sean con las dendritas distales, la región del soma, la parte proximal de las dendritas o el segmento inicial del axón.

También hay interneuronas que contactan selectivamente con otras interneuronas. Modificado de (Fishell & Kepecs 2020).

2.3 Células gliales

El papel de las células gliales en el funcionamiento del sistema nervioso es de más importancia de lo que se había considerado de forma tradicional. Las células gliales pueden ser de origen ectodérmico (astrocitos, oligodendrocitos, y células ependimarias) o de origen mesodérmico (microglía). La proporción de células gliales en el cerebro frente al número de neuronas está aún por definir. En los trabajos clásicos se mostraba que la glía superaba numéricamente a las neuronas en proporciones de 10:1, o incluso 50:1 (Kandel et al. 2021), con valores muy variables en distintas regiones y especies. Sin embargo, otros autores proponen que la proporción de células gliales y neuronas es relativamente constante y de aproximadamente 1:1 en casi todas las áreas y especies (Herculano-Houzel et al. 2007; Hilgetag & Barbas 2009).

- Astrocitos:

Los astrocitos tienen un papel fundamental regulando el metabolismo neuronal ya que generan el lactato que usan las neuronas para, una vez transformado en Adenosín Trifosfato (ATP), usarlo como fuente energética. Tienen la habilidad de detectar la demanda metabólica y, en consecuencia, producir cambios en el diámetro de los capilares, lo que es básico para el funcionamiento hemodinámico del cerebro. Pese a que no se han registrado potenciales de acción en los astrocitos, su actividad es modulada por corrientes de calcio que se propagan por la red de astrocitos mediante uniones comunicantes que los interconectan; dicha actividad puede estar evocada por la actividad neuronal o ser independiente a ella. Tienen receptores ácido N-metil-D-aspartato (NMDA) que elevan los niveles de calcio intracelular en respuesta a glutamato. Además, regulan activamente la excitabilidad neuronal, ya que pueden reducir los niveles de neurotransmisores en el espacio sináptico, liberar ellos mismos gliotransmisores como glutamato, D-serina y ATP, y regular la formación de espinas dendríticas. En particular, en el área somatosensorial primaria

del ratón, se ha observado que la estimulación de un astrocito activa al resto de astrocitos de los circuitos locales, produciendo la sincronización de las neuronas vecinas (Oliveira & Araque 2022; Poskanzer & Yuste 2011). Todas estas vías de comunicación entre astrocitos y neuronas han llevado a crear el concepto de “sinapsis tripartita”, donde se resalta que las sinapsis estarían formadas tanto por los elementos neuronales pre y postsináptico como por los astrocitos adyacentes (Figura 5) (Perea et al. 2009; Watson et al. 2011). Sin embargo, recientemente se ha observado que hasta el 32% de sinapsis de la corteza somatosensorial de la rata y el 50% de las sinapsis en la corteza somatosensorial del ratón no presentan contactos con prolongaciones astrocitarias (Kasthuri et al. 2015; Kikuchi et al. 2020).

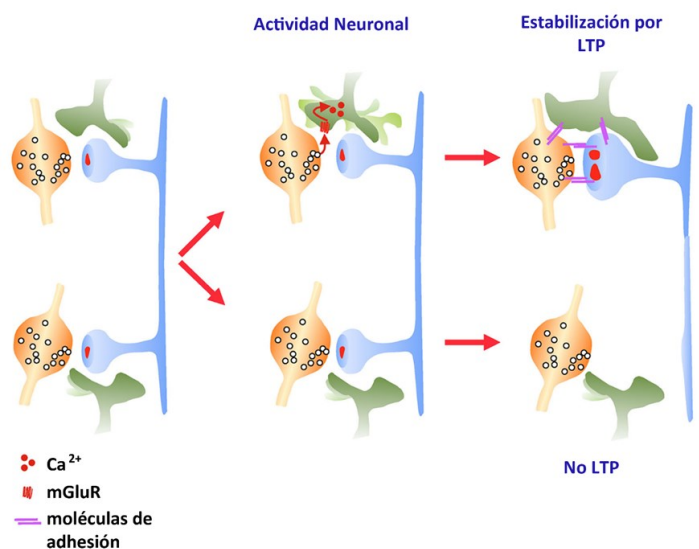


Figura 5: La plasticidad astrocítica contribuye al mantenimiento de sinapsis activas. En el panel de la izquierda, las sinapsis excitadoras están rodeadas por prolongaciones astrocitarias que muestran una gran movilidad. Panel medio: la movilidad astrocítica es regulada por la liberación de neurotransmisores a través de sus receptores metabotrópicos de glutamato (mGluR), que permiten un incremento en el flujo de calcio y en consecuencia, de su movilidad. Panel derecho: cuando se aplican protocolos de aprendizaje (Potenciación a largo plazo, LTP por sus siglas en inglés, *long term potentiation*) se aumenta la movilidad, lo que incrementa y estabiliza la presencia de las prolongaciones astrocitarias en la sinapsis, produciendo la estabilización de ésta. En este mecanismo están involucradas moléculas de adhesión. Modificado de (Bernardinelli et al. 2014).

- Oligodendrocitos

Los oligodendrocitos emiten prolongaciones ricas en mielina que envuelven los axones del sistema nervioso central (SNC) para aislarlos y así facilitar

la propagación de los potenciales de acción. El proceso de mielinización es básico en la maduración cortical y cada oligodendrocito puede mielinizar varios axones. Los oligodendrocitos de la sustancia gris son más pequeños y mielinizan segmentos axónicos más cortos que los oligodendrocitos de la sustancia blanca. Sus funciones van más allá de la de ser aislantes pasivos, ya que se comunican con las neuronas mediante uniones comunicantes a través de una red independiente a la de los astrocitos, y proveen apoyo trófico para el crecimiento y supervivencia de los axones (Watson et al. 2011).

- **Microglía:**

La microglía tiene un origen embrionario distinto al resto de células gliales. Se trata de células mesodérmicas con capacidad fagocítica que forman parte del sistema inmune del SNC. En estado de reposo, las células microgliales tienen prolongaciones muy dinámicas que exploran el microambiente en busca de cambios en la homeostasis (Voet et al. 2019). Ante una alteración en el medio, como la aparición de patógenos, la microglía se activa. En este estado cambia su morfología, segrega citoquinas, elimina los restos celulares por fagocitosis, produce factores neuroprotectores y participa en procesos de restauración como la angiogénesis y la oligodendrogénesis. Sin embargo, aunque la función normal de la microglía es la protección del SNC, la microglía activada puede tener un efecto proinflamatorio y, en consecuencia, provocar neurotoxicidad (Rodríguez-Gómez et al. 2020).

3. La corteza somatosensorial

La corteza somatosensorial en el ratón se divide en corteza somatosensorial primaria (S1) y corteza somatosensorial secundaria (S2) (Figura 6). S1 se localiza en la región dorsolateral de la mitad rostral de la isocorteza, mientras que S2 se localiza lateral a S1 y separa a S1 del área insular cortical. S1 se puede subdividir en numerosas áreas en las que se conserva somatotopía entre estas y las distintas partes del cuerpo. Entre las áreas que conforman S1, la corteza de barriles representa las vibrisas y otras regiones faciales, y ocupa más de dos terceras partes del área total (Paxinos & Franklin 2004). En S1 encontramos, también, la representación de los miembros an-

teriores, el tronco, y los miembros posteriores. El presente trabajo se ha realizado en esta última región, que habitualmente se denomina S1HL (abreviatura del inglés *hindlimb*) (Watson et al. 2011).

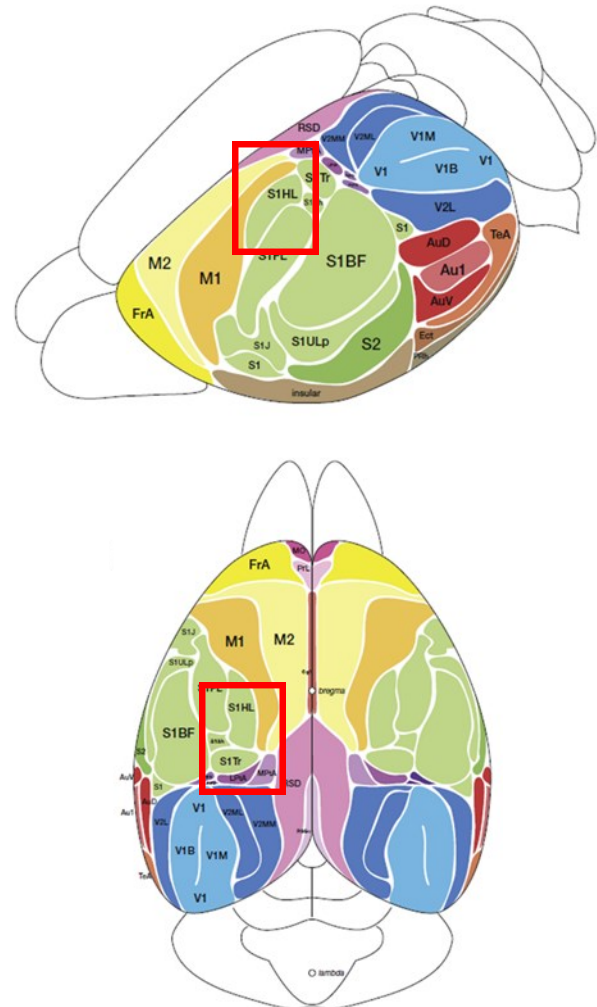


Figura 6. Esquema de las áreas corticales de la corteza cerebral del ratón. En la imagen superior, vista oblicua de la superficie dorsolateral anterior de la corteza cerebral. En la imagen inferior, vista superior. En ambas imágenes se observa la corteza somatosensorial primaria (verde) y, en particular, la correspondiente al miembro inferior (S1HL, hindlimb) (rectángulo rojo). Modificado de (Watson et al. 2011).

3.1 Aferencias

La isocorteza recibe aferencias tanto de otras zonas de la corteza como del tálamo (Figura 7). En la corteza somatosensorial primaria del ratón la mayor parte de las aferencias provienen de los núcleos talámicos de relevo ventral posteromedial (VPM) y ventral posterolateral (VPL), cuyos

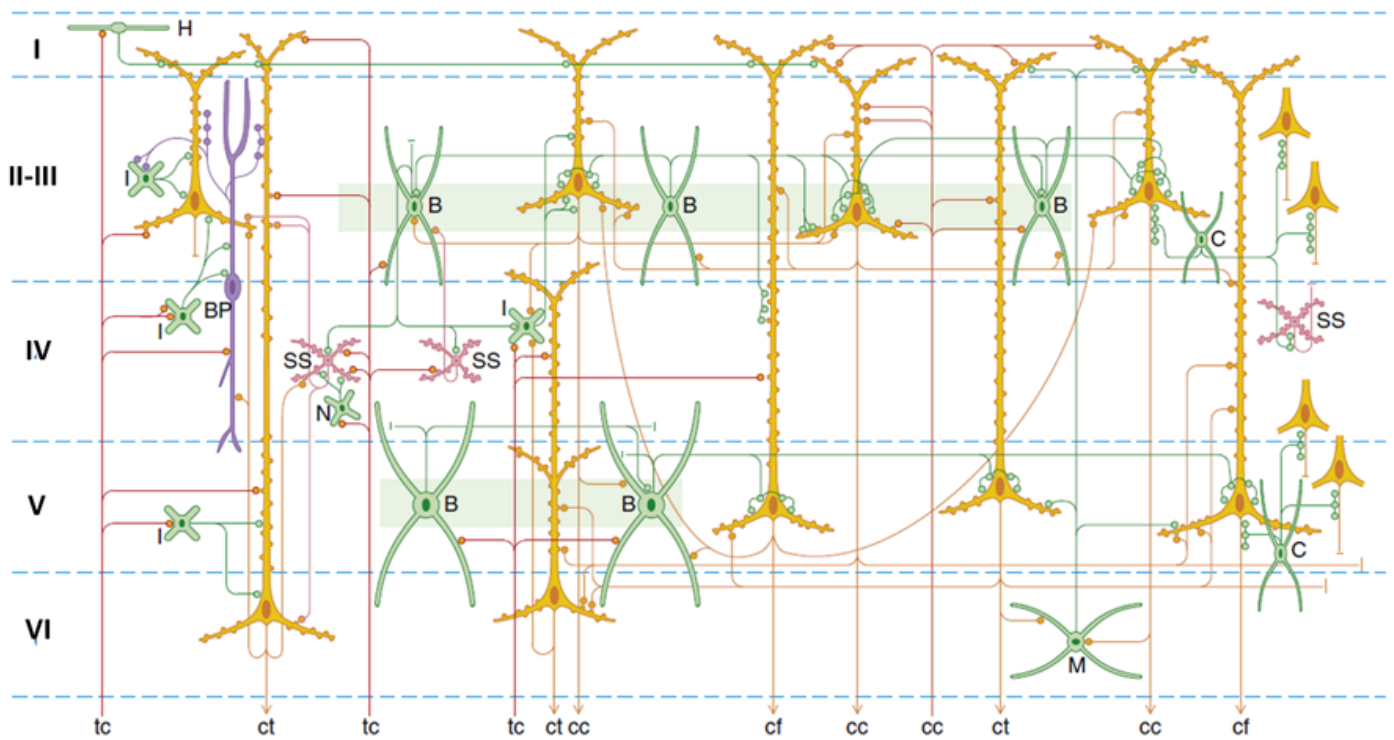


Figura 7. Conectividad de la isocorteza. Se muestran las conexiones más comunes entre las neuronas corticales organizadas por su clasificación morfológica. Se han representado las neuronas piramidales (naranja), las estrelladas con espinas (rosa) y las interneuronas (verde). La zona sombreada en verde indica la red inhibitoria mediada por uniones comunicantes. Abreviaciones: B, células en cesto; BP, célula bipolar (morada); C, célula en candelabro; H, inhibición horizontal; I, interneurona; M, célula de Martinotti; N, célula neurogliaforme; SS, célula estrellada con espinas. Las aferencias y eferencias han sido marcadas como: cc, corticocortical; cf, corticofugal (hacia el tronco del encéfalo y médula espinal); ct, corticotálamica; tc, tálamo-cortical. Modificado de (Watson et al. 2011)

axones llegan preferentemente a la capa IV. Se trata de fibras procedentes de neuronas tipo C (core type), también llamadas específicas o lemniscales. Sin embargo, aunque éste es el tipo neuronal predominante en los núcleos sensoriales, el tálamo también proyecta desde otros núcleos como el núcleo posterior, el ventrolateral y el ventromedial, que poseen mayoritariamente neuronas tipo M (matrix type) tanto focales como multiárea, que proyectan de forma divergente a las capas I, III y Va. Por último, las neuronas tipo IL de los núcleos intralaminares también proyectan a la corteza somatosensorial, concretamente a las capas Va y VI (Clascá et al. 2012; Tracey 2004) (Figura 8). Las aferentes talámicas representan el 17% de las sinapsis excitadoras que se establecen en capa IV, mayoritariamente (90%) en espinas dendríticas, donde producen conexiones muy eficaces (Bopp et al. 2017; Watson et al. 2011).

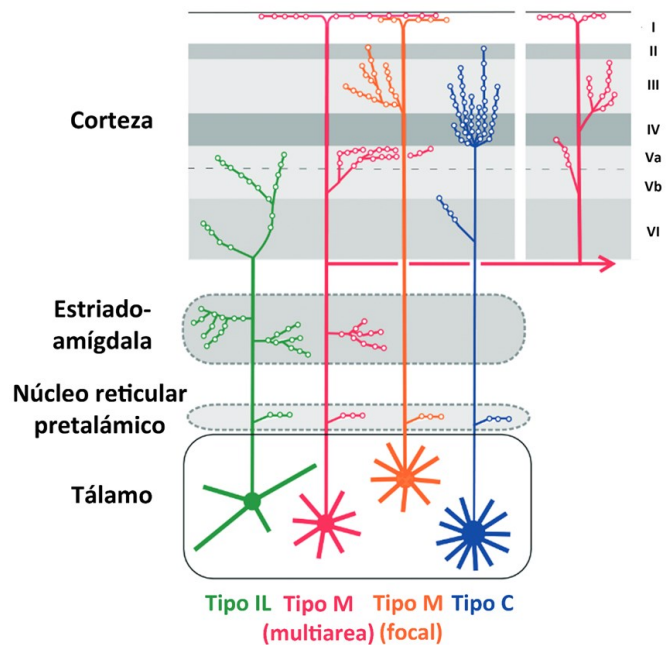


Figura 8. Diagrama esquemático de las neuronas de proyección talamocorticales. Muestra la morfología somatodendrítica y arborización axónica, incluyendo la distribución de los terminales axónicos en el núcleo pretalámico, el estriado y la corteza cerebral. Modificado de (Clascá et al. 2012).

3.2 Eferencias

La corteza somatosensorial presenta conexiones recíprocas a los núcleos talámicos. Las neuronas corticotalámicas se localizan en las capas V y VI. Las de la capa V terminan en la parte dorsal del núcleo posterior, mientras que aquellas de la capa VI proyectan al complejo ventrobasal, el grupo posterior y el núcleo reticular talámico.

Además de proyecciones hacia el tálamo, ciertas neuronas de la capa Vb proyectan hacia los núcleos de la columna dorsal y trigeminales del tronco del encéfalo. También se encuentran proyecciones al caudado-putamen, —lo que permite la integración de la información sensorimotora y cognitiva—, al núcleo rojo, a los núcleos pontinos, a los núcleos vestibulares y a la médula espinal (Tracey 2004) (Figuras 7 y 9).

3.3 Interconexiones de la corteza somatosensorial con otras áreas corticales

Se han descrito conexiones recíprocas entre la corteza somatosensorial primaria y el área motora primaria y con la corteza somatosensorial secundaria. Los axones que atraviesan el cuerpo caloso conectan la corteza somatosensorial de ambos hemisferios, se originan en las capas III, V y VI, y proyectan a las mismas capas del lado contralateral (Tracey 2004) (Figura 9).

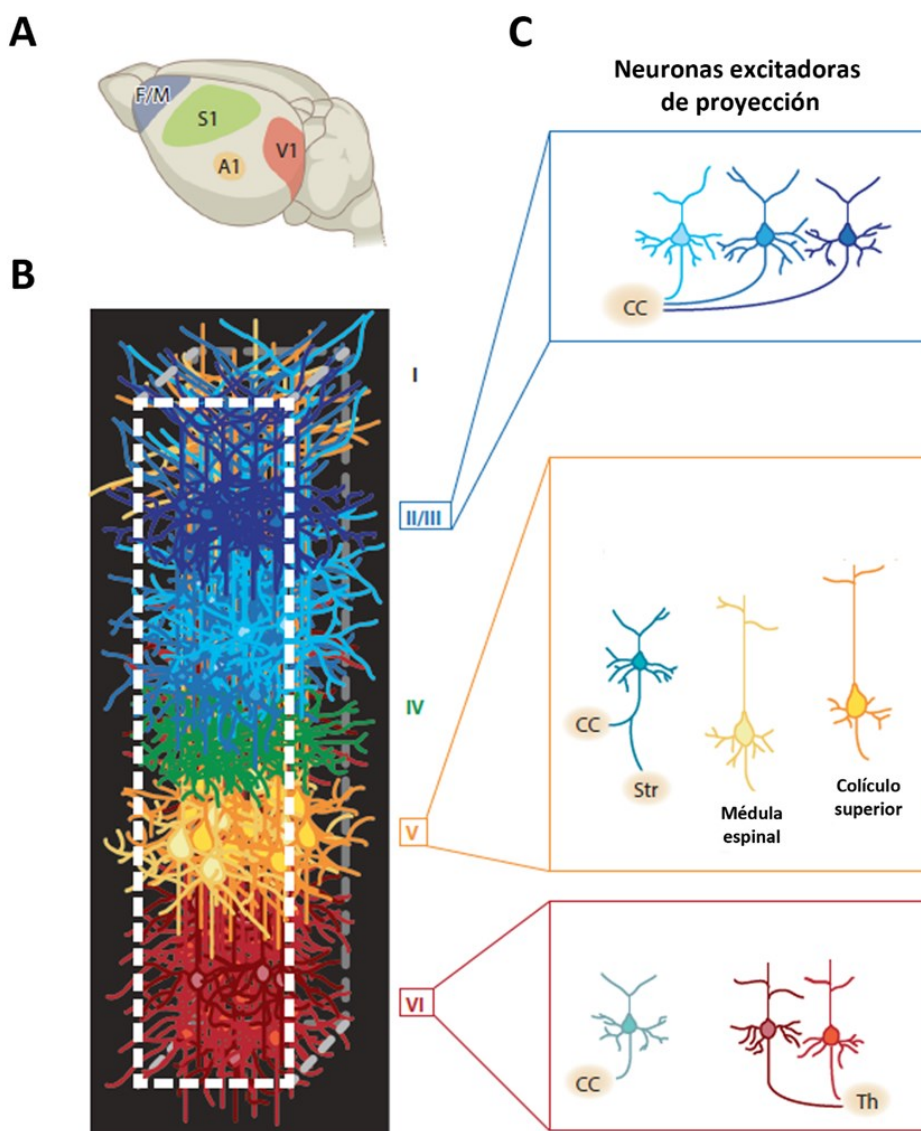


Figura 9. La isocorteza se organiza en áreas, capas y columnas pobladas por una gran diversidad de tipos neuronales excitadores e inhibidores. A. Representación esquemática de algunas de las áreas corticales dedicadas al procesamiento de las distintas modalidades sensitivas y al control motor fino. B. Columna cortical, que contiene capas organizadas de forma horizontal con una composición neuronal diversa. C. Las capas II/III contienen diferentes clases de neuronas piramidales cuyos axones proyectan a través del cuerpo caloso (CC). La capa V tiene diferentes neuronas piramidales que también proyectan a través del cuerpo caloso (CC), y que pueden dejar colaterales en el estriado (Str), así como neuronas piramidales subcerebrales que conectan con el tronco del encéfalo, la médula espinal y el colículo superior. La capa VI tiene neuronas corticotalámicas que conectan con diferentes núcleos del tálamo (Th) y neuronas cuyos axones proyectan a través del cuerpo caloso (CC). Extraído de (Lodato & Arlotta 2015).

4. Diferencias entre la corteza humana y la corteza de ratón

La facilidad de manipulación genética y lo asequible que es su mantenimiento y crianza respecto a otras especies hacen del ratón el modelo animal elegido en la mayoría de los estudios del sistema nervioso y sus patologías. Con frecuencia se asume que la isocorteza es una estructura equivalente en el ratón y en el humano, pero esta premisa debe ser examinada con cuidado.

Ambas isocortezas tienen estructuras organizadas en capas, pobladas de neuronas con características que son en general similares. A pesar de ello, hay importantes diferencias, algunas de las cuales vamos a describir brevemente a continuación. En el ratón, las capas supragranulares son menos extensas que en el humano (Jones 2009)

(Figura 10A). Por otro lado, también se han encontrado diferentes tipos celulares en las cortezas de diferentes especies. Uno de los ejemplos más claros es el de las neuronas de *double bouquet*. Estas células se caracterizan por presentar colaterales axónicas largas, —que forman haces verticales densamente agrupados (como colas de caballo),— y por ser muy numerosas (Jones 2009; Yáñez et al. 2005). Además, puesto que cada cola de caballo establece cientos de sinapsis inhibitorias con espinas y tallos dendríticos, dentro del estrecho campo de distribución vertical de su arborización axónica, se considera que las células de *double bouquet* representan un elemento clave en la organización microcolumnar de la neocorteza.

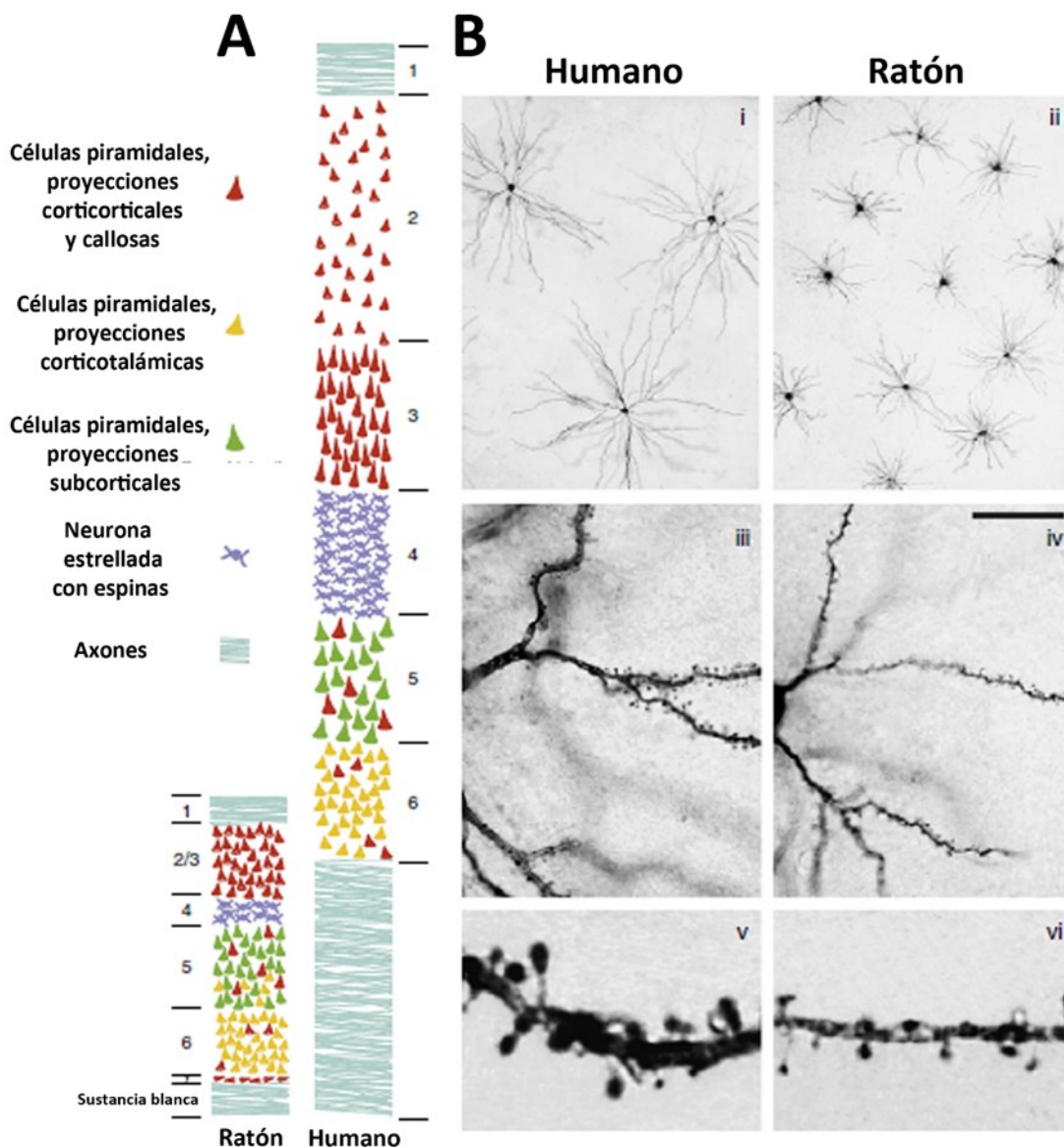


Figura 10. Isocorteza humana y del ratón. A. Aunque las capas de la corteza del ratón y del humano sean homólogas, su grosor y el grosor relativo de cada capa es diferente. B. Las dendritas basales de neuronas piramidales supragranulares de la corteza temporal han sido inyectadas con Lucifer Yellow y visualizadas con diaminobencidina (DAB). Como se puede observar, aunque el tamaño de los somas celulares pueda ser comparable, la extensión total de los árboles dendríticos en el humano es mucho más grande que el espacio abarcado por las dendritas de las neuronas del ratón. Asimismo, las espinas dendríticas son considerablemente más pequeñas en el ratón. Barra de escala: 425 μ m en i y ii; 45 μ m en iii y iv; y 10 μ m en v y vi. Modificado de (Benavides-Piccione et al. 2002; Watson et al. 2011).

Aunque estas células se han descrito en diversas especies, esta organización microcolumnar solo se ha observado en el humano y otros primates, pero no en roedores (ratón, rata), lagomorfos (conejo), artiodáctilos (cabra) ni carnívoros (gato, león, perro), lo que sugiere una diferencia fundamental en la organización de la corteza cerebral entre estas especies (Yáñez et al. 2005).

Otra de las diferencias notables es la densidad neuronal. Diferentes estimaciones en la corteza del ratón indican densidades neuronales desde más de 90000 neuronas/mm³ (Schüz & Palm 1989) hasta aproximadamente 120000 neuronas/mm³ (DeFelipe et al. 2002; Tsai et al. 2009), valores muy superiores a la densidad neuronal de los humanos (24000/mm³), e incluso la rata (55000/mm³) (DeFelipe et al. 2002). La alta densidad de neuronas implica un menor tamaño neuronal. De hecho, es llamativo el menor desarrollo de los árboles dendríticos en el ratón en comparación con los de la especie humana (Figura 10B) (Benavides-Piccione et al. 2002). No obstante, hay que tener en cuenta que las diferencias no son proporcionales entre ambas especies, es decir, que las neuronas del humano no son “neuronas del ratón” a mayor escala (Benavides-Piccione et al. 2019). Además, el número estimado de sinapsis por neurona es mayor en el humano (30000) que en el ratón (22000) (DeFelipe et al. 2002).

Lo descrito anteriormente sugiere que las neuronas que reciben más sinapsis deben tener una arborización dendrítica más compleja, lo que incrementaría la distancia entre los cuerpos celulares. Por el contrario, las neuronas que reciben menos sinapsis deben tener árboles dendríticos menos complejos, permitiendo de esta forma un empaquetamiento de neuronas más denso (DeFelipe et al. 2002). En cuanto a la naturaleza de las sinapsis, la proporción de sinapsis inhibitoras es ligeramente mayor en el ratón (16%) que en la rata (11%) o en los humanos (11%) (DeFelipe et al. 2002).

En cuanto a la composición y homología del cerebro entre ratones y humanos, recientemente se ha comparado la secuencia de ácido ribonucleico (ARN) de cada tipo celular del cerebro de ambas especies (Hodge et al. 2019). En general, se ha observado que la organización transcriptómica de las diferentes clases y subclases celulares apa-

rece conservada. Los genes que discriminaban neuronas inhibitoras y excitadoras eran homólogos, mientras que los tipos celulares con menos correspondencia entre ambas especies eran los de células no neuronales, con una expresión mucho más divergente. Entre los genes más divergentes se encuentran los de receptores de neurotransmisores (receptores de serotonina y glutamato), canales iónicos, elementos de la matriz extracelular y moléculas de adhesión celular (colágeno, cadherinas).

5. Sinapsis

Las sinapsis son contactos especializados a través de los cuales se transmite información entre neuronas, entre una célula sensorial y una neurona, o entre una neurona y una célula efectora, comúnmente muscular o secretora. En la corteza cerebral, las sinapsis más abundantes se establecen entre un axón y una dendrita, seguidas por las sinapsis axosomáticas, y las axo-axónicas. Atendiendo al mecanismo de transmisión de la información las sinapsis se dividen en eléctricas y químicas.

5.1 Sinapsis eléctricas

En las sinapsis eléctricas el paso de la información entre dos células se realiza mediante canales intercelulares que se denominan uniones comunicantes o nexus (en inglés, *gap junctions*), que comunican directamente los citoplasmas de las dos células (Figura 11). En las uniones comunicantes, cada canal está formado por dos hemicanales, anclados en la membrana plasmática de cada célula, produciéndose así una comunicación directa y bidireccional entre ambas. Cada hemicanal es un oligómero de seis subunidades proteicas llamadas conexas. En las sinapsis eléctricas la separación entre las membranas plasmáticas de ambas células es de solo 4 nm. Dado que las uniones comunicantes permiten el paso de iones de un citoplasma a otro, la comunicación entre las células es extremadamente rápida y bidireccional, lo que permite sincronizar el funcionamiento de grandes grupos de neuronas. En la corteza cerebral de los mamíferos son poco frecuentes, y se establecen fundamentalmente entre interneuronas inhibitoras (Kandel et al. 2021).

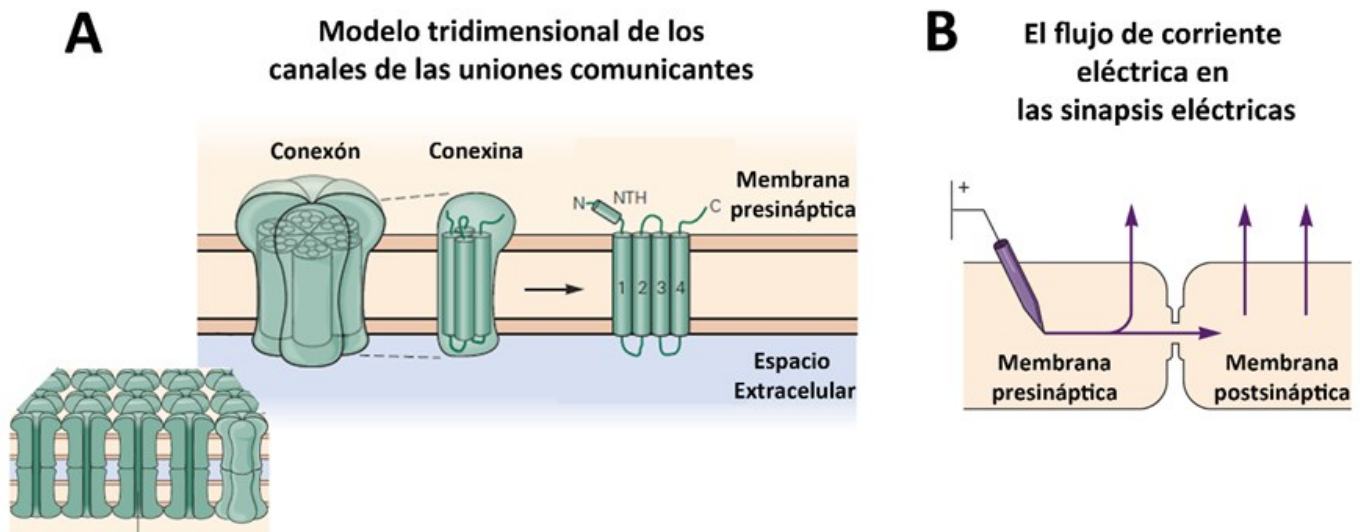


Figura 11. Propiedades funcionales de las sinapsis eléctricas. A. La sinapsis eléctrica se compone de canales especializados que permiten el paso de iones. Cada conexón se compone de 6 subunidades idénticas llamadas conexinas. Las conexinas se sitúan de tal forma que el poro queda en el centro de la estructura. B. En la sinapsis eléctrica la corriente pasa directamente de una neurona a la otra mediante uniones comunicantes que conectan el citoplasma de ambas células y que ofrecen una baja resistencia a la corriente eléctrica.

5.2 Sinapsis químicas

En las sinapsis químicas el paso de la información se produce mediante la liberación por parte del elemento presináptico de una molécula denominada neurotransmisor, que interacciona con receptores específicos localizados en la membrana del elemento postsináptico. En este caso, el flujo de información es unidireccional. Desde un punto de vista morfológico, las sinapsis químicas son mucho más complejas. Están constituidas por un elemento presináptico (generalmente un terminal axónico) que contiene el neurotransmisor almacenado en el interior de las vesículas sinápticas; un elemento postsináptico, que puede ser un soma neuronal, una dendrita o, menos frecuentemente, otro axón; y una hendidura sináptica, que separa ambos elementos (Figura 12) (Gray 1959; Peters et al. 1991; Peters & Palay 1996). Las vesículas sinápticas se concentran alrededor de una zona de la membrana presináptica del axón denominada zona activa (Figura 12B). Cuando una despolarización alcanza el terminal axónico, se abren canales que dejan entrar iones de calcio, lo que produce que las vesículas sinápticas se fusionen con la membrana celular y liberen el neurotransmisor en la hendidura. La interacción del neurotransmisor con los receptores específicos situados en la membrana de la neurona postsináptica producirá fenómenos eléctricos y/o metabólicos, dependiendo de los neuro-

transmisores y receptores implicados. De esta forma, las sinapsis químicas son más variables y plásticas que las eléctricas, pudiendo producir comportamientos más complejos. Pueden producir señales excitadoras o inhibitorias y cambios en las células postsinápticas que duran desde milisegundos a minutos. Pueden servir también para amplificar señales, ya que un pequeño terminal presináptico puede alterar la actividad de una neurona completa (Kandel et al. 2021).

5.3 Tipos de sinapsis químicas

Cuando se comenzó a estudiar la corteza cerebral mediante microscopía electrónica se reveló la existencia de dos tipos morfológicos de sinapsis, dependiendo del grosor de la densidad postsináptica: las sinapsis de tipo I y las sinapsis de tipo II (Gray 1959). Las sinapsis de tipo I también se denominan sinapsis asimétricas (SA) (Colonnier 1968), ya que presentan una banda de material electrodensito de unos 40 nm de grosor en la cara citoplasmática de la membrana postsináptica. Las sinapsis de tipo II también se denominan sinapsis simétricas (SS) (Colonnier 1968), porque tienen una densidad postsináptica más delgada, de aproximadamente 10 nm, presentando las densidades pre y postsinápticas un grosor similar (Gray 1959; Peters & Palay 1996) (Figura 13).

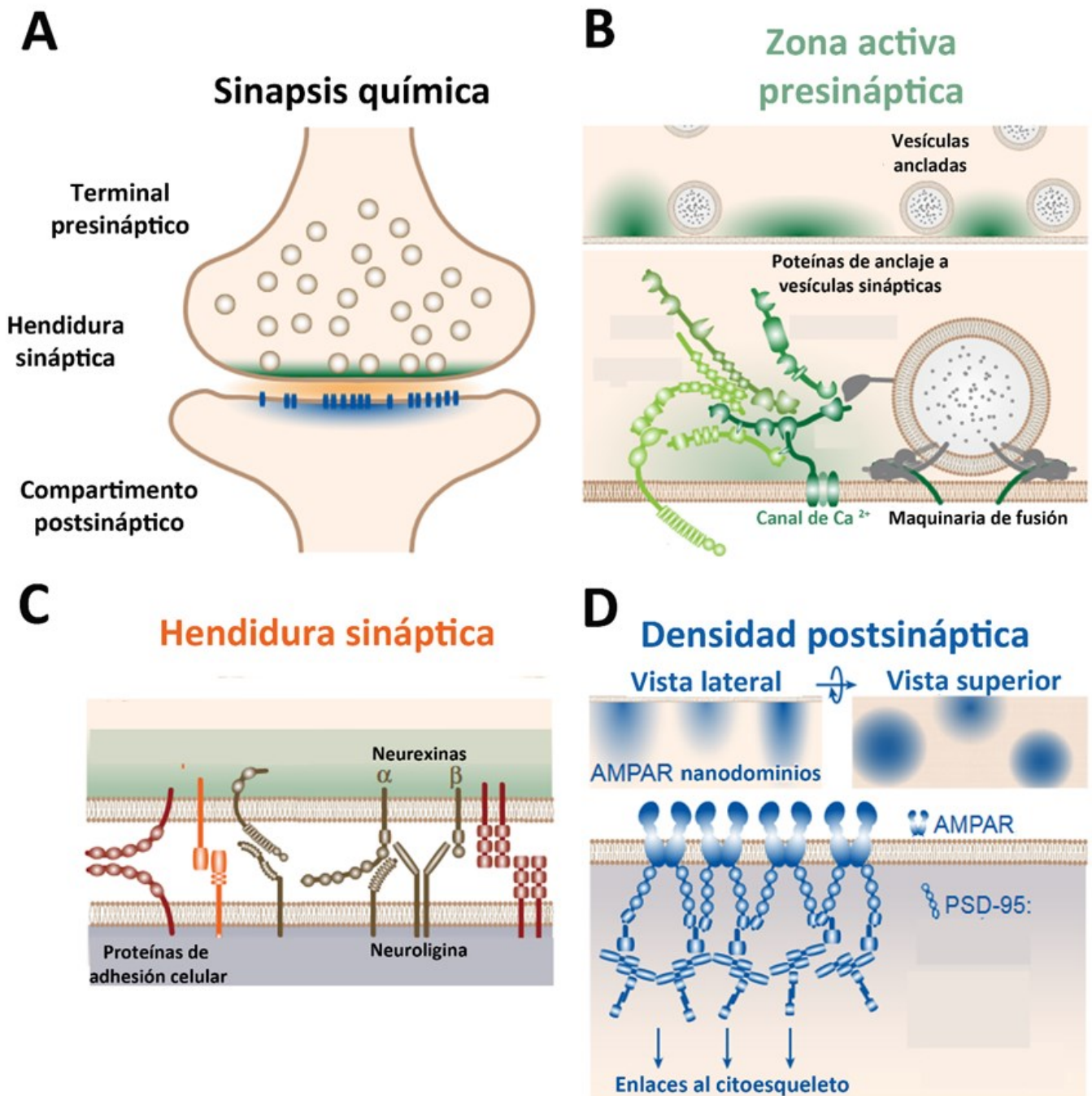


Figura 12. La maquinaria de las sinapsis. A. Esquema de la sinapsis excitadora, la zona activa (verde), el espacio sináptico (naranja) y la PSD (azul). Este código de color se mantiene en el resto de apartados. B. El patrón de componentes moleculares de la zona activa presináptica. C. Representación de los complejos proteicos situados en el espacio sináptico desde una vista lateral. D. Vista lateral y superior del patrón molecular de los componentes de la PSD. Se han representado los receptores AMPA (AMPA), que se agrupan localmente formando nanodomínios. Modificado de (Biederer et al. 2017).

Estas diferencias morfológicas entre ambos tipos de sinapsis permiten su diferenciación en los estudios de microscopía electrónica. Funcionalmente, las SA son excitadoras y usan principalmente glutamato como neurotransmisor, mientras que las SS son inhibitoras y usan ácido γ -aminobutírico (GABA) mayoritariamente como neurotransmisor (DeFelipe & Fariñas 1992; Houser et al. 1984; Peters & Palay 1996). Estudios

cuantitativos realizados en la isocorteza han demostrado que la mayoría de las sinapsis son SA o excitadoras (90%) mientras que el resto (10%) son sinapsis SS o inhibitoras. Este balance entre sinapsis excitadoras e inhibitoras se mantiene aproximadamente constante entre diferentes regiones corticales y especies (DeFelipe et al. 2002).

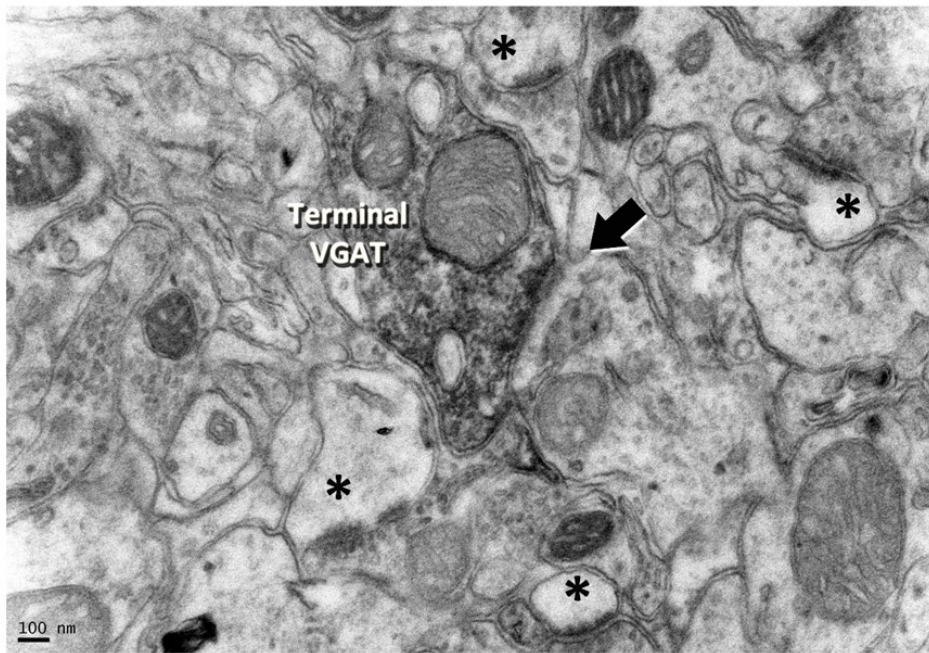


Figura 13. Diferencias entre las densidades postsinápticas de las sinapsis excitadoras e inhibitoras. Imagen obtenida con microscopio de transmisión de la corteza cerebral del ratón. Se observa un terminal inhibitor marcado con un anticuerpo contra el transportador vesicular de GABA (VGAT). La densidad postsináptica de la sinapsis inhibitora marcada (flecha) es delgada y poco prominente comparada con las densidades postsinápticas de las sinapsis establecidas por los axones excitadores circundantes (asteriscos).

5.4 Composición de la densidad postsináptica

La densidad postsináptica (PSD por sus siglas en inglés, *postsynaptic density*) contiene una gran variedad de receptores, proteínas de andamiaje y complejos de señalización implicados en la transmisión y plasticidad sináptica. La cara exterior de la PSD es rica en receptores de neurotransmisores y moléculas de adhesión trans-sinápticas incluidas en la membrana plasmática. Debajo de los receptores hay una densa matriz de proteínas, incluyendo las de andamiaje, de unión a actina y de cascadas de señalización. Algunos estudios indican el posible alineamiento en columna entre los sitios de liberación de vesículas de neurotransmisor en la zona activa y los nanodominios ricos en receptores de la PSD (Figura 12D) (Biederer et al. 2017).

En la PSD de las sinapsis excitadoras se localizan los receptores ionotrópicos de glutamato, conocidos por el nombre de sus principales agonistas: NMDA, AMPA (ácido α -amino-3-hidroxi-5-metilo-4-isoxazolpropiónico) y kainato. Por otro lado, los receptores metabotrópicos, como el receptor metabotrópico de glutamato (mGluR) están acoplados a proteínas G que desencadenan cascadas de activación mediante segundos mensajeros (Luján et al. 1996).

Las proteínas de adhesión celular median el contacto sináptico por la unión a proteínas localizadas en la membrana presináptica. Un ejemplo bien descrito es la interacción de neurexinas presinápticas con neuroliginas postsinápticas (Sheng

& Kim 2011)(Figura 12C). Las proteínas de andamiaje crean la estructura que da forma a la PSD mediante dominios de unión que les permiten interaccionar con otras proteínas. El grupo de proteínas de andamiaje mejor conocido es la familia de proteínas MAGUK (del inglés *membrane-associated guanylate kinases*) que incluyen PSD95, PSD93 (del inglés *postsynaptic density protein*), SAP102 Y SAP97 (del inglés *synapse-associated protein*) (Figura 12D) (Bayés et al. 2011). Las interacciones entre estas proteínas y los receptores permiten a la sinapsis regular la activación de los receptores así como las cascadas de señalización (Biederer et al. 2017). También se encuentran proteínas de señalización como kinasas, fosfatasa y guanosa trifosfatasa (GTPasas), que regulan múltiples procesos, y proteínas de unión al citoesqueleto de actina como alfa-actinina, cofilina y cortactina (Gentile et al. 2022; Harris & Weinberg 2012).

La densidad postsináptica de las sinapsis inhibitoras es más estrecha, consistente con las descripciones de las sinapsis tipo II de Gray (Figura 13). En la membrana postsináptica de las sinapsis inhibitoras se encuentran los receptores de GABA. El número de receptores GABA está relacionado con la magnitud de la corriente postsináptica inhibitora. Los receptores interaccionan con las proteínas de andamiaje, algunas de las cuales son la gefirina, la profilina y algunas isoformas específicas de GRIP (del inglés *glutamate receptor interacting protein*) (Harris & Weinberg 2012).

5.5 Forma y tamaño de las sinapsis

Las sinapsis no son estructuras estáticas sino que van sufriendo variaciones debido a los cambios funcionales de la actividad neuronal. La plasticidad que presenta el sistema nervioso hace que sean remodeladas y reemplazadas continuamente como parte del funcionamiento normal del cerebro (Fauth & Tetzlaff 2016; Lisman 2017). Por un lado, la distribución de las vesículas sinápticas en los axones y el tamaño de la zona activa cambian después de procesos de LTP. Por otro lado, se producen cambios en la PSD, involucrando a los receptores de neurotransmisores y a los complejos que median el anclaje, reciclaje y funcionamiento de dichos receptores. Todo ello conduce hacia cambios en el tamaño y la forma de las densidades postsinápticas. Se ha descrito el aumento de tamaño de las sinapsis tras la inducción de LTP *in vivo* (Popov et al. 2004), habiendo un correlato directo entre el tamaño de las PSD y la fuerza sináptica medida como la amplitud de los potenciales postsinápticos excitadores (Holler et al. 2021). También hay que tener en cuenta la forma de la PSD, pudiendo ser aproximadamente discoidal (también llamada macular), perforada, con invaginaciones en forma de herradura, o una PSD fragmentada en varias partes aisladas (Cano-Astorga et al. 2021; Domínguez-Álvaro et al. 2019; Montero-Crespo et al. 2020; Santuy et al. 2018a). Al explorar las diferentes sinapsis según su forma, se ha cuantificado un mayor número de receptores tanto de tipo AMPA como de NMDA en las sinapsis con una forma más compleja, como en las sinapsis perforadas y fragmentadas, respecto a las sinapsis que tienen una PSD macular (Ganeshina et al. 2004a,b). Esto se traduce en que también las sinapsis más complejas son las que tienen mayores amplitudes de las corrientes postsinápticas respecto a las sinapsis más simples (Holler et al. 2021).

6. Espinas dendríticas

En la corteza cerebral, la mayor parte de las sinapsis se encuentran en el neuropilo, y en particular se establecen sobre las espinas dendríticas (DeFelipe et al. 1999). Las espinas son protuberancias de las dendritas que aumentan en gran medida su superficie. Teniendo en cuenta que cada dendrita tiene miles de espinas, la superficie

que ofrecen para el establecimiento de las sinapsis es mucho mayor que la que se observa en el soma neuronal o en el tallo dendrítico (DeFelipe & Fariñas 1992). De esta forma, la mayoría de las sinapsis que recibe una neurona piramidal son sinapsis axoespinosas, mientras que las sinapsis axosomáticas y las axodendríticas en los tallos son bastante menos numerosas. Las sinapsis axoaxónicas establecidas por las células en candelabro (DeFelipe & Fariñas 1992) son las menos numerosas.

Las espinas dendríticas se encuentran principalmente en las dendritas de las neuronas piramidales y en las neuronas estrelladas con espinas. Fueron descritas por primera vez en 1888 por Cajal, quien interpretó estas estructuras como posibles dianas de los axones (Figura 14A) (DeFelipe 2015). Son compartimentos subcelulares que influyen en el procesamiento de las señales neuronales y actúan como unidades funcionales integradoras, en las que su morfología está asociada a su función (Araya et al. 2014; Cornejo et al. 2022; Parajuli et al. 2020; Yuste 2010). De esta forma, es de relevancia la observación de cambios morfológicos asociados a la plasticidad sináptica y eventos neurodegenerativos (Figura 14B) (Heck & Benavides-Piccione 2016).

En cuanto a su morfología, las espinas dendríticas son bastante heterogéneas tanto en tamaño como en la forma (Figura 14 y Figura 15). Típicamente, son una protuberancia que emerge del tallo dendrítico y que se une a este por un cuello normalmente estrecho (0.2 μm de diámetro) y de longitud variable, del que se origina una cabeza más ancha (1 μm de diámetro) (Yuste 2010). La estructura y forma de las espinas es debida al citoesqueleto, que está principalmente formado por filamentos de actina (Stewart et al. 2014) y que modifica, en parte, la difusión de los receptores en la membrana y la interacción con el sistema endosomal (Adrian et al. 2014). De forma tradicional, las espinas dendríticas han sido divididas en cuatro tipos morfológicos que de menor a mayor volumen son: filopodial, fina, sésil y fungiforme (Berry & Nedivi 2017). Las espinas dendríticas han sido agrupadas también en estructuras filopodiales, que suelen ser las más pequeñas, estructuras inmaduras de tamaño intermedio y estructuras maduras, que se corresponden con

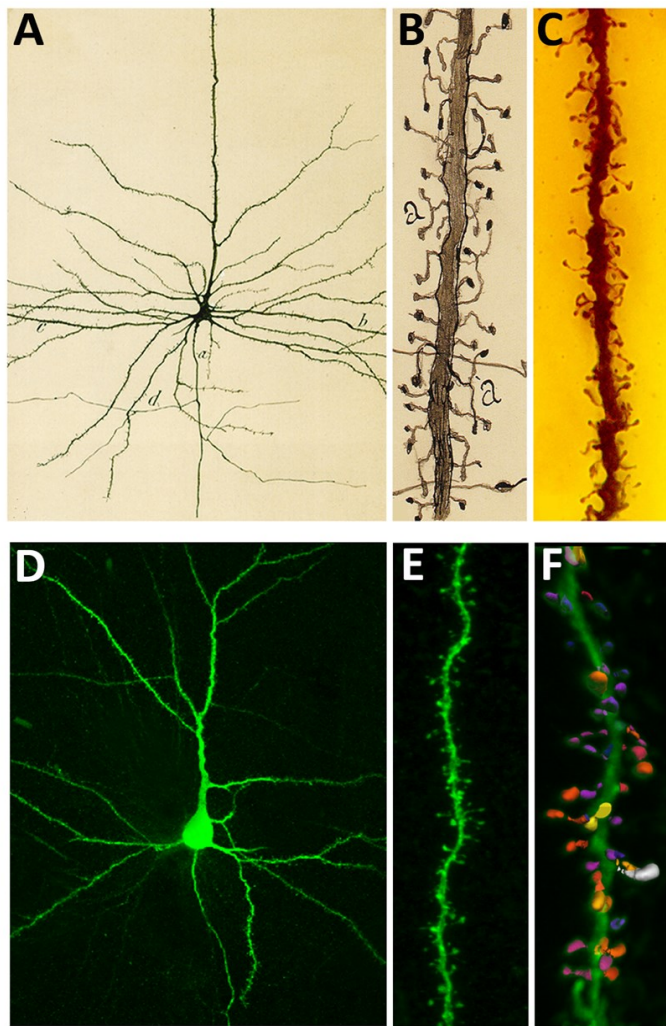


Figura 14. La célula piramidal y las espinas dendríticas.

A. Dibujo hecho por Cajal (1899) para ilustrar una célula piramidal de la corteza motora humana. B. Dibujo de Cajal (1933) para ilustrar las espinas dendríticas de las células piramidales (corteza cerebral de un niño de dos años). C. Microfotografía de una preparación de Cajal del cerebro de un niño de 15 días teñida con el método de Golgi. Se muestra la dendrita apical de una célula piramidal de la capa V cubierta por completo de espinas. D. Imagen de microscopía confocal de una célula piramidal de la corteza somatosensorial del ratón inyectada con Lucifer Yellow. E. Detalle de la dendrita cubierta por espinas dendríticas. F. Reconstrucción digital y tridimensional para el análisis de la morfología de las espinas dendríticas. A-C, modificado de (DeFelipe 2015); D-F, imágenes cedidas por Ruth Benavides-Piccione.

las espinas más grandes (Figura 15A). Sin embargo, resulta muy difícil distinguir entre dichas categorías basándonos únicamente en la morfología. En adultos, aunque la mayoría de las espinas contienen contactos sinápticos maduros y funcionales, se observa hasta un 20% de espinas inmaduras y de forma filopodial (Figura 15C y 15D) (Berry & Nedivi 2017). En los últimos años se ha demostrado que las espinas dendríticas son altamente dinámicas, y que su morfología sigue una distribución continua y unimodal (Figura 15B)

(Berry & Nedivi 2017; Ofer et al. 2021).

La morfología de las espinas dendríticas está íntimamente ligada a su grado madurativo. Las espinas filopodiales, que son las que ocupan menos volumen, son mucho menos estables y se encuentran en mayor medida en estadios postnatales, disminuyendo drásticamente en el adulto. Esto sugiere que la espina filopodial es probablemente la primera etapa de una espina que posteriormente cambia de morfología según va madurando en el tiempo (Bhatt et al. 2009) (Figura 15). Las espinas dendríticas pequeñas son las que más se forman y eliminan a lo largo del tiempo (Pfeiffer et al. 2018). Su morfología también está directamente ligada a su función. Concretamente, el volumen de la cabeza se correlaciona con el área de la PSD, el número de receptores postsinápticos y la cantidad de neurotransmisor listo para ser liberado (Arellano et al. 2007a; Ofer et al. 2021). Por otro lado, la longitud del cuello es proporcional al grado de aislamiento bioquímico y eléctrico de la espina respecto al tallo de la dendrita (Araya et al. 2006), siendo inversamente proporcional a los potenciales registrados en el soma tras la estimulación de la espina dendrítica (Araya et al. 2006; Yuste 2010, 2013). Además, se ha demostrado que en las espinas más grandes se pueden generar corrientes sinápticas mayores que en las espinas pequeñas (Vlachos et al. 2009). La distribución y el tamaño de las espinas varía a lo largo de la dendrita y hay diferencias entre dendritas apicales y basales (Anton-Sanchez et al. 2017; Benavides-Piccione et al. 2013).

En sus estudios, Cajal ya observó mayor densidad de espinas en estadios juveniles respecto a adultos, señalando que la adición o eliminación de espinas era el fenómeno en el que podrían estar basados el aprendizaje y la memoria. Con el desarrollo de técnicas de marcaje celular y microscopía de dos fotones se han podido hacer estudios longitudinales sobre una misma neurona monitorizando la incorporación o eliminación de espinas dendríticas en diferentes contextos (Blumenstock et al. 2017). Las espinas formadas de nuevo pueden ser espinas persistentes que aparecen y se mantienen durante meses, mientras que si desaparecen no vuelven a emerger. El otro tipo de espinas son las espinas transitorias,

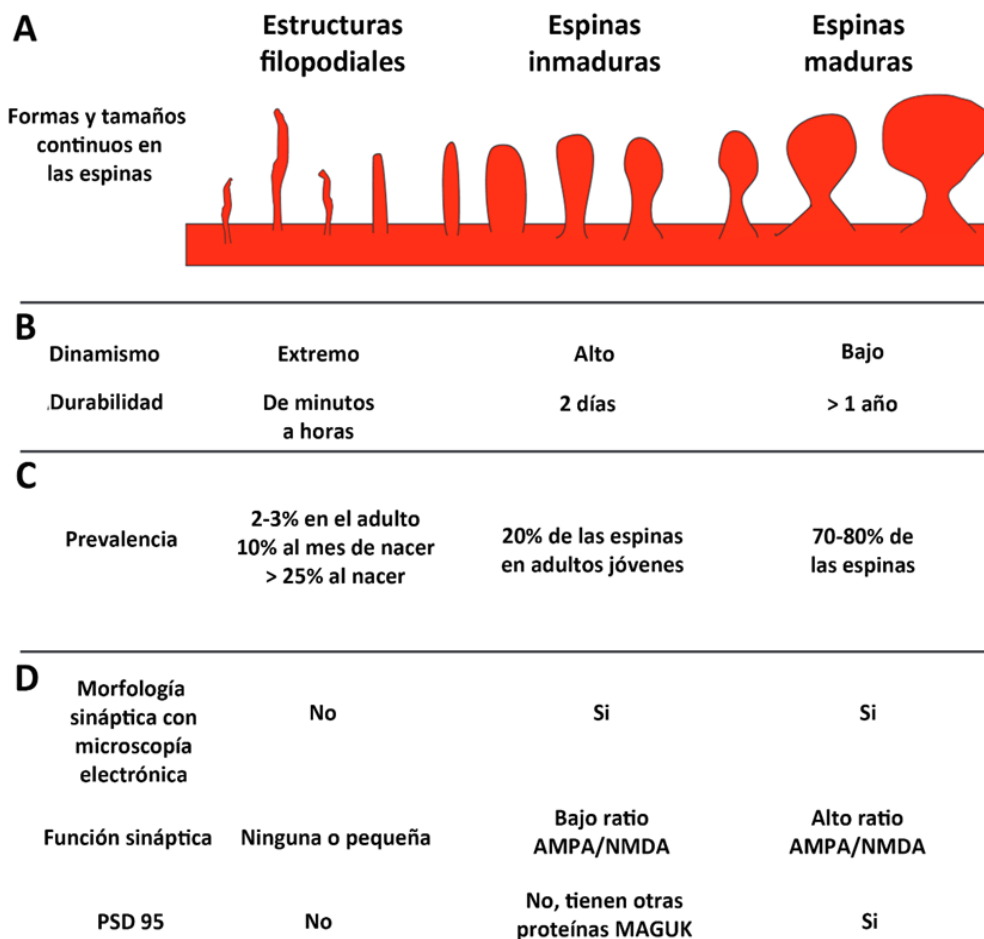


Figura 15. Las espinas se distribuyen en un continuo de morfologías y funciones. A. Representación de la morfología de las espinas. Las espinas pueden presentarse como estructuras filopodiales, estructuras inmaduras y estructuras maduras. B. Dinámica y duración de las espinas dendríticas a lo largo del tiempo. C. Prevalencia de cada tipo de espina a lo largo de la vida D. Componentes moleculares y estructuras observadas mediante microscopía electrónica en el gradiente morfológico de las espinas dendríticas. Modificado de (Berry & Nedivi 2017).

que son añadidas o eliminadas en una media de 4 días. En la corteza somatosensorial, solo el 35% de las espinas persiste a las tres semanas de edad, incrementándose este porcentaje hasta el 54% entre las cuatro y las diez semanas de edad, y finalmente estabilizándose el 70% de las espinas en el adulto. Una de las proteínas que se encuentran en espinas estabilizadas es la proteína de andamiaje PSD95 (Figura 15D). Se ha descrito que la proteína de andamiaje PSD95 no está presente en las estructuras filopodiales ni en las espinas inmaduras, apareciendo después, a medida que las espinas se estabilizan y maduran (Cane et al. 2014; Lambert et al. 2017; Villa et al. 2016). La estabilización en el adulto se logra mediante un equilibrio entre las espinas que se pierden y las que emergen de nuevo. Estudios con correlatos comportamentales sugieren que lo que mejor correlaciona con la consolidación y almacenamiento de nueva información a largo plazo es la estabilización de espinas que se han creado de nuevo. Además, hay otras vías de formación de espinas, como las sinapsis en el tallo dendrítico que parece que preceden a la formación de espinas en la misma región. Los procesos de LTP están relacionados con la creación de nuevas espinas y con la

estabilización de otras preexistentes, mientras que los procesos de depresión a largo plazo (LTD, del inglés *Long Term Depression*) producen disminución del volumen y desestabilización de espinas (Berry & Nedivi 2017). De hecho, el origen de las membranas para la generación de nuevas espinas podría ser el retículo endoplásmico liso de los tallos dendríticos, ya que usando protocolos de LTP se ha observado cómo disminuye en los tallos dendríticos, en correlación con el incremento de la densidad de espinas (Kulik et al. 2019). Aunque en muchos trabajos cuantitativos se interpreta cada espina como una sinapsis, parece que no todas las espinas establecen contactos funcionalmente efectivos. En estudios de microscopía electrónica, se ha observado que en el cerebro adulto, entre un 2% y un 4% de las espinas no contienen densidades postsinápticas (Arellano et al. 2007b; Bosch et al. 2015; Kasthuri et al. 2015). Además, algunas espinas establecen más de una sinapsis tanto en la cabeza como en el cuello de la misma (Berry & Nedivi 2017; Santuy et al. 2018b).

7. El aparato de espina

El aparato de espina es un orgánulo que se localiza en las espinas dendríticas y es parte de la red continua de retículo endoplasmático liso que se encuentra en las neuronas telencefálicas. El aparato de espina consiste en dos o más cisternas membranosas que en ocasiones aparecen conectadas. Entre cada par de cisternas se observa una banda electrodensa, que a veces aparece como una estructura doble, y que contrasta con el interior de las cisternas, ya que estas son electrolúcidas. Fueron descritos por primera vez por Gray en sus estudios de microscopía electrónica (Figura 16) (Gray 1959).

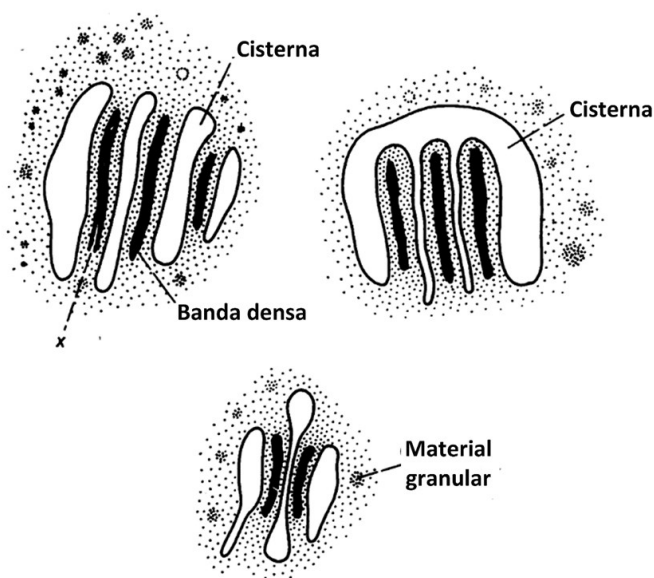


Figura 16. Diagramas que ilustran los aparatos de espina de la corteza cerebral. Consisten en cisternas que se alternan con bandas electrodensas. Las bandas a veces aparecen como estructuras dobles (x). Las cisternas pueden ser continuas (derecha). Extraído de (Gray 1959).

Sus funciones parecen estar relacionadas con la plasticidad sináptica, regulación del calcio y modificación y transporte de proteínas sintetizadas de forma local en las espinas dendríticas (Jedlicka et al. 2008). El aparato de espina aparece de forma más frecuente en las espinas que contienen sinapsis con una morfología más compleja (Spacek 1985).

Para el estudio del aparato de espina se usan técnicas inmunohistoquímicas que marcan sinaptopodina, una proteína de unión a actina que se localiza en las bandas electrodensas de este orgá-

nulo y que es esencial para su formación, ya que animales deficientes en esta proteína no forman aparatos de espina en sus neuronas. La expresión de sinaptopodina en ratones comienza postnatalmente, se incrementa con la madurez y disminuye con los años (Yap et al. 2020). Estudios electrofisiológicos y comportamentales demostraron que los ratones deficientes en sinaptopodina presentan dificultades en el establecimiento de la LTP y deficiencias de la memoria espacial (Jedlicka et al. 2008). La presencia de sinaptopodina facilita la expansión de las espinas después de la LTP y lo hace mediante la liberación del calcio almacenado en el aparato de espina (Korkotian et al. 2014; Vlachos et al. 2009). El calcio actúa como segundo mensajero, iniciando cascadas de señalización que permiten la LTP, LTD, reorganización del citoesqueleto de actina y expansión del volumen de las espinas dendríticas (Bell et al. 2019).

No todas las espinas poseen aparato de espina. De hecho, el aparato de espina es dinámico y puede aparecer en espinas preexistentes, lo que hace que la espina crezca en tamaño, mientras que la pérdida del aparato de espina se asocia con la reducción en el tamaño de la cabeza de la espina (Maggio & Vlachos 2014; Yap et al. 2020). Las espinas con sinaptopodina sobreviven más tiempo (17.5 días de media) que aquellas sin esta proteína (6.8 días de media), incluso cuando las espinas son de igual tamaño, lo que sugiere que es la presencia de sinaptopodina y no el tamaño de la espina lo que determina la supervivencia de la espina a largo plazo. Las espinas que van a ser eliminadas y que tienen sinaptopodina, pierden la sinaptopodina antes de desaparecer (Yap et al. 2020). Estos resultados implican a la sinaptopodina como uno de los mayores reguladores de la estabilidad de las espinas dendríticas.

Cuando se produce la LTD, el receptor mGluR1 promueve la degradación lisosomal de la sinaptopodina en los tallos dendríticos y apoya la estabilización de la sinaptopodina en algunas espinas, produciéndose un refinamiento de los circuitos sinápticos que elimina selectivamente espinas inestables mientras se preservan aquellas fuertes y estables (Speranza et al. 2022).

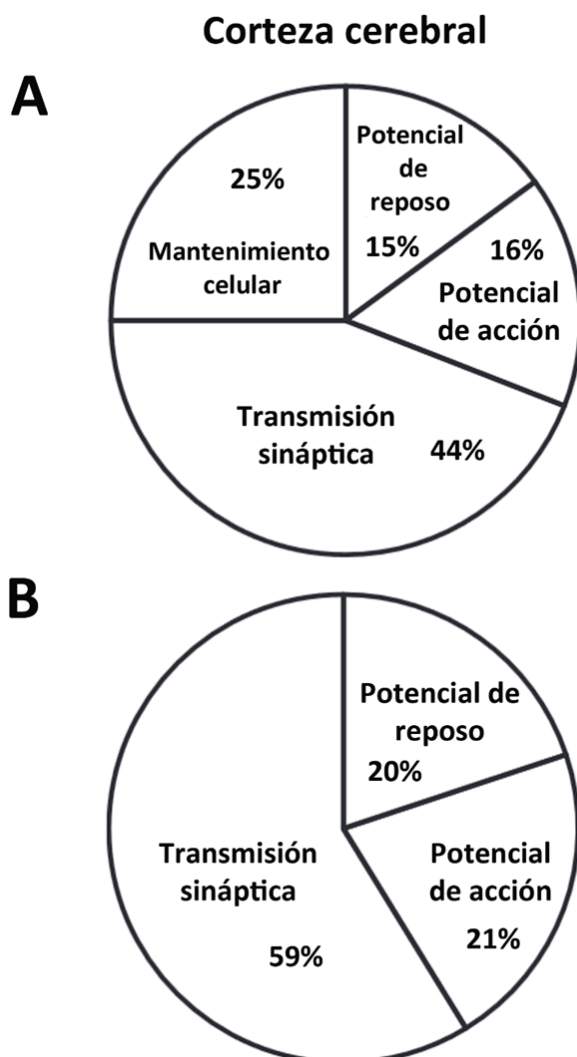
8. El aporte energético en el sistema nervioso: las mitocondrias

El cerebro es uno de los órganos que más energía consume y la actividad sináptica en gran parte contribuye a ello (Faria-Pereira & Morais 2022). En general, la mayor parte del gasto energético cerebral (hasta el 50%) se produce en el elemento postsináptico, con el fin de revertir los movimientos iónicos que se producen durante la respuesta sináptica (Figura 17) (Howarth et al. 2012). En los animales adultos se estima que las sinapsis excitadoras tienen un gasto energético mayor que las sinapsis inhibitoras, puesto que en las sinapsis inhibitoras el potencial de repolarización está más próximo al potencial de reposo, y restablecer el gradiente de cloro gasta menos energía que restablecer el gradiente de sodio (Harris et al. 2012; Howarth et al. 2012).

Las mitocondrias son orgánulos característicos de los organismos eucariotas encargados de suministrar energía a las células. La energía que utilizan las neuronas se obtiene mediante glucólisis y fosforilación oxidativa, y este último proceso ocurre en las mitocondrias. Su estructura se compone de una membrana externa lisa y una membrana interna altamente invaginada. Las invaginaciones de la membrana interna forman las crestas mitocondriales, ricas en proteínas que son parte de la cadena de transporte de electrones, y en ATP sintasa, ambas responsables del almacenamiento de energía en forma de ATP. En la matriz mitocondrial se encuentra el ADN mitocondrial, que es circular, vestigio de su origen bacteriano. El ADN de la mitocondria codifica únicamente una parte de las proteínas mitocondriales, siendo fundamental la síntesis del resto de las proteínas mitocondriales a partir del ADN nuclear (Ernster & Schatz 1981).

Las mitocondrias cumplen funciones importantes relacionadas con la neuroplasticidad y el mantenimiento de la homeostasis neuronal. Se movilizan a lo largo de las dendritas, los axones y el soma. Se mueven en dirección anterógrada mediante kinesinas, mientras que el movimiento retrógrado es mediado por dineínas (Cheng et al. 2010). El comportamiento y las propiedades funcionales de las mitocondrias en los axones y las dendritas son diferentes (Figura 18) (Rossoll & Bassell 2019). Por ejemplo, se ha observado que las mitocondrias en los axones son más dinámicas que aquellas que se localizan en las dendritas, lo que depende de las diferentes interacciones con el citoesqueleto en dendritas y axones (Cheng et al. 2010; Rangaraju et al. 2019). Las mitocondrias sufren procesos de fisión y fusión que están relacionados con la bifurcación de los axones.

Figura 17. Estimación de la energía usada en la corteza cerebral. A. Distribución de la energía durante la actividad sináptica incluyendo el mantenimiento celular, que comprende el 25% del total de energía gastada. B. Cuando se excluye el gasto en mantenimiento celular, se calcula que el mantenimiento de los potenciales de reposo consume el 20% de la energía, los potenciales de acción el 21% y la transmisión sináptica el 59%. Dentro de los procesos de transmisión sináptica se incluyen los receptores postsinápticos (50%), el reciclaje de neurotransmisores (4%) y la entrada de calcio y el ciclo vesicular en el compartimento presináptico (5%). Modificado de (Howarth et al. 2012).



Dichos procesos son los responsables de que en los axones se encuentren mitocondrias con menor tamaño respecto a las mitocondrias dendríticas (Cheng et al. 2010; Misgeld & Schwarz 2017; Turner et al. 2022). En respuesta a la estimulación neuronal, las mitocondrias se redistribuyen y aumentan su actividad. Los terminales presinápticos acumulan mitocondrias, indicando una necesidad local de ATP y calcio en este compartimento. La localización de mitocondrias residentes en los botones presinápticos está relacionada con una mayor persistencia de dichos botones en el tiempo (Lees et al. 2020).

Las mitocondrias en las dendritas se localizan principalmente en los tallos dendríticos, donde participan en el aporte de energía para la traducción de proteínas locales en los compartimentos postsinápticos (Figura 18A). De esta forma, la inhibición de su actividad suprime la plasticidad sináptica y la traducción en el elemento postsináptico al que se encuentran ancladas, pero no afecta a la traducción proteica en espinas remotas (Rangaraju et al. 2019). Por otro lado, las espinas dendríticas de la neocorteza, en general, carecen de mitocondrias (Harris & Weinberg 2012; Kasthuri et al. 2015; Santuy et al. 2018b).

Debido a que las neuronas tienen una larga vida, la discrepancia entre el recambio celular y el recambio proteico es particularmente extrema. Las mitocondrias necesitan un constante recambio proteico, sin importar lo lejos que estén del soma, que es el lugar donde se encuentra el núcleo y los principales orgánulos que intervienen en la síntesis proteica (Misgeld & Schwarz 2017). En las dendritas, la síntesis proteica se asocia localmente a las mitocondrias (Rangaraju et al. 2019), mientras que en los axones los cuerpos multivesiculares (CMVs) se asocian a las mitocondrias para actuar como plataforma de traducción de los ácidos ribonucleicos mensajeros (ARNm) esenciales para ellas (Figura 18B) (Cioni et al. 2019).

Por último, la disfunción mitocondrial está implicada en algunas patologías del sistema nervioso como la enfermedad de Parkinson, la enfermedad de Alzheimer, la esclerosis lateral amiotrófica o la Corea de Huntington (Cheng et al. 2010). Por ejemplo, se ha descrito que en muestras de personas con la enfermedad Alzheimer se produce una reducción de hasta 4 veces en la proporción de terminales presinápticos con múltiples mitocondrias (Pickett et al. 2018).

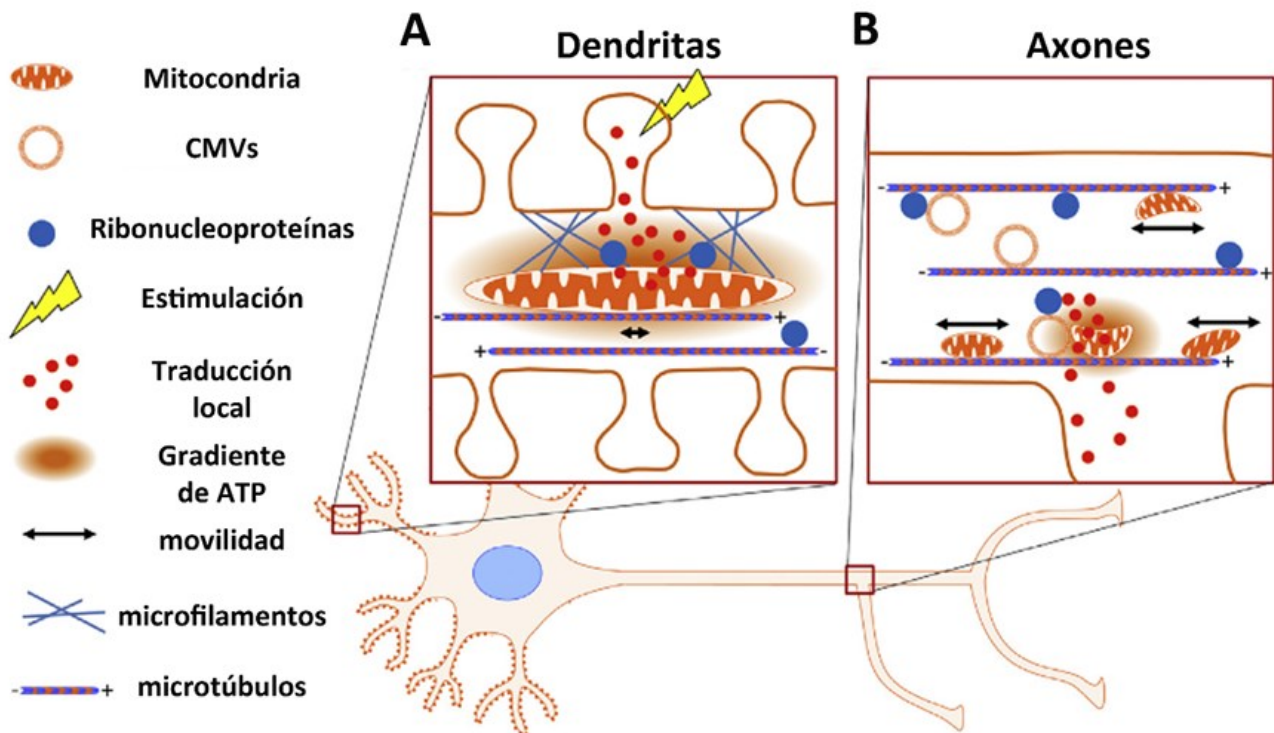


Figura 18. La traducción local de ARNm es esencial para la supervivencia de la mitocondrias y a su vez las mitocondrias son las proveedoras de la energía para este proceso. A. Traducción proteica local próxima a espinas dendríticas e inducida por la actividad sináptica en las dendritas. B. En los axones, los cuerpos multivesiculares (CMVs) se asocian a las mitocondrias y sirven como plataforma de traducción proteica local. Modificado de (Rossoll & Bassell 2019).

9. Transporte, reciclaje y degradación de sustancias en el sistema nervioso: los cuerpos multivesiculares (CMVs)

Los CMVs son orgánulos limitados por una membrana simple que contienen una o más vesículas intraluminales (Klumperman & Raposo 2014). Se describieron por primera vez por Palay y Palade en 1955 (Palay & Palade 1955) en neuronas observadas al microscopio electrónico. Forman parte de la vía endocítica y están implicados en el reciclaje, transporte, clasificación, almacenamiento y exocitosis de numerosas sustancias (Von Bartheld & Altick 2011). Participan también en el proceso de autofagia y por tanto en el reciclaje y renovación de orgánulos, proteínas de larga vida y ARN (Fader & Colombo 2009).

Los CMVs tienen un diámetro de entre 250-1000 nm, pueden contener varias decenas de vesículas en su interior y están relacionados con otros orgánulos celulares como el aparato de Golgi, el retículo endoplasmático (Von Bartheld & Altick 2011) y las mitocondrias (Sugiura et al. 2014), como veremos más adelante.

Los CMVs se originan por la endocitosis de proteínas de la membrana plasmática, la cual se invagina y forma una vesícula. Varias vesículas suelen fusionarse entre sí formando vesículas más grandes que darán lugar a endosomas tempranos.

En este estadio, el endosoma temprano también se fusiona con vesículas cargadas de proteínas procedentes del aparato de Golgi. En el interior del endosoma temprano se empiezan a formar vesículas intraluminales (ILVs, por sus siglas en inglés, *Intra-Luminal Vesicles*) que van a acumular las sustancias que posteriormente serán degradadas (Figura 19). Durante la maduración de los CMVs se observan una serie de cambios morfológicos: aumentan de tamaño, aumenta el número de vesículas intraluminales y se vuelven más electrodensos (Woodman & Futter 2008). Al orgánulo que llega a este estadio se le denomina CMV o endosoma tardío, términos que son comúnmente intercambiables. Su vida celular suele acabar con la fusión de los CMVs con los lisosomas y la degradación de su contenido (Huotari & Helenius 2011). También hay CMVs que se fusionan con orgánulos procedentes de la vía autofágica, dando lugar a orgánulos híbridos llamados anfisomas cuyo destino es la degradación lisosomal (Figura 19) (Fader & Colombo 2009). Además de la función degradativa, los CMVs participan en el reciclaje de moléculas que van de vuelta a la membrana plasmática o a la red trans-Golgi. Los CMVs con capacidad de reciclar tienen una morfología característica y presentan extensiones tubulares (Huotari & Helenius 2011; Jovic et al. 2010; Lu & Hong 2014; Sachse et al. 2002; Von Bartheld & Altick 2011).

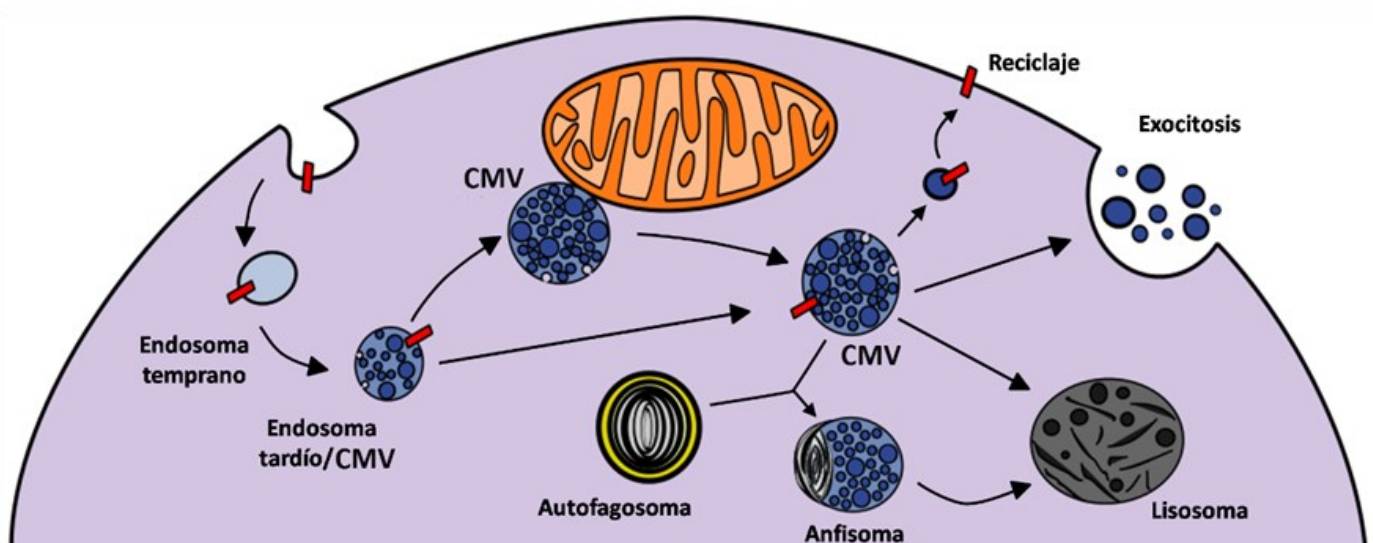


Figura 19. Representación esquemática de la participación de los cuerpos multivesiculares (CMVs) en la vía endocítica y en los procesos de autofagia. Se ha representado el proceso de endocitosis por el que se forman los CMVs, su maduración, su relación con otros orgánulos como las mitocondrias, su fusión con autofagosomas para formar anfisomas, su participación en el reciclaje de proteínas de membrana, la liberación de exosomas y el transporte de compuestos hacia el lisosoma para su degradación. Modificado de (Turegano-Lopez et al. 2019) .

Los CMVs también pueden fusionarse con la membrana plasmática y, mediante un proceso de exocitosis, liberar su contenido en forma de exosomas al espacio extracelular (Chivet et al. 2012). Cada tipo de endosoma contiene moléculas características que ayudan a su identificación. Por ejemplo, la proteína Rab 5 es típica de endosomas tempranos, mientras que la Rab 7 se localiza en endosomas tardíos y la proteína LAMP1 (por sus siglas en inglés, *lysosomal-associated membrane protein*) es un marcador lisosomal (Figura 20). Recientemente se ha descubierto que varias de esas moléculas pueden coexistir en el mismo endosoma, por lo que parece que las distintas fases de la vía endosomal no son totalmente excluyentes entre sí (Shearer & Petersen 2019).

9.1 CMVs en el sistema nervioso

Los CMVs de las neuronas se han descrito mayoritariamente en somas y dendritas (Altick et al. 2009; Cooney et al. 2002; Von Bartheld & Altick 2011) (Figura 19), aunque ocasionalmente se han visualizado en axones o terminales axónicos *in vivo*. Normalmente se encuentran asociados e interconectados con extensiones tubulares mediando en el almacenaje, la clasificación y el reciclaje de diversas moléculas. Cuando se encuentran de forma aislada, se relacionan con su función de transporte entre las dendritas y el soma (Cooney et al. 2002).

Se ha descrito que la fracción de volumen de los CMVs en somas y dendritas varía entre el 0,2% y el 1.8% del volumen total. Los datos son similares tanto en estudios *in vitro* como *in vivo*. Este volumen no es fijo, ya que puede alterarse por influencias externas como agentes farmacológicos, estimulación eléctrica y actividad neuronal (Von Bartheld & Altick 2011). Se ha observado un incremento de CMVs en ratones a los que se les ha inyectado con proteína de tipo fibrinógeno 1

(FGL) (Popov et al. 2008) o han realizado un test de aprendizaje *Water Maze* (Stewart et al. 2005). Por otro lado, tanto la inyección de FGL como la estimulación eléctrica epiletogénica provocan la migración de CMVs hacia las espinas dendríticas (Kraev et al. 2009; Popov et al. 2008).

9.2 Los CMVs y las sinapsis

Los CMVs están implicados, entre otras funciones, en el almacenamiento y transporte de proteínas. Por este motivo se ha estudiado si pueden ser parte de los reservorios de receptores que se encuentran cercanos a los elementos postsinápticos y que son imprescindibles en la potenciación sináptica (Chivet et al. 2012; Kneussel & Hausrat 2016; Stewart et al. 2014). En este proceso es importante el estudio del transporte de receptores AMPA, que tiene un papel fundamental en la plasticidad sináptica (Hiester et al. 2018). Durante la LTP, los endosomas de reciclaje que transportan receptores AMPA son movilizados hacia las espinas dendríticas en respuesta a la activación de los receptores NMDA y la consiguiente entrada de calcio (Kulik et al. 2019). De esta manera, el bloqueo del tráfico de endosomas produce una disminución de receptores AMPA postsinápticos y disminuye el tamaño y la formación de espinas nuevas (Park et al. 2006; Wang et al. 2008). En cuanto al peso que tiene la aportación de los CMVs en la potenciación a largo plazo, experimentos funcionales muestran que los endosomas proporcionan entre un 10% y un 30% del total de receptores requeridos. Por otro lado, otros estudios sugieren que la eliminación de los CMVs de las espinas produce la disminución de los niveles de AMPA en un rango de entre el 10 y el 20% (Kneussel & Hausrat 2016).

Se han encontrado alteraciones de la vía endocítica en enfermedades neurodegenerativas como

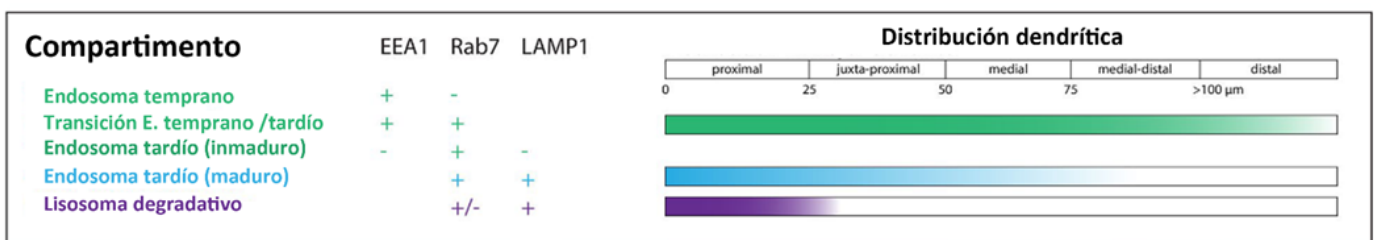


Figura 20. Distribución de los diferentes tipos de endosomas y sus marcadores moleculares en diferentes regiones de las dendritas. EEA1 es la proteína Rab 5. Modificado de (Kulkarni & Maday 2018).

en la enfermedad de Alzheimer (Friedrich et al. 2010; Funk et al. 2011; Goetzl et al. 2015; Janas et al. 2016; Takahashi et al. 2002; Trousdale & Kim 2015; Vingtdoux et al. 2012; Yamazaki et al. 2010; Yuyama et al. 2015), en la enfermedad de Parkinson (Kurashige et al. 2013; Schreij et al. 2016) y en la enfermedad de Huntington (Von Bartheld & Altick 2011). En todas ellas es característica la acumulación de proteínas aberrantes. Los CMVs participan en la clasificación de proteínas que tienen que ser degradadas, lo que es vital para el mantenimiento de la homeostasis neuronal (Filimonenko et al. 2007). Por ello, se postula que la acumulación de este tipo de proteínas en CMVs pueda tener una función neuroprotectora. Sin embargo, los CMVs también podrían ser el medio de transporte por el cual dichas proteínas llegan a otras células, liberadas por los exosomas, extendiendo la enfermedad a nuevas zonas cerebrales (Von Bartheld & Altick 2011).

9.3 Los CMVs y las mitocondrias

Una de las funciones más importante de los CMVs es la selección y recogida de compuestos que han de ser degradados en el lisosoma. Este proceso es básico para orgánulos celulares como las mitocondrias, que están implicadas en procesos oxidativos y que necesitan mantener su medio interno en condiciones óptimas para llevar a cabo todas sus funciones. Se han caracterizado las vesículas derivadas de mitocondrias (MDVs, por sus siglas en inglés, *mitochondrial-derived vesicles*), cuyo destino es su fusión con CMVs para la degradación en los lisosomas de las moléculas que portan. La generación de MDVs es la primera respuesta de las mitocondrias para evitar el fallo del orgánulo (Sugiura et al. 2014). La formación de MDVs destinadas a lisosomas requiere la proteína quinasa PINK1 (por sus siglas en inglés, *PTEN-induced kinase 1*) y la E3 ubiquitin-ligasa citosólica Parkina, que se encuentran mutadas en la enfermedad de Parkinson familiar, por lo que se sospecha que este proceso de degradación mitocondrial pueda ser importante en el contexto de dicha enfermedad (Trinh & Farrer 2013).

Además del uso de la vía degradativa por parte de las mitocondrias, se ha cuantificado que el 10% del contenido exosomal tiene origen mitocondrial, aunque se desconocen los efectos que

la liberación de este contenido podría tener sobre las células vecinas (Sugiura et al. 2014). Otra de las funciones recientemente descritas que realizarían los CMVs es el transporte de ARNm asociado a ribosomas a lo largo de los axones, actuando como espacios de síntesis local de proteínas, como se ha mencionado anteriormente. En particular, se ha observado traducción de ARNm esenciales para el funcionamiento mitocondrial en CMVs y la consecuente proximidad entre estos y las mitocondrias (Cioni et al. 2019) (Figura 18B y Figura 21). La asociación entre CMVs y mitocondrias, además de en neuronas (Figura 21) (Turegano-Lopez et al. 2019), también se ha observado en otros tipos celulares, como en las células HeLa (Fermie et al. 2018) y en células epiteliales (Das et al. 2016).

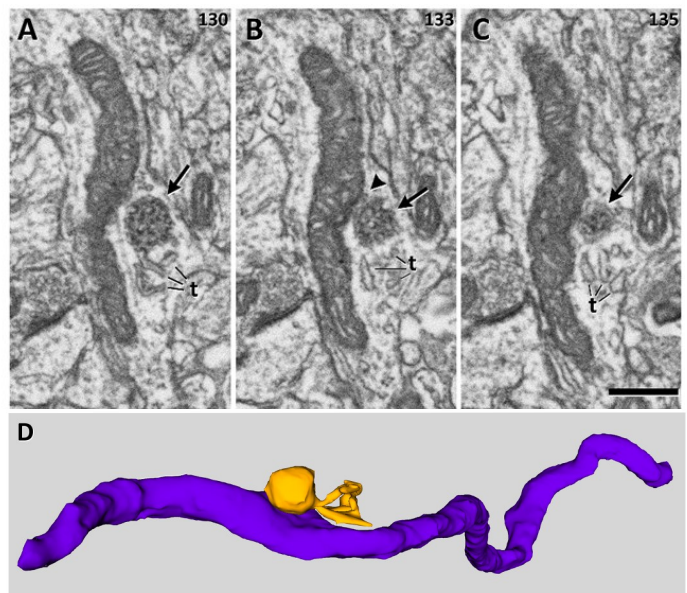


Figura 21. Los CMVs y las mitocondrias. A-C. Imágenes de microscopía electrónica seriada que muestran la asociación (punta de flecha) entre una mitocondria y un CMV (flechas) con extensiones tubulares (t) en la corteza cerebral de la rata. Los números en la parte superior derecha indican la posición de la imagen en la serie. D. Reconstrucción tridimensional de la mitocondria y el CMV que aparece en A-C. Barra de escala: 520 nm. Modificado de (Turegano-Lopez et al. 2019).

Objetivos

La capacidad de la corteza cerebral para procesar información depende en gran medida del sistema de conexiones entre sus elementos, o conectoma. Este sistema de conexiones se conoce solo parcialmente, a menudo de forma esquemática y cualitativa, especialmente a nivel de las conexiones sinápticas individuales, o sinaptoma. Además, los circuitos corticales no son estructuras estáticas, sino que necesitan, por un lado, de un aporte energético para propiciar el flujo de información y, por otro lado, de un sistema capaz de mantener y modificar las estructuras celulares implicadas. Nuestro primer objetivo será, por tanto, el estudio de las sinapsis de la corteza somatosensorial primaria del ratón adulto; estudiaremos en segundo lugar las mitocondrias como fuente de energía, y en tercer lugar los cuerpos multivesiculares como parte fundamental del sistema endosomal, responsable de gran parte del tráfico de sustancias tanto en el interior como en el exterior de las células.

Más concretamente, nuestros objetivos seguirán el siguiente esquema:

1. Estudio cuantitativo de las sinapsis:
 - a. Cuantificar la densidad de sinapsis excitadoras e inhibitoras en las diferentes capas corticales.
 - b. Describir y cuantificar las proporciones en las que ambas categorías de sinapsis se establecen sobre tallos dendríticos o espinas dendríticas.
 - c. Describir la forma y el tamaño de las sinapsis y sus posibles correlaciones con la naturaleza excitadora o inhibitora de las sinapsis, y con las diferentes dianas postsinápticas.
 - d. Estudiar la relación de las sinapsis con el aparato de espina.
2. Estudio cuantitativo de la distribución de mitocondrias:
 - a. Cuantificar la cantidad de mitocondrias presentes en las distintas capas corticales.
 - b. Establecer las proporciones en las que las mitocondrias se localizan en axones, dendritas o elementos celulares no sinápticos.
 - c. Analizar cuantitativamente la posible correlación entre la densidad de sinapsis y la cantidad de mitocondrias.
3. Estudio cuantitativo de la distribución de cuerpos multivesiculares:
 - a. Cuantificar la cantidad de cuerpos multivesiculares en las distintas capas corticales.
 - b. Establecer las proporciones en las que se alojan en los diferentes compartimentos celulares.
 - c. Describir la forma y el tamaño de los cuerpos multivesiculares en referencia a su localización y a su relación con las mitocondrias.
 - d. Determinar las posibles relaciones cuantitativas entre sinapsis, cuerpos multivesiculares y mitocondrias.

Materiales y Métodos

10. Preparación del tejido para microscopía electrónica

El estudio fue realizado en tres ratones C-57 machos adultos (8 semanas de edad). Todos los animales fueron manipulados de acuerdo a las pautas establecidas en la Directiva de la Comunidad Europea 2010/63/EU para la investigación animal, y todos los procedimientos fueron aprobados por el comité de ética del Consejo Superior de Investigaciones Científicas. Los animales recibieron una inyección intraperitoneal de pentobarbital sódico (Nembutal, 40 mg/kg), seguida de la perfusión intracardiaca de paraformaldehído (PFA) al 4% (Figura 22). Los cerebros se extrajeron del cráneo y se postfijaron a 4°C durante una noche en PFA al 2%, glutaraldehído al 2.5% y CaCl_2 0.003M en tampón cacodilato 0.1M. Posteriormente se lavaron en tampón cacodilato y se cortaron con un vibratomo (Vibratomo Leica) secciones de 150 μm de grosor. Con la referencia de un atlas (Paxinos & Franklin 2004), se seleccionaron las secciones que contenían la representa-

ción somatotópica de la pata trasera en la corteza somatosensorial primaria. Las secciones fueron osmificadas a temperatura ambiente durante una hora con OsO_4 al 1%, ferrocianuro potásico al 0.1% y CaCl_2 0.003M en tampón cacodilato 0.1M. Se realizó una segunda osmificación con OsO_4 al 1% y CaCl_2 0.003M en tampón cacodilato 0.1M, durante una hora a temperatura ambiente. Tras lavar en tampón cacodilato, las secciones se tiñeron a 37°C durante 30 min con acetato de uranilo al 1% en etanol al 50%, posteriormente se deshidrataron en concentraciones crecientes de etanol, se aclararon en acetona y se incluyeron en Araldita (DeFelipe & Fairén 1993). Una vez incluidas, las secciones se pegaron con cianoacrilato sobre un bloque de Araldita vacío y se tallaron para delimitar el área de interés (Figura 23A). Para la correcta localización de la región a analizar se obtuvieron cortes semifinos (de 1-2 μm de grosor) de la superficie del bloque con un ultramicrotomo (EM UC6, Leica Microsystems, Wetzlar, Alemania). Dichas secciones se tiñeron con azul de toluidina y se estudiaron con un microscopio óptico.

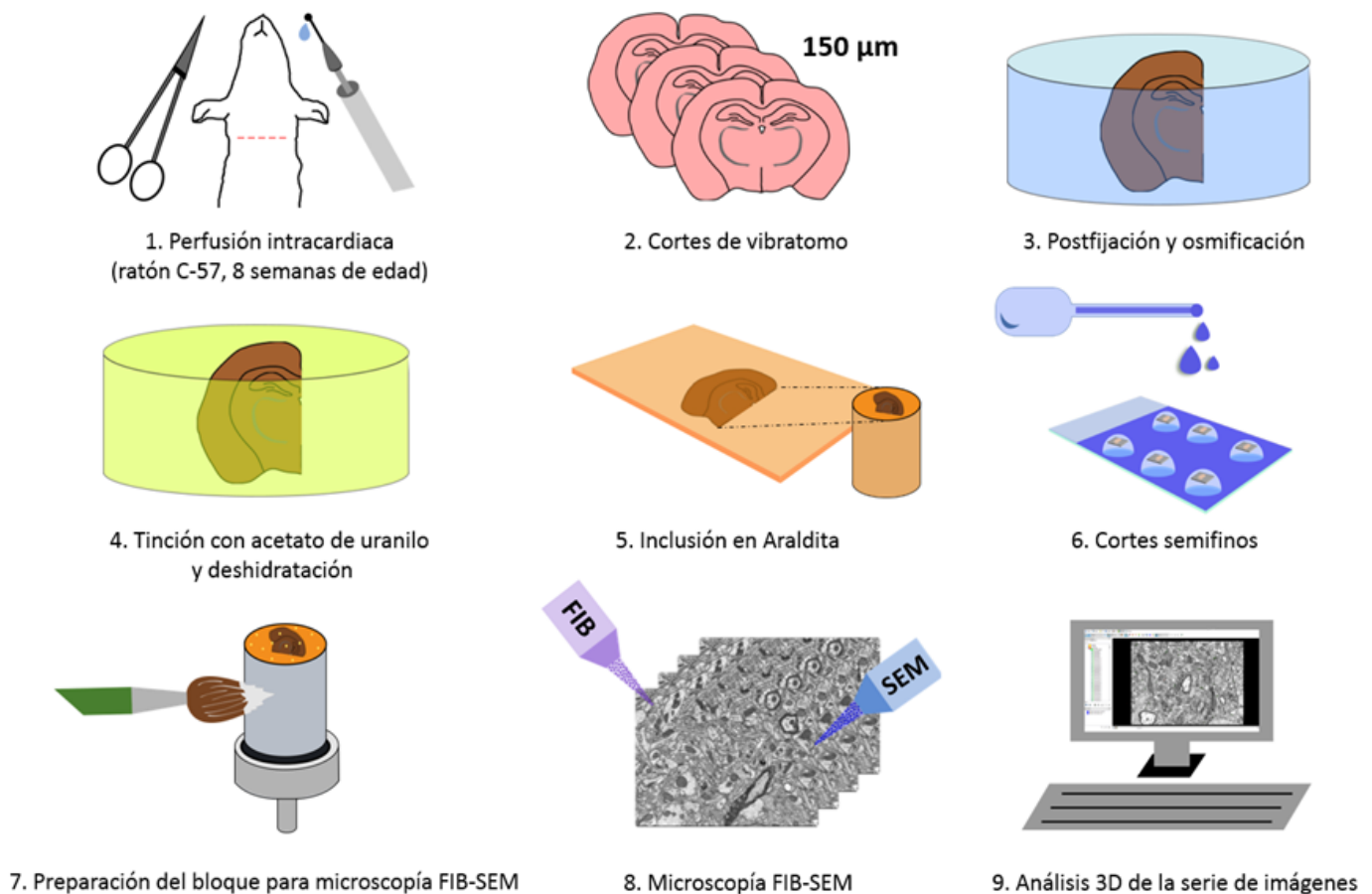


Figura 22. Esquema paso a paso del procedimiento para la obtención de las imágenes de microscopía electrónica.

El último de los cortes semifinos es adyacente a la superficie del bloque que más tarde se observará con el microscopio electrónico, por ello se utilizó para localizar con exactitud las regiones de interés. Los bloques de Araldita con el tejido elegido se pegaron en un portamuestras de aluminio utilizando un adhesivo de carbón conductor. El bloque de Araldita se recubrió con pintura conductora de plata, excepto en la cara superior del bloque donde se encuentra el tejido; de esta forma se facilitó la disipación de la carga bajo el haz de electrones. Una vez seca la pintura, los bloques se recubrieron con una capa conductora más, en nuestro caso una fina capa de oro/paladio aplicada durante 30 segundos con un pulverizador catódico (SC7620 Mini Sputter Coater, Quorum Technologies, Reino Unido) (Figura 22).

El procesamiento del tejido para microscopía electrónica produce modificaciones físicas en las secciones que conllevan la retracción en su volumen. Este encogimiento fue estimado midiendo el área de las secciones obtenidas con el vibratomo antes y después del procesamiento (Merchán-Pérez et al. 2009) con el programa ImageJ (Schindelin et al. 2012). Se obtuvo el factor de encogimiento del área ($p^2 = 0.9142$) dividiendo el valor del área de la muestra después del procesamiento entre el valor del área de la muestra antes del procesamiento. Se calcularon a continuación los factores de encogimiento para el volumen y la longitud, que fueron $p^3 = 0.8741$ y

$p = 0.9561$, respectivamente. Todos los datos procedentes del estudio de microscopía electrónica fueron corregidos con el factor de encogimiento correspondiente.

11. Adquisición de imágenes seriadas mediante microscopía electrónica de doble haz FIB-SEM

Las imágenes de las muestras analizadas se obtuvieron con un microscopio electrónico de doble haz, en inglés "*Focused Ion Beam-Scanning Electron Microscope*" (FIB-SEM; Crossbeam® 540 EsB, Carl Zeiss NTS GmbH, Oberkochen, Alemania). Este microscopio consta de una columna SEM de alta resolución (Gemini® column, Carl Zeiss NTS GmbH, Oberkochen, Alemania) y de un haz de iones de galio (FIB), que permite eliminar material de la superficie de la muestra en una escala de nanómetros. Usando una corriente del haz iónico de 7 nA, se realizó una primera trinchera para permitir la visualización del interior de la muestra (Figura 23). A continuación, se usó una corriente menor del haz iónico (750 pA) para pulir secuencialmente la superficie expuesta de la trinchera, eliminando 20 nm de material. Cuando el FIB ha avanzado 20 nm, la superficie expuesta es fotografiada con el SEM, usando un haz de 1.7 – 1.9 kV y el detector de electrones retrodispersados.

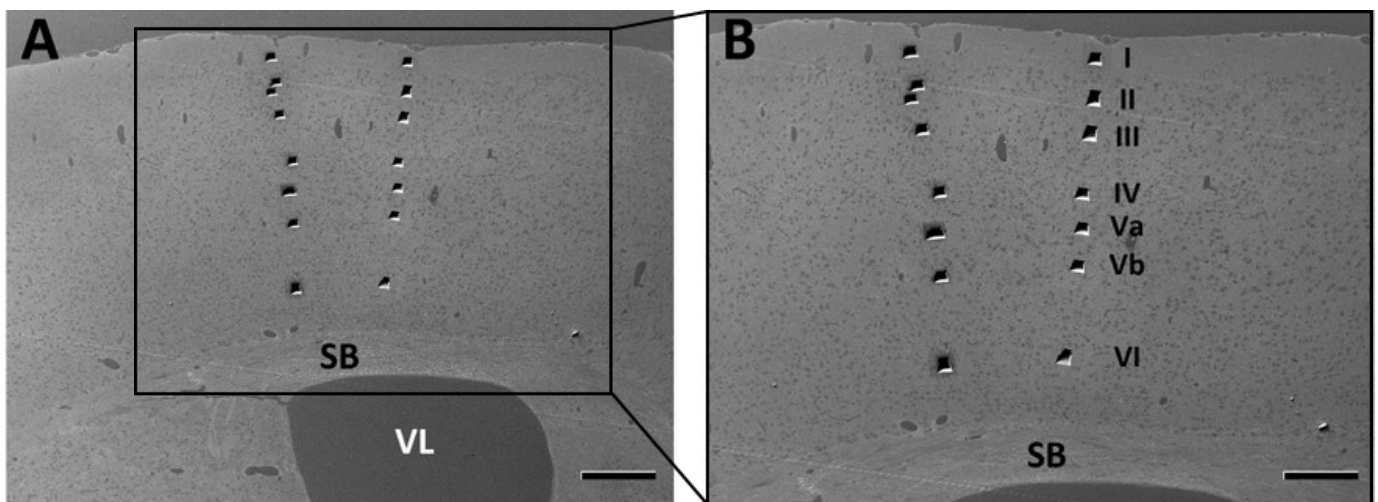


Figura 23. Panorámicas de la región de la corteza cerebral de donde se han obtenido las pilas de imágenes analizadas. Fotografías tomadas con el SEM, utilizando el detector de electrones secundarios. A. Se observa la región donde se realizaron dos trincheras por capa cortical del animal ID5. En la parte inferior se puede identificar la sustancia blanca (SB) y el ventrículo lateral (VL). Barra de escala: 257 μ m. B. Detalle de la panorámica mostrada en A. Se observan las trincheras distribuidas en las capas corticales ordenadas desde la superficie hasta la región más profunda de la corteza cerebral (Capas I, II, III, IV, Va, Vb y VI). Barra de escala: 200 μ m.

Los ciclos de pulido con el FIB y la adquisición de imágenes con el SEM se repiten automáticamente, lo que permite la obtención de largas series de fotografías de la región de interés (Blazquez-Llorca et al. 2013; Knott et al. 2008; Merchán-Pérez et al. 2009).

Las series de imágenes utilizadas en este estudio se obtuvieron del neuropilo para el posterior análisis en 3D. El neuropilo está formado por dendritas, axones y prolongaciones gliales, por lo que las imágenes utilizadas en nuestro estudio no contenían cuerpos celulares ni vasos sanguíneos. El tamaño total de cada imagen individual fue de 2048 x 1536 píxeles, con una resolución 5 nm / pixel. El grosor del material eliminado en cada ciclo de pulido con el FIB, equivalente al grosor de cada sección, fue de 20 nm. Por lo tanto, el tamaño del vóxel en las series de imágenes 3D, en los ejes X, Y y Z, fue de $5 \times 5 \times 20 = 500 \text{ nm}^3$. Para esta tesis se obtuvieron 35 series o pilas de imágenes del neuropilo, 5 de cada capa cortical analizada (I, II, III, IV, Va, Vb y VI) de 3 animales diferentes (ID5, ID24, ID25) (Figura 23B).

Las series de imágenes utilizadas tienen entre 202 y 350 imágenes, lo que equivale a volúmenes de tejido de entre $363.48 \mu\text{m}^3$ y $629.79 \mu\text{m}^3$ (ver Tabla 3 en el apartado de Resultados).

12. Alineamiento, visualización y segmentación de las sinapsis en las series de imágenes

Aunque las fotografías se obtuvieron de manera secuencial, fueron inevitables pequeñas desviaciones entre ellas debidas a la deriva normal del microscopio a lo largo del tiempo. Por ello, fue necesario alinear con mayor exactitud las imágenes antes de proceder a su análisis. El alineamiento de las microfotografías se realizó con el programa ImageJ (Schneider et al. 2012). Se aplicó un método de traslación sin rotación, para evitar la deformación de las imágenes y no alterar las mediciones realizadas posteriormente. También se aplicó a todas ellas un filtro *Gaussian Blur*, que suaviza los píxeles, lo que agiliza la fase de segmentación de estructuras (Figura 24C).

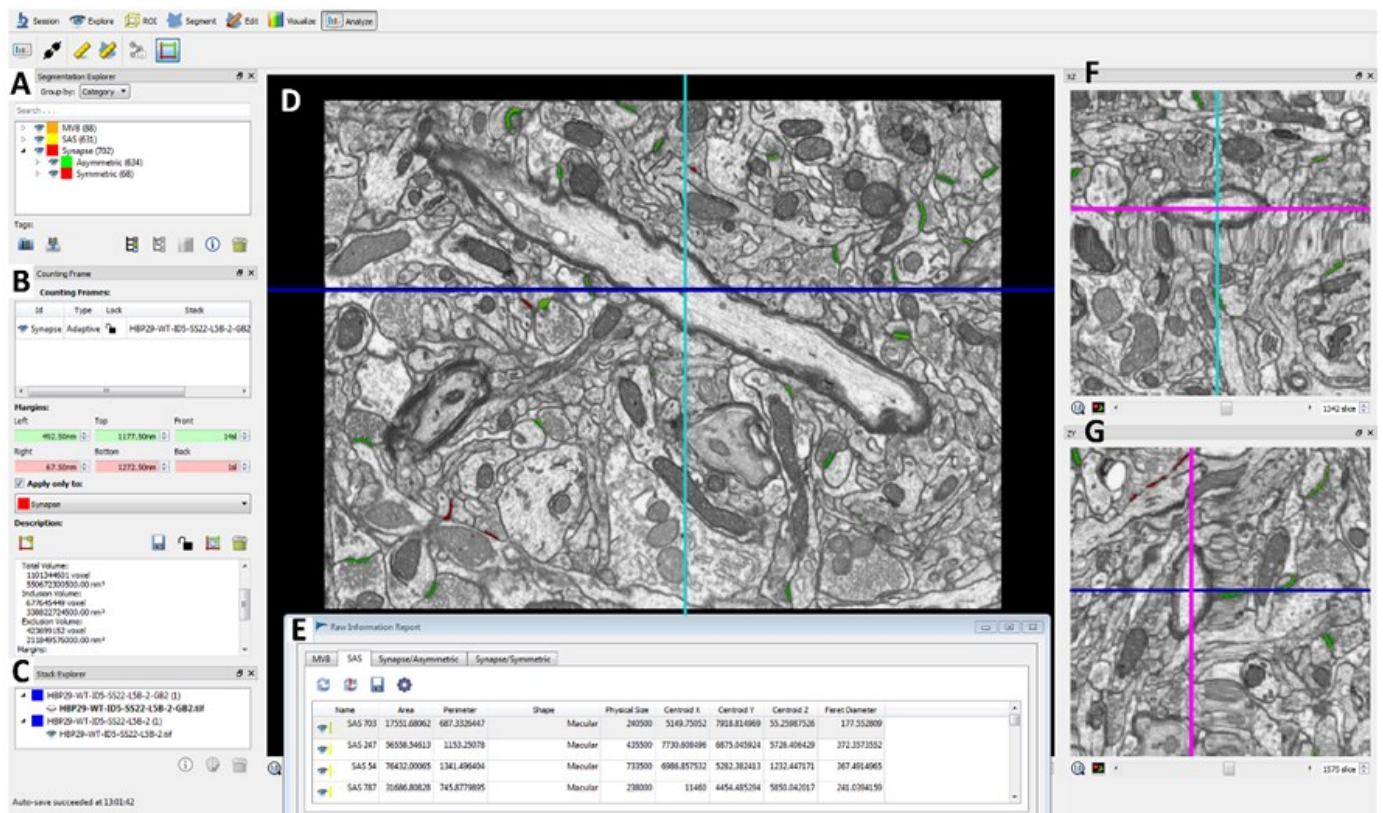


Figura 24. Captura de pantalla para ilustrar el programa Espina. A. Ventana de exploración en la que se muestran los objetos segmentados. B. Ventana donde se indican las dimensiones del marco de conteo estereológico. C. Ventana de exploración en la que se muestran las pilas de imágenes cargadas actualmente en el programa. D. Ventana principal, que muestra las imágenes seriadas en el plano de corte original (XY). E. Ventana con la información de los datos que se pueden obtener a partir de las segmentaciones. F. Vista del plano XZ de la pila de imágenes de microscopía electrónica. G. Vista del plano ZY de la pila de imágenes a analizar.

Para la visualización y el análisis de las imágenes se usó el programa Espina (Morales et al. 2011) (Figura 24). Espina permite navegar en tres dimensiones a través del conjunto de imágenes (Figura 24D, F, G) y segmenta cualquier objeto seleccionado por el usuario. El resultado de esta segmentación es un objeto reconstruido en 3D, al que el programa otorga un nombre y número individuales (Figura 24A), y calcula su tamaño y posición espacial (Figura 28).

Las sinapsis pueden identificarse en las imágenes de microscopía electrónica gracias a que las densidades pre y postsinápticas aparecen como estructuras electrodensas. Para segmentar las sinapsis usando el programa Espina, el usuario señala uno de los vóxeles perteneciente a esta estructura y el algoritmo de segmentación seleccionará los vóxeles contiguos con un nivel de gris similar, creando un volumen que incluye tanto la densidad presináptica como la postsináptica (Morales et al. 2013).

13. Contaje e identificación del tipo de sinapsis

El contaje de las sinapsis se realizó utilizando el programa Espina, mediante la aplicación de un marco de contaje estereológico en 3D (Howard & Reed 2004). El marco tiene tres caras de inclusión y otras tres de exclusión. En cada pila de imágenes el programa cuenta las sinapsis que hay en el interior del marco más las que tocan los bordes de inclusión, y elimina las que tocan los bordes de exclusión (Figura 25). La densidad de sinapsis en la muestra de tejido se calcula de manera directa, dividiendo el número de sinapsis por el volumen del marco de contaje.

Las sinapsis se clasificaron según su morfología en sinapsis asimétricas (SA) y sinapsis simétricas (SS). Cuando la densidad postsináptica era de mayor grosor que la presináptica, la sinapsis fue clasificada como SA, mientras que si ambas densidades eran menos prominentes y tenían un grosor similar, se clasificaron como SS (Colonnier 1968; Gray 1959; Peters et al. 1991) (Figura 26). La identificación de cada sinapsis como SA o SS se basó en el examen de todas las imágenes de la serie en las que aparece, no en una sola imagen.

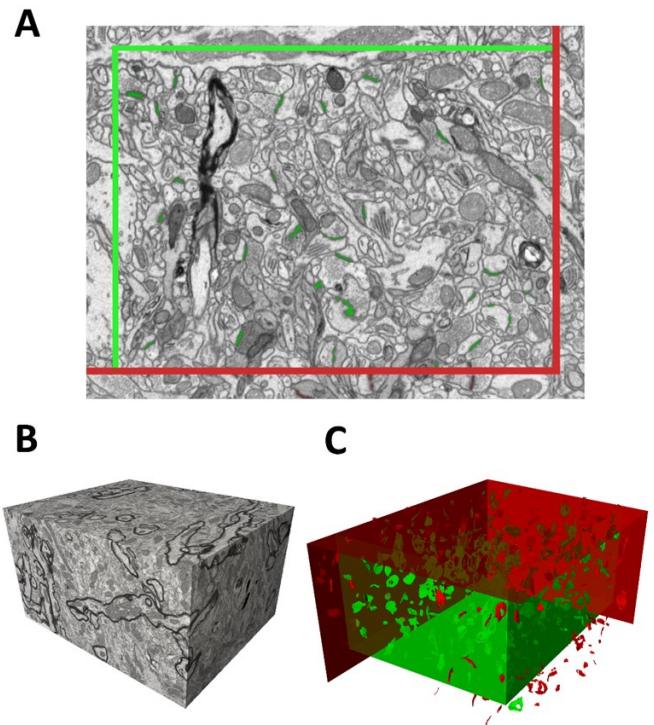


Figura 25. Visualización de la pila de imágenes de microscopía electrónica y la aplicación del marco de contaje. A. Vista 2D de una imagen de microscopía electrónica con el marco de contaje aplicado sobre la imagen. Los bordes rojos representan los bordes de exclusión y los bordes verdes representan los bordes de inclusión. B. Vista tridimensional del bloque de tejido conformado por la pila de imágenes de microscopía electrónica. C. Vista tridimensional del marco de contaje aplicado sobre las sinapsis segmentadas en 3D.

En caso necesario, cuando las sinapsis resultaron cortadas *en face* u oblicuamente, se examinaron también cortes ortogonales al plano de corte original, generados virtualmente por el programa Espina.

En la corteza cerebral, las SA se corresponden mayoritariamente con sinapsis glutamatérgicas excitadoras, mientras que las SS se corresponden con sinapsis GABAérgicas inhibitoras (Houser et al. 1984; Peters et al. 1991; The Petilla Interneuron Nomenclature Group (PING) 2008). Para cerciorarnos de que la correspondencia entre sinapsis SA/SS y sinapsis excitadoras/inhibidoras, respectivamente, era también correcta en nuestras muestras, realizamos un experimento en el que marcamos las fibras GABAérgicas del neuropilo (Figura 26). Para ello, fue necesario adaptar un método inmunocitoquímico de preinclusión que permitiera su visualización con el microscopio FIB-SEM, como se describe detalladamente en (Turégano-López et al. 2021).

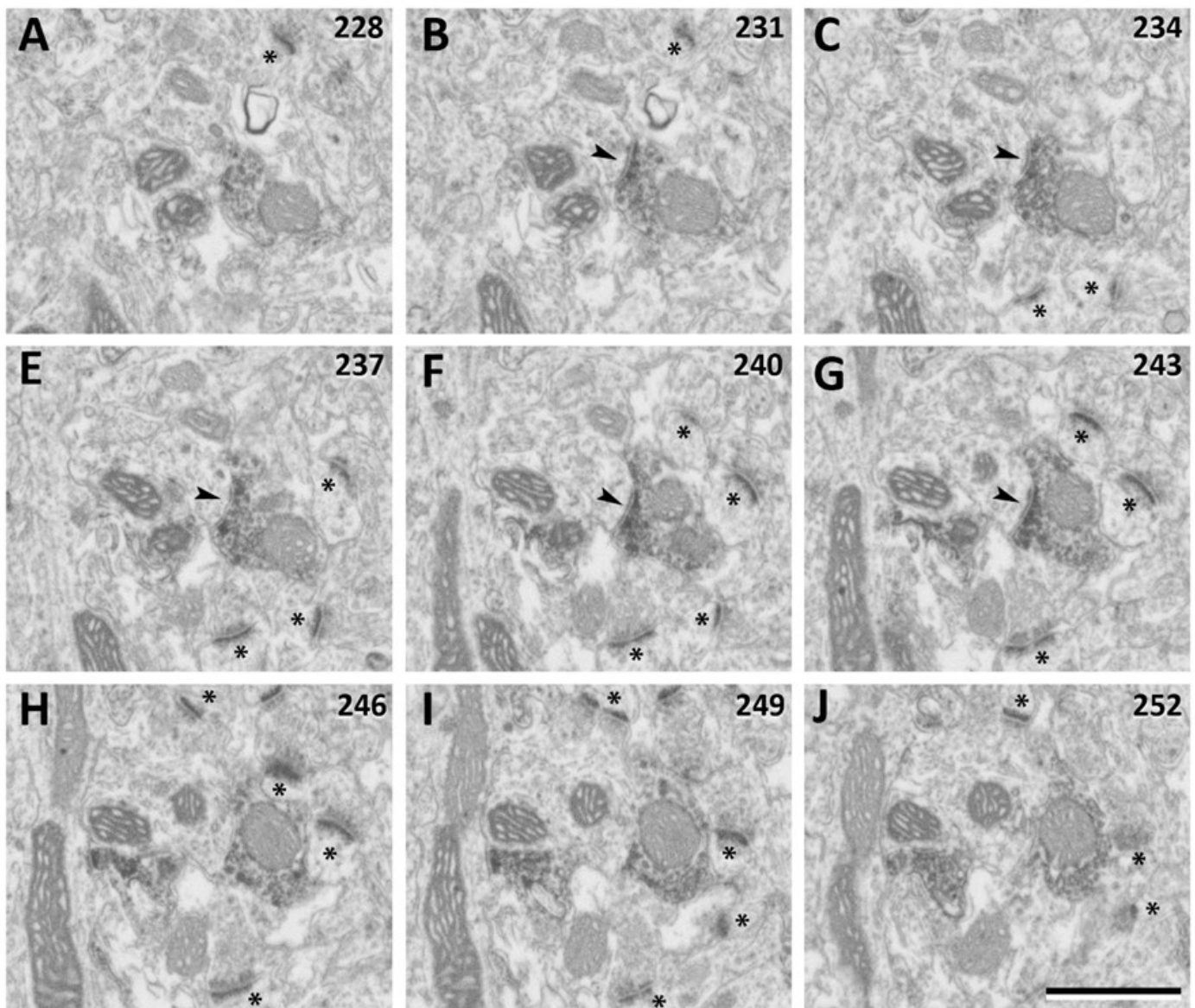


Figura 26. Ejemplo de una serie de imágenes obtenidas con microscopía FIB-SEM de una muestra marcada con el transportador vesicular de GABA (VGAT). En la serie de imágenes se aprecia una fibra marcada que establece una sinapsis simétrica (SS1). La densidad postsináptica estrecha correspondiente a dicha sinapsis y es visible en las imágenes B a F (puntas de flecha). En toda la serie de imágenes se aprecian también varias SA, con una densidad postsináptica mucho más gruesa, establecidas por botones axónicos no marcados (asteriscos). Los números en la esquina inferior derecha indican la posición de la imagen en la serie de imágenes. Barra de escala: 1 μ m. Modificado de (Turégano-López et al. 2021).

De manera resumida, una vez que se obtuvo el tejido fijado y cortado con el vibratomo, se crioprotegieron los cortes con sacarosa y se permeabilizaron por congelación en nitrógeno líquido. A continuación, se preincubaron las secciones con suero de cabra y después se incubaron con el anticuerpo primario, en este caso contra el transportador vesicular de GABA (Vesicular GABA Transporter, VGAT). Posteriormente, los cortes se incubaron con un anticuerpo biotinilado secundario. Después, se utilizó el complejo ABC, que permitió una amplificación de la señal del anticuerpo secundario biotinilado. A continuación, se reveló con una solución de DAB y peróxido de hidrógeno. El procedimiento continuó con

las postfijación, osmificación e inclusión, tal como se han descrito anteriormente (Figura 22).

Los resultados del experimento indicaron que las sinapsis que establecían los axones marcados con VGAT eran siempre de tipo simétrico (Figura 26), mientras que las sinapsis establecidas por los axones no marcados eran siempre de tipo asimétrico (Turégano-López et al. 2021). Además, los porcentajes de SA y SS observados en las muestras marcadas con VGAT fueron equivalentes a los porcentajes observados en las muestras utilizadas en el presente trabajo (Tabla 1).

Muestra	Capa	% SA	% SS
ID 57	II	93.32	6.68
ID 58	II	91.08	8.92
ID 58	II	92.88	7.12
ID 59	II	87.16	12.84
Media	II	91.11	8.89

Tabla 1.
Porcentaje de SA y SS en las muestras marcadas con VGAT.

14. Identificación de las dianas postsinápticas

Para determinar si la estructura postsináptica en donde se establecía cada sinapsis era una espina o un tallo dendrítico se utilizó Espina para recorrer la pila de imágenes. La identificación inequívoca de una espina dendrítica requiere que esté completa y que pueda seguirse visualmente hasta el tallo dendrítico del que emerge. Las estructuras que parecían espinas pero estaban cortadas por los bordes de las imágenes o no pudieron seguirse hasta su unión con un tallo dendrítico se clasificaron como espinas truncadas o putativas. También se determinó si las sinapsis se establecieron en la cabeza o en el cuello de las espinas. Los tallos dendríticos también fueron seguidos, y para establecer su identidad nos basamos en su longitud, calibre, y en la posibilidad de que de ellos emergieran espinas dendríticas (Figura 27 y Figura 31).

En los casos en los que las sinapsis se establecían en un tallo dendrítico, se determinó si éste tenía o no espinas dendríticas. De esta forma, si encontramos espinas que se originan en el tallo dendrítico, clasificamos esa fibra como una dendrita "con espinas". Cuando se realiza el seguimiento a través de la pila de imágenes y el tallo dendrítico no muestra espinas, se clasifica como "sin espinas". Sin embargo, en este último caso no se puede concluir con absoluta certeza que pertenezca a una neurona sin espinas, puesto que podría ser un segmento dendrítico de una neurona con espinas que no presente espinas en el volumen analizado.

Para la ejecución de esta tarea se desarrolló una herramienta nueva dentro del programa Espina. La herramienta nos permite trazar líneas dentro

de las fibras que encontramos en nuestra pila de imágenes, de forma que obtenemos una representación simplificada o esqueleto de cada una de esas fibras (Figura 27). De esta forma, se trazaron los esqueletos que correspondían a cada dendrita, otorgando a los diferentes segmentos del esqueleto la categoría de tallo dendrítico o espina dendrítica. Además, la herramienta permite que las segmentaciones tridimensionales de las diferentes sinapsis se conecten a cada esqueleto trazado, pudiendo así categorizar dichas sinapsis según su localización en la cabeza o el cuello de las espinas dendríticas, o en el tallo dendrítico (Turegano-Lopez et al. 2022) .

15. Identificación de los aparatos de Espina

Los aparatos de espina son estructuras en forma de cisternas membranosas alternadas con bandas electrodensas, que a veces parecen estar conectadas entre sí. Se localizan en algunas espinas dendríticas (Gray 1959; Peters et al. 1991). Gracias a la observación de imágenes seriadas hemos podido identificar los aparatos de espina que se encuentran en algunas de las espinas dendríticas (Figura 31), y que a veces invaden el tallo dendrítico. Utilizando el programa Espina, las espinas dendríticas fueron etiquetadas de acuerdo a la presencia o ausencia de aparato de espina.

16. Extracción de la superficie de la aposición sináptica

Como hemos comentado anteriormente, gracias a la microscopía electrónica se pueden identificar las densidades pre y postsinápticas.

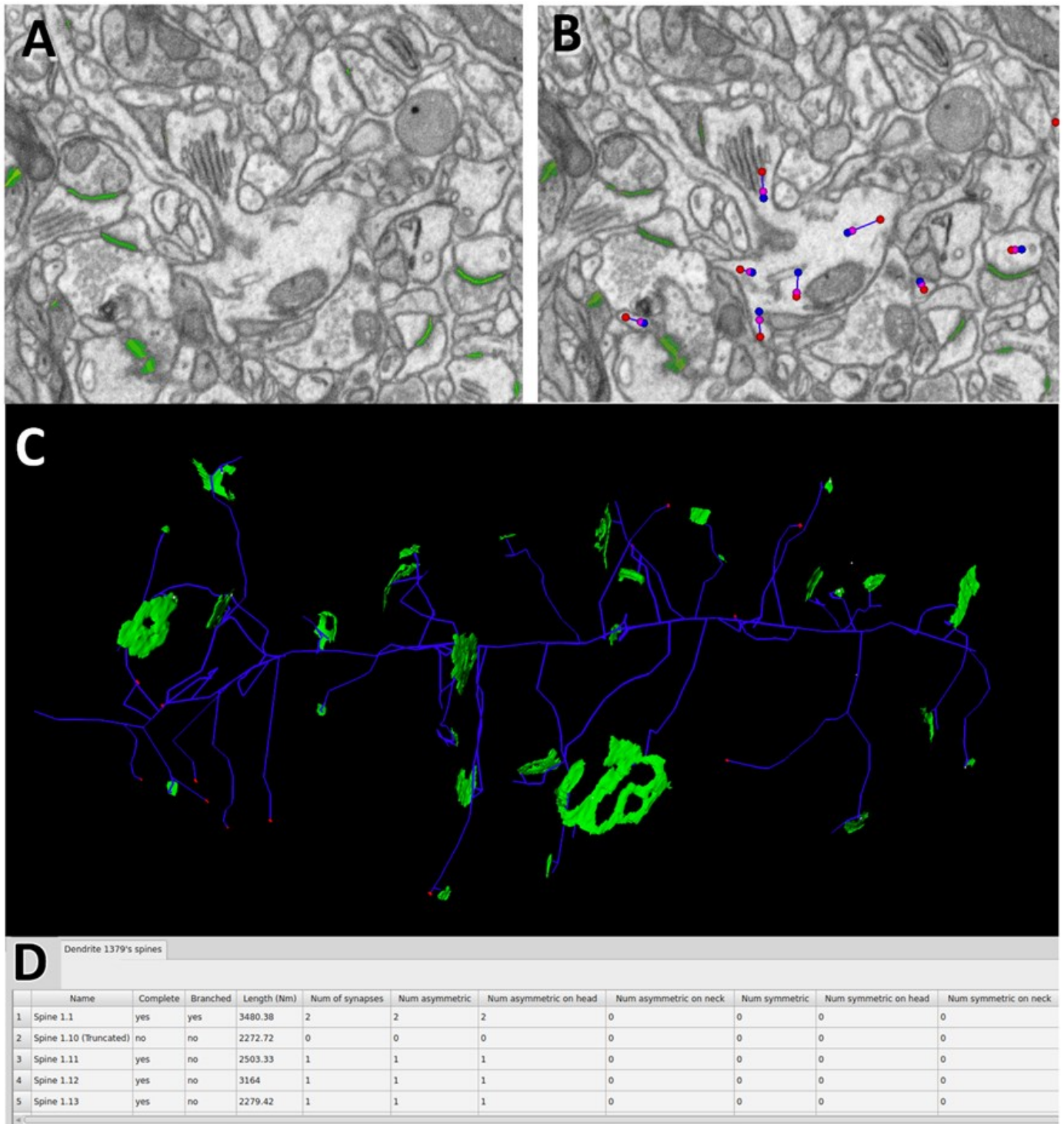


Figura 27. Herramienta de trazado de esqueletos del programa Espina. A. Imagen de microscopía electrónica perteneciente a una pila de imágenes de la corteza cerebral. Se muestran varias sinapsis segmentadas en verde. B. La imagen A donde se muestran los nodos y conexiones que conforman el esqueleto de una de las dendritas. Se observa el tallo dendrítico y algunas espinas pertenecientes a la misma dendrita. C. Esqueleto completo de la dendrita trazada (azul) y las sinapsis establecidas en dicha dendrita (verde). Cada segmento del esqueleto se asocia a información sobre su naturaleza (tallo o espina dendrítica), y se registra también la presencia y localización de las sinapsis. D. Ejemplo de los datos que pueden obtenerse de los segmentos del esqueleto que representan las espinas dendríticas.

Ambas densidades se sitúan una enfrente de la otra y tienen un área muy similar, por lo que se pueden simplificar en una única superficie, llamada superficie de aposición sináptica (SAS) (Figura 28). Ésta se puede extraer automáticamente de la segmentación tridimensional de la sinapsis (Morales et al. 2013) utilizando el programa Espi-

na. Debido a que el tamaño de la zona activa (equivalente a la densidad presináptica) se relaciona con la probabilidad de liberación del neurotransmisor y la densidad postsináptica con el número de receptores (Ganeshina et al. 2004a,b; Tarusawa et al. 2009), el área de la SAS es una medida funcionalmente relevante

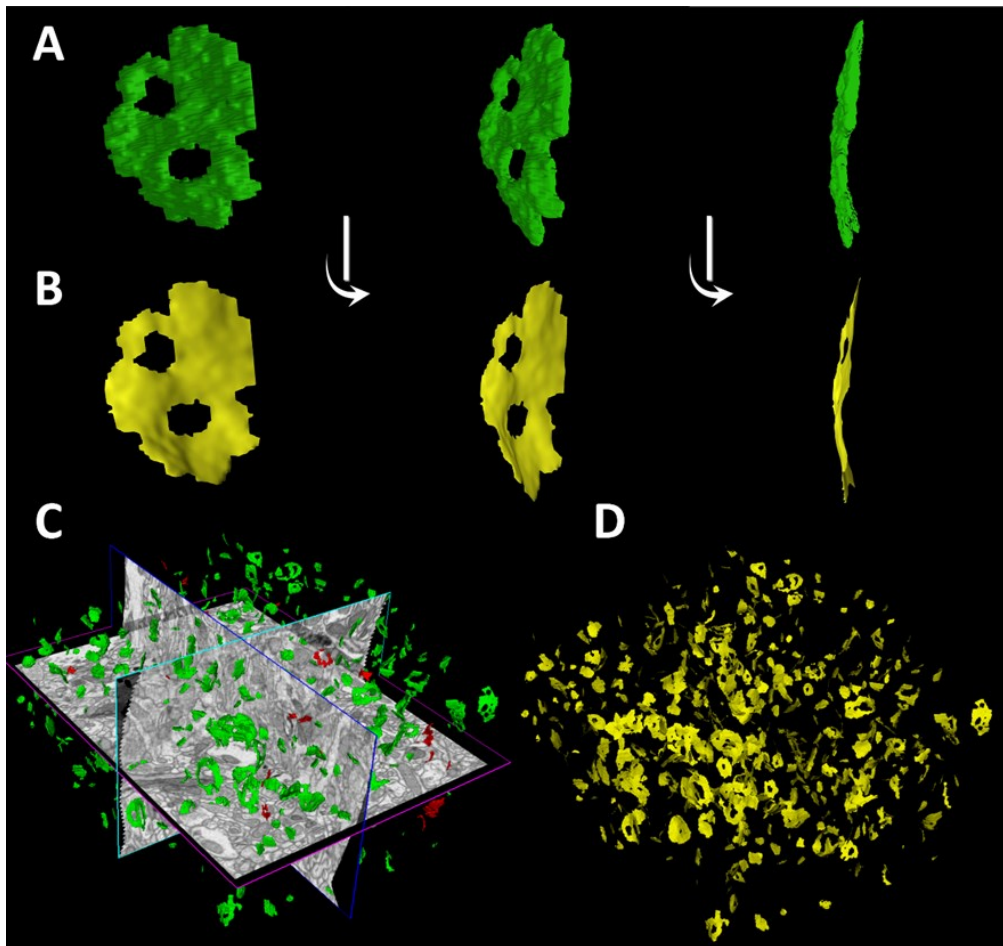


Figura 28. Extracción de las superficies de aposición sináptica (SAS). A. Reconstrucción tridimensional de una sinapsis excitadora y perforada en diferentes perspectivas. B. Superficie de aposición sináptica (SAS) de la sinapsis reconstruida en A. C. Conjunto de sinapsis asimétricas/excitadoras (verde) y simétricas/inhibidoras (rojo) en una de las pilas de imágenes analizadas. D. SAS de las sinapsis que se visualizan en C.

(Biederer et al. 2017). Además, las SAS conservan la morfología de la unión sináptica, por lo que pueden ser clasificadas según su forma (Cano-Astorga et al. 2021; Domínguez-Álvarez et al. 2021; Montero-Crespo et al. 2020; Santuy et al. 2018a). Las SAS fueron visualizadas tridimensionalmente y clasificadas como maculares cuando eran continuas y en forma de disco, perforadas cuando presentaban una o más perforaciones, en herradura cuando presentaban hendiduras y fragmentadas cuando había dos o más densidades postsinápticas diferenciadas en la misma sinapsis (Figura 46 y Figura 48).

17. Distribución espacial de las sinapsis y de los cuerpos multivesiculares

La estadística espacial ofrece herramientas que nos permiten establecer de qué manera se distribuyen un grupo de objetos en el espacio tridimensional. De esta forma, podremos determinar si los objetos se distribuyen de una manera aleatoria, de una manera regular, o si responden a un patrón agrupado o en cluster.

Al reconstruir tridimensionalmente las sinapsis de nuestras muestras con el programa Espina, hemos obtenido las coordenadas espaciales de sus centros de masa o centroides (Blazquez-Llorca et al. 2013; Merchán-Pérez et al. 2014). Con estos datos hemos analizado su distribución espacial para determinar si están distribuidas en el espacio siguiendo una distribución completamente aleatoria (patrón aleatorio, o distribución homogénea de Poisson) (Blazquez-Llorca et al. 2015). La distribución completamente aleatoria se toma como referencia, ya que los centroides también podrían encontrarse más agrupados de lo que sería esperable por azar (patrón agrupado o cluster), o dispuestos más regularmente de lo que cabría esperar en un patrón aleatorio (patrón regular). Para el análisis de la distribución espacial de las sinapsis y de los CMVs, hemos calculado las funciones G, F y K para los centroides de cada uno de nuestras pilas de imágenes con ayuda del paquete "spatstat" del programa R (Baddeley & Turner 2005). La función G, o del vecino más cercano, calcula la distancia entre cada punto de la muestra y su vecino más cercano, y representa la gráfica acumulada de todas estas distancias.

Para la estimación de la función F, o de espacio vacío, se traza una rejilla regular en el volumen que contiene los puntos a analizar. Se mide la distancia entre cada punto de cruce de la rejilla y el punto más cercano de nuestra muestra y se representa la gráfica acumulada de todas estas distancias. La función K o función de Ripley es una medida del número de puntos dentro de una esfera de radio creciente alrededor de cada punto de nuestra muestra. Dado que ninguna de estas funciones utilizada aisladamente es suficiente para determinar un patrón espacial, las hemos utilizado en conjunto (Baddeley et al. 1993; Merchán-Pérez et al. 2014).

Para cada una de las muestras, se calcularon las funciones G, F y K correspondientes a la nube de centroides y también las funciones teóricas correspondientes a una distribución homogénea de Poisson con la misma densidad de puntos, que nos servirán de referencia. Además, hemos calculado y representado el área envolvente correspondiente a la distribución de Poisson, obtenida mediante 100 simulaciones con el mismo número de puntos que cada una de nuestras muestras. De esta manera, si las curvas de nuestra muestra están dentro del área envolvente, se considera que su distribución espacial es aleatoria (Anton-Sanchez et al. 2014).

El análisis de la distribución espacial requiere un número mínimo de puntos para poder diferenciar entre las tres distribuciones posibles. En nuestro caso, las gráficas no son concluyentes en las muestras que presentaban menos de 30 puntos, por lo que no se han usado para el análisis de distribución espacial.

18. Estereología de las mitocondrias

Se cuantificó la cantidad de mitocondrias en el tejido analizado como la fracción de volumen mitocondrial (Vm). Las mitocondrias se observan como estructuras cilíndricas, cortadas en diferentes planos, rodeadas por una doble membrana electrodensa. La membrana interna se invagina hacia el interior, formando las características crestas mitocondriales (Ernester & Gottfried Schatz 1981) (Figura 21). Para calcular la fracción de volumen mitocondrial se utilizó como técnica estereológica el método de Cavalieri, basado en el principio de Delesse (Gundersen et al. 1988; Tang et al. 1997). El método consiste en superponer una gradilla de puntos con un área asociada conocida sobre las imágenes a estudiar (Figura 29). El número de puntos que tocan el objeto a cuantificar (en este caso, las mitocondrias) se divide entre el número total de puntos que se encuentran en el área a estudiar, obteniéndose la fracción de volumen ocupada por el objeto (Gundersen et al. 1988).

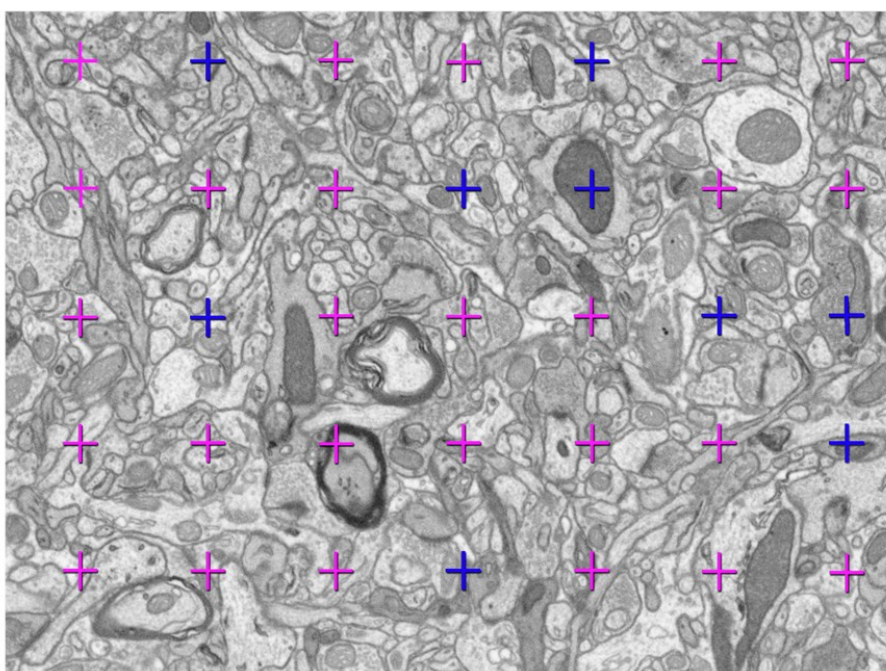


Figura 29. Método de Cavalieri para la estimación de la fracción de volumen mitocondrial. Imagen de microscopía electrónica y la superposición de una gradilla con cruces. Las cruces en rosa son las cruces que no están en contacto con mitocondrias, mientras que las cruces en azul están superpuestas sobre mitocondrias. De esta forma, calculando el cociente de cruces que tocan mitocondrias sobre el total de cruces se logra obtener el porcentaje de volumen que ocupan las mitocondrias en el tejido estudiado.

Fracción de volumen mitocondrial = $9 / (9 + 26) = 25.71\%$

Este análisis se realizó con el conjunto de herramientas “Stereology” del programa Image J (Mironov 2017). Para realizar un análisis óptimo, sin sobrestimaciones ni subestimaciones, se realizó un estudio piloto para hallar el área asociada por punto más conveniente y el número de imágenes suficientes para que los resultados fueran fiables. En el estudio piloto se analizaron 3 series de imágenes, variando el área por punto y el número de imágenes analizadas. Después se calculó la desviación típica, el coeficiente de variación (CV) y el coeficiente de error (CE). Finalmente, se seleccionaron aquellos parámetros con los que se obtenía un menor coeficiente de error, todos ellos menores del 10%, por lo que se consideran válidos (Broskey et al. 2013) (Tabla 2).

$$CV = \left(\frac{\text{Desviación típica}}{\text{Media}} \right)$$

$$CE = \left(\frac{\text{Coeficiente de variación}}{\sqrt{\text{número de muestras}}} \right)$$

Tras el estudio piloto, para analizar las 21 series de imágenes de FIB-SEM obtenidas de tres animales diferentes, se usó una gradilla con un área por punto de 250000 nm². Se realizó el análisis en una de cada 40 imágenes sucesivas, de modo que cada imagen analizada estaba separada de la siguiente 800 nm. El número total de imágenes analizadas fue de 128. Además de cuantificar la

fracción de volumen mitocondrial en el neuropilo, se determinó el compartimento celular en el que se encontraban las mitocondrias. Los compartimentos se clasificaron en compartimentos neuronales (dendríticos o axónicos) y no sinápticos. Para la identificación del compartimento que contenía la mitocondria en cuestión se visualizó la serie de imágenes, buscando si establecía o no sinapsis. Los puntos que tocaban mitocondrias situadas en elementos postsinápticos fueron clasificados como “dendríticos” mientras que aquellos que tocaban mitocondrias localizadas en prolongaciones presinápticas o mielinizadas se clasificaron como “axónicos”. Los puntos que tocaban mitocondrias situadas en prolongaciones que no realizaban sinapsis y carecían de mielina se clasificaron como mitocondrias en elementos no sinápticos.

19. Análisis de los cuerpos multivesiculares

Para la identificación de los cuerpos multivesiculares (CMVs) hemos seguido el criterio clásico de Palay y Palade (Palay & Palade 1955), de forma que hemos considerado CMVs a aquellas organelas rodeadas de membrana simple que contienen vesículas en su interior.

Los CMVs fueron identificados y reconstruidos en 3D con el programa Espina (Morales et al. 2011). Se midió el volumen de cada CMVs reconstruido.

Área por punto Frecuencia	Total mitocondrias	Mitocondrias dendríticas	Mitocondrias axónicas	Mitocondrias no sinápticas
400000 nm ² 1/20 imágenes	5.74	4.85	9.24	20.49
250000 nm ² 1/20 imágenes	3.79	1.95	1.19	8.77
250000 nm ² 1/40 imágenes	5.02	3.52	6.05	8.22

Tabla 2. Coeficientes de error obtenidos en tres condiciones diferentes (en las que se han variado los parámetros área por punto y frecuencia de imágenes analizadas) para optimizar el estudio estereológico en las tres series de imágenes analizadas en el estudio piloto. Se escogió finalmente la opción representada en la tercera fila de la tabla: un área por punto de 250000 nm² analizando 1 de cada 40 imágenes. Estos fueron los parámetros que permitían un coeficiente de error menor al 10% y redujeron el número de imágenes a analizar, optimizando de esta forma el tiempo de análisis.

Para identificar el compartimento donde se localizaban los CMVs, se usó el programa Espina que nos permitió navegar por la pila de imágenes. Los compartimentos subcelulares fueron clasificados como dendritas, cuando eran presinápticos, y axones cuando eran postsinápticos con respecto a la unión sináptica que separaba ambos compartimentos. También se determinó si los CMVs se localizaban en las espinas o en los tallos dendríticos (Figura 54H y G, respectivamente) y si las dendritas tenían o no espinas. Los axones fueron clasificados como excitadores o inhibidores según establecían SA o SS, respectivamente (Colonnier 1968; Gray 1959) (Figura 54C y E). Las fibras mielínicas fueron clasificadas como axones incluso si no establecían sinapsis dentro de la muestra analizada (Figura 54E). El resto de compartimentos que no establecían sinapsis fueron clasificados como “no sinápticos”. En ocasiones pudo determinarse que el compartimento no sináptico donde se localizaba el CMVs era el interior de una célula que envolvía a los axones con vainas de mielina, por lo que se clasificó como oligodendrocito (Figura 54F).

Hemos considerado que existe asociación de los CMVs con las mitocondrias cuando se ha observado un contacto directo entre las membranas de ambos orgánulos (Turegano-Lopez et al. 2019) (Figura 54A).

En cuanto a la morfología de los CMVs, la mayoría de ellos presentaron una forma esferoidal irregular, pero parte de ellos presentaron proyecciones en la membrana en forma de tubo, por lo que se han clasificado como CMVs con extensiones tubulares (Figura 54B).

20. Análisis estadístico

Para el análisis estadístico se usó el programa GraphPad Prism 7. Los criterios de normalidad y homocedasticidad se analizaron mediante la prueba de Kolmogorov-Smirnov (KS) y la prueba de Brown-Forsythe, respectivamente. Cuando se cumplieron ambos criterios se realizaron pruebas paramétricas como la prueba t de Student cuando se comparaban dos grupos y la prueba ANOVA para comparar más de dos grupos, haciendo

comparaciones dos a dos con la prueba de comparación múltiple de Tukey. Cuando los criterios de normalidad y homocedasticidad no se cumplieron, se realizaron pruebas no paramétricas. Se utilizó la prueba de Mann-Whitney (MW) para comparaciones de dos grupos y la prueba de Kruskal-Wallis (KW) para comparaciones de más de dos grupos, haciendo comparaciones dos a dos con la prueba de comparación múltiple de Dunn.

Para comparar proporciones con tablas de contingencia, se usó el Test exacto de Fisher y cuando las muestras eran de gran tamaño se usó la prueba χ^2 . Cuando las tablas de contingencia fueron más grandes que de 2 x 2, se realizaron pruebas post-hoc comparando dos a dos los distintos grupos para averiguar exactamente cuáles fueron los grupos que producían las diferencias sobre los valores estimados. Para ello aplicamos la corrección de Bonferroni. De esta forma se disminuye el valor p al que se otorga significación estadística. En nuestro caso particular, se ha tomado el valor $p < 0.05$, que se divide entre el número de comparaciones post-hoc realizadas (21 comparaciones en la mayoría de los casos), quedando un valor $p < 0.00238$.

Para las correlaciones se aplicó el coeficiente de correlación de Pearson cuando la distribución de datos era normal y el coeficiente de correlación de Spearman cuando la distribución de los datos no cumplía con los criterios de normalidad. A la hora de comparar distribuciones de frecuencia acumulada, se aplicó la prueba de Kolmogorov-Smirnov (KS).

El ajuste de las curvas de las funciones de densidad de probabilidad fue llevado a cabo con Easyfit Professional 5.5 (MathWave Technologies).

Resultados

21. Estudio de la distribución de sinapsis en el neuropilo

A continuación, describiremos la distribución de las sinapsis en el neuropilo de las seis capas corticales de la corteza somatosensorial del ratón adulto. Nos ocuparemos primero de la densidad de sinapsis y de las proporciones de SA y SS. En segundo lugar, describiremos cómo se distribuyen las sinapsis entre las espinas y tallos dendríticos. Finalmente nos ocuparemos de las sinapsis axoespinosas y describiremos cómo se reparten entre la cabeza y el cuello de las espinas dendríticas.

21.1 Densidad de sinapsis y proporción de sinapsis asimétricas (SA) y simétricas (SS)

Para calcular las densidades sinápticas hemos identificado y reconstruido 18427 sinapsis completas en el neuropilo. Los datos han sido obtenidos de 35 series de imágenes realizadas en las seis capas corticales (la capa V fue subdividida en capa Va y Vb). El volumen total de tejido analizado fue de $13315.3 \mu\text{m}^3$ (volumen incluido en el marco de inclusión, estimado tras corregir la retracción del tejido sufrida durante el procesado para microscopía electrónica) (Tabla 3).

La densidad media de sinapsis fue (media \pm error estándar de la media) 1.38 ± 0.09 sinapsis/ μm^3 .

La mayor densidad de sinapsis la encontramos en la capa I (1.75 ± 0.10 sinapsis/ μm^3), descendiendo progresivamente hasta la capa III (1.38 ± 0.15 sinapsis/ μm^3). La densidad vuelve a repuntar en la capa IV (1.56 ± 0.13 sinapsis/ μm^3), que es la capa con más densidad de sinapsis después de la capa I. La densidad de sinapsis vuelve a caer progresivamente en las capas infragranulares, alcanzando la menor densidad en la capa VI (1.02 ± 0.13 sinapsis/ μm^3). Las diferencias observadas entre las capas individuales no son estadísticamente significativas (ANOVA, $p = 0.06$). Cuando en el análisis se compara en conjunto la densidad de sinapsis de las capas supragranulares (I, II y III) frente a la densidad del resto de las capas (IV, Va, Vb y VI) se observa que la densidad de sinapsis en las capas supragranulares es significativamente mayor (1.54 ± 0.08 sinapsis/ μm^3) que la del resto de las capas (1.27 ± 0.10 sinapsis/ μm^3) (t test, $p < 0.05$) (Figura 30A).

A continuación, desglosaremos los datos de los dos tipos de sinapsis, SA o excitadoras y SS o inhibitoras. Respecto a las SA, la densidad media encontrada es de 1.25 ± 0.08 sinapsis/ μm^3 . En cuanto a su distribución en las diferentes capas corticales, la densidad de SA más alta se encuentra en la capa I (1.58 ± 0.07 sinapsis/ μm^3), mientras que la capa con menor densidad es la capa VI (0.93 ± 0.12 sinapsis/ μm^3).

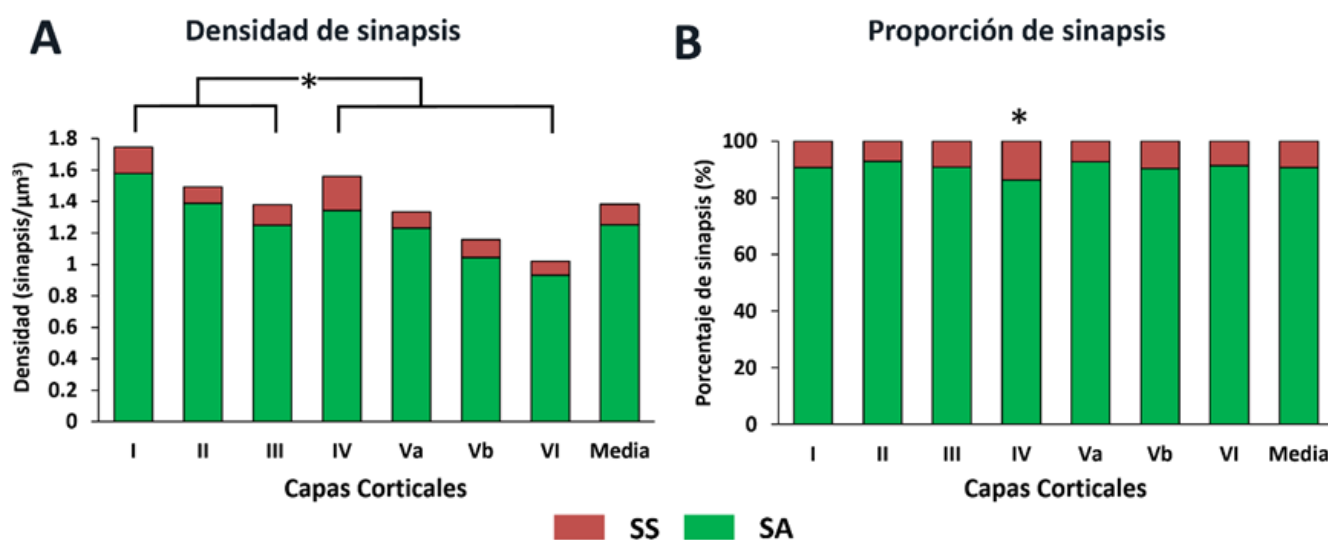


Figura 30. Densidad y proporción de SA (verde) y SS (rojo) en el neuropilo. A. Densidad de SA y SS en el neuropilo de todas las capas corticales y su media, medida como el número de sinapsis por μm^3 de tejido. El asterisco indica que hay una diferencia estadísticamente significativa entre las densidades sinápticas de las capas I a III y IV a VI (t test, $p < 0.05$). B. Porcentaje de SA y SS en el neuropilo de todas las capas corticales y su media. El asterisco indica que la proporción de SS en la capa IV es mayor que en el resto de las capas ($\chi^2 < 0.0001$).

Capa	Animal	Nº de secciones	Resolución (nm/áxixel)	Volumen corregido Total (μm^3)	Volumen corregido MC (μm^3)	Nº de SA	Nº de SS	Nº de SA + SS	Retracción del tejido corregida			Sin corrección por retracción del tejido		
									Densidad de SA (sin/ μm^3)	Densidad de SS (sin/ μm^3)	Densidad de SA + SS (sin/ μm^3)	Densidad de SA (sin/ μm^3)	Densidad de SS (sin/ μm^3)	Densidad de SA + SS
I	ID5	253	5	458.05	365.50	496	20	516	1.36	0.05	1.41	1.55	0.06	1.62
	ID5	305	5	552.03	424.26	676	86	762	1.60	0.20	1.80	1.82	0.23	2.05
	ID24	265	5	479.70	349.59	547	51	598	1.56	0.15	1.71	1.79	0.17	1.96
	ID25	202	5	365.89	291.77	523	58	581	1.79	0.20	1.99	2.05	0.23	2.28
	ID25	277	5	501.37	380.29	605	90	695	1.59	0.24	1.83	1.82	0.27	2.09
II	ID5	250	5	452.73	348.79	505	40	545	1.45	0.11	1.56	1.66	0.13	1.79
	ID5	269	5	487.25	366.84	706	46	752	1.92	0.13	2.05	2.20	0.14	2.35
	ID24	350	5	633.41	502.75	637	52	689	1.27	0.10	1.37	1.45	0.12	1.57
	ID25	281	5	508.71	374.96	403	39	442	1.07	0.10	1.17	1.23	0.12	1.35
	ID25	215	5	381.98	288.06	351	22	373	1.22	0.08	1.30	1.39	0.09	1.48
III	ID5	272	5	492.59	379.47	573	68	641	1.51	0.18	1.69	1.73	0.21	1.93
	ID5	299	5	541.35	423.76	646	70	716	1.52	0.17	1.69	1.74	0.19	1.93
	ID24	270	5	488.61	335.94	309	24	333	0.92	0.07	0.99	1.05	0.08	1.13
	ID25	263	5	476.15	351.81	356	25	381	1.01	0.07	1.08	1.16	0.08	1.24
	ID25	304	5	550.40	417.25	532	69	601	1.27	0.17	1.44	1.37	0.09	1.65
IV	ID5	251	5	454.45	343.16	485	17	502	1.41	0.05	1.46	1.62	0.06	1.67
	ID5	302	5	546.91	356.47	516	151	667	1.45	0.42	1.87	1.66	0.48	2.14
	ID24	268	5	481.22	381.20	385	81	466	1.01	0.21	1.22	1.16	0.24	1.40
	ID25	304	5	553.20	449.65	736	103	839	1.64	0.23	1.87	1.87	0.26	2.14
	ID25	338	5	612.08	196.34	235	36	271	1.20	0.18	1.38	1.37	0.21	1.58
Va	ID5	254	5	459.94	339.07	442	17	459	1.30	0.05	1.35	1.49	0.06	1.55
	ID5	331	5	599.48	481.10	587	57	644	1.22	0.12	1.34	1.40	0.14	1.53
	ID24	346	5	626.28	447.44	412	31	443	0.92	0.07	0.99	1.05	0.08	1.13
	ID25	314	5	568.51	408.33	304	25	329	0.74	0.06	0.80	0.85	0.07	0.92
	ID25	252	5	456.62	340.42	672	74	746	1.97	0.22	2.19	2.26	0.25	2.51

Tabla 3. Densidad de SA y SS en las capas de la corteza (continúa en la página siguiente). En cada capa cortical se indican los datos referentes a cada una de las series de imágenes realizadas. Estos datos incluyen el número de secciones de cada una de las series de imágenes, la resolución a la que fueron obtenidas, el volumen total de la pila de imágenes una vez corregida la retracción del tejido durante el procesado para microscopía electrónica, y el volumen del marco de contaje usado para el cálculo de las densidades. Las densidades de SA, SS y sinapsis totales (SA + SS) se han estimado teniendo en cuenta la retracción del tejido, pero se indican también los datos brutos, sin considerar la retracción del tejido.

Capa	Animal	Nº de secciones	Resolución (nm/píxel)	Volumen corregido Total (μm^3)	Volumen corregido MC (μm^3)	Nº de SA	Nº de SS	Nº de SA + SS	Retracción del tejido corregida			Sin corrección por retracción del tejido			
									Densidad de SA (sin/ μm^3)	Densidad de SS (sin/ μm^3)	Densidad de SA + SS (sin/ μm^3)	Densidad de SA (sin/ μm^3)	Densidad de SS (sin/ μm^3)	Densidad de SA + SS	
Vb	ID5	262	5	474.41	380.84	609	40	649	1.60	0.10	1.70	1.83	0.12	1.95	
	ID5	331	5	629.98	426.39	468	50	518	1.10	0.12	1.22	1.26	0.13	1.39	
	ID24	323	5	585.65	471.31	464	27	491	0.98	0.06	1.04	1.13	0.07	1.19	
	ID25	230	5	416.27	250.31	108	14	122	0.43	0.06	0.49	0.49	0.06	0.56	
	ID25	315	5	570.44	417.32	468	86	554	1.12	0.21	1.33	1.28	0.24	1.52	
VI	ID5	264	5	477.97	374.06	327	23	350	0.87	0.06	0.93	1.00	0.07	1.07	
	ID5	348	5	602.86	433.71	559	45	604	1.29	0.10	1.39	1.47	0.12	1.59	
	ID24	271	5	490.74	410.47	410	35	445	1	0.08	1.08	1.14	0.10	1.24	
	ID25	282	5	510.37	358.72	193	19	212	0.54	0.05	0.59	0.62	0.06	0.68	
	ID25	321	5	581.27	447.97	428	63	491	0.96	0.14	1.10	1.09	0.16	1.25	
MEDIAS									Capa I	1.58	0.17	1.75	1.81	0.19	2.00
									Capa II	1.39	0.10	1.49	1.59	0.12	1.71
									Capa III	1.25	0.13	1.38	1.43	0.15	1.58
									Capa IV	1.34	0.22	1.56	1.53	0.25	1.78
									Capa Va	1.23	0.10	1.33	1.41	0.12	1.53
									Capa Vb	1.05	0.11	1.16	1.20	0.12	1.32
									Capa VI	0.93	0.09	1.02	1.07	0.10	1.17
									Capa I-VI	1.25	0.13	1.38	1.43	0.15	1.58

Tabla 3. Densidad de SA y SS en las capas de la corteza (continuación). En cada capa cortical se indican los datos referentes a cada una de las series de imágenes realizadas. Estos datos incluyen el número de secciones de cada una de las series de imágenes, la resolución a la que fueron obtenidas, el volumen total de la pila de imágenes una vez corregida la retracción del tejido durante el procesado para microscopía electrónica, y el volumen del marco de contaje usado para el cálculo de las densidades. Las densidades de SA, SS y sinapsis totales (SA + SS) se han estimado teniendo en cuenta la retracción del tejido, pero se indican también los datos brutos, sin considerar la retracción del tejido.

En el caso de las SS la densidad es de media 0.13 ± 0.02 sinapsis/ μm^3 , lo que es alrededor de diez veces menor que la densidad de SA. La capa con mayor densidad de SS es la capa IV (0.22 ± 0.06 sinapsis/ μm^3), mientras que la capa con menor densidad es la capa VI (0.09 ± 0.02 sinapsis/ μm^3) (Figura 30A y Tabla 3). Las diferencias entre capas no han resultado ser estadísticamente significativas, ni en el caso de las SA ni en el de las SS (t test, $p > 0.05$). Tampoco se han observado diferencias significativas en la densidad de SA y SS entre los diferentes animales analizados (KW, $p > 0.05$).

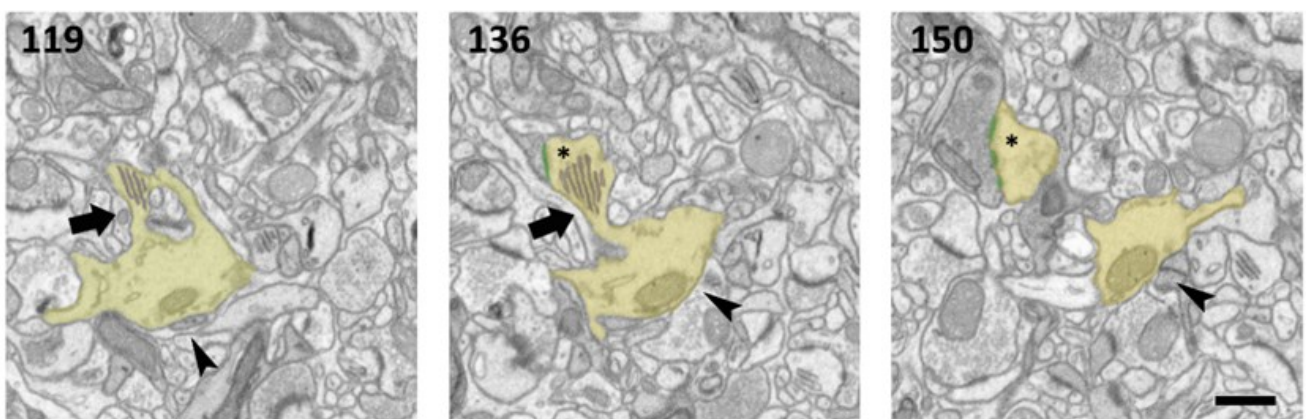
Si consideramos las proporciones en las que se encuentran las SA y SS encontramos que, de media, el 90.69% de sinapsis son SA y el 9.31% de sinapsis son SS. Uno de los animales estudiados, el ID25, presentó una proporción mayor de SS

(10.54%) que los otros dos (8.39% y 8.72%) (Test exacto de Fisher, $p < 0.0001$). En cuanto a la proporción de SA y SS en las distintas capas corticales, se encontró que la capa con una mayor proporción de SA fue la capa II (92.86%) mientras que la capa con menor proporción de SA fue la capa IV (86.21%). De ello resulta que el mayor porcentaje de SS se encuentra en la capa IV (13.79%), dato que es significativamente diferente al porcentaje de SS del resto de capas corticales ($\chi^2 < 0.0001$) (Figura 30B).

21.2 Proporción de sinapsis en espinas y tallos dendríticos

Las sinapsis pueden localizarse en dos lugares diferenciados de las dendritas como son las espinas dendríticas y los tallos dendríticos (Figura 31). Hemos identificado la localización de 10314

A



B

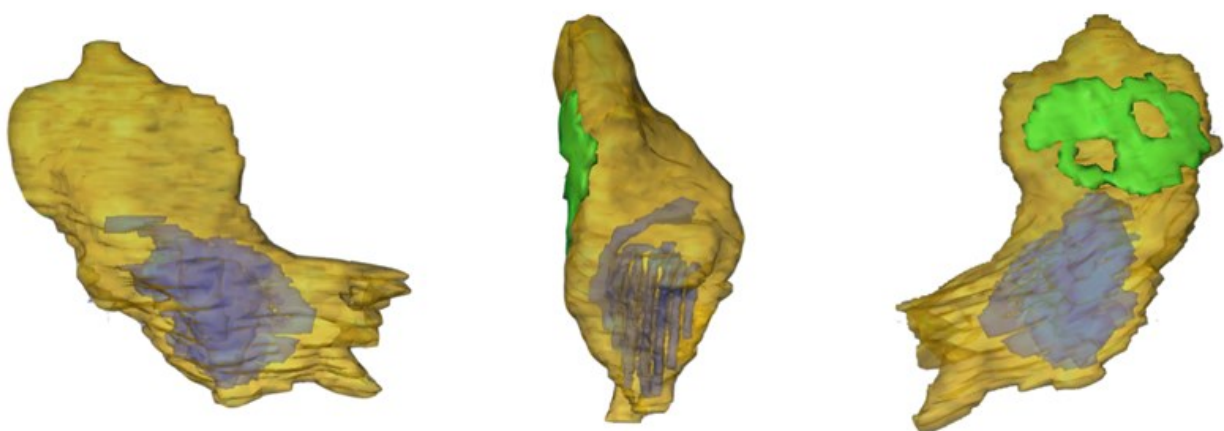


Figura 31. Las espinas dendríticas y el aparato de espina. A. Serie de tres fotografías de microscopía electrónica donde se observa una dendrita (amarillo) en la que aparece el tallo dendrítico (punta de flecha), el cuello (flecha) y la cabeza de una espina dendrítica (asterisco). La sinapsis excitadora que se establece sobre la cabeza se ha representado en verde. También es visible el aparato de espina, representado en morado en las fotografías 119 y 136. La numeración indica la posición de cada imagen dentro de la serie. Barra de escala: 500 nm. B. Reconstrucción tridimensional de la espina dendrítica, vista desde tres perspectivas diferentes. Se observa la sinapsis perforada (verde) y el aparato de espina (morado) en la espina dendrítica (amarillo).

sinapsis, cuyos elementos postsinápticos (espinas o tallos) pudieron identificarse completamente, en tres pilas de imágenes por cada capa cortical. De media, el porcentaje de sinapsis que se localizan en las espinas es del 79.62%, lo que se corresponde con un 20.38% de sinapsis en los tallos dendríticos. Las capas II y III son las que tienen mayor proporción de sinapsis en espinas (83.03% y 84.72%, respectivamente), siendo la diferencia con respecto a las capas IV, Va y Vb estadísticamente significativa. En la capa Vb es en la que más sinapsis hay en los tallos (26.88%), con una diferencia estadísticamente significativa con respecto a las capas I, II, III y VI (Test exacto de Fisher, $p < 0.0024$) (Tabla 4).

También aquí podemos desglosar las sinapsis en asimétricas (SA) o excitadoras y simétricas (SS) o inhibitoras. Si consideramos solo las SA, encontramos que, de media, el 85.88% de ellas se establecen sobre las espinas dendríticas, y el 14.12% restante sobre los tallos dendríticos. La proporción de SA en espinas varía con las capas corticales, desde el 77.96% de la capa Vb, hasta el 91.06% de la capa III. Las capas Va y Vb presentan las mayores proporciones de SA en tallos dendríticos (19.29% y 22.04%, respectivamente), y la diferencia con el resto de las capas es estadísticamente significativa ($\chi^2 < 0.0024$) (Tabla 5) (Figura 32).

Total sinapsis		I	II	III	IV	Va	Vb	VI	Media I-VI
Sinapsis en espinas dendríticas	% (media)	80.97	83.03	84.72	77.56	75.76	73.12	82.22	79.62
	Nº sinapsis	1415	1282	1178	959	1265	1037	1096	
Sinapsis en tallos dendríticos	%	19.03	16.98	15.29	22.44	24.24	26.88	17.78	20.38
	Nº sinapsis	340	238	214	283	377	384	246	
Total	Nº sinapsis	1755	1520	1392	1242	1642	1421	1342	

Tabla 4. Distribución de sinapsis es espinas y tallos dendríticos, para cada una de las capas de la corteza cerebral. Se expresa la media de las muestras obtenidas en cada capa cortical y el número absoluto de sinapsis que se encontraron en cada localización.

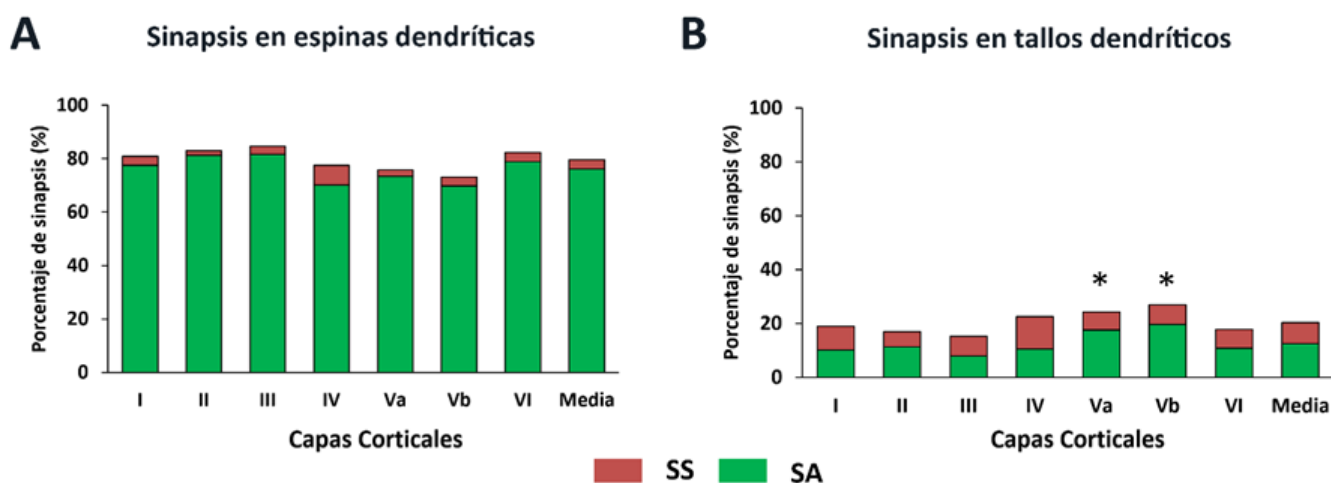


Figura 32. Proporción de sinapsis según su diana postsináptica (espinas o tallos dendríticos) en el neuropilo de las capas corticales. A. Porcentaje de SA (verde) y SS (rojo) establecidas en espinas dendríticas. B. Porcentaje de SA y SS establecidas en tallos dendríticos. Los asteriscos indican que la proporción de SA en tallos dendríticos en las capas Va y Vb es significativamente mayor que en el resto de las capas ($\chi^2 < 0.0024$).

SA		I	II	III	IV	Va	Vb	VI	Media I-VI
Sinapsis en espinas dendríticas	% (media)	88.34	87.86	91.06	87.08	80.71	77.96	88.12	85.88
	Nº sinapsis	1355	1257	1135	863	1224	988	1052	
Sinapsis en tallos dendríticos	% (media)	11.66	12.14	8.94	12.92	19.29	22.04	11.88	14.12
	Nº sinapsis	182	149	108	120	266	279	153	
Total	Nº sinapsis	1537	1406	1243	983	1490	1267	1205	

Tabla 5. Distribución de SA en espinas y tallos dendríticos, para cada una de las capas de la corteza cerebral. Se expresa la media de los porcentajes obtenidos en cada capa cortical y el número absoluto de sinapsis en cada localización.

Por su parte, las SS o sinapsis inhibitoras muestran preferencia por establecer sinapsis en los tallos dendríticos. De media, el 69.78% de las SS se establecen sobre tallos dendríticos mientras que el 30.31% restante se establecen sobre espinas dendríticas. La capa con mayor porcentaje de SS sobre tallos dendríticos fue la capa II (76.12%) mientras que la capa con menor porcentaje fue la capa IV con el 60.02%. Aunque encontramos diferentes proporciones de SS en tallos y espinas dendríticas en cada capa, estas diferencias no fueron estadísticamente significativas (χ^2 , $p = 0.07$) (Tabla 6) (Figura 32).

Si consideramos ahora en conjunto los dos tipos de sinapsis (asimétricas y simétricas) y las dos localizaciones posibles sobre el árbol dendrítico (espinas y tallos dendríticos), se puede concluir que en el neuropilo la mayoría de las conexiones sinápticas son asimétricas axoespinosas (76.07%), seguidas de las asimétricas localizadas en el tallo dendrítico (12.58%). Las siguientes más numerosas son las simétricas que se establecen en los tallos dendríticos (7.80%), siendo las

menos abundantes las simétricas axoespinosas (3.55%) (Figura 33).

Resumiendo, podemos decir que hay 9 sinapsis SA por cada sinapsis SS. A su vez, hay 4 sinapsis en espinas por cada sinapsis en el tallo dendrítico.

Porcentaje de sinapsis en espinas y en tallos dendríticos

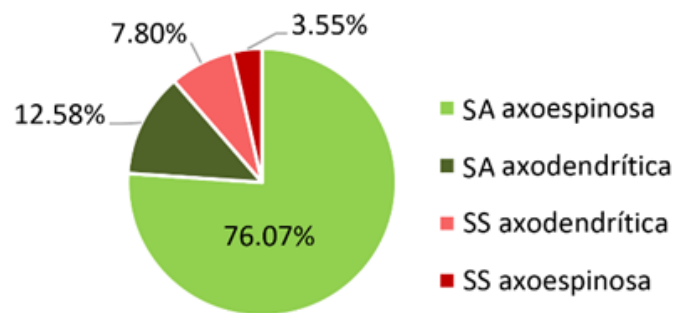


Figura 33. Porcentajes de SA y SS establecidas en espinas dendríticas (axoespinosas) y en tallos dendríticos (axodendríticas).

SS		I	II	III	IV	Va	Vb	VI	Media I-VI
Sinapsis en espinas dendríticas	% (media)	29.98	23.88	30.15	39.98	26.73	30.40	31.04	30.31
	Nº sinapsis	60	25	43	96	41	49	44	
Sinapsis en tallos dendríticos	% (media)	70.65	76.12	69.85	60.02	73.27	69.60	68.97	69.78
	Nº sinapsis	158	89	106	163	111	105	93	
Total	Nº sinapsis	218	114	149	259	152	154	137	

Tabla 6. Distribución de SS en espinas y tallos dendríticos, para cada una de las capas de la corteza cerebral. Se expresa la media de los porcentajes obtenidos en cada capa cortical y el número absoluto de sinapsis en cada localización.

En las espinas, la inmensa mayoría de las sinapsis son excitadoras, ya que encontramos una proporción de más de 20 sinapsis excitadoras por cada inhibidora. En los tallos dendríticos también las sinapsis excitadoras son más frecuentes que las inhibidoras, pero en una proporción menos abultada de 3 sinapsis excitadoras por cada 2 inhibidoras.

El hecho de que las SA sean más frecuentes tanto en las espinas como en los tallos dendríticos podría deberse al azar, ya que son el tipo sináptico predominante. Para comprobar si la distribución de SA y SS sobre las espinas y los tallos dendríticos se debe o no al azar hemos realizado el test exacto de Fisher sobre una muestra de 10314 sinapsis. Este test analiza la discrepancia entre la distribución que hemos encontrado experimentalmente y la distribución que obtendríamos si las SA y SS se distribuyeran al azar entre las espinas y los tallos dendríticos (Tabla 7).

	Datos obtenidos (Datos esperados)		Total
	En espinas	En tallos	
SA	7874 (7287.80)	1257 (1843.20)	9131
SS	358 (944.20)	825 (238.80)	1183
Total	8232	2082	10314

Tabla 7. Tabla de contingencia de las SA y simétricas (SS) localizadas en espinas y tallos dendríticos. Se muestran los valores obtenidos experimentalmente y los valores esperados en una distribución aleatoria entre paréntesis. La distribución observada experimentalmente no es compatible con una distribución aleatoria (Test exacto de Fisher, $p < 0.0001$).

El análisis realizado indica que la desigual distribución de las SA y SS sobre los tallos y las espinas no se debe al azar (Test exacto de Fisher, $p < 0.0001$). Cuando la ratio de sinapsis reales de un tipo entre sinapsis esperadas supera el valor 1, las sinapsis de ese tipo estarán sobrerrepresentadas y no se distribuirán de forma aleatoria. Las sinapsis excitadoras se localizan algo más frecuentemente en las espinas dendríticas de lo que encontraríamos si se distribuyeran de forma aleatoria (1.08 veces más de lo que correspondería). Al mismo tiempo, las sinapsis excitadoras se encuentran menos representadas en los tallos (0.68 veces lo esperable por azar). Esta diferencia es mucho más remarcable en las sinapsis inhibido-

ras, que se establecen preferentemente en los tallos dendríticos, ya que el número de sinapsis inhibidoras en tallos dendríticos es 3.45 veces más alto de lo esperable al azar, mientras que solo 0.38 veces las sinapsis inhibidoras se establecen sobre espinas (Tabla 7).

Describiremos a continuación la distribución de las sinapsis que se establecen en los tallos dendríticos. Los tallos dendríticos pueden pertenecer a dendritas con espinas (principalmente de neuronas piramidales y estrelladas) o a dendritas sin espinas (principalmente de interneuronas inhibidoras). Del total de las 2082 sinapsis establecidas en tallos dendríticos, el 86.82% se localizaron en tallos de neuronas con espinas y el 13.18% restante en tallos dendríticos que no presentaban espinas (Figura 4).

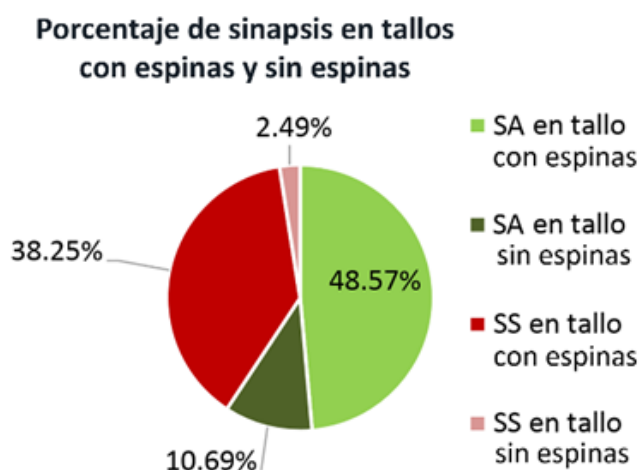


Figura 34. Porcentajes de SA y SS establecidas en tallos con espinas y sin espinas.

También aquí podemos desglosar los datos entre SA y SS. En el caso de las SA, encontramos que el 81.96% se establecieron en tallos dendríticos con espinas y el 18.04% restante en tallos sin espinas. En el caso de las SS, se establecieron sobre tallos con espinas en el 94.14% de las ocasiones, y en tallos sin espinas en el 5.86% restante. Estas diferencias de distribución entre las SA y SS no pueden atribuirse al azar (Test exacto de Fisher, $p < 0.0001$) (Tabla 8).

	Datos obtenidos (Datos esperados)		Total
	En tallos espinosos	En tallos no espinosos	
SA	1027 (1090.37)	230 (166.63)	1257
SS	779 (715.63)	46 (109.37)	825
Total	1806	276	2082

Tabla 8. Tabla de contingencia de las SA y SS localizadas en tallos dendríticos con espinas y sin espinas. Se muestran los valores obtenidos experimentalmente y los valores esperados en una distribución aleatoria entre paréntesis. La distribución observada experimentalmente no es compatible con una distribución aleatoria (Test exacto de Fisher, $p < 0.0001$).

Como hemos visto anteriormente, el 79.62% de las sinapsis se establecen sobre espinas dendríticas, lo que nos deja un 20.38% de sinapsis que se establecen sobre los tallos dendríticos. Pero, según acabamos de ver, en el 86.82% de los casos, esos tallos dendríticos pertenecen a neuronas

con espinas. Si ahora sumamos el porcentaje de sinapsis axoespinosas (79.62%) y el de sinapsis en los tallos de neuronas con espinas (el 86.82% del 20.38%, es decir el 17.69%) el resultado es que el 97.31% de todas las sinapsis tienen lugar sobre neuronas con espinas.

21.3 Proporción de sinapsis en la cabeza y el cuello de las espinas dendríticas

Las sinapsis que se localizan en las espinas dendríticas pueden situarse tanto en la cabeza como en el cuello de la espina. Las SA rara vez se establecen en el cuello, dado que, por cada SA establecida en el cuello de una espina, se encontraron 38 sinapsis establecidas en la cabeza. Sin embargo, no se observó un desequilibrio tan acusado en las SS, en las que aproximadamente, por cada 2 sinapsis en el cuello, se encuentran 3 sinapsis en la cabeza de las espinas (Tabla 9 y Figura 35).

		Capas Corticales							Media I-VI
		I	II	III	IV	Va	Vb	VI	
SA en cabezas de espinas	% medias	75.61	79.58	79.90	69.15	70.93	66.70	76.97	74.12
	Nº sinapsis	1321	1232	1114	852	1185	945	1026	
SA en cuellos de espinas	% medias	1.90	1.73	1.71	0.95	2.40	3.07	1.91	1.95
	Nº sinapsis	34	25	21	11	39	43	26	
SA en tallos dendríticos	% medias	10.20	11.25	8.00	10.57	17.66	19.61	10.78	12.58
	Nº sinapsis	182	149	108	120	266	279	153	
SS en cabezas de espinas	% medias	2.70	1.37	1.77	4.56	1.60	2.26	1.76	2.29
	Nº sinapsis	47	21	22	58	26	33	23	
SS en cuellos de espinas	% medias	0.77	0.34	1.33	2.90	0.83	1.09	1.58	1.26
	Nº sinapsis	13	4	21	38	15	16	21	
SS en tallos dendríticos	% medias	8.82	5.73	7.29	11.87	6.58	7.27	7.00	7.80
	Nº sinapsis	158	89	106	163	111	105	93	
Total	Nº sinapsis	1755	1520	1392	1242	1642	1421	1342	

Tabla 9. Distribución de SA y SS en la cabeza de las espinas dendríticas, en el cuello de las espinas y en los tallos dendríticos, para cada una de las capas de la corteza cerebral. Se expresan los porcentajes y el número absoluto de sinapsis en cada localización.

Espinass completass		I	II	III	IV	Va	Vb	VI	I-VI
Espinass simples	% (medias)	92.88	93.40	93.60	95.06	95.49	94.23	93.44	94.01
	Nº	1376	1280	1157	1239	1327	1043	1144	
Espinass ramificadas	% (medias)	7.12	6.60	6.41	4.94	4.51	5.77	6.56	5.99
	Nº	106	91	81	67	66	64	80	
Total	Nº	1482	1371	1238	1306	1393	1107	1224	

Tabla 10. Distribución porcentual de espinass simples y ramificadas en las capas de la corteza cerebral. Los porcentajes (%) son la media de las muestras obtenidas en cada capa. También se indica el número absoluto (Nº) de espinass de cada tipo.

21.5 Espinass simples

La mayoría de las espinass simples, el 92.58%, tenían al menos una sinapsis, mientras que en el 7.42% de ellas no hemos observado contactos sinápticos. La mayor proporción de espinass sin sinapsis se encontró en la capa VI (11.36%), que duplicaba el porcentaje encontrado en la capa II (5.66%). La diferencia entre la capa VI y el resto de las capas resultó estadísticamente significativa (χ^2 , $p < 0.0001$), excepto con la capa Va (χ^2 , $p = 0.011$), que presentó la segunda mayor proporción de espinass sin sinapsis (8.64%) (Tabla 11).

En cuanto a la proporción de espinass simples con sinapsis múltiples, fueron un 6.13% de media entre todas las capas, pero variaron desde por encima del 10% en la capa IV hasta alrededor del 4% en las capas II y VI (Tabla 11, Figura 37A). La dife-

rencia entre la capa IV y el resto de capas fue estadísticamente significativa (χ^2 , $p < 0.0001$), con la excepción de la capa Vb (χ^2 , $p = 0.0198$). La capa Vb tenía, a su vez, más sinapsis múltiples que la capa II de forma estadísticamente significativa, (χ^2 , $p = 0.0004$) (Tabla 11) (Figura 37A).

21.6 Espinass Ramificadas

La mayoría de las espinass ramificadas, el 97.72%, tenían al menos una sinapsis, mientras que solo en el 2.28% de ellas no hemos observado contactos sinápticos. No hemos encontrado diferencias estadísticamente significativas entre las distintas capas corticales (χ^2 , $p = 0.94$). Las espinass ramificadas más frecuentes son aquellas con dos sinapsis (71.05%), seguidas de las espinass en las que se establece una sinapsis (14.98%) y las que tienen más de dos sinapsis (11.69%).

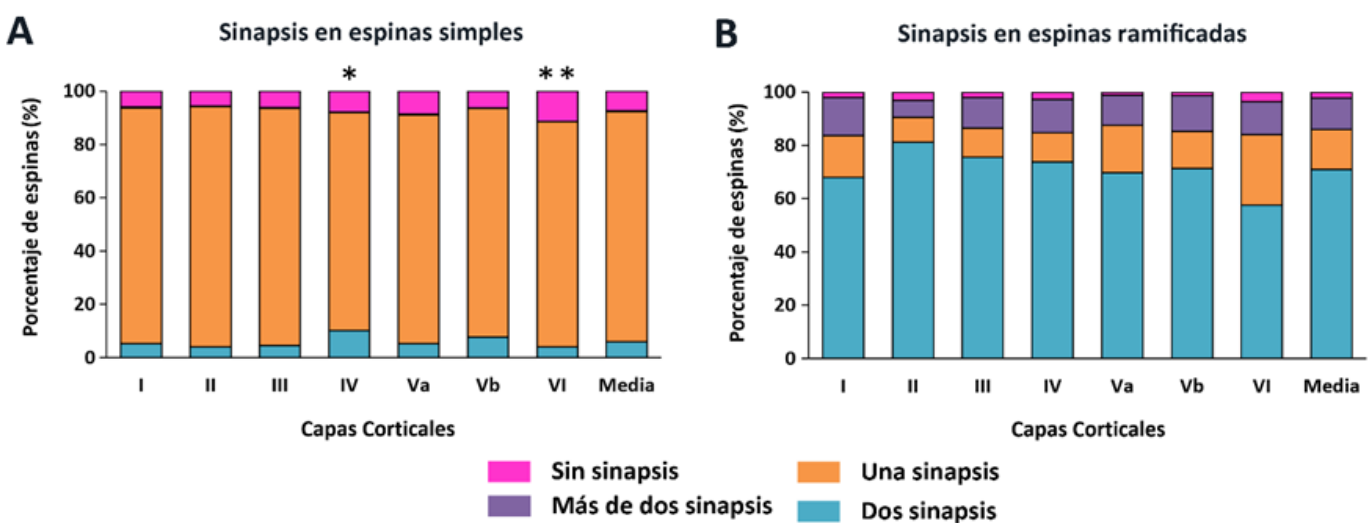


Figura 37. Porcentaje de espinass sin sinapsis, con una sinapsis, con dos sinapsis y con más de dos sinapsis en espinass simples (A) y ramificadas (B) en cada capa cortical.

* Las espinass simples con dos sinapsis fueron más abundantes en la capa IV que en el resto de las capas (χ^2 , $p < 0.0001$), salvo la capa Vb (χ^2 , $p = 0.0198$).

** La mayor abundancia de espinass simples sin sinapsis en la capa VI fue estadísticamente significativa con respecto al resto de las capas (χ^2 , $p < 0.0001$), excepto la capa Va (χ^2 , $p = 0.011$).

Espinas simples		I	II	III	IV	Va	Vb	VI	I-VI
Espinas simples sin sinapsis	% (medias)	5.93	5.66	6.21	7.83	8.64	6.34	11.36	7.42
	Nº	81	72	74	96	108	66	128	
Espinas simples con una sinapsis	% (medias)	88.32	90.18	88.80	81.76	85.65	85.89	84.55	86.45
	Nº	1216	1153	1026	1013	1144	896	969	
Espinas simples con dos sinapsis	% (medias)	5.32	4.10	4.67	10.22	5.32	7.67	4.10	5.92
	Nº	73	54	53	128	71	80	47	
Espinas simples con más de dos sinapsis	% (medias)	0.43	0.06	0.31	0.19	0.39	0.10	0	0.21
	Nº	6	1	4	2	4	1	0	
Total	Nº	1376	1280	1157	1239	1327	1043	1144	

Tabla 11. Distribución porcentual de la distribución de sinapsis en espinas simples en las capas de la corteza cerebral. Se expresan los porcentajes (%), obtenidos como la media de las muestras de cada capa y el número absoluto (Nº) de espinas encontradas en cada categoría.

Tampoco se observan diferencias estadísticamente significativas en el número de sinapsis en las espinas ramificadas en las diferentes capas corticales (χ^2 , $p = 0.40$) (Tabla 12) (Figura 37B).

Si consideramos ahora el conjunto de las espinas estudiadas, independientemente de la capa en la que se localicen, encontramos que la mayoría de las espinas simples presenta una sola sinapsis (86.45%), que es excitadora en más del 99% de los casos. Cuando una espina presentaba más de una sinapsis (6.13% de las espinas simples), la

combinación más común fue la de una sinapsis excitadora y otra inhibitoria (56.30%), seguida de dos sinapsis excitadoras (39.98%), siendo el resto de combinaciones mucho menos frecuentes (3.72%). En el caso de las espinas ramificadas, la mayoría presentan dos sinapsis excitadoras (70.81%), seguidas de las espinas que cuentan con solo una sinapsis excitadora (14.60%) y tres sinapsis excitadoras (6.31%), siendo muy minoritarias el resto de las combinaciones encontradas (1.97%).

Espinas Ramificadas		I	II	III	IV	Va	Vb	VI	I-VI
Espinas ramificadas sin sinapsis	% (medias)	2.01	3.06	2.08	2.78	1.08	1.28	3.67	2.28
	Nº	2	2	1	2	1	1	3	
Espinas ramificadas con una sinapsis	% (medias)	15.62	9.42	10.89	10.91	17.79	13.83	26.41	14.98
	Nº	17	9	9	7	10	9	21	
Espinas ramificadas con dos sinapsis	% (medias)	68.00	81.20	75.56	73.76	69.81	71.40	57.64	71.05
	Nº	72	74	63	49	48	46	47	
Espinas ramificadas con más de dos sinapsis	% (medias)	14.37	6.32	11.47	12.55	11.33	13.49	12.28	11.69
	Nº	15	6	8	9	7	8	9	
Total	Nº	106	91	81	67	66	64	80	

Tabla 12. Distribución porcentual del número de sinapsis en espinas ramificadas en las capas de la corteza cerebral. Se expresan los porcentajes (%) obtenidos de la media de las muestras de cada capa y el número absoluto (Nº) de sinapsis encontradas en cada categoría.

22. Estudio del tamaño y la forma de las sinapsis

Una vez descrita y analizada la densidad y distribución de las sinapsis en las distintas capas de la corteza somatosensorial del ratón, se procedió al estudio del tamaño de dichas sinapsis.

22.1 Área y perímetro de las uniones sinápticas en referencia a su naturaleza excitadora o inhibitoria

Se analizó el tamaño de 18426 sinapsis, cuya unión sináptica estaba completa, lo que permitió obtener la superficie de aposición sináptica (SAS) asociada a la sinapsis. La SAS es una superficie que representa la superficie de aposición entre la densidad presináptica y la densidad postsináptica, y conserva la curvatura, perforaciones e irregularidades presentes en la unión sináptica. Del total de sinapsis estudiadas, 16672 (90.48%) fueron SA, mientras que 1754 (9.52%) se clasificaron como SS. Los datos de tamaño sobre los que se ha llevado a cabo este análisis han sido corregidos por el factor de retracción descrito en la sección de “Materiales y Métodos”.

El tamaño medio de las SA ($71502.42 \text{ nm}^2 \pm 462.73$) fue mayor que el de las SS ($67281.34 \text{ nm}^2 \pm 1154.97$) (Tabla 13). Las SS de uno de los animales (ID24) fueron más grandes de forma estadísticamente significativa respecto a las sinapsis del resto de animales (ID5, ID25) (KW, Dunn’s post-hoc, $p < 0.0001$). En las SA se observan diferencias estadísticamente significativas entre los animales ID24 e ID25 (KW, Dunn’s post-hoc, $p < 0.05$) (Figura 38).

En la mayoría de las capas corticales las SA tienen más área, de media, que las SS, excepto en las capas II, Vb, VI (Tabla 13). El área de las SAS de las SA varió entre 683173.04 nm^2 y 1484.60 nm^2 , mientras que las SAS de las SS presentan menor rango de variación, siendo 531025.95 nm^2 el área máxima encontrada y 4261.36 nm^2 el área mínima de SAS. Las diferencias entre el área de SA y SS son estadísticamente significativas en las capas II, IV y VI (MW, $p < 0.05$, $p < 0.05$, $p < 0.0001$ respectivamente) (Figura 39A).

Si exploramos el tamaño de las SA, encontramos las más grandes en la capa III ($83249.30 \text{ nm}^2 \pm 1454.10$). siendo la diferencia estadísticamente significativa con el resto de capas excepto la capa Va (KW, $p < 0.05$).

SA					SS				
Capa	Área media de la SAS \pm error estándar	n	μ	σ	Capa	Área media de la SAS \pm error estándar	n	μ	σ
I	62262.09 \pm 1077.29	2847	10.711	0.8068	I	55737.374 \pm 2135.01	305	10.724	0.6699
II	76086.37 \pm 1301.62	2602	10.928	0.8016	II	80408.21 \pm 3856.77	199	11.071	0.7077
III	83249.30 \pm 1454.10	2415	11.014	0.8063	III	69991.46 \pm 2854.74	256	10.934	0.7167
IV	66974.51 \pm 929.10	2357	10.907	0.6527	IV	59765.55 \pm 1939.27	388	10.809	0.6353
Va	75836.09 \pm 1236.62	2417	10.949	0.7848	Va	67992.06 \pm 3687.10	204	10.896	0.7478
Vb	72287.72 \pm 1256.86	2117	10.904	0.7746	Vb	72849.35 \pm 3665.69	217	10.984	0.6611
VI	63439.65 \pm 1126.86	1917	10.787	0.7525	VI	76890.92 \pm 4471.76	185	11.031	0.6588
Media I-VI	71502.42 \pm 462.73	16672	10.884	0.7786	Media I-VI	67281.34 \pm 1154.97	1754	10.897	0.6909

Tabla 13. Parámetros de la distribución log-normal que mejor se ajusta a la distribución de tamaños de las superficies de aposición sináptica (SAS). Se indica el área media de las SAS ($\text{nm}^2 \pm$ error estándar de la media), el número de SAS analizadas (n), y la localización (μ) y escala (σ) de las distribuciones log-normales que mejor se ajustan a la distribución de los datos en cada capa cortical. También se muestra la media no ponderada del total de las capas.

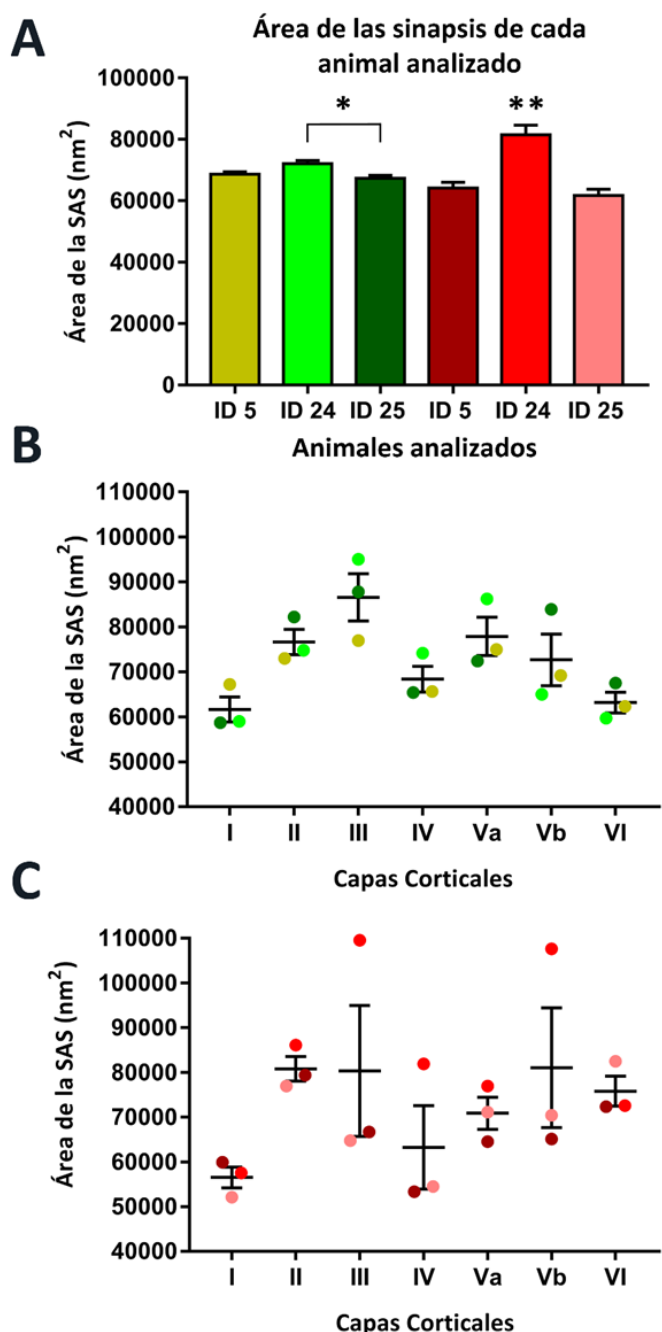


Figura 38. Área de las SA (en tonos verdes) y SS (en tonos rojos) en los diferentes animales estudiados. A. Media del área de las SAS de los animales ID5, ID24 e ID25, tanto para las SS como SA. * Se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre el área de las SA de los animales ID24 e ID25 (KW, Dunn's post-hoc, $p < 0.05$). ** Las SS del animal ID24 fueron mayores que las SS del resto de animales (KW, Dunn's post-hoc, $p < 0.0001$). B. Representación de la media y el error estándar de la media del área de las SAS de las SA de cada animal estudiado (3 animales) en cada capa cortical. C. Representación de la media y el error estándar de la media del área de las SAS de las SS de cada animal estudiado (3 animales) en cada capa cortical.

Por otro lado, las sinapsis más pequeñas están en la capa I ($62262.09 \text{ nm}^2 \pm 1077.29$). Las sinapsis de las capas I y VI fueron más pequeñas de forma

significativa respecto al resto de capas (KW, $p < 0.0001$, Duns post-hoc) (Figura 39B) (Tabla 13) (Tabla 14).

En cuanto al tamaño de las SS, las más grandes se encuentran en la capa II ($80408.21 \text{ nm}^2 \pm 3856.77$) y las más pequeñas están localizadas en la capa I ($55737.37 \text{ nm}^2 \pm 2135.01$), siendo estas diferencias estadísticamente significativas (KW, $p < 0.0001$). Además, las sinapsis de la capa I son más pequeñas respecto a las de las capas Vb y VI (KW, $p = 0.0009$, $p = 0.0002$ respectivamente), las sinapsis de la capa II fueron más grandes respecto a las de la capa IV (KW, $p < 0.0001$) y las sinapsis de la capa IV más pequeñas frente a las de las capas Vb y VI (KW, $p < 0.05$) (Figura 39C) (Tabla 13) (Tabla 14).

Para estudiar la distribución de tamaños de las SA y SS en las diferentes capas corticales la hemos representado en forma de histogramas de frecuencia. Estos histogramas, que representan la función de densidad de probabilidad, tienen en todos los casos una forma asimétrica, ya que la mayoría de las sinapsis se sitúan en la izquierda de las gráficas mientras que unas pocas sinapsis muestran un tamaño mucho mayor que hace que la curva tenga una cola larga en la parte derecha (Figura 40A). Para analizar si hay diferencias en la distribución del tamaño de las áreas de las SA y SS, se han comparado sus distribuciones acumuladas, entre las cuales hemos encontrado diferencias estadísticamente significativas (KS, $p < 0.0001$) (Figura 40B). Hemos comprobado que tanto en las SA como en las SS, la función de densidad de probabilidad se ajusta a una distribución log-normal (Tabla 13) (Figura 41).

Hemos medido también el perímetro de las SAS (Figura 42A). Al comparar el área y el perímetro de cada SAS, hemos observado una fuerte correlación entre ellos ($R^2 = 0.89$, R de Spearman = 0.943 , $p < 0.0001$). Además, la tortuosidad del perímetro crece más rápidamente que el área de las SAS. Esto es observable en la Figura 42B, donde comparamos el perímetro de las SAS con el perímetro de un círculo de la misma área, que es el perímetro mínimo teórico que podrían tener.

II	<0.0001					
III	<0.0001	0.0157				
IV	<0.0001	>0.9999	0.0017			
Va	<0.0001	>0.9999	>0.9999	>0.9999		
Vb	<0.0001	>0.9999	0.0018	>0.9999	>0.9999	
VI	0.0080	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001
Capas (SAS SA)	I	II	III	IV	Va	Vb

Tabla 14. Comparaciones dos a dos del área de las SAS de las SA y SS de las diferentes capas corticales. Se indican los valores de p para los test KW con la corrección de Dunns. Los valores de p de las comparaciones estadísticamente significativas están en negrita.

II	<0.0001					
III	0.0029	>0.9999				
IV	>0.9999	<0.0001	0.1353			
Va	0.0819	0.3092	>0.9999	>0.9999		
Vb	0.0009	>0.9999	>0.9999	0.0459	>0.9999	
VI	0.0002	>0.9999	>0.9999	0.0096	>0.9999	>0.9999
Capas (SAS SS)	I	II	III	IV	Va	Vb

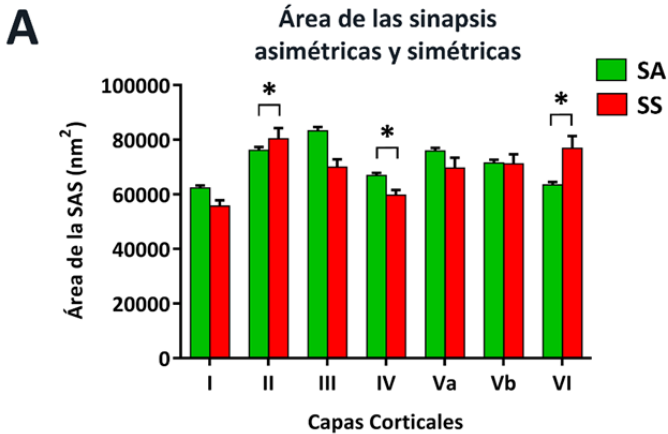
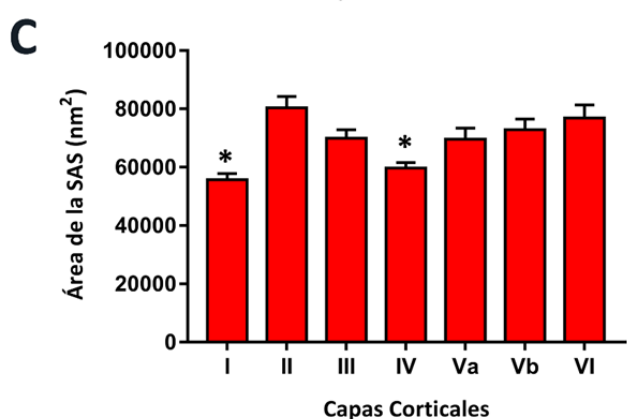
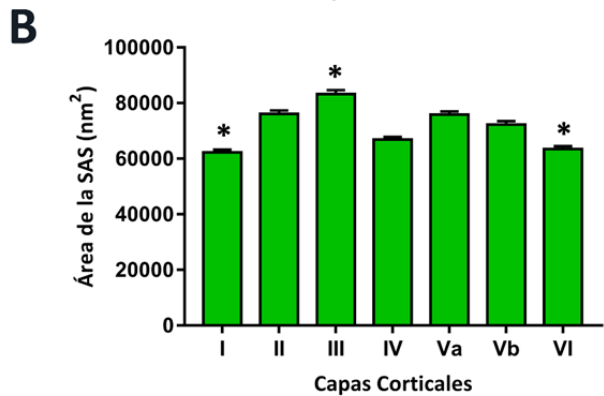


Figura 39. Área de las sinapsis SA y SS en las diferentes capas corticales. A. Tamaño del área de las SAS de SA y SS capa a capa. Las sinapsis excitadoras fueron de media más grandes en todas las capas corticales, excepto en las capas II y Vb. Los asteriscos indican las capas donde las diferencias de tamaño fueron estadísticamente significativas (Capas II, IV y VI; MW, $p < 0.05$, $p < 0.05$, $p < 0.0001$ respectivamente). B. Tamaño del área de las SAS asimétricas en cada capa cortical. Las capas I y VI presentaron áreas más pequeñas que el resto de las capas (KW, $p < 0.0001$, Dunn's post-hoc, asteriscos). En cambio, las SAS de la capa III fueron más grandes que las SAS del resto de las capas, excepto la Va (KW, $p < 0.05$, asterisco). C. Tamaño del área de las SAS simétricas en cada capa cortical. Los asteriscos indican dónde se encontraron diferencias estadísticamente significativas: las sinapsis de la capa I fueron más pequeñas que las de las capas II, Vb y VI (KW, $p < 0.0001$), mientras que las sinapsis de la capa IV fueron más pequeñas frente a las de las capas II (KW, $p < 0.0001$), Vb y VI (KW, $p < 0.05$).



Al comparar el tamaño de las sinapsis con la densidad sináptica de cada pila de imágenes, hemos observado una correlación inversa entre ambos parámetros ($R^2 = 0.4096$, R de Spearman = -0.64 , $p < 0.0001$). De esta forma, en las muestras con mayor densidad sináptica, el tamaño de las sinapsis tiende a decrecer, mientras que en las muestras con menor densidad sináptica las sinapsis tienden a ser más grandes en todas las capas (Figura 43).

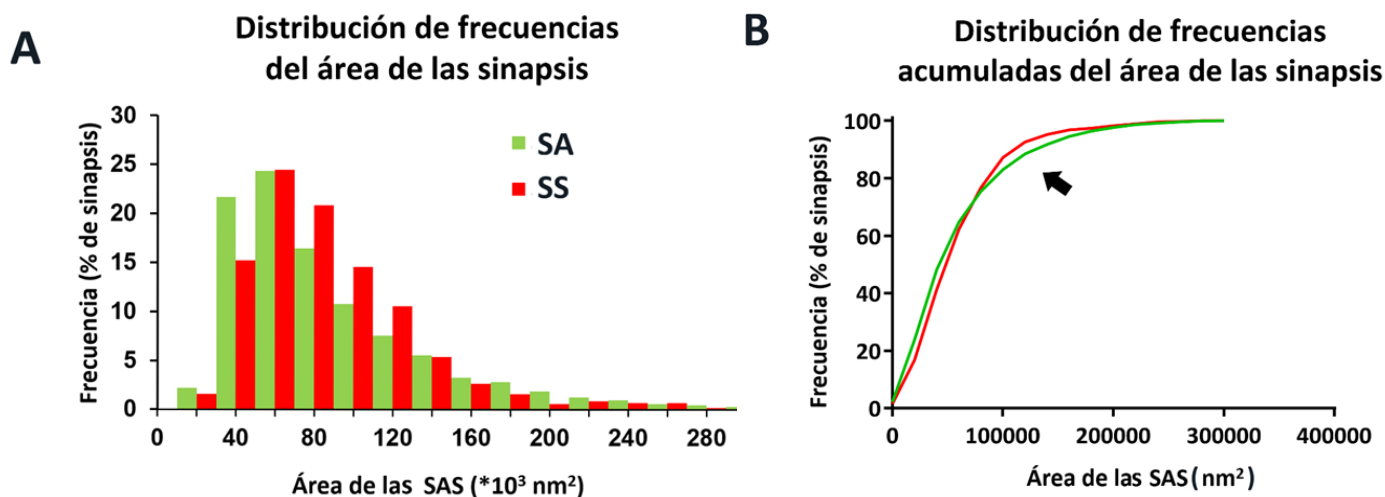


Figura 40. Distribución del tamaño de las superficies de aposición sináptica (SAS) de las SA y SS. A. Distribución de frecuencias del tamaño de las SAS de las SA (columnas verdes) y SS (columnas rojas). B. Distribución acumulada del tamaño de las SAS de las SA (línea verde) y de las SS (línea roja). Se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la distribución de tamaños entre ambos tipos de sinapsis (KS, $p < 0.0001$).

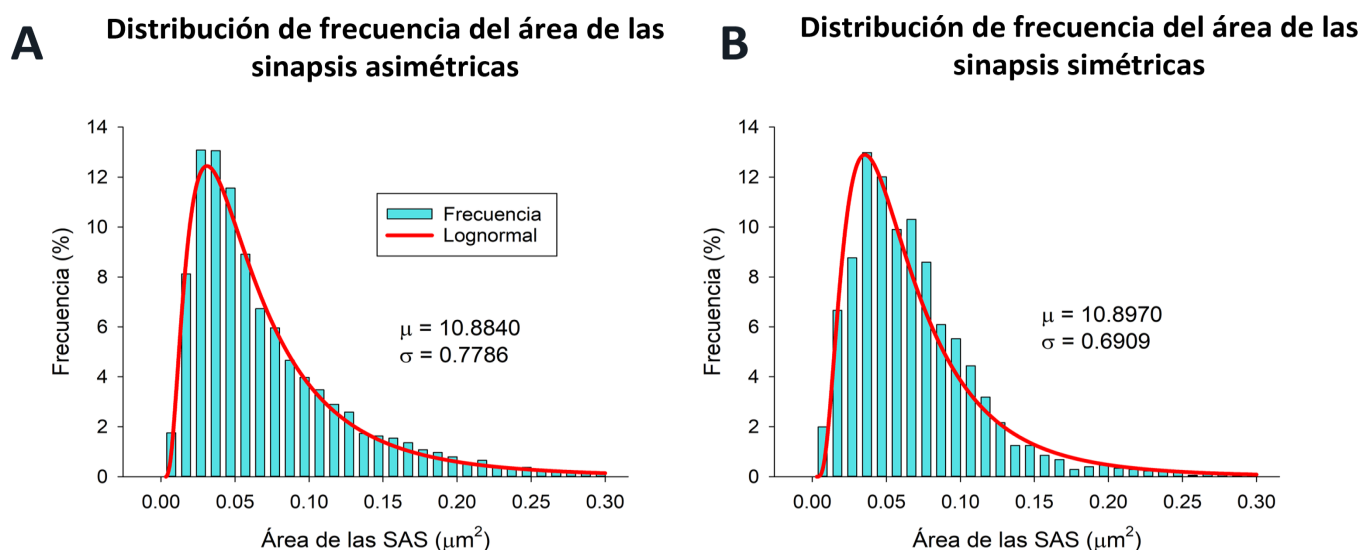


Figura 41. Distribución de frecuencia del área de las SAS de SA (A) y SS (B). En ambos histogramas (azul) se muestra el ajuste de la curva log-normal correspondiente (rojo). También se muestran los parámetros que definen ambas curvas (μ y σ).

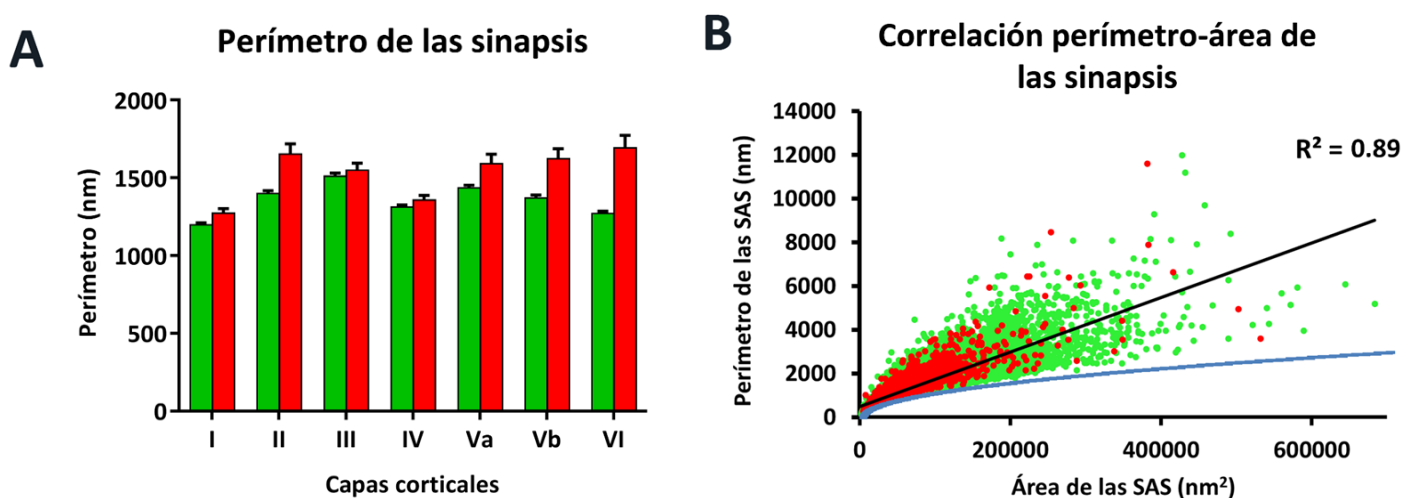


Figura 42. El perímetro sináptico. A. Perímetros de las superficies de aposición sináptica (SAS) de las SA (verde) y SS (rojo) en las capas corticales. El perímetro de las SS es mayor en todas las capas corticales. B. Gráfico de dispersión mostrando la relación entre las áreas y los perímetros de las SAS. Las SA se representan como puntos verdes y las SS como puntos rojos. Se ha añadido como referencia la relación perímetro/área de un círculo (línea azul). Hay una fuerte correlación entre el área y el perímetro de las SAS ($R^2 = 0.89$ para SA y SS juntas, línea negra, R de Spearman = 0.943, $p < 0.0001$).

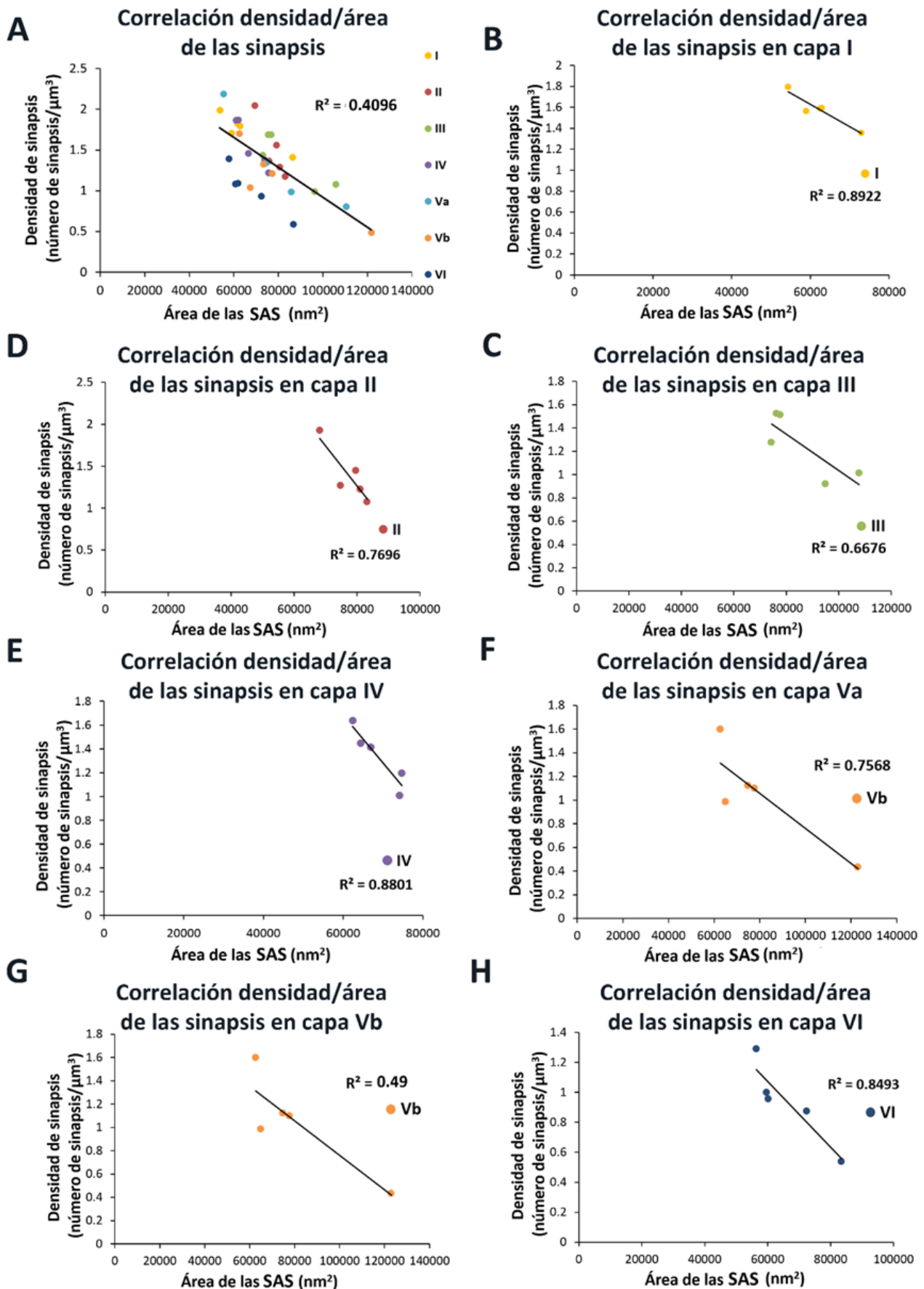


Figura 43. Correlación entre la densidad de sinapsis y el tamaño de las superficies de aposición sináptica (SAS). A. Representación de la correlación del total de muestras y capas analizadas ($R^2 = 0.4096$, R de Spearman = -0.64 , $p < 0.0001$). B. Correlación de las muestras de la Capa I (R de Pearson = -0.94 , $p < 0.05$). C. Correlación de las muestras de la Capa II (R de Pearson = -0.91 , $p < 0.05$). D. Correlación de las muestras de la Capa III (R de Pearson = -0.87 , $p = 0.06$). E. Correlación de las muestras de la Capa IV (R de Pearson = -0.95 , $p < 0.05$). F. Correlación de las muestras de la Capa Va (R de Pearson = -0.92 , $p < 0.03$). G. Correlación de las muestras de la Capa Vb (R de Spearman = -0.70 , $p = 0.233$). H. Correlación de las muestras de la Capa VI (R de Pearson = -0.95 , $p = 0.01$).

Si consideramos solamente las SA, la relación inversa entre la densidad de sinapsis y su tamaño se mantiene ($R^2 = 0.33$, R de Spearman = -0.576 , $p < 0.0001$) (Figura 44A), mientras que esa relación es mucho más débil en las SS ($R^2 = 0.27$, R de Spearman = 0.52 , $p < 0.0001$) (Figura 44B).

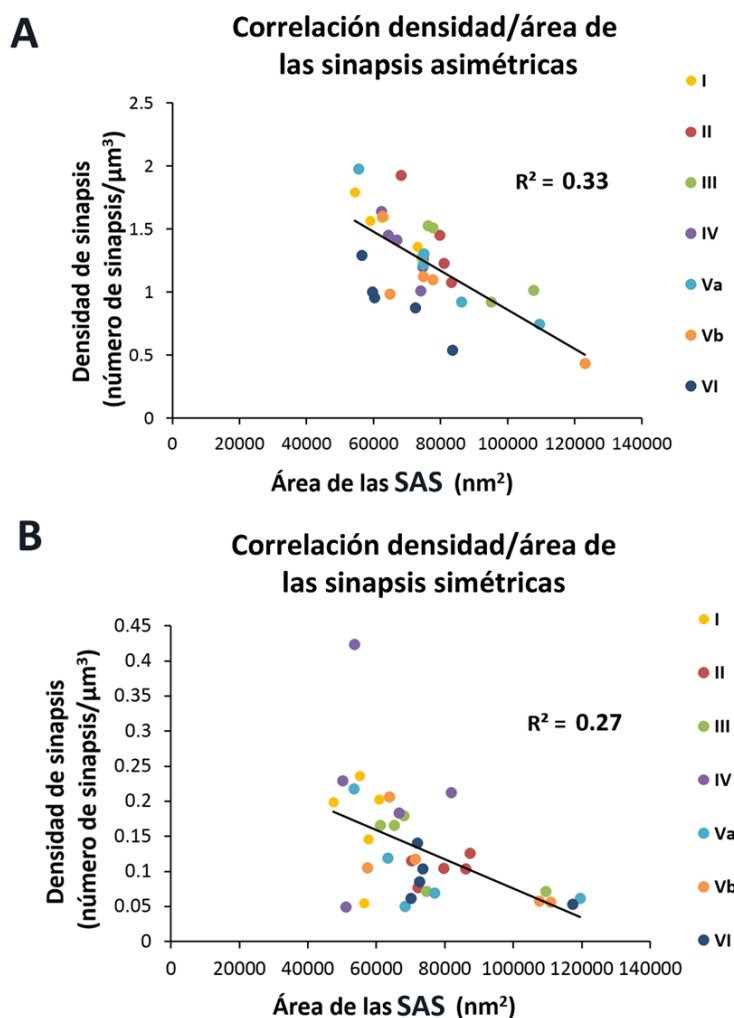


Figura 44. Correlación negativa de la densidad de sinapsis y el área de las sinapsis, desglosada entre SA y SS. Se representa el valor de cada muestra por un punto coloreado según la capa cortical a la que pertenece dicha muestra. A. Correlación de tamaño y densidad de SA ($R^2 = 0.33$, R de Spearman = -0.576 , $p < 0.0001$). C. Correlación de tamaño y densidad de SS ($R^2 = 0.27$, R de Spearman = 0.52 , $p < 0.0001$).

22.2 Tamaño de las sinapsis en función de su diana postsináptica

Para este análisis se ha contado con 10314 sinapsis, procedentes de tres pilas de imágenes por capa. Dichas sinapsis pudieron visualizarse y segmentarse completas en nuestras muestras, y se pudo identificar el elemento postsináptico en el que se establecían. Los elementos postsinápticos identificados han sido el tallo dendrítico o las espinas dendríticas, pudiendo establecerse las sinapsis en las cabezas o en los cuellos de dichas espinas. Las sinapsis en los tallos dendríticos fueron de media más grandes ($76764 \text{ nm}^2 \pm 1007$) que aquellas que se establecieron en las espinas dendríticas, ya fuera en la cabeza ($67866 \text{ nm}^2 \pm 645$) o en el cuello ($44921 \text{ nm}^2 \pm 1786$). Dichas diferencias fueron estadísticamente significativas (KW, $p < 0.0001$).

Dentro de las SA, las más grandes, en promedio, fueron aquellas que se encuentran en los tallos dendríticos ($77104 \text{ nm}^2 \pm 1211$), seguidas por aquellas que están en la cabeza de las espinas ($64408 \text{ nm}^2 \pm 660.1$) y en los cuellos de las espinas ($41295 \text{ nm}^2 \pm 2204$). Las diferencias encontradas también fueron estadísticamente significativas entre estos tres grupos (KW, $p < 0.0001$). Cuando analizamos las SS, las sinapsis en los tallos vuelven a ser, de media, las más grandes ($76245 \text{ nm}^2 \pm 1748$), seguidas por las SS en el cuello de las espinas ($50503 \text{ nm}^2 \pm 2952$) y por las que recaen en la cabeza de las espinas ($49688 \text{ nm}^2 \pm 2194$). En el caso de las SS, las diferencias de tamaño entre las que se establecen en el tallo dendrítico y las espinas fueron estadísticamente significativas (KW, $p < 0.0001$), mientras que las diferencias entre el cuello y la cabeza de las espinas no fueron estadísticamente significativas (KW, $p > 0.9999$) (Figura 45) (Tabla 15).

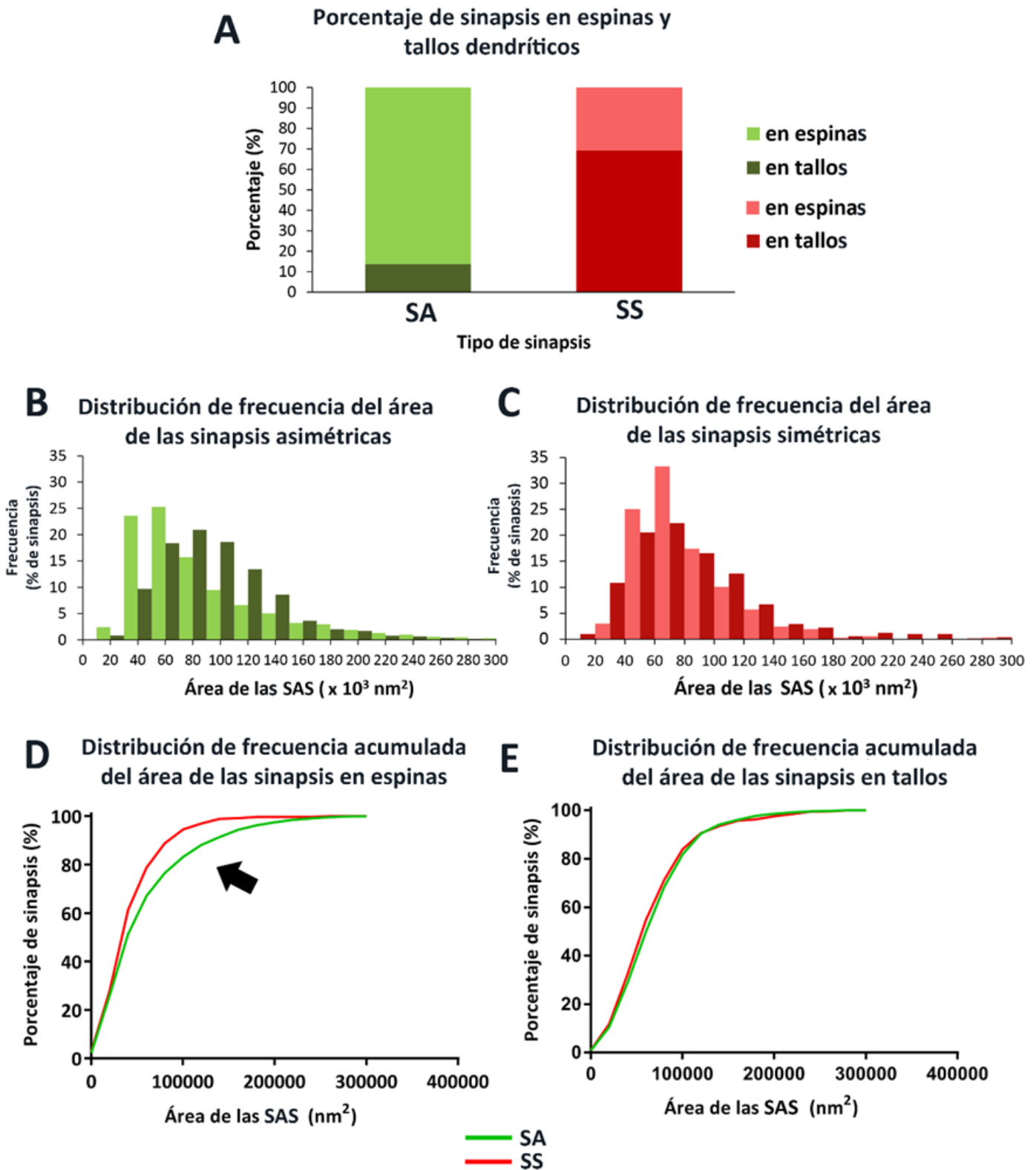


Figura 45. Localización de las sinapsis y su tamaño. A. Proporción de SA y SS en espinas y tallos dendríticos. B. Distribución de frecuencia de las áreas de las superficies de aposición sináptica (SAS) de las SA que se establecen en espinas dendríticas (verde claro) y en tallos dendríticos (verde oscuro). C. Distribución de frecuencia de las áreas de las SAS de las SS en espinas (rojo claro) y en tallos dendríticos (rojo oscuro). D. Distribución de frecuencia acumulada del tamaño de las SAS de las SA (verde) y SS (rojo) establecidas en espinas dendríticas. Se han encontrado diferencias (flecha) estadísticamente significativas en el tamaño de dichas sinapsis (KS, $p < 0.0001$). E. Distribución de frecuencia acumulada del tamaño de las SAS de las SA (verde) y SS (rojo) establecidas en tallos dendríticos. No se observan diferencias en la distribución de frecuencia de dichas sinapsis, quedando la prueba utilizada en el límite de la significación estadística (KS, $p = 0.045$).

		I	II	III	IV	Va	Vb	VI	Medias
Área sinapsis excitadoras (nm ² ± SEM)	Cabeza	61438 ± 1581 (1321)	73734 ± 1827 (1232)	78387 ± 1960 (1114)	67232 ± 1538 (852)	70703 ± 1710 (1185)	69518 ± 1902 (945)	57455 ± 1409 (1026)	68408 ± 660.1 Suma (7675)
	Cuello	36304 ± 5701 (34)	46333 ± 7297 (25)	63319 ± 8875 (21)	50238 ± 8020 (11)	31791 ± 3117 (39)	44719 ± 4606 (41)	30262 ± 3947 (26)	41295 ± 2204 Suma (197)
	Tallo	69473 ± 3020 (182)	76401 ± 3266 (149)	74207 ± 4612 (108)	86857 ± 3941 (120)	76837 ± 2653 (266)	82707 ± 2765 (281)	71437 ± 2810 (153)	77104 ± 1211 Suma (1259)
	No identificada	60550 ± 3394 (291)	72287 ± 3574 (288)	88531 ± 5148 (243)	73256 ± 4177 (153)	62775 ± 4410 (181)	81146 ± 5248 (133)	58089 ± 3213 (192)	70539 ± 1606 Suma (1481)
Global	61629 ± 1307 (1828)	73318 ± 1494 (1694)	79529 ± 1734 (1486)	69952 ± 1363 (1136)	69912 ± 1382 (1671)	72544 ± 1503 (1400)	58568 ± 1178 (1397)		
Área sinapsis inhibidoras (nm ² ± SEM)	Cabeza	43525 ± 3703 (47)	57773 ± 12179 (21)	54482 ± 7883 (21)	49648 ± 4029 (58)	42662 ± 5093 (26)	53673 ± 5406 (33)	52844 ± 7194 (23)	49688 ± 2194 Suma (229)
	Cuello	36688 ± 7780 (13)	42256 ± 8326 (4)	53774 ± 8104 (21)	46312 ± 5281 (38)	42856 ± 5877 (15)	56143 ± 8227 (16)	66100 ± 8591 (21)	50503 ± 2952 Suma (128)
	Tallo	64499 ± 3351 (158)	92324 ± 5765 (89)	78802 ± 4694 (107)	72890 ± 3575 (163)	71642 ± 4010 (111)	84145 ± 5893 (105)	80335 ± 6139 (93)	76245 ± 1748 Suma (826)
	No identificada	45204 ± 6618 (9)	80573 ± 19904 (6)	51049 ± 8599 (14)	67643 ± 11602 (9)	24867 ± 5315 (10)	50742 ± 9473 (9)	51335 ± 11822 (6)	51224 ± 4119 Suma (63)
Global	57799 ± 2592 (227)	84021 ± 5042 (120)	70058 ± 3594 (163)	63915 ± 2582 (268)	61438 ± 3171 (162)	73383 ± 4206 (163)	72606 ± 4449 (143)		
Área excitadoras + inhibidoras (nm ² ± SEM)	Cabeza	60822 ± 1535 (1368)	73466 ± 1808 (1253)	77945 ± 1932 (1135)	66112 ± 1469 (910)	70101 ± 1681 (1211)	68984 ± 1849 (978)	57354 ± 1387 (1049)	67866 ± 645 Suma (7904)
	Cuello	36410 ± 4608 (47)	45770 ± 6359 (29)	58547 ± 5982 (42)	47193 ± 4442 (49)	34864 ± 2834 (54)	47925 ± 4057 (57)	46275 ± 5092 (47)	44921 ± 1786 Suma (325)
	Tallo	67161 ± 2245 (340)	82356 ± 3006 (238)	76493 ± 3286 (215)	78812 ± 2679 (283)	75307 ± 2214 (377)	83098 ± 2569 (386)	74801 ± 2911 (246)	76764 ± 1007 Suma (2085)
	No identificada	60090 ± 3301 (300)	72457 ± 3521 (294)	86490 ± 4917 (257)	72944 ± 3992 (162)	60791 ± 4231 (191)	79219 ± 4986 (142)	57885 ± 3134 (198)	69751 ± 1552 Suma (1544)
Global	61206 ± 1197 (2055)	74026 ± 1436 (1814)	78593 ± 1603 (1649)	68800 ± 1209 (1404)	69163 ± 1291 (1833)	72631 ± 1416 (1563)	59871 ± 1150 (1540)		

Tabla 15. Tamaño promedio de las SA y SS de las distintas capas corticales (I a VI) clasificadas según su diana postsináptica. El tamaño se indica como la superficie de aposición sináptica (SAS), expresada en nm² ± error estándar de la media. El elemento postsináptico puede ser la cabeza de una espina dendrítica, el cuello de una espina dendrítica o un tallo dendrítico. Las sinapsis que aparecen como no identificadas son aquellas cuya diana postsináptica no ha podido clasificarse con claridad, normalmente espinas dendríticas que quedan cortadas antes de llegar a su tallo dendrítico de origen. La casilla "Global" incluye todas las sinapsis de cada capa (SA, SS, o ambas), independientemente de su diana postsináptica.

22.3 Análisis de la forma de las uniones sinápticas

La forma de las uniones sinápticas puede analizarse a través del estudio de las superficies de aposición sináptica (SAS). Como se ha descrito en Materiales y Métodos, la SAS representa la superficie entre la densidad presináptica y la densidad postsináptica, y mantiene la forma y la curvatura de ambas. El análisis que se realiza a continuación se llevó a cabo sobre una muestra de 7294 sinapsis, segmentadas en dos pilas de imágenes por cada capa cortical (6398 SA, 896 SS). Las SAS pueden presentar formas diversas, como muestra en la Figura 46. Dichas formas pueden ser clasificadas en cuatro grupos. En primer lugar, tendríamos las más sencillas, que son las maculares, con forma discoidal más o menos irregular. En segundo lugar, están las que tienen forma de herradura, con una gran muesca. En tercer lugar, las perforadas, que presentan uno o varios orificios en su interior. Finalmente, encontramos las sinapsis fragmentadas, en las que la densidad postsináptica se encuentra dividida en dos o más fragmentos discontinuos (Figura 46). Debe resaltarse aquí que el análisis de la forma de las sinapsis se ha realizado en tres dimensiones, por lo que no cabe confusión entre sinapsis perforadas, en forma de herradura o fragmentadas, que podrían tener un aspecto similar en secciones individuales, pero que son completamente distintas una vez que se han segmentado tridimensionalmente y se estudian de manera completa.

La mayoría de las SA mostraron una forma macular (82.13%), seguidas de las perforadas (13.33%) y en herradura (3.73%), siendo minoritarias las fragmentadas (0.81%). En el caso de las SS la gran mayoría mostraron una forma macular (85.00%), seguidas de las en herradura (7.99%), perforadas (6.61%), siendo también minoritarias las fragmentadas (0.40%) (Tabla 16). No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre las sinapsis maculares y fragmentadas en los grupos de SA y SS. En cambio, sí se encontraron diferencias en los porcentajes de sinapsis perforadas y en herradura entre los grupos de SA y SS, ya que en estas últimas la forma perforada es me-

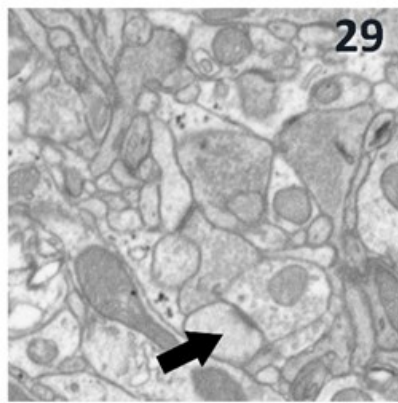
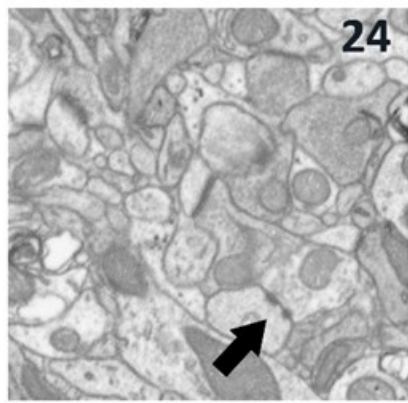
nos frecuente y la forma en herradura está más representada (χ^2 , $p < 0.0001$) (Tabla 17) (Figura 47 B y C).

Las sinapsis con diferentes formas se encuentran en diferentes proporciones en cada capa cortical. En la capa I se encuentran menos representadas las sinapsis en forma de herradura y fragmentadas. En cambio, en las capas II, III, IV y Va se encuentran más sinapsis en herradura y fragmentadas de las que cabría esperar por azar, mientras que en las capas Vb y VI se observa de nuevo una composición similar a la de la capa I (χ^2 , $p < 0.0001$) (Tabla 17) (Figura 47A).

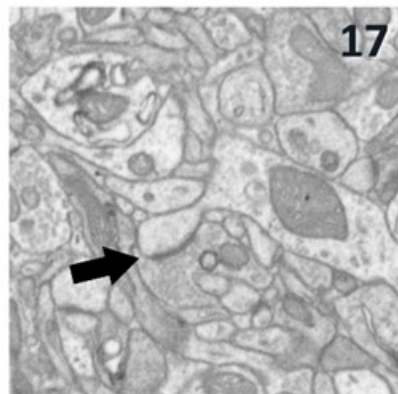
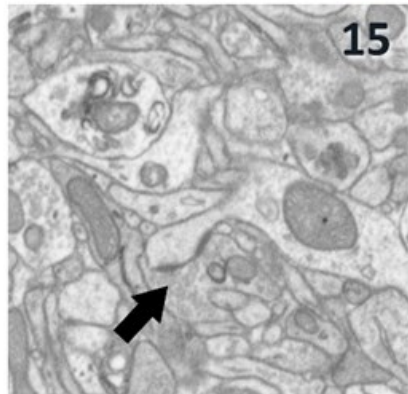
22.4 Relación entre la forma y el tamaño de las sinapsis

El área de las SAS también varía en función de la forma de la sinapsis. Las sinapsis maculares son las que tienen menor área (media \pm error estándar de la media; SA $51873.15 \text{ nm}^2 \pm 447.12$, SS $56691.19 \text{ nm}^2 \pm 1231.78$), seguidas por las sinapsis en herradura (SA $128986.40 \text{ nm}^2 \pm 3696.73$, SS $92203.91 \text{ nm}^2 \pm 5586.90$). Las siguientes con mayor área son las sinapsis perforadas (SA $147285.02 \text{ nm}^2 \pm 2213.06$, SS $122464.40 \text{ nm}^2 \pm 9950.61$) y, por último, las sinapsis más grandes son las sinapsis fragmentadas, si sumamos los diferentes fragmentos (SA $153076.41 \text{ nm}^2 \pm 10508.46$, SS $162993.17 \text{ nm}^2 \pm 74851.61$) (Tabla 18) (Figura 48).

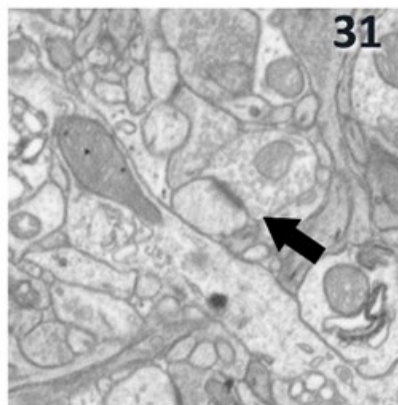
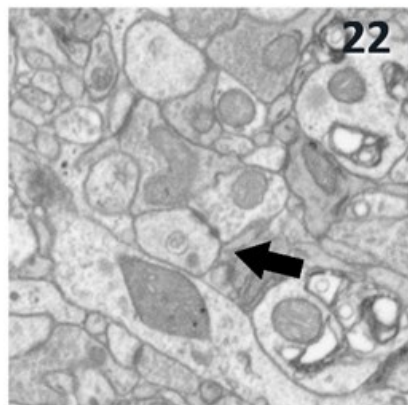
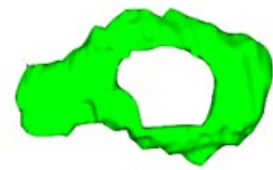
Aplicando análisis estadístico, las sinapsis maculares son más pequeñas en comparación con las demás sinapsis de forma estadísticamente significativa tanto en SA como SS (excepto en la comparación entre SS maculares y fragmentadas) (KW, corrección de Dunns; $p < 0.0001$). Si analizamos dichas diferencias entre las capas corticales, las SA maculares son más pequeñas que el resto de SA en todas las capas (KW, corrección de Dunns; $p < 0.0001$). En cambio, en las SS se observan diferencias entre sinapsis de diferentes formas en cada capa, pero en dichos análisis el número de sinapsis fue mucho menor que en el grupo de SA, por lo que los datos son menos representativos.



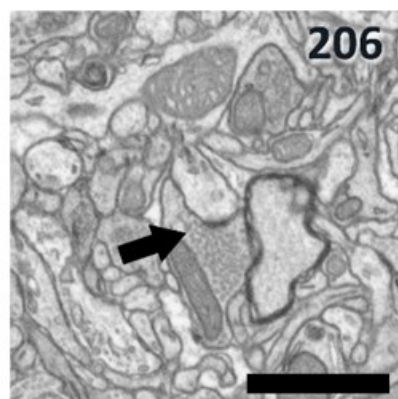
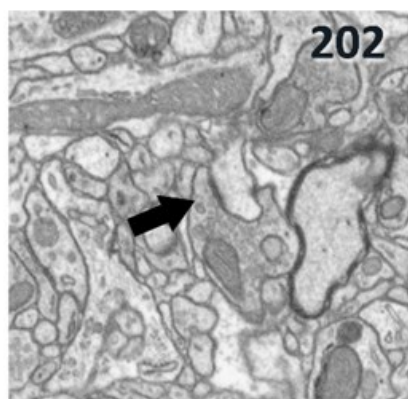
Sinapsis macular



Sinapsis perforada



Sinapsis en herradura



Sinapsis fragmentada

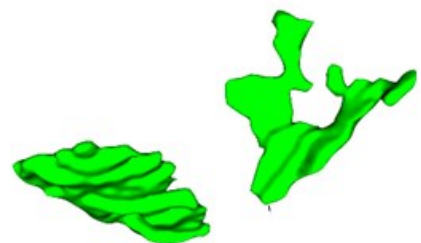


Figura 46. Diferentes morfologías sinápticas. En la figura se muestran dos imágenes de microscopía electrónica FIB-SEM por cada tipo sináptico (sinapsis macular, perforada, en herradura y fragmentada). En las imágenes se señalan los diferentes tipos sinápticos encontrados en nuestras muestras (flechas), y su reconstrucción tridimensional se muestra a la derecha (verde).

Capa	Tipo sináptico		Maculares	Perforadas	Herradura	Fragmentadas
I	SA	Medias (%)	83.92	13.24	2.48	0.36
		Nº	893	136	27	4
	SS	Medias (%)	94.20	1.74	4.06	0
		Nº	162	3	7	0
II	SA	Medias (%)	81.71	13.82	3.33	1.14
		Nº	719	109	34	10
	SS	Medias (%)	82.03	5.99	11.98	0
		Nº	51	4	8	0
III	SA	Medias (%)	81.62	13.16	4.44	0.78
		Nº	818	134	44	8
	SS	Medias (%)	85.42	8.41	6.17	0
		Nº	107	11	8	0
IV	SA	Medias (%)	78.63	13.62	6.24	1.51
		Nº	506	87	43	13
	SS	Medias (%)	81.77	4.56	13.33	0.34
		Nº	154	7	20	1
Va	SA	Medias (%)	79.80	15.86	4.74	0.60
		Nº	880	176	53	7
	SS	Medias (%)	80.86	6.18	11.32	1.64
		Nº	99	8	14	2
Vb	SA	Medias (%)	83.96	12.73	2.60	0.71
		Nº	711	108	22	6
	SS	Medias (%)	84.58	10.83	4.58	0
		Nº	110	12	6	0
VI	SA	Medias (%)	86.30	10.85	2.27	0.58
		Nº	737	88	20	5
	SS	Medias (%)	86.15	8.56	4.48	0.82
		Nº	89	8	4	1
I-VI	SA	%	82.13	13.33	3.73	0.81
	SS	%	85.00	6.61	7.99	0.40

Tabla 16. Sinapsis clasificadas por su forma (macular, perforada, herradura, fragmentada) y su naturaleza (SA o excitadora y SS o inhibitoria), en las diferentes capas corticales. Se muestran los porcentajes obtenidos del promedio de las muestras de cada capa y el número absoluto de sinapsis.

	Datos obtenidos (Datos esperados)		Total
	Sinapsis perforadas	Sinapsis en herradura	
SA	838 (801.97)	243 (279.03)	1081
SS	53 (89.03)	67 (30.97)	120
Total	891	310	1201

Tabla 17. Tabla de contingencia de las SA y SS con forma perforada y en herradura. Se muestran los valores observados experimentalmente y los valores esperados en una distribución aleatoria entre paréntesis. La distribución observada de sinapsis no se ha producido de forma aleatoria (χ^2 , $p < 0.0001$). En las SS es especialmente apreciable el menor número de sinapsis perforadas en favor de una mayor representación de sinapsis en herradura.

Aunque las diferencias en el tamaño promedio son amplias y estadísticamente significativas entre las sinapsis maculares y el resto de sinapsis más complejas (KS, $p < 0.0001$) (Figura 47F y G), existe solapamiento del tamaño de las cuatro formas sinápticas (Figura 47D y E).

En la categoría de sinapsis maculares y fragmentadas, las SS fueron más grandes que las SA, siendo esta diferencia estadísticamente significativa en el caso de las sinapsis maculares (MW; $p < 0.0001$). En las categorías de sinapsis perforadas y en herradura, las SA son más grandes que las SS, siendo las diferencias entre ellas estadísticamente significativas (MW; $p < 0.05$) (Tabla 18).

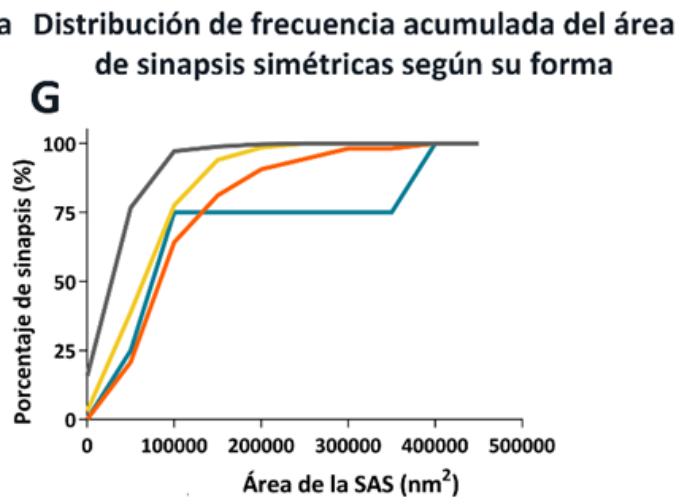
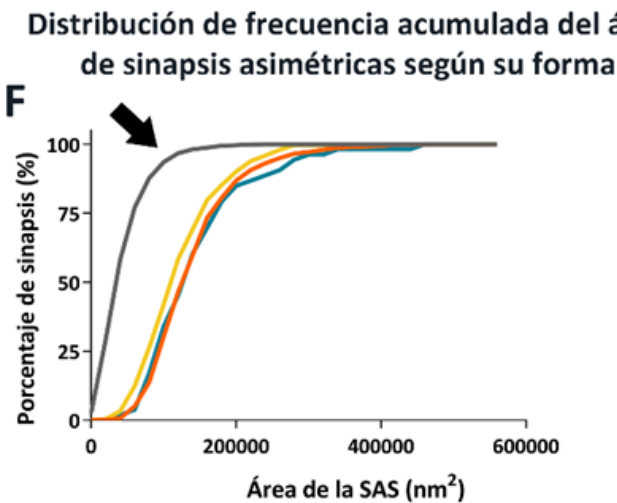
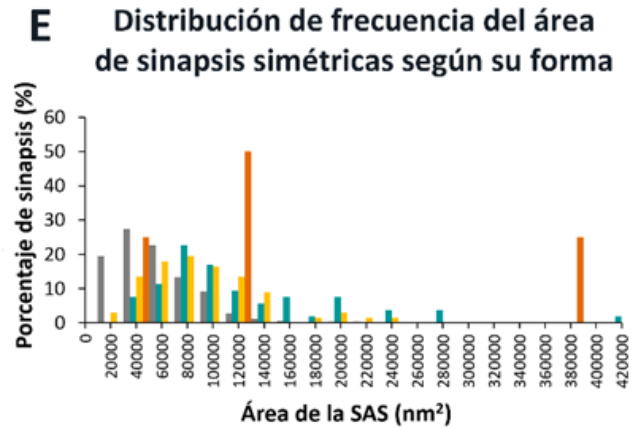
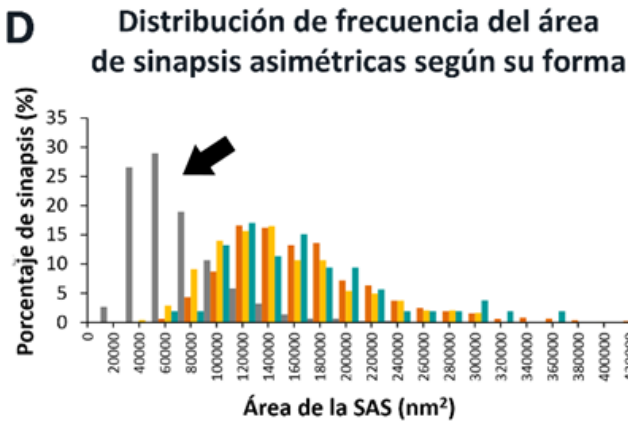
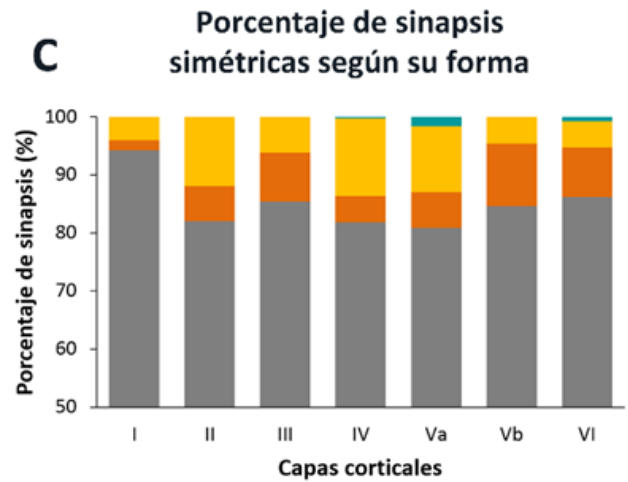
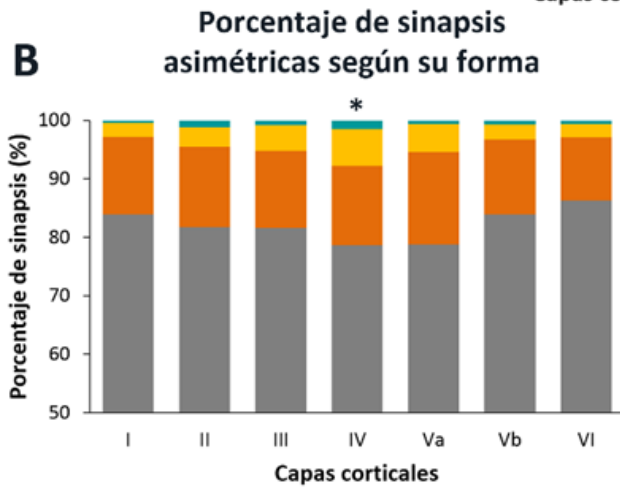
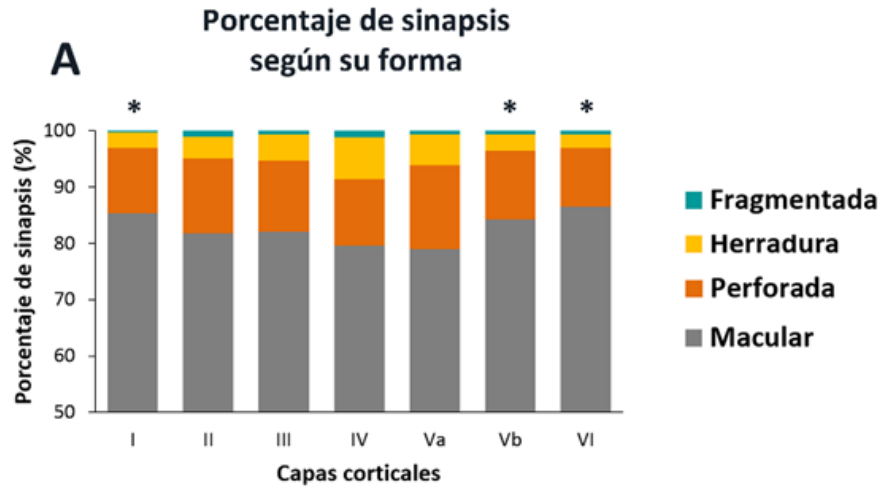


Figura 47. Porcentajes y tamaños de las sinapsis según su forma (macular, perforada, en herradura o fragmentada). A. Porcentaje de sinapsis según su forma en las distintas capas corticales, del total de sinapsis (SA y SS). Los asteriscos indican que en las capas I, Vb y VI se encuentran menos representadas las sinapsis en forma de herradura y fragmentadas que en el resto de las capas (χ^2 , $p < 0.0001$). B. Porcentaje de sinapsis según su forma en las SA. El asterisco indica que se encontraron más sinapsis en herradura en la capa IV que en las capas I, Vb y VI (χ^2 , $p < 0.0001$). C. Porcentaje de sinapsis según su forma en las SS, donde las diferencias entre capas no son estadísticamente significativas. D. Distribución de frecuencia del tamaño de las SA. La flecha señala la distribución de las sinapsis maculares (gris), las cuales se sitúan en su gran mayoría a la izquierda de la distribución, donde las áreas son más pequeñas. E. Distribución de frecuencia del tamaño de las SS. La distribución es mucho más irregular debido al escaso número de sinapsis en la muestra. F. Distribución de frecuencia acumulada del tamaño de SA. Las sinapsis maculares (flecha) son más pequeñas que las sinapsis más complejas (en herradura, perforadas y fragmentadas) (KS, $p < 0.0001$). G. Distribución de frecuencia acumulada del tamaño de las SS. Las SS maculares son más pequeñas que las sinapsis más complejas (KS, $p < 0.0001$ con respecto a las SS en herradura y perforadas; KS, $p < 0.05$ con respecto a las SS fragmentadas), aunque el análisis es menos robusto debido al menor tamaño de la muestra.

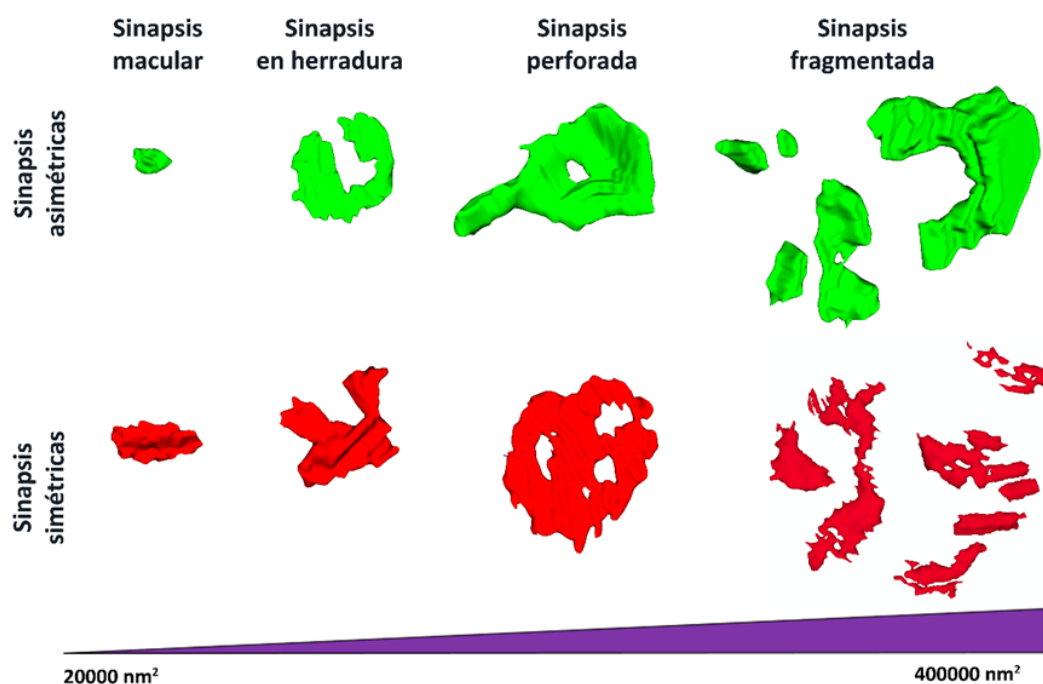


Figura 48. Ejemplos de SA (verde) y SS (rojo) con áreas de diferentes tamaños. Se muestra una sinapsis de cada categoría morfológica de tamaño creciente: macular, en herradura, perforada y fragmentada.

Forma de la unión sináptica	Tipo de sinapsis	Área (nm ²) media ± error estándar	Perímetro (nm) media ± error estándar
Macular	SA	51873.15 ± 447.12	1073.57 ± 6.31
	SS	56691.19 ± 1231.78	1320.06 ± 20.24
	SA + SS	52423.78 ± 420.68	1105.09 ± 6.18
Perforada	SA	147285.02 ± 2213.06	2309.07 ± 32.77
	SS	122464.40 ± 9950.61	2373.44 ± 159.75
	SA + SS	145808.59 ± 2171.37	2312.90 ± 32.23
En herradura	SA	128986.40 ± 3696.73	2772.43 ± 69.86
	SS	92203.91 ± 5586.90	2253.42 ± 112.25
	SA + SS	121036.64 ± 3251.50	2660.26 ± 61.04
Fragmentada	SA	153076.41 ± 10508.46	3632.21 ± 200.98
	SS	162993.17 ± 74851.61	4830.56 ± 2319.11
	SA + SS	153772.33 ± 10794.53	3717.81 ± 239.72

Tabla 18. Área y perímetro de las superficies de aposición sináptica (SAS) de las sinapsis maculares, perforadas, en herradura y fragmentadas. Se muestran las medidas correspondientes a las SA, SS y ambas en conjunto. Los datos se expresan como media ± error estándar de la media.

El perímetro de las SAS va acorde a su superficie, de forma que las sinapsis maculares tienen menor perímetro y éste va aumentando en las perforadas, en las que tienen forma de herradura y en las fragmentadas, en este orden (Tabla 18). También en este caso, es el perímetro de las sinapsis maculares (las más pequeñas) el que difiere significativamente del perímetro del resto de sinapsis, tanto en las excitadoras como en las inhibitorias (KW, corrección de Dunns; $p < 0.0001$) (Tabla 18).

22.5 Relación entre las diferentes formas de sinapsis y su localización

A continuación, hemos analizado si las diferentes formas sinápticas se encontraban asociadas preferentemente con alguna de las diferentes dianas postsinápticas (tallos dendríticos o espinas dendríticas). En las SA hemos observado que las sinapsis maculares tienen preferencia por los tallos dendríticos, mientras que las sinapsis perforadas y en herradura se asocian más con las espinas (χ^2 , $p < 0.0001$) (Tabla 19). Con respecto a las SS, ocurría lo contrario, ya que las maculares mostraron preferencia por las espinas dendríticas y las perforadas y en herradura por los tallos, aunque en el caso de las SS estas preferencias no resultaron estadísticamente significativas (χ^2 , $p = 0.0045$; Test exacto de Fisher, $p > 0.01$) (Tabla 19).

En las SA, aquellas que tenían formas más complejas (en herradura, perforadas y fragmentadas) y se establecían en las espinas dendríticas, tenían un área mayor que aquellas que se establecían en el tallo dendrítico, aunque las diferencias no fueron estadísticamente significativas. En cambio, se observó el efecto contrario en las sinapsis maculares, que eran más grandes de forma estadísticamente significativa en el tallo que en las espinas dendríticas (MW, $p < 0.0001$) (Tabla 19).

En las SS, las que tenían formas más complejas y se localizaban en las espinas dendríticas tenían menor área respecto a aquellas de los tallos dendríticos, aunque las diferencias no fueron estadísticamente significativas. La misma tendencia fue observada en las sinapsis maculares, que fueron más pequeñas en las espinas dendríticas que en

los tallos dendríticos, esta vez de forma estadísticamente significativa (MW, $p < 0.0001$) (Tabla 19).

SA	Datos obtenidos (Datos esperados)		Total
	Sinapsis en tallo	Sinapsis en espina	
Sinapsis maculares	789 (732.53)	4475 (4531.47)	5264
Sinapsis perforadas	60 (116.47)	777 (720.53)	837
Total	849	5252	6101

SS	Datos obtenidos (Datos esperados)		Total
	Sinapsis en tallo	Sinapsis en espina	
Sinapsis maculares	789 (769.48)	4475 (4494.52)	5264
Sinapsis herradura	16 (35.52)	227 (207.48)	243
Total	805	4702	5507

SA	Datos obtenidos (Datos esperados)		Total
	Sinapsis en tallo	Sinapsis en espina	
Sinapsis maculares	520 (528.5)	252 (243.5)	772
Sinapsis herradura	53 (44.5)	12 (20.5)	65
Total	573	264	837

SS	Datos obtenidos (Datos esperados)		Total
	Sinapsis en tallo	Sinapsis en espina	
Sinapsis maculares	520 (528.36)	252 (243.64)	772
Sinapsis perforadas	46 (37.64)	9 (17.36)	55
Total	566	261	827

Tabla 19. Tablas de contingencia en las que se muestra la distribución de las sinapsis que se localizan en los tallos y en las espinas dendríticas según su morfología (maculares, perforadas y en herradura). Se muestran los datos obtenidos experimentalmente, y seguidamente, entre paréntesis, los datos esperados si la distribución se hubiese producido al azar. Se observó que las SA maculares se encontraban más frecuentemente de lo esperado en los tallos dendríticos mientras que las SA perforadas y en herradura se localizaban más frecuentemente de lo esperado en las espinas dendríticas (χ^2 , $p < 0.0001$). Con respecto a las SS, ocurría lo contrario, ya que las maculares mostraron preferencia por las espinas dendríticas y las perforadas y en herradura por los tallos, aunque estas preferencias no resultaron estadísticamente significativas (χ^2 , $p = 0.0045$; Test exacto de Fisher, $p > 0.01$).

23. El aparato de espina y su relación con las sinapsis

Como hemos mencionado anteriormente, es posible identificar si el elemento postsináptico de una sinapsis determinada es una espina o un tallo dendrítico. Asimismo, una vez identificada una espina dendrítica, podemos navegar en tres dimensiones hasta visualizar la espina completa y así podemos determinar si tiene o no aparato de espina (Figura 31). De esta manera, hemos analizado la distribución de aparatos de espina en las distintas capas de la corteza. En promedio, de todas las sinapsis que se encuentran en espinas dendríticas en las diferentes capas corticales, el 29.73% se encuentran en espinas con aparatos de espina. No encontramos diferencias en el número de sinapsis asociadas a aparatos de espina en los diferentes animales estudiados (Test exacto de Fisher, $p > 0.05$). Las capas corticales con mayor porcentaje de sinapsis en espinas con aparato de espina son las capas II y III (37.16% y 37.63% respectivamente), mientras que la capa I es en la que menor porcentaje (21.33%) de sinapsis se establecen en espinas dendríticas con aparatos de espina. En algunas capas las sinapsis con aparato de espina están en mayor número de lo que correspondería si se distribuyeran de forma homogénea, como en la capa II respecto a las capas I, IV, Va y Vb o en la capa III respecto a las IV, Va y Vb. En otras capas hay menos sinapsis en espinas con aparato de espina de lo esperado, como en la capa I frente a las capas Va y VI (Test exacto de Fisher, $p < 0.0001$).

La gran mayoría (93.40%) de las sinapsis que se establecen sobre espinas con aparato de espina son SA, lo cual es esperable dado que las SS axoespinosas son escasas, como se ha comentado anteriormente. Si desglosamos el porcentaje de sinapsis en espinas con aparatos de espina entre las SA y SS, observamos que el 29.22% de las SA axoespinosas se establecen sobre espinas con aparato, mientras que el 42.95% de las SS axoespinosas se establecen sobre espinas con aparato (Figura 49 A y B) (Tabla 20). Esto parece indicar una mayor preferencia de las SS por las espinas con aparato en comparación con las SA.

Hemos realizado un test exacto de Fisher (Tabla 21), que confirma que esta preferencia es significativa y no es debida al azar ($p < 0.05$). No encontramos diferencias en las proporciones de SA y SS establecidas en espinas con aparato de espina en las diferentes capas corticales (Test exacto de Fisher, $p > 0.05$).

Capa	Tipo sinapsis		Con aparato de espina	Sin aparato de espina
I	SA	Medias (%)	20.52	79.48
		Nº	189	734
	SS	Medias (%)	39.90	60.10
		Nº	16	24
II	SA	Medias (%)	36.30	63.70
		Nº	280	494
	SS	Medias (%)	70.83	29.17
		Nº	12	6
III	SA	Medias (%)	37.43	62.57
		Nº	345	571
	SS	Medias (%)	42.81	57.19
		Nº	15	20
IV	SA	Medias (%)	26.05	73.95
		Nº	152	434
	SS	Medias (%)	26.15	73.85
		Nº	18	53
Va	SA	Medias (%)	27.47	72.53
		Nº	265	702
	SS	Medias (%)	35.79	64.21
		Nº	12	22
Vb	SA	Medias (%)	25.95	74.05
		Nº	166	466
	SS	Medias (%)	36.51	63.49
		Nº	15	26
VI	SA	Medias (%)	30.86	69.14
		Nº	224	506
	SS	Medias (%)	48.62	51.38
		Nº	18	16
I-VI	SA	%	29.22	70.78
	SS	%	42.95	57.05

Tabla 20. Porcentaje de sinapsis SA y SS en espinas con/sin aparato de espina por cada capa cortical. Se indican los porcentajes (%) obtenidos de la media de las muestras de cada capa cortical. Se proporciona también el número absoluto (Nº) de sinapsis por capa en cada categoría.

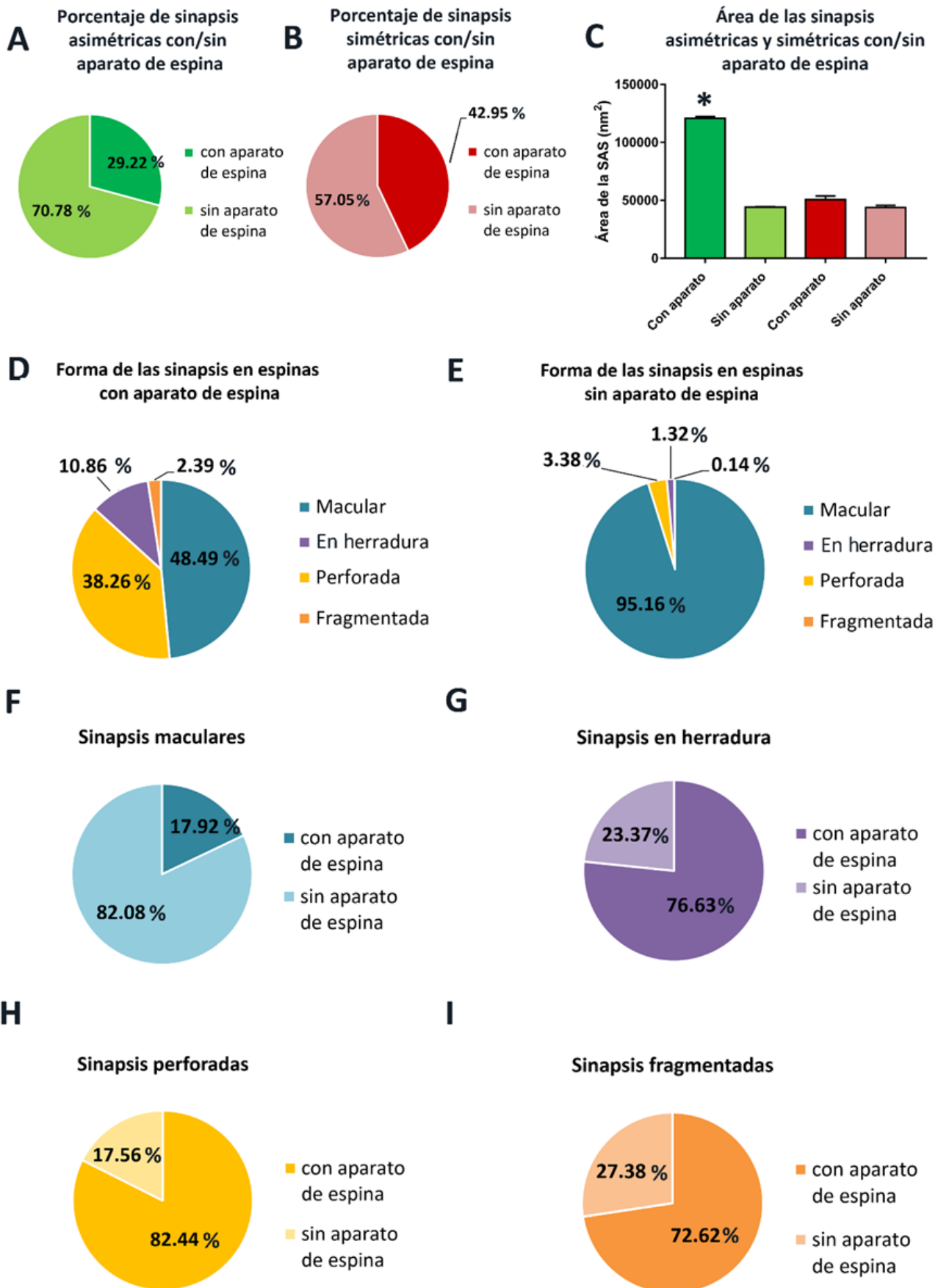


Figura 49. Porcentaje de sinapsis en espinas dendríticas con y sin aparato de espina. A y B muestran los porcentajes en SA y SS respectivamente. En C se muestran el tamaño de SA y SS en espinas con y sin aparato de espina. Las SA sobre espinas con aparato de espina son de mayor tamaño (más del doble) que el resto de sinapsis (KW, $p < 0.0001$). D y E. Porcentajes de sinapsis maculares, en herradura, perforadas, y fragmentadas en espinas con y sin aparato de espina, respectivamente. En F, G, H e I se desglosa cómo se reparten la sinapsis maculares, en herradura, perforadas y fragmentadas, respectivamente, entre las espinas con y sin aparato de espina.

	Datos obtenidos (Datos esperados)		Total
	Sobre espinas con aparato	Sobre espinas sin aparato	
SA	1621 (1645.73)	3907 (3882.27)	5528
SS	106 (81.27)	167 (191.73)	273
Total	1727	4074	5801

Tabla 21. Tabla de contingencia de las SA y SS que se establecen sobre espinas con y sin aparato de espina. Se muestran los datos obtenidos experimentalmente, y seguidamente, entre paréntesis, los datos esperados si la distribución fuese aleatoria. Las SS se encuentran en espinas con aparato de espina más frecuentemente que lo esperado por azar (Test exacto de Fisher, $p = 0.0011$).

Hemos estudiado también la relación entre el tamaño de las sinapsis axoespinosas y la ausencia o presencia de aparato de espina. Las sinapsis con mayor tamaño fueron las SA sobre espinas con aparato de espina ($120765.61 \text{ nm}^2 \pm 1590.14$), casi triplicando el tamaño de las SA establecidas en espinas sin aparato de espina ($44240.35 \text{ nm}^2 \pm 489.20$). Esta diferencia de tamaño es estadísticamente significativa (MW, $p < 0.0001$) y se repite en todas las capas corticales (MW, $p < 0.0001$). En el caso de las SS, aquellas establecidas sobre espinas con aparato de espina también tienen mayor área ($50703.70 \text{ nm}^2 \pm 3132.70$), pero las diferencias respecto a las SS sobre espinas que no tienen aparato de espina ($43787.84 \text{ nm}^2 \pm 1946.90$) no fueron estadísticamente significativas (MW, $p > 0.05$) (Figura 49C).

Las sinapsis que se encuentran de forma mayoritaria en las espinas con aparato de espina son las sinapsis cuya forma es más compleja (perforadas, en herradura y fragmentadas), mientras que las sinapsis más simples (maculares) se encuentran de forma predominante en espinas sin aparato de espina (Figura 49D y 49E). Hemos calculado el porcentaje de sinapsis según su forma (macular, perforada, en herradura y fragmentada) que se encuentra en espinas que contienen el aparato de espina. Las espinas con aparato reciben los cuatro tipos de sinapsis (Figura 49D), pero cada uno de los tipos de sinapsis presenta diferentes afinidades por las espinas con aparato o sin él. De

esta manera, solo el 17.92% de las sinapsis maculares se encuentran en espinas con aparato. El resto de sinapsis se asocian con la presencia de aparato de espina en porcentajes mucho más altos: el 72.62% del total de las fragmentadas, 76.63% de las que tienen forma de herradura y el 82.44% de las sinapsis perforadas (Figura 49 F – I). La baja asociación de sinapsis maculares a aparatos de espina es estadísticamente significativa respecto a la asociación encontrada en el resto de tipos sinápticos (Test exacto de Fisher, $p < 0.0001$). Si calculamos ahora los porcentajes de los diferentes tipos de sinapsis sobre espinas dendríticas sin aparato, encontramos que las sinapsis maculares predominan claramente (95.16%), repartiéndose el resto entre las sinapsis perforadas (3.38%), en herradura (1.32%) y fragmentadas (0.14%) (Figura 49E). La preferencia de las sinapsis maculares por las espinas dendríticas sin aparato de espina fue estadísticamente significativa (Test exacto de Fisher, $p < 0.0001$).

24. Análisis de la distribución espacial de las sinapsis

Las sinapsis fueron reconstruidas en 3D con el software Espina, que además nos proporcionó las coordenadas en el espacio (X, Y, Z) en las que se encuentra el centroide o centro de gravedad de cada una de ellas. Obtuvimos así una nube de puntos tridimensional que representa la posición espacial de las sinapsis en el tejido. Hemos analizado las SA y SS de manera separada, en 35 pilas de imágenes seriadas.

Para estudiar la distribución espacial de las sinapsis hemos usado herramientas de estadística espacial tridimensional, concretamente las funciones G, F y K. Para cada una de las funciones, se generó una envolvente a partir de 100 simulaciones de distribuciones aleatorias de puntos, con la misma densidad que la muestra a analizar. Si nuestra muestra fuera completamente aleatoria, las curvas correspondientes a las tres funciones se encontrarían dentro de las envolventes. Si alguna de las funciones se saliera de las envolventes, consideraríamos que la muestra no era aleatoria, pudiendo ser agrupada o regular.

En una distribución agrupada hay espacios relativamente vacíos (detectables por la función F), y/o los puntos se encuentran más cerca de sus vecinos de lo que cabría esperar por azar (detectable por la función G), y/o las densidades locales de puntos son mayores de lo que cabría esperar en una distribución aleatoria (detectable por la función K). En una distribución regular, por el contrario, los puntos tienden a separarse lo más posible unos de otros, por lo que la distancia al vecino más cercano tiende a ser más homogénea que lo esperable al azar (detectable especialmente por la función G). Ninguna de las tres funciones por sí sola es suficiente para evaluar una muestra, por lo que deben calcularse las tres en todos los casos.

Con respecto a las SA, solo 3 de las 35 muestras mostraban una distribución aleatoria en todas las funciones analizadas, el resto de las muestras (32) mostraban un patrón no aleatorio con tendencia al agrupamiento en una, dos o las tres funciones analizadas. Dicha tendencia al agrupamiento de las SA no es muy marcada, pero se ha observado de forma generalizada en las diferentes capas corticales (Figura 50).

Con respecto a las SS, 14 de las 35 muestras tenían menos de 30 SS, por lo que no pudo realizarse un análisis espacial fiable. De las 21 muestras restantes, en 3 de ellas se obtuvo un patrón completamente aleatorio, y en el resto de muestras (18) se mostraba un patrón espacial no aleatorio en el que alguna de las funciones analizadas indicaba una tendencia al patrón agrupado (Figura 50).

Resumiendo, podemos decir que las sinapsis en el neuropilo tienden a distribuirse de forma agrupada. Sin embargo, esta tendencia al agrupamiento no es muy marcada, ya que en ambas poblaciones de sinapsis (SA y SS) convive una minoría de muestras completamente aleatorias (Figura 50 columna izquierda) con una mayoría de muestras parcialmente agrupadas (Figura 50 columna media), y con otra minoría de muestras claramente agrupadas (Figura 50 columna derecha).

25. Análisis de las mitocondrias de la corteza somatosensorial

En este apartado estudiamos el volumen ocupado por las mitocondrias en el neuropilo de las diferentes capas corticales. Para calcularlo hemos hecho un estudio estereológico de las mitocondrias aplicando el principio de Cavalieri en 21 series de imágenes de todas las capas corticales. Se realizó un estudio piloto para optimizar el método de contaje cuyos resultados se presentan en el apartado “Materiales y Métodos”.

La fracción de volumen mitocondrial es del 8.25% de media en todas las capas corticales. No hemos encontrado diferencias estadísticamente significativas entre los animales estudiados. De las capas corticales, las capas con mayor fracción de volumen mitocondrial son la capa IV (9.30%) y la Vb (9.19%) mientras que las capas con menor fracción de volumen son la capa II (7.12%) y la capa VI (7.21%). Los coeficientes de error para estas medidas se mantuvieron por debajo del 10% en todas las capas (Tabla 22).

Capa	Nº Imágenes analizadas	Fracción de volumen mitocondrial (%)	Error estándar	CV	CE
I	19	8.34	0.72	8.69	5.02
II	16	7.12	0.57	8.00	4.62
III	17	8.44	1.40	16.55	9.55
IV	18	9.30	0.15	1.57	0.91
Va	19	8.12	0.19	2.33	1.35
Vb	20	9.19	0.68	7.36	4.25
VI	19	7.21	0.67	9.32	5.38
I-VI	128	8.25	0.62	7.69	4.44

Tabla 22. Fracción de volumen mitocondrial en todas las capas corticales. Se representan el número de imágenes analizadas por capa, la fracción de volumen mitocondrial estimada en cada capa, el error estándar de la media, el coeficiente de variación (CV) y el coeficiente de error (CE).

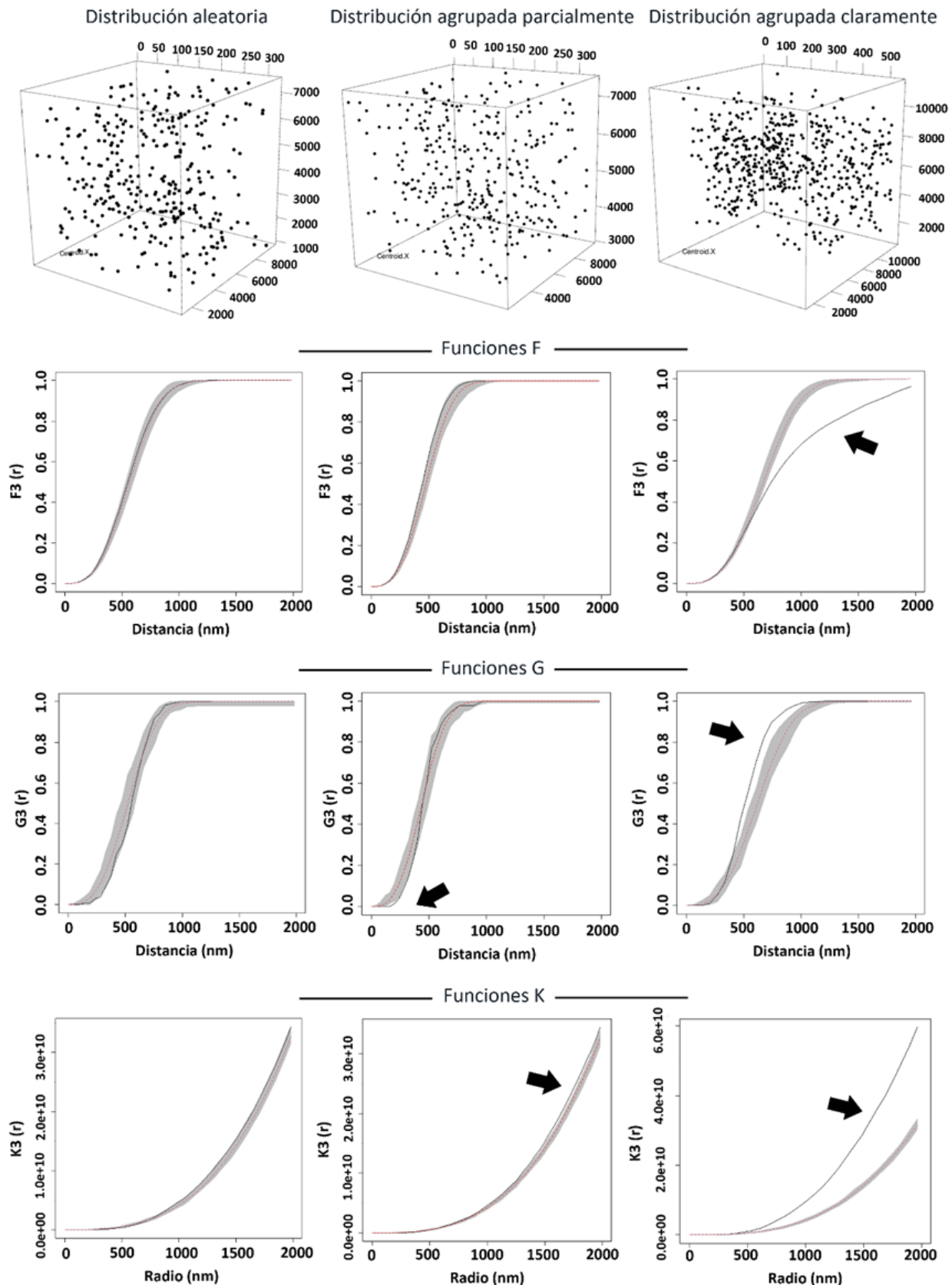
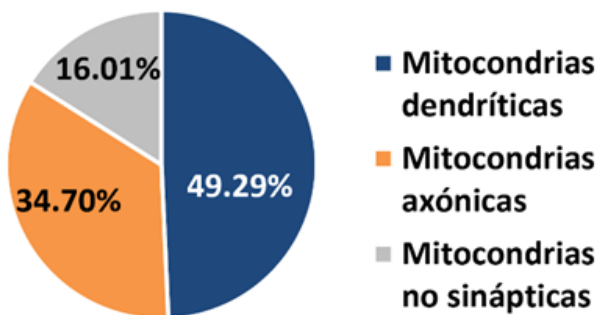


Figura 50. Ejemplos de análisis de la distribución espacial de sinapsis en tres nubes de puntos que representan las posiciones de las SA reconstruidas en tres pilas de imágenes. En la columna de la izquierda la distribución de puntos es aleatoria, dado que las tres funciones calculadas para la muestra experimental (línea negra) se encuentran dentro de la envolvente (gris) que ha sido generada por 100 réplicas aleatorias con el mismo número de puntos que la muestra experimental. En la columna central se ha representado una muestra de SA con una distribución espacial agrupada, dado que algunas de las funciones se salen de la envolvente (gris). En el caso de la función G, la curva se sale de la envolvente solo parcialmente (flecha), pero la tendencia al agrupamiento se revela más claramente por la función K. En la columna de la derecha la distribución espacial de los puntos representados es más claramente agrupada. En las tres funciones la curva experimental (línea negra) se sale (flecha) de la envolvente generada (gris).

De las mitocondrias observadas, se determinó el compartimento subcelular en el que se encontraban: dendritas, axones o elementos no sinápticos. En promedio, el 49.29% del volumen mitocondrial total era dendrítico, el 34.70% del volumen mitocondrial correspondía a mitocondrias que se encontraban en axones y el resto (16.01%) se encontraban en estructuras no sinápticas (Figura 51A). En todas las capas excepto en la capa IV, la fracción de volumen de mitocondrias que se encontraban en dendritas fue mayor que la fracción de volumen de mitocondrias que se localizaban en axones. En la capa IV, ambas fracciones de volumen fueron muy similares, ya que el 43.43% del volumen mitocondrial se localizaba en dendritas, mientras que el 43.97% correspondía a mitocondrias axónicas (Figura 52 A y B).

A Distribución de mitocondrias en diferentes compartimentos subcelulares



B Distribución de mitocondrias en diferentes tipos de axones

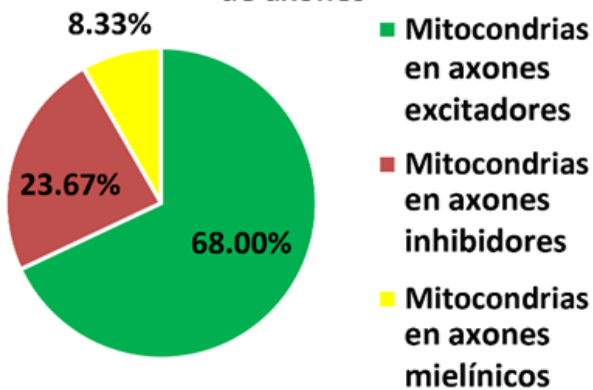


Figura 51. Distribución de las mitocondrias. A. Distribución del volumen mitocondrial en dendritas, axones y estructuras no sinápticas. B. Distribución del volumen mitocondrial en axones excitadores, inhibidores y mielínicos.

Una parte minoritaria de las mitocondrias se encuentra en elementos no sinápticos. La fracción de volumen de estas mitocondrias localizadas en prolongaciones no sinápticas va desde el 11.71% en la capa I hasta el 20.91% de la capa Vb, siendo el promedio del 16.01% (Figura 52 A y B).

El volumen ocupado por las mitocondrias también fue analizado teniendo en cuenta si las mitocondrias se encontraban en axones de naturaleza excitadora, inhibidora o mielínicos. Del total del volumen mitocondrial en axones, la mayoría se localizaba en axones excitadores (68.00%), seguido de los axones inhibidores (23.67%) y siendo minoritaria la fracción de volumen mitocondrial en axones mielínicos (8.33%) (Figura 51B). La diferencia en los porcentajes de volumen de mitocondrias en axones excitadores e inhibidores es más marcada en las capas I y II, donde solo un 16.86% y un 10.54% del volumen mitocondrial axónico corresponde al volumen de mitocondrias en axones inhibidores. Sin embargo, en las capas III y IV el porcentaje asciende hasta el 31.65% y el 33.11%, respectivamente. La fracción de volumen correspondiente a mitocondrias localizadas en axones mielínicos aumenta progresivamente desde las capas corticales más superficiales hasta las más profundas. Dicho porcentaje llega al máximo en la capa VI, donde hasta el 22.14% del volumen de las mitocondrias axónicas se localizaba en axones envueltos en mielina (Figura 52 C y D).

A continuación, exploramos la relación que puede haber entre la fracción de volumen mitocondrial y la densidad de sinapsis en cada serie de imágenes analizada. Al realizar las correlaciones en cada muestra, no observamos correlación entre la densidad de sinapsis y la fracción de volumen mitocondrial total ($R^2 = 0.01$), ni con la fracción de volumen mitocondrial en cualquiera de los compartimentos estudiados (dendritas $R^2 = 0.09$, axones $R^2 = 0.01$ y elementos no sinápticos $R^2 = 0.09$) (Figura 53).

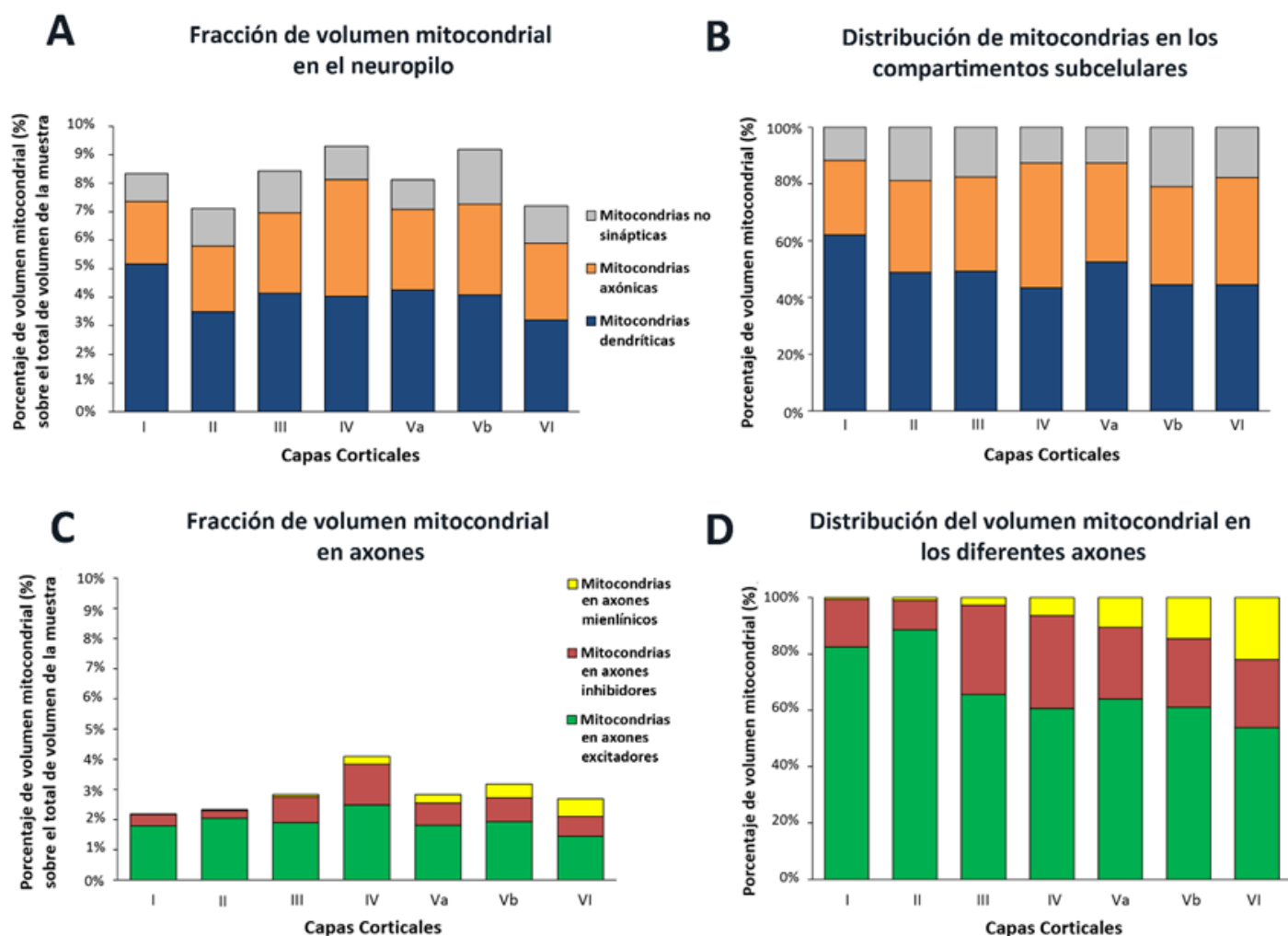


Figura 52. Porcentaje y distribución de mitocondrias en los diferentes compartimentos subcelulares. A. Fracción de volumen mitocondrial en el neuropilo, distribuido entre dendritas, axones y compartimentos no sinápticos. B. Del total del volumen mitocondrial, porcentaje localizado en dendritas, axones y compartimentos no sinápticos. C. Fracción de volumen mitocondrial en axones excitadores, inhibidores y mielínicos. D. Distribución del volumen mitocondrial axónico en axones excitadores, inhibidores y mielínicos.

Correlación de la densidad sináptica y la fracción de volumen mitocondrial

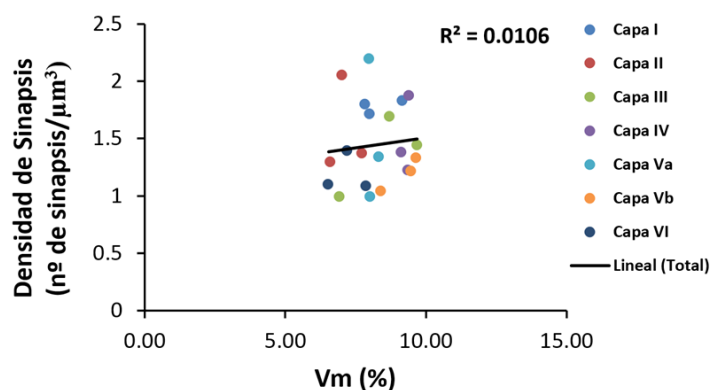


Figura 53. Gráfico de correlación entre la densidad de sinapsis y la fracción de volumen mitocondrial en cada muestra estudiada (21 puntos correspondientes a 21 pilas de imágenes). Se observa ausencia de correlación entre ambos parámetros. $R^2 = 0.0106$, R de Pearson = 0.104, $p = 0.65$.

26. Cuantificación de los cuerpos multivesiculares (CMVs)

Los CMVs fueron visualizados en secciones seriadas como orgánulos de membrana simple que contienen vesículas en su interior. Hemos identificado 3263 CMVs y reconstruido 1617 CMVs completos, en un volumen total de 16271.49 micras cúbicas. Los datos fueron obtenidos de 35 series de imágenes de las seis capas corticales. Hemos calculado la densidad de CMVs en el neuropilo y su distribución en axones, dendritas y elementos no sinápticos (Figura 54). En cuanto a su morfología, se cuantificó su tamaño y la presencia o no de protrusiones tubulares (Figura 54). También hemos estudiado las relaciones que los CMVs establecen con otros orgánulos como las mitocondrias y los aparatos de espina (Figura 54).

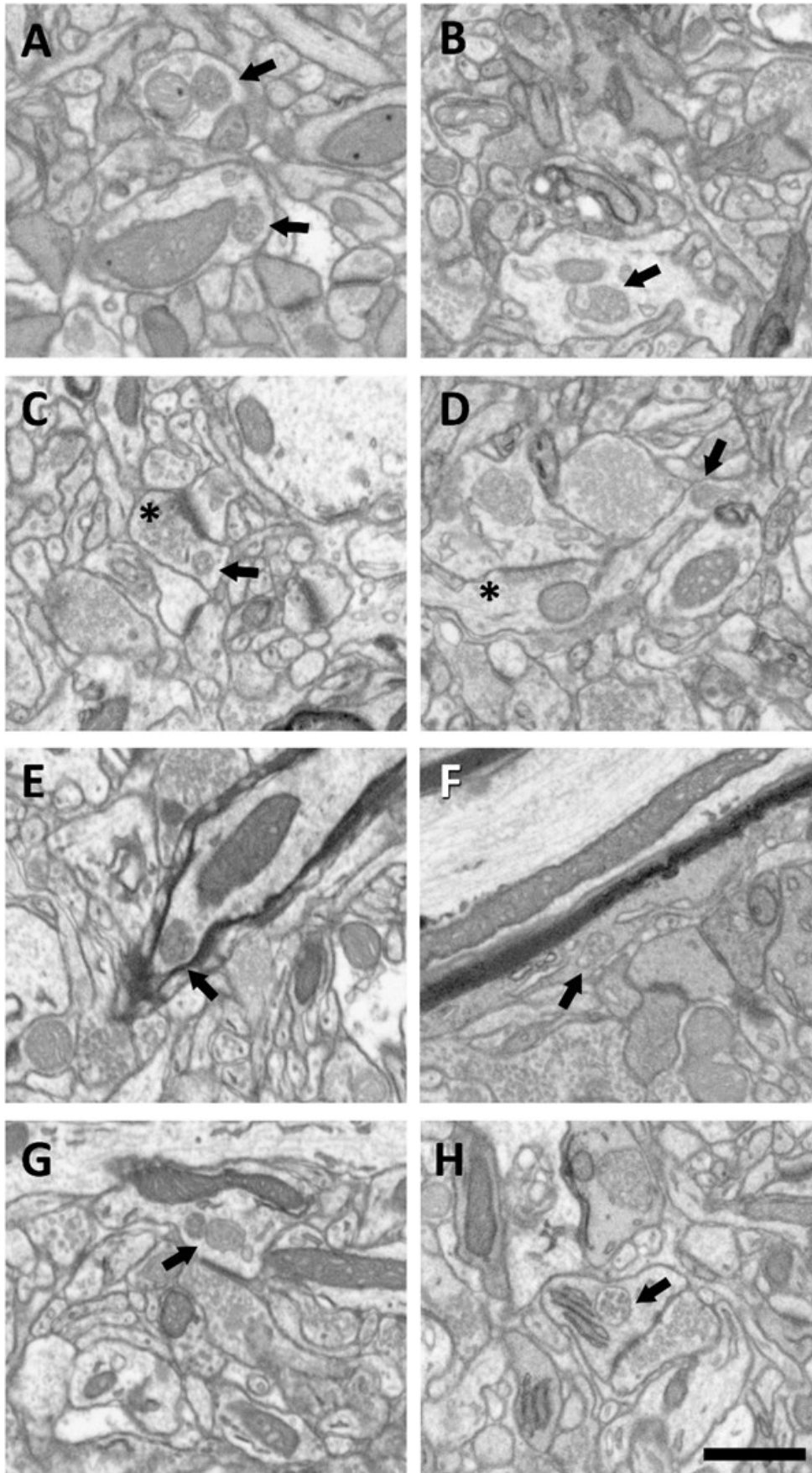


Figura 54. Diversidad en los CMVs. A. Dos CMVs asociados a mitocondrias (flechas). B. CMV con túbulo (flecha). C. CMV (flecha) en un axón excitador (asterisco). D. CMV (flecha) en un axón inhibitor (asterisco). E. CMV en un axón mielínico (flecha). F. CMV en un oligodendrocito (flecha). G. Un CMV asociado a otro CMV (flecha) en un tallo dendrítico. H. CMV (flecha) en contacto con el aparato de espina en una espina dendrítica donde se establece una sinapsis excitadora. Barra de escala: 740 nm.

26.1 Densidad de los CMVs en el neuropilo

La densidad media de los CMVs fue de 0.20 ± 0.01 (CMVs/ $\mu\text{m}^3 \pm$ error estándar de la media). La densidad máxima fue encontrada en la capa Va (0.26 ± 0.05) mientras que la densidad mínima se encontró en la capa II (0.16 ± 0.03). Aunque la densidad entre las capas varía, las diferencias no fueron estadísticamente significativas (KW, $p = 0.40$) (Figura 57A). Al comparar la densidad de los CMVs con la densidad de sinapsis en las mismas muestras encontramos una correlación moderada entre ambos elementos ($R^2 = 0.37$, R de Pearson = 0.609, $p < 0.0001$) (Figura 55). No hemos encontrado diferencias estadísticamente significativas en la densidad de CMVs en los diferentes animales estudiados (ANOVA, test de comparación múltiple de Tukey, $p > 0.05$).

Correlación de densidad de CMVs y densidad de sinapsis

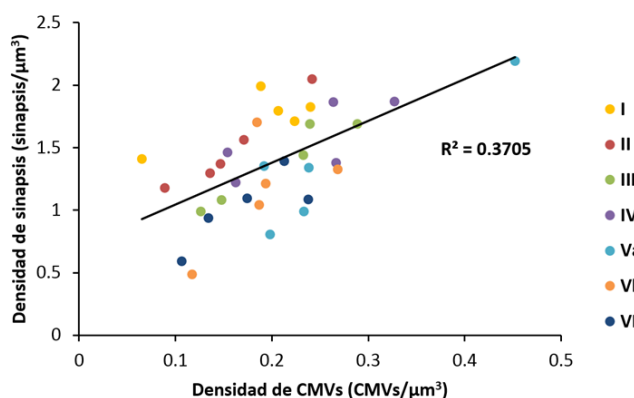


Figura 55. Correlación de densidad de CMVs y densidad de sinapsis en las muestras de todas las capas corticales. $R^2 = 0.37$, R de Pearson = 0.609, $p < 0.0001$.

26.2 Localización de CMVs en axones, dendritas y elementos celulares no sinápticos

Hemos analizado la localización de 1617 CMVs, que ha podido ser determinada gracias a la visualización y navegación tridimensional de las series de imágenes de microscopía electrónica (ver “Materiales y Métodos”). La mayoría de los CMVs (79.22%) se encontraban en procesos celulares en donde se establecían sinapsis, por lo que fueron clasificados como CMVs axónicos o dendríticos. En promedio, el porcentaje de CMVs localizados en axones (44.83%) fue superior al porcen-

taje de CMVs localizados en dendritas (34.40%). El resto de los CMVs (20.77%) se encontraban en prolongaciones celulares donde no se establecían conexiones sinápticas, por lo que fueron clasificados como no sinápticos. En una parte de los CMVs localizados en compartimentos no sinápticos pudo determinarse que se trataba de oligodendrocitos, dado que eran visibles las vainas de mielina a las que estaban asociados. Los CMVs no sinápticos localizados en oligodendrocitos fueron el 0.94% del total de CMVs (Tabla 23).

La mayoría de CMVs dendríticos (95.07%) se encuentran en segmentos que contienen al menos una espina dendrítica. De hecho, el 7.81% de los CMVs dendríticos (47 CMVs de los 529 CMVs totales en dendritas con espinas) se localizan en el interior de espinas dendríticas. En las espinas con CMVs las sinapsis fueron de mayor tamaño ($179817 \text{ nm}^2 \pm 12081$) que en las espinas sin CMVs ($65231 \text{ nm}^2 \pm 712.4$) (MW, $p < 0.0001$), también se encontraron sinapsis con formas complejas de forma más frecuente que en las espinas dendríticas sin CMVs (Test exacto de Fisher, $p < 0.0001$). No hay diferencias estadísticamente significativas en el número de CMVs en espinas dendríticas entre las diferentes capas corticales (χ^2 , $p > 0.05$). A su vez, de los CMVs que se encontraban en espinas dendríticas, algo menos de la mitad (44.68%) estaban en espinas con aparatos de espina. El resto de CMVs dendríticos (4.93%) se localizaron en segmentos que no contienen espinas en el volumen de tejido analizado (Figura 56) (Figura 57C).

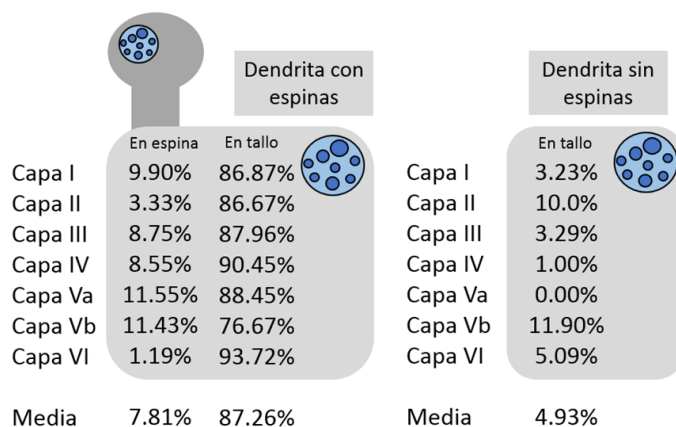


Figura 56. Localización de los CMVs en las dendritas con espinas y sin espinas, en las seis capas corticales. En las dendritas con espinas se han desglosado según su localización en el tallo o en espinas dendríticas.

Localización de los CMVs en diferentes compartimentos de las seis capas corticales
(Porcentaje de CMVs \pm error estándar)

Capa	Dendritas	Axones excitadores	Axones inhibidores	Axones mielínicos	Elementos No sinápticos (incluidos oligodendrocitos)	Oligodendrocitos*
I	29.10 \pm 0.80	44.59 \pm 3.08	8.46 \pm 1.92	0 \pm 0	17.85 \pm 1.96	0 \pm 0
II	33.50 \pm 1.59	39.58 \pm 3.41	4.32 \pm 0.07	0 \pm 0	22.60 \pm 5.06	0 \pm 0
III	34.55 \pm 1.45	40.78 \pm 0.78	5.31 \pm 1.54	0 \pm 0	19.36 \pm 1.76	0 \pm 0
IV	34.96 \pm 4.41	45.40 \pm 3.67	6.39 \pm 0.09	0 \pm 0	13.24 \pm 0.65	0 \pm 0
Va	32.85 \pm 3.03	38.60 \pm 4.25	4.39 \pm 0.58	0.38 \pm 0.38	23.78 \pm 1.34	0.69 \pm 0.07
Vb	39.60 \pm 3.88	29.95 \pm 1.69	6.32 \pm 0.20	1.75 \pm 0.30	22.39 \pm 1.29	2.26 \pm 0.81
VI	36.21 \pm 8.48	32.34 \pm 0.43	3.05 \pm 1.99	2.21 \pm 1.15	26.18 \pm 7.68	3.61 \pm 2.77
I-VI	34.40 \pm 1.21	38.75 \pm 2.19	5.46 \pm 0.67	0.62 \pm 0.36	20.77 \pm 1.32	0.94 \pm 0.55

Tabla 23. Porcentaje de CMVs localizados en dendritas, axones, elementos no sinápticos (incluyendo oligodendrocitos) y oligodendrocitos, en las seis capas del córtex, y la media de todas las capas (I-VI). Datos expresados como porcentaje \pm error estándar de la media. Los elementos no sinápticos son compartimentos celulares que no establecen sinapsis, es decir, todos los compartimentos no neuronales, incluidos los oligodendrocitos. * Los oligodendrocitos fueron los únicos elementos no sinápticos que pudieron identificarse como tales, gracias a su asociación a vainas de mielina. La distribución de CMVs en los distintos compartimentos fue similar en todas las capas. Los CMVs se distribuyen de forma mayoritaria en los axones, excepto en las capas más profundas (Vb y VI) (χ^2 , $p=0.0001$).

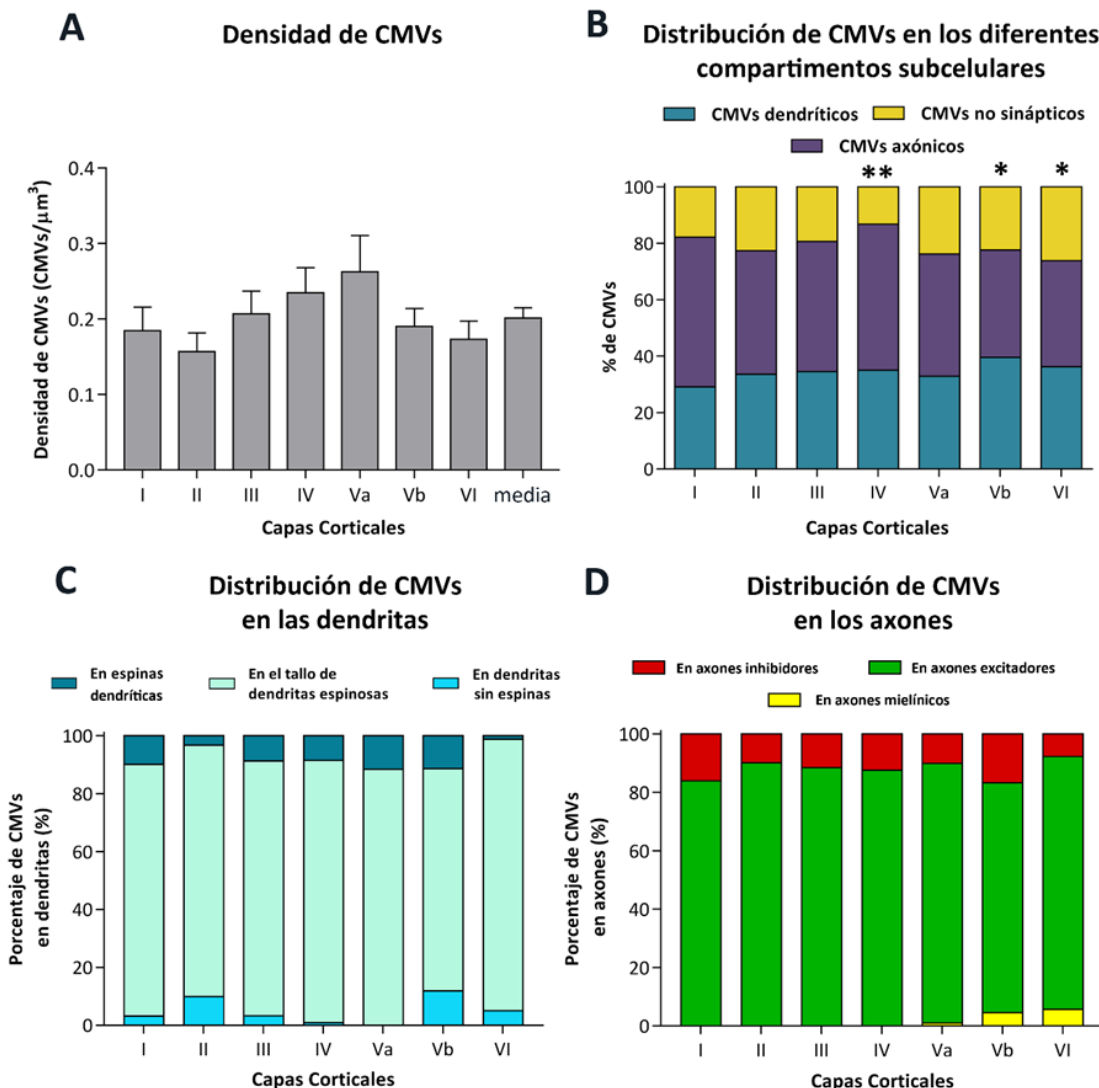


Figura 57. Densidad y distribución de los CMVs en el neuropilo. A. Densidad de CMVs en las diferentes capas corticales. B. Distribución de CMVs en dendritas, axones y compartimentos no sinápticos. Los asteriscos * indican que en las capas Vb y VI se encontraron menos CMVs en axones que en el resto de las capas corticales (χ^2 , $p=0.0001$). El doble asterisco ** indica que en la capa IV se observaron menos CMVs en compartimentos no sinápticos que en la capa VI de forma estadísticamente significativa (Test exacto de Fisher, $p=0.0003$). C. Distribución de CMVs en dendritas con espinas (desglosados en el tallo dendrítico y en las espinas dendríticas) y en dendritas sin espinas. D. Distribución de CMVs en axones excitadores, inhibidores y mielínicos.

26.3 Relación entre los CMVs y las mitocondrias

De los 1617 CMVs observados, el 16.63% mostraba contacto directo con una mitocondria. No se observaron diferencias estadísticamente significativas en el número de CMVs asociados a mitocondrias en los diferentes animales analizados (Test exacto de Fisher, $p > 0.05$). La localización de los CMVs que presentaban dicha asociación fue mayoritaria en las dendritas (49.72%) respecto a los axones (36.15%) y los elementos no sinápticos (14.13%) (Tabla 24) (Figura 58B). La capa cortical en la que fue más frecuente esta asociación fue la capa III en donde el 20.68% de los CMVs se encontraban asociados a mitocondrias, mientras que la capa VI fue en la que menor porcentaje de asociación se observó (11.68%) (Figura 58A). A pesar de estas variaciones, las diferencias en el porcentaje de CMVs asociados a mitocondrias entre las capas corticales no fueron estadísticamente significativas (χ^2 , $p = 0.15$).

En cuanto a los diferentes compartimentos estudiados, de los CMVs que se encontraban en las dendritas, el 25.46% estaba asociado a mitocondrias, descendiendo este porcentaje en los CMVs que se encontraban en axones (13.60%) y en prolongaciones no sinápticas (10.68%) (Figura 58 C - E). De hecho, estas diferencias fueron estadísticamente significativas (χ^2 , $p < 0.0001$). Debido a que la cantidad de mitocondrias varía a lo largo de las capas corticales, hemos examinado la correlación entre la densidad de CMVs aislados y asociados a mitocondrias y la fracción de volumen ocupada por mitocondrias en cada capa cortical. No hemos encontrado una correlación clara entre la fracción de volumen mitocondrial y el grado de asociación entre los CMVs y las mitocondrias ($R^2 = 0.08$ y $R^2 = 0.14$, respectivamente) (Figura 58F).

26.4 CMVs con extensiones tubulares

La mayoría de CMVs tiene una forma esferoidal irregular, pero en un pequeño porcentaje de ellos (6.76%) se pueden observar uno o varios túbulos (Figura 59A). No se observaron diferencias estadísticamente significativas en la cantidad de CMVs con extensiones tubulares entre los di-

Distribución de los CMVs asociados a mitocondrias en los diferentes compartimentos celulares (Porcentaje de CMVs asociados a mitocondrias \pm error estándar)			
Capa	Dendritas	Axones	Elementos no sinápticos
I	46.88 \pm 3.13	39.29 \pm 10.71	13.84 \pm 7.59
II	39.74 \pm 6.41	47.01 \pm 8.55	13.25 \pm 2.14
III	52.50 \pm 2.50	35.56 \pm 0.56	11.94 \pm 1.94
IV	56.58 \pm 6.58	38.52 \pm 6.94	4.90 \pm 0.36
Va	54.02 \pm 2.50	23.85 \pm 6.46	22.13 \pm 3.95
Vb	54.55 \pm 4.55	31.36 \pm 8.64	14.09 \pm 4.09
VI	43.75 \pm 10.42	37.50 \pm 4.17	18.75 \pm 14.58
I-VI	49.72 \pm 2.39	36.15 \pm 2.72	14.13 \pm 2.05

Tabla 24. Distribución de los CMVs asociados a mitocondrias en dendritas, axones y elementos no sinápticos en las seis capas de la corteza y la media de todas las capas (I -VI). Datos dados como porcentaje \pm error estándar de la media.

ferentes animales (Test exacto de Fisher, $p > 0.05$). Este tipo de CMV se encuentra mayoritariamente en dendritas (74.01%), siendo los compartimentos no sinápticos (17.39%) y los axones (8.60%) localizaciones mucho menos frecuentes para ellos (Figura 59B).

La capa cortical con mayor porcentaje de CMVs con extensiones tubulares es la capa II (10.14%) mientras que la que tiene menos CMVs tubulares es la capa Va (4.06%), aunque estas diferencias no fueron estadísticamente significativas (χ^2 , $p = 0.10$) (Figura 59A). De los CMVs que se encontraron en dendritas, el 13.74% presentaron túbulos, seguido del 7.37% en elementos no sinápticos y del 1.45% en axones (Figura 59C - E). Los CMVs tubulares están más representados en las dendritas e infrarrepresentados en los axones y en los compartimentos no sinápticos, respecto a los CMVs esferoidales (χ^2 , $p < 0.0001$).

26.5 Tamaño de los CMVs

Hemos medido el tamaño de los CMVs reconstruidos tridimensionalmente a lo largo de todas las capas corticales (2113 CMVs en total).

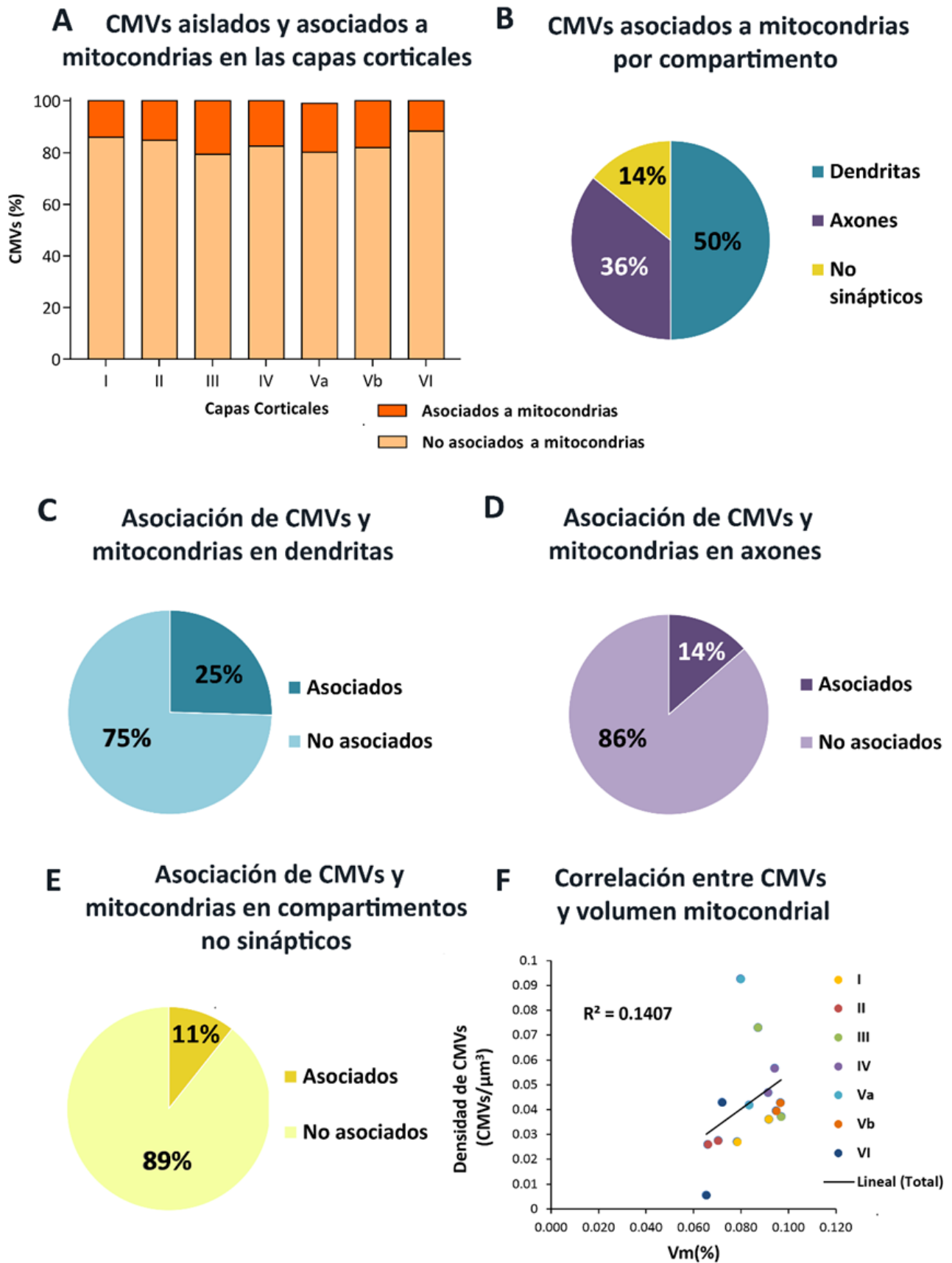


Figura 58. Porcentaje y distribución de CMVs asociados a mitocondrias. A. Porcentaje de CMVs asociados y no asociados a mitocondrias en todas las capas corticales. B. Distribución del total CMVs asociados a mitocondrias que se localizan en dendritas, axones y compartimentos no sinápticos. C-D-E. Porcentaje de CMVs asociados y no asociados a mitocondrias en dendritas, axones y compartimentos no sinápticos, respectivamente. F. Ausencia de correlación entre la densidad de CMVs asociados a mitocondrias y la fracción de volumen mitocondrial, $R^2 = 0.14$, R de Pearson = 0.375, $p > 0.05$). Cada punto representa los datos obtenidos de cada pila de imágenes, en todas las capas corticales.

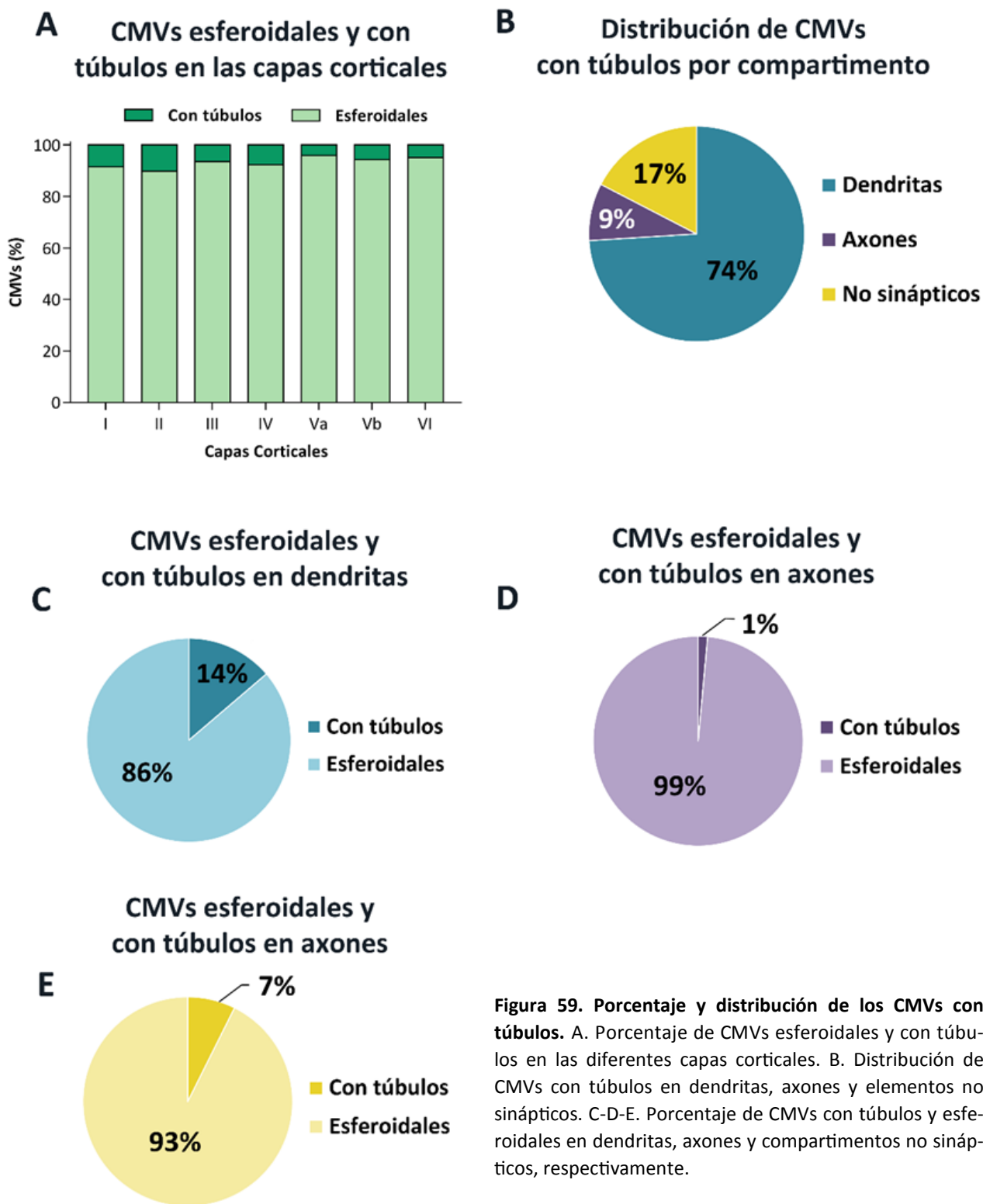


Figura 59. Porcentaje y distribución de los CMVs con túbulos. A. Porcentaje de CMVs esferoidales y con túbulos en las diferentes capas corticales. B. Distribución de CMVs con túbulos en dendritas, axones y elementos no sinápticos. C-D-E. Porcentaje de CMVs con túbulos y esferoidales en dendritas, axones y compartimentos no sinápticos, respectivamente.

Para estimar la función de densidad de probabilidad de los tamaños de los CMVs hemos realizado un histograma, y hemos estimado la curva mejor ajustada a la muestra. Así, se ha determinado que el tamaño de los CMVs sigue aproximadamente una distribución log-normal con parámetros $\mu = 0.8275$ y $\sigma = 5.2652$ (Figura 60).

Considerando todas las capas en conjunto, el tamaño medio de los CMVs fue de $7.66 \times 10^{-3} \mu\text{m}^3$, encontrándose los CMVs más grandes en la capa III ($8.41 \times 10^{-3} \mu\text{m}^3$) y los más pequeños en la capa I ($6.39 \times 10^{-3} \mu\text{m}^3$) y Va ($6.82 \times 10^{-3} \mu\text{m}^3$). Las diferencias de tamaño entre la capa Va y las capas III, IV y Vb fueron estadísticamente significativas (KW, $p < 0.05$) (Figura 61A).

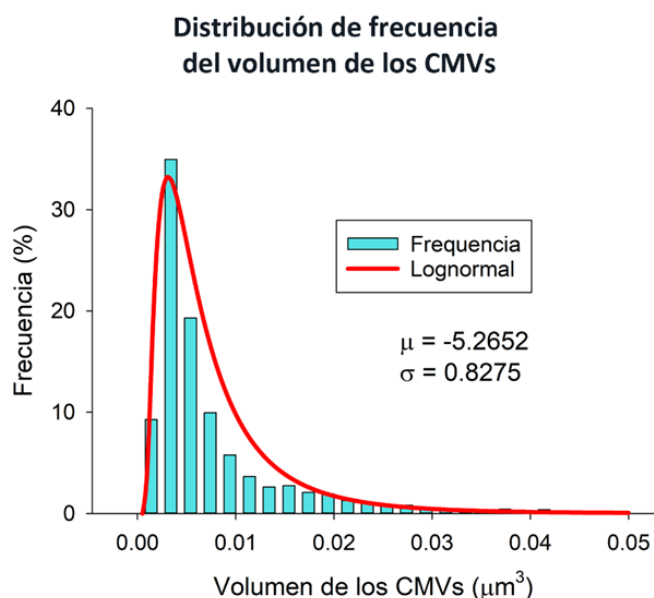


Figura 60. Distribución de frecuencia del volumen del total de CMVs (azul). Se muestra el ajuste del histograma a una curva log-normal cuyos parámetros son $\mu = 0.8275$ y $\sigma = -5.2652$.

Hemos encontrado una correlación negativa entre la densidad de CMVs y su tamaño ($R^2 = 0.41$, R de Pearson = -0.643 , $p = 0.002$) en las 21 muestras analizadas (Figura 61B). No se hallaron diferencias en tamaños en los CMVs entre los diferentes animales (t test, $p > 0.05$).

La distribución de tamaños de los CMVs fue similar en todas las capas (Figura 61C), pero se encontraron importantes diferencias en los tamaños de los CMVs localizados en dendritas, axones y compartimentos no sinápticos (Figura 61D). Los CMVs localizados en dendritas fueron, en promedio, los más grandes ($13.14 \times 10^{-3} \mu\text{m}^3$) seguidos de los que se encuentran en elementos no sinápticos ($5.22 \times 10^{-3} \mu\text{m}^3$) y de los que se localizan en los axones ($3.56 \times 10^{-3} \mu\text{m}^3$) (Figura 61E) (Tabla 25). Entre los que se encuentran en elementos no sinápticos, los que se localizan en oligodendrocitos tienen un tamaño medio de $7.86 \times 10^{-3} \mu\text{m}^3$. Las diferencias de tamaño entre los tres compartimentos (dendritas, axones y no sinápticos) fueron estadísticamente significativas (KW, $p < 0.0001$).

Posteriormente estudiamos el tamaño de los CMVs (1617 CMVs) en referencia a los diferentes tipos morfológicos observados: CMVs aislados en el citoplasma, CMVs asociados a mitocondrias,

CMVs con extensiones tubulares y CMVs con túbulos asociados a mitocondrias. Los CMVs esféricos aislados son los más pequeños ($5.96 \times 10^{-3} \mu\text{m}^3$), seguidos de los CMVs esféricos asociados a mitocondrias ($9.49 \times 10^{-3} \mu\text{m}^3$). Los CMVs que presentan túbulos son los de mayor tamaño medio, siendo similares los que están aislados en el citoplasma ($17.192 \times 10^{-3} \mu\text{m}^3$) y los que están asociados a las mitocondrias ($16.12 \times 10^{-3} \mu\text{m}^3$). Las diferencias de tamaño entre estos diferentes tipos de CMVs fueron estadísticamente significativas, excepto cuando se compararon los tamaños de los CMVs con expansiones tubulares asociados o no a mitocondrias (KW, $p < 0.0001$) (Figura 61F).

Dentro de los CMVs dendríticos, el tamaño no fue diferente en aquellos que se encontraban en dendritas con espinas frente a los que se localizaban en dendritas sin espinas (MW, $p = 0.73$) (Figura 62A). Por otro lado, en los CMVs dendríticos que se situaban en espinas, no encontramos diferencia de tamaño entre aquellos que estaban en espinas dendríticas con y sin aparatos de espina (MW, $p = 0.63$) (Figura 62B). Los CMVs que estaban en espinas dendríticas fueron más pequeños ($5.99 \times 10^{-3} \mu\text{m}^3$) que los que se encontraban en el tallo dendrítico ($13.80 \times 10^{-3} \mu\text{m}^3$) (MW, $p < 0.0001$) (KS, $p < 0.0001$) (Figura 62C y D).

De los CMVs que se localizan en los axones, los más grandes se encontraban en los axones mielínicos ($7.05 \times 10^{-3} \mu\text{m}^3$) (KW, $p = 0.0004$), mientras que no encontramos diferencias apreciables en el tamaño de los CMVs de axones excitadores ($3.48 \times 10^{-3} \mu\text{m}^3$) e inhibidores ($3.79 \times 10^{-3} \mu\text{m}^3$) (KW, Dunn's post-hoc, $p = 0.22$).

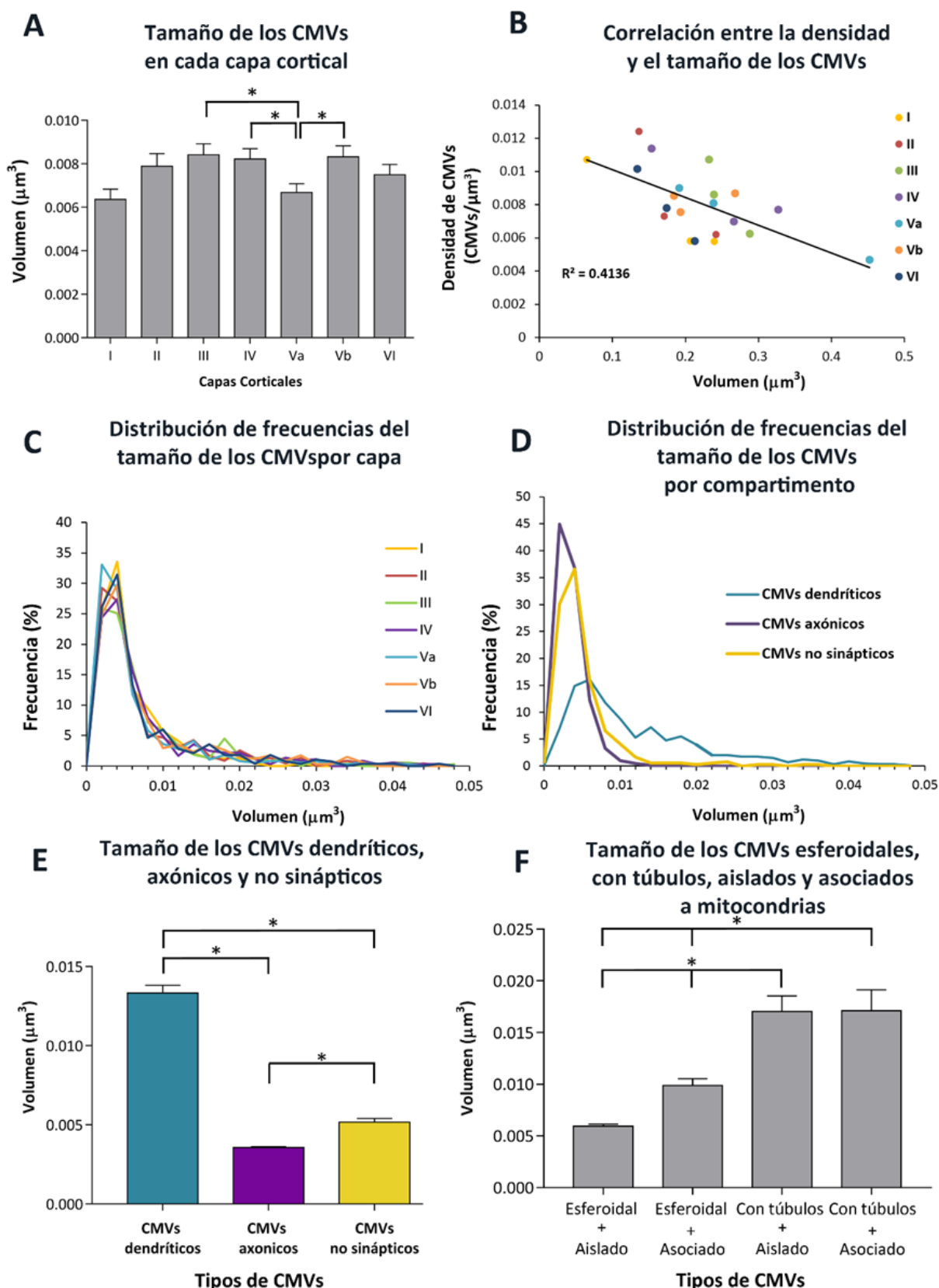


Figura 61. Tamaño de los CMVs. A. Volumen medio (μm^3) + error estándar de la media de los CMVs por capa cortical. Los asteriscos indican las capas en las que las diferencias observadas fueron estadísticamente significativas (KW, $p < 0.05$). B. Correlación entre la densidad de CMVs y sus volúmenes en cada pila de imágenes analizada (21 muestras) ($R^2 = 0.41$, R de Pearson = -0.643 , $p = 0.002$). C. Distribuciones de frecuencia del volumen de los CMVs en cada capa cortical. D. Distribuciones de frecuencia del volumen de los CMVs en cada compartimento celular (dendritas, axones, compartimentos no sinápticos). E. Volumen medio de los CMVs ubicados en dendritas, axones y compartimentos no sinápticos. Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas entre los compartimentos. F. Volumen medio de cada tipo de CMV de acuerdo a su forma y a su asociación con las mitocondrias (esferoidal y aislado, esferoidal y asociado a mitocondrias, con túbulos y aislado, con túbulos y asociado a mitocondrias). Los asteriscos indican diferencias de tamaño estadísticamente significativas (KW, $p < 0.0001$).

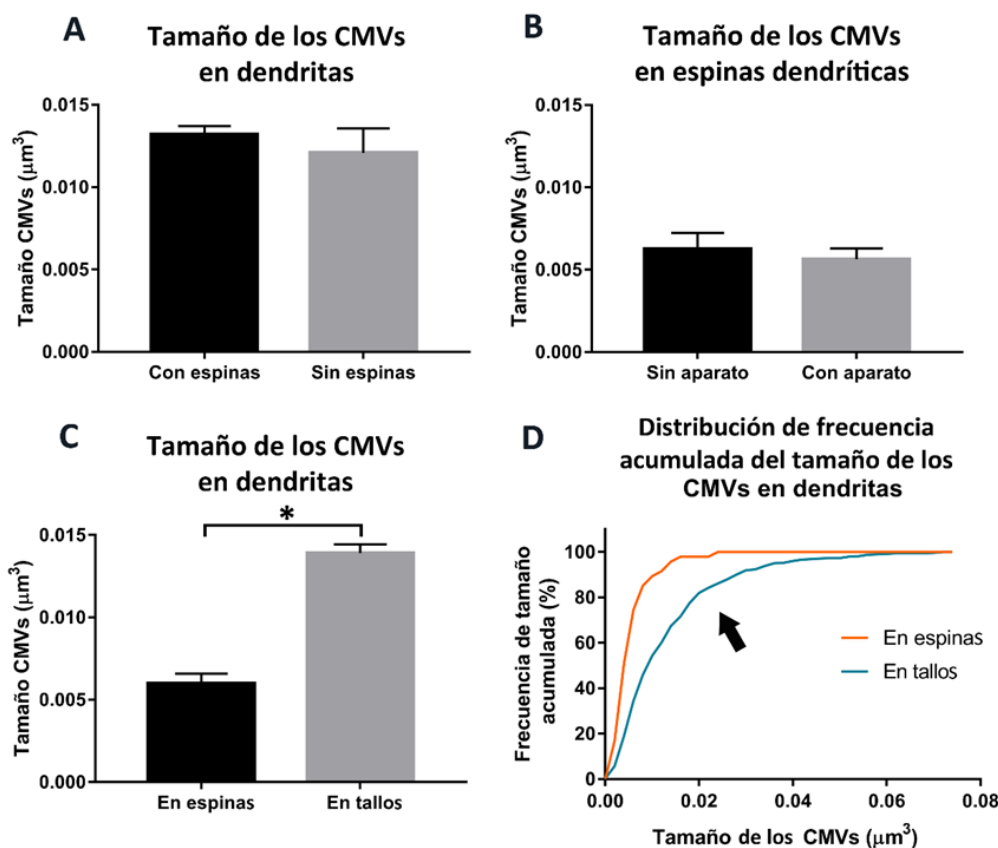


Figura 62. Tamaño de los CMVs en las dendritas. A. Tamaño de los CMVs en dendritas con espinas y en dendritas sin espinas. B. Tamaño de los CMVs en espinas dendríticas con y sin aparato de espina. C. Tamaño de los CMVs en espinas y tallos dendríticos. El asterisco indica una diferencia estadísticamente significativa, siendo aquellos que se sitúan en el tallo más del doble de grandes que aquellos que se sitúan en espinas (MW, $p < 0.0001$). D. Distribución de frecuencias acumuladas de los tamaños de los CMVs localizados en espinas dendríticas y en tallos dendríticos. El asterisco indica diferencias estadísticamente significativas entre ambas distribuciones (KS, $p < 0.0001$).

Hemos evaluado, además, las variaciones de tamaños en cada compartimento celular en las distintas capas corticales. El tamaño de los CMVs dendríticos es variable pero las diferencias no son estadísticamente significativas entre las diferentes capas. Los CMVs axónicos son similares en tamaño en todas las capas corticales excepto en la capa Va, cuyo tamaño es más pequeño que en los CMVs de las capas III y Vb (KW, $p < 0.05$, Dunn's post-hoc, $p = 0.0011$ y $p = 0.0096$). El tamaño de los CMVs en elementos no sinápticos no presentó diferencias estadísticamente significati-

vas entre las capas (KW, $p = 0.03$, Dunn's post-hoc, $p > 0.05$ en comparaciones dos a dos) (Tabla 25).

26.6 Distribución espacial de los CMVs

Cuando los CMVs fueron reconstruidos con el software Espina, se extrajeron sus coordenadas en el espacio (X, Y, Z). De esta forma, en cada una de nuestras series de imágenes obtuvimos una nube de puntos que representan la localización de los CMVs en el espacio tridimensional.

Tamaño de los CMVs ($\mu\text{m}^3 \times 10^{-3} \pm$ error estándar) en diferentes compartimentos subcelulares

Capa	Todos los compartimentos	Dendritas	Axones	Elementos no sinápticos
I	6.39 \pm 0.49	10.13 \pm 1.08	3.50 \pm 0.15	5.59 \pm 0.52
II	7.79 \pm 0.57	15.17 \pm 1.49	3.81 \pm 0.25	5.33 \pm 0.82
III	8.41 \pm 0.52	15.44 \pm 1.58	3.92 \pm 0.18	6.17 \pm 0.75
IV	8.23 \pm 0.53	13.91 \pm 1.17	3.44 \pm 0.15	5.06 \pm 0.37
Va	6.82 \pm 0.42	11.37 \pm 1.05	3.02 \pm 0.13	5.00 \pm 0.67
Vb	8.29 \pm 0.50	14.03 \pm 1.26	3.77 \pm 0.18	5.16 \pm 0.67
VI	7.40 \pm 0.47	11.61 \pm 1.11	3.67 \pm 0.23	4.44 \pm 0.43
I-VI	7.66 \pm 0.19	13.14 \pm 0.49	3.66 \pm 0.08	5.22 \pm 0.26

Tabla 25. Tamaño de los CMVs localizados en dendritas, axones y elementos no sinápticos en las seis capas del córtex y la media para todas las capas (I-VI). Datos dados como $\mu\text{m}^3 \times 10^{-3} \pm$ error estándar de la media.

De manera similar a lo que hicimos con las sinapsis, hemos usado herramientas de estadística espacial tridimensional (funciones G, F y K) para estudiar la distribución espacial de 35 bloques de imágenes seriadas. En 3 de las 35 muestras había menos de 30 CMVs, por lo que no hubo suficientes puntos para determinar con seguridad su distribución y se descartaron del análisis. Como en el caso de las sinapsis descritas anteriormente, para cada función se generó una envolvente simulando 100 nubes de puntos distribuidos al azar, con la misma densidad que la nube que se iba a analizar. Si la curva correspondiente a nuestra muestra queda dentro de esa envolvente, consideraremos que la distribución de puntos es aleatoria. Si la curva de nuestra muestra se sale de la envolvente puede ser que haya una tendencia de los puntos a agruparse, o a distribuirse regularmente.

De las 32 muestras analizadas, hemos observado que en 23 de ellas los CMVs están distribuidos de forma aleatoria mientras que en 9 de ellas muestran una tendencia a distribuirse agrupadamente. Esta tendencia a agruparse se identifica por la presencia de espacios vacíos en la nube de puntos (detectados por la función F), porque la distancia al vecino más cercano es más corta de lo esperado por azar (detectado por la función G), o porque las densidades locales de puntos son mayores que las esperadas por azar (detectable por la función K) (Figura 63).

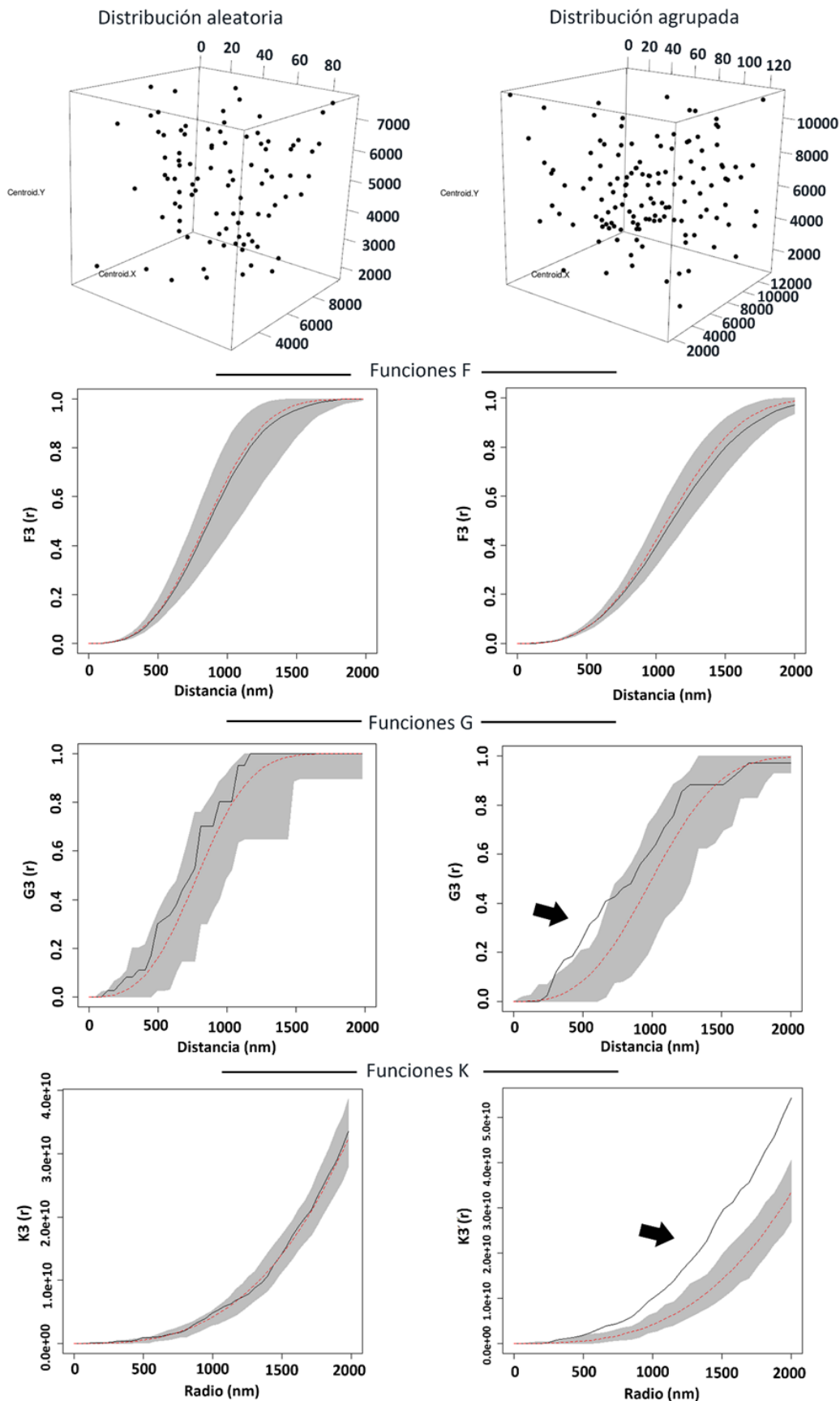


Figura 63. Análisis de la distribución espacial de los CMVs. Se muestran dos ejemplos de distribuciones espaciales encontrados en nuestras muestras. En la columna de la izquierda la distribución es aleatoria, y en la columna de la derecha, agrupada. Se representa la nube de puntos con las coordenadas de los CMVs y las funciones F, G y K. En la columna de la izquierda la curva de la muestra (línea negra) se encuentra dentro de la envolvente (área gris) en todas las funciones, por lo que podemos determinar que la muestra tiene una distribución aleatoria. En la columna de la derecha, tanto en la función G como en la función K, la curva de la muestra (línea negra) se sale (flecha negra) de la envolvente (área gris), por lo que no podemos concluir que la muestra sea aleatoria, sino que sigue una distribución agrupada.

Discusión

27. Estudio de la distribución de sinapsis en el neuropilo del ratón adulto

En este apartado se discute el significado de los resultados sobre las proporciones de sinapsis asimétricas y simétricas y sus dianas postsinápticas en el neuropilo de las seis capas de la corteza somatosensorial del ratón adulto. Estos resultados se basan en el análisis de una muestra de más de 18000 sinapsis que han sido segmentadas y visualizadas en tres dimensiones.

27.1 Densidad de sinapsis en el neuropilo

En nuestro estudio hemos determinado que la densidad media de sinapsis en el neuropilo de la corteza somatosensorial es de $1.38 \text{ sinapsis}/\mu\text{m}^3$, en el área de representación del miembro posterior. En otros estudios previos realizados en nuestro laboratorio en la corteza somatosensorial correspondiente al ‘campo de barriles’ del ratón, se estimó una densidad mucho mayor, de $2.93 \text{ sinapsis}/\mu\text{m}^3$ (DeFelipe et al. 2002) y $2.57 \text{ sinapsis}/\mu\text{m}^3$ (De Felipe et al. 1997). Las diferencias con el presente estudio pueden ser debidas a las diferentes metodologías utilizadas, ya que hemos realizado un conteo directo de las sinapsis en secciones seriadas, mientras que en los estudios mencionados anteriormente se usaron diversos métodos estereológicos para estimar la densidad sináptica en secciones no seriadas: el método tamaño-frecuencia (en inglés, *size-frequency method*) *vid.* (Colonnier & Beaulieu 1985) en (DeFelipe et al. 2002) y el disector (Sterio 1984) en (De Felipe et al. 1997).

En un estudio en el que se compararon los tres métodos (Merchán-Pérez et al. 2009), el método tamaño-frecuencia dio valores ligeramente más altos que la cuantificación de sinapsis por conteo directo, lo que podría ocasionar una pequeña sobreestimación de la densidad sináptica (*vid.* también (Cano-Astorga et al. 2021)). El disector estimó una densidad sináptica más parecida a la obtenida por conteo directo, pero con una variabilidad estadística mucho mayor que el método tamaño-frecuencia, lo cual lo hace propenso a errores de estimación si no se realiza un número suficiente de disectores. Por otro lado, la proba-

bilidad de malinterpretar perfiles no sinápticos como sinápticos (y a la inversa) es muy superior cuando no se cuenta con imágenes seriadas, como ocurre en (De Felipe et al. 1997; DeFelipe et al. 2002).

Aparte de las diferencias metodológicas, debe tenerse en cuenta la posibilidad de que la densidad de sinapsis sea realmente distinta en diferentes regiones de la corteza somatosensorial. Esto es lo que se desprende de un estudio en el que se estimaron las densidades de sinapsis en el cerebro de ratón adulto por un método en el que se combinaron la microscopía FIB-SEM y la identificación de proteínas postsinápticas mediante microscopía confocal (Santuy et al. 2020). En ese estudio no se obtuvieron datos de la representación del miembro posterior, pero para el miembro anterior se estimó una densidad de $1.46 \text{ sinapsis}/\mu\text{m}^3$, mientras que la corteza de barriles llegaba a $1.85 \text{ sinapsis}/\mu\text{m}^3$.

Finalmente, debe tenerse en cuenta la variabilidad de la densidad de sinapsis, incluso en diferentes muestras tomadas de la misma región y capa cortical. Esta variabilidad local pudo ya observarse en diez muestras de la capa III de la rata juvenil, en las que el conteo directo de sinapsis dio densidades que iban desde 0.69 hasta $1.13 \text{ sinapsis}/\mu\text{m}^3$ (Merchán-Pérez et al. 2014). Más adelante se comprobó que la variabilidad entre muestras afecta a todas las capas corticales de la rata (Santuy et al. 2018b), por lo que es importante analizar varias muestras en cada localización, tal como hemos hecho en el presente estudio (Tabla 3, en “Resultados”). Un ejemplo demostrativo de esto puede ser el dato ofrecido por (Kasthuri et al. 2015), procedente de una sola muestra de la capa V del ratón adulto, en un área no especificada de la corteza somatosensorial. La densidad de sinapsis en esa localización fue de $0.88 \text{ sinapsis}/\mu\text{m}^3$. Por un lado, ese valor es inferior al que nosotros hemos obtenido de media en diez muestras de la capa V ($1.25 \text{ sinapsis}/\mu\text{m}^3$) pero, por otra parte, está dentro del rango que hemos encontrado en esa misma capa, que va desde 0.49 hasta $2.19 \text{ sinapsis}/\mu\text{m}^3$.

La capa cortical con la mayor densidad de sinapsis en el neuropilo fue la capa I, disminuyendo progresivamente hasta la capa III, siendo la capa IV la segunda capa con mayor densidad de sinapsis, y volviendo a disminuir hasta la capa VI, que es la capa con menor densidad sináptica. La misma dinámica entre capas se observó en las sinapsis cuantificadas en el ratón adulto en (De Felipe et al. 1997) y en (DeFelipe et al. 2002). En este último caso, la capa VI fue la segunda capa con menor densidad sináptica. Resulta interesante que sea la capa I, constituida mayoritariamente por árboles dendríticos distales procedentes de células piramidales y ramificaciones axónicas terminales de diversos orígenes, la que tenga una mayor densidad de sinapsis, mientras que la capa VI, en la que se encuentran gran cantidad de axones de paso, muchos de ellos mielínicos, es la que tiene una menor densidad de sinapsis.

El patrón es diferente en la rata juvenil (Santuy et al. 2018b), que no solo tiene una densidad de sinapsis inferior ($0.89 \text{ sinapsis}/\mu\text{m}^3$), sino que presenta las densidades más altas en las capas II y IV, aunque la densidad más baja vuelve a ser en la capa VI. Estas diferencias pueden deberse al diferente estado de maduración o ser específicas de la especie, aunque actualmente carecemos de datos para determinarlo con exactitud. Con respecto a la capa IV, parece encontrarse siempre entre las que tienen mayor densidad de sinapsis. Aunque es tentador atribuirlo a que esta capa recibe mayoritariamente las aferencias talámicas (Watson et al. 2011), nuestra metodología no permite discernir el origen de las sinapsis, por lo que debemos mantener esta idea como una hipótesis de trabajo para futuros estudios.

27.2 Proporción de sinapsis asimétricas y simétricas

En cuanto a la proporción de sinapsis asimétricas (excitadoras) y simétricas (inhibidoras) en las muestras analizadas, aproximadamente el 91% de las sinapsis fueron asimétricas, mientras que el 9% de ellas fueron simétricas. En un estudio realizado en la capa V del ratón adulto, basado en una única muestra, la proporción de sinapsis simétricas fue mucho menor, ya que por cada

sinapsis inhibitora se encontraron 20 sinapsis excitadoras sobre las dendritas de neuronas excitadoras, mientras que en las dendritas de neuronas inhibitoras se encontraron 10 sinapsis excitadoras por cada sinapsis inhibitora (Kasthuri et al. 2015). En otros estudios de la corteza de barriles del ratón adulto los porcentajes varían, encontrando el 84% de sinapsis asimétricas y el 16% de sinapsis simétricas (De Felipe et al. 1997; DeFelipe et al. 2002). Las diferencias con el presente trabajo pueden deberse a la diferente metodología utilizada, como hemos comentado anteriormente. Concretamente, es importante tener en cuenta que, en esos estudios hubo aproximadamente un 56% de las sinapsis que no pudieron ser clasificadas como asimétricas o simétricas, debido a que se usaron imágenes individuales en lugar de imágenes seriadas como en nuestro caso (revisado en (DeFelipe et al. 1999; Merchán-Pérez et al. 2009). Con el protocolo aplicado en el presente trabajo, no quedan sinapsis sin determinar, ya que exploramos la pila de imágenes en tres dimensiones y podemos visualizar las sinapsis en todos los planos (XY, XZ, YZ).

Por otro lado, no podemos descartar que en la corteza de barriles las proporciones de sinapsis excitadoras e inhibitoras sean realmente diferentes a la representación del miembro posterior, como hemos comentado antes en el caso de las densidades de sinapsis. En la corteza somatosensorial de la rata juvenil, utilizando el mismo método que el presente trabajo, los porcentajes de sinapsis asimétricas y simétricas fueron muy similares a las del ratón adulto, de aproximadamente el 90% y el 10% de las sinapsis, respectivamente (Santuy et al. 2018b).

Es interesante resaltar que en nuestro estudio la capa con mayor porcentaje de sinapsis simétricas fue la capa IV (13.79% de sinapsis simétricas). En otros trabajos en la corteza somatosensorial del ratón adulto (De Felipe et al. 1997; DeFelipe et al. 2002) y en la rata juvenil (Santuy et al. 2018b), la capa IV fue también la que mayor porcentaje de sinapsis simétricas presentó. En cuanto a la densidad absoluta de sinapsis simétricas por μm^3 , nuestros datos indican que también es la capa IV

la que presenta los valores más altos (0.22 sinapsis simétricas/ μm^3), seguida de la capa I (0.17 sinapsis simétricas/ μm^3). Esto también ocurre en la rata juvenil, aunque con valores muy inferiores (0.14 sinapsis simétricas/ μm^3 en la capa IV y 0.10 sinapsis simétricas/ μm^3 en la capa I) (Santuy et al. 2018b).

Este enriquecimiento en sinapsis inhibitoras se produce durante el desarrollo. En el ratón, la densidad sináptica aumenta hasta los 32 días de edad, tanto en el caso de las sinapsis asimétricas como las simétricas, seguido de una reducción de sinapsis en el adulto que afecta más a las sinapsis asimétricas (37% de pérdida de sinapsis asimétricas frente al 8% de pérdida de sinapsis simétricas). En la capa IV, no se produce la reducción de sinapsis simétricas desde los 32 días de edad hasta el adulto; es más, junto a la capa VI es la capa en la que se produce un incremento de sinapsis simétricas en dicha ventana temporal (De Felipe et al. 1997).

La mayor abundancia de sinapsis simétricas en la capa IV podría deberse a una mayor concentración de células inhibitoras en esta capa, lo que se ha observado al menos en la corteza de barriles (Keller & White 1987). Resulta una vez más, tentador, atribuir la abundancia de sinapsis inhibitoras en la capa IV a las aferencias talámicas, pero en este caso por un mecanismo indirecto. En un estudio en la corteza de barriles en el que se marcaron anterógradamente axones talamocorticales, se encontró que el 15% de las sinapsis axoespinosas estaban acompañadas por una segunda sinapsis, esta vez inhibitora, que se establecía sobre la misma espina dendrítica (Rodríguez-Moreno et al. 2018). Un hecho similar también ocurre en la capa V sobre el 18% de espinas contactadas por axones procedentes del núcleo posterior del tálamo (Rodríguez-Moreno et al. 2020), y resultados similares se observaron en la corteza prefrontal de la rata (Kubota et al. 2007).

Esta asociación preferente de sinapsis inhibitoras con las sinapsis talamocorticales podría explicar la riqueza de sinapsis inhibitoras en la capa IV, pero desconocemos su mecanismo y significa-

ción. El emparejamiento de sinapsis inhibitoras y excitadoras sobre la misma espina dendrítica se ha encontrado también en la capa II-III de la corteza somatosensorial (Gemin et al. 2021). De hecho, en nuestras muestras es muy raro encontrar espinas cuya única sinapsis sea simétrica (menos del 1% de las espinas dendríticas), siendo más común encontrarlas acompañadas por, al menos, otra sinapsis asimétrica (algo más del 4% de las espinas dendríticas), por lo que el emparejamiento de sinapsis de distinto signo podría no ser específico de determinadas proyecciones, sino un fenómeno general.

Finalmente, como hemos indicado anteriormente, también la capa I es rica en sinapsis inhibitoras. De hecho, en estudios de la corteza temporal humana y de la corteza somatosensorial de la rata adulta, fue la capa con mayor porcentaje de sinapsis simétricas (DeFelipe et al. 2002). En la corteza visual del ratón se ha descrito que la densidad de sinapsis inhibitoras aumenta en las ramificaciones distales de las dendritas apicales (Chen et al. 2012). También en el hipocampo de la rata y del humano se ha encontrado que la mayor densidad de sinapsis inhibitoras se da en el *stratum lacunosum-moleculare*, donde se encuentran las ramificaciones más distales de las dendritas apicales (Megías et al. 2001; Montero-Crespo et al. 2020; Santuy et al. 2020). Si esto ocurriera de manera general en otras regiones de la corteza, ayudaría a explicar la riqueza de sinapsis simétricas de la capa I, donde las dendritas son casi exclusivamente ramificaciones distales de dendritas apicales procedentes de capas más profundas.

27.3 Proporción de sinapsis en espinas y tallos dendríticos

Si consideramos las sinapsis asimétricas y simétricas en conjunto, y el lugar donde se establecen (espinas o tallos dendríticos), hemos encontrado que las más frecuentes son las sinapsis asimétricas axoespinosas (76.07%), seguidas de las asimétricas en el tallo dendrítico (12.58%), y por las sinapsis simétricas en tallos dendríticos (7.80%), siendo las menos abundantes las simétricas axoespinosas (3.55%).

El mismo patrón, aunque con distintos porcentajes, se ha observado en otros estudios en el ratón (Kwon et al. 2019) y la rata juveniles (Santuy et al. 2018b). Por lo tanto, no puede asumirse, como se ha hecho en publicaciones recientes (Karimi et al. 2020; Loomba et al. 2022; Motta et al. 2019) que una sinapsis es excitadora simplemente por estar el axón presináptico en aposición con una espina dendrítica y, menos aún, que un terminal axónico que se encuentra en aposición con en el tallo dendrítico sea inhibitor, ya que está claro que en los tallos dendríticos hay, en promedio, más sinapsis asimétricas que simétricas.

Las sinapsis asimétricas se encontraron mucho más frecuentemente en las espinas dendríticas (85.88%), prácticamente todas ellas en la cabeza de la espina (más del 97%). Sin embargo, es interesante destacar que las capas Va y Vb presentaron porcentajes relativamente altos de sinapsis asimétricas en tallos dendríticos (19% y 22% respectivamente), una observación que también se ha encontrado en la rata de 14 días (Santuy et al. 2018b). Asimismo, se ha descrito que los axones procedentes del núcleo posterior del tálamo establecen un mayor porcentaje de sinapsis asimétricas en los tallos dendríticos de la capa Va de la corteza somatosensorial (17%) respecto a otras capas y regiones corticales (4-6%) (Rodríguez-Moreno et al. 2020). Desconocemos el significado de este hecho, pero podemos plantear, como hipótesis, que podría tratarse de una propiedad característica de los circuitos que involucran a las células piramidales cuyos somas se localizan en las capas V y VI y con dendritas en la capa V.

Al contrario que las sinapsis asimétricas, las sinapsis simétricas se encontraron con más frecuencia en los tallos dendríticos (69.78%). Como acabamos de comentar, esto no significa que las sinapsis inhibitoras sean las predominantes en los tallos, ya que las excitadoras las superan en una proporción de aproximadamente 3 a 2. En cualquier caso, también hay un porcentaje importante de sinapsis simétricas en espinas dendríticas (30.31%). Diferentes estudios han encontrado diferentes porcentajes de sinapsis simétricas en las espinas dendríticas de la corteza soma-

tosensorial, habiéndose reportado un 25% en la rata juvenil (Santuy et al. 2018b), un 17% en la capa II-III del ratón juvenil (Kwon et al. 2019), un 38% en la capa II-III del ratón adulto (Gemin et al. 2021) y un 26%, también en la capa II/III del ratón adulto (Iascone et al. 2020). En la corteza visual del ratón adulto se ha descrito que la distribución de sinapsis inhibitoras en los tallos es constante a lo largo de las dendritas, mientras que las sinapsis inhibitoras en espinas son más frecuentes en las regiones más distales de las dendritas apicales, como ya hemos dicho (Chen et al. 2012). Según nuestros datos, dos de cada tres de las sinapsis simétricas axoespinosas se establecen en el cuello de la espina, lo que contrasta con las sinapsis asimétricas, que prefieren casi exclusivamente la cabeza, como ya hemos mencionado.

Resulta de gran interés volver a resaltar que, en su mayoría, las sinapsis axoespinosas inhibitoras se encuentran acompañadas por otra sinapsis excitadora. Este hallazgo es común, como hemos comentado, en la corteza somatosensorial (Gemin et al. 2021; Rodríguez-Moreno et al. 2018, 2020) y en la prefrontal (Kubota et al. 2007), y se refleja también en nuestros propios datos. Este hecho podría ser indicativo de la plasticidad de este tipo de espinas, ya que en estudios *in vivo* se ha observado que las sinapsis inhibitoras sobre espinas con más de una sinapsis son la población sináptica más dinámica, más que las sinapsis excitadoras o las sinapsis inhibitoras sobre tallos dendríticos (Villa et al. 2016).

Finalmente, queremos resaltar el dato de que en nuestras muestras la gran mayoría de las sinapsis se establecen sobre espinas dendríticas y sobre tallos que tienen espinas dendríticas. De esta forma, solo un pequeño porcentaje, menos del 3% de todas las sinapsis, se establece sobre dendritas que carecen de espinas. El porcentaje de sinapsis en tallos dendríticos sin espinas podría corresponderse con las sinapsis establecidas en las dendritas de interneuronas inhibitoras, las cuales por lo general no tienen espinas (Bopp et al. 2014; The Petilla Interneuron Nomenclature Group (PING) 2008).

27.4. Estudio de las espinas dendríticas y sus sinapsis

La mayoría de espinas son espinas simples, siendo aproximadamente el 6% de las espinas dendríticas ramificadas, es decir, espinas que cuentan con más de una rama, aunque se unan al tallo dendrítico mediante un único cuello.

En las espinas simples hemos encontrado que un 7% de ellas carecen de contactos sinápticos, mientras que en las espinas ramificadas eso solo ocurre en un 2.28% de ellas. Estudios previos han cuantificado un porcentaje de espinas sin contactos sinápticos menor al 5% (Arellano et al. 2007b; Bosch et al. 2015; Kasthuri et al. 2015). Estos datos, obtenidos mediante microscopía electrónica, contrastan con el porcentaje mucho más alto de espinas sin PSD95 (20%), una proteína de la densidad postsináptica de las sinapsis excitadoras, necesaria para la estabilización sináptica (Berry & Nedivi 2017). Tanto las espinas sin sinapsis visible al microscopio electrónico como aquellas en las que no se detecta PSD95 podrían representar estadios previos al establecimiento y estabilización de una sinapsis, o bien estadios posteriores a la eliminación de una sinapsis preexistente. La dinámica de las espinas dendríticas en el ratón adulto produce, de hecho, un equilibrio entre la eliminación y la adición de nuevas espinas, dando lugar a un 70%-80% de espinas persistentes (con más de 2 días de antigüedad), porcentaje que se ve influenciado por el aprendizaje y la privación sensorial (Berry & Nedivi 2017).

Aunque tradicionalmente se equipara una espina a una sinapsis, acabamos de ver que hay espinas sin sinapsis, y también las hay con más de una sinapsis. En nuestras muestras hemos cuantificado hasta un 6.13% de espinas simples con más de una sinapsis, que es un porcentaje similar al encontrado en la corteza somatosensorial de la rata juvenil (5.57%) (Santuy et al. 2018b) pero muy superior al encontrado en el ratón juvenil (1.76%) (Kwon et al. 2019). La combinación más frecuente en espinas con sinapsis múltiples fue de una sinapsis asimétrica y una simétrica, como hemos comentado anteriormente, combinación que se dio en más del 55% de las espinas con sinapsis

múltiples. La siguiente combinación más frecuente fue la de dos sinapsis asimétricas, en alrededor del 40% de los casos. Dicho orden fue el inverso al encontrado en la rata juvenil (Santuy et al. 2018b). Esta diferencia puede radicar en el momento del desarrollo estudiado, dado el gran dinamismo de este tipo de sinapsis (Villa et al. 2016), y su ya mencionada abundancia en las proyecciones talamocorticales (Kubota et al. 2007; Rodríguez-Moreno et al. 2018, 2020), que podrían no haber completado su desarrollo en la rata juvenil.

El papel funcional de las espinas múltiples es un tema de creciente interés. La generación de las espinas multisinápticas se relaciona con la potenciación sináptica y la memoria (Giese et al. 2015; McLeod et al. 2020; Radwanska et al. 2011). Por un lado, se ha descrito en la corteza visual primaria del ratón que dichas espinas son más numerosas en etapas tempranas del desarrollo (de 14 días de edad) (Risher et al. 2014), lo que sería contradictorio con lo que acabamos de discutir sobre las proyecciones talamocorticales. Por otro lado, en un estudio con dos grupos de diferentes edades (ratones de 3 meses y ratones de 20 meses) se ha comprobado cómo, exclusivamente en los ratones de mayor edad, la memoria en contextos de miedo está íntimamente asociada a la generación de espinas dendríticas con sinapsis múltiples en el hipocampo (Aziz et al. 2019). Puede, por tanto, que la generación de espinas multisinápticas se encuadre en ventanas temporales del desarrollo concretas y que, a su vez, el proceso se modifique por diferentes condiciones de aprendizaje y memoria.

28. Estudio del tamaño y la forma de las sinapsis

En este apartado se han medido el área y el perímetro de la superficie de aposición sináptica (SAS). En este trabajo hemos usado la SAS porque es equivalente a la superficie de la densidad postsináptica (PSD) y a la zona activa de la sinapsis, visible al microscopio electrónico como densidad presináptica (Morales et al. 2013).

Es interesante el análisis de la forma y tamaño de las sinapsis en primer lugar porque el área de la zona activa es proporcional al número de vesículas ancladas y a la probabilidad de la liberación de neurotransmisor (Branco et al. 2010; Holderith et al. 2012; Matz et al. 2010; Schikorski & Stevens 1997). En segundo lugar, el tamaño de la PSD está fuertemente relacionado con la fuerza y eficacia sináptica, y con la plasticidad, de manera que las sinapsis más grandes tienen en general más receptores, producen potenciales postsinápticos de mayor amplitud, tienen tasas de fallo más bajas y son más estables que las sinapsis más pequeñas (Biederer et al. 2017; Ganeshina et al. 2004a,b; Holderith et al. 2012; Holler et al. 2021; Tarusawa et al. 2009).

La SAS tiene ventajas notables que merecen ser destacadas. En primer lugar, las SAS se extraen de manera automática de las uniones sinápticas segmentadas previamente en tres dimensiones, de forma que se evita el trazado por parte de cada usuario y los posibles sesgos derivados de ello (Morales et al. 2013). Además, pese a ser una superficie, la SAS también es un objeto tridimensional que reproduce la forma y la curvatura de la PSD. De esta manera, la SAS se puede visualizar en tres dimensiones para obtener información cualitativa como la presencia de perforaciones o hendiduras. Finalmente, nos permite obtener información cuantitativa del área y el perímetro, de manera que la forma y el tamaño se pueden correlacionar fácilmente.

28.1 Área y perímetro de las uniones sinápticas en referencia a su naturaleza excitadora o inhibitoria

Se encontraron SAS de mayor área de media en las sinapsis asimétricas que en las simétricas. El área de ambos tipos sinápticos tiene una distribución de frecuencia que sigue una curva sesgada, con una larga cola hacia la derecha, algo ya descrito en anteriores estudios (Arellano et al. 2007a). Una distribución log-normal se caracteriza precisamente por tener esa forma sesgada característica, y de hecho se ha comprobado que la distribución de tamaños sinápticos en la neocor-

teza y en el hipocampo se ajusta a una curva log-normal (Merchán-Pérez et al. 2014; Santuy et al. 2018a, Santuy et al. 2020). Nuestros datos se distribuyen de la misma manera, lo que refleja el hecho de que las sinapsis pequeñas son predominantes, mientras que las más grandes (entre ellas perforadas, en herradura o fragmentadas) son menos comunes.

Es muy interesante constatar que hay otros parámetros sinápticos, como la fuerza sináptica y la probabilidad de transmisión de impulsos, que también se ajustan a distribuciones log-normales (Buzsáki & Mizuseki 2014). Por ejemplo, la distribución del tamaño de los potenciales postsinápticos excitadores es muy similar a la distribución del tamaño sináptico observada en nuestras muestras (Lefort et al. 2009; Song et al. 2005). Aunque se observan diferencias significativas en el tamaño medio de ambos tipos sinápticos (sinapsis asimétricas y simétricas), la mayor parte de la distribución de los tamaños de las SAS se superponen, por lo que resultaría imposible identificar si una sinapsis es asimétrica o simétrica solo por su área.

Con respecto al perímetro de las sinapsis, un hallazgo importante es la observación de que las sinapsis más grandes no son una versión a mayor escala de las más pequeñas, sino que a medida que crece el área de las SAS su perímetro se hace más tortuoso y complejo, con aparición de invaginaciones cada vez más frecuentes y profundas. Este parece ser un fenómeno general, ya que se ha observado anteriormente en la rata juvenil (Santuy et al. 2018a) y ocurre por igual en sinapsis excitadoras e inhibitorias.

Otro fenómeno interesante que se observa en nuestras muestras es que la densidad de sinapsis está inversamente correlacionada con el área de estas, es decir, las regiones con mayor densidad de sinapsis, contienen sinapsis más pequeñas. Dicha correlación también se ha observado en otros estudios en animales adultos (De Felipe et al. 1997; DeFelipe et al. 2002), pero no en estadios juveniles (Santuy et al. 2018a,b). Esta relación inversa entre el número y el tamaño de las sinapsis ha sido recientemente investigada por

(Hazan & Ziv 2020), quienes han hecho un seguimiento de la dinámica molecular de la proteína postsináptica PSD95. Sus resultados sugieren que la falta de actividad sináptica produciría la eliminación de las sinapsis más pequeñas, decreciendo el número total de sinapsis y permaneciendo las más grandes. De esta forma, el tamaño y la densidad de sinapsis estarían relacionados de una manera continua y dinámica.

28.2 Tamaño de las sinapsis en función de su diana postsináptica

Los elementos postsinápticos identificados fueron el tallo dendrítico y las espinas dendríticas, pudiendo establecerse las sinapsis tanto en la cabeza como en el cuello de dichas espinas.

Las sinapsis asimétricas y simétricas establecidas en el tallo fueron más grandes que las localizadas en las espinas dendríticas. La misma tendencia ha sido observada previamente en la rata juvenil (Santuy et al. 2018a) y en las neuronas piramidales de la capa II/III de corteza somatosensorial del ratón adulto (Gemin et al. 2021). Sin embargo, las sinapsis asimétricas en las espinas fueron más grandes que las que se establecieron en los tallos en la corteza temporal humana (Cano-Astorga et al. 2021). Por otro lado, las sinapsis asimétricas establecidas en espinas dendríticas fueron a su vez más grandes que las simétricas en espinas dendríticas. Según hemos indicado anteriormente, en las espinas dendríticas lo que encontramos con más frecuencia es una sinapsis asimétrica, y cuando encontramos sinapsis simétricas, estas casi siempre comparten espina con otra sinapsis asimétrica. De esta forma, es posible que el simple hecho de compartir espina limite el tamaño de las SAS, más aún si tenemos en cuenta que en la mayoría de los casos la sinapsis excitadora se encuentra en la cabeza mientras que la inhibidora se encuentra en el cuello de la espina. De hecho, en un trabajo reciente se describe que las sinapsis excitadoras que comparten espina con las sinapsis inhibitoras son hasta el doble de grandes que estas últimas (Gemin et al. 2021).

28.3 Análisis de la forma de las uniones sinápticas

Hemos analizado la forma de las sinapsis gracias a que la SAS mantiene la forma y curvatura de la sinapsis. Las SAS tienen formas diversas que tradicionalmente han sido clasificadas en los siguientes grupos: maculares, perforadas, en herradura y fragmentadas. La forma de las SAS predominante en nuestro estudio fue la macular, encontrada en 4 de cada 5 sinapsis, tanto para sinapsis asimétricas como simétricas. El resto de formas son más complejas, ya que cuentan con hendiduras, perforaciones y fragmentaciones (Arellano et al. 2007a). Estas sinapsis más complejas conforman el 17.87% de las sinapsis asimétricas y el 15% de las sinapsis simétricas en nuestras muestras. Hemos encontrado además que las sinapsis asimétricas son más complejas en las espinas que en los tallos dendríticos, mientras que en las sinapsis simétricas ocurre lo contrario.

Las sinapsis perforadas tienen más receptores AMPA y NMDA que las sinapsis maculares y constituyen una población de sinapsis relacionadas con la memoria a largo plazo (Ganeshina et al. 2004a,b). En otros trabajos se han reportado porcentajes de sinapsis perforadas similares a los nuestros (Arellano et al. 2007a; Cano-Astorga et al. 2021; Domínguez-Álvaro et al. 2021). En la rata juvenil, sin embargo, las sinapsis perforadas fueron solo el 7% de las sinapsis (Santuy et al. 2018a), lo que puede deberse a los diferentes momentos de desarrollo analizados. Por otro lado, en las sinapsis establecidas en la capa IV por axones procedentes del tálamo, las sinapsis complejas son mucho más frecuentes, conformando hasta el 52% de las sinapsis analizadas (Rodríguez-Moreno et al. 2018). De hecho, en nuestras muestras la capa IV es la capa con más sinapsis complejas, lo que podría deberse, al menos en parte, a las proyecciones talamocorticales.

También hemos observado que las sinapsis en herradura están más asociadas a las sinapsis simétricas de lo que cabría esperar por azar, tendencia que se ha reportado también en muestras de la corteza entorrinal y de la región CA1 del hipocampo humanos

(Domínguez-Álvaro et al. 2021; Montero-Crespo et al. 2020), y en la corteza somatosensorial de la rata juvenil (Santuy et al. 2018a). Este hecho es más difícil de explicar, aunque podría tratarse de una característica propia de algún tipo de neurona inhibitoria, aún por determinar.

28.4 Relación entre la forma y el tamaño de las sinapsis

En nuestro estudio, las sinapsis más pequeñas fueron siempre las maculares. Estas diferencias de tamaño parecen conservarse entre diferentes especies y en diferentes regiones cerebrales (Hsu et al. 2017; Santuy et al. 2018a), y se han observado también en humanos (Montero-Crespo et al. 2020; Domínguez-Álvaro et al. 2021; Cano-Astorga et al. 2021). Las sinapsis complejas se encuentran predominantemente en la cola de la derecha de la distribución de frecuencias del área de las SAS, sobre todo en el caso de las sinapsis asimétricas, pero aun así sus tamaños se solapan en parte con las sinapsis maculares. En estudios realizados en el hipocampo se ha observado que las proporciones de sinapsis perforadas, en herradura y fragmentadas cambian tras la inducción de potenciación a largo plazo (Geinisman et al. 1993; Toni et al. 2001). Un estudio reciente muestra cómo estos cambios se inician rápidamente, ya que las densidades postsinápticas empiezan a agrandarse desde los primeros minutos del experimento, aumentando de forma paralela el porcentaje de espinas con densidades postsinápticas complejas (perforadas, en herradura y fragmentadas) (Sun et al. 2021).

Teniendo en cuenta lo que acabamos de ver, y si consideramos las sinapsis como estructuras dinámicas, resulta tentador sugerir que las diferentes formas de las sinapsis no pertenecen a grupos diferenciados, sino que cada sinapsis individual puede adquirir diferentes formas según crece o decrece durante los procesos de plasticidad, implicando el crecimiento una forma más compleja, y viceversa. Desde este punto de vista, el hecho de que las sinapsis grandes y complejas (especialmente las perforadas) se encuentren con más frecuencia en proyecciones como las talamocorticales (Rodríguez-Moreno et al. 2018),

se debería a una actividad sináptica más alta o más sostenida en ese sistema, y no a una característica exclusiva de esas proyecciones.

29. El aparato de espina y su relación con las sinapsis

Gracias a la imágenes seriadas, hemos podido identificar los aparatos de espina y analizar las sinapsis localizadas en espinas que contenían esta estructura. Aproximadamente, un 30% de las sinapsis que se establecieron en espinas dendríticas, lo hicieron en espinas con aparato de espina. En la corteza visual (Arellano et al. 2007a) y somatosensorial (Kasthuri et al. 2015) del ratón se ha descrito que aproximadamente el 60% de las espinas presentaban aparato de espina. En estudios que marcan sinaptopodina, una molécula presente en el aparato de espina, aportan datos más parecidos a los encontrados en nuestra investigación, como el 25% (Bowen et al. 2017), el 30% (Vlachos et al. 2009), o el 26% (Korkotian et al. 2014) de espinas marcadas con sinaptopodina. El aparato de espina es más común en las espinas que reciben inervación talámica, ya que hasta el 75% de estas lo contienen (Rodríguez-Moreno et al. 2020).

En nuestros datos, hemos encontrado una asociación entre sinapsis axoespinosas simétricas (hasta el 43% de ellas) y espinas con aparato de espina. Como hemos visto anteriormente, las sinapsis simétricas localizadas en espinas casi siempre se encuentran en espinas multisinápticas, y en general comparten espina con sinapsis asimétricas. Nuestros resultados van en línea con lo observado en la corteza somatosensorial del ratón (Jasinska et al. 2016), donde encontraron que en espinas con una única sinapsis, la asociación al aparato de espina era del 20%, y el porcentaje se incrementaba hasta el 50% en espinas multisinápticas.

Las sinapsis asimétricas que se establecen sobre espinas con aparato de espina son más del doble de grandes, en promedio, que las que se establecen en espinas sin aparato. Este aumento de tamaño no se da en las sinapsis simétricas, pero debemos recordar de nuevo que estas sinapsis

inhibidoras suelen compartir espacio en la misma espina con otra sinapsis excitadora. La correlación entre la presencia de aparatos de espina, el incremento de tamaño de las densidades postsinápticas y el mayor volumen de la espina se ha observado en varios trabajos (Arellano et al. 2007a; Gemin et al. 2021; Hsu et al. 2017; Ofer et al. 2021). Recientemente se ha propuesto un mecanismo de acción por el cual el aparato de espina podría estar implicado en la plasticidad sináptica (Speranza et al. 2022). Cuando se aplican protocolos de depresión a largo plazo, las espinas que no tienen sinaptopodina (las que carecen de aparato de espina) son eliminadas selectivamente, mientras que las espinas con sinaptopodina se mantienen. Este proceso es dependiente de la activación de mGluR1, uno de los subtipos de receptor metabotrópico de glutamato. El receptor mGluR1 promueve la retención física de la sinaptopodina en las espinas con sinapsis excitadoras durante el protocolo de depresión a largo plazo. Mientras la sinaptopodina se retiene en las espinas, se activa la degradación lisosomal de la sinaptopodina que reside en los tallos dendríticos. De esta forma, el hecho de que una espina tuviera o no aparato de espina estaría relacionado con la interacción de la sinaptopodina y el receptor metabotrópico de glutamato, el cual se encuentra en la densidad postsináptica de las sinapsis excitadoras (Luján et al. 1996). La sinaptopodina también parece interactuar con el ácido retinoico. El tratamiento con ácido retinoico aplicado a neuronas de la corteza humana produce un aumento de las corrientes excitadoras postsinápticas espontáneas y el incremento del volumen de las espinas dendríticas. Dichos cambios se realizan mediante la interacción con sinaptopodina, ya que no se observaron en ratones deficientes de sinaptopodina (Lenz et al. 2021).

En nuestras muestras hemos encontrado que las sinapsis complejas (perforadas, en herradura o fragmentadas) se localizan en espinas con aparato de espina en más del 70% de las veces, mientras que las sinapsis maculares se localizan en espinas con aparato de espina en un bajo porcentaje (17.92%). Nuestras observaciones van acordes con lo reportado en otros estudios (Arellano

et al. 2007a; Spacek 1985; Spacek & Harris 1997), y probablemente están relacionadas con el hecho de que las sinapsis complejas son más grandes que las sinapsis maculares, como hemos discutido anteriormente.

30. Análisis de la distribución espacial de las sinapsis

En el análisis de la distribución espacial de las sinapsis observamos que en solo algunos casos la distribución espacial de las sinapsis es compatible con una distribución aleatoria, mientras que en la mayoría encontramos una leve tendencia a agruparse. Este resultado es diferente del obtenido en otros estudios que han llevado a cabo este tipo de análisis.

Tanto en la corteza somatosensorial de la rata juvenil (Anton-Sanchez et al. 2014; Merchán-Pérez et al. 2014), como en las cortezas frontal (Blazquez-Llorca et al. 2013), temporal (Cano-Astorga et al. 2021), transentorrinal (Domínguez-Álvaro et al. 2018) y en la región CA1 del hipocampo humano (Montero-Crespo et al. 2020) y de la rata (Blazquez-Llorca et al. 2021) se ha descrito que las sinapsis se distribuyen aleatoriamente. Es posible que en el ratón, al presentar una densidad de contactos sinápticos mucho más alta que el humano y la rata (DeFelipe et al. 2002), sus sinapsis muestren una tendencia a empaquetarse que no sería detectable con densidades más bajas.

31. Análisis de las mitocondrias de la corteza somatosensorial

Establecer, remodelar y mantener las sinapsis consume gran cantidad de energía. Por ello, en las neuronas, las mitocondrias son esenciales para apoyar la transmisión sináptica, tanto en condiciones basales como durante los procesos de plasticidad (Rangaraju et al. 2019). Para analizar las mitocondrias en el tejido hemos implementado el método de Cavalieri, que nos proporciona una estimación del volumen ocupado por estos orgánulos. Hemos encontrado que el 8.25% del volumen analizado está ocupado por mitocondrias.

La fracción de volumen mitocondrial que se ha descrito en la rata juvenil es menor no solo de media (5.62%) sino capa por capa (Santuy et al. 2018c). Teniendo en cuenta que el mayor gasto energético en el tejido nervioso se dedica a la actividad sináptica (Howarth et al. 2012; Rossi & Pekkurnaz 2019), esta diferencia podría explicarse porque la densidad de sinapsis encontrada en nuestras muestras en el ratón (1.38 sinapsis/ μm^3) es claramente mayor que en la rata juvenil (0.89 sinapsis/ μm^3).

Aproximadamente, la mitad del volumen mitocondrial se localizó en dendritas, seguido del volumen mitocondrial localizado en axones (un 35%), aportando el 16% del volumen las mitocondrias establecidas en elementos no sinápticos. Es la tendencia generalizada que se ha observado en otros estudios. Por ejemplo, en el trabajo de (Kasthuri et al. 2015), en una sola muestra de la capa V de la corteza somatosensorial del ratón, se observa la misma tendencia, con el 49% del volumen mitocondrial perteneciente al compartimento dendrítico, un 44% del volumen localizado en los axones y finalmente un 7% de volumen en elementos gliales. En el trabajo de (Turner et al. 2022), en el que calculan el volumen mitocondrial perteneciente a cada compartimento neuronal (axón, soma, dendritas apicales, dendritas basales), encontraron que las mitocondrias dendríticas, tanto basales como apicales, representan el mayor volumen mitocondrial, mientras que las mitocondrias axónicas son las de menor volumen.

Hemos observado también un gran incremento de la fracción de volumen mitocondrial en axones del ratón adulto (35%) respecto al porcentaje encontrado en la rata juvenil (15%), utilizando la misma metodología (Santuy et al. 2018c). Las mitocondrias en dendritas correspondieron con el 44% del volumen mitocondrial, porcentaje similar al encontrado en el ratón. Sin embargo, el 41% del volumen mitocondrial en elementos no sinápticos en la rata juvenil fue mucho mayor que el observado en nuestras muestras. Dejando aparte las posibles variaciones entre especies, es posible que estas diferencias se deban al desarro-

llo incompleto de la corteza cerebral en la rata juvenil.

La fracción de volumen mitocondrial en axones excitadores fue mayoritaria (68%) en nuestras muestras, seguida de las que se localizaban en axones inhibidores (24%), siendo minoritarias las establecidas en axones mielínicos (8%). Esta tendencia es la misma que en la rata juvenil (Santuy et al. 2018c). Al igual que en la rata juvenil, solo hemos observado mitocondrias en axones mielínicos en las capas profundas, desde la capa IV a la VI, que podrían pertenecer a neuronas excitadoras que proyectan hacia o desde otras regiones corticales y subcorticales (Watson et al. 2011). Sin embargo, se ha descrito otra posibilidad, ya que se ha cuantificado que entre el 5% y el 20% de los axones mielínicos podrían pertenecer a interneuronas inhibitorias (Micheva et al. 2016). Con nuestra metodología actual, no podemos discriminar si los axones mielínicos son excitadores o inhibidores, por lo que hemos preferido dejarlos sin asignar a la espera de futuros estudios.

Una observación interesante es que muy rara vez encontramos una mitocondria en el interior de una espina dendrítica —de un total de 9121 espinas dendríticas, solo encontramos 2 espinas que contenían mitocondrias—. Resultados similares se han encontrado en otros estudios en la corteza somatosensorial del ratón adulto (Kasthuri et al. 2015), en el que se han descrito 3 espinas con mitocondrias de 1425 espinas analizadas, o en la rata juvenil (Santuy et al. 2018c) en la que no se encontraron mitocondrias en las espinas dendríticas. La presencia de mitocondrias en las espinas dendríticas parece ser más común en el hipocampo (Chicurel & Harris 1992; Li et al. 2004) que en la isocorteza. A pesar de carecer de mitocondrias y de actuar como compartimentos funcionales independientes (Cornejo et al. 2022; Yuste 2013), las espinas dendríticas se ven afectadas por la actividad mitocondrial más próxima a ellas (Rangaraju et al. 2019).

Como hemos comentado con anterioridad, la función sináptica es en la que más gasto energético se invierte en las neuronas (Howarth et al. 2012; Rossi & Pekkurnaz 2019).

Por ello, cabría esperar que hubiera una correlación entre la fracción de volumen mitocondrial y la densidad sináptica. Aunque no hemos encontrado esta correlación, cuando consideramos todas las capas en conjunto, sí que podemos afirmar que las capas más ricas en sinapsis (I y IV), tienen también una fracción de volumen mitocondrial alta, mientras que la capa VI, que es la más pobre en sinapsis, tiene una menor fracción de volumen mitocondrial. La correlación se rompe, sin embargo, en capas como la II, con muchas sinapsis y poco volumen mitocondrial, y la Vb, con pocas sinapsis y mucho volumen mitocondrial.

En la rata juvenil sí se ha descrito una correlación entre densidad de sinapsis y volumen mitocondrial que afecta a la corteza en conjunto (Santuy et al. 2018c). En el ratón joven (de 36 días de edad), se encontró también una correlación, esta vez entre el volumen mitocondrial por longitud y la densidad sináptica lineal en las regiones distales de las dendritas (Turner et al. 2022). Las diferencias con nuestro estudio podrían deberse a los procesos de reestructuración sináptica, que en los animales jóvenes aún no ha concluido (Juraska & Drzewiecki 2020), y que podrían requerir más energía durante ese periodo madurativo, haciendo más evidente la correlación entre volumen mitocondrial y densidad sináptica. Al progresar la maduración, por razones que desconocemos, esta correlación se rompería en algunas capas, difuminado la correlación general visible en estadios anteriores. Una explicación podría ser que no sea solo el número de sinapsis el que condiciona la cantidad de mitocondrias, sino una combinación entre el número de sinapsis y su actividad, por lo que una capa con pocas sinapsis, pero con una actividad sináptica intensa y sostenida, podría tener más mitocondrias que otra con más sinapsis, pero menor actividad.

32. Cuantificación de los cuerpos multivesiculares (CMVs) en el ratón adulto

Los CMVs forman parte de la vía endocítica y son imprescindibles para el mantenimiento de los procesos celulares como el transporte, reciclaje y

degradación de proteínas. Una de las dificultades a la hora de su estudio es la ausencia de un marcador específico para este orgánulo, lo que limita sobremanera las técnicas que pueden usarse para su identificación. En la actualidad, se pueden cuantificar con técnicas inmunohistoquímicas marcando moléculas que se encuentran enriquecidas en ellos, aunque ninguna es exclusiva de los CMVs. El uso de microscopía electrónica en tres dimensiones como la que se ha utilizado en este trabajo, nos ha permitido realizar la identificación de 3263 CMVs y la reconstrucción de 1617 CMVs. De esta manera hemos podido cuantificar parámetros como su distribución espacial, su tamaño, su forma, o los contactos posibles con otros orgánulos.

32.1 Densidad de los CMVs en el neuropilo

La densidad de CMVs encontrada en el neuropilo de la corteza somatosensorial del ratón adulto (0.20 CMVs/ μm^3) fue prácticamente la misma que la descrita en la corteza somatosensorial de la rata juvenil (0.21 CMVs/ μm^3) (Turegano-Lopez et al. 2019). Aunque en ambos casos las diferencias entre las distintas capas corticales no fueron estadísticamente significativas, el perfil de las gráficas de densidad de CMVs por capa cortical fue muy similar en ambos estudios. En el presente estudio observamos una correlación moderada entre la densidad de CMVs y la densidad de sinapsis ($R^2 = 0.37$), aún así, una correlación más fuerte que en la rata juvenil (Turegano-Lopez et al. 2019).

Diversos estudios han mostrado una asociación entre los CMVs y las sinapsis. Por ejemplo, en los ratones deficientes en la proteína Rab 11, una proteína reguladora de la función de reciclaje endosomal, la LTP está bloqueada, siendo los endosomas de reciclaje los que, en condiciones fisiológicas, proveen la membrana para el crecimiento de las espinas derivado de dicha potenciación (Nishino et al. 2019; Park et al. 2006). Recientemente se ha observado también que, después de la aplicación de protocolos de LTP, hay un incremento de espinas dendríticas con endosomas en su interior, que a su vez proveen receptores postsinápticos (Kulik et al. 2019).

32.2 Localización de CMVs en axones, dendritas y elementos celulares no sinápticos

En todas las capas corticales, excepto en la capa Vb, encontramos los CMVs en un mayor porcentaje en axones (45%) que en dendritas (34%) y que en compartimentos no sinápticos (21%). En la rata juvenil ocurre lo contrario, ya que el mayor porcentaje de CMVs fue localizado en elementos no sinápticos (43%), seguidos de los CMVs dendríticos (39%) y axónicos (18%) (Turegano-Lopez et al. 2019). Tradicionalmente, también se han observado más CMVs en el compartimento somatodendrítico que en los axones (Rind et al. 2005; Von Bartheld & Altick 2011). Las diferencias observadas podrían depender del periodo del desarrollo observado. De hecho, parece haber diferencias en la regulación de la localización endosomal en dendritas maduras e inmaduras (Yap & Winckler 2022).

La proporción de CMVs en axones excitadores superó en 7 veces la proporción de CMVs en axones inhibidores, siendo los más minoritarios los CMVs en axones mielínicos, que aparecieron solo en las capas infragranulares. En la rata juvenil se ve la misma desproporción en los axones excitadores sobre los inhibidores, aunque no se encontraron en axones mielínicos, probablemente por el menor grado de mielinización en ese estadio del desarrollo (Turegano-Lopez et al. 2019). A los CMVs en el compartimento presináptico se los relaciona con las vesículas sinápticas. La existencia de marcadores endosomales (como Rab 5) en las vesículas sinápticas sugiere que han sido parte de endosomas o son capaces de fusionarse con ellos (Jähne et al. 2015; Morgan et al. 2013).

De los CMVs dendríticos, la mayoría se localizaron en dendritas con espinas (95%), porcentaje superior al observado en la rata juvenil (82%) (Turegano-Lopez et al. 2019). Algunos de los CMVs los hemos encontrado en el interior de espinas dendríticas (7.81% de los CMVs dendríticos). En estos casos las espinas también tenían aparatos de espina y sinapsis grandes y con formas complejas. Se han descrito con anterioridad endosomas residentes en espinas dendríticas, que podrían participar en el tráfico de proteínas

en el interior de la espina (Bowen et al. 2017). Además, estos endosomas podrían estar relacionados con una alta actividad sináptica, ya que se ha descrito que después de protocolos de LTP, los endosomas de reciclaje se movilizan hacia las espinas y son necesarios para el crecimiento de estas (Park et al. 2006).

32.3 Relación entre los CMVs y las mitocondrias

Hemos observado que aproximadamente 1 de cada 6 CMVs está en contacto directo con una mitocondria. Del total de CMVs cuantificados en cada compartimento, los CMVs se asociaron a las mitocondrias de forma más frecuente en las dendritas. Estos hechos se han descrito también en la rata juvenil (Turegano-Lopez et al. 2019). La explicación de este hallazgo podría ser que los CMVs están involucrados en el transporte y degradación de componentes mitocondriales (Das et al. 2016; Sugiura et al. 2014). Por un lado, la función de transporte ha sido demostrada por la interacción transitoria “kiss and run” entre CMVs y mitocondrias, proceso en el que se transporta transferina. Por otro lado, la función degradativa está representada por la fusión entre CMVs y vesículas derivadas de mitocondrias cuyo destino es la degradación lisosomal. También se ha descrito recientemente que los CMVs transportan ARNm a lo largo de los axones y se asocian con los ribosomas, actuando como sitios locales de síntesis de proteínas. A menudo se detienen en las mitocondrias, llegando a estar hasta el 35% de los endosomas tardíos adyacentes a estas. En asociación con las mitocondrias, los endosomas actúan como plataformas para la síntesis de proteínas importantes para la integridad mitocondrial y la supervivencia de los axones (Cioni et al. 2019; Müntjes et al. 2021).

32.4 CMVs con extensiones tubulares

Los CMVs con extensiones tubulares son normalmente interpretados como endosomas tempranos cuyas funciones son la clasificación, el reciclaje y el transporte a la red trans-Golgi y a la membrana plasmática de su contenido (Huotari & Helenius 2011; Jovic et al. 2010; Von Bartheld & Altick 2011).

En nuestras muestras fueron minoritarios, ya que aproximadamente el 7% de los CMVs mostraron estas características morfológicas, dato también replicado en la rata juvenil (Turegano-Lopez et al. 2019). Los CMVs con extensiones tubulares se encontraron con más frecuencia entre los CMVs dendríticos, seguidos por los CMVs en elementos no sinápticos, y siendo muy minoritarios en los CMVs axónicos, lo cual coincide con la distribución mayoritaria de endosomas tempranos en el compartimento somatodendrítico (Parton et al. 1992; Rao et al. 2011).

32.5 Tamaño de los CMVs

Gracias a la reconstrucción tridimensional de los CMVs hemos podido medir su volumen. Los CMVs en nuestra muestra tuvieron un tamaño medio de $7.66 \times 10^{-3} \mu\text{m}^3$, algo menor al tamaño observado en la rata juvenil ($8.80 \times 10^{-3} \mu\text{m}^3$). El tamaño de los CMVs reportado en diferentes estudios ha sido altamente variable (Altick et al. 2009; Hanson & Cashikar 2012; Von Bartheld & Altick 2011). La distribución de frecuencia del tamaño de los CMVs se ajustaba a una curva log-normal, con una larga cola hacia la derecha representada por algunos CMVs minoritarios más grandes (Turegano-Lopez et al. 2019). Este tipo de curva se encuentra habitualmente en medidas fisiológicas y anatómicas (Buzsáki & Mizuseki 2014).

Hemos observado una correlación negativa entre el tamaño de CMVs y su densidad, es decir, cuanto más CMVs hay, de menor tamaño son. Es una tendencia que también se observa para la sinapsis, aunque en el caso de las sinapsis la correlación es más fuerte. También hemos encontrado diferencias de tamaño según las diferentes morfologías, localización en axones o dendritas, asociación a mitocondrias, y demás características analizadas. Puede haber varios factores limitantes que regulen el tamaño y la densidad de los CMVs. Por un lado, la membrana de los CMVs es de origen plasmático (Hanson & Cashikar 2012), por lo que un aumento en la formación de CMVs estaría limitado por el tamaño de la célula donde se originan. Por otro lado, los CMVs parecen aumentar de tamaño a lo largo de su maduración

(Altick et al. 2009), por lo que la cola derecha de la distribución de tamaños estaría formada predominantemente por endosomas tardíos. Las variaciones en tamaño han sido relacionadas con aspectos funcionales de los CMVs. Por ejemplo, no se ha encontrado actividad de la fosfatasa ácida en CMVs tempranos y de tamaño pequeño, la cual suele aparecer en estadios de maduración más tardíos (Altick et al. 2009). Los métodos que hemos utilizado, sin embargo, no nos permiten rechazar o verificar esas observaciones, por lo que es necesaria más investigación sobre qué diferencias de tamaño serían atribuibles a aspectos madurativos y funcionales.

32.6 Distribución espacial de los CMVs

Los CMVs se distribuyen mayoritariamente de forma aleatoria en el espacio, aunque encontramos que en aproximadamente un tercio de los casos los CMVs muestran una leve tendencia al agrupamiento. Una posible explicación a este hecho es la desigual distribución de los CMVs en los distintos compartimentos, ya que se encontraron con más frecuencia en los axones que en las dendritas o en los elementos no sinápticos. Para evaluar esta posibilidad necesitaríamos determinar la fracción de volumen ocupada por cada compartimento y relacionarla con su riqueza relativa en CMVs, lo cual será objeto de futuros estudios.

Conclusiones

1. Estudio de las sinapsis en el neuropilo

- 1.1 La densidad de sinapsis en la isocorteza del ratón es más alta que en la rata y que en el humano.
- 1.2 Las sinapsis excitadoras (asimétricas) son claramente predominantes, superando, en promedio, el 90% del total de sinapsis.
- 1.3 Las sinapsis asimétricas muestran una clara preferencia por las espinas dendríticas, donde se establecen en más del 85% de los casos, mientras que el 15% restante se establecen sobre tallos dendríticos.
- 1.4 Las sinapsis inhibitoras (simétricas) se establecen preferentemente en los tallos dendríticos (70%), pero también lo hacen sobre espinas dendríticas en un porcentaje importante (30%). Cuando ocurre esto último, generalmente comparten la misma espina con otra sinapsis, en este caso asimétrica.
- 1.5 En los tallos dendríticos predominan las sinapsis asimétricas sobre las simétricas en una proporción de 3 a 2 aproximadamente. No puede asumirse, por tanto, que una sinapsis es simétrica por el mero hecho de encontrarse en un tallo dendrítico, como vienen haciendo algunos autores en diversas publicaciones recientes.
- 1.6 Las sinapsis asimétricas son, en promedio, más grandes que las simétricas.
- 1.7 Las sinapsis que se establecen en los tallos dendríticos son, en promedio, más grandes que las que se establecen en las espinas dendríticas.
- 1.8 El tamaño de la sinapsis se correlaciona con su forma. La forma predominante es la macular, característica de las sinapsis pequeñas. A medida que crece el tamaño, el perímetro se vuelve más tortuoso y complejo, y son más frecuentes las sinapsis perforadas, en herradura y fragmentadas.
- 1.9 El tamaño y la forma de las sinapsis axoespinosas se correlaciona también con la presencia de aparato de espina a nivel postsináptico, de manera que en las espinas con aparato de espina se suelen establecer sinapsis grandes con formas complejas.
- 1.10 La distribución espacial de las sinapsis muestra una leve tendencia al agrupamiento, posiblemente como consecuencia de la alta densidad de sinapsis.

2. Estudio de las mitocondrias en el neuropilo

- 2.1 La fracción de volumen mitocondrial es relativamente alta, superando el 8% en promedio.
- 2.2 Aproximadamente la mitad del volumen mitocondrial se encuentra alojado en dendritas, seguido de aproximadamente un tercio en axones y el resto en elementos no sinápticos.
- 2.3 En algunas capas (I, IV y VI) se observa una relación entre la densidad sináptica y el volumen mitocondrial. En otras capas, sin embargo, esta relación se pierde (II, III, Va y Vb).

3. Estudio de los cuerpos multivesiculares en el neuropilo

- 3.1 La densidad de cuerpos multivesiculares se correlaciona con la densidad de sinapsis. Predominan en los axones, seguidos de las dendritas y de los elementos no sinápticos.
- 3.2 Uno de cada seis cuerpos multivesiculares se encuentra asociado a una mitocondria, lo que sugiere una importante implicación en el mantenimiento de estas.
- 3.3 La distribución espacial de los cuerpos multivesiculares es aleatoria o ligeramente agrupada, lo que podría deberse a su desigual distribución entre axones, dendritas y elementos no sinápticos.

4. Características distintivas de las capas de la isocorteza

Hemos encontrado diferencias entre las capas en todos los parámetros estudiados, referentes a las sinapsis, las mitocondrias y los cuerpos multivesiculares. Algunas de estas diferencias son suficientemente marcadas como para reconocerlas como características distintivas de ciertas capas, como detallamos a continuación:

4.1 La capa I es muy rica en sinapsis, siendo estas de pequeño tamaño. Contiene, además, gran cantidad de sinapsis inhibitoras. Presenta una fracción de volumen mitocondrial alta. Los cuerpos multivesiculares de esta capa son de pequeño tamaño.

4.2 Las capas II y III tienen una densidad de sinapsis media y sinapsis relativamente grandes. Las espinas dendríticas con aparato de espina son más frecuentes que en otras capas, de modo que más de un tercio de las sinapsis axoespinosas se establecen sobre ese tipo de espinas.

4.3 La capa IV es muy rica en sinapsis en general, siendo la más rica en sinapsis inhibitoras. En esta capa es frecuente encontrar sinapsis grandes con formas complejas (perforadas, en herradura) y tiene la fracción de volumen mitocondrial más alta.

4.4 En la capa V encontramos una cantidad inusualmente alta de sinapsis en tallos dendríticos. La capa Vb tiene, además, una densidad de sinapsis relativamente baja y una fracción de volumen mitocondrial relativamente alta.

4.5 La capa VI es la más pobre en sinapsis y tiene una fracción de volumen mitocondrial baja. En esta capa encontramos, además, el mayor porcentaje de espinas sin sinapsis.

Bibliografía

- Adrian M, Kusters R, Wierenga CJ, Storm C, Hoogenraad CC, Kapitein LC. 2014. Barriers in the brain: resolving dendritic spine morphology and compartmentalization. *Front. Neuroanat.* 8:
- Altick AL, Baryshnikova LM, Vu TQ, von Bartheld CS. 2009. Quantitative analysis of multivesicular bodies (MVBs) in the hypoglossal nerve: evidence that neurotrophic factors do not use MVBs for retrograde axonal transport. *J. Comp. Neurol.* 514(6):641–57
- Anton-Sanchez L, Bielza C, Merchán-Pérez A, Rodríguez J-R, DeFelipe J, Larrañaga P. 2014. Three-dimensional distribution of cortical synapses: a replicated point pattern-based analysis. *Front. Neuroanat.* 8:85
- Anton-Sanchez L, Larranaga P, Benavides-Piccione R, Fernaud-Espinosa I, DeFelipe J, Bielza C. 2017. Three-dimensional spatial modeling of spines along dendritic networks in human cortical pyramidal neurons. *PLoS One.* 12(6):e0180400
- Araya R, Jiang J, Eiselth KB, Yuste R. 2006. The spine neck filters membrane potentials. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 103(47):17961–66
- Araya R, Vogels TP, Yuste R. 2014. Activity-dependent dendritic spine neck changes are correlated with synaptic strength. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 111(28):
- Arellano JI, Benavides-Piccione R, DeFelipe J, Yuste R. 2007a. Ultrastructure of dendritic spines: correlation between synaptic and spine morphologies. *Front. Neurosci.* 1(1):14
- Arellano JI, Espinosa A, Fairén A, Yuste R, DeFelipe J. 2007b. Non-synaptic dendritic spines in neocortex. *Neuroscience.* 145(2):464–69
- Aziz W, Kraev I, Mizuno K, Kirby A, Fang T, et al. 2019. Multi-input Synapses, but Not LTP-Strengthened Synapses, Correlate with Hippocampal Memory Storage in Aged Mice. *Curr. Biol.* 29(21):3600-3610.e4
- Baddeley A, Turner R. 2005. spatstat: An R Package for Analyzing Spatial Point Patterns. *J. Stat. Softw.* 12(1):1–42
- Baddeley AJ, Møller RA, Howard CV, Boyde A. 1993. Analysis of a Three-Dimensional Point Pattern with Replication. *J. R. Stat. Soc. Ser. C Appl. Stat.* 42(4):641–68
- Bayés À, van de Lagemaat LN, Collins MO, Croning MDR, Whittle IR, et al. 2011. Characterization of the proteome, diseases and evolution of the human postsynaptic density. *Nat. Neurosci.* 14(1):19–21
- Bell M, Bartol T, Sejnowski T, Rangamani P. 2019. Dendritic spine geometry and spine apparatus organization govern the spatiotemporal dynamics of calcium. *J. Gen. Physiol.* 151(8):1017–34
- Benavides-Piccione R, Ballesteros-Yáñez I, DeFelipe J, Yuste R. 2002. Cortical area and species differences in dendritic spine morphology. *J. Neurocytol.* 31(3/5):337–46
- Benavides-Piccione R, Fernaud-Espinosa I, Robles V, Yuste R, DeFelipe J. 2013. Age-based comparison of human dendritic spine structure using complete three-dimensional reconstructions. *Cereb. Cortex N. Y. N 1991.* 23(8):1798–1810
- Benavides-Piccione R, Regalado-Reyes M, Fernaud-Espinosa I, Kastanauskaite A, Tapia-González S, et al. 2019. Differential Structure of Hippocampal CA1 Pyramidal Neurons in the Human and Mouse. *Cereb. Cortex.* bhz122 e16553 e41714 e1000781
- Bernardinelli Y, Nikonenko I, Muller D. 2014. Structural plasticity: mechanisms and contribution to developmental psychiatric disorders. *Front. Neuroanat.* 8:

-
- Berry KP, Nedivi E. 2017. Spine Dynamics: Are They All the Same? *Neuron*. 96(1):43–55
- Bhatt DH, Zhang S, Gan W-B. 2009. Dendritic Spine Dynamics. *Annu. Rev. Physiol.* 71(1):261–82
- Biederer T, Kaeser PS, Blanpied TA. 2017. Transcellular Nanoalignment of Synaptic Function. *Neuron*. 96(3):680–96
- Blazquez-Llorca L, Merchán-Pérez Á, Rodríguez J-R, Gascón J, DeFelipe J. 2013. FIB/SEM Technology and Alzheimer's Disease: Three-Dimensional Analysis of Human Cortical Synapses. *J. Alzheimers Dis.* 34(4):995–1013
- Blazquez-Llorca L, Miguéns M, Montero-Crespo M, Selvas A, Gonzalez-Soriano J, et al. 2021. 3D Synaptic Organization of the Rat CA1 and Alterations Induced by Cocaine Self-Administration. *Cereb. Cortex.* 31(4):1927–52
- Blazquez-Llorca L, Woodruff A, Inan M, Anderson SA, Yuste R, et al. 2015. Spatial distribution of neurons innervated by chandelier cells. *Brain Struct. Funct.* 220(5):2817–34
- Blumenstock S, Rodrigues EF, Peters F, Blazquez-Llorca L, Schmidt F, et al. 2017. Seeding and transgenic overexpression of alpha-synuclein triggers dendritic spine pathology in the neocortex. *EMBO Mol. Med.* 9(5):716–31
- Bopp R, Holler-Rickauer S, Martin KAC, Schuhknecht GFP. 2017. An Ultrastructural Study of the Thalamic Input to Layer 4 of Primary Motor and Primary Somatosensory Cortex in the Mouse. *J. Neurosci.* 37(9):2435–48
- Bopp R, Maçarico da Costa N, Kampa BM, Martin KAC, Roth MM. 2014. Pyramidal Cells Make Specific Connections onto Smooth (GABAergic) Neurons in Mouse Visual Cortex. *PLoS Biol.* 12(8):e1001932
- Bosch C, Martínez A, Masachs N, Teixeira CM, Fernaud I, et al. 2015. FIB/SEM technology and high-throughput 3D reconstruction of dendritic spines and synapses in GFP-labeled adult-generated neurons. *Front. Neuroanat.* 9:60
- Bowen AB, Bourke AM, Hiester BG, Hanus C, Kennedy MJ. 2017. Golgi-independent secretory trafficking through recycling endosomes in neuronal dendrites and spines. *eLife.* 6:e27362
- Branco T, Marra V, Staras K. 2010. Examining size–strength relationships at hippocampal synapses using an ultrastructural measurement of synaptic release probability. *J. Struct. Biol.* 172(2):203–10
- Broskey NT, Daraspe J, Humbel BM, Amati F. 2013. Skeletal muscle mitochondrial and lipid droplet content assessed with standardized grid sizes for stereology. *J. Appl. Physiol.* 115(5):765–70
- Bureau I, von Saint Paul F, Svoboda K. 2006. Interdigitated Paralemniscal and Lemniscal Pathways in the Mouse Barrel Cortex. *PLoS Biol.* 4(12):e382
- Buzsáki G, Mizuseki K. 2014. The log-dynamic brain: how skewed distributions affect network operations. *Nat. Rev. Neurosci.* 15(4):264–78
- Cadwell CR, Bhaduri A, Mostajo-Radji MA, Keefe MG, Nowakowski TJ. 2019. Development and Arealization of the Cerebral Cortex. *Neuron.* 103(6):980–1004
- Cane M, Maco B, Knott G, Holtmaat A. 2014. The Relationship between PSD-95 Clustering and Spine Stability In Vivo. *J. Neurosci.* 34(6):2075–86
- Cano-Astorga N, DeFelipe J, Alonso-Nanclares L. 2021. Three-Dimensional Synaptic Organization of Layer III of the Human Temporal Neocortex. *Cereb. Cortex.* 31(10):4742–64

- Chen JL, Villa KL, Cha JW, So PTC, Kubota Y, Nedivi E. 2012. Clustered Dynamics of Inhibitory Synapses and Dendritic Spines in the Adult Neocortex. *Neuron*. 74(2):361–73
- Cheng A, Hou Y, Mattson MP. 2010. Mitochondria and Neuroplasticity. *ASN Neuro*. 2(5):AN20100019
- Chicurel ME, Harris KM. 1992. Three-dimensional analysis of the structure and composition of CA3 branched dendritic spines and their synaptic relationships with mossy fiber boutons in the rat hippocampus. *J. Comp. Neurol*. 325(2):169–82
- Chivet M, Hemming F, Pernet-Gallay K, Fraboulet S, Sadoul R. 2012. Emerging role of neuronal exosomes in the central nervous system. *Front. Physiol*. 3:145
- Cioni J-M, Lin JQ, Holtermann AV, Koppers M, Jakobs MAH, et al. 2019. Late Endosomes Act as mRNA Translation Platforms and Sustain Mitochondria in Axons. *Cell*. 176(1):56-72.e15
- Clascá F, Rubio-Garrido P, Jabaudon D. 2012. Unveiling the diversity of thalamocortical neuron subtypes: Thalamocortical neuron diversity. *Eur. J. Neurosci*. 35(10):1524–32
- Colonnier M. 1968. Synaptic patterns on different cell types in the different laminae of the cat visual cortex. An electron microscope study. *Brain Res*. 9(2):268–87
- Colonnier M, Beaulieu C. 1985. An empirical assessment of stereological formulae applied to the counting of synaptic disks in the cerebral cortex. *J. Comp. Neurol*. 231(2):175–79
- Cooney JR, Hurlburt JL, Selig DK, Harris KM, Fiala JC. 2002. Endosomal compartments serve multiple hippocampal dendritic spines from a widespread rather than a local store of recycling membrane. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci*. 22(6):2215–24
- Cornejo VH, Ofer N, Yuste R. 2022. Voltage compartmentalization in dendritic spines in vivo. *Science*. 375(6576):82–86
- Das A, Nag S, Mason AB, Barroso MM. 2016. Endosome–mitochondria interactions are modulated by iron release from transferrin. *J Cell Biol*. jcb.201602069
- De Felipe J, Marco P, Fairén A, Jones EG. 1997. Inhibitory synaptogenesis in mouse somatosensory cortex. *Cereb. Cortex*. 7(7):619–34
- DeFelipe J. 1997. Types of neurons, synaptic connections and chemical characteristics of cells immunoreactive for calbindin-D28K, parvalbumin and calretinin in the neocortex. *J. Chem. Neuroanat*. 14(1):1–19
- DeFelipe J. 2015. The dendritic spine story: an intriguing process of discovery. *Front. Neuroanat*. 9:14
- DeFelipe J, Alonso-Nanclares, Arellano JI. 2002. Microstructure of the neocortex: Comparative aspects. *J. Neurocytol*. 31(3/5):299–316
- DeFelipe J, Fairén A. 1993. A simple and reliable method for correlative light and electron microscopic studies. *J. Histochem. Cytochem*. 41(5):769–72
- DeFelipe J, Fariñas I. 1992. The pyramidal neuron of the cerebral cortex: Morphological and chemical characteristics of the synaptic inputs. *Prog. Neurobiol*. 39(6):563–607
- DeFelipe J, Jones EG. 1988. *Cajal on the Cerebral Cortex: An Annotated Translation of the Complete Writings*. Oxford Unive. Press

-
- DeFelipe J, Marco P, Busturia I, Merchán-Pérez A. 1999. Estimation of the Number of Synapses in the Cerebral Cortex: Methodological Considerations. *Cereb. Cortex.* 9(7):722–32
- DeFelipe J, Markram H, Rockland KS. 2012. The neocortical column. *Front. Neuroanat.* 6:
- Domínguez-Álvaro M, Montero-Crespo M, Blazquez-Llorca L, DeFelipe J, Alonso-Nanclares L. 2019. 3D Electron Microscopy Study of Synaptic Organization of the Normal Human Transentorhinal Cortex and Its Possible Alterations in Alzheimer's Disease. *eneuro.* 6(4):ENEURO.0140-19.2019
- Domínguez-Álvaro M, Montero-Crespo M, Blazquez-Llorca L, DeFelipe J, Alonso-Nanclares L. 2021. 3D Ultrastructural Study of Synapses in the Human Entorhinal Cortex. *Cereb. Cortex.* 31(1):410–25
- Domínguez-Álvaro M, Montero-Crespo M, Blazquez-Llorca L, Insausti R, DeFelipe J, Alonso-Nanclares L. 2018. Three-dimensional analysis of synapses in the transentorhinal cortex of Alzheimer's disease patients. *Acta Neuropathol. Commun.* 6:20
- Ernster L, Gottfried Schatz. 1981. *Mitochondria: A Historical Review.* Rockefeller Univ. Press
- Ernster L, Schatz G. 1981. Mitochondria: a historical review. *J. Cell Biol.* 91(3):227s–55
- Fader CM, Colombo MI. 2009. Autophagy and multivesicular bodies: two closely related partners. *Cell Death Differ.* 16(1):70–78
- Faria-Pereira A, Morais VA. 2022. Synapses: The Brain's Energy-Demanding Sites. *Int. J. Mol. Sci.* 23(7):3627
- Fauth M, Tetzlaff C. 2016. Opposing Effects of Neuronal Activity on Structural Plasticity. *Front. Neuroanat.* 10:
- Feldmeyer D, Qi G, Emmenegger V, Staiger JF. 2018. Inhibitory Interneurons and their Circuit Motifs in the Many Layers of the Barrel Cortex. *Neuroscience.* 368:132–51
- Fermie J, Liv N, Ten Brink C, van Donselaar EG, Müller WH, et al. 2018. Single organelle dynamics linked to 3D structure by correlative live-cell imaging and 3D electron microscopy. *Traffic Cph. Den.* 19(5):354–69
- Filimonenko M, Stuffers S, Raiborg C, Yamamoto A, Malerød L, et al. 2007. Functional multivesicular bodies are required for autophagic clearance of protein aggregates associated with neurodegenerative disease. *J. Cell Biol.* 179(3):485–500
- Fishell G, Kepecs A. 2020. Interneuron Types as Attractors and Controllers. *Annu. Rev. Neurosci.* 43(1):1–30
- Friedrich RP, Tepper K, Röncke R, Soom M, Westermann M, et al. 2010. Mechanism of amyloid plaque formation suggests an intracellular basis of A β pathogenicity. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 107(5):1942–47
- Funk KE, Mrak RE, Kuret J. 2011. Granulovacuolar degeneration (GVD) bodies of Alzheimer's disease (AD) resemble late-stage autophagic organelles. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* 37(3):295–306
- Ganeshina O, Berry RW, Petralia RS, Nicholson DA, Geinisman Y. 2004a. Differences in the expression of AMPA and NMDA receptors between axospinous perforated and nonperforated synapses are related to the configuration and size of postsynaptic densities. *J. Comp. Neurol.* 468(1):86–95
- Ganeshina O, Berry RW, Petralia RS, Nicholson DA, Geinisman Y. 2004b. Synapses with a segmented, completely partitioned postsynaptic density express more AMPA receptors than other axospinous synaptic junctions. *Neuroscience.* 125(3):615–23

- Geinisman Y, Detoledo-Morrell L, Morrell F, Heller RE, Rossi M, Parshall RF. 1993. Structural synaptic correlate of long-term potentiation: Formation of axospinous synapses with multiple, completely partitioned transmission zones. *Hippocampus*. 3(4):435–45
- Gemin O, Serna P, Zamith J, Assendorp N, Fossati M, et al. 2021. Unique properties of dually innervated dendritic spines in pyramidal neurons of the somatosensory cortex uncovered by 3D correlative light and electron microscopy. *PLOS Biol*. 19(8):e3001375
- Gentile JE, Carrizales MG, Koleske AJ. 2022. Control of Synapse Structure and Function by Actin and Its Regulators. *Cells*. 11(4):603
- Giese KP, Aziz W, Kraev I, Stewart MG. 2015. Generation of multi-innervated dendritic spines as a novel mechanism of long-term memory formation. *Neurobiol. Learn. Mem.* 124:48–51
- Goetzl EJ, Boxer A, Schwartz JB, Abner EL, Petersen RC, et al. 2015. Altered lysosomal proteins in neural -derived plasma exosomes in preclinical Alzheimer disease. *Neurology*. 85(1):40–47
- Gray EG. 1959. Axo-somatic and axo-dendritic synapses of the cerebral cortex. *J. Anat.* 93(Pt 4):420–33
- Gundersen HJ, Bendtsen TF, Korbo L, Marcussen N, Møller A, et al. 1988. Some new, simple and efficient stereological methods and their use in pathological research and diagnosis. *APMIS Acta Pathol. Microbiol. Immunol. Scand.* 96(5):379–94
- Hanson PI, Cashikar A. 2012. Multivesicular body morphogenesis. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 28:337–62
- Harris JJ, Jolivet R, Attwell D. 2012. Synaptic Energy Use and Supply. *Neuron*. 75(5):762–77
- Harris KM, Weinberg RJ. 2012. Ultrastructure of Synapses in the Mammalian Brain. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 4(5):a005587–a005587
- Hazan L, Ziv NE. 2020. Activity Dependent and Independent Determinants of Synaptic Size Diversity. *J. Neurosci.* 40(14):2828–48
- Heck N, Benavides-Piccione R, eds. 2016. *Dendritic Spines: From Shape to Function*. Frontiers Media SA
- Herculano-Houzel S, Collins CE, Wong P, Kaas JH. 2007. Cellular scaling rules for primate brains. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 104(9):3562–67
- Hiester BG, Becker MI, Bowen AB, Schwartz SL, Kennedy MJ. 2018. Mechanisms and Role of Dendritic Membrane Trafficking for Long-Term Potentiation. *Front. Cell. Neurosci.* 12:391
- Hilgetag CC, Barbas H. 2009. Are there ten times more glia than neurons in the brain? *Brain Struct. Funct.* 213(4–5):365–66
- Hodge RD, Bakken TE, Miller JA, Smith KA, Barkan ER, et al. 2019. Conserved cell types with divergent features in human versus mouse cortex. *Nature*. 573(7772):61–68
- Holderith N, Lorincz A, Katona G, Rózsa B, Kulik A, et al. 2012. Release probability of hippocampal glutamatergic terminals scales with the size of the active zone. *Nat. Neurosci.* 15(7):988–97
- Holler S, Köstinger G, Martin KAC, Schuhknecht GFP, Stratford KJ. 2021. Structure and function of a neocortical synapse. *Nature*. 591(7848):111–16
- Houser CR, Barber RP, Vaughn JE. 1984. Immunocytochemical localization of glutamic acid decarboxylase in the dorsal lateral vestibular nucleus: Evidence for an intrinsic and extrinsic GABAergic innervation. *Neurosci. Lett.* 47(3):213–20

-
- Howard V, Reed M. 2004. *Unbiased Stereology: Three-Dimensional Measurement in Microscopy*. Garland Science
- Howarth C, Gleeson P, Attwell D. 2012. Updated Energy Budgets for Neural Computation in the Neocortex and Cerebellum. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 32(7):1222–32
- Hsu A, Luebke JI, Medalla M. 2017. Comparative ultrastructural features of excitatory synapses in the visual and frontal cortices of the adult mouse and monkey. *J. Comp. Neurol.* 525(9):2175–91
- Huotari J, Helenius A. 2011. Endosome maturation. *EMBO J.* 30(17):3481–3500
- Iascone DM, Li Y, Sümbül U, Doron M, Chen H, et al. 2020. Whole-Neuron Synaptic Mapping Reveals Spatially Precise Excitatory/Inhibitory Balance Limiting Dendritic and Somatic Spiking. *Neuron.* 106(4):566-578.e8
- Jähne S, Rizzoli SO, Helm MS. 2015. The structure and function of presynaptic endosomes. *Exp. Cell Res.* 335(2):172–79
- Janas AM, Sapoń K, Janas T, Stowell MHB, Janas T. 2016. Exosomes and other extracellular vesicles in neural cells and neurodegenerative diseases. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* 1858(6):1139–51
- Jasinska M, Siucinska E, Jasek E, Litwin JA, Pyza E, Kossut M. 2016. Effect of Associative Learning on Memory Spine Formation in Mouse Barrel Cortex. *Neural Plast.* 2016:1–11
- Jedlicka P, Vlachos A, Schwarzacher SW, Deller T. 2008. A role for the spine apparatus in LTP and spatial learning. *Behav. Brain Res.* 8
- Jones EG. 2009. The Origins of Cortical Interneurons: Mouse versus Monkey and Human. *Cereb. Cortex.* 19(9):1953–56
- Jovic M, Sharma M, Rahajeng J, Caplan S. 2010. The early endosome: a busy sorting station for proteins at the crossroads. *Histol. Histopathol.* 25(1):99–112
- Juraska JM, Drzewiecki CM. 2020. Cortical reorganization during adolescence: What the rat can tell us about the cellular basis. *Dev. Cogn. Neurosci.* 45:100857
- Kandel ER, Koester JD, Mack SH, Siegelbaum SA. 2021. *Principles of Neural Science, Sixth Edition*. McGraw-Hill Education
- Karimi A, Odenthal J, Drawitsch F, Boergens KM, Helmstaedter M. 2020. Cell-type specific innervation of cortical pyramidal cells at their apical dendrites. *eLife.* 9:e46876
- Kasthuri N, Hayworth KJ, Berger DR, Schalek RL, Conchello JA, et al. 2015. Saturated Reconstruction of a Volume of Neocortex. *Cell.* 162(3):648–61
- Keller A, White EL. 1987. Synaptic organization of GABAergic neurons in the mouse Sml cortex. *J. Comp. Neurol.* 262(1):1–12
- Kikuchi T, Gonzalez-Soriano J, Kastanauskaite A, Benavides-Piccione R, Merchan-Perez A, et al. 2020. Volume Electron Microscopy Study of the Relationship Between Synapses and Astrocytes in the Developing Rat Somatosensory Cortex. . 20
- Klumperman J, Raposo G. 2014. The complex ultrastructure of the endolysosomal system. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 6(10):a016857

- Kneussel M, Hausrat TJ. 2016. Postsynaptic Neurotransmitter Receptor Reserve Pools for Synaptic Potentiation. *Trends Neurosci.* 39(3):170–82
- Knott G, Marchman H, Wall D, Lich B. 2008. Serial Section Scanning Electron Microscopy of Adult Brain Tissue Using Focused Ion Beam Milling. *J. Neurosci.* 28(12):2959–64
- Korkotian E, Frotscher M, Segal M. 2014. Synaptopodin Regulates Spine Plasticity: Mediation by Calcium Stores. *J. Neurosci.* 34(35):11641–51
- Kraev IV, Godukhin OV, Patrushev IV, Davies HA, Popov VI, Stewart MG. 2009. Partial kindling induces neurogenesis, activates astrocytes and alters synaptic morphology in the dentate gyrus of freely moving adult rats. *Neuroscience.* 162(2):254–67
- Kubota Y, Hatada S, Kondo S, Karube F, Kawaguchi Y. 2007. Neocortical Inhibitory Terminals Innervate Dendritic Spines Targeted by Thalamocortical Afferents. *J. Neurosci.* 27(5):1139–50
- Kulik YD, Watson DJ, Cao G, Kuwajima M, Harris KM. 2019. Structural plasticity of dendritic secretory compartments during LTP-induced synaptogenesis. *eLife.* 8:e46356
- Kulkarni VV, Maday S. 2018. Neuronal endosomes to lysosomes: A journey to the soma. *J Cell Biol.* 217(9):2977–79
- Kurashige T, Takahashi T, Yamazaki Y, Hiji M, Izumi Y, et al. 2013. Localization of CHMP2B-immunoreactivity in the brainstem of Lewy body disease. *Neuropathology.* 33(3):237–45
- Kwon T, Merchán-Pérez A, Rial Verde EM, Rodríguez J-R, DeFelipe J, Yuste R. 2019. Ultrastructural, Molecular and Functional Mapping of GABAergic Synapses on Dendritic Spines and Shafts of Neocortical Pyramidal Neurons. *Cereb. Cortex.* 29(7):2771–81
- Lambert JT, Hill TC, Park DK, Culp JH, Zito K. 2017. Protracted and asynchronous accumulation of PSD95-family MAGUKs during maturation of nascent dendritic spines. *Dev. Neurobiol.* 77(10):1161–74
- Lees RM, Johnson JD, Ashby MC. 2020. Presynaptic Boutons That Contain Mitochondria Are More Stable. *Front. Synaptic Neurosci.* 11:37
- Lefort S, Tómm C, Floyd Sarria J-C, Petersen CCH. 2009. The Excitatory Neuronal Network of the C2 Barrel Column in Mouse Primary Somatosensory Cortex. *Neuron.* 61(2):301–16
- Lenz M, Kruse P, Eichler A, Straehle J, Beck J, et al. 2021. All-trans retinoic acid induces synaptic plasticity in human cortical neurons. *eLife.* 10:e63026
- Li Z, Okamoto K-I, Hayashi Y, Sheng M. 2004. The Importance of Dendritic Mitochondria in the Morphogenesis and Plasticity of Spines and Synapses. *Cell.* 119(6):873–87
- Lisman J. 2017. Glutamatergic synapses are structurally and biochemically complex because of multiple plasticity processes: long-term potentiation, long-term depression, short-term potentiation and scaling. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* 372(1715):20160260
- Lodato S, Arlotta P. 2015. Generating Neuronal Diversity in the Mammalian Cerebral Cortex. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 31(1):699–720
- Loomba S, Straehle J, Gangadharan V, Heike N, Khalifa A, et al. 2022. Connectomic comparison of mouse and human cortex. *Science.* Eabo0924
- Lu L, Hong W. 2014. From endosomes to the trans-Golgi network. *Semin. Cell Dev. Biol.* 31:30–39

-
- Luján R, Nusser Z, Roberts JDB, Shigemoto R, Somogyi P. 1996. Perisynaptic Location of Metabotropic Glutamate Receptors mGluR1 and mGluR5 on Dendrites and Dendritic Spines in the Rat Hippocampus. *Eur. J. Neurosci.* 8(7):1488–1500
- Maggio N, Vlachos A. 2014. Synaptic plasticity at the interface of health and disease: New insights on the role of endoplasmic reticulum intracellular calcium stores. *Neuroscience.* 281:135–46
- Markram H, Toledo-Rodriguez M, Wang Y, Gupta A, Silberberg G, Wu C. 2004. Interneurons of the neocortical inhibitory system. *Nat. Rev. Neurosci.* 5(10):793–807
- Matz J, Gilyan A, Kolar A, McCarvill T, Krueger SR. 2010. Rapid structural alterations of the active zone lead to sustained changes in neurotransmitter release. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 107(19):8836–41
- McLeod F, Boyle K, Marzo A, Martin-Flores N, Moe TZ, et al. 2020. Wnt Signaling Through Nitric Oxide Synthase Promotes the Formation of Multi-Innervated Spines. *Front. Synaptic Neurosci.* 12:575863
- Megías M, Emri Z, Freund TF, Gulyás AI. 2001. Total number and distribution of inhibitory and excitatory synapses on hippocampal CA1 pyramidal cells. *Neuroscience.* 102(3):527–40
- Merchán-Pérez A, Rodríguez J-R, Alonso-Nanclares L, Schertel A, Defelipe J. 2009. Counting Synapses Using FIB/SEM Microscopy: A True Revolution for Ultrastructural Volume Reconstruction. *Front. Neuroanat.* 3:18
- Merchán-Pérez A, Rodríguez J-R, González S, Robles V, DeFelipe J, et al. 2014. Three-Dimensional Spatial Distribution of Synapses in the Neocortex: A Dual-Beam Electron Microscopy Study. *Cereb. Cortex.* 24(6):1579–88
- Micheva KD, Wolman D, Mensh BD, Pax E, Buchanan J, et al. 2016. A large fraction of neocortical myelin ensheathes axons of local inhibitory neurons. *eLife.* 5:e15784
- Mihaljević B, Benavides-Piccione R, Bielza C, Larrañaga P, DeFelipe J. 2019. Classification of GABAergic interneurons by leading neuroscientists. *Sci. Data.* 6(1):221
- Mihaljević B, Larrañaga P, Benavides-Piccione R, Hill S, DeFelipe J, Bielza C. 2018. Towards a supervised classification of neocortical interneuron morphologies. *BMC Bioinformatics.* 19(1):511
- Mironov A. 2017. Stereological morphometric grids for ImageJ. *Ultrastruct. Pathol.* 41(1):126–126
- Misgeld T, Schwarz TL. 2017. Mitostasis in Neurons: Maintaining Mitochondria in an Extended Cellular Architecture. *Neuron.* 96(3):651–66
- Montero-Crespo M, Dominguez-Alvaro M, Rondon-Carrillo P, Alonso-Nanclares L, DeFelipe J, Blazquez-Llorca L. 2020. Three-dimensional synaptic organization of the human hippocampal CA1 field. *eLife.* 9:e57013
- Morales J, Alonso-Nanclares L, Rodríguez J-R, Defelipe J, Rodríguez A, Merchán-Pérez A. 2011. Espina: a tool for the automated segmentation and counting of synapses in large stacks of electron microscopy images. *Front. Neuroanat.* 5:18
- Morales J, Rodríguez A, Rodríguez J-R, Defelipe J, Merchán-Pérez A. 2013. Characterization and extraction of the synaptic apposition surface for synaptic geometry analysis. *Front. Neuroanat.* 7:20
- Morgan JR, Comstra HS, Cohen M, Faundez V. 2013. Presynaptic Membrane Retrieval and Endosome Biology: Defining Molecularly Heterogeneous Synaptic Vesicles. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 5(10):a016915–a016915

- Motta A, Berning M, Boergens KM, Staffler B, Beining M, et al. 2019. Dense connectomic reconstruction in layer 4 of the somatosensory cortex. *Science*. 366(6469):eaay3134
- Mountcastle VB. 1957. MODALITY AND TOPOGRAPHIC PROPERTIES OF SINGLE NEURONS OF CAT'S SOMATIC SENSORY CORTEX. *J. Neurophysiol.* 20(4):408–34
- Müntjes K, Devan SK, Reichert AS, Feldbrügge M. 2021. Linking transport and translation of mRNAs with endosomes and mitochondria. *EMBO Rep.* 22(10):
- Nishino H, Saito T, Wei R, Takano T, Tsutsumi K, et al. 2019. The LMTK1-TBC1D9B-Rab11A Cascade Regulates Dendritic Spine Formation via Endosome Trafficking. *J. Neurosci.* 39(48):9491–9502
- Ofer N, Berger DR, Kasthuri N, Lichtman JW, Yuste R. 2021. Ultrastructural analysis of dendritic spine necks reveals a continuum of spine morphologies. *Dev. Neurobiol.* 81(5):746–57
- Oliveira JF, Araque A. 2022. Astrocyte regulation of neural circuit activity and network states. *Glia*. 24178
- Palay SL, Palade GE. 1955. The fine structure of neurons. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* 1(1):69–88
- Palomero-Gallagher N, Zilles K. 2015. Chapter 22 - Isocortex. In *The Rat Nervous System (Fourth Edition)*, ed. G Paxinos, pp. 601–25. San Diego: Academic Press
- Parajuli LK, Urakubo H, Takahashi-Nakazato A, Ogelman R, Iwasaki H, et al. 2020. Geometry and the Organizational Principle of Spine Synapses along a Dendrite. *eneuro*. 7(6):ENEURO.0248-20.2020
- Park M, Salgado JM, Ostroff L, Helton TD, Robinson CG, et al. 2006. Plasticity-Induced Growth of Dendritic Spines by Exocytic Trafficking from Recycling Endosomes. *Neuron*. 52(5):817–30
- Parton RG, Simons K, Dotti CG. 1992. Axonal and dendritic endocytic pathways in cultured neurons. *J. Cell Biol.* 119(1):123–37
- Paxinos G, Franklin KBJ. 2004. *The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates*. Elsevier Academic Press
- Perea G, Navarrete M, Araque A. 2009. Tripartite synapses: astrocytes process and control synaptic information. *Trends Neurosci.* 32(8):421–31
- Peters A, Palay SL. 1996. The morphology of synapses. *J. Neurocytol.* 25(1):687–700
- Peters A, Palay SL, Webster HF. 1991. *The Fine Structure of the Nervous System: Neurons and Their Supporting Cells*. Oxford University Press
- Peters A, Proskauer C. 1980. Smooth or sparsely spined cells with myelinated axons in rat visual cortex. *Neuroscience*. 5(12):2079–92
- Pfeiffer T, Poll S, Bancelin S, Angibaud J, Inavalli VK, et al. 2018. Chronic 2P-STED imaging reveals high turnover of dendritic spines in the hippocampus in vivo. *eLife*. 7:e34700
- Pickett EK, Rose J, McCrory C, McKenzie C-A, King D, et al. 2018. Region-specific depletion of synaptic mitochondria in the brains of patients with Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol. (Berl.)*. 136(5):747–57
- Popov VI, Davies HA, Rogachevsky VV, Patrushev IV, Errington ML, et al. 2004. Remodelling of synaptic morphology but unchanged synaptic density during late phase long-term potentiation(ltp): A serial section electron micrograph study in the dentate gyrus in the anaesthetised rat. *Neuroscience*. 128(2):251–62

-
- Popov VI, Medvedev NI, Kraev IV, Gabbott PL, Davies HA, et al. 2008. A cell adhesion molecule mimetic, FGL peptide, induces alterations in synapse and dendritic spine structure in the dentate gyrus of aged rats: a three-dimensional ultrastructural study. *Eur. J. Neurosci.* 27(2):301–14
- Poskanzer KE, Yuste R. 2011. Astrocytic regulation of cortical UP states. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 108(45):18453–58
- Puelles L, Martínez de la Torre M, Martínez S. 2008. *Neuroanatomía*. Editorial Médica Panamericana S.A.
- Radwanska K, Medvedev NI, Pereira GS, Engmann O, Thiede N, et al. 2011. Mechanism for long-term memory formation when synaptic strengthening is impaired. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 108(45):18471–75
- Rangaraju V, Lauterbach M, Schuman EM. 2019. Spatially Stable Mitochondrial Compartments Fuel Local Translation during Plasticity. *Cell.* 176(1–2):73–84.e15
- Rao A, Simmons D, Sorkin A. 2011. Differential subcellular distribution of endosomal compartments and the dopamine transporter in dopaminergic neurons. *Mol. Cell. Neurosci.* 46(1):148–58
- Rind HB, Butowt R, von Bartheld CS. 2005. Synaptic targeting of retrogradely transported trophic factors in motoneurons: comparison of glial cell line-derived neurotrophic factor, brain-derived neurotrophic factor, and cardiotrophin-1 with tetanus toxin. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 25(3):539–49
- Risher WC, Patel S, Kim IH, Uezu A, Bhagat S, et al. 2014. Astrocytes refine cortical connectivity at dendritic spines. *eLife.* 3:e04047
- Rodríguez-Gómez JA, Kavanagh E, Engskog-Vlachos P, Engskog MKR, Herrera AJ, et al. 2020. Microglia: Agents of the CNS Pro-Inflammatory Response. *Cells.* 9(7):1717
- Rodríguez-Moreno J, Porrero C, Rollenhagen A, Rubio-Teves M, Casas-Torremocha D, et al. 2020. Area-Specific Synapse Structure in Branched Posterior Nucleus Axons Reveals a New Level of Complexity in Thalamocortical Networks. *J. Neurosci.* 40(13):2663–79
- Rodríguez-Moreno J, Rollenhagen A, Arlandis J, Santuy A, Merchan-Pérez A, et al. 2018. Quantitative 3D Ultrastructure of Thalamocortical Synapses from the “Lemniscal” Ventral Posteromedial Nucleus in Mouse Barrel Cortex. *Cereb. Cortex.* 28(9):3159–75
- Rossi MJ, Pekkurnaz G. 2019. Powerhouse of the mind: mitochondrial plasticity at the synapse. *Curr. Opin. Neurobiol.* 57:149–55
- Rossoll W, Bassell GJ. 2019. Crosstalk of Local Translation and Mitochondria: Powering Plasticity in Axons and Dendrites. *Neuron.* 101(2):204–6
- Sachse M, Urbé S, Oorschot V, Strous GJ, Klumperman J. 2002. Bilayered clathrin coats on endosomal vacuoles are involved in protein sorting toward lysosomes. *Mol. Biol. Cell.* 13(4):1313–28
- Santuy A, Rodríguez J-R, DeFelipe J, Merchán-Pérez A. 2018a. Study of the Size and Shape of Synapses in the Juvenile Rat Somatosensory Cortex with 3D Electron Microscopy. *eNeuro.* 5(1):
- Santuy A, Rodríguez JR, DeFelipe J, Merchan-Perez A. 2018b. Volume electron microscopy of the distribution of synapses in the neuropil of the juvenile rat somatosensory cortex. *Brain Struct. Funct.* 223(1):77–90
- Santuy A, Tomás-Roca L, Rodríguez J-R, González-Soriano J, Zhu F, et al. 2020. Estimation of the number of synapses in the hippocampus and brain-wide by volume electron microscopy and genetic labeling. *Sci. Rep.* 10(1):14014

- Santuy A, Turégano-López M, Rodríguez JR, Alonso-Nanclares L, DeFelipe J, Merchán-Pérez A. 2018c. A Quantitative Study on the Distribution of Mitochondria in the Neuropil of the Juvenile Rat Somatosensory Cortex. *Cereb. Cortex* N. Y. N 1991
- Schikorski T, Stevens CF. 1997. Quantitative Ultrastructural Analysis of Hippocampal Excitatory Synapses. *J. Neurosci.* 17(15):5858–67
- Schindelin J, Arganda-Carreras I, Frise E, Kaynig V, Longair M, et al. 2012. Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat. Methods.* 9(7):676–82
- Schneider CA, Rasband WS, Eliceiri KW. 2012. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nature Methods.* www.nature.com
- Schreij AMA, Fon EA, McPherson PS. 2016. Endocytic membrane trafficking and neurodegenerative disease. *Cell. Mol. Life Sci.* 73(8):1529–45
- Schüz A, Palm G. 1989. Density of neurons and synapses in the cerebral cortex of the mouse. *J. Comp. Neurol.* 286(4):442–55
- Shearer LJ, Petersen NO. 2019. Distribution and Co-localization of endosome markers in cells. *Heliyon.* 5(9):e02375
- Sheng M, Kim E. 2011. The Postsynaptic Organization of Synapses. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 3(12):a005678
- Song S, Sjöström PJ, Reigl M, Nelson S, Chklovskii DB. 2005. Highly Nonrandom Features of Synaptic Connectivity in Local Cortical Circuits. *PLoS Biol.* 3(3):e68
- Spacek J. 1985. Relationships between synaptic junctions, puncta adhaerentia and the spine apparatus at neocortical axo-spinous synapses. A serial section study. *Anat. Embryol. (Berl.).* 173(1):129–35
- Spacek J, Harris KM. 1997. Three-Dimensional Organization of Smooth Endoplasmic Reticulum in Hippocampal CA1 Dendrites and Dendritic Spines of the Immature and Mature Rat. *J. Neurosci.* 17(1):190–203
- Speranza L, Inglebert Y, De Sanctis C, Wu PY, Kalinowska M, et al. 2022. Stabilization of Spine Synaptopodin by mGluR1 Is Required for mGluR-LTD. *J. Neurosci.* 42(9):1666–78
- Sterio DC. 1984. The unbiased estimation of number and sizes of arbitrary particles using the disector. *J. Microsc.* 134(2):127–36
- Stewart MG, Davies HA, Sandi C, Kraev IV, Rogachevsky VV, et al. 2005. Stress suppresses and learning induces plasticity in CA3 of rat hippocampus: a three-dimensional ultrastructural study of thorny excrescences and their postsynaptic densities. *Neuroscience.* 131(1):43–54
- Stewart MG, Popov VI, Kraev IV, Medvedev N, Davies HA. 2014. Structure and Complexity of the Synapse and Dendritic Spine. In *The Synapse*, pp. 1–20. Elsevier
- Sugiura A, McLelland G-L, Fon EA, McBride HM. 2014. A new pathway for mitochondrial quality control: mitochondrial-derived vesicles. *EMBO J.* 33(19):2142–56
- Sun Y, Smirnov M, Kamasawa N, Yasuda R. 2021. Rapid Ultrastructural Changes in the PSD and Surrounding Membrane after Induction of Structural LTP in Single Dendritic Spines. *J. Neurosci.* 41(33):7003–14

-
- Sun Y, Smirnov M, Kamasawa N, Yasuda R. 2021. Rapid Ultrastructural Changes in the PSD and Surrounding Membrane after Induction of Structural LTP in Single Dendritic Spines. *J. Neurosci.* 41(33):7003–14
- Takahashi RH, Milner TA, Li F, Nam EE, Edgar MA, et al. 2002. Intraneuronal Alzheimer A β 42 Accumulates in Multivesicular Bodies and Is Associated with Synaptic Pathology. *Am. J. Pathol.* 161(5):1869–79
- Tang Y, Nyengaard JR, Pakkenberg B, Gundersen HJ. 1997. Age-induced white matter changes in the human brain: a stereological investigation. *Neurobiol. Aging.* 18(6):609–15
- Taniguchi H, Lu J, Huang ZJ. 2013. The Spatial and Temporal Origin of Chandelier Cells in Mouse Neocortex. *Science.* 339(6115):70–74
- Tarusawa E, Matsui K, Budisantoso T, Molnar E, Watanabe M, et al. 2009. Input-Specific Intrasynaptic Arrangements of Ionotropic Glutamate Receptors and Their Impact on Postsynaptic Responses. *J. Neurosci.* 29(41):12896–908
- The Petilla Interneuron Nomenclature Group (PING). 2008. Petilla terminology: nomenclature of features of GABAergic interneurons of the cerebral cortex. *Nat. Rev. Neurosci.* 9(7):557–68
- Toni N, Buchs P-A, Nikonenko I, Povilaitite P, Parisi L, Muller D. 2001. Remodeling of Synaptic Membranes after Induction of Long-Term Potentiation. *J. Neurosci.* 21(16):6245–51
- Tracey D. 2004. CHAPTER 25 - Somatosensory System. In *The Rat Nervous System (Third Edition)*, ed. G Paxinos, pp. 797–815. Burlington: Academic Press
- Triarhou LC. 2006. The signalling contributions of Constantin von Economo to basic, clinical and evolutionary neuroscience. *Brain Res. Bull.* 69(3):223–43
- Trinh J, Farrer M. 2013. Advances in the genetics of Parkinson disease. *Nat. Rev. Neurol.* 9(8):445–54
- Trousdale C, Kim K. 2015. Retromer: Structure, function, and roles in mammalian disease. *Eur. J. Cell Biol.* 94(11):513–21
- Tsai H-C, Zhang F, Adamantidis A, Stuber GD, Bonci A, et al. 2009. Phasic Firing in Dopaminergic Neurons Is Sufficient for Behavioral Conditioning. *Science.* 324(5930):1080–84
- Turégano-López M, Rodríguez J-R, Alonso-Nanclares L, González-Soriano J, DeFelipe J, Merchán-Pérez A. 2021. Pre-Embedding Immunostaining of Brain Tissue and Three-Dimensional Imaging with FIB-SEM. In *Receptor and Ion Channel Detection in the Brain*, eds. R Lujan, F Ciruela, pp. 285–302. New York, NY: Springer US
- Turegano-Lopez M, Santuy A, DeFelipe J, Merchan-Perez A. 2019. Size, Shape, and Distribution of Multivesicular Bodies in the Juvenile Rat Somatosensory Cortex: A 3D Electron Microscopy Study. *Cereb. Cortex.* Bhz211
- Turegano-Lopez M, Santuy A, Kastanauskaite A, Rodriguez J-R, DeFelipe J, Merchan-Perez A. 2022. Single-Neuron Labeling in Fixed Tissue and Targeted Volume Electron Microscopy. *Front. Neuroanat.* 16:852057
- Turner NL, Macrina T, Bae JA, Yang R, Wilson AM, et al. 2022. Reconstruction of neocortex: Organelles, compartments, cells, circuits, and activity. *Cell.* 185(6):1082-1100.e24
- Valverde F. 2002. Estructura de la corteza cerebral. Organización intrínseca y análisis comparativo del neocórtex. *Rev. Neurol.* 34(08):758

- Villa KL, Berry KP, Subramanian J, Cha JW, Oh WC, et al. 2016. Inhibitory Synapses Are Repeatedly Assembled and Removed at Persistent Sites In Vivo. *Neuron*. 89(4):756–69
- Vingtdeux V, Sergeant N, Buee L. 2012. Potential contribution of exosomes to the prion-like propagation of lesions in Alzheimer’s disease. *Membr. Physiol. Membr. Biophys.* 3:229
- Vlachos A, Korkotian E, Schonfeld E, Copanaki E, Deller T, Segal M. 2009. Synaptopodin Regulates Plasticity of Dendritic Spines in Hippocampal Neurons. *J. Neurosci.* 29(4):1017–33
- Voet S, Prinz M, van Loo G. 2019. Microglia in Central Nervous System Inflammation and Multiple Sclerosis Pathology. *Trends Mol. Med.* 25(2):112–23
- Von Bartheld CS, Altick AL. 2011. Multivesicular bodies in neurons: distribution, protein content, and trafficking functions. *Prog. Neurobiol.* 93(3):313–40
- Wang Z, Edwards JG, Riley N, Provance Jr. DW, Karcher R, et al. 2008. Myosin Vb Mobilizes Recycling Endosomes and AMPA Receptors for Postsynaptic Plasticity. *Cell.* 135(3):535–48
- Watson C, Paxinos G, Puelles L. 2011. *The Mouse Nervous System*. Academic Press
- Woodman PG, Futter CE. 2008. Multivesicular bodies: co-ordinated progression to maturity. *Curr. Opin. Cell Biol.* 20(4):408–14
- Yamazaki Y, Takahashi T, Hiji M, Kurashige T, Izumi Y, et al. 2010. Immunopositivity for ESCRT-III subunit CHMP2B in granulovacuolar degeneration of neurons in the Alzheimer’s disease hippocampus. *Neurosci. Lett.* 477(2):86–90
- Yáñez IB, Muñoz A, Contreras J, Gonzalez J, Rodriguez-Veiga E, DeFelipe J. 2005. Double bouquet cell in the human cerebral cortex and a comparison with other mammals: Double Bouquet Cells In The Neocortex. *J. Comp. Neurol.* 486(4):344–60
- Yap CC, Winckler B. 2022. Spatial regulation of endosomes in growing dendrites. *Dev. Biol.* 486:5–14
- Yap K, Drakew A, Smilovic D, Rietsche M, Paul MH, et al. 2020. The actin-modulating protein synaptopodin mediates long-term survival of dendritic spines. *eLife.* 9:e62944
- Yuste R. 2010. *Dendritic Spines*. Cambridge, Mass: MIT Press
- Yuste R. 2013. Electrical Compartmentalization in Dendritic Spines. *Annu. Rev. Neurosci.* 36(1):429–49
- Yuyama K, Sun H, Usuki S, Sakai S, Hanamatsu H, et al. 2015. A potential function for neuronal exosomes: Sequestering intracerebral amyloid- β peptide. *FEBS Lett.* 589(1):84–88

Artículos anexados



Pre-Embedding Immunostaining of Brain Tissue and Three-Dimensional Imaging with FIB-SEM

Marta Turégano-López, José-Rodrigo Rodríguez, Lidia Alonso-Nanclares, Juncal González-Soriano, Javier DeFelipe, and Angel Merchán-Pérez

Abstract

FIB-SEM is an electron microscopy technique that allows the acquisition of serial sections in an automated manner. A Focused Ion Beam (FIB) is directed toward the specimen, removing material from its surface. Since the FIB can be positioned and controlled on a nanometer scale, the specimen surface can be milled so that a thin layer of a specified thickness is removed. The Scanning Electron Microscope (SEM) column is then used to acquire an image from the freshly milled surface. To obtain a series of images, the milling/imaging cycle is repeated automatically. This technique can be used with any pre-embedding method that yields an electron-dense end product. We describe here an immunocytochemical protocol to be used on vibratome brain sections. After the immunocytochemical procedure, the sections are flat embedded in epoxy resin and prepared for FIB-SEM imaging. Serial image acquisition, visualization, and analysis in 3D are also briefly described.

Key words Immunocytochemistry, Immunoperoxidase, Electron microscopy, Ultrastructure, Serial section, 3D reconstruction

1 Introduction

Serial section reconstruction is the gold standard method to unravel the extraordinarily complex ultrastructure of the brain. The use of serial sections in transmission electron microscopy (TEM) is a well-established technology for obtaining three-dimensional data from brain tissue [1–5]. Serial section TEM is based on the collection and imaging of ribbons of consecutive sections, obtained with a diamond knife. One of its main limitations is that ultrathin sectioning is a time-consuming and technically demanding task, often making it impossible to reconstruct large volumes of tissue. The development of automated techniques has overcome this limitation, and long series of sections can now be obtained (e.g., [6–11]).

One such technique, FIB-SEM, combines a Focused Ion Beam (FIB) and a Scanning Electron Microscope (SEM). The FIB column directs a gallium (Ga^+) ion beam toward the sample [12]. Low currents of Ga^+ can be used to visualize the surface of the sample, similar to the way in which the electron beam of the SEM is used. However, the main use of the FIB is to remove material from the specimen. This takes place when the Ga^+ ions collide with substrate atoms, detaching them from the surface. Given that the FIB can be focused and controlled on a nanometer scale, the region of interest on the specimen surface can be milled, removing a thin layer of material of a specified thickness. The SEM column is then used to acquire a backscattered electron image from the freshly milled surface. The milling/imaging cycle can be repeated automatically, so we can obtain long series of images that represent a three-dimensional volume of tissue [8].

The preparation of samples for FIB-SEM is similar to the preparation for conventional TEM and, in general, any protocol that can be performed in TEM can be adapted for FIB-SEM (Fig. 1). However, postembedding methods cannot be used in FIB-SEM, simply because our serial images are acquired from a surface that is progressively milled, so we do not have any physical sections. Although this may seem to be a disadvantage compared to TEM, it is compensated by the fact that milling is performed with no mechanical interaction with the sample, so it is more reliable and stable than sectioning performed with a diamond knife. We also avoid artifacts such as wrinkles, holes, and deformations, which are common in conventional ultramicrotomy. Moreover, the milling thickness can be much smaller than the thickness of ultrathin sections. For example, we routinely use a milling thickness of 20 nm, which would be impossible to obtain with a diamond knife; in fact, given that the FIB operates with a resolution of 1 nm, even smaller thicknesses are possible. Finally, although the sample is destroyed while milling, the window that you need to mill to acquire a stack of serial images is only a few tens of microns wide, so multiple stacks can be obtained from the same or adjacent regions. In this way, the variability within a given region, or between regions, can be analyzed statistically [13, 14].

In our laboratory, we have applied FIB-SEM imaging to the study of several aspects of the ultrastructure of the cerebral cortex in rodents, including the densities, distribution and sizes of synapses [14–16], the organization of mitochondria [17], and the distribution of multivesicular bodies [18]. In humans, it has been applied to the study of the synaptic organization in normal and pathological brain tissue [19–21]. We have also used FIB-SEM in combination with different labeling techniques, such as genetic labeling [22, 23], tract tracing [24, 25], and intracellular injections [26]. The common end product of these methods is an electron-dense precipitate obtained from 3,3'-Diaminobenzidine (DAB).

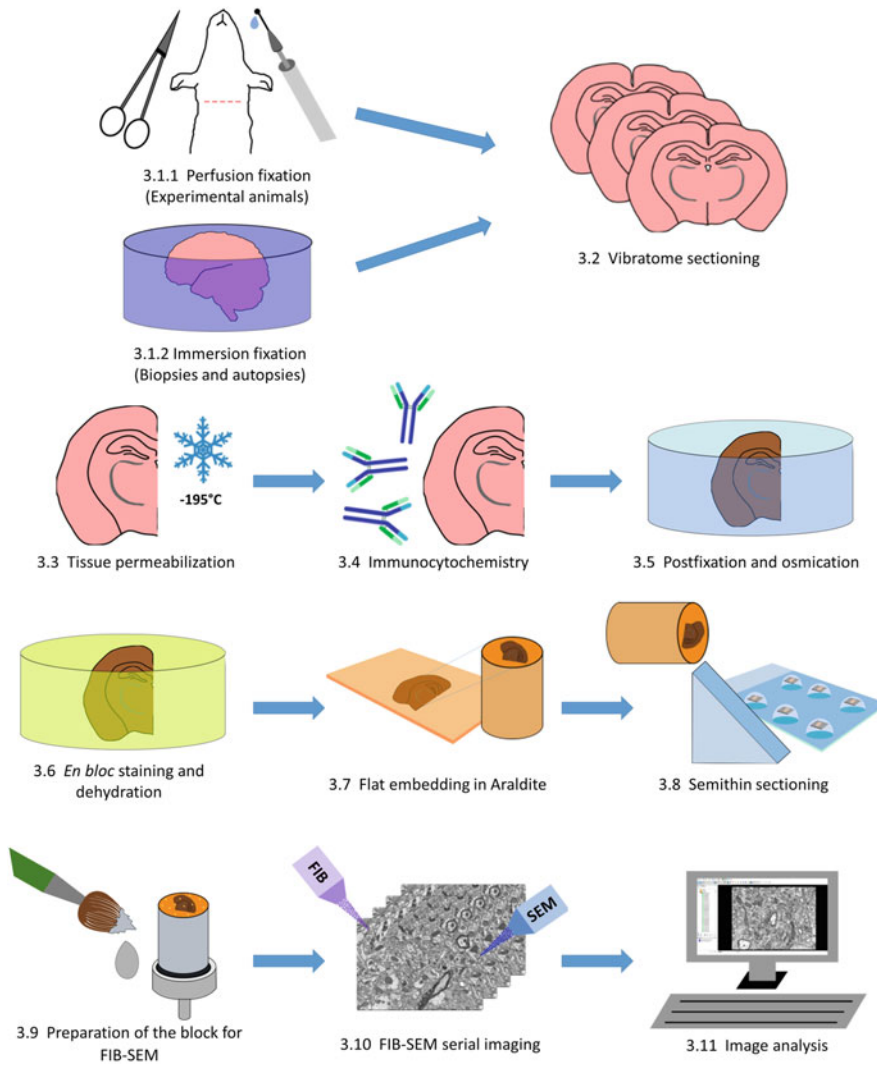


Fig. 1 General methodology. Schematic representation of the different steps for the preparation of brain tissue for pre-embedding immunocytochemistry and FIB-SEM imaging. Numbering corresponds to the paragraphs of Subheading 3. See text for details

Some of the electrons that collide with the heavy atoms present in the DAB precipitate bounce back and can be detected by the back-scattered electron detector of the SEM. In the following pages, we will describe a labeling method requiring aldehyde fixation, pre-embedding immunocytochemistry, and embedding in epoxy resin.

2 Materials

2.1 Solutions and Buffers

1. Saline solution. Dissolve 0.9% NaCl in distilled water.
2. Phosphate buffer (PB). Prepare a stock solution of 0.4 M PB, pH 7.4. Dissolve 10.6 g of sodium dihydrogen phosphate monohydrate ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, Sigma-Aldrich) and 56 g of potassium phosphate dibasic anhydrous (K_2HPO_4 , Sigma-Aldrich) in 1 L of distilled water. Adjust the pH to 7.4 with a 1 N solution of sodium hydroxide (4 g in 100 mL distilled water).
3. Cacodylate buffer (CB). Prepare a 0.4 M stock solution as follows—dissolve 42.8 g of sodium cacodylate trihydrate in 500 mL of distilled water. Prepare a solution of 0.4 M HCl by adding 10 mL of 37% HCl to 290 mL of distilled water. Adjust the pH to 7.4 by adding small quantities of 0.4 M HCl to the 0.4 M sodium cacodylate solution.

2.2 Anesthesia, Fixation and Tissue Preparation

1. Pentobarbital anesthesia (Nembutal).
2. Saline solution.
3. Paraformaldehyde (PFA) for perfusion or immersion fixation. The fixative must be freshly prepared before use. Add 8% PFA powder (EMS) to distilled water at 50 °C, under agitation, in a fume hood. When the solution clears, let it cool, filter, and mix two parts of 8% PFA, one part of distilled water, and one part of 0.4 M PB, to obtain a final concentration of 4% PFA in 0.1 M PB.
4. Pressure pump for perfusion fixation.
5. Buffer: 0.1 M PB, pH 7.4. Prepare the buffer from the stock solution: one part 0.4 M stock solution, three parts distilled water.
6. Vibration microtome (Vibratome, Leica).
7. 24-well culture plates (Falcon).

2.3 Tissue Permeabilization

1. Cryo-protectant solutions. Prepare a solution of 10% sucrose and another of 30% sucrose, in 0.1 M PB.
2. Liquid nitrogen in a Dewar flask.
3. Buffer: 0.1 M PB, pH 7.4.

2.4 Immunocytochemistry

1. Primary antibodies.
2. Biotinylated secondary antibodies (Vector Laboratories).
3. Normal goat serum (NGS, Vector Laboratories) or normal horse serum (NHS, Vector Laboratories), depending on the species of the secondary antibody.

4. Bovine Serum Albumin (BSA, Sigma-Aldrich).
5. Vectastain ABC elite kit (Vector Laboratories).
6. 3,3'-Diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB, Sigma-Aldrich). A 0.05% DAB solution in 0.1 M PB must be prepared before use, although it can also be stored at -20°C . Protect from light. DAB is potentially toxic; handle with gloves and face mask.
7. 30% hydrogen peroxide (Merck).
8. Buffer: 0.1 M PB, pH 7.4.
9. Diluted bleach. Glassware and plastic ware with DAB residues can be disposed of or cleaned in diluted bleach.

2.5 Postfixation and Osmication

1. Buffer: 0.1 M cacodylate buffer, pH 7.4.
2. The postfixation solution contains 2% PFA, 2.5% glutaraldehyde (GA), and 3 mM calcium chloride in 0.1 M cacodylate buffer, pH 7.4. Prepare PFA from powder as described above; GA is provided as a 25% aqueous solution (EM grade, TAAB) that must be stored in the refrigerator. GA and PFA are toxic; handle them in a fume hood with protective gloves. Prepare a stock solution of 0.3 M calcium chloride by dissolving 4.4 g of calcium chloride dihydrate (Sigma-Aldrich) in 100 mL of distilled water. Use the following proportions to prepare 100 mL of the final postfixation solution: 25 mL of 0.4 M CB, 39 mL of distilled water, 25 mL of 8% PFA, 10 mL of 25% GA—mix well and add 1 mL of 0.3 M calcium chloride.
3. 1% osmium tetroxide in 0.1 M cacodylate buffer with 7% glucose and 3 mM calcium chloride. Prepare a stock solution of 4% osmium tetroxide (Sigma-Aldrich) in distilled water. The stock solution can be stored at -20°C . Osmium is very volatile and toxic; always handle with gloves in a fume hood. Use the following proportions to prepare 10 mL of the final osmication solution: 2.5 mL of 0.4 M cacodylate buffer, 2.5 mL of 4% osmium tetroxide, 0.7 g of sucrose; add distilled water to reach 10 mL. Mix well and add 100 μL of 0.3 M calcium chloride. Protect from light.

2.6 En Bloc Staining with Uranyl Acetate and Dehydration

1. 1% uranyl acetate (Sigma-Aldrich) in 50% ethanol. Filter with a syringe filter (Millipore, 0.2 μm). Place in an oven at 37°C for 10 min before use.
2. Graded series of ethanol (Merck): 70%, 96%, and 100%.
3. Acetone (Merck).

2.7 Flat-Embedding in Araldite

1. Overhead stirrer.
2. Vacuum chamber.
3. Disposable aluminum tart molds.

4. Araldite components: Araldite 502 resin (TAAB E021), DDSA, distilled (TAAB D025), DBP (Dibutyl Phthalate, TAAB D011), BDMA (Accelerator, Benzyl Dimethylamine, TAAB B008). Prepare the Araldite mixture in a disposable aluminum mold just before use. Prepare at least 1 mL per section to be embedded. Use the following proportions: Araldite, 10 g; DDSA, 8 g; add 0.3 mL of DBP with a syringe; add 0.5 mL of BDMA with a different syringe. Mix well with an overhead mixer and place in a vacuum chamber for 30 min to remove bubbles.
5. Siliconized microscope slides. Silicone coating is used to prevent araldite from adhering to the glass slide. Microscope slides are immersed in silicone (Serva, 35130) for a few seconds and then placed vertically in a slide holder (Ted Pella, 21078-1) to let them drain. When they are still wet, they are placed in an oven at 100 °C for 1–2 h. Silicone-coated glass slides can be stored for months in dust-free slide boxes.
6. Aclar embedding film (Ted Pella, 10501-25).

2.8 Semithin Sectioning

1. Cyanoacrylate glue.
2. Ultramicrotome (Leica).
3. Glass knife maker (LKB).
4. Diamond knife (Diatome Histo).
5. Microscope slides treated with gelatin or any other adhesive for histology.
6. Toluidine blue for semithin section staining. Dissolve 1 g of sodium borate (borax, Sigma-Aldrich) in 100 mL of distilled water. Add 0.5 g of Toluidine blue (Sigma-Aldrich) and stir. Prepare at least a week before use. Keep in an amber jar, protected from light. Use a syringe and a syringe filter (Millipore, 0.2 µm) to stain semithin sections.
7. Histological hot plate.

2.9 Preparation of the Specimen Block for FIB-SEM

1. Aluminum SEM specimen stubs (Electron Microscopy Sciences, 75191).
2. Conductive carbon stickers (Electron Microscopy Sciences, 77825-09).
3. Silver paint (Electron Microscopy Sciences, 12630).
4. Vacuum desiccator.
5. Sputter coater (Quorum Emitech SC7620).

3 Methods

3.1 Fixation

3.1.1 Intracardial Perfusion (Rodents)

1. Animals are deeply anesthetized with an intraperitoneal injection of Pentobarbital (40 mg/kg).
2. Connect one bottle with saline and another with the fixative to the pressure pump system. Drain air bubbles from the tubing—first with fixative, then with the saline. Set pressure to 80 mmHg.
3. When the animal is deeply anesthetized, fix it to the perfusion table. Open the upper abdomen and thorax. Make a small incision in the left ventricle and insert a blunt cannula. When the tip of the cannula is placed in the root of the aorta, clamp the heart transversally to keep the cannula in place. Cut the right atrium and open the valve to let saline flow.
4. When all the blood has been flushed out, close the saline and open the fixative. As the animal begins to stiffen because of the fixative, the perfusion pressure can be gradually increased to 90 mmHg (mouse) or 120 mmHg (rat). Perfuse for 15–20 min. Note that once the thorax is opened, the animal can no longer breathe, so the procedure must be performed quickly to avoid brain anoxia. A well-perfused animal is stiff from head to tail. Discard the specimen if it dies before you can begin perfusion, if perfusion cannot be initiated quickly, or if the solutions do not flow.
5. Remove the brain from the skull and check that it has hardened and appears clean (free of blood).
6. Keep the brain in fixative at 4 °C until sectioning (*see Note 1*).
7. If you plan another perfusion, flush the fixative from the tubing with saline and repeat the procedure.

3.1.2 Immersion Fixation (Biopsies and Autopsies)

1. Use immersion fixation for tissue samples that cannot be perfused. This is particularly the case for human tissue obtained from biopsies and autopsies. In the latter case, it is important to shorten the postmortem time as much as possible, to avoid degradative processes. Preferably, fix autopsy tissue no later than 4 h after death. Submerge the samples in freshly prepared 4% PFA in 0.1 M PB at 4 °C for 24–48 h.

3.2 Vibratome Sectioning

1. Wash the brain thoroughly in PB for 1 h.
2. The brain is sectioned (50–150 µm thickness) with a vibrating microtome. Use cold 0.1 M PB to collect the sections serially. Using a soft paint brush, place the sections in 24-well plates with 0.1 M PB.

**3.3 Tissue
Permeabilization
(Freeze–Thaw)**

1. Place the vibratome sections in PB with 10% sucrose until they sink.
2. Place the sections in PB with 30% sucrose until they sink.
3. Put each section in a plastic beaker and immerse the beaker in liquid nitrogen. Do not allow the liquid nitrogen to come into direct contact with the section.
4. Once the section has completely frozen, remove the beaker from the liquid nitrogen.
5. Allow the section to thaw at room temperature for 3–5 min, and then place it in PB (*see Note 2*).

**3.4 Pre-Embedding
Immunocytochemistry**

1. Wash the sections three times, for 10 min each, with 0.1 M PB, pH 7.4. Place the 24-well plate containing the sections on an orbital shaker. Mild agitation will be used throughout the whole procedure.
2. Preincubate with 3% normal goat serum (NGS) or normal horse serum (NHS) in 0.1 M PB, for 2 h at room temperature. Use NGS or NHS according to the species from which the secondary antibody was obtained.
3. Dilute the primary antibody in 0.1 M PB containing 3% NGS/NHS, and incubate the sections for 12–48 h in a cold chamber or refrigerator, on the orbital shaker.
4. Allow the sections to reach room temperature for 15 min and wash three times, 10 min each, in 0.1 M PB containing 6% bovine serum albumin (BSA).
5. Dilute the appropriate biotinylated secondary antibody (Vectastain, Vector laboratories) 1/200 in 0.1 M PB containing 6% BSA. Incubate for 2 h at room temperature.
6. Prepare the ABC complex (Vectastain elite kit, Vector Laboratories). This complex must be prepared 30 min before use, so prepare it just before the end of the incubation in the secondary antibody. Use the following quantities per section: 4 μL of component A, 4 μL of component B, and 500 μL of 0.1 M PB. Shake well with a vortex shaker and protect from light until use.
7. Wash three times, 10 min each, in PB.
8. Incubate for 2 h at room temperature with the previously prepared ABC complex.
9. Wash three times, 10 min each, in PB.
10. Prepare a 0.05% DAB solution in PB with 0.01% hydrogen peroxide. The solution must be prepared immediately before use and must be protected from light. Use the following proportions of reagents: Mix 10 mg of DAB in 20 mL of 0.1 M PB; when the solution is clear, add 6.6 μL of hydrogen

peroxide (taken from a 30% solution of H_2O_2). Filter the DAB solution with a syringe filter (0.2 μm).

11. Incubate the sections in the DAB/hydrogen peroxide solution and monitor the reaction under the light microscope.
12. Stop the reaction by placing the sections in PB when the reaction product is visible as a brown precipitate (usually after 2–5 min of incubation).
13. Wash three times in PB, 10 min each.

3.5 Postfixation and Osmication

1. Wash three times, 10 min each, in 0.1 M cacodylate buffer, pH 7.4.
2. Postfix for 2 h in a solution of 2% PFA, 2.5% GA and 3 mM CaCl_2 in 0.1 M cacodylate buffer. Handle in a fume hood. Add and remove the fixative carefully with a Pasteur pipette to prevent sections from folding. Do not agitate.
3. Wash three times, 10 min each, in 0.1 M cacodylate buffer, pH 7.4.
4. Osmicate for 1 h in a solution of 1% osmium tetroxide, 7% glucose, and 3 mM CaCl_2 in 0.1 M cacodylate buffer. Osmium is very volatile and toxic; always handle in a fume hood, with protective glasses and gloves. Add and remove the osmium solution very carefully with a Pasteur pipette to prevent sections from folding or breaking. After osmication, the sections become brittle and break easily. Use a small spatula or weighting spoon to carefully manipulate them (*see Note 3*).
5. Wash three times in cacodylate buffer, 10 min each.
6. The sections may be stored overnight in the refrigerator.

3.6 En Bloc Uranyl Acetate Staining and Dehydration

1. Put the sections in the uranyl acetate solution in an oven at 37 °C for 30 min.
2. Dehydrate in graded series of ethanol and acetone as follows:

Ethanol 70%	10 min
Ethanol 96%	2 × 10 min
Ethanol 100%	3 × 10 min
Acetone	3 × 10 min

3.7 Flat Embedding in Araldite

1. Prepare a 1:1 mixture of acetone and freshly prepared araldite. Put the sections into aluminum molds with this mixture for 1 h (*see Note 4*).
2. Change to new molds with pure araldite, and keep at 4 °C overnight in a closed container with silica gel.

3. The next day, prepare new araldite and embed the sections for 3–4 h at room temperature in a closed container with silica gel.
4. Cover a siliconized microscope slide with an Aclar sheet that has been cropped to the same size as the slide. Place the section on the Aclar sheet and cover it with another Aclar sheet and another siliconized slide. Make sure bubbles are avoided. To flatten the section, you can put some small weights (e.g., small metal nuts) onto the upper siliconized slide.
5. Polymerize araldite in an oven at 60 °C for 48 h.
6. After polymerization, remove the siliconized slides, and peel off the Aclar sheets.

3.8 Semithin Sectioning

1. Trim the araldite sheet containing the section. For FIB-SEM imaging, the block face may be as large as a whole mouse brain hemisphere, so do not trim excessively.
2. Glue the trimmed section onto a blank araldite block with cyanoacrylate glue and leave it until the following day.
3. Semithin sectioning. Mount the block on the ultramicrotome. Begin taking semithin sections (1–2 µm thick) with a glass knife to remove most of the epoxy resin on top of the block. Change to a diamond knife and continue sectioning. Antibodies and reactants usually penetrate only a few microns into the tissue, so it is important to examine the semithin sections as they are being obtained. Continue sectioning until you have removed the resin that lies on the tissue of your region of interest. Once you reach the surface of the tissue, do not proceed too far, since the thin layer of tissue where penetration of reactants is optimal must remain just below the block face.
4. Collect semithin sections on a gelatinized microscope slide. They must be examined and photographed before staining. This will give you an idea about the distribution and visibility of the reaction product. Even if the reaction product is not visible, the last semithin section obtained is important because it will match the block face, so it will be useful to identify the region of interest in the FIB-SEM.
5. Toluidine blue staining. Use a syringe and a syringe filter (0.2 µm) to pour a drop of toluidine blue solution onto each semithin section. Place the microscope slide on a hot plate at 60 °C, and then rinse with tap water. Take a photograph of the last semithin section (*see Note 5*).

3.9 Preparation of the Block for FIB-SEM Imaging

1. Glue the block onto SEM specimen stubs with a conductive carbon sticker.
2. Silver paint. To facilitate charge dissipation, electrical continuity between the araldite block and the aluminum stub must be

ensured. To achieve this, the block is covered with silver paint (except for the upper surface). Make sure that the conductive sticker and the upper face of the aluminum stub are also covered. Care must be taken not to cover or spill silver droplets on the upper surface of the block. Let the paint dry for at least 24 h in a vacuum desiccator, where the blocks are stored until observation.

3. Gold-palladium sputtering. To ensure charge dissipation from the top surface of the block, which has not been painted with silver, the block is coated with gold-palladium for 30 s in a sputter coater. Carbon, gold alone, or other heavy metals are also suitable for sputtering (*see Note 6*).
4. Store the specimens in the vacuum desiccator until needed.

3.10 FIB-SEM Imaging

1. Place the blocks inside the SEM chamber. If possible, do this the previous day, so that the vacuum and temperature conditions are as stable as possible.
2. Take a panoramic picture of the surface of the block using the secondary electron detector. Begin with an accelerating voltage of 3–5 kV. If you do not see the tissue below the surface, increase the accelerating voltage. Although you will not have a clear view of the tissue that is underneath the block face, some structures such as blood vessels and cell bodies will usually be visible. To locate the region of interest more precisely, collate this microphotograph with the one you took from the last semithin section.
3. Place the region of interest in the point of coincidence: once you have located your region of interest, the block face must be positioned at the point of coincidence of the two beams (the electron beam and the ion beam), so we can image and mill the same location. To achieve this, move the microscope stage to the appropriate position. Alternate the secondary electron detector (with 4–6 kV SEM acceleration voltage) and a low FIB current (50 pA, 30 kV FIB acceleration voltage), until you see the same location (the region of interest) with both the SEM and the FIB.
4. Mill a coarse trench. Use the FIB to mill a coarse trench to have visual access to the tissue below the block surface. Use a 7 nA FIB current (30 kV accelerating voltage). We usually mill a trapezoidal trench, with the wide base toward the observer, to avoid shading effects. You will acquire images from the front side of the trapezoid (the face that is farthest from the observer), so make sure it is wide enough for your intended field of view. For example, if you plan to acquire $12 \times 10 \mu\text{m}$ images, the front side of the trapezoid must be at least $24 \mu\text{m}$ wide and $20 \mu\text{m}$ deep.

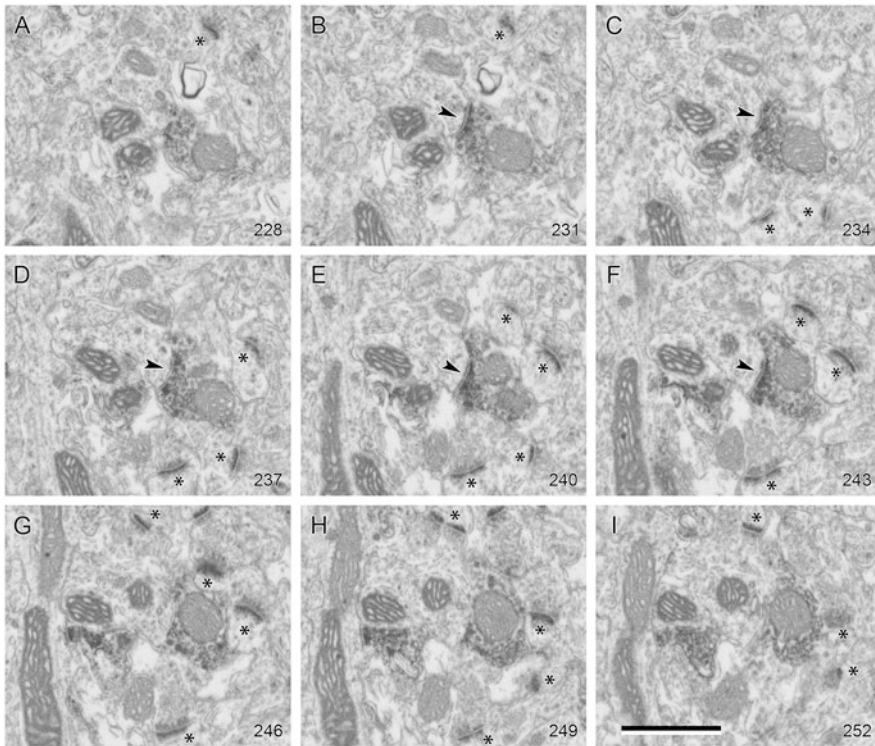


Fig. 2 FIB-SEM imaging. An example of a series of images obtained with FIB-SEM. A symmetric synapse is established by an axonal bouton that has been labeled with the vesicular GABA transporter (VGAT). The thin postsynaptic density corresponding to this inhibitory synapse is visible in frames B to F (arrowheads). Note that asymmetric synapses with much thicker postsynaptic densities are also visible in all panels (asterisks). Asymmetric synapses are established by unlabeled excitatory axons. Numbers in the bottom-right corner indicate the position of each frame in the original series of images. Calibration bar: 1 μm

5. Take an SEM image of the front side of the coarse trench. Use the same field of view and imaging conditions that you plan to use to acquire the final series of images. Use the back-scattered electron detector with an acceleration voltage between 0.6 and 2 kV. Dwell time and noise reduction settings must be chosen carefully. If you plan to acquire serial sections, the acquisition time per section is critical, since it will limit the total number of images that you will finally obtain. You can reduce image noise by increasing dwell time and by using more line averaging or integrating cycles. However, this will require a longer acquisition time. For example, if the acquisition time per section is 10 min, you will only obtain 6 images/h, or 60 images in a 10-hour session. If you mill 20 nm per section, your sample will only have 1.2 μm of depth. Thus, it is better to find a solution that represents a compromise between obtaining the best image quality possible and keeping the acquisition time to a

minimum. With our equipment (CrossBeam 540, Zeiss), a good quality image can be obtained in 1.5–3 min.

6. Set the milling conditions. To mill 20 nm per cycle (equivalent to section thickness), we use an FIB current of 1500 pA (30 kV acceleration voltage). This current can be decreased or increased if you need a smaller or larger section thickness. To avoid shading artifacts, we recommend that the milling window be at least twice as wide as the imaging window.
7. Start milling the front side of the trench. Begin a little behind the trench wall and let the FIB advance until it actually mills the surface. Wait until the whole surface is uniformly milled.
8. Start acquiring serial images. Once the milling appears to be uniform, you can begin acquiring SEM images (Fig. 2). The presence of milling/imaging artifacts is common during the first 20–40 min of the series, until the milling/imaging cycle stabilizes (*see Note 7*).
9. Check focus and drift regularly and pause the milling/imaging cycle if they need to be corrected (*see Note 8*).

3.11 Serial Section Alignment and Analysis

1. Serial section alignment (registration). Once the full series of images has been acquired, a small amount of drift is commonly noticeable, especially after long milling/imaging sessions. Thus, alignment of serial images—also known as registration—is necessary. We use ImageJ (<https://imagej.nih.gov/ij/>) or FIJI, which is a version of ImageJ with a collection of preinstalled plug-ins and other tools (<https://fiji.sc/>). We recommend using the “Register Virtual Stack Slices” plug-in. To avoid deformation of the original images, as well as size changes and other artifacts, we select a registration technique that only allows translation of individual images, with no rotation.
2. Image preprocessing. ImageJ or FIJI can also be used to perform image preprocessing. We usually prepare two versions of each stack; one is preprocessed with a Gaussian blur filter to remove noisy pixels, which is a requirement for the synapse segmentation algorithm. The other is the same stack with only brightness/contrast adjustments according to the user’s preferences.
3. Image visualization, segmentation in 3D, and analysis. We use EspINA software (<http://cajalbbp.es/espina/>), which has been specifically designed for 3D electron microscopy [27] (Fig. 3). Load the Gaussian blur stack in EspINA and select it as the “active stack.” This means that image segmentation operations will be performed on the Gaussian-blur stack. Load the brightness/contrast-adjusted stack and select it as the “visualization stack.” Both stacks will be superimposed, so on the screen you will see the visualization stack, while

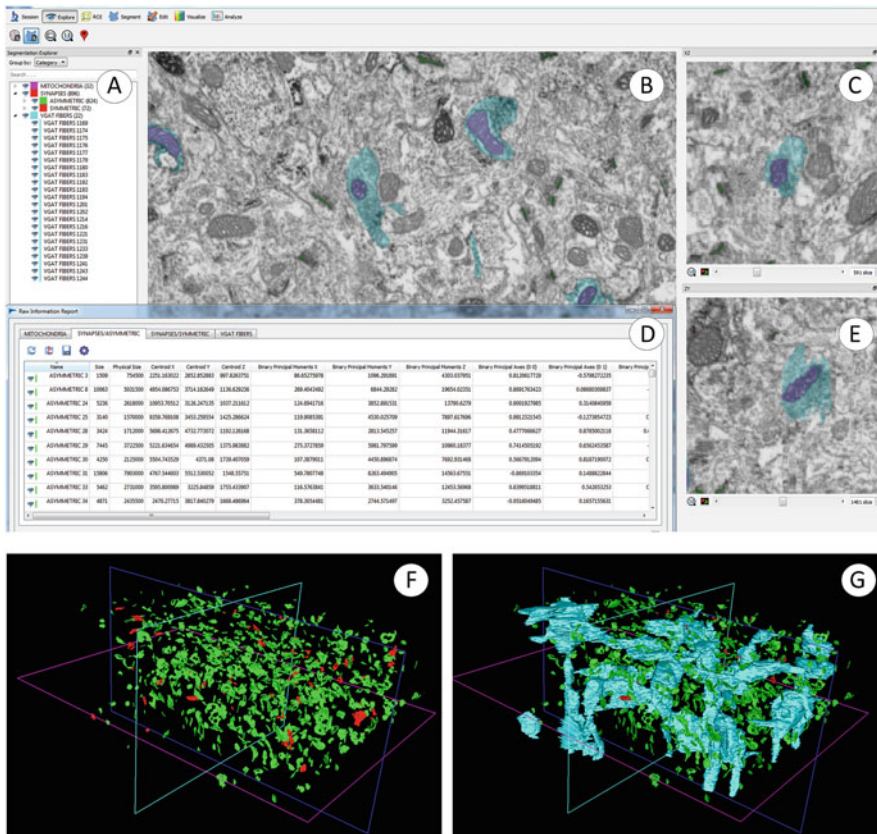


Fig. 3 Visualization and analysis of stacks of serial sections. A screenshot of the EspINA software is shown in panels **A** to **E**. The list of objects that have been segmented is shown in **A**. Serial sections can be navigated in three different panels (**B**, **C**, **E**). In panel **B**, images can be visualized through the original plane of section (XY); in panels **C** and **E**, the stack of sections has been re-sectioned through the other two orthogonal planes (XZ and ZY , respectively). Quantitative information regarding the segmented objects is displayed in panel **D**. The structures of interest can also be represented in 3D. Excitatory (green) and inhibitory (red) synaptic junctions have been represented in panel **F**. VGAT immunoreactive boutons (blue) have been represented in panel **G**, as well as synaptic junctions

segmentation and other operations are performed in the background on the Gaussian-blur stack. The dimensions of both stacks (pixel size and section thickness) are entered by the user.

- Synapse segmentation. The identification of synapses is carried out by the user based on the presence of the pre- and postsynaptic densities, and on the accumulation of synaptic vesicles in the presynaptic terminal. The segmentation of synapses relies on the fact that the pre- and postsynaptic densities are strongly electron-dense. The user must set a gray-level threshold and the segmentation algorithm will select the pixels of the synaptic junction that are darker than the chosen threshold. The resulting segmentation is a 3D object that comprises the pre- and

postsynaptic densities, since these are the two darkest regions of the synaptic junction.

5. Synapse classification and quantification. Synapses with a prominent postsynaptic density are tagged as “asymmetric” and synapses with a thin postsynaptic density are tagged as “symmetric” [28, 29] (*see Note 9*). The number of synapses per unit volume is calculated by using an unbiased three-dimensional counting frame [30], whose dimensions can be set by the user or optimized by the EspINA software. The size of synapses can be measured as the area of the synaptic apposition surface (SAS), which is equivalent to the area of the postsynaptic density that faces the synaptic cleft [31].
6. Identification of presynaptic elements and postsynaptic targets. Once all synapses have been segmented and classified, the pre- and postsynaptic elements that participate in each synapse can be identified according to simple criteria. For example, any nerve fiber that is presynaptic to at least one synapse is classified as an axon. Axons can be subdivided into excitatory and inhibitory, depending on the type of synapses that they establish (asymmetric or symmetric, respectively). Postsynaptic elements, such as dendritic spines, dendritic shafts, or cell bodies, can also be identified and tagged. In this way, we can calculate, for example, the proportions of synapses that are established by excitatory axons on dendritic spines or dendritic shafts, and we can compare them with synapses established by inhibitory axons [15].
7. Identification of other structures. Intracellular structures such as mitochondria and multivesicular bodies can be easily identified. Quantification of these structures may be performed after three-dimensional reconstruction, or with the help of stereological methods (*see, e.g., [17, 18]*). Other structures may be difficult to identify and may require specific labeling. For example, thin glial processes can be easily mistaken for thin dendritic branches. In this case, the intracellular injection of astrocytes has proven useful for the unambiguous identification of the glial processes [26].
8. Statistical analysis. EspINA software provides quantitative information of any structure that has been segmented within the stack of sections. This information includes the number, position, and size of each segmented object, as well as the category to which it belongs (*e.g., asymmetric synapse, inhibitory axon, or dendritic spine*). Different objects may be compared within the stack (*e.g., the number and size of asymmetric and symmetric synapses; or the volume of multivesicular bodies located in dendrites and axons*). Finally, given that multiple stacks of images can be acquired from the same or different regions of the brain, the intra- or interregional variability can also be statistically assessed (*see, e.g., [14, 15]*).

4 Notes

1. Although GA can be used at low concentrations (0.05–0.5%) during the initial fixation, we prefer to avoid this, since it impairs tissue antigenicity. To improve tissue preservation, we perform a postfixation step, *after* the immunocytochemical procedure, with a solution containing 2% PFA and 2.5% GA.
2. We do not recommend the use of detergents such as triton or saponin since their disruptive effects on membranes are usually noticeable. If they need to be used, we suggest conducting several trials to determine the lowest concentration that permeabilizes the tissue as desired.
3. The presence of glucose in the osmium tetroxide solution prevents the tissue from becoming too dark. This makes it possible to identify the DAB reaction product after osmication.
4. Other epoxy resins such as Durcupan are also suitable. In fact, we would advise against changing the resin you routinely use for TEM.
5. If you need to examine the semithin sections at higher resolution, they can be prepared for SEM imaging. In that case, use 0.5 μm -thick semithin sections, stained or not with toluidine blue, and collect them on specially prepared slides [32].
6. If the deposition layer is too thick, it will prevent visualization of what is underneath the surface of the block; this will make it difficult to locate the region of interest. On the other hand, a deposition layer that is too thin will cause charge build-up, although in this case, the problem can be easily solved by repeating the sputter-coating.
7. Common artifacts include vertical shades (curtaining) and horizontal waves. Curtaining is most commonly caused by an irregular block face, which in turn is caused by notches in the knife used for the semithin sectioning and/or dirt that accumulated on the block during processing. Horizontal waves may be caused by an out-of-focus FIB and/or an off-center FIB aperture. If artifacts persist after adjustment, the aperture may be damaged, or it may have reached its operational lifespan and need to be replaced.
8. Although not strictly necessary, the use of autofocus, autostigmation, and auto drift correction software is recommended if available.
9. This classification is an example that is especially useful in the cerebral cortex, where asymmetric synapses are excitatory and symmetric synapses are inhibitory. Synapses can also be classified based on size, shape, or any other criteria.

Acknowledgments

The authors would like to thank L. Valdés and M.C. Álvarez for their technical assistance and Nick Guthrie for his excellent text editing. This work was partially supported by grants from the following entities: Centro de Investigación en Red sobre Enfermedades Neurodegenerativas (CIBERNED, CB06/05/0066, Spain); and the Spanish Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades (grant PGC2018-094307-B-I00 and the Cajal Blue Brain Project [the Spanish partner of the Blue Brain Project initiative from EPFL, Switzerland]).

References

1. Stevens JK, Davis TL, Friedman N, Sterling P (1980) A systematic approach to reconstructing microcircuitry by electron microscopy of serial sections. *Brain Res* 2:265–293. [https://doi.org/10.1016/0165-0173\(80\)90010-7](https://doi.org/10.1016/0165-0173(80)90010-7)
2. Harris KM, Perry E, Bourne J et al (2006) Uniform serial sectioning for transmission electron microscopy. *J Neurosci* 26:12101–12103. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3994-06.2006>
3. Hoffpauir BK, Pope BA, Spirou GA (2007) Serial sectioning and electron microscopy of large tissue volumes for 3D analysis and reconstruction: a case study of the calyx of held. *Nat Protoc* 2:9–22. <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.9>
4. Bock DD, Lee W-CA, Kerlin AM et al (2011) Network anatomy and in vivo physiology of visual cortical neurons. *Nature* 471:177–182. <https://doi.org/10.1038/nature09802>
5. Lee TJ, Kumar A, Balwani AH et al (2018) Large-scale neuroanatomy using LASSO: loop-based automated serial sectioning operation. *PLoS One* 13:e0206172. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0206172>
6. Denk W, Horstmann H (2004) Serial block-face scanning electron microscopy to reconstruct three-dimensional tissue nanostructure. *PLoS Biol* 2:e329. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0020329>
7. Knott G, Marchman H, Wall D, Lich B (2008) Serial section scanning electron microscopy of adult brain tissue using focused ion beam milling. *J Neurosci* 28:2959–2964. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3189-07.2008>
8. Merchán-Pérez A, Rodríguez J-R, Alonso-Nanclares L et al (2009) Counting synapses using FIB/SEM microscopy: a true revolution for ultrastructural volume reconstruction. *Front Neuroanat* 3:18. <https://doi.org/10.3389/neuro.05.018.2009>
9. Kasthuri N, Hayworth KJ, Berger DR et al (2015) Saturated reconstruction of a volume of neocortex. *Cell* 162:648–661. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.06.054>
10. Kubota Y, Sohn J, Kawaguchi Y (2018) Large volume electron microscopy and neural microcircuit analysis. *Front Neural Circuits* 12:98. <https://doi.org/10.3389/fncir.2018.00098>
11. Helmstaedter M (2013) Cellular-resolution connectomics: challenges of dense neural circuit reconstruction. *Nat Methods* 10:501–507. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2476>
12. Langford RM (2006) Focused ion beams techniques for nanomaterials characterization. *Microsc Res Tech* 69:538–549. <https://doi.org/10.1002/jemt.20324>
13. Anton-Sanchez L, Bielza C, Merchan-Perez A et al (2014) Three-dimensional distribution of cortical synapses: a replicated point pattern-based analysis. *Front Neuroanat* 8:85. <https://doi.org/10.3389/fnana.2014.00085>
14. Merchán-Pérez A, Rodríguez J-R, González S et al (2014) Three-dimensional spatial distribution of synapses in the neocortex: a dual-beam electron microscopy study. *Cereb Cortex* 24:1579–1588. <https://doi.org/10.1093/cercor/bht018>
15. Santuy A, Rodríguez J-R, DeFelipe J, Merchan-Perez A (2018) Volume electron microscopy of the distribution of synapses in the neuropil of the juvenile rat somatosensory cortex. *Brain Struct Funct* 223:77–90. <https://doi.org/10.1007/s00429-017-1470-7>
16. Santuy A, Rodríguez J-R, DeFelipe J, Merchan-Perez A (2018) Study of the size and shape of synapses in the juvenile rat somatosensory cortex with 3D electron

- microscopy. *eNeuro* 5:e0377–17.2017. <https://doi.org/10.1523/ENEURO.0377-17.2017>
17. Santuy A, Turégano-López M, Rodríguez JR et al (2018) A quantitative study on the distribution of mitochondria in the neuropil of the juvenile rat somatosensory cortex. *Cereb Cortex* 28:3673–3684. <https://doi.org/10.1093/cercor/bhy159>
 18. Turegano-Lopez M, Santuy A, DeFelipe J, Merchan-Perez A (2020) Size, shape, and distribution of multivesicular bodies in the juvenile rat somatosensory cortex: a 3D electron microscopy study. *Cereb Cortex* 30:1887–1901. <https://doi.org/10.1093/cercor/bhz211>
 19. Domínguez-Álvaro M, Montero-Crespo M, Blazquez-Llorca L et al (2018) Three-dimensional analysis of synapses in the transentorhinal cortex of Alzheimer's disease patients. *Acta Neuropathol Commun* 6:20. <https://doi.org/10.1186/s40478-018-0520-6>
 20. Domínguez-Álvaro M, Montero-Crespo M, Blazquez-Llorca L et al (2019) 3D electron microscopy study of synaptic Organization of the Normal Human Transentorhinal Cortex and its Possible Alterations in Alzheimer's disease. *eNeuro* 6. <https://doi.org/10.1523/ENEURO.0140-19.2019>
 21. Montero-Crespo M, Domínguez-Álvaro M, Rondón-Carrillo P, et al (2020) Three-dimensional synaptic organization of the human hippocampal CA1 field. *bioRxiv* 2020.02.25.964080. <https://doi.org/10.1101/2020.02.25.964080>
 22. Bosch C, Martínez A, Masachs N et al (2015) FIB/SEM technology and high-throughput 3D reconstruction of dendritic spines and synapses in GFP-labeled adult-generated neurons. *Front Neuroanat* 9:60. <https://doi.org/10.3389/fnana.2015.00060>
 23. Bosch C, Masachs N, Exposito-Alonso D et al (2016) Reelin regulates the maturation of dendritic spines, synaptogenesis and glial Ensheathment of newborn granule cells. *Cereb Cortex* 26:4282–4298. <https://doi.org/10.1093/cercor/bhw216>
 24. Rodríguez-Moreno J, Rollenhagen A, Arlandis J et al (2018) Quantitative 3D ultrastructure of Thalamocortical synapses from the “Lemniscal” ventral posteromedial nucleus in mouse barrel cortex. *Cereb Cortex* 28:3159–3175. <https://doi.org/10.1093/cercor/bhx187>
 25. Rodríguez-Moreno J, Porrero C, Rollenhagen A et al (2020) Area-specific synapse structure in branched posterior nucleus axons reveals a new level of complexity in Thalamocortical networks. *J Neurosci* 40:2663–2679. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2886-19.2020>
 26. Kikuchi T, Gonzalez-Soriano J, Kastanauskaite A et al (2020) Volume electron microscopy study of the relationship between synapses and astrocytes in the developing rat somatosensory cortex. *Cereb Cortex* 30:3800–3819. <https://doi.org/10.1093/cercor/bhz343>
 27. Morales J, Alonso-Nanclares L, Rodríguez J-R et al (2011) Espina: a tool for the automated segmentation and counting of synapses in large stacks of electron microscopy images. *Front Neuroanat* 5:18. <https://doi.org/10.3389/fnana.2011.00018>
 28. Gray EG (1959) Axo-somatic and axo-dendritic synapses of the cerebral cortex: an electron microscope study. *J Anat* 93:420–433
 29. Colonnier M (1968) Synaptic patterns on different cell types in the different laminae of the cat visual cortex. An electron microscope study. *Brain Res* 9:268–287
 30. Howard CV, Reed MG (2005) Unbiased stereology : three-dimensional measurement in microscopy, 2nd edn. Garland Science/BIOS Scientific Publishers, Oxon, UK
 31. Morales J, Rodríguez A, Rodríguez J-R et al (2013) Characterization and extraction of the synaptic apposition surface for synaptic geometry analysis. *Front Neuroanat* 7:20. <https://doi.org/10.3389/fnana.2013.00020>
 32. Rodríguez J-R, Turégano-López M, DeFelipe J, Merchán-Pérez A (2018) Neuroanatomy from mesoscopic to nanoscopic scales: an improved method for the observation of semithin sections by high-resolution scanning electron microscopy. *Front Neuroanat* 12:14. <https://doi.org/10.3389/fnana.2018.00014>



Single-Neuron Labeling in Fixed Tissue and Targeted Volume Electron Microscopy

Marta Turegano-Lopez^{1,2†}, Andrea Santuy^{3†}, Asta Kastanauskaite¹, Jose-Rodrigo Rodriguez^{1,4,5}, Javier DeFelipe^{1,4,5} and Angel Merchan-Perez^{1,5,6*}

¹ Laboratorio Cajal de Circuitos Corticales, Centro de Tecnología Biomédica, Universidad Politécnica de Madrid, Pozuelo de Alarcón, Spain, ² Ph.D. Program in Neuroscience, Universidad Autónoma de Madrid – Instituto Cajal, Madrid, Spain, ³ Department of Neurology and Epileptology, Hertie Institute for Clinical Brain Research, University of Tübingen, Tübingen, Germany, ⁴ Instituto Cajal, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Madrid, Spain, ⁵ Centro de Investigación Biomédica en Red sobre Enfermedades Neurodegenerativas (CIBERNED), ISCIII, Madrid, Spain, ⁶ Departamento de Arquitectura y Tecnología de Sistemas Informáticos, Universidad Politécnica de Madrid, Madrid, Spain

OPEN ACCESS

Edited by:

Maria Eulalia Rubio,
University of Pittsburgh, United States

Reviewed by:

Daniela Boassa,
University of California, San Diego,
United States

Laxmi Kumar Parajuli,
The University of Tokyo, Japan

*Correspondence:

Angel Merchan-Perez
amerchan@fi.upm.es

[†]These authors have contributed
equally to this work

Received: 10 January 2022

Accepted: 15 March 2022

Published: 21 April 2022

Citation:

Turegano-Lopez M, Santuy A, Kastanauskaite A, Rodriguez J-R, DeFelipe J and Merchan-Perez A (2022) Single-Neuron Labeling in Fixed Tissue and Targeted Volume Electron Microscopy. *Front. Neuroanat.* 16:852057. doi: 10.3389/fnana.2022.852057

The structural complexity of nervous tissue makes it very difficult to unravel the connectivity between neural elements at different scales. Numerous methods are available to trace long-range projections at the light microscopic level, and to identify the actual synaptic connections at the electron microscopic level. However, correlating mesoscopic and nanoscopic scales in the same cell, cell population or brain region is a problematic, laborious and technically demanding task. Here we present an effective method for the 3D reconstruction of labeled subcellular structures at the ultrastructural level, after single-neuron labeling in fixed tissue. The brain is fixed by intracardial perfusion of aldehydes and thick vibratome sections (250 μm) are obtained. Single cells in these vibratome sections are intracellularly injected with horseradish peroxidase (HRP), so that the cell body and its processes can be identified. The thick sections are later flat-embedded in epoxy resin and re-sectioned into a series of thinner (7 μm) sections. The sections containing the regions of interest of the labeled cells are then imaged with automated focused ion beam milling and scanning electron microscopy (FIB-SEM), acquiring long series of high-resolution images that can be reconstructed, visualized, and analyzed in 3D. With this methodology, we can accurately select any cellular segment at the light microscopic level (e.g., proximal, intermediate or distal dendrites, collateral branches, axonal segments, etc.) and analyze its synaptic connections at the electron microscopic level, along with other ultrastructural features. Thus, this method not only facilitates the mapping of the synaptic connectivity of single-labeled neurons, but also the analysis of the surrounding neuropil. Since the labeled processes can be located at different layers or subregions, this method can also be used to obtain data on the differences in local synaptic organization that may exist at different portions of the labeled neurons.

Keywords: FIB-SEM, serial sectioning, 3D reconstruction, intracellular injection, quantitative neuroanatomy

INTRODUCTION

The relatively high density and complex arrangement of cells that make up the nervous system, their extensive dendritic and axonal arborizations and the complexity of neuronal connections, all make it extremely difficult, if not impossible, to study completely—and in detail—both the microscopic and ultrastructural characteristics of any cell of the nervous system. The introduction of the combined Golgi-electron microscope technique in the 1970s and 1980s represented a major stimulus to search for methods that permit cells identified at the light microscopic level to be studied subsequently by electron microscopy. This allowed the first steps to be taken toward the reconstruction of complex neuronal circuits (reviewed in Blackstad, 1970, 1981; Freund and Somogyi, 1989; Fairén, 2005).

Since then, important advances have been made in the study of the neural circuits thanks to the development of a variety of light and electron microscope techniques, including immunocytochemistry; combinations of tract-tracing methods and histochemistry or immunocytochemistry; intracellular injections of dyes; and genetic methods to trace brain circuits. The reconstruction of subcellular structures in 3D usually requires serial sectioning and obtaining such series of sections manually is both difficult and time-consuming. To overcome these limitations, automated electron microscopy methods have been developed that allow the acquisition of long series of sections. Although transmission electron microscopy techniques have been developed (Yin et al., 2020), most of these automated methods are based on scanning electron microscopy (SEM) (Kornfeld and Denk, 2018). They include serial block-face SEM (Denk and Horstmann, 2004; Briggman and Denk, 2006), array tomography (Micheva and Smith, 2007), automated tape-collecting ultramicrotomy (ATUM) (Schalek et al., 2011; Hayworth et al., 2014), focused ion beam milling SEM (FIB-SEM) (Knott et al., 2008; Merchán-Pérez et al., 2009), and cluster ion beam SEM (Hayworth et al., 2020).

The main challenge is to correlate the findings obtained by the methods that operate at a scale of hundreds or thousands of microns and those operating at a scale of nanometers. Ideally, a given cell can be identified at the light microscopic level on the basis of its location, cytoarchitecture, long-range connectivity or other criteria, and then studied at the ultrastructural level to obtain further information, especially regarding its connectivity at the synaptic level. Bridging the gap between light and electron microscopy is, however, a laborious and technically demanding task, since it requires compatible processing methodologies for both scales and a high degree of expertise in the different techniques needed. Moreover, it is important that the approach is accurate enough to ensure that the same location that is observed at the light microscopic field is later observed at the electron microscopic level (e.g., DeFelipe and Fairén, 1982).

In the present article, we present a method to correlate light and electron microscopy by labeling identified single cells in fixed sections of brain tissue. Selected portions of the labeled cells can later be imaged at the electron microscopic level and reconstructed in three dimensions. Single-cell labeling is performed by intracellular injection of horseradish peroxidase

(HRP) in fixed vibratome sections (250 μm thick). The injections are performed under a fluorescence microscope, and the selection of the cells to be injected is facilitated by nuclear staining. The injection is monitored by injecting a fluorescent tracer together with the HRP. After development of the injected HRP, the vibratome section is flat-embedded in an epoxy resin. The vibratome section is then re-sectioned into a series of thinner, 7 μm sections, so that the region of interest can be accurately located. The specific section containing the region of interest is further sectioned and imaged, this time at the ultrastructural level, using FIB-SEM, obtaining a series of EM images that can later be reconstructed in 3D and analyzed (**Figure 1**).

Equipment

The main equipment used to set up the technique was as follows: Vibratome (Leica VT 1200S); Electrode Puller (Sutter Instrument Co., Model P-97) and glass capillary electrodes (1 mm \times 58 mm, A-M Systems, catalog #601000); Fluorescence Microscope (Olympus BX51WI) equipped with a Green Fluorescent Protein (GFP) filter set and Leica micromanipulators; Microiontophoresis Current Generator

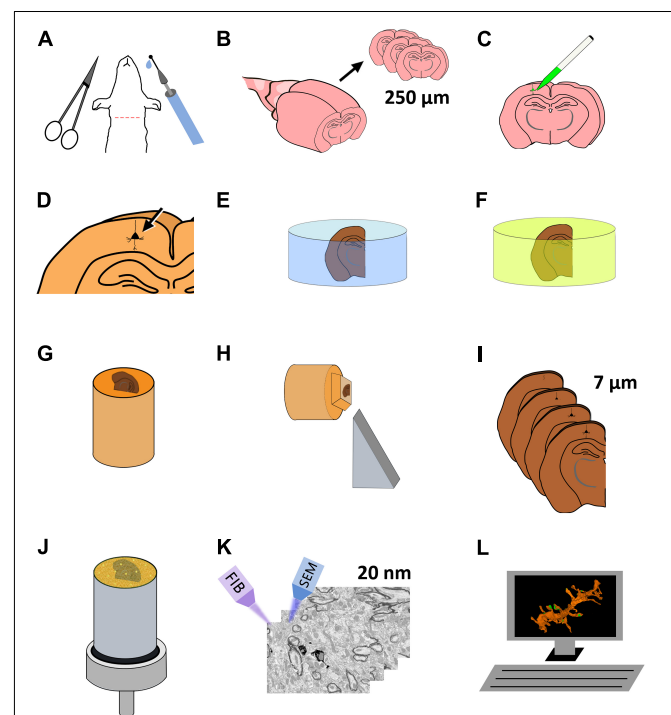


FIGURE 1 | Schematic representation of the protocol for the preparation of brain tissue for single-neuron labeling and FIB-SEM imaging. **(A)** Perfusion fixation of experimental animals. **(B)** Vibratome sectioning in slices (250 μm thick). **(C)** Intracellular injection of HRP and LY. **(D)** Development of HRP. **(E)** Postfixation and osmication. **(F)** En bloc staining. **(G)** The flat embedded section is glued onto a blank Araldite block. **(H)** Re-sectioning of the sample. **(I)** A series of 7 μm sections is obtained. **(J)** One of the 7 μm sections is selected and mounted for FIB-SEM. To facilitate charge dissipation, the block (except for the upper surface) is painted with conductive silver paint, and then sputter-covered with gold-palladium. **(K)** FIB-SEM serial milling and imaging. **(L)** Three-dimensional reconstruction and image analysis.

(World Precision Instruments, model 260); Rotating Automated Microtome (Thermo Scientific, Microm HM 360); Tungsten Carbide Knives (Ted Pella #121-50); Sputter Coater (Quorum Emitech SC7620); and Focused Ion Beam – Scanning Electron Microscope (FIB-SEM; Zeiss, CrossBeam 540).

Solutions

Perfusion fixation solution: prepare 4% paraformaldehyde (PFA; Aldrich #441244) and 0.125% glutaraldehyde (GA; TAAB #G002) in 0.1 M phosphate buffer pH 7.4 (PB). The solution must be prepared just before use in a fume hood.

First postfixation solution: 0.125% GA in PB. Prepare just before use in a fume hood.

Nuclear staining solution: dissolve 1 μ l of SYTOX Green (Thermo Fisher #S7020) in 1 ml of phosphate buffered saline (PBS), pH 7.4. Store at 4°C.

Stock solution of fluorescent tracer: 8% Lucifer Yellow (LY; Sigma #L0259) in 0.1 M TRIS buffer, pH 7.4. Store at 4°C.

Stock solution of HRP: prepare an 8% solution of HRP by dissolving 5 mg of HRP (Sigma-Aldrich P8375-5KU) in 63 μ l of 0.05 M TRIS buffer, pH 7.4. Prepare 5 μ l aliquots and store at –20°C.

Intracellular injection solution: mix 1 μ l of the stock solution of HRP and 2 μ l of the stock solution of LY (the final concentration of HRP is 2.67%). Mix well and centrifuge for 5 min before electrode filling.

Preincubation solution of 3,3'-Diaminobenzidine (DAB): the solution contains 10 mg of DAB (Sigma #D5905) and 200 μ l of dimethyl sulfoxide (DMSO, Sigma D8418) in 20 ml of PB. Prepare immediately before use in a fume hood and protect from light. Filter with a syringe filter (Acrodisc 0.2 μ m, #4612) before use.

Incubation solution of DAB: immediately before use, add 5 μ l of 30% H₂O₂ (Merck # 1.07209.1000) to 10 ml of the DAB solution described above and mix well.

Second postfixation solution: freshly prepared 2% PFA, 2.5% GA, and 3 mM CaCl₂ (Sigma-Aldrich #C2661) in 0.1 M cacodylate buffer. Prepare in a fume hood.

Osmium solution: 1% osmium tetroxide (Sigma-Aldrich #O5500), 7% glucose (Merck #1.08337.0250) and 3 mM CaCl₂ in 0.1 M cacodylate buffer. Always handle osmium in a fume hood, with protective glasses and gloves.

Uranyl acetate solution for *en bloc* staining: dissolve 1% uranyl acetate (Electron Microscopy Sciences #22400) in 50% ethanol. Filter with a syringe filter (Acrodisc 0.2 μ m, #4612).

METHODS

Animals, Perfusion Fixation, and Vibratome Sectioning

Four adult male mice (C57BL/6, 8 weeks old) were used to set up the technique presented here. All animals were handled in accordance with the guidelines for animal research set out in the European Community Directive 2010/63/EU, and all procedures were approved by the Local Ethics Committee of the Spanish National Research Council (CSIC). The animals

were deeply anesthetized with an intraperitoneal injection of pentobarbital (40 mg/kg) and intracardially perfused with 200 mL of freshly prepared fixation solution (4% PFA, 0.125% GA, in PB). The brains were postfixed for 6–16 h (overnight) in the first postfixation solution (0.125% GA). Vibratome sections (250 μ m thick) were obtained and collected in PB in 24-well flat-bottom plates.

Intracellular Injection of Horseradish Peroxidase and Lucifer Yellow

In order to visualize the cell nuclei, the vibratome section to be injected is placed in SYTOX Green solution (SG) for 30 s, and then placed in a methacrylate dish in PBS until injection. The intracellular injection solution is prepared by mixing the stock solutions of LY and HRP, as described above. The tip of the microelectrode is filled with the HRP-LY mix, and a conductive solution of 0.1 M lithium chloride is used to fill the rest of the microelectrode. The sections are observed under a fluorescence microscope equipped with a GFP filter set. The region of interest and the cells to be injected are selected making use of the nuclear staining with SG. Cell nuclei are used as a guide for the impalement of the cell body with the microelectrode. When current injection is turned on, LY allows visual monitoring of the quality of impalement and of the progress of cell filling. Once we have visually ascertained that LY is correctly filling the cell, the current polarity is reversed in cycles of 30 s to 4 min. The filling process is periodically monitored until the cell is completely filled. An arbitrary number of cells can be injected in each vibratome slice. We recommend, however, keeping enough distance between them to avoid overlapping of cell arborizations. After the desired cells have been injected, the vibratome section is washed three times in PBS, for 5 min each time, and stored at 4°C in the dark until development of HRP.

Horseradish Peroxidase Development

For HRP development, wash three times in PB at room temperature, 5 min each time. Preincubate the vibratome section in a plastic Petri dish for 15 min in DAB solution without H₂O₂, in a fume hood with mild agitation, protected from light. Next, incubate in DAB solution with H₂O₂ for 5–10 min. Progress of DAB precipitation can be periodically monitored under an optical microscope. When the precipitate has reached the desired intensity, the reaction is stopped by washing the sections three times in PB, 5 min each time.

Postfixation and Osmication

Wash the vibratome section (three times, 10 min each) in 0.1 M cacodylate buffer, pH 7.4. The section is postfixed for 2 h in the second postfixation solution (2% PFA, 2.5% GA, and 3 mM CaCl₂ in 0.1 M cacodylate buffer). Add the fixative carefully with a plastic Pasteur pipette and do not agitate to prevent sections from curling or folding. Handle in a fume hood. Wash three times, 10 min each time, in 0.1 M cacodylate buffer. Osmicate for 1 h in the osmium solution, always in a fume hood, with protective glasses and gloves. Add and remove the osmium solution very slowly with a plastic Pasteur pipette to prevent sections from

folding or breaking. During osmication, the sections become brittle and break easily, so use a small spatula or weighing spoon to handle them carefully. Wash three times in cacodylate buffer, 10 min each time, and store overnight in the refrigerator.

En bloc Staining, Flat Embedding, and Re-sectioning

En bloc staining is performed by placing the sections in the uranyl acetate solution at 37°C for 30 min. Dehydrate in a graded series of ethanol, clear in acetone and flat-embed in Araldite. Any other resin that is suitable for electron microscopy (Durcupan, Spurr, etc.) may also be used. Once the resin has cured, the flat-embedded section is examined and photographed under an optical microscope (**Figure 2A**). The region of interest is then trimmed and glued with cyanoacrylate onto a blank Araldite block. We then use a tungsten carbide knife (Ted Pella #121-50) to obtain serial sections (7 μm thick), collecting them on glass slides that have been previously covered with silicone and Araldite. Once the series of 7 μm sections have been obtained, they are examined and photographed to select the region of interest. Blood vessels and other morphological features in and around the region of interest will later be used as landmarks to precisely locate the area to be imaged with the FIB-SEM (**Figure 2B**).

Focused Ion Beam Milling and Scanning Electron Microscopy Imaging

Once the region of interest has been selected in the 7 μm section, the section is detached from the glass slide and re-mounted on a blank Araldite block with cyanoacrylate glue. The new block is mounted on an SEM specimen stub with a conductive carbon sticker (Electron Microscopy Sciences, #77825-09). To prevent charge build-up, the block is covered with silver paint (Electron Microscopy Sciences, #12630), except for the top surface. It is important not to cover or spill silver droplets on the upper surface of the block where the specimen is located. Conversely, the base of the block must be carefully painted to ensure electrical continuity between the Araldite block and the specimen stub. Let the paint dry for at least 24 h in a vacuum desiccator. Charge dissipation from the upper surface of the block is achieved by gold-palladium sputter-coating for 30 s. Carbon, gold alone, or other metals are also suitable for sputter coating, but care must be taken not to cover the specimen with a layer that is too thick as this might obscure surface details.

The surface of the block is then photographed with the SEM using the secondary electron detector. The landmarks in the section that were previously identified with the optical microscope (mainly small blood vessels) are also visible with the SEM, so the region of interest can be precisely located (**Figure 2C**). A viewing trench is then excavated with the FIB using a 7 nA milling current, to provide visual access to the region that we plan to image. The front face of this trench must be located close enough to the target to allow its identification (**Figures 2D–F**). The ion beam and the electron beam can be used simultaneously, so it is possible to monitor the progression of the

trench as it is being excavated. In practice, however, it is difficult to find the labeled structure while continuing the excavation, so we usually pause the milling process periodically. During these pauses, we examine the front face of the trench in search of the labeled structure, and we acquire an image using the back-scattered electron detector (0.6–2.0 kV acceleration voltage). As soon as we have identified our target, milling of the viewing trench is stopped. We then use a smaller FIB current (700 pA) to progressively mill the front face of the trench in steps of 20 nm. During each milling step, we remove 20 nm of material with the FIB, and then use the SEM to take a microphotograph of the freshly milled surface (**Figure 2G**). In our equipment, the angle between the SEM and the FIB is 54°, so the angle of incidence of the SEM on the surface to be imaged is 54°, rather than perpendicular. The resulting perspective deformation is automatically corrected by the microscope software during acquisition (SmartSEM 6.02; Carl Zeiss Microscopy Ltd.), so no distortion is present in the final images.

Since the milling/imaging cycle can be fully automated, serial images of the target are obtained (**Figure 3**). We routinely use a milling step of 20 nm (equivalent to section thickness) and a resolution in the X-Y plane of 5 nm/pixel, so the actual voxel size is 5 nm \times 5 nm \times 20 nm. Other resolutions and milling steps can also be used, depending on the particular imaging needs, and the length of the series of sections can be selected according to the researcher's needs. During the development of the technique, we performed five series of FIB-SEM sections at different locations to be certain that any selected cell region can be located, accessed and imaged.

RESULTS

Long series of consecutive EM images can be obtained from any region of interest that has been previously selected at the light microscopic level. In the particular example presented here, a relatively long dendritic segment was selected for study, obtaining a series of 569 images (**Figures 2F,G, 3** and **Supplementary Videos 1, 2**). Given that the size of each image was 2,048 \times 1,536 pixels and was acquired with a resolution of 5 nm/pixel, the field of view was 10.24 μm \times 7.68 μm . Since the spacing between consecutive sections was 20 nm, the size of the stack was 10.24 μm \times 7.68 μm \times 11.38 μm , with sufficient resolution to identify small subcellular structures such as synaptic vesicles.

Since some drift takes place during acquisition of the FIB-SEM image series, further alignment (registration) is necessary. For the registration, we used FIJI, a distribution of ImageJ with preinstalled plugins for microscopy (Schindelin et al., 2012)¹. We routinely use a “rigid” registration protocol to avoid deformation of individual images. Also, alignment is performed by translation only, with no rotation allowed. The aligned stack of images is then loaded into Espina software (Morales et al., 2011), which allows visualization through the original plane of section or the other two orthogonal planes (Espina software can be downloaded from <https://cajalbbp.es/espina/>).

¹<https://imagej.net/software/fiji/>

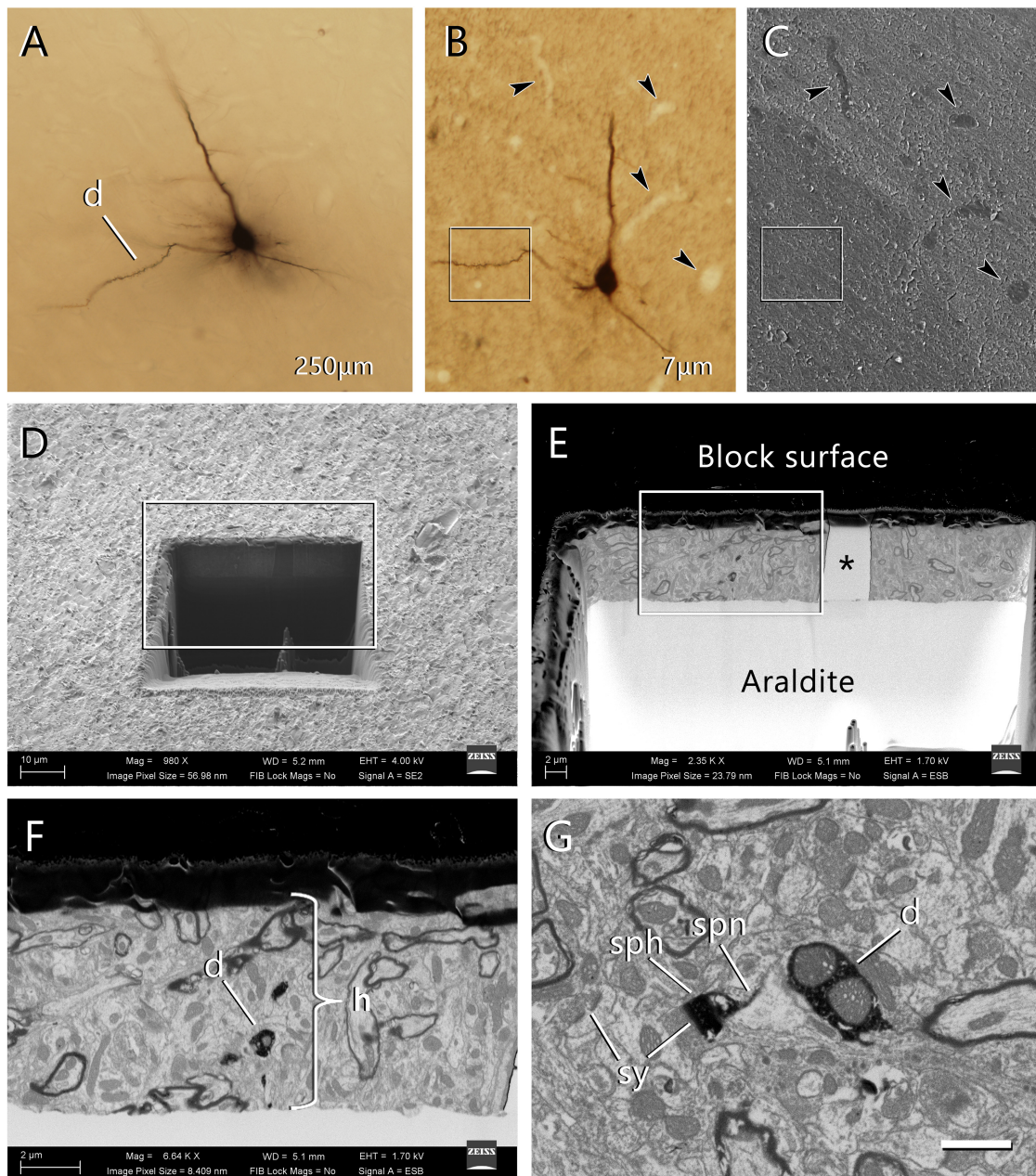


FIGURE 2 | Selection of the region of interest in a labeled cell and FIB-SEM imaging. **(A)** An intracellularly injected pyramidal neuron in a 250 μm -thick vibratome section. The labeled cell was injected with HRP, developed with DAB and flat-embedded in Araldite. One dendritic segment (d) was selected for further study. In this particular example, the injected cell was a pyramidal neuron from layer three of the motor cortex. **(B)** One of the 7 μm -thick serial sections that were obtained from the 250 μm -thick vibratome section. This section contains the selected dendritic segment (inset). Blood vessels (arrowheads) were clearly identifiable and were later used as landmarks. Once this section was photographed, it was mounted on a blank Araldite block and observed with the SEM. **(C)** The surface of the 7 μm section photographed with the SEM using the secondary electron detector. The same blood vessels were visible (arrowheads), so they were used as landmarks to identify the region where the labeled dendritic segment is located (inset). **(D)** A viewing trench was excavated with the FIB in the 7 μm -thick section to gain visual access to the target dendrite. This image was taken with the secondary electron detector. The inset indicates the region that is further magnified in the next panel. **(E)** Backscattered electron image showing the trench that was excavated with the FIB to identify the selected dendritic segment. The gray scale has been inverted so the block surface appears dark and the Araldite bed appears light. The visible portion of brain tissue is crossed vertically by a blood vessel (asterisk). The region within the inset is further magnified in the next panel. **(F)** Region of interest where the labeled dendrite (d) is visible due to the dark, electron-dense precipitate. The thickness of the section (h) is approximately 7 μm . **(G)** Detail of one of the serial images acquired from the dendrite (d). One of its dendritic spines is visible, showing both the spine head (sph) and spine neck (spn). Synaptic junctions (sy) can be identified on the dendritic spine and in the surrounding tissue. Calibration bar in **(G)** 50 μm for **(A–C)**; 16 μm for **(D)**; 6.9 μm for **(E)**; 2.4 μm for **(F)**; and 1 μm for **(G)**.

The DAB precipitate appears as a dark, granular and very electron-dense material that fills the dendritic shaft and the dendritic spines (Figure 3 and Supplementary Videos 1, 2). The labeled dendrite is thus easily recognizable, and can be followed

throughout the stack of serial sections. The dark intracellular deposit fills most of the cytosolic space, masking small organelles, although other structures such as mitochondria, multivesicular bodies or large vacuoles are clearly identifiable. The surrounding

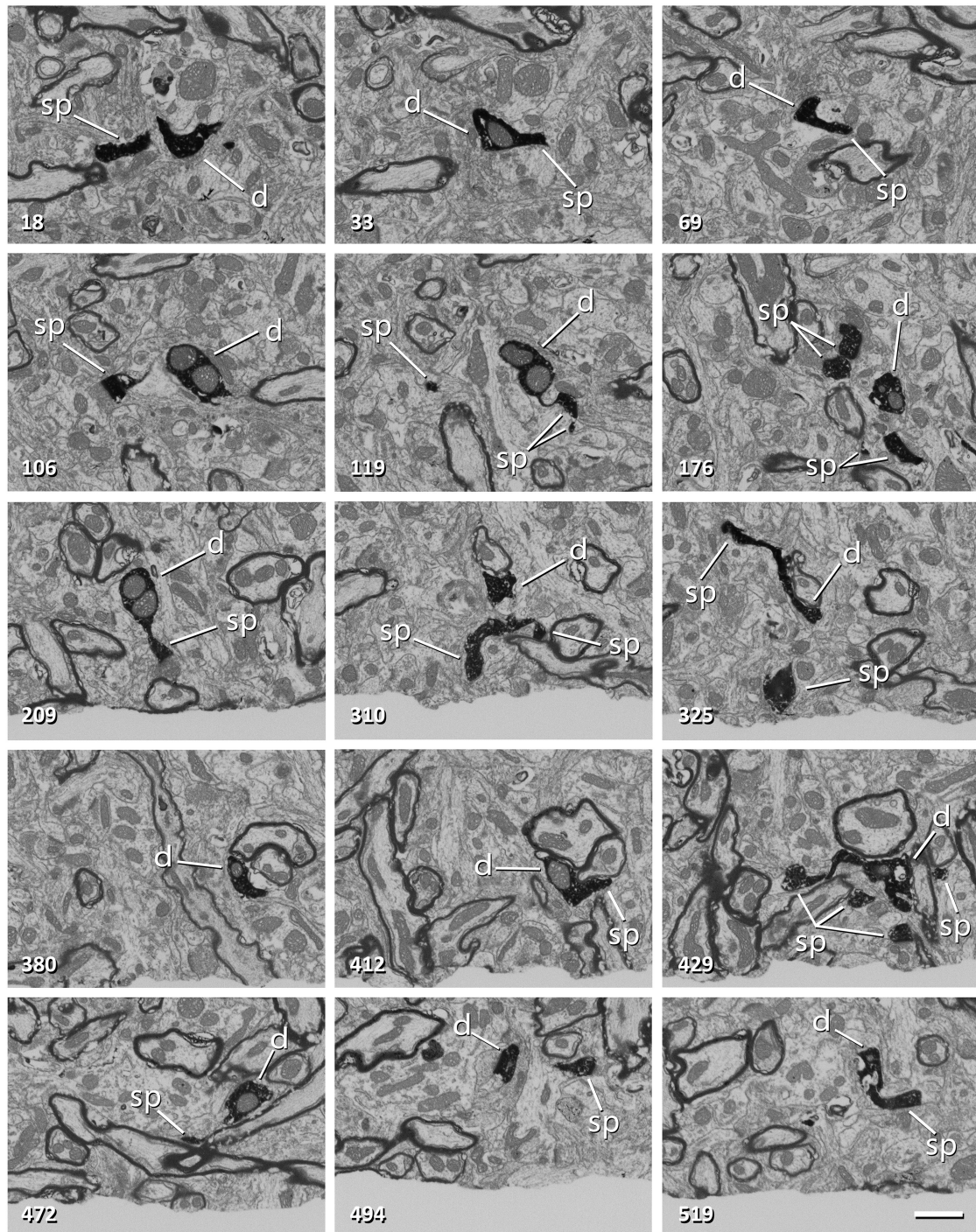


FIGURE 3 | Non-consecutive images of a labeled dendrite from a series obtained with FIB-SEM. The number in the bottom-left corner indicates the position of each image in the series. The dendritic shaft (d) and dendritic spines (sp) are filled with a dark electron-dense precipitate. Note that frame 106 corresponds to **Figure 2G**. Scale bar, 1 μ m. See also **Supplementary Video 1**.

tissue is lighter, except for myelin sheaths, which form a dark, smooth covering around some axons. Synapses are identified in serial sections by the presence of synaptic vesicles in the presynaptic axon and electron-dense pre- and postsynaptic densities (Merchán-Pérez et al., 2009). The fact that the postsynaptic densities appear in several consecutive images greatly facilitates their identification. Also, the postsynaptic densities are membrane-bound and smooth, while the DAB precipitate is intracellular and granular. Synaptic junctions with a prominent postsynaptic density are classified as “asymmetric” and synapses with a thin postsynaptic density as “symmetric” (Gray, 1959; Colonnier, 1968). In the cerebral cortex, asymmetric and symmetric synapses correspond to excitatory (glutamatergic) and inhibitory (GABAergic) synapses, respectively (Houser et al., 1984; Peters et al., 1991; Ascoli et al., 2008).

Espina software (or any other dedicated 3D software) can also be used for the segmentation and 3D reconstruction of the structures of interest. In this example, we have reconstructed the labeled dendritic segment, the synaptic junctions that it establishes, and the synapses located in the surrounding tissue (Figure 4). The labeled dendritic segment can also be skeletonized, providing a simplified version of the structure with its corresponding connections (Figure 4D). Segmentation is performed by shading the object of interest in the serial sections. Once segmented, any object can be rendered in three dimensions, visualized and measured by the software (Figure 5 and Supplementary Video 3). Quantitative information can be obtained from 3D segmentations, including the density and size of synaptic junctions, and the length, surface, and volume of the dendrite. For example, a dendritic segment can be reconstructed with its corresponding dendritic spines and synaptic contacts (Figure 5 and Supplementary Video 3). In this example, volumes and surfaces of the dendrite and its dendritic spines have been obtained with Espina software. In the case of synapses, the Feret diameter and synaptic apposition surface have been calculated (Morales et al., 2013).

DISCUSSION

The main advantage of using fixed tissue for intracellular injections is that you can select the region of interest very precisely. Using a fluorescent nuclear stain, it is possible to not only choose a particular brain area or layer, but also select the particular cell type to be injected. Neuronal nuclei are usually large and round, so neuronal somata are the easiest to locate. Injections are not limited to neurons; other cell types such as astrocytes can also be injected, on the basis of their smaller, irregularly shaped nuclei (Kikuchi et al., 2020). The main limitation of the injection of single cells in fixed sections is that only local processes can be studied, and some processes, especially in large neurons, will be truncated since they usually span farther than the section thickness. However, multiple injections can be performed in the same section, and different planes of section can be used to focus on different cell compartments. For example, coronal or sagittal sections are suitable for the study of the

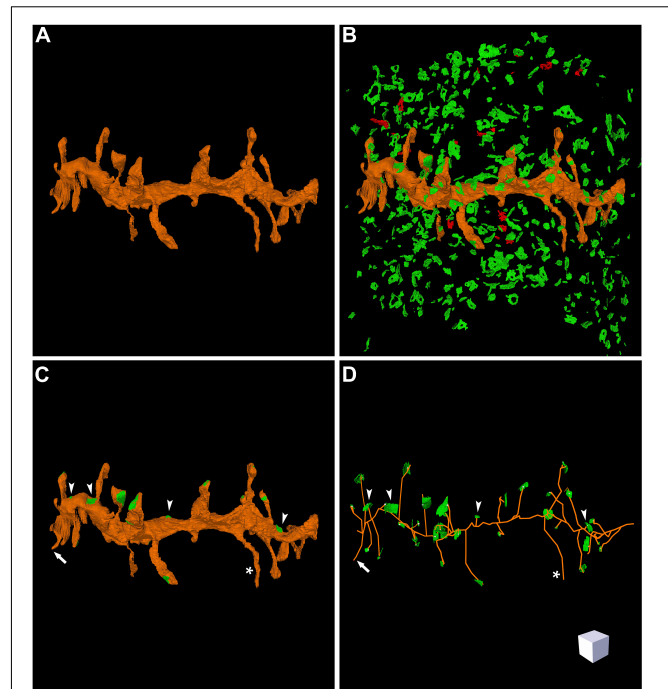
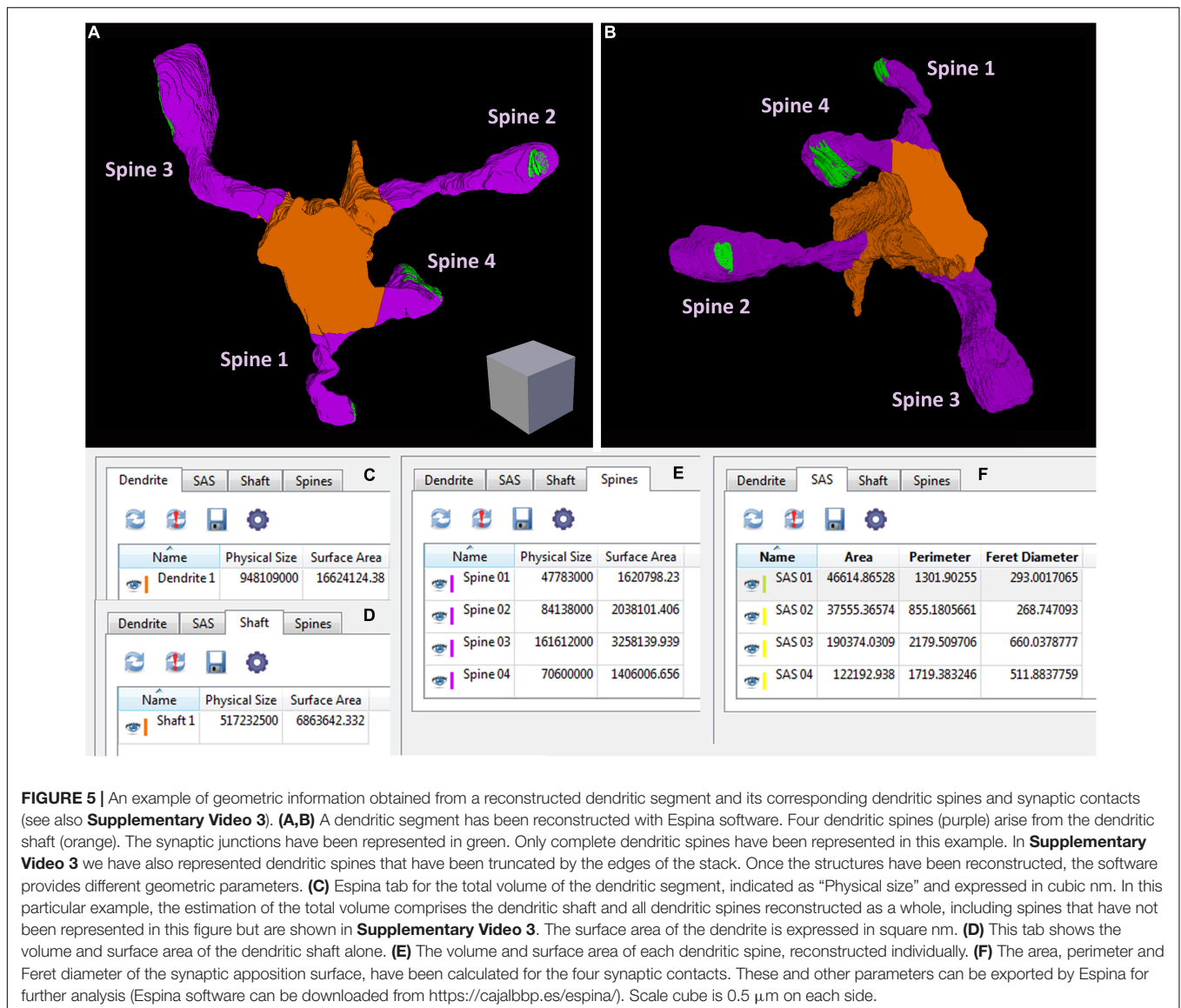


FIGURE 4 | Three-dimensional reconstruction of a labeled dendritic segment and the surrounding synaptic junctions. **(A)** Reconstructed dendritic segment showing multiple dendritic spines. **(B)** The synaptic junctions present in the neighboring tissue have been segmented and reconstructed. Excitatory synaptic junctions are represented in green and inhibitory synaptic junctions are shown in red. **(C)** The same dendritic segment has been rendered with its corresponding synaptic junctions (green). Most synapses are established on dendritic spines, but synapses on the dendritic shaft are also visible (arrow heads). One of the dendritic spines does not establish any synaptic contact (asterisk). **(D)** Skeletonized representation of the same dendrite with its corresponding synapses. Arrow heads point to synaptic junctions that are established on the dendritic shaft; the asterisk indicates one non-synaptic dendritic spine; the arrow points to a dendritic spine that was truncated by the edges of the stack of serial images, so no synapse could be found. Scale cube is 1 μm on each side. See also **Supplementary Video 2**.

apical dendrites of cortical pyramidal cells, while sections that are parallel to the cortical surface are best suited for the study of basal dendrites (e.g., see Benavides-Piccione et al., 2006). Thus, even though some of the processes of single neurons may be truncated, it is possible to design a sampling strategy that provides a general view of the target cell type using multiple injections and different sectioning orientations.

Re-sectioning the original 250 μm -thick vibratome section into a series of thinner sections (7 μm thick) increases the precision by which we can select and image any compartment of the target cell. We selected a thickness of 7 μm to optimize the field of view and resolution of serial sections obtained by FIB-SEM. We routinely use a field of view of 10.24 μm \times 7.68 μm , with a resolution, or voxel size, of 5 nm \times 5 nm \times 20 nm. With these settings, acquisition time per frame is between 2 and 4 min, using frame integration as the noise reduction method. Other settings can of course be used, but they must be carefully selected as a compromise solution between the desired



resolution, field of view and acquisition time. For example, if we increase the field of view, the acquisition time per frame will also increase, so the number of serial images per session will decrease. Similar re-sectioning protocols have been described (Hayworth et al., 2015; Kislinger et al., 2020). The main advantages of our method are its simplicity and the fact that it does not require specialized equipment or techniques for thick sectioning and collection of sections.

Selecting the appropriate resolution is especially important given that the freshly milled surface is imaged and immediately milled again to acquire the next image, meaning that the series of images can only be obtained once. This is often viewed as a disadvantage (Titze and Genoud, 2016; Schifferer et al., 2021), although—in practice—this is not the case if an adequate sampling strategy is carefully planned. For example, the dendritic segment shown in **Figures 2–4** is around 12 μm long. Even though it cannot be imaged again

since it was milled by the FIB when it was sequentially imaged, we have many other similar segments in the same cell that we could also use. In fact, we routinely use a multiple sampling approach so that we obtain multiple stacks of images from the same region from different individuals. In this way, the information we finally obtain from any given brain area, layer or cell comes from multiple samples that can be statistically analyzed. Although our method has been designed for the study of targeted, relatively small regions of identified cells in great detail, it is compatible with other serial section methods that allow a wider field of view. These methods include serial block-face SEM (Denk and Horstmann, 2004; Briggman and Denk, 2006), ATUM (Schalek et al., 2011; Hayworth et al., 2014) or multi-beam techniques (Eberle and Zeidler, 2018). However, these techniques have a lower resolution in the Z-axis, since section thicknesses of 20 nm or less, that are easily obtained by FIB milling, are not

possible by mechanical sectioning. Recent developments in ion milling—such as gas cluster ion milling (Hayworth et al., 2020)—will offer wide fields of view with no loss of resolution in the Z-axis.

In our method, LY is only used to monitor the injection of HRP. Given that LY is visible under the fluorescence microscope, we use it to determine the position of the electrode tip, to ascertain that we have impaled the appropriate cell, to check if there is any leakage during the injection, and to help decide when the filling of a given cell has been completed. Once the cells have been filled, we proceed directly to the development of HRP, so LY no longer participates in the labeling process. We also tested the injection of LY alone, with subsequent photoconversion of DAB (e.g., see Lübke, 1993; Ohm and Diekmann, 1994; Hanani, 2012). However, we found that HRP consistently yielded a denser precipitate, less background staining and a more consistent filling of distal cell processes of neurons. The dense precipitate of DAB facilitates the identification and reconstruction of large structures such as dendritic spines, dendritic shafts or mitochondria. However, it masks smaller organelles such as synaptic vesicles, which may hinder the identification of presynaptic terminals of labeled cells. This limitation must be taken into consideration when designing any study and, if the analysis of axonal boutons or terminals is intended, it may be necessary to consider other methods of intracellular labeling, either in combination with the present technique or as an alternative to it.

Focused ion beam milling and scanning electron microscopy serial sectioning can be combined with several labeling methods. These include genetic labeling (Bosch et al., 2015, 2016) tract-tracing (Rodríguez-Moreno et al., 2018, 2020) and immunocytochemistry (Turégano-López et al., 2021). These methods allow the researcher to select a group of cells based on their origin, projections, or neurochemical characteristics. Intracellular injection of single cells adds the capability to select single neurons based on their location, with a precision of microns, both in the X-Y plane and the Z-axis. The morphological features of the injected cells can be analyzed at the light microscopic level, and multiple cells can be selected and studied in 3D at the electron microscopic level, as can multiple regions of the same cell. This provides a powerful tool to bridge the mesoscopic and nanoscopic scales of the brain and thus will help to establish the relationships between long-range projections and connectivity at the synaptic level. Finally, our method not only facilitates the mapping of the synaptic connectivity of single-labeled neurons, but also the analysis of the surrounding neuropil. Since the labeled processes can be located in different layers or subregions, this method can also be used to

obtain data on the similar or different local synaptic organization that may exist at different portions of the labeled neurons.

DATA AVAILABILITY STATEMENT

The original contributions presented in the study are included in the article/**Supplementary Material**, further inquiries can be directed to the corresponding author.

ETHICS STATEMENT

All procedures were approved by the Local Ethics Committee of the Spanish National Research Council (CSIC).

AUTHOR CONTRIBUTIONS

JD and AM-P designed the research. MT-L, AS, AK, and J-RR performed the research. MT-L, AS, and AM-P analyzed the data. MT-L, AS, AM-P, and JD wrote the manuscript. All authors contributed to the article and approved the submitted version.

FUNDING

This study was funded by grants from the following entities: Spanish “Ministerio de Ciencia e Innovación” grant PGC2018-094307-B-I00, and the Interdisciplinary Platform Cajal Blue Brain (CSIC); and the European Union’s Horizon 2020 Framework Program for Research and Innovation under specific grant agreement no. 945539 (Human Brain Project SGA3). AS has been funded by the Alexander von Humboldt Foundation.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Ana Isabel García, Carmen Alvarez, and Lorena Valdés for their technical assistance, and Nick Guthrie for his excellent text editing.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fnana.2022.852057/full#supplementary-material>

REFERENCES

- Ascoli, G. A., Alonso-Nanclares, L., Anderson, S. A., Barrionuevo, G., Benavides-Piccione, R., Burkhalter, A., et al. (2008). Petilla terminology: nomenclature of features of GABAergic interneurons of the cerebral cortex. *Nat. Rev. Neurosci.* 9, 557–568. doi: 10.1038/nrn2402
- Benavides-Piccione, R., Hamzei-Sichani, F., Ballesteros-Yáñez, I., DeFelipe, J., and Yuste, R. (2006). Dendritic size of pyramidal neurons differs among mouse cortical regions. *Cereb. Cortex* 16, 990–1001. doi: 10.1093/cercor/bhj041
- Blackstad, T. W. (1970). “Electron microscopy of Golgi preparations for the study of neuronal relations,” in *Contemporary Research Methods in Neuroanatomy*, eds W. J. H. Nauta and S. O. E. Ebbesson (Berlin: Springer), 186–216. doi: 10.1007/978-3-642-85986-1_10
- Blackstad, T. W. (1981). “Tract tracing by electron microscopy of Golgi preparations,” in *Neuroanatomical Tract-Tracing Methods*, eds L. Heimer and M. J. Robards (Boston, MA: Springer), 407–440. doi: 10.1007/978-1-4613-3189-6_12
- Bosch, C., Martínez, A., Masachs, N., Teixeira, C. M., Feraud, I., Ulloa, F., et al. (2015). FIB/SEM technology and high-throughput 3D reconstruction of

- dendritic spines and synapses in GFP-labeled adult-generated neurons. *Front. Neuroanat.* 9:60. doi: 10.3389/fnana.2015.00060
- Bosch, C., Masachs, N., Exposito-Alonso, D., Martínez, A., Teixeira, C. M., Feraud, I., et al. (2016). Reelin regulates the maturation of dendritic spines, synaptogenesis and glial ensheathment of newborn granule cells. *Cereb. Cortex* 26, 4282–4298. doi: 10.1093/cercor/bhw216
- Briggman, K. L., and Denk, W. (2006). Towards neural circuit reconstruction with volume electron microscopy techniques. *Curr. Opin. Neurobiol.* 16, 562–570. doi: 10.1016/j.conb.2006.08.010
- Colonnier, M. (1968). Synaptic patterns on different cell types in the different laminae of the cat visual cortex. An electron microscope study. *Brain Res.* 9, 268–287. doi: 10.1016/0006-8993(68)90234-5
- DeFelipe, J., and Fairén, A. (1982). A type of basket cell in superficial layers of the cat visual cortex. A Golgi-electron microscope study. *Brain Res.* 244, 9–16. doi: 10.1016/0006-8993(82)90898-8
- Denk, W., and Horstmann, H. (2004). Serial block-face scanning electron microscopy to reconstruct three-dimensional tissue nanostructure. *PLoS Biol.* 2:e329. doi: 10.1371/journal.pbio.0020329
- Eberle, A. L., and Zeidler, D. (2018). Multi-beam scanning electron microscopy for high-throughput imaging in connectomics research. *Front. Neuroanat.* 12:112. doi: 10.3389/fnana.2018.00112
- Fairén, A. (2005). Pioneering a golden age of cerebral microcircuits: the births of the combined Golgi-electron microscope methods. *Neuroscience.* 136, 607–614. doi: 10.1016/j.neuroscience.2005.08.011
- Freund, T. F., and Somogyi, P. (1989). “Synaptic relationships of Golgi-impregnated neurons as identified by electrophysiological or immunocytochemical techniques,” in *Neuroanatomical Tract-Tracing Methods 2: Recent Progress*, eds L. Heimer and L. Záborszky (Boston, MA: Springer US), 201–238. doi: 10.1007/978-1-4757-2055-6_8
- Gray, E. G. (1959). Axo-somatic and axo-dendritic synapses of the cerebral cortex: an electron microscope study. *J. Anat.* 93, 420–433.
- Hanani, M. (2012). Lucifer yellow - an angel rather than the devil. *J. Cell. Mol. Med.* 16, 22–31. doi: 10.1111/j.1582-4934.2011.01378.x
- Hayworth, K. J., Morgan, J. L., Schalek, R., Berger, D. R., Hildebrand, D. G. C., and Lichtman, J. W. (2014). Imaging ATUM ultrathin section libraries with WaferMapper: a multi-scale approach to EM reconstruction of neural circuits. *Front. Neural. Circuits* 8:68. doi: 10.3389/fncir.2014.00068
- Hayworth, K. J., Peale, D., Januszewski, M., Knott, G. W., Lu, Z., Xu, C. S., et al. (2020). Gas cluster ion beam SEM for imaging of large tissue samples with 10 nm isotropic resolution. *Nat. Methods* 17, 68–71. doi: 10.1038/s41592-019-0641-2
- Hayworth, K. J., Xu, C. S., Lu, Z., Knott, G. W., Fetter, R. D., Tapia, J. C., et al. (2015). Ultrastructurally smooth thick partitioning and volume stitching for large-scale connectomics. *Nat. Methods* 12, 319–322. doi: 10.1038/nmeth.3292
- Houser, C. R., Vaughn, J. E., Hendry, S. H. C., Jones, E. G., and Peters, A. (1984). “GABA neurons in the cerebral cortex,” in *Cerebral Cortex, Vol. 2, Functional Properties of Cortical Cells*, (New York: Plenum Press), 63–89. doi: 10.1007/978-1-4615-6610-6_3
- Kikuchi, T., Gonzalez-Soriano, J., Kastanauskaite, A., Benavides-Piccione, R., Merchán-Pérez, A., DeFelipe, J., et al. (2020). Volume electron microscopy study of the relationship between synapses and astrocytes in the developing rat somatosensory cortex. *Cereb. Cortex* 30, 3800–3819. doi: 10.1093/cercor/bhz343
- Kislinger, G., Gnägi, H., Kerschensteiner, M., Simons, M., Misgeld, T., and Schifferer, M. (2020). Multiscale ATUM-FIB microscopy enables targeted ultrastructural analysis at isotropic resolution. *iScience* 23:101290. doi: 10.1016/j.isci.2020.101290
- Knott, G., Marchman, H., Wall, D., and Lich, B. (2008). Serial section scanning electron microscopy of adult brain tissue using focused ion beam milling. *J. Neurosci.* 28, 2959–2964. doi: 10.1523/JNEUROSCI.3189-07.2008
- Kornfeld, J., and Denk, W. (2018). Progress and remaining challenges in high-throughput volume electron microscopy. *Curr. Opin. Neurobiol.* 50, 261–267. doi: 10.1016/j.conb.2018.04.030
- Lübke, J. (1993). Photoconversion of diaminobenzidine with different fluorescent neuronal markers into a light and electron microscopic dense reaction product. *Microsc. Res. Tech.* 24, 2–14. doi: 10.1002/jemt.1070240103
- Merchán-Pérez, A., Rodríguez, J.-R., Alonso-Nanclares, L., Schertel, A., and DeFelipe, J. (2009). Counting synapses using FIB/SEM microscopy: a true revolution for ultrastructural volume reconstruction. *Front. Neuroanat.* 3:18. doi: 10.3389/fnana.2009.05.018.2009
- Micheva, K. D., and Smith, S. J. (2007). Array tomography: a new tool for imaging the molecular architecture and ultrastructure of neural circuits. *Neuron* 55, 25–36. doi: 10.1016/j.neuron.2007.06.014
- Morales, J., Alonso-Nanclares, L., Rodríguez, J.-R., DeFelipe, J., Rodríguez, Á., and Merchán-Pérez, A. (2011). Espina: a tool for the automated segmentation and counting of synapses in large stacks of electron microscopy images. *Front. Neuroanat.* 5:18. doi: 10.3389/fnana.2011.00018
- Morales, J., Rodríguez, A., Rodríguez, J.-R., DeFelipe, J., and Merchán-Pérez, A. (2013). Characterization and extraction of the synaptic apposition surface for synaptic geometry analysis. *Front. Neuroanat.* 7:20. doi: 10.3389/fnana.2013.00020
- Ohm, T. G., and Diekmann, S. (1994). The use of Lucifer Yellow and Mini-Ruby for intracellular staining in fixed brain tissue: methodological considerations evaluated in rat and human autopsy brains. *J. Neurosci. Methods* 55, 105–110. doi: 10.1016/0165-0270(94)90046-9
- Peters, A., Palay, S. L., Webster, H., and deF. (1991). *The fine structure of the nervous system. Neurons and their supporting cells*, 3rd Edn. New York: Oxford University Press.
- Rodríguez-Moreno, J., Porrero, C., Rollenhagen, A., Rubio-Teves, M., Casas-Torremocha, D., Alonso-Nanclares, L., et al. (2020). Area-specific synapse structure in branched posterior nucleus axons reveals a new level of complexity in thalamocortical networks. *J. Neurosci.* 40, 2663–2679. doi: 10.1523/JNEUROSCI.2886-19.2020
- Rodríguez-Moreno, J., Rollenhagen, A., Arlandis, J., Santuy, A., Merchán-Pérez, A., DeFelipe, J., et al. (2018). Quantitative 3D ultrastructure of thalamocortical synapses from the “Lemniscal” ventral posteromedial nucleus in mouse barrel cortex. *Cereb. Cortex* 28, 3159–3175. doi: 10.1093/cercor/bhx187
- Schalek, R., Kasthuri, N., Hayworth, K., Berger, D., Tapia, J., Morgan, J., et al. (2011). Development of high-throughput, high-resolution 3D reconstruction of large-volume biological tissue using automated tape collection ultramicrotomy and scanning electron microscopy. *Microsc. Microanal.* 17, 966–967. doi: 10.1017/S1431927611005708
- Schifferer, M., Snaidero, N., Djannatian, M., Kerschensteiner, M., and Misgeld, T. (2021). Niwaki instead of random forests: targeted serial sectioning scanning electron microscopy with reimaging capabilities for exploring central nervous system cell biology and pathology. *Front. Neuroanat.* 15:79. doi: 10.3389/fnana.2021.732506
- Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E., Kaynig, V., Longair, M., Pietzsch, T., et al. (2012). Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat. Methods* 9, 676–682. doi: 10.1038/nmeth.2019
- Titze, B., and Genoud, C. (2016). Volume scanning electron microscopy for imaging biological ultrastructure. *Biol. Cell* 108, 307–323. doi: 10.1111/boc.201600024
- Turegano-López, M., Rodríguez, J.-R., Alonso-Nanclares, L., González-Soriano, J., DeFelipe, J., and Merchán-Pérez, A. (2021). “Pre-embedding immunostaining of brain tissue and three-dimensional imaging with FIB-SEM,” in *Receptor and Ion Channel Detection in the Brain Neuromethods*, eds R. Lujan and F. Ciruela (New York, NY: Springer US), 285–302. doi: 10.1007/978-1-0716-1522-5_20
- Yin, W., Brittain, D., Borseth, J., Scott, M. E., Williams, D., Perkins, J., et al. (2020). A petascale automated imaging pipeline for mapping neuronal circuits with high-throughput transmission electron microscopy. *Nat. Commun.* 11:4949. doi: 10.1038/s41467-020-18659-3

Conflict of Interest: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Publisher’s Note: All claims expressed in this article are solely those of the authors and do not necessarily represent those of their affiliated organizations, or those of the publisher, the editors and the reviewers. Any product that may be evaluated in this article, or claim that may be made by its manufacturer, is not guaranteed or endorsed by the publisher.

Copyright © 2022 Turegano-Lopez, Santuy, Kastanauskaite, Rodriguez, DeFelipe and Merchán-Pérez. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.