

Universidad Autónoma de Madrid
Facultad de Medicina
Departamento de Anatomía, Histología y Neurociencia

**Microcircuitos de la corteza cerebral:
distribución de la proteína Reelina y análisis
de los aferentes GABAérgicos a la capa I de la
neocorteza de la rata adulta**

Tesis Doctoral

Tania Ramos Moreno

Dirigida por el Doctor

Francisco Clascá Cabré

Madrid, 2007

Índice.

INTRODUCCIÓN	1
RESUMEN	3
1. ORGANIZACIÓN CELULAR GENERAL DE LA CORTEZA CEREBRAL.	5
1.1 Citoarquitectura:	5
1.1.1 Laminación	5
1.1.1 Tipos celulares	7
1.1.2.1 Neuronas piramidales de la isocorteza	7
1.1.2.2 Neuronas noespinosas de axón corto	8
1.2 Circuitos básicos:	15
1.2.1 Proyecciones aferentes.	15
1.2.2 Proyecciones eferentes.	15
1.2.3 Conexiones locales.	16
2. LA CAPA I.	17
2.1 Importancia funcional de la capa I.	17
2.2 Células de capa I.	19
3. NEUROPILO DE LA CAPA I.	20
3.1 Dendritas de células piramidales.	20
3.2 Dendritas de interneuronas profundas.	21
3.3 Aferentes extrínsecos. Proyección excitatoria e inhibitoria a la capa I	21
3.3.1 Axones corticales locales.	22
3.3.2 Axones corticocorticales ipsi- y contralaterales.	22
3.3.3 Axones procedentes del claustró y de la amígdala.	23
3.3.4 Axones procedentes del hipotálamo.	24
3.3.5 Prosencéfalo basal.	25
3.3.6 Axones glutamatérgicos procedentes del tálamo.	26
3.3.7 Subtálamo.	26
3.3.8 Aferentes troncoencefálicos.	27
I. Rafe y locus ceruleus.	27
II. Área tegmental ventral.	28

4	OTROS ELEMENTOS DE LA CAPA I.	29
	4.1 <i>Glía.</i>	29
	4.1.1. <i>Astrocitos.</i>	29
	4.1.2. <i>Oligodendrocitos. Organización de las vainas de mielina.</i>	29
	4.1.3. <i>Microglía.</i>	30
	4.2. <i>La membrana basal.</i>	30
	4.3. <i>La Piamadre.</i>	31
	4.4. <i>Estratificación y modularidad tridimensional de la capa I.</i>	31
5.	LA MATRIZ EXTRACELULAR.	33
	5.1 <i>Reelina.</i>	34
	5.2 <i>Otras proteínas de matriz extracelular características de capa I.</i>	36

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS **37**

MATERIALES Y MÉTODOS **43**

1.	ANIMALES.	45
2.	EXPERIMENTOS DE DEPÓSITO EPIPIALES DE TRAZADORES RETRÓGRADOS.	45
	2.1 <i>Trazadores axónicos empleados.</i>	45
	2.2 <i>Cirugía.</i>	46
	2.2.1 <i>Procedimientos generales.</i>	46
	2.2.2 <i>Depósitos epipiales de trazadores retrógrados.</i>	47
3.	SACRIFICIO Y PERFUSIÓN DE LOS ANIMALES.	49
4.	CORTE Y PROCESAMIENTO DEL TEJIDO.	51
5.	MONTAJE, DESHIDRATACIÓN Y DESENGRASADO DE LAS SECCIONES HISTOLÓGICAS.	51
6.	MÉTODOS DE ANÁLISIS DEL MATERIAL HISTOLÓGICO.	52
	6.1 <i>Localización de los depósitos del trazador.</i>	52
	6.2 <i>Localización de las neuronas retrógradamente marcadas desde la corteza.</i>	53
	6.3 <i>Caracterización bioquímica de las neuronas corticales que inervan capa I.</i>	55

6.4	<i>Inmunodetección de la proteína Reelina en tejido cerebral de rata adulta.</i>	56
	PROTOCOLOS EXPERIMENTALES.	63
	SOLUCIONES.	72
	RESULTADOS.	73
I.	EXPERIMENTOS DE INMUNODETECCIÓN DE LA PROTEÍNA REELINA EN EL CEREBRO DE RATA.	75
	<i>I.1 Inmunorreactividad de Reelina en el bulbo olfatorio y áreas olfatorias de Reelina.</i>	78
	<i>I.2 Inmunorreactividad de Reelina en el septum, amígdala y ganglios basales.</i>	83
	<i>I.3 Inmunorreactividad de Reelina en estructuras diencefálicas.</i>	85
	<i>I.4 Inmunorreactividad de Reelina en el tronco y la retina.</i>	91
	<i>I.5 Inmunorreactividad de Reelina en el isocortex y la formación hipocampal.</i>	95
	<i>I.6 Depósitos de FastBlue e inmunofluorescencia para Reelina colocalizando con somatostatina, calbindina y calretinina.</i>	101
II.	COMPOSICIÓN DEL NEUROPILO. EXPERIMENTOS DE DEPÓSITOS EPIPIALES EN LA CORTEZA CEREBRAL.	103
	<i>II.1 Aferentes cortico-corticales ipsilaterales a capa I.</i>	103
	<i>II.2 Aferentes a capa I desde estructuras subcorticales no talámicas.</i>	104
	<i>II.2.1 Depósitos en la corteza frontal dorsal.</i>	106
	<i>II.2.2 Depósitos en la corteza somestésica.</i>	106
	<i>II.2.3 Depósitos en la corteza visual.</i>	106
	<i>II.3 Inervación GABAérgica subcortical a capa I.</i>	110
	<i>II.4 Aferentes corticales locales. Análisis de las interneuronas situadas radialmente bajo el depósito epipial de FastBlue.</i>	112
	<i>II.4.1 Depósitos de FastBlue e inmunofluorescencia para NeuN.</i>	112
	<i>II.4.2 Depósitos de FastBlue e inmunofluorescencia para GABA.</i>	113
	<i>II.4.3 Depósitos de FastBlue e inmunofluorescencia para GABA y calbindina.</i>	113

II.4.4 <i>Depósitos de FastBlue e inmunofluorescencia para somatostatina y calbindina.</i>	115
II.4.5 <i>Depósitos de FastBlue e inmunofluorescencia para calretinina y calbindina.</i>	117
ABREVIATURAS	121
DISCUSIÓN	125
Parte I.	127
I.1 Especificidad e interpretación del inmunomarcado.	127
I.2 Reelina secretada es abundante en algunos neuropilos ricos en espinas.	129
I.3 Transporte y secreción a distancia de Reelina en vías nerviosas adultas.	131
I.4 Tipos celulares inmunorreactivas en el telencéfalo.	132
I.5 Observaciones comparativas.	134
Parte II.	135
II.1 Consideraciones metodológicas.	135
II.2 Los aferentes cortico-corticales a capa I de larga distancia no son GABAérgicos.	139
II.3 Los axones del prosencéfalo basal y de zona incerta proyectan a capa I y contienen GABA.	141
II.4 El origen fundamental del plexo GABAérgico en cada punto de capa I cortical son las interneuronas situadas bajo ese punto.	142
II.5 Las interneuronas corticales que inervan capa I cortical secretan Reelina.	143
CONCLUSIONES	145
BIBLIOGRAFÍA	149

INTRODUCCIÓN

RESUMEN.

La neocorteza es el sustrato anatómico fundamental de las funciones cognitivas superiores características del ser humano. Su capa histológica más externa, la capa I, es un neuropilo básicamente acelular. Este neuropilo contiene fundamentalmente los penachos distales de las dendritas apicales de varias poblaciones de células piramidales (Koester y O'Leary, 1992; Callaway, 2002). Estos penachos distales son elementos claves del microcircuito cortical (Shepherd y cols., 1985; Larkum y cols., 2004, 2007; Sjöstrom y Häusser, 2006; LaBerge, 2006).

Sobre los penachos distales converge un variado conjunto de aferentes locales y extrínsecos. En cuanto a su origen y naturaleza, pueden distinguirse cuatro grupos principales de axones que inervan la capa I cortical:

- (1) axones *GABAérgicos* y/o *peptidérgicos* de interneuronas locales situadas en capas profundas, sobre todo células de Martinotti (Wang y cols, 2004; Ma y cols., 2006);
- (2) axones *glutamatérgicos* procedentes de áreas corticales distantes (Maunsell y Van Essen, 1983; Mitchell y cols., 2001), así como de otras regiones de origen palial telencefálico como claustró y amígdala (Llamas y cols, 1989; Clascá y cols, 1992). En roedores, además, existe una importante proyección cortical-cortical de neuronas glutamatérgicas de la lámina VII o subgrísea, cuyo equivalente en otras especies todavía no está claro (Reep y Goodwin, 1988; Clancy y Cauller, 1999; Reep, 2000);
- (3) axones glutamatérgicos procedentes del tálamo (Herkenham 1986; Jones 2001; Rubio-Garrido y cols, 2007);
- (4) axones *monoaminérgicos*, *colinérgicos* y *serotoninérgicos* procedentes de núcleos del prosencéfalo basal, hipotálamo y tronco encefálico (Foote y Morrison, 1987; Janusonis y cols, 2004).

Se ha sugerido que la activación de los sistemas que proyectan a capa I de corteza está en la base de los mecanismos de atención y memoria (Cauller, 1995; Lamme y cols., 1998; Olson y cols., 2001; Llinás y cols., 2002). Entre el conjunto de estos aferentes en capa I destaca un denso neuropilo GABAérgico, concentrado principalmente en la mitad externa de capa I (subcapa Ia). La literatura indica que, en roedores, posibles fuentes de estos axones GABA pueden ser aferentes cortico-corticales de larga distancia (McDonald y Burkhalter, 1993, Gonchar y cols., 1995, Fabri y Manzoni, 1996), determinadas estructuras subcorticales no talámicas (Lin y cols., 1990; Nicoletis y cols., 1995; Kowiński y cols.,

2001; Sarter y Bruno, 2004), e interneuronas corticales, principalmente células de Martinotti, aunque podrían estar también proyectando a capa I células bipolares y de double-bouquet (Kawaguchi y Kubota, 1993; Kawaguchi, 1995; Markram y cols., 2004).

Como en cada tejido, cada componente celular de capa I está, asimismo, inmerso en la matriz extracelular. La matriz extracelular (ECM) de un tejido actúa como componente cohesivo e integra las diferentes unidades funcionales celulares. En el sistema nervioso central, muchas de las moléculas que forman parte de la ECM se distribuyen selectivamente en el cerebro adulto, por lo que la composición de la ECM varía según la región (Nicholson y Syková, 1998). Su capacidad para la señalización celular y regulación de adhesión en la ECM las hace potenciales proteínas moduladoras de plasticidad sináptica (Dityatev & Schachner, 2003; Berardi et al., 2004). Entre las moléculas de la matriz cuya participación en esas funciones está mejor establecida se encuentra la glicoproteína Reelina (D'Arcangelo, 2005).

La capa I adulta presenta un denso inmunomarcado de Reelina en neuritas y matriz extracelular (Martínez-Cerdeño y Clascá, 2002). Se ha propuesto que son las interneuronas las que expresan Reelina y las que la estarían secretando (Alcántara y cols., 1998; Pesold y cols., 1998; Drakew y cols., 1998). Las funciones que podrían ser atribuidas a Reelina se encuadran en el favorecimiento y regulación del crecimiento y morfología de las espinas dendríticas de las pirámides corticales (Liu y cols., 2001; Niu y cols., 2004), así como en la potenciación de la inducción de LTP (Weeber y cols., 2002; Beffert y cols., 2005). Se ha sugerido también que podría existir transporte axonal a larga distancia de esta glicoproteína desde diversas estructuras subcorticales para su secreción en corteza (Martínez-Cerdeño y cols., 2002, 2003). Sin embargo, los datos publicados sobre inmunomarcado en roedor adulto son limitados y fragmentarios (Miyata et al., 1996; Pesold et al., 1998, 1999; Pérez-García et al., 2001; Misaki et al., 2004), por lo que no se conoce con exactitud la localización de la proteína Reelina.

En esta tesis nos propusimos como un objetivo precisar la localización de la proteína Reelina así como el origen de su aporte a la matriz extracelular de capa I. Como segundo objetivo nos proponemos analizar cualitativa y cuantitativamente el origen de la innervación GABAérgica de capa I cortical.

1. ORGANIZACIÓN CELULAR GENERAL DE LA CORTEZA CEREBRAL.

La corteza cerebral de los mamíferos ha evolucionado a partir de la región dorsal de las vesículas telencefálicas conocidas en el desarrollo como *palio*, con el aporte adicional de células procedentes de la región ventral de las vesículas telencefálicas o *subpalio* (Puelles, 2001; Molnár y cols., 2006). Junto con el subpalio, el palio telencefálico pronto regionaliza en subregiones durante el desarrollo. Una de estas subregiones, llamada *palio dorsal*, dará lugar a lo que en adulto se conoce como *isocorteza*. La iso- o neocorteza es una característica distintiva de los cerebros de los mamíferos, y no tiene claro su homólogo en los hemisferios cerebrales de otros amniotas (Aboitiz y cols., 2003). En ella se pueden subdividir funcional y anatómicamente, diferentes regiones especializadas en el procesamiento de distinto tipo de información. La expansión de la isocorteza en diversos mamíferos, y particularmente en primates, insinúa, presumiblemente, la importancia del isocortex en funciones cognitivas superiores (Karlen y Krubitzer, 2006). Sin embargo, todavía estamos lejos de entender completamente el significado biológico, la estructura y función de la corteza (Watakabe y cols., 2006; Rash y Grove, 2006).

1.1 CITOARQUITECTURA.

1.1.1 LAMINACIÓN.

Le Brun Kemper y Galaburda (Le Brun Kemper y Galaburda, 1984) definen el término *arquitectura cortical* como el estudio de la estructura en capas y columnas de una unidad cortical particular. Como esta estructura no es homogénea para todo el manto cortical, se conforman las bases para la subdivisión de la corteza en diferentes áreas. El término *arquitectónica cortical* se refiere al campo de estudio anatómico que se ocupa de la identificación y caracterización de esas áreas diferentes. El método utilizado en el estudio se toma como prefijo y así, *citoarquitectónica* es el estudio referido a la disposición de las neuronas que han sido teñidas con Nissl y *mieloarquitectónica* al estudio de las secciones teñidas para mielina. Las primeras descripciones de la estructura de la corteza cerebral se realizaron durante la segunda mitad del siglo XIX, asociadas con el desarrollo de las técnicas de tinción celular. Hanover (1840) utilizó por primera vez la fijación del tejido nervioso en ácido crómico; asimismo, Von Gerlach (1858) introdujo la tinción celular por medio de dicromato de potasio y carmín amoniaco (revisado por Jones, 1984). El uso de estas metodologías permitió a Meynert (1867-1872) y a Lewis y Clarke (1878) dar las

primeras descripciones de la laminación cortical. Estas propuestas establecieron, en general, que la corteza cerebral de los mamíferos, incluida la humana, está constituida por seis “láminas”, capas o estratos, emplazados en sentido paralelo a la superficie pial y que son diferenciables en función del tipo y el tamaño de las células que los componen (Jones, 1984; Rakic, 1988; Creutzfeldt, 1995).

La corteza cerebral tiene una disposición estratificada, formada por capas superpuestas de neuronas de distintos tipos. En base a criterios filogenéticos y citoarquitectónicos, la corteza de los mamíferos puede dividirse en dos categorías principales: la alo-corteza y la iso- o neocorteza. La isocorteza recibe este nombre a causa de la relativa uniformidad en el número de sus capas y corresponde a la corteza del neopallio (neocorteza).

La alo-corteza presenta una estructura más variable de un área a otra, y está representada en la formación del hipocampo (giro dentado, el cuerno de Ammón y subículo) con tres capas de células; y en la corteza piriforme, la cual recibe fibras olfatorias secundarias del bulbo olfatorio. En ella pueden encontrarse, según la región, de dos a cinco capas de células.

Desde el punto de vista embriológico se considera que la corteza cerebral adulta comprende tanto la capa de sustancia gris limitada externamente por la piamadre, como la sustancia blanca del hemisferio cerebral, que se extiende hasta el epitelio endimario de la luz ventricular (por ej, Guillery, 2005). En cambio la Nomenclatura Anatómica Internacional (Feneis y Dauber, 2006), y el uso general, reservan el término *corteza* para la capa gris. Al igual que la sustancia gris de cualquier otro sitio del SNC, la corteza cerebral contiene células nerviosas, con sus dendritas y segmentos amielínicos de axones; astroglia, microglía, y vasos sanguíneos.

En la corteza se observa una capa en posición subpial, denominada molecular, “plexiforme externa” o “capa I” casi desprovista de somas celulares. Profundamente a esta capa se localizan en la isocorteza 5 capas más, todas ellas densamente pobladas por somas neuronales de diverso tipo. Más profundamente aún, se encuentra la sustancia blanca del hemisferio cerebral. En la isocorteza de primates, la sustancia blanca cortical es incluso varias veces más gruesa que la propia corteza. En los roedores, en cambio, la sustancia blanca del hemisferio cerebral es sólo una delgada lámina.

1.1. 2 TIPOS CELULARES.

La clasificación de las células presentes en la corteza cerebral se realizó ya en el siglo XIX. Éstas se clasificaron atendiendo a su tamaño, forma y patrón de árbol dendrítico tal y como aparecían tras una tinción de plata (Peters y Jones, 1984). La terminación básica acuñada entonces sigue vigente hoy en día. Los principales tipos neuronales de la corteza cerebral son las células piramidales o de proyección y las células no piramidales o interneuronas, de axón corto.

1.1.2.1 *Las neuronas piramidales de la isocorteza.*

Las neuronas de proyección constituyen el 70%-80% de todas las neuronas de la corteza cerebral de los mamíferos (Peters y Jones, 1984; Hoff y cols., 1999) y su morfología se ajusta, en términos generales, al modelo de las células piramidales (Fedelman y Peters, 1984). Los somas de estas células se encuentran presentes en las capas II-VI, pero son particularmente evidentes en las láminas II-III y V-VI, desde donde originan los principales sistemas eferentes de la corteza cerebral. Las neuronas piramidales típicas se caracterizan por poseer: 1) dendritas con espinas; 2) tallo apical orientado radialmente, formando 3) un *bouquet* terminal en la capa más superficial de corteza; 4) un conjunto de dendritas basales; 5) un axón descendente hacia la sustancia blanca; 6) un número de colaterales axónicas intracorticales; 7) terminales estableciendo contactos sinápticos excitatorios, y 8) el uso de neurotransmisores aminoacídicos excitatorios como el *glutamato* y/o aspartato, cuya acción en la membrana postsináptica es despolarizante, es decir, produce un efecto general excitatorio (Nieuwenhuys, 1994; Wang y cols., 1999; Conti y Weinberg, 1999; Weinberg, 1999).

La clasificación para las células piramidales se ha hecho hasta ahora en base a la posición laminar de su soma, a su morfología (aun relativamente homogénea), electrofisiología y hodología (Peters y Jones, 1985; Molnár y Cheung, 2006), aunque en la actualidad existen ya unos pocos marcadores genéticos disponibles para su identificación (Molnár y Cheung, 2006).

En la última década, ha quedado establecido que todas las células piramidales tienen su origen en el palio dorsal telencefálico. Una vez interrumpido el ciclo celular, ascienden hacia la superficie guiadas por los procesos de la glía radial (Rakic, 1972; Valverde y cols., 1989; Noctor y cols., 2001). Curiosamente, durante el desarrollo algunas

de las células piramidales pierden las dendritas apicales y los axones descendentes, transformándose mediante dicha reducción en células estrelladas, células piramidales atípicas que se pueden encontrar en la capa IV de la corteza cerebral (Nieuwenhuys, 1994).

1.1.2.2. *Neuronas no espinosas de axón corto.*

Las neuronas no espinosas de axón corto constituyen el segundo tipo de neuronas y son menos numerosas que las anteriores (constituyen el restante 25-30% de neuronas de la isocorteza). Estas células presentan una considerable variación en su morfología, hasta el punto de que, si las interneuronas de la isocorteza bien definidas morfológicamente se clasificasen en base a su electrofisiología y sus características sinápticas (facilitación/depresión de la respuesta sináptica) formarían un mínimo de catorce tipos diferentes de subpoblaciones no solapadas (Gupta y cols., 2000; Benes y Berretta, 2001). Esta variabilidad ha dado lugar a la utilización de diversas denominaciones para caracterizarlas, como células de axón corto o neuronas no piramidales (Fairén y cols., 1984), aunque prevalece la denominación de *interneuronas corticales* para indicar su función preponderante en el establecimiento de circuitos locales entre neuronas adyacentes. De igual manera, se ha podido establecer que la gran mayoría de estas células utiliza el ácido γ -aminobutírico (GABA) como neurotransmisor, cuya acción sobre la membrana postsináptica es de hiperpolarización, lo que causa un efecto general inhibitorio (Bormann, 2000; de Felipe, 2001). Algunas de ellas co-secretan diversos péptidos, y una pequeña minoría son nitrérgicas y colinérgicas (De Felipe y cols., 1997; Kawaguchi y Kubota, 1998).

Los criterios para clasificar las interneuronas incluyen principalmente aspectos morfológicos, especialmente el tipo de ramificación de los axones (Fairén y cols., 1984); criterios asociados con patrones característicos de respuesta eléctrica (Cauli y cols., 1997; Kawaguchi y Kubota, 1997, 1998), y características bioquímicas y moleculares específicas, como expresión de neuropéptidos, moléculas de la superficie celular o proteínas específicas (de Felipe, 1993, 1997; Kawaguchi y Kubota, 1998; Hof y cols., 1999; Markram y cols., 2004). En esta última dirección, un desarrollo muy significativo de la investigación ha estado asociado con la identificación de *proteínas ligadoras de calcio*, pertenecientes a la familia *hf-hand*, las cuales parecen funcionar como bufferes fisiológicos para el control del exceso de Ca^{++} citoplasmático, atrapando el Ca^{++} con cinéticas variables (Clapham, 1995).

Sin embargo, aparte de su función fisiológica, se ha establecido que distintas proteínas de este tipo —principalmente parvalbúmina, calbindina y calretinina— se expresan de manera diferencial en subpoblaciones de interneuronas corticales, con muy poco grado de superposición, lo cual las convierte en marcadores muy útiles en la identificación de grupos particulares de neuronas no piramidales (Hof y cols., 1999; de Felipe, 1993, 1997; Raynolds y Beasley, 2001; Kawaguchi y Kondo, 2002).

Además, determinadas subpoblaciones de interneuronas con morfología, contenido en péptidos y propiedades electrofisiológicas básicas más o menos comunes, tienden a contactar sistemáticamente, como se explicará más detenidamente en el apartado sobre Circuitos intrínsecos, partes específicas del árbol dendrítico, soma, segmento inicial del axón de las neuronas piramidales o de otras interneuronas (Figura 1) (Somogyi y cols., 1998; Kawaguchi y Kondo, 2002; Markram y cols., 2004). Así, las interneuronas se clasifican en (1) células en cesto (inervación en dendritas proximales y somas de sus células diana); (2) células en candelabro (inervación en axones de sus células diana); (3) células bipenachadas, bipolares y doble-bouquet (inervación en dendritas de sus células diana) y (4) células de Martinotti (inervación en dendritas y penachos apicales de dendritas de sus células diana (Markram y cols., 2004). Típicamente se ha considerado a estas últimas como interneuronas proyectantes a capa I (DeFelipe, 1997). Sin embargo, Kawaguchi (1995) mostró que el axón de células bipolares y doble-bouquet previamente registradas en capa II-III (algunos somas también se encontraron en el borde de capa V) en corteza frontal de rata podía inervar capa I, independientemente de su árbol dendrítico (Figura 2). Este grupo de células pertenecen electrofisiológicamente a la categoría de disparo RSNP (regular-spiking nonpyramidal, o células no piramidales con frecuencia de disparo regular) (Figura 2). Curiosamente, las células de Martinotti pertenecerían al grupo de las células de patrón de disparo RSNP (Kawaguchi, 1995; Wang y cols., 2004), aunque unas pocas de éstas se han caracterizado con un patrón irregular de disparo (Kawaguchi y Kubota, 1993; Wang y cols., 2004).

Otro rasgo destacable de las interneuronas corticales es que, además de contactos sinápticos típicos, establecen entre sí uniones de tipo “gap” que pueden facilitar su acoplamiento eléctrico y oscilación sincrónica (Gibson y cols., 2005; Merriam y cols., 2005). En conjunto, los somas de las interneuronas GABAérgicas están presentes, con una densidad comparable, en todas las capas corticales; no obstante, en determinadas capas parecen predominar algunos tipos de interneuronas respecto a otros (De Felipe y

Para ver esta película, debe disponer de QuickTime™ y de un descompresor TIFF (LZW).

Figura 1. Características morfológicas y bioquímicas de las subpoblaciones de neuronas GABAérgicas en la corteza prefrontal dorsal en primate. El diagrama ilustra las proteínas ligadoras de calcio -parvalbúmina (azul), calbindina (rojo) y calretinina (amarillo) – y la localización de las sinapsis inhibitorias a una neurona piramidal (verde) por diferentes clases de neuronas corticales GABAérgicas. Las neuronas en candelabro (Ch) y las neuronas en cesto (WA) proveen de sinapsis inhibitorias a los segmentos iniciales del axón (ais) y las dendritas proximales al soma piramidal, respectivamente. Por otra parte, las células doble-bouquet calbindina positivas (DB en rojo), neurogliaformes (Ng) y células de Martinotti tienden a hacer sinapsis inhibitorias en las dendritas distales de las neuronas piramidales. Por último, las células DB que expresan calretinina (en amarillo) y las células Cajal-Retzius (CRC) aparecen sinaptando tanto las dendritas distales de las células piramidales como a otras células GABAérgicas. “1-6”: capas de la corteza prefrontal dorsolateral. Tomado de Lewis y cols. (2005).

cols.,1997; Benes y Berretta, 2001; Markram y cols., 2004).

Un descubrimiento de gran calado sobre las interneuronas corticales es que estas células no se originan en el palio cortical sino que se asientan en él tras una serie de migraciones tangenciales desde el subpalio. Durante el desarrollo, en el neuroepitelio del subpalio se diferencian zonas conocidas como eminencias ganglionares (origen en parte de los ganglios basales). En este estadio, se pueden diferenciar al menos tres dominios en base a gradientes de expresión diferencial de genes: EGL o eminencia ganglionar lateral, EGM o eminencia ganglionar medial y EGC o eminencia ganglionar caudal, la cual no posee la expresión de un gen en particular, pero que, sin embargo, se la dota de entidad al considerar el comportamiento diferencial de las neuronas que genera durante el proceso de migración respecto a las neuronas generadas en los otros dos dominios (Flames y Marin, 2005). Se ha descrito en el ratón que tal vez se dé también generación de interneuronas en la región entopeduncular anterior y el área alrededor de la base del bulbo olfatorio (Marin y Rubenstein, 2001). Además, todas estas regiones

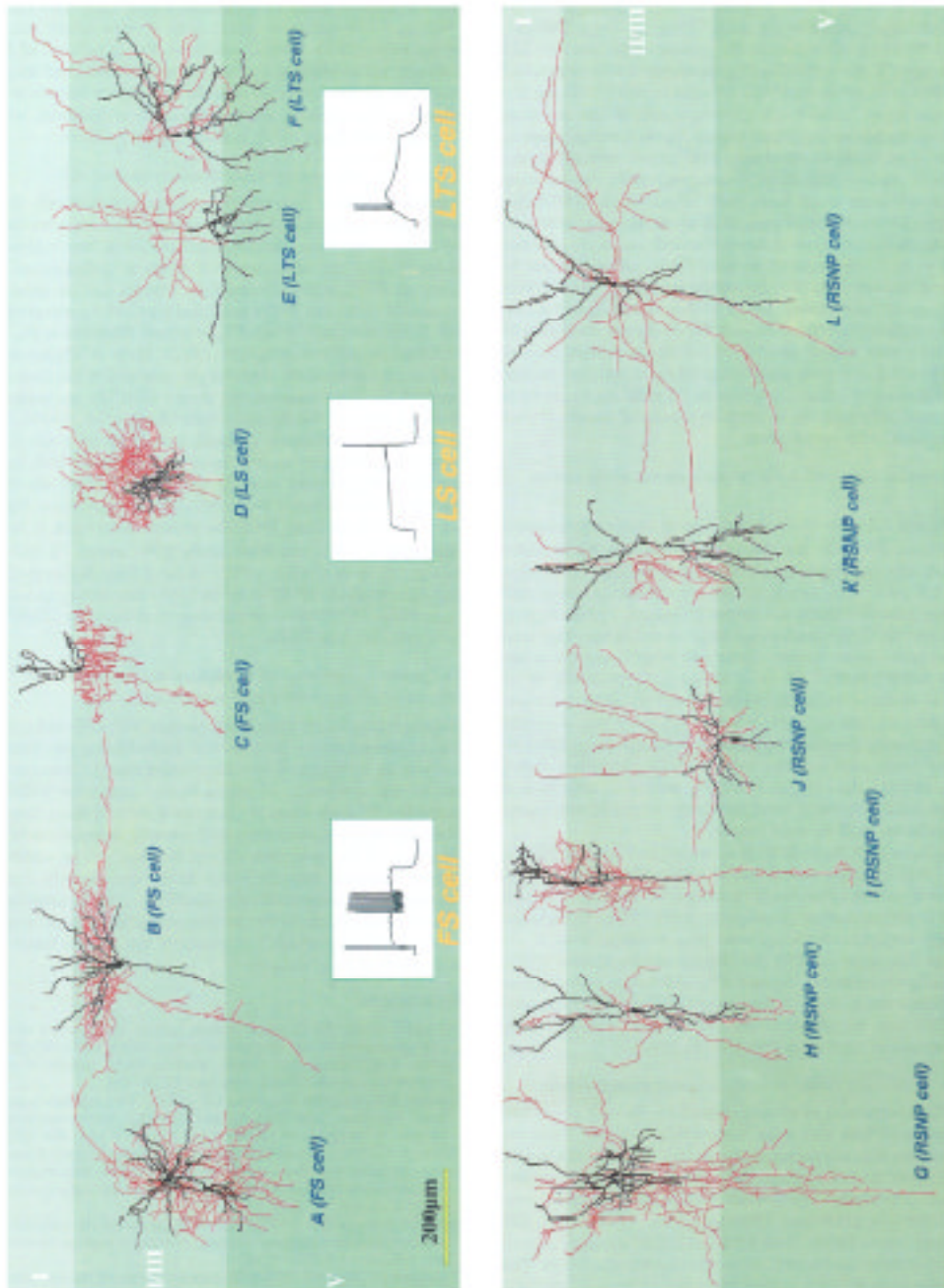


Figura 2. Diversidad anatómica de neuronas neocorticales. Resumen esquemático de los patrones de descarga y morfologías de dendritas y axones de cuatro subgrupos de células no piramidales. En las cajas blancas se representan los registros de células no piramidales en respuesta a los pulsos de corrientes dados. Las dendritas y los axones se representan en negro y rojo, respectivamente. **A**, célula de disparo rápido (FS) con árboles axonales locales. **B**, célula de disparo rápido con árbol axonal horizontal. **C**, célula en candelabro de disparo rápido. **D**, célula neurogliaforme con disparo retardado (LS). **E**, célula multipolar con disparo de bajo umbral (LTS) con axón ascendente. **F**, célula bipenchada con disparo de bajo umbral con axón ascendente. **G**, célula multipolar con árbol axonal vertical con frecuencia de disparo regular (RSNP). **H**, célula bipenachada (doble-bouquet) con árbol axonal vertical con frecuencia de disparo regular. **I**, célula bipolar con árbol axonal vertical con frecuencia de disparo regular. **J**, célula con axón ascendente con frecuencia de disparo regular. **K**, célula bipenachada con árbol axonal vertical (doble-bouquet) con frecuencia de disparo regular. **L**, célula bipenachada con amplio árbol axonal con frecuencia de disparo regular. Tomado de Kawaguchi (1995).

progenitoras expresan los genes *Dlx1*, *Dlx2* y *Mash1*. Aunque no existe todavía un consenso pleno al respecto, la evidencia que se tiene respecto a los diferentes orígenes de los tipos de interneuronas en roedor sugiere que las células que son PV+ y SOM/CB+ derivan del EGM, y las células CR/VIP+ derivarían, sin embargo, del EGC (Flames y Marin, 2005).

Se ha descrito en ratón tres rutas principales de migración de las futuras interneuronas por la zona marginal, bajo las células Cajal-Retzius, en su camino hasta la corteza: a) caudal a rostral y lateral a medial, emergiendo de las eminencias ganglionares medial y caudal, respectivamente; b) rostral a caudal confinado el telencefalo ventral; y c) rostral a caudal, emergiendo dorsal al bulbo olfatorio (Ang y cols., 2003). Al alcanzar su área y posición cortical, parecen utilizar como sustrato tanto los procesos de la glía radial como las dendritas apicales de las neuronas piramidales ya posicionadas (Figura 3) (Ang y cols., 2003).

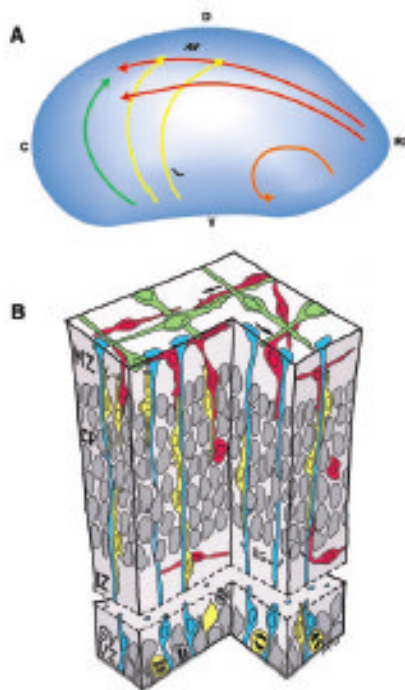


Figura 3. Representaciones esquemáticas que ilustran la migración a distancia de las interneuronas en la zona marginal (MZ) y su integración eventual en la placa cortical (CP) con las neuronas de migración radial generadas al mismo tiempo. A. Tres corrientes de interneuronas migrando en la MZ de la corteza en desarrollo: I, una corriente caudal a rostral y lateral a medial que emerge de las eminencias ganglionares cauda y medial (verde y amarillo, respectivamente); II, una corriente de rostral a caudal confinada en el telencefalo ventral (naranja); y III, una corriente rostral a caudal emergiendo dorsal al bulbo olfatorio (en rojo). B. Modelo para el posicionamiento local de las interneuronas en migración. La glía radial (en azul) soporta la migración radial de las neuronas derivadas dorsalmente a la CP. En la MZ, las interneuronas migrando tangencialmente (en rojo) se localizan bajo las células Cajal-Retzius (en verde). Al final de su posicionamiento en la MZ, las interneuronas en migración cambian su dirección y se incorporan en la CP usando como guía tanto los procesos de la glía radial como las dendritas apicales. R, rostral; C, caudal; V, ventral; D, dorsal; L, lateral; M, medial; RG, glía radial; SV, subventricular. Tomado de Ang y cols. (2003).

	TIPO DE CÉLULA	MARCADORES ESPECÍFICOS					MARCADORES ADICIONALES						ORIGEN EMBRIOLÓGICO		
		SOM	CB	CR	PV	VIP	SOM	CB	CR	PV	VIP	CCK	NPY	EGM	EGC
INTERNEURONAS CUYO AXÓN ALCANZA CAPA I	Martinotti	+			-	-		+	+			+	+	+	
		1,3,4,5,6,7			1	1		1,2,5	1			1	1	8	
	Doble-Bouquet		+	+							+	+			+
			1,2	1,2,3,6						1,6,7	1			8	
	Bipolar			+		+						+			+
				1,2,3,6		1,6,7								8	
INTERNEURONAS CUYO AXÓN NO ALCANZA CAPA I	Bipenachada				-		+	+	+		+	+	+	+	+
					1		1,3,6	1	1		1	1	1	8	8
	En cesto		+		+		+		+			+	+	+	
			1		1,4		1,7		7			1,4,7	1	8	
	En candelabro		+		+		-		-		-	-	-	+	
			1,2		1,2,4,7		1		1		1	1	1	8	

1. Markram y cols., 2004. Trabajo en corteza somatosensorial de rata.
2. De Felipe, 1997. Trabajo en corteza de rata y de primate humano.
3. Gonchar y Burkhalter, 1997. Trabajo en corteza visual de rata.
4. Kawaguchi y Kondo, 2002. Trabajo en corteza frontal de rata.
5. Ma y cols., 2006. Trabajo en corteza somatosensorial de ratón.
6. Kawaguchi y Kubota, 1996. Trabajo en corteza frontal de rata.
7. Kawaguchi y Kubota, 1998. Trabajo en corteza frontal de rata.
8. Flames y Marin, 2005.

Tabla 1. Tabla resumen en la que se representa el tipo de interneurona clasificadas según si su axón alcanza o no capa I cortical y según su expresión tanto de proteínas ligadoras de calcio como de neuropéptidos. Basado en Markram y cols., 2004; De Felipe, 1997; Gonchar y Burkhalter, 1997; Kawaguchi y Kondo, 2002; Ma y cols., 2006; Kawaguchi y Kubota, 1996; Kawaguchi y Kubota, 1998 y Flames y Marin, 2005. SOM, somatostatina; CB, calbindina; CR, calretinina; PV, parvalbúmina; VIP, péptido intestinal vasoactivo; CCK, colecistoquinina; NPY, neuropéptido Y; EGM, eminencia ganglionar medial; EGC, eminencia ganglionar caudal.

1.2 CIRCUITOS BÁSICOS. Aferentes, eferentes y conexiones locales.

1.2.1 *Proyecciones aferentes.*

Cinco grupos principales de axones inervan la corteza:

1) axones colaterales de células piramidales excitatorios procedentes de la misma área, así como axones procedentes de otras áreas corticales tanto ipsilaterales como contralaterales (Maunsell y Van Essen, 1983; Mitchell y cols., 2001);

2) axones glutamatérgicos del claustró y amígdala (Llamas y cols., 1989; Clascá y cols., 1992). En roedores existe, además, una importante proyección de neuronas glutamatérgicas de la lámina subgrisea (Clancy y Cauller, 1999; Reep, 2000).

3) axones glutamatérgicos procedentes del tálamo (Herkenham 1986; Jones, 2001; Rubio-Garrido y cols., 2007).

4) axones monoaminérgicos, colinérgicos y serotoninérgicos procedentes de núcleos del prosencéfalo basal y tronco encefálico (Foote y Morrison, 1987; Janusonis y cols., 2004).

1.2.2 *Proyecciones eferentes.*

Las proyecciones de salida de los módulos corticales, de manera general, se pueden caracterizar como segregados en *tres sistemas*:

El primero está constituido por proyecciones que se originan principalmente en neuronas piramidales de la lámina Vb, las cuales tienen como blanco estructuras subcorticales localizadas a la altura del estriado, diencefalo, del tronco encefálico y de la médula espinal. Estas eferentes corticales eventualmente constituirán el gran sistema de salida de la corteza cerebral hacia los efectores musculares, responsables de las respuestas motoras del organismo (Rizzolatti y Luppino, 1998; Luppino y Rizzolatti, 2000; Molnár, 2006).

El segundo sistema se origina fundamentalmente en neuronas piramidales de la lámina II, III y Va, y conforma proyecciones córtico-corticales, las cuales constituyen un sistema de asociación que, en la línea evolutiva de mamíferos, se va haciendo más voluminoso hasta llegar a constituir un sistema masivo en primates (Barbas y Rempler-Clower, 1997).

El tercer sistema se origina en neuronas de proyección de la lámina VI, las cuales dirigen sus axones únicamente al tálamo y a su vez reciben proyecciones recíprocas de esta estructura y constituyen, así, un circuito córtico-talámico-cortical (Deschenes y cols., 1998).

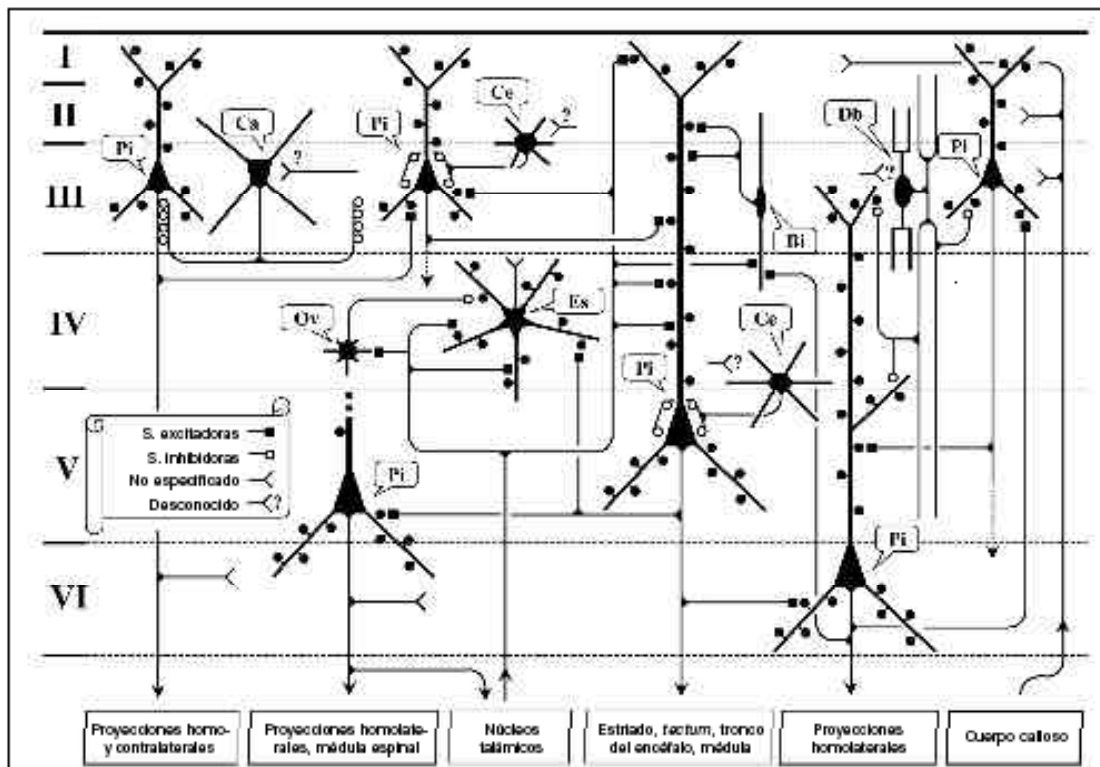


Figura 4. Esquema que representa las conexiones sinápticas entre varios tipos celulares establecidas de forma cierta, entendiendo con ello aquellas en las que ambos elementos pre- y postsinápticos han sido marcados en la misma preparación. Las sinapsis excitadoras aparecen señaladas con un cuadrado negro; las inhibitorias, como un círculo vacío. Para completar el esquema, se señalan de forma general, las proyecciones subcorticales y los sistemas aferentes de diverso origen. Bi: células bipolares; Ca: células en candelabro; Ce: células en cesto; Db: células bipenachadas; Es: células estrelladas con espinas; Ov: células en ovillo; Pi: células piramidales. Tomado de Valverde (2002).

1.2.3 Conexiones locales.

El modelo básico de conectividad intracortical, que puede extenderse a todas las áreas de recepción primaria (somatosensorial, auditiva y visual), está basado en estudios llevados fundamentalmente a cabo en la corteza visual primaria del gato (Gilbert, 1983; Valverde, 2002), y que, en resumen, es el siguiente: tomamos como punto de partida la entrada de información a corteza desde las fibras aferentes procedentes del tálamo. Esta entrada se realiza en la capa IV, sobre las células espinosas (de naturaleza excitatoria) e interneuronas VIP y PV (+) (Douglas y Martín, 2004; Thomson y Bannister, 2003). Las células de la capa IV proyectan fundamentalmente a las capas II y III. Se ha descrito que tanto a las células espinosas como las células inhibitorias contactan con las células inhibitorias y células piramidales de la capa II-III. Las células piramidales de esta capa proyectan principalmente a las pirámides de la capa V, que a su vez lo hace sobre la célula piramidal de la capa VI; finalmente, las capas V y VI proyectan a las capas II y III y a la IV, respectivamente, de otra área cortical de orden superior (Cauller y Connors, 1994;

Valverde, 2002; Thomson y Bannister, 2003). Desde el área de orden superior que recibe la información se reenvía de nuevo, una vez procesada, principalmente a la capa I, evitando las capas intermedias, del área cortical de partida (Cauller y Connors, 1998). Este hecho hace diferenciar dos tipos de sistema en el procesamiento cortical de información: *proyecciones “forward” o de salida*, aquéllas que salen desde el área primaria; y *proyecciones “backward” o retrógradas*, aquéllas que “reentran” información al área primaria de salida, una vez procesadas en un área cortical de orden superior (Cauller y Connors, 1994).

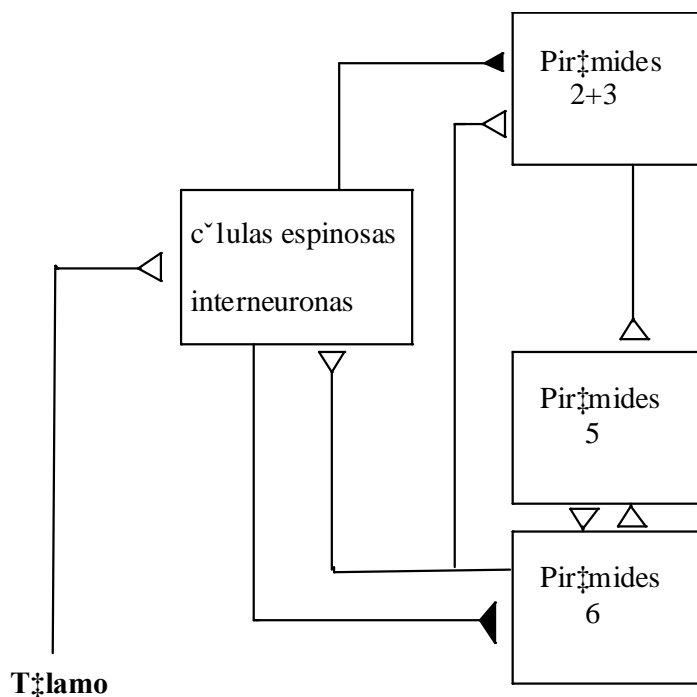


Figura 5. Esquema de la entrada de información a corteza y su procesamiento posterior. La entrada de información se realiza sobre las células espinosas e interneuronas de capa IV, que a su vez la transmite a las células piramidales de capas II-III. De estas capas se pasa a las capas V y VI. Desde la capa VI puede reentrar a capas II-III (proyecciones “backward” o retrógradas). Sinapsis abiertas: conexiones excitatorias. Sinapsis rellenas: conexiones inhibitorias. Modificado de Douglas y Martin (1991).

2. LA CAPA I.

2.1 Importancia funcional de la capa I: los penachos distales de las dendritas apicales de las células piramidales, un elemento clave del microcircuito cortical.

Las células piramidales son las responsables tanto de la proyección corticocortical como de la proyección corticofuga, es decir, son responsables de la salida de información desde corteza (Shepherd y cols., 1985). Una de las características de este tipo de célula es su larga dendrita apical, que alcanza la capa más superficial de corteza con su característico penacho distal, además de varias dendritas basales situadas en la capa donde alojan su soma (Feldman, 1984; Vogt, 1991; Mitchell y Cauller, 2001; Shlosberg y cols., 2003; LaBerge, 2006). Aunque ya en la década de los 80 se postulaba (mediante

modelación neuronal) para la dendrita apical distal un papel importante en el procesamiento de información y plasticidad (Shepherd y cols., 1985), no fue hasta la última década donde se dieron una serie de descubrimientos que indican que las interacciones sinápticas que suceden en la capa I son un elemento fundamental en la función cortical. Resumidamente, estos hallazgos han sido:

- (1) La demostración de que algunas subpoblaciones de neuronas piramidales extienden profusamente sus penachos apicales en la capa I mientras que otras neuronas piramidales pierden su dendrita apical de dicha capa (Koester y O'Leary, 1992, Kasper y cols., 1994; Callaway, 2002). Esto implica que unas neuronas se exponen a los aferentes que alcanzan la capa I mientras que otras los evitan activamente.
- (2) El descubrimiento de que el penacho distal de las dendritas apicales de las neuronas de la capa V es un compartimento de integración sináptica distinto funcionalmente y relativamente independiente del somático (Felleman y Van Essen, 1991; Yuste y cols., 1994; Cauller y Connors, 1998). Por ejemplo, corrientes catiónicas activadas por hiperpolarización (I_h) presentes en la dendrita apical de las células piramidales de la capa V, contribuyen a atenuar los EPSPs que se desplazan en la dendrita (Berger y cols., 2001; Williams y Stuart, 2002) incrementando el aislamiento electrotónico entre la dendrita apical y el soma.
- (3) La demostración de que en la mitad superior de la dendrita apical las neuronas de la capa V existe una zona de elevado umbral de iniciación de espigas de calcio (Schiller y cols., 1997). Las aferencias distales que superan el umbral pueden así provocar potenciales dendríticos capaces de invadir el soma y provocar salvas de potenciales de acción (Cauller y Connors, 1994; Schiller y cols., 1997; Larkum y Zhu, 2002). Por otra parte, los potenciales de acción axónicos no solo invaden anterógradamente el axón, sino que también se propagan retrógradamente hacia la dendrita apical (Stuart y Sakmann, 1994), donde pueden así interaccionar con las aferencias distales. Se ha propuesto que cuando un potencial distal coincide con otro potencial que se propaga retrógradamente por la dendrita, en una ventana temporal de unos 20-30 mseg., disminuye significativamente el umbral de generación de potenciales de acción dendríticos, facilitándose mucho la transmisión de estímulos distales a la zona de inicio de los potenciales de acción axónicos (Larkum y cols., 1999). Es más, debido a este mecanismo, la frecuencia y tiempo de la actividad neuronal puede llegar a estar dominada por la aferencia distal (Larkum y cols., 2004; Sjöstrom y Häusser, 2006).

- (4) La caracterización de interneuronas que desde todas las capas corticales envían axones que arborizan selectivamente en la capa I (Wang y cols., 2004), así como la caracterización de diversas poblaciones de interneuronas específicas de esta capa (Hestrin y Armstrong, 1996; Zhou y Hablitz, 1996).
- (5) La constatación de diferencias en la complejidad y composición celular de la capa I en distintas especies, y en particular su gran desarrollo en primates (Zecevic y Rakic, 2001; Rakic y Zecevic, 2003).
- (6) La detección de una organización modular de los elementos constitutivos del neuropilo de la capa I con una distribución heterogénea de dendritas y aferentes corticales y subcorticales de diverso tipo (Ichinohe y cols., 2003).
- (7) El reconocimiento de que en la capa I arborizan selectivamente los axones cortico-corticales de las conexiones de retroalimentación (“feedback” o “top-down”) en la jerarquía de integración transcortical, y de la importancia de estas conexiones. Pese a su nombre, no se trata solo de un bucle de retroalimentación sino que su valor como ante- o retroalimentación fluctúa dinámicamente de acuerdo con las distintas demandas cognitivas y conductuales. Por ejemplo, estas conexiones parecen ser el sustrato que permite que áreas asociativas o de alto nivel jerárquico recluten y dominen en determinadas situaciones conductuales la actividad de las áreas primarias (Thomson y Bannister, 2003; Shlosberg y cols., 2003; Sjöstrom y Häusser, 2006).

Añadido a lo anterior, estudios fisiológicos dirigidos directamente a capa I de neocorteza de roedores revelan que la capa I posee un efecto neto inhibitorio en el circuito cortical (Shlosberg y cols., 2003). Asimismo se ha sugerido que a través de sus interneuronas intrínsecas, la capa I es crítica para sincronizar y modular la propagación de la respuesta GABA a través del neocortex (Keros y Hablitz, 2005).

2.2 Células de capa I.

La población neuronal cuyos somas se alojan en la capa I adulta en roedores es muy escasa. Está constituida por a) neuronas *pequeñas estrelladas* de axón descendente situadas preferentemente en la mitad inferior de la capa; b) neuronas *neurogliaformes*, cuyos axones se limitan a la propia capa I; c) células con un soma vertical, situadas en la mitad superior de la capa; y d) células bipolares, además de otras con morfologías diversas (Zhou y Hablitz, 1996; Hestrin y Armstrong, 1996; Gonchar y Burkhalter,

1999). En carnívoros, alrededor del 95% de estas neuronas son GABAérgicas (Gabbot y Somogyi, 1986; Prieto y cols., 1994; Li y Schwark, 1994; Zhou y Hablitz, 1996). La densidad y diversidad de las interneuronas locales se incrementa en especies con un gran desarrollo isocortical como primates. A esta diversidad y mayor número contribuye el hecho de que en los primates persisten en el adulto al menos parte de las células de Cajal-Retzius (Zecevic y Rakic, 2001; Rakic y Zecevic, 2003).

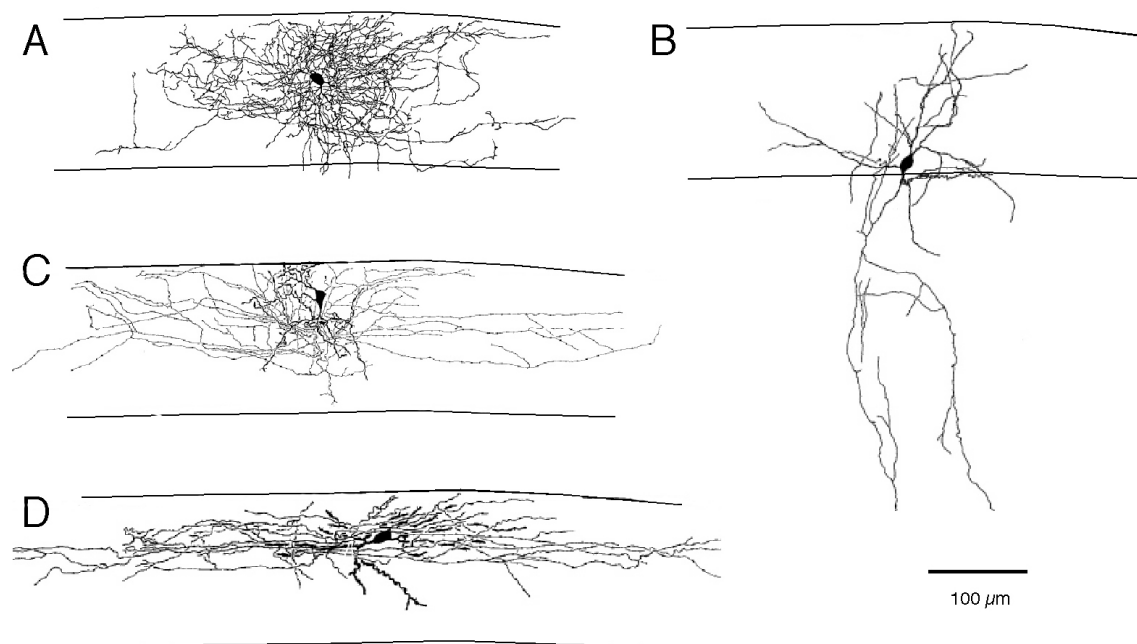


Figura 6. Tipos morfológicos más frecuentes de neuronas intrínsecas de la capa I de la rata, tras relleno intracelular con biocitina en rodajas de tejido. A: Neurona neurogliaforme. B: neurona con axón descendente. C: neurona vertical. D: neurona bipolar. Modificado de Zhou y Hablitz (1996) y Hestrin y Armstrong (1996).

3. NEUROPILO DE LA CAPA I.

3.1 Dendritas de células piramidales.

Además de las propias dendritas de las células cuyo soma se aloja en la capa I, la capa I alberga típicamente los penachos distales de dendritas apicales de células piramidales cuyos somas se localizan en capas inferiores (II-VI). No obstante, mientras unas pirámides forman un profuso penacho distal en esta capa, otras apenas arborizan. Por ejemplo, las pirámides de las capas II y III (LaBerge, 2006) y las neuronas corticoespinales y corticotectales de la capa V forman penachos apicales en la capa I (Deschenes y cols., 1994; Veinante y cols., 2000; Guillery y cols., 2001, Degenetais y cols., 2002; Haman y cols., 2002). En cambio, las dendritas de las

pirámides corticocorticales de la capa V o las corticotalámicas de la capa VI no llegan a arborizar en la capa I (Lorente de Nó, 1938; Hallman y cols., 1988; Wiser y Callaway, 1996; Veinante y Deschenes, 2003; Gao y Zheng, 2004; Voelker y cols., 2004; Molnar y Cheung, 2006).

El proceso de crecimiento dendrítico apical parece estar finamente regulado, porque durante el desarrollo temprano todas las neuronas piramidales han tenido un proceso apical que, inicialmente al menos, alcanzaba la zona marginal del palio en desarrollo (capa I en adulto) (Koester y O'Leary, 1992; Marín-Padilla, 1992; Polleux y cols., 2000; Whitford y cols., 2002; Olson y cols., 2006).

3.2 Dendritas de interneuronas profundas.

No sólo se localizan en capa I las dendritas correspondientes a las células intrínsecas de capa I o de células piramidales, también hay dendritas, en menor medida, de interneuronas que alcanzan la capa I. Así, podemos también encontrar dendritas correspondientes a células en candelabro, doble-bouquet, bipolares y multipolares cuyos somas se encuentran alojados en capa II-III (Kawaguchi, 1995; Markram, 2004). En primate, además, se han descrito células piramidales invertidas cuya dendrita también alcanza capa I (Qi y cols., 1999).

3.3 Aferentes extrínsecos. Proyección excitatoria e inhibitoria a la capa I.

Las proyecciones que alcanzan capa I de corteza cerebral convergen sobre la dendrita apical de las neuronas piramidales (Vogt, 1991). Se ha sugerido que la activación de los sistemas que proyectan a la capa I de la corteza cerebral están el la base de los mecanismos de atención y binding (Cauller, 1995; Lamme y cols., 1998; Olson y cols., 2001; Llinás y cols., 2002). Los axones que inervan la capa I de corteza proceden en gran parte de la propia corteza cerebral, así como de otros grupos neuronales subcorticales.

La anatomía y fisiología de los sistemas de neurotransmisores moduladores y sus inervaciones en la corteza cerebral están bien caracterizados. Los neurotransmisores en la corteza cerebral se pueden clasificar según su acción fisiológica: 1) aquellos con efectos excitatorios, como el glutamato (Glu), 2) aquellos con efectos inhibitorios, como el ácido gamma –aminobutírico (GABA) y 3) aquellos con efectos excitatorios e inhibitorios, es decir, en función del tipo celular postsináptico y de la composición del receptor, estos neurotransmisores pueden actuar con efectos excitatorios o inhibitorios

(Gu, 2002). Este último grupo incluye neurotransmisores como la acetilcolina (ACh), noradrenalina (NA), serotonina (5-HT), dopamina (DA) e histamina (Hi), que poseen algunas características comunes, tales como que sus axones se originan fundamental o exclusivamente de núcleos localizados fuera de la corteza cerebral.

3.3.1 *Axones corticales locales.*

Los axones de las neuronas piramidales (glutamatérgicas) emiten colaterales que arborizan en la corteza, especialmente allí donde también están arborizando sus dendritas (Feldman, 1984). Además, en la rata existe una importante proyección desde neuronas situadas en la capa VII (Clancy y Cauller, 1999). Estas neuronas proceden probablemente de la subplaca embrionaria (Reep, 2000). Responden a hipocretina-orexina y podrían estar implicadas en fenómenos de activación cortical durante la vigilia (Bayer y cols., 2004). Su naturaleza bioquímica no está establecida, aunque se sabe que contienen mRNA del factor de crecimiento de tejido conectivo (Heuer y cols., 2003; Watakabe y cols., 2004).

También las células de Martinotti (GABAérgicas) presentes en todas las capas inervan esta capa (Wang y cols., 2004). Asimismo, se ha observado en corteza de rata terminaciones GABAérgicas de células bipolares y células doble-bouquet de capas II-III y V que también arborizan en capa I (Kawaguchi y Kubota, 1993; Kawaguchi 1995; Shlosberg y cols, 2003; Markram y cols, 2004). Estudios en roedores han mostrado que la mayor aferencia inhibitoria a capa I tiene naturaleza somatostatin (+), frente a la naturaleza calretinina (+), es decir, que aunque pudieran existir más tipos de interneuronas que proyectan a capa I, supuestamente la mayor aferencia provendría de las células de Martinotti. Dichos axones somatostatin (+) se localizan principalmente en su mitad externa (Shlosberg y cols., 2003). No se conoce con exactitud, sin embargo, la proporción de cada tipo de interneurona que pudiera estar proyectando a capa I en el microcircuito cortical.

3.3.2 *Axones corticocorticales ipsi- y contralaterales.*

El cuerpo calloso es la principal vía comisural conectando los dos hemisferios cerebrales en el cerebro de mamíferos placentarios, extendiéndose ampliamente desde el lóbulo parietal al lóbulo frontal (Innocenti, 1986). Las neuronas piramidales (glutamatérgicas) localizadas principalmente en las capas II-III y V proyectan a las espinas de las neuronas piramidales en áreas homo y heterotípicas de la corteza

contralateral (Innocenti, 1986). Hay estudios que indican que las proyecciones comisurales de cualquier área son particularmente densas en el área homotópica (Rockland y Pandya, 1986; Clascá y cols., 2000; Liu y cols., 2002). Asimismo, las proyecciones comisurales se originan mayoritariamente desde la capa III y Va. Las capas profundas sin embargo participan en el sistema comisural en menor medida, aunque pueden tener una mayor representación en algunas áreas premotoras en el primate (Nimchinsky y cols., 1996) y en corteza posterior de roedores (Olavarria y Van Sluyters, 1983).

La proyección ipsilateral también tiene, en general, su origen en las capas superficiales (II-III) y profundas (V), aunque exhibe un patrón laminar de neuronas proyectantes y terminaciones característico del área cortical (Koralek y cols., 1990). Ambos tipos de axones, ipsi- y contralaterales, pueden terminar en todas las capas de la corteza cerebral (Koralek y cols., 1990; Cauller y Connors, 1994; Mitchell y Cauller 2001)

Se cree que a capa I llegan sobre todo proyecciones ipsilaterales “feedback” o “top-down”. Parece ser que éstas provienen mayoritariamente de las células piramidales cuyo soma está principalmente localizado en las capas infragranulares (Felleman y Van Essen, 1991; Cauller, 1995; Mitchell y Cauller 2001) .

Algunos autores han descrito conexiones callosas de naturaleza inhibitoria (Buhl y Singer, 1987; Vercelli y cols., 1992). En rata y utilizando tanto GABA como GAD, sólo se han identificado en células proyectantes extrínsecamente desde el área 18 ipsilateral al área 17 y viceversa (McDonald y Burkhalter, 1993), de SII a S1 (Fabri y Manzini, 1996) o a través del cuerpo calloso (Gonchar y cols., 1995).

3.3.3 *Axones procedentes del claustró y de la amígdala.*

El *claustró* es una estructura filogenéticamente conservada relacionada con la corteza, situado bajo la corteza insular, con extensas conexiones recíprocas con la corteza, que está probablemente más implicado en la coordinación e integración de los procesos que toman parte en las diferentes regiones corticales (Kowiński y cols, 2001; Miyashita 2005). En roedores (Zhang y cols., 2001), al igual que en carnívoros (LeVay ySheik, 1981; Clascá y cols., 1992) las proyecciones desde el claustró llegan a todas las capas de la corteza, aunque más profusamente en capas IV y I.

En el claustró se diferencian dos clases de neuronas: neuronas de proyección e interneuronas, siendo estas últimas de naturaleza GABAérgica (Kowiński y cols,

2001). Hay evidencia en carnívoros para pensar que los terminales de dicho núcleo podrían liberar en la corteza glutamato y/o aspartato (Pérez-Cerda F y cols., 1996). Estudios en rata muestran que las neuronas de proyección en rata expresan Netrina-G2 positivas, al igual que en primates (Miyashita 2005) y NOS, y son positivas para NADPH-diaforasa; las interneuronas, por el contrario, expresan SOM, VIP y NPY y se pueden diferenciar de las células proyectantes porque éstas, en principio, no colocalizan NOS (Kowiński y cols., 2001). La colocalización de GABA con NOS y diversos neuropéptidos se ha descrito en rata para varias regiones corticales (DeFelipe, 1993). En roedores, sin embargo, todavía no se ha estudiado una colocalización similar en claustró, por lo que sigue siendo una cuestión abierta la naturaleza de las proyecciones claustró-corticales (Kowiński y cols., 2001).

La *amígdala* es una heterogénea colección de grupos celulares en el lóbulo temporal medial y regiones adyacentes del lóbulo piriforme que ha sido definido fundamentalmente en términos de anatomía macroscópica (Swanson, 2003). En la amígdala se suelen diferenciar dos grandes porciones: 1) el núcleo centromedial que están estrechamente asociados al estriado, y 2) los núcleos basolateral (que se puede dividir en parte anterior y posterior) y cortical, estrechamente asociados a la corteza cerebral (Krettek y Price, 1977; McDonald AJ, 2003). Estudios cualitativos en corteza prefrontal han mostrado que las proyecciones desde la amígdala (concretamente desde el núcleo basolateral) terminan en las capas I-II y V-VI tanto en primates (Glashghaei y cols., 2007) como en gato (Krettek y Price, 1977) y rata (Krettek y Price, 1977; Bacon y cols., 1996).

Al igual que en el claustró, en el núcleo basolateral de la amígdala se diferencian dos tipos celulares: células piramidales, consideradas las células de proyección a corteza, y no piramidales (McDonald, 1996). Estudios en rata, gato y primate sobre la naturaleza de las proyecciones amígdalo-corticales muestran que son de naturaleza excitatoria, y pueden utilizar tanto glutamato como aspartato (Amaral e Insausti, 1992; McDonald, 1996; Sosulina y cols., 2006).

3.3.4 *Axones procedentes del hipotálamo*

El *hipotálamo* es una colección de núcleos celulares localizadas bajo el tálamo que están implicados en la regulación de las funciones autónomas. Las *proyecciones hipotálamo-corticales* se ha estudiado en detalle en la rata (Saper, 2004) y en primate

(Barbas y cols., 2003). Cuatro poblaciones separadas de neuronas hipotalámicas son las que constituyen la fuente principal de inervación cortical: núcleo tuberolateral hipotalámico (LHAt), campos de Forel (FF), núcleo posterolateral hipotalámico (LHAp) y núcleo tuberomamilar. En líneas generales, las proyecciones hipotálamicocorticales son ipsilaterales y se dirigen hacia cortezas frontales, cingular y perirrinal (Saper, 2004). En la neocorteza, la inervación más densa se da en capas V y VI, aunque también se encuentra en las capas I y III, de una manera más escasa (Saper, 2004). En primate este patrón de inervación sólo cambia en la densidad de la inervación, que, al contrario que en el roedor, es en la capa I donde se encuentra más profusa (Barbas y cols., 2003). El hipotálamo es considerado como un sistema activador de la corteza, cuyo principal neurotransmisor para ello es la histamina (Lin, 2000). Sin embargo, se ha descrito en rata, tras experimentos utilizando trazadores retrógrados e inmunohistoquímica para GAD, neuronas magnocelulares GABAérgicas en el hipotálamo posterior que proyectan a neocorteza (Vincent, 1983).

3.3.5 *Prosencéfalo basal.*

El *prosencéfalo basal* está constituido por un heterogéneo conjunto de grupos celulares: el núcleo basal de Meynert, núcleos basales (caudado, putamen y globo pálido), estriado (núcleo accumbens y tubérculo olfatorio) y pálido ventral (sustancia innominada). La inervación que se produce en corteza desde el *prosencéfalo basal*, se ha estudiado en rata, gato y mono (Rieck y Carey, 1984; Barstad y Bear, 1990; Lewis, 1991). Sólo se origina en algunos de estos núcleos (destaca el núcleo basal de Meynert) y, en general se dispersa sobre la corteza cerebral de modo relativamente difuso (Avendaño y Llamas, 1984). Esta inervación en primates y carnívoros es profusa en capa I, y menos densa en capas III, IV y V (Barstad y Bear, 1990; Lewis, 1991). En la rata, en cambio, la inervación a capa I es, en principio, insignificante (Rieck y Carey, 1984).

La naturaleza química del prosencéfalo basal también se ha caracterizado en la rata. Las neuronas colinérgicas del prosencéfalo basal se entremezclan con las neuronas GABAérgicas. En términos anatómicos, las neuronas GABAérgicas están en una proporción de 2:1 con respecto a las colinérgicas. En esencia, las neuronas colinérgicas y GABAérgicas del prosencéfalo basal proyectarían en paralelo a la corteza (Gritti y cols., 1997; Sarter y Bruno, 2004). Se acepta que estas neuronas son positivas para parvalbúmina (PV) y que contactan, primariamente, con neuronas GABAérgicas de la

corteza (Sarter y Bruno, 2004). En la rata, la localización de las neuronas PV (+) del prosencéfalo basal se da preferentemente en el globo pálido lateral. Las neuronas colinérgicas, en cambio, se localizan preferentemente en el núcleo basal de Meynert y en la sustancia innominada (Sarter y Bruno, 2004). No se conoce con exactitud, sin embargo, si en roedores alcanzarían también los axones de naturaleza inhibitoria capa I desde el prosencéfalo basal (Gritti y cols., 1997; Sarter y Bruno, 2004).

3.3.6 Axones glutamatérgicos procedentes del tálamo.

Dorsal al hipotálamo, esta estructura de origen diencefálico actúa como centro de relevo de la información sensitiva (excepto del olfato) que alcanza la corteza cerebral. Las proyecciones tálamo-corticales se han estudiado en roedores (Fairén y Valverde, 1979; Lin y cols., 1996), carnívoros (Rausell y Avendaño, 1985; Avendaño y cols., 1990) y primates (Avendaño y cols., 1990; Jones 1998a,b, 2001, 2002) y son de naturaleza excitatoria (Fujiyama y cols., 2001, Kaneko y Fujiyama, 2002). Siguiendo a Jones, se podría realizar una clasificación de las neuronas tálamo-corticales (TC) en dos tipos básicos (Jones, 1998a,b, 2001):

a) la *matriz talámica* (rebautizando el LIPS de Avendaño y cols., 1990), compuesta según esta hipótesis, por neuronas de menor tamaño somático, que expresarían calbindina y que inervan la capa I de la corteza cerebral de una forma “difusa”, sin respetar los límites de las áreas de la corteza cerebral reconocidas citoarquitectónica y funcionalmente, y distribuidas en todos los núcleos talámicos. Son axones a los que se les conoce como los implicados en el procesamiento de la información “no específica” (Thomson y Bannister, 2003; Rubio-Garrido y cols., 2007).

b) el “*core*” *talámico*, compuesto por neuronas que expresan parvalbúmina, que inervan las capas IIIb-IV y VI de áreas corticales circunscritas, y presentes sólo en algunos núcleos talámicos.

3.3.7 Subtálamo.

Desde la *zona incerta* (extensión de células subtalámicas localizadas ventrales al tálamo) algunos autores han sugerido que se produce una importante inervación gabaérgica de la capa I que es activa desde el nacimiento (Dammerman y cols., 2000; Sarter y Bruno, 2002). En la zona incerta se pueden realizar dos subdivisiones funcionales: la dorsal (ZId) y la ventral (ZIv). En roedores, son las células de la ZIv las que proyectan a neocorteza y tienen una naturaleza inhibitoria (GABA) (Nicoletis y

cols., 1995; Lin y cols., 1997), inervando densamente capa I, mayormente en corteza somatosensorial (Lin y cols., 1997). Sin embargo, en estos trabajos la división entre zona incerta y tálamo dorsal es, al menos, dudosa con la división entre ambas actual. Además, en la identificación de la naturaleza inhibitoria de las supuestas células de la zona incerta, Nicolelis y cols. realizaban inyecciones columnares en corteza, no limitadas exactamente a capa I (Lin y cols., 1990; Nicolelis y cols., 1995), por lo que la inervación inhibitoria desde ZI a capa I de corteza sigue siendo una cuestión dudosa.

3.3.8 Aferentes troncoencefálicos.

I. Rafe y locus coeruleus.

Los núcleos del rafe se encuentran en la porción medial de la formación reticular del tronco del encéfalo. En la rata la inervación cortical de serotonina (5-HT) se origina de dos núcleos del rafe (dorsal y mediano) (Azmitia y Segal, 1978). Los terminales de 5-HT están presentes en todas las áreas y capas corticales, aunque hay sutiles diferencias en la densidad y distribución laminar entre diferentes regiones corticales (Gu, 2002). Esta distribución se ha estudiado en roedores (Lidov y cols., 1980; Papadopoulos y cols., 1978), carnívoros (Gu y cols., 1990; Voigt y de Lima, 1991) y mono (Morrison y cols., 1982; Takeuchi y Sano, 1984). Aunque la inervación de serotonina en corteza se realiza en todas las capas, en roedores y en carnívoros la mayor densidad de terminales serotoninérgicos se encuentra en las capas superficiales (I-III) (Gu, 2002).

Respecto a la naturaleza de las células serotoninérgicas en el rafe, Stamp y Semba en un estudio sistemático utilizando un método indirecto, concluyeron que sólo un pequeño porcentaje de células en los núcleos del rafe magno y rafe oscuro (3.6% y 1.5%, respectivamente) contenían tanto GABA como 5-HT (Stamp y Semba, 1995).

El locus ceruleus (LC) es un núcleo localizado en el tronco cerebral, en la zona dorsal del tegmento pontino. Es la fuente principal de noradrenalina a la corteza cerebral. Proyecta a regiones alejadas de él, e incluye a todas las capas de la neocorteza (Gu, 2002), aunque el patrón laminar puede variar entre especies. Éste se ha estudiado en roedores (Morrison y cols, 1978), carnívoros (Liu y Cynader, 1994) y primates (Morrison y cols, 1982). En rata y carnívoros se da, de nuevo, la mayor densidad de terminales en las capas superficiales, incluyendo capa I.

En un estudio en tronco de rata, Ijima y cols. realizaron en secciones adyacentes inmunocitoquímicas para GABA y para trirosin-hidroxilasa concluyeron que el 80 % de células noradrenérgicas del LC son también GABAérgicas (Ijima y cols., 1992; Ijima, 1993).

II. *Área tegmental ventral (VTA)*. El VTA contiene neuronas dopaminérgicas (DA) agrupadas en núcleos cerca de la línea media las zonas ventrales del tegmento mesencefálico (Oades y Halliday, 1987).

En la corteza cerebral todas las capas contienen terminales dopaminérgicos que emanan de los grupos celulares del área tegmental ventral (ventral tegmental area o VTA) (Gu, 2002). Sin embargo, su distribución puede variar entre especies. En roedores, por ejemplo, son las capas V-VI las que muestran un mayor número de receptores para dopamina (Boyson y cols., 1986; Richfield y cols., 1989). Sin embargo, en carnívoros la concentración de receptores de dopamina se da también en las capas superficiales I-III (Richfield y cols., 1989) y en primate las fibras dopaminérgicas adquieren mayor densidad en las capas I-III y V-VI (Lewis y cols., 1987).

En el VTA se diferencian dos tipos de neuronas proyectantes a corteza: neuronas dopaminérgicas y neuronas GABAérgicas (Phillipson, 1979a, 1979b; Peters y cols., 2004). Recientemente, Yamaguchi y cols. han caracterizado una tercera población, glutamatérgica, de neuronas en el VTA de la rata (Yamaguchi y cols., 2007).

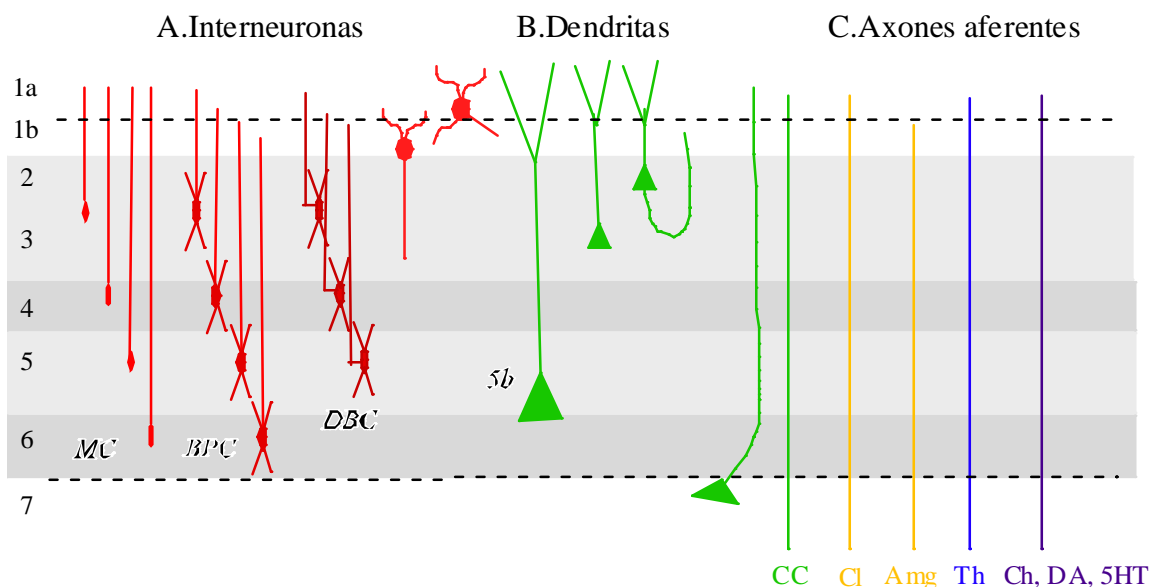


Figura 7 : Esquema-resumen de los procesos celulares presentes en la capa I de la corteza cerebral de la rata. De modo muy simplificado se representan tanto los axones y dendritas de distinto origen. Para mayor claridad se omiten los detalles de esas mismas células o axones en las capas II-VII de la corteza. Hasta donde es posible con la información actualmente publicada, se indica esquemáticamente la sublámina de la capa I en la que preferentemente se sitúan los distintos procesos celulares. MC: Células de Martinotti; BPC: Células bipolares; DBC: Células de *doble-bouquet*; CC: Axones córtico-corticales; Cl: Claustro; Amg: Amígdala; Th: Tálamo; Ch, DA, 5HT: Axones colinérgicos y monoaminérgicos del prosencéfalo basal y tronco encefálico.

4. OTROS ELEMENTOS DE LA CAPA I.

4.1. *Glía.*

4.1.1. Astrocitos.

Profundamente a la lámina basal, la porción más externa del tejido nervioso propiamente dicho es un estrato de procesos gliales al que se conoce como “membrana limitante glial” (Peters, 1991). Durante el desarrollo, esta capa está inicialmente formada por la fusión de los pies piales de la glía radial (Derer, 1979). Al terminar la neurogénesis, la membrana limitante glial pasa a estar formada por varias capas de prolongaciones de astrocitos estrechamente superpuestas e interdigitadas que forman una barrera continua. Con la edad, esta capa se engruesa progresivamente y aumenta el contenido de haces de fibras colágenas de las prolongaciones astrocitarias (Peters y Sethares, 2002). Dichas prolongaciones astrocitarias muestran un elevado contenido en aquaporina-4, la proteína de transporte de agua a través de la membrana celular predominante en el sistema nervioso.

Precisamente a través de las aquaporinas hay un pequeño flujo constitutivo neto de agua hacia el líquido cefalorraquídeo en la superficie pial. Este flujo participa en la regulación del volumen del espacio intersticial cortical y, con él, de aspectos funcionalmente importantes como la concentración extracelular de K^+ y el edema cerebral (Amiry-Moghaddam y cols., 2004).

Aunque clásicamente se ha considerado a los astrocitos como células de soporte que no contribuían al procesamiento de información en el sistema nervioso, recientemente se ha puesto de manifiesto que estas células, además, están implicados indirectamente en el procesamiento de información por las células piramidales, pudiendo aumentar la eficacia en la transmisión sináptica (Perea y Araque, 2006, 2007).

4.1.2. Oligodendrocitos. Organización de las vainas de mielina.

Los axones de muchas neuronas están rodeados de envueltas gliales ricas en mielina, las cuales aceleran la propagación de los potenciales de acción. Dentro del SNC, los

oligodendrocitos son las células encargadas de formar la mielina. Esta capa lipídica deriva de la membrana plasmática de los oligodendrocitos, aunque su composición difiere de la que presenta la membrana progenitora. En peso seco, la mielina está compuesta por un 70-75% de lípidos y un 25-30% de proteínas. La mielinización comienza, en la rata, aproximadamente una semana después del nacimiento, siendo más activa a la tercera semana postnatal declinando después progresivamente. En el hombre, el proceso de mielinización abarca desde las 25 semanas de gestación hasta al menos los 20 años de edad (Banmanny Pham-Dinh, 2001).

Basándonos en el grado de mielinización se distinguen en capa I de corteza cingular de rata clásicamente varias subcapas en la dimensión radial (Vogt, 1991). El estrato más externo contiene axones fundamentalmente amielínicos y dendritas finas. En la capa intermedia, están presentes dendritas apicales gruesas orientadas perpendicularmente y un denso plexo de axones muy mielinizados. En la mitad profunda de la capa, de modo general, alternan zonas ocupadas por segmentos iniciales de las dendritas apicales de pirámides de capa II, e intersticios donde se alojan las dendritas apicales de las pirámides situadas en capas más profundas. Contiene axones fundamentalmente amielínicos, al igual que en la subcapa más superficial (Vogt, 1991).

4.1.3. Microglía.

Como cualquier otro macrófago, se la caracteriza con enzimas hidrolíticas, absorción de carbono y una morfología característica observable con microscopía electrónica. Aparte de su función como fagocitos activos, la microglía está implicada en síndromes degenerativos como la enfermedad de Alzheimer (Ling y Wong, 1993).

4.2. *La membrana basal.*

El límite externo de la capa I es un interfaz mesénquima-epitelial, y como tal está delineado por una lámina basal. Esta lámina es un fino estrato de matriz extracelular que está formado por un complejo entramado de *glicoproteínas* como lamininas, entactina-1/nidogen-1, Colágeno tipo IV, y *proteoglicanos* como perlecan, heparansulfato y agrina (Erickson y Couchman, 2000). Durante la histogénesis cortical, la lámina basal desempeña un papel crucial como sustrato de adhesión celular para el anclaje de la glía radial y de algunas migraciones neuronales (Halfter y cols., 2002). Asimismo, se ha sugerido que durante el desarrollo los proteoglicanos puedan estar también controlando la respuesta del neuroepitelio a factores de crecimiento, ya que son capaces de modificar la concentración

de los morfógenos según su afinidad de unión a ellos (Girós y cols., 2007). En el adulto, se considera que ejerce un papel adhesivo y de sostén.

4.3. *La Piamadre.*

Externamente a la capa I cortical y a la membrana basal se sitúa la piamadre. Esta leptomeninge está formada por una o varias capas de fibroblastos aplanados y con frecuencia solapados, algunos macrófagos, y fibras colágenas. Superficialmente a ella se sitúa el espacio subaracnoideo, ocupado por el líquido cefalorraquídeo. La superficie interna de la piamadre se acerca, y con frecuencia contacta, la lámina basal del tejido nervioso. Sin embargo el límite es siempre evidente, porque las células de la piamadre carecen de lamina basal propia. En el espacio que separa a la piamadre de la lamina basal (espacio “subpial”), se observan algunas fibras de colágeno (Peters, 1991). En la corteza cerebral de la rata, la piamadre es unicelular o incluso presenta algunas fenestraciones, donde la lámina basal queda directamente expuesta al espacio subaracnoideo (Brightman, 1965; Morse y Low, 1972). La piamadre y células aracnoideas envuelven a los vasos corticales en el espacio subaracnoideo y acompañan durante una distancia variable, a modo de manguito, a las arterias que penetran en el parénquima cortical.

4.4 *Estratificación y modularidad tridimensional de la capa I.*

El límite interno de la capa I es simplemente la línea imaginaria limitada por los somas de las neuronas piramidales. Esta delimitación se basa en sobre todo en el aspecto que estos ofrecen observaciones de tejido teñido con técnicas de Nissl que impregna los ácidos nucleicos del núcleo y los polirribosomas del perikarion neuronal. Pero la alineación de estos somas, que son elementos discretos y relativamente independientes, no es estricta, ni continua. La alineación de los somas que genera este límite depende de la correcta regulación de la adhesión y la cariocinesis migración radial de las neuronas; por ello el borde interno de la capa I desaparece por completo en trastornos de la migración como el fenotipo Reeler y afines, o, más focalmente en alteraciones de la lámina basal/membrana limitante glial como el ratón Dreher de LimX1 (Costa y cols., 2001), o en las lisencefalias humanas tipo II.

Por otra parte, es bien sabido que en áreas allocorticales de la corteza entorrinal o el complejo subicular los somas de la capa II se agrupan formando compactos acúmulos o “nidos” celulares que dejan entre ellos espacios libres de somas; de esta forma, el límite entre la capa I y II toma un aspecto almenado y resulta confuso.

Pese a su escaso grosor y aunque en preparaciones de Nissl presenta un aspecto homogéneo, clásicamente la capa I se divide al menos en dos o tres estratos tangenciales (subláminas) basándose en su fibro y dendroarquitectura, conexiones e histoquímica. Las tinciones de mielina y la microscopía electrónica permiten distinguir tres subláminas (Vogt, 1991). La más externa, pobre en axones, amielínicos o pobremente mielínicos, con presencia de ramas dendríticas finas; una capa intermedia, con troncos gruesos de dendritas apicales orientadas perpendicularmente y con un denso plexo de axones muy mielinizados (*stria laminae molecularis* en la nomenclatura anatómica, Feneis y Dauber, 2000); y la capa más profunda, con dendritas orientadas oblicuamente y el segmento inicial de las dendritas apicales de las neuronas de la capa 5, y con axones poco mielinizados.

En otros sistemas es bien conocido que en la capa molecular externa existe una precisa organización y segregación laminar de los aferentes. Esto es muy evidente en el hipocampo, las aferentes entorrinales y talámicas finalizan en el estrato lacunosomolecular, donde están presentes la porción más distal de las dendritas apicales de las células piramidales de CA3, mientras las aferentes comisurales finalizan en el stratum radiatum. En la corteza rínica, las aferentes del bulbo olfatorio finalizan en la mitad externa de la capa I, y las aferentes asociativas en la mitad interna. Hay evidencia de que en la capa I de la neocorteza existe igualmente una segregación laminar de los aferentes.

Por ejemplo, la capa Ia contiene las terminaciones de los axones TC, mientras que la Ib contiene los axones procedentes de la amígdala. La heterogeneidad de la capa I es también puesta de manifiesto por la distribución de neuropilo GABA y GAD+, de fibras colinérgicas y TH+ presentes en la capa Ia (Houser y cols., 1983; Campbell y cols., 1987; Prieto, 1994).

También, la capa Ib del neocórtex se caracteriza por contener los segmentos iniciales de las dendritas apicales de todas las pirámides cuyos somas forman la capa II. El penacho apical de estas neuronas se extiende en la capa Ia. Los segmentos iniciales de estas dendritas apicales tienen en muchos casos una distribución no homogénea en el plano tangencial, especialmente allí donde la capa II es discontinua. De esta forma puede decirse de modo general que la capa Ib contiene de modo discontinuo zonas ocupadas por segmentos iniciales de las dendritas apicales de pirámides de capa II, e intersticios de diversa amplitud donde se alojan las dendritas apicales de las pirámides situadas en capas más profundas. Esta distribución fue inicialmente detectada mediante estudios con técnicas de relleno intracelular en la corteza retrosplenica de la rata (Wyss y cols., 1990). Recientemente, Ichinohe y cols. han generalizado esta distribución para varias áreas

neocorticales de la rata y el macaco (Ichinohe y cols., 2003b; Ichinohe y Rockland, 2004). Estos autores han propuesto un modelo de distribución heterogénea, “en panal”, en la capa Ib y II de las dendritas apicales de las pirámides de la capa II frente a las de las capas III y V.

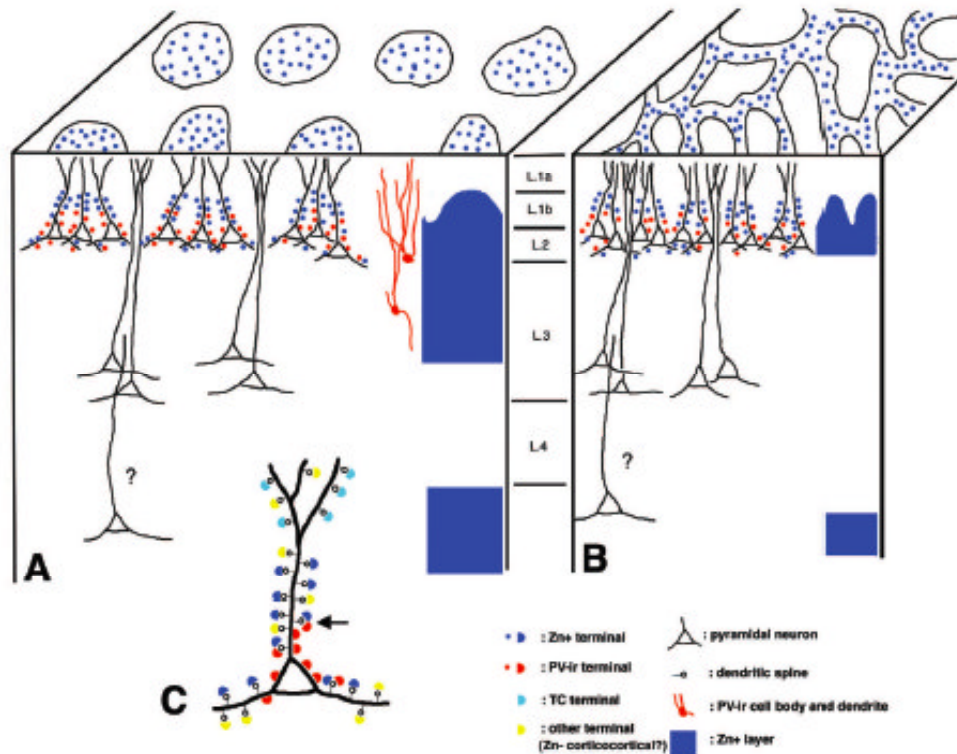


Figura 8. Neuropilo de la capa I: organización de general de los penachos dendríticos distales. A: Inmunotinción frente a la proteína asociada a microtúbulos tipo 2 (MAP2), que revela indiscriminadamente, y de modo incompleto, las arborizaciones dendríticas en las capas superficiales de la corteza somestésica de rata. La línea discontinua marca el límite entre las capas I y II. Barra = 50 µm. **B:** Esquema tridimensional de la organización espacial de los penachos dendríticos de neuronas piramidales de distintas capas que arborizan en la capa I. **C:** Esquema de la organización y agrupamiento selectivo de los penachos apicales de las neuronas piramidales de distintas capas. Se indican también los distintos aferentes que alcanzan el tallo o el penacho apical de las pirámides de la capa II. En azul claro se señalan los aferentes talamocorticales que terminan sobre espinas del penacho apical. Paneles A y B modificados de Escobar y cols. (1986); panel C, tomado de Ichinohe y Rockland (2004).

5. LA MATRIZ EXTRACELULAR.

En la capa I, como en el resto del sistema nervioso, los componentes celulares se encuentran embebidos en una matriz extracelular. La matriz extracelular (ECM) de un tejido actúa como componente cohesivo e integra las diferentes unidades funcionales celulares. Se compone de material extracelular y forma parte del mismo tejido, por lo que es muy variable (difiere de un tejido a otro). Tanto su volumen como su función han

pasado desapercibidos en el sistema nervioso central (SNC) hasta épocas más recientes (Nicholson y Syková, 1998). En el SNC, muchas de las moléculas que forman parte de la ECM se distribuyen amplia y selectivamente en el cerebro adulto, por lo que la composición de la ECM varía según la citoarquitectura (Nicholson y Syková, 1998).

A lo largo de los últimos años se ha ido alcanzando la idea de que las moléculas de la matriz extracelular son importantes tanto en el desarrollo embrionario como en la maduración postnatal del cerebro. Sus habilidades en la señalización celular y regulación de adhesión las hace potenciales moduladores de plasticidad sináptica (Dityatev & Schachner, 2003; Berardi et al., 2004). Entre esta clase de moléculas se encuentra la glicoproteína Reelina (D’Arcangelo, 2005).

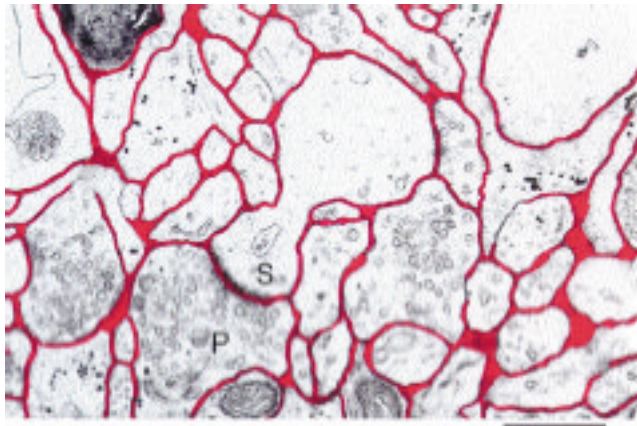


Figura 9. Geometría del espacio extracelular. Electromicrografía de una pequeña región de corteza de rata con prominentes espinas dendríticas (S) y terminales presinápticas (P). El espacio extracelular está resaltado en rojo. Nótase la presencia de “lagos”. El espacio seguramente se haya visto reducido por el proceso de fijación. Barra de 1 μ m. Tomado de Nicholson y Syková (1998).

5.1. Reelina.

Reelina es una glicoproteína de elevado peso molecular (3461 residuos aminoacídicos) y de estructura muy conservada en vertebrados (D’Arcangelo y cols., 1997).

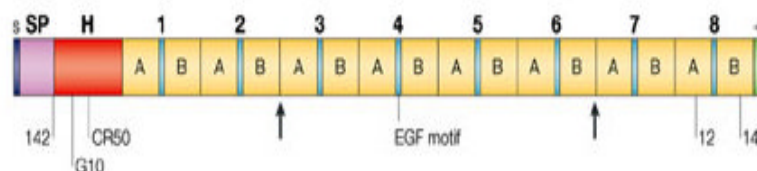


Figura 10. Esquema de la proteína Reelina. La secuencia empieza con el péptido señal de 27 residuos, seguido por una región similar a la F-espondina. Un único segmento (segmento H) entre los aminoácidos 191 y 500 es seguido por 8 repeticiones de 350 aminoácidos. Cada repetición contiene un motivo de factor de crecimiento epidérmico (EGF) en el centro, flanqueado por dos subrepeticiones que muestran mucha similitud entre ellos (A y B). La proteína termina con una cola de 33 aminoácidos ricos en residuos básicos. Se muestran los epítomos reconocidos por los anticuerpos 142, G10, CR50, 12 y 14. Se indican mediante flechas los lugares de su procesamiento *in vivo*. Tomado de Tissir y Goffinet (2003).

Una vez secretada, reconoce a los receptores de lipoproteínas y activa, así, una cascada de señales intracelulares que se traducen en la regulación del citoesqueleto para un correcto posicionamiento final durante la migración neuronal (Rice y Curran, 2001; Tissir y Goffinet, 2003). Se ha sugerido por ello que, mediante mecanismos análogos de regulación de la adhesión celular y la motilidad del citoesqueleto, Reelina podría ejercer efectos en el desarrollo postnatal o en el adulto sobre la remodelación y motilidad de las espinas dendríticas (Niu y cols., 2004). Recientemente se ha demostrado que Reelina regula a través de la unión al receptor tipo 2 de lipoproteína ApoE la fosforilación del receptor de NMDA (Weeber y cols., 2002, Beffert y cols., 2005). Durante el desarrollo postnatal, además, Reelina regula la maduración de dicho receptor (Sinagra y cols., 2005). Estos hallazgos implican así a Reelina directamente en la modulación funcional de una diana molecular clave en los procesos de maduración sináptica, capacidad para aprendizaje y capacidad para memoria (Impagnatiello y cols, 1998; Rodríguez y cols., 2000; Chen y cols., 2005; D'Arcangelo y cols., 2005).

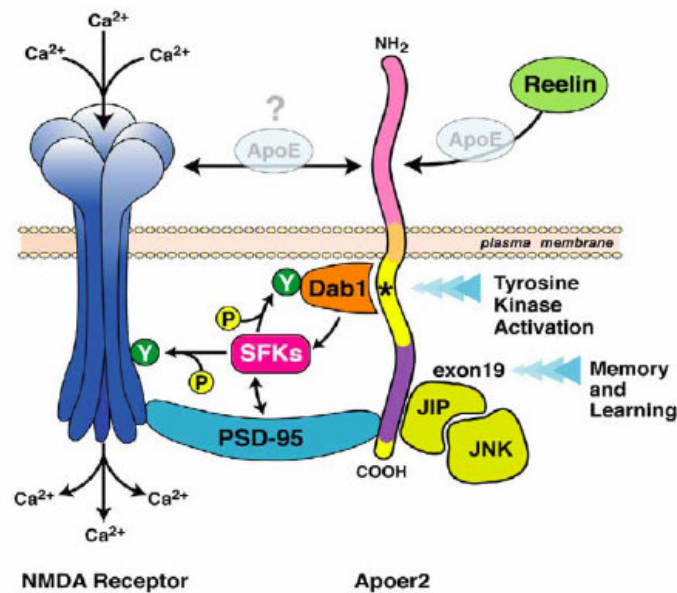


Figura 11. Modelo hipotético de la interacción del receptor del NMDA con el complejo del receptor de Reelina. El receptor Apoer2 forma parte del complejo del receptor NMDA. PSD-95 se puede unir a los dominios citoplasmáticos de los receptores Apoer2 y NMDA y promueve el reclutamiento de la proteína de la familia de las tirosin-kinasas Src (SFK) en el complejo, facilitando así la interacción y reclutamiento de Dab1. La unión de Reelina con Apoer2 permitiría el reclutamiento de los receptores Apoer2, Dab1 y NMDA, favoreciendo la actividad de la proteína SFK y la fosforilación del receptor NMDA. Esto aumentaría la conductancia del calcio y e incrementaría la potenciación. El reclutamiento de JNK a través de las proteínas JIPs también podría modular las respuestas sinápticas. ApoE podría también interferir con el receptor NMDA, sin conocer exactamente las consecuencias. El refinamiento de este modelo implicaría la identificación de la mutación selectiva de PSD-95 y los sitios de interacción de JIP con la secuencia del exón 19. Tomado de Beffert y cols. (2005).

Durante el período embrionario de la corteza cerebral, Reelina es expresada y secretada por una población neuronal transitoria situada en la zona subpial de la corteza llamada células de Cajal-Retzius. Durante el desarrollo postnatal otras poblaciones de diversas capas del neocortex y del hipocampo comienzan a expresar Reelina, manteniendo esta síntesis en el adulto (Alcántara y cols., 1998; Pesold y cols., 1998; Drakew y cols., 1998).

En adulto la expresión más abundante parece darse precisamente en varias poblaciones de interneuronas GABAérgicas (Alcántara y cols., 1998; Pesold y cols., 1998). En roedores concretamente se cree que son las células Martinotti, las células doble-bouquet, las células horizontales y las células multipolares (Alcántara y cols., 1998; Pesold y cols., 1999). Además, se ha sugerido que existe transporte axonal a larga distancia de esta glicoproteína desde diversas estructuras subcorticales para su secreción en corteza (Pappas y cols., 2001). También se sabe que su secreción a la ECM sería independiente de Ca^{2+} (Lacor y cols., 2000).

Por otro lado, la capa I adulta presenta un denso inmunomarcado de Reelina en neuritas y matriz extracelular (Martínez-Cerdeño y Clascá, 2002). Sin embargo, los datos publicados sobre inmunomarcado en roedor adulto son limitados y fragmentarios (Miyata y cols., 1996; Pesold y cols., 1998, 1999; Pérez-García y cols., 2001; Misaki y cols., 2004), por lo que no se conoce con exactitud el origen de Reelina en el neuropilo de capa I.

5.2. Otras proteínas de matriz extracelular de capa I.

El *ácido hialurónico*, una molécula de matriz extracelular (ECM), es esencial para la terminación segregada y específica de capa de las fibras entorrinales en el giro dentado del hipocampo de ratón. Este ácido tiene moléculas asociadas de ECM, sintetizadas por astrocitos (Deller y cols., 2000), como el *neurocan* y el *condroitin sulfato* (un derivado del cartílago) que muestran un patrón de marcaje específico de lámina molecular en el hipocampo (Zhao y cols., 2003), al igual que lo muestra Reelina (Martínez-Cerdeño y Clascá, 2002).

Tenascina-C es otra molécula de ECM secretada por los astrocitos a la que se le ha implicado en la regulación del crecimiento axonal. Durante el desarrollo se ha descrito un substrato rico en tenascina-C en la capa molecular durante el tiempo de sprouting (Deller y cols., 1997).

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Como hemos visto, la capa I de la isocorteza cerebral se caracteriza por alojar los penachos distales de las dendritas apicales de algunas neuronas piramidales. Estudios recientes han puesto de manifiesto que estos penachos son dominios dendríticos especializados y que su actividad puede ser determinante en la función cortical. Los sistemas aferentes que alcanzan los penachos apicales parecen ser, por tanto, un elemento clave del microcircuito cortical. Se ha sugerido que la activación de los sistemas que proyectan a la capa I de la corteza cerebral están en la base de los mecanismos de atención y memoria (Cauler, 1995; Lamme y cols., 1998; Olson y cols., 2001; Llinás y cols., 2002) y un conocimiento detallado del origen de esta inervación es importante para conocer que sistemas pueden estar afectando de forma importante la función cerebral. Sin embargo, la información sobre estos sistemas y sus contactos sinápticos con los penachos distales en la capa I es, todavía hoy, sorprendentemente escasa.

Tal como hemos reflejado en la sección precedente, destaca entre el conjunto de aferentes a capa I un denso plexo de fibras GABAérgicas situado en la subcapa Ia, es decir, en la mitad externa de la capa I cortical. La literatura indica que, en roedores, posibles fuentes de estos axones GABA pueden ser aferentes cortico-corticales de larga distancia (McDonald y Burkhalter, 1993, Gonchar y cols., 1995, Fabri y Manzini, 1996), determinadas estructuras subcorticales no talámicas (Lin y cols., 1990; Nicoletti y cols., 1995; Kowiński y cols., 2001; Sarter y Bruno, 2004), e interneuronas corticales, principalmente células de Martinotti, aunque podrían estar también proyectando a capa I células bipolares y de doble-bouquet (Kawaguchi y Kubota, 1993; Kawaguchi, 1995; Markram y cols., 2004). Sin embargo, no existe en la literatura un estudio sistemático dirigido exclusivamente a conocer el origen de estas fibras y su peso en el microcircuito cortical.

Además, la capa I adulta presenta un denso inmunomarcado de Reelina en neuritas y matriz extracelular (Martínez-Cerdeño y Clascá, 2002). En corteza adulta se ha descrito que son las interneuronas las que expresan y secretan Reelina (Alcántara y cols., 1998; Pesold y cols., 1998; Drakew y cols., 1998; Ramos-Moreno y cols., 2005), favoreciendo y regulando el crecimiento y morfología de las espinas dendríticas de las pirámides corticales (Liu y cols., 2001; Niu y cols., 2004) y potenciando la inducción de LTP (Weeber y cols., 2002; Beffert y cols., 2005). Asimismo, se ha sugerido que existe transporte axonal a larga distancia de esta glicoproteína desde diversas estructuras subcorticales para su secreción en corteza (Martínez-Cerdeño y cols., 2002, 2003).

No obstante, los datos disponibles en roedor son insuficientes para establecer la localización y posible secreción a distancia de Reelina, ya que en la literatura sólo están disponibles datos de hibridaciones *in situ* para su mRNA en roedores (Ikeda y Terashima, 1997; Alcántara y cols., 1998; Pesold y cols., 1998; Haas y cols., 2000), y los datos publicados sobre el inmunomarcado en adulto son limitados y fragmentarios (Miyata y cols., 1996; Pesold y cols., 1998, 1999; Pérez-García y cols., 2001; Misaki y cols., 2004). Debemos recordar que Reelina, una vez sintetizada, sufre transporte axonal (Pesold y cols., 1998; Derer y cols., 2001), secreción (D'Arcangelo y cols., 1997), dimerización (Benhayon y cols., 2003; Strasser y cols., 2004), fragmentación (Jossin, 2004) e incluso internalización por otras células (D'Arcangelo y cols., 1999; Morimura y cols., 2005), por lo que se hace necesario precisar la localización de dicha glicoproteína en cerebro adulto de roedor.

Así, nos propusimos, en este orden, los siguientes objetivos:

1. Precisar, a nivel global, la localización y distribución, en la rata, de las neuronas que contienen Reelina mediante un inmunomapeo sistemático.
2. Analizar el transporte axonal a larga distancia de Reelina desde estructuras subcorticales como posible origen de la Reelina inmunodetectada en neuritas y matriz extracelular de capa I.
3. Analizar el tipo de neuronas corticales que contienen Reelina y que pudieran estar secretándola en capa I mediante un transporte axonal de corta distancia.
4. Precisar, a nivel global, la localización y distribución de las células proyectantes a capa I.
5. Analizar las proyecciones cortico-corticales a larga distancia como posible fuente de GABA a capa I cortical.
6. Analizar las estructuras subcorticales no talámicas descritas en la literatura como posibles fuentes de GABA a larga distancia a capa I cortical.
7. Analizar como fuente de GABA local las interneuronas corticales de manera cualitativa y cuantitativa.
8. Conocer el peso de cada una de las tres anteriores en la inhibición GABAérgica a capa I.

Para nuestro estudio decidimos utilizar la rata (*Rattus norvegicus*) como especie modelo, por tratarse de una especie lisencéfala sobre la que, además, existe información bastante detallada sobre la parcelación anatómica y funcional de sus estructuras subcorticales y su corteza cerebral, y donde, como se ha dicho, los datos sobre la inmunodetección de Reelina son limitados y fragmentarios.

Materiales y Métodos

1. ANIMALES

Para los experimentos recogidos en esta Tesis utilizamos ratas adultas hembras y machos de entre 250 y 450 gr. de peso, de la cepa Sprague-Dawley, obtenidas de la colonia del Animalario de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Madrid. Los procedimientos experimentales contaron con la aprobación del Comité de Ética de la Investigación de la Universidad Autónoma de Madrid y se realizaron de acuerdo con las directrices europeas (Decreto 86/609/EEC) y españolas, estas últimas refundidas y actualizadas en el R.D. 1201/2005, de 10 de octubre, para el uso de animales en investigación. Los animales fueron estabulados en el Animalario. Los procedimientos anestésicos y cuidados postoperatorios aplicados se describen en la sección correspondiente.

La Tabla 2 resume los animales usados para realizar depósitos epipiales de trazadores retrógrados. Cinco animales más se utilizaron para experimentos de control histológico e inmunomarcado. De estos animales, hemos obtenido un total de 28 casos válidos para estudio.

2. EXPERIMENTOS DE DEPÓSITO DE TRAZADORES RETRÓGRADOS: EPIPIALES

2.1. Trazadores axónicos empleados.

Hemos empleado como trazadores Fast-Blue (FB) (diamidino compound 253/50, Dr. Illing GmbH & Co. KG, Groß-Umstadt, Alemania) y Fluorogold (FG), metanesulfonato de hydroxystilbamidina, Molecular Probes, Oregon, EEUU).

Estos trazadores son captados por terminales nerviosas y por neuritas dañadas. A la concentración usada para su captación y transporte pueden producir un grado variable de necrosis tisular focal en el punto donde son depositados, aunque este hecho no parece afectar al transporte. Desde los sitios en que son captados son transportados en vesículas, retrógradamente hasta el soma neuronal. Concretamente, FB marca el citoplasma y el inicio de las dendritas (Bentivoglio y cols., 1980) y FG el núcleo, citoplasma y dendritas (Schmued y Fallon, 1986).

Estos trazadores son transportadas con velocidades parecidas. Por ejemplo, tras una inyección de FB en la médula espinal de la rata, a las 48 horas se observan somas neuronales en las corteza cerebral. Sin embargo, la fluorescencia y el número de

neuronas marcadas se incrementa considerablemente a lo largo de la primera semana. Con periodos más prolongados (a partir de dos semanas) puede observarse difusión del trazador fuera de la célula marcada, en el neuropilo de alrededor y en células gliales. El FB, a diferencia del FG, permanece en las células que lo han captado muchas semanas, e incluso meses. Estos trazadores pueden ser captados desde el líquido cefalorraquídeo y desde el sistema vascular (Van der Krans y Hoogland, 1983; Eisenman, 1985; Novikova y cols., 1997; Köbbert y cols., 2000) lo que indica que la barrera hematoencefálica y la barrera pial no pueden impedir su paso.

Aplicamos los trazadores sobre la superficie pial utilizando pequeños trozos de papel de filtro impregnado en el trazador diluido en agua destilada. Utilizamos distintas concentraciones del trazador. Con FB las concentraciones óptimas para limitar el trazador a la capa I fueron de 0,5-1%. Para los casos con FG empleamos diluciones del 0,5%, sin embargo con este trazador siempre existió una penetración del trazador un poco más allá de la capa I, junto con una gran extensión del trazador sobre la superficie cortical. La tabla 2 muestra los trazadores y concentración empleada en cada caso.

2.2. Cirugía

2.2.1. Procedimientos generales.

Las ratas eran anestesiadas con 0,1-0,2 ml por cada 100gr de peso del animal de una mezcla de ketamina al 3,5% (Ketolar®, Parke-Davis, Alcobendas, Madrid, España) y xilacina al 0,5% (Rompun®, Bayer, Kiel, Alemania), en agua destilada, administradas intramuscularmente. Además se añadía atropina (B-Braun, Rubí, Barcelona, España) para evitar la sobreproducción de secreciones bronquiales. A lo largo del procedimiento quirúrgico mantuvimos el nivel de anestesia mediante inyecciones de 1/3 de la dosis inicial, para mantener al animal sedado y sin reflejos.

Rasurábamos la cabeza y administrábamos en la piel una solución antiséptica de povidona iodada (Betadine®, Viatrix, Burdeos, Francia). Sobre los ojos aplicábamos vaselina líquida para proteger la córnea. En el conducto auditivo externo administrábamos una solución de lidocaína tópica y fijábamos el animal en un aparato estereotáxico (Kopf® David Kopf instruments, Tujunga, California). Bajo el animal colocábamos una almohadilla de agua circulante a 37° C (T-Pump®, Gaymar Industries, Orchard Park, New Jersey, EEUU) para evitar la posible aparición de una hipotermia.

El cuero cabelludo se abría haciendo una incisión longitudinal en la línea media, y rebatiendo lateralmente la piel y los tegumentos para dejar expuesto el cráneo. En los casos en los que el depósito fue sobre la parte lateral del hemisferio (S1-S2), se prolongó la apertura cutánea lateralmente y se desinsertó el músculo temporal.

2.2.2. Depósitos epipiales de trazadores retrógrados

La técnica de depósito epipial empleada es una adaptación a roedores del método desarrollado originalmente Rausell y Avendaño (1985) y Avendaño y cols. (1990) en carnívoros y primates. Había sido previamente empleado en rata por Mitchell y Cauller (2001). Básicamente, el procedimiento busca conseguir una impregnación del trazador limitada a la capa I. Para ello impregnamos pequeños trozos (<1 mm²) de papel de filtro (Whatman®, Whatman Internacional, Maidston, Inglaterra) con el trazador y los colocábamos sobre la superficie pial (Figura 12).

Tras elegir la zona donde íbamos a realizar el depósito, abrimos el cráneo mediante un trépano. En las regiones dorsales donde la tabla ósea es plana, extrajimos una porción rectangular de hueso que se conservó en suero salino fisiológico a 4°C, para utilizarlo posteriormente en el cierre del trépano. Una vez expuesta la duramadre, escogimos una zona libre de vasos dentro del área donde se iba a realizar el depósito, y abrimos la duramadre mediante una incisión en “L” con una aguja hipodérmica cuya punta se había doblado suavemente para formar un gancho. Tras secar suavemente el líquido cefalorraquídeo del área seleccionada, depositamos el papel de filtro impregnado en trazador y secado previamente al aire, sobre la superficie cerebral. Con precaución para evitar que se desplazara el trozo de papel, lo estabilizamos cubriéndolo con la duramadre y/o con una lámina delgada de gelatina absorbente (Espongostan Film; Ferrosan A/S, Soeborg, Dinamarca), o con el propio hueso del animal en los casos que fue posible. Posteriormente, la solución de continuidad en el cráneo la ocluimos con cemento dental (Duralay, Reliance Dental Mfg. Co., Alsip, IL, EE.UU). Tras aplicar antiséptico en la zona expuesta, cerramos el campo suturando la piel con hilo de seda trenzada estéril 2/0 (Lorca-Marín, Murcia, España).

Caso	Trazador	Localización	Comentario
♀ 01	FB (2%)	V1	Penetra capas profundas
♀ 02	FB (2%)	V1	
♀ 03	FB (2%)	S1	
♀ 04	FB (2%)	S1	
♀ 05	FB (2%)	M1	
♀ 06	FB (2%)	M1	Penetra capas profundas
♀ 07	FB (1%)/FG (0,5%)	M1/V1	Penetra capas profundas
♀ 08	FB (1%)/FG (0,5%)	M1/V1	No hay transporte
♀ 09	FB (1%)/FG (0,5%)	M1/S1	
♀ 10	FG (0,5%)/FB (1%)	S1/S2	No hay transporte
♀ 11	FG (0,5%)	M1	Penetra capas profundas
♀ 12	FB (1%)	M1	No hay transporte
♀ 13	FG (0,5%)	V1	Penetra capas profundas
♀ 14	FB (1%)	V1	No hay transporte
♀ 15	FG (0,5%)	S1	Penetra capas profundas
♀ 16	DY (0,5%)	M1	No hay transporte
♀ 17	FB (0,5%)	M1	No hay transporte
♀ 18	FB (0,5%)	V1	
♀ 19	FB (0,5%)	V1	
♀ 20	FB (0,5%)	M1	
♀ 21	FB (0,5%)	M1	No hay transporte
♀ 22	FB (0,5%)	M1	
♀ 23	FB (0,5%)	M1	
♀ 24	FB (0,5%)	S1	
♀ 25	FB (0,5%)	S1	No hay transporte
♀ 26	FB (0,5%)	S1	No hay depósito
♀ 27	FB (0,5%)	V1	
♀ 28	FB (0,5%)	V1	Penetra capas profundas
♀ 29	FB (0,5%)	V1	
♀ 30	FB (0,5%)	M1, S1, V1	
♀ 31	FB (0,5%)	M1, S1, V1	
♀ 32	FB (0,5%)	M1, S1, V1	

Tabla 2. Listado de los casos en los que se realizaron depósitos epipiales de trazadores axonales retrógrados en la corteza cerebral.

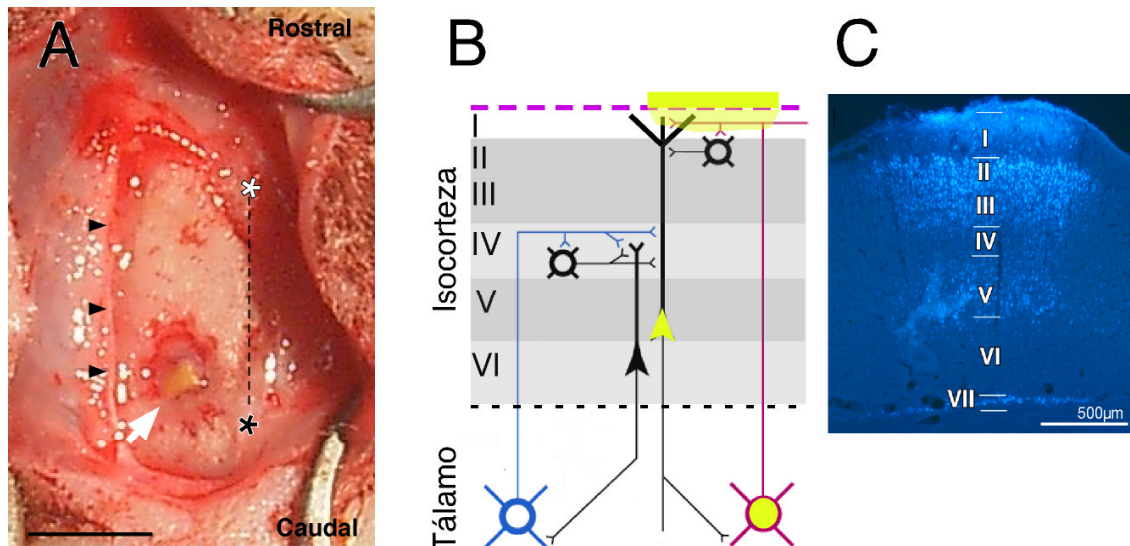


Figura 12. Impregnación de la capa I de la corteza cerebral mediante depósitos epipiales de trazadores. **A:** Visión cenital del campo quirúrgico durante la aplicación de un depósito epipial en la corteza parietal dorsal. Como referencias de la línea media se indican la sutura interparietal (línea discontinua), bregma (asterisco blanco) y lambda (asterisco negro). La cresta temporal superior se señala con cabezas de flecha negras. Obsérvese la ventana ósea y la pieza de papel de filtro impregnado en FB (de color amarillento) sobre la superficie pial intacta. **B:** Diagrama del diseño de los experimentos de depósito epipial. Sobre un esquema tomado y modificado de la Fig. 5 de Jones (2001) que representa las principales dianas celulares de los axones “específicos” y de la matriz talámica en las capas de la isocorteza cerebral, hemos indicado la colocación sobre la piamadre (línea violeta), de la pieza de papel impregnado en trazador (rectángulo amarillo) que produce la impregnación selectiva de la capa I subyacente (área sombreada en amarillo). De este modo, la captación y transporte del trazador tiene lugar sólo en aquellas neuronas cuyo axón o dendrita apical se encuentran en la capa I. El trazador se acumula en su soma (sombras amarillos). **C:** Corte coronal de la isocorteza parietal a nivel del centro de una zona de depósito. Imagen obtenida en un microscopio de epifluorescencia, en la que la trazador axonal, Fast Blue en este caso, brilla intensamente en color azul claro. La orientación de la isocorteza es idéntica a la del panel “B”. Se ha retirado el fragmento de papel de filtro. La impregnación a través de la piamadre se observa como una área homogéneamente brillante en la capa I. Más profundamente, se observa marcado en los somas de numerosas neuronas de las capas II, III, Vb y VII que han captado FB a través de sus dendritas apicales o de sus axones. Nótese, en cambio, la ausencia de células marcadas en las capas IV, Va y VI.

3. SACRIFICIO Y PERFUSIÓN DE LOS ANIMALES

Tras la cirugía mantuvimos a los animales bajo observación hasta que se recuperaban de los efectos de la anestesia, y a continuación los devolvimos a sus jaulas en el Animalario. El tiempo de supervivencia tras la cirugía fue de siete a diez días.

Tras el periodo de supervivencia imprescindible para que se verificase el transporte axonal de los trazadores (una semana), los animales fueron sacrificados. Para ello se les administró intraperitonealmente una dosis letal (80 mg/Kg.) de pentobarbital sódico. Alcanzado un coma profundo, colocamos al animal en decúbito supino y tras comprobar la abolición de reflejos ante estímulos dolorosos abrimos la

piel torácica y la pared abdominal por la línea media. Desde la cara abdominal abrimos el diafragma y cortamos la pared costal lateralmente, rebatiendo la pared anterior del tórax hacia la cabeza del animal. De esta forma quedaba expuesto el corazón en el saco pericárdico. Tras incidir y revertir el pericardio, introdujimos una aguja en el ventrículo izquierdo hasta colocar su punta en la raíz de la aorta. La aguja se retuvo mediante una pinza de hemostasia. Comenzamos a infundir suero salino e inmediatamente cortamos la aurícula para posibilitar el drenaje del líquido de perfusión. Tras unos 3 minutos, aproximadamente, de suero salino continuamos la perfusión con paraformaldehído al 4% en PB 0,1M, durante 40 minutos. Para los animales que sólo se utilizaron para inmunohistoquímicas, las perfusiones se llevaron a cabo de igual manera.

Terminada la perfusión, decapitamos al animal, y colocamos su cabeza en el aparato estereotáxico. Tras abrir la bóveda craneal, y exponer la superficie dorsal del cerebro, seccionamos el tronco del encéfalo según el plano coronal estereotáxico. De esta forma obtuvimos dos bloques del cerebro, uno anterior, que contenía toda la corteza cerebral y el tálamo, y otro posterior que contenía la mayor parte del tronco del encéfalo y el cerebelo. De los bloques así tallados pueden obtenerse sistemáticamente cortes paralelos al plano estereotáxico coronal, lo cual facilita la comparación entre los distintos casos y con los atlas estereotáxicos del cerebro (Paxinos y Watson, 1998)

Extrajimos los bloques de tejido del cráneo y los dejamos postfijar por inmersión en formaldehído al 4%, a 4°C durante 12 horas en agitación suave. A continuación, introdujimos los bloques en una solución de sacarosa al 30%, donde permanecieron durante 24-48 horas a 4°C, en agitación suave hasta que el bloque se hundía en dicha solución, es decir, una vez alcanzada la saturación del tejido con la solución de sacarosa. Esta solución anticongelante permite posteriormente cortar el tejido en un microtomo de congelación sin que se formen cristales de hielo en el tejido.

En los animales que se requerían para el aplanamiento del hemisferio de la corteza cerebral en bloque (casos ♂33, ♂34 y ♂35) el procedimiento de perfusión fue algo distinto. En estos casos, tras la perfusión con salino realizamos durante 5-10 minutos una perfusión con paraformaldehído al 4% en PB. Tras ello abrimos el cráneo y extrajimos rápidamente el cerebro del animal. En ese momento, escindimos ambos hemisferios mediante un corte sagital con un bisturí, cortando el cuerpo calloso y estructuras subcorticales. Una vez aislados los hemisferios, los apoyamos en un porta

con paraformaldehído al 4% en PB sobre su cara medial, y la presionamos suavemente con un segundo porta impregnado también en paraformaldehído al 4% en PB de forma que quedaran lo más plano posible. Ambos portas se sujetaban con ayudas de gomas elásticas (para permitir su continuo aplastamiento), y se incluían en un cristalizador con paraformaldehído al 4% en PB durante el tiempo que duraba la fijación (48 horas). Posteriormente se crioprotegió en sacarosa 30% durante 24-48h para su corte tangencial en congelación.

4. CORTE Y PROCESAMIENTO DEL TEJIDO.

Todos los bloques de los casos que habían servido para marcaje retrógrado desde la corteza, así como los bloques de animales sin depósito que iban a ser utilizados en inmunohistoquímicas, fueron cortados en un microtomo de congelación en secciones coronales de 40µm de grosor. Estos cortes eran recogidos en PB frío, en cinco series.

A continuación, y para los casos con depósito epipial, una de estas series fueron montadas inmediatamente, y sirvieron para el estudio de las neuronas trazadas retrógradamente. Las otras series sirvieron para la realización de tinción de Nissl o inmunohistoquímica (Protocolos 1, 2, 3, 4 respectivamente), o bien se reservaron a -20°C en solución anticongelante.

En los experimentos en que queríamos observar la disposición tangencial en capa I de los axones somatostatina (+) se hicieron secciones de 80 µm de la corteza aplanada, paralelas a la superficie cortical, de forma que en las primeras secciones se incluyera la mayor parte de la capa I.

5. MONTAJE, DESHIDRATACIÓN Y DESENGRASADO DE LAS SECCIONES HISTOLÓGICAS.

Montamos las secciones histológicas sobre portas (Menzel-Glaser®, Menzel GmbH & Co KG) gelatinizados (protocolo 7), utilizando PB 0,033 M, y dejándolas secar 24 horas. Posteriormente fueron deshidratadas en pases de alcohol a concentración creciente y desengrasadas en xilol (Protocolos 8 y 9). Tras ello las cubríamos con un cubreobjetos, utilizando DePeX (Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Alemania) como medio de montaje.

6. MÉTODOS DE ANÁLISIS DEL MATERIAL HISTOLÓGICO

6.1. Localización de los depósitos del trazador.

En todos los casos en los que hay depósitos superficiales de trazador neuronal, estudiamos la extensión del área marcada, la profundidad y la localización del depósito en la corteza cerebral.

Para ello en fotografiamos con el objetivo de 4x el hemisferio inyectado con el trazador en secciones seriadas separadas entre sí 200 μm . Sobre estas fotografías medimos:

a) El área de cada depósito. Así, el área total de un depósito es la suma de n rectángulos, con un ancho de 200 μm y un largo de y . Siendo n el número de secciones en las que aparece depósito de trazador, e y la extensión en el plano coronal del depósito: $\text{área} = \sum_{1-n} (200 \cdot y_n)$.

b) La distancia al surco rínico y/o cuerpo calloso del depósito. Lo que permite localizar en la superficie de la corteza cerebral el depósito. Posteriormente, en secciones adyacentes de Nissl, se localizaba con mayor precisión el área citoarquitectónica cortical a la que afectaba el depósito.

A continuación, dibujamos la localización y extensión de cada depósito en una representación bidimensional de las áreas citoarquitectónicas de la corteza cerebral de la rata, según el atlas de Paxinos y Watson (1998). Esta representación plana de las áreas de la corteza cerebral tomada de Rubio-Garrido (Rubio-Garrido y cols., 2007) (Figura 13). Para ello, utilizamos imágenes digitalizadas de Paxinos y Watson con los dibujos coronales de la corteza cerebral y con los límites de las distintas áreas dibujados. Sobre estas imágenes medimos la extensión entre cada límite, y con la escala de la imagen obtuvimos la distancia que separaban los límites entre áreas. Posteriormente, dibujamos estos límites de áreas, obtenidos de los distintos dibujos coronales de la extensión rostrocaudal del cerebro de la rata, tomando como punto de alineación (línea verde de la Figura 13), el vértice dorsal del hemisferio cerebral, donde la superficie de la cara medial del hemisferio pasa a ser lateral.

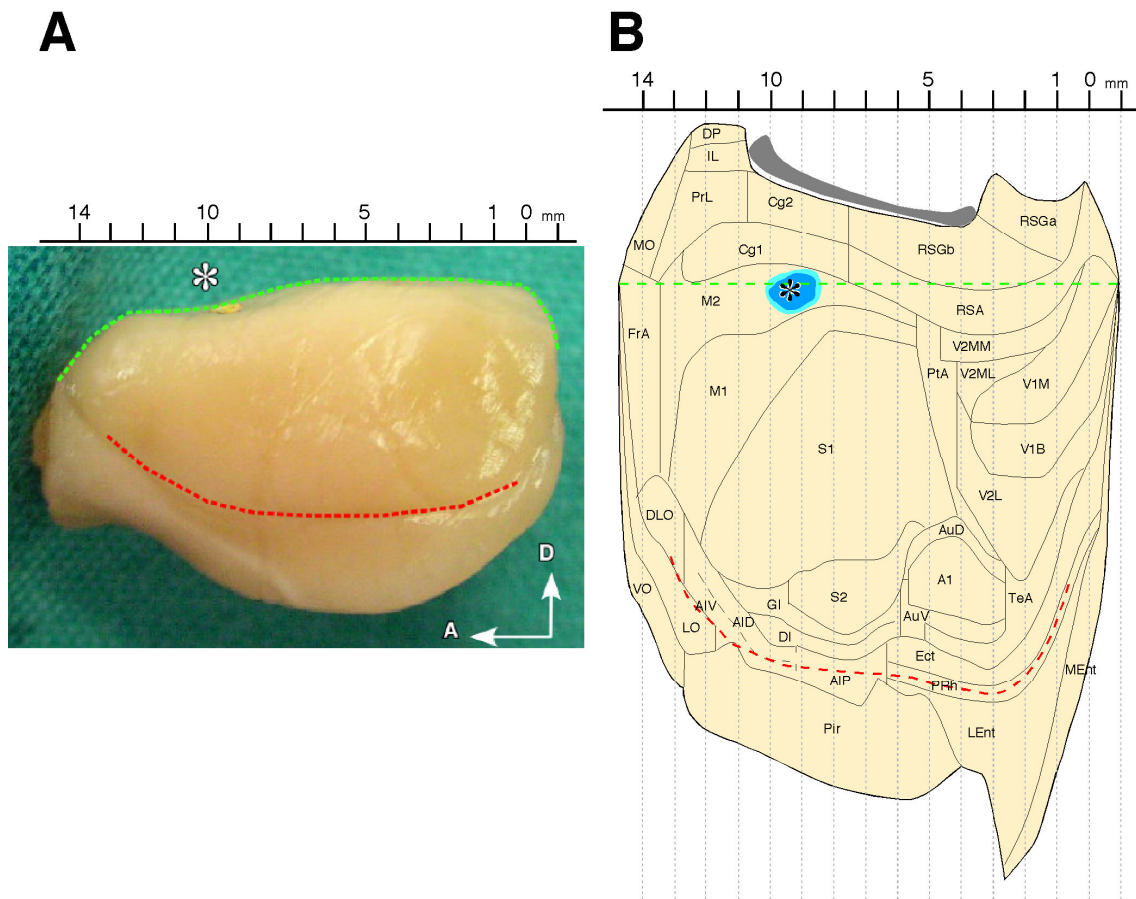


FIGURA 13: Representación en un esquema bidimensional de las áreas de la corteza cerebral de la rata, según el atlas de Paxinos y Watson (1998). **A:** En la izquierda, visión lateral de un cerebro de rata fijado por perfusión. Puede observarse una pieza de papel de filtro impregnado de trazador sobre un punto dorsal de la corteza cerebral (asterisco). **B:** Generación de una representación gráfica bidimensional de la capa I de todo el hemisferio cerebral ajustada al plano estereotáxico coronal. Tomando como eje de alineación el vértice dorsal del hemisferio cerebral (línea punteada verde) se representan los perímetros de la superficie cortical de cada área en cada plano según el atlas de Paxinos y Watson (1998). Como referencia, obsérvese la posición del surco rínico (línea punteada roja) y la posición del depósito ilustrado en “A” (asterisco).

6.2. Localización de las neuronas retrógradamente marcadas desde la corteza.

En estos casos, registramos la localización de los somas neuronales marcados retrógradamente. Para ello utilizamos un microscopio Nikon Eclipse E600 de óptica conjugada-infinita, con objetivos Nikon plan flúor de altas aperturas numéricas. En comparación con objetivos convencionales mejora mucho la detección de imágenes fluorescentes, en especial aquellas poco luminosas. El microscopio tenía acoplada una cámara digital (DXM1200, Nikon) y una pletina motorizada (ProScan, Prior, Cambridge, Inglaterra), controlada por el software AnalySIS® 3.1 (Soft Imaging System GMBH, Munster, Alemania). Con el objetivo de 10X, adquirimos imágenes mediante el módulo MIA (*multiple image alignment*) de AnalySIS. Esta función

permite obtener imágenes adyacentes de forma que permiten construir un mosaico de todas ellas. Sobre estas imágenes dibujamos con el programa de imagen y dibujo vectorial Canvas X, (ACD Systems, EE.UU) las áreas corticales y sus capas, los contornos de los núcleos subcorticales y troncoencefálicos y los haces de fibras, así como cada una de las neuronas marcadas, en una sección de cada cinco (160 micras de separación entre cada muestra). Cada punto en el dibujo corresponde a una neurona. Utilizamos secciones adyacentes procesadas para Nissl para identificar las distintas áreas corticales, los distintos núcleos subcorticales y troncoencefálicos, y dibujarlos. Estos dibujos los superponíamos a las imágenes de fluorescencia con las neuronas dibujadas (Figura 14).

Posteriormente, contábamos las neuronas marcadas en cada capa y núcleo, para conocer la proporción y distribución de neuronas que contribuyen a inervar cada porción de capa I estudiada. Estos porcentajes se recogen en forma de gráficas de barras.

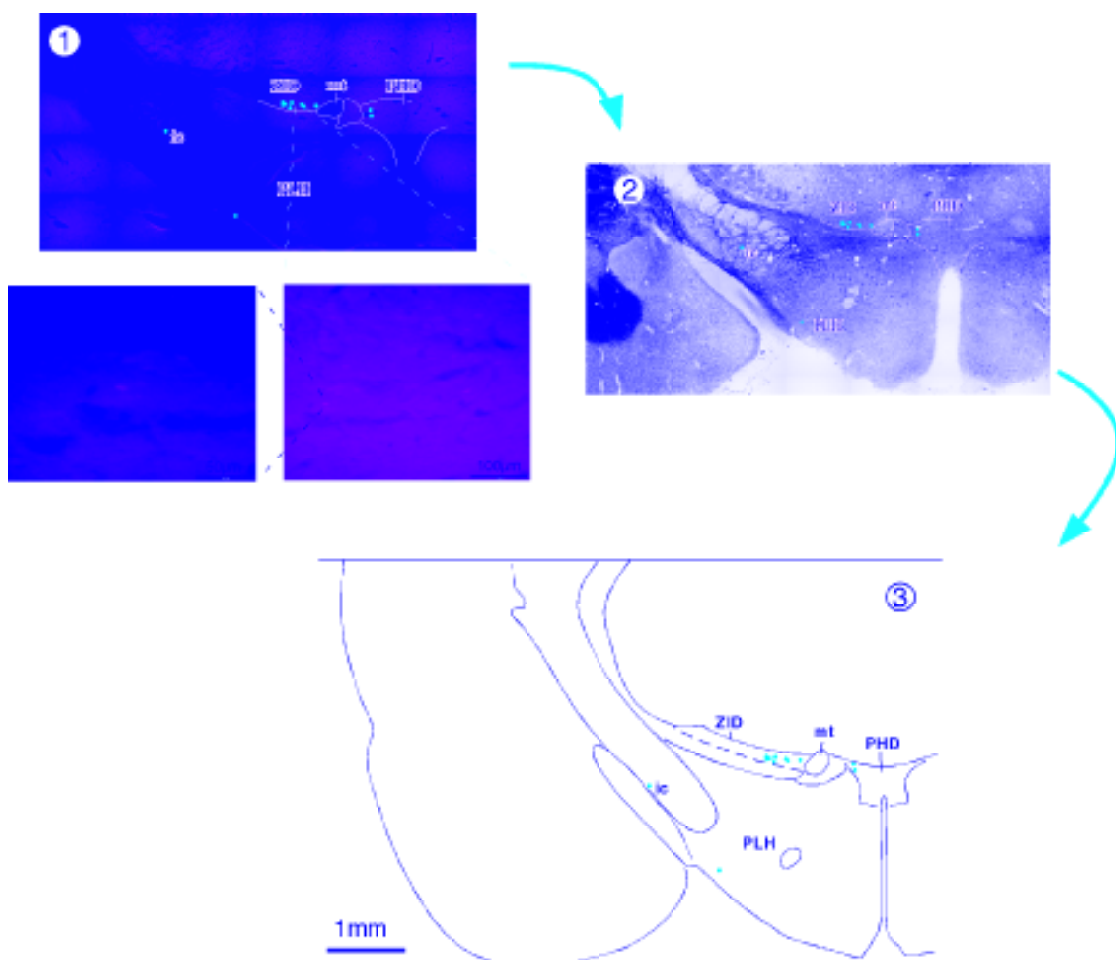


Figura 14. (Página anterior). **Procedimiento para el trazado de límites nucleares talámicos basados en la superposición de imágenes de cortes seriados adyacentes procesados para técnicas diferentes.** En este caso, sobre la microfotografía (1) de la sección de interés, dibujamos los límites del tejido, tractos de fibras, e incluso algún límite nuclear. Posteriormente, trasladamos el dibujo vectorial sobre una microfotografía de una sección adyacente procesada para AChE (2), y dibujamos los límites de los núcleos reconocibles con esta técnica. En casos donde es imprescindible la complementar con el uso de secciones adyacentes procesadas mediante Nissl (no mostrado), se superpone a su vez el dibujo vectorial y se terminan de dibujar los núcleos deseados. En la sección de interés (1) dibujamos un punto sobre cada neurona marcada retrógradamente, haciendo zoom en la imagen (recuadros en 1), y trasladamos el dibujo vectorial con todos los límites nucleares sobre la fotografía. En (3), mostramos el dibujo final de los núcleos subcorticales y de las neuronas.

6.3. Caracterización bioquímica de las neuronas corticales que inervan la capa I.

En los casos donde el depósito de FB era óptimo (marcado en *Tabla 1* sin ningún comentario) se realizaron en cuatro de sus cinco series inmunofluorescencias frente a NeuN (Mouse anti NeuN, Chemicon, 1:400), GABA (rabbit anti GABA, Sigma, 1:400), Calbindina (mouse anti Calbindin y rabbit anti Calbindin, Chemicon, 1:1000), Somatostatina (rabbit anti Somatostatin, Peninsula Lab, 1:1000), Calretinina (rabbit anti Calretinin, Chemicon, 1:1000) y Reelina (mouse anti Reelin, Chemicon, 1:400) (protocolos 2-13). Para visualizar los anticuerpos se utilizaron anticuerpos secundarios goat anti rabbit (Alexa Fluor GAR $\lambda=647$, Molecular Probes, 1:100) y goat anti mouse (Alexa Fluor GAM $\lambda=568$, Molecular Probes, 1:100). Los espectros en rojo lejano y rojo cercano nos permitían diferenciarlos entre sí y frente al trazador FB ($\lambda=461$).

En cuatro ratas adultas jóvenes SD se analizaron tres áreas de la corteza (S1, V1, M1) en las que habíamos realizado un depósito de FB. Sobre secciones de estos experimentos se había realizado posteriormente inmunofluorescencia doble y sencilla (ver protocolos 2-14), según la serie. La localización de los anticuerpos entre sí y/o con el trazador se estudió utilizando un microscopio confocal Leica TCS SPII en tres áreas corticales (M1, S1 y V1). Para cada una de las tres áreas, hemos expresado el número promediado entre cuatro animales de las neuronas retrógradamente marcadas desde la capa I que expresan dichos marcadores según la distancia de su soma a capa I (ver figura 15). Para ello se procedió a adquirir imágenes de 3 μm de grosor con el objetivo de 20X y un zoom de 1.3, mediante el módulo *biomapping* del programa Leica TCS SPII. Esta función permite obtener imágenes de 4 μm de grosor adyacentes de forma que permiten construir un mosaico de todas ellas.

Sobre estas imágenes dibujamos con el programa de imagen y dibujo vectorial Canvas X, (ACD Systems, EE.UU) las áreas corticales y sus capas, basándonos en los

Nissl adyacentes, así como cada una de las neuronas marcadas. Cada círculo en el dibujo representa una neurona positiva para el marcador que se esté estudiando. Si además la célula contiene FB (FB+), el círculo se representa relleno y se le da el mismo color que para su marcador (Figura 15).

Para conocer la proporción y distribución de neuronas que contribuyen a inervar cada porción de capa I estudiada, posteriormente estas células fueron agrupadas según la localización de su soma respecto a capa I en cada animal. Para ello se dividió en 10 segmentos la distancia que separa capa I de capa VII, y en cada uno de estos cuadrantes se contaron las células positivas para el marcador que se estaba analizando y, que además, fueran FB+. Tras calcular la media de estas células para cada área y para cada cuadrante entre los cuatro animales, se pasó a su representación gráfica (Figura 15). Las gráficas representan, así, la media entre los cuatro animales.

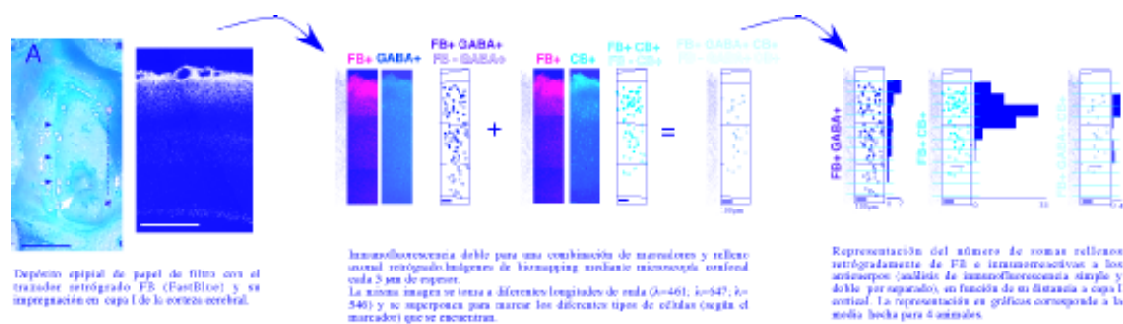


Figura 15. Procedimiento para el análisis de inmunofluorescencias dobles en las mismas secciones de tejido y el posterior trazado de (10) segmentos corticales. Procedimiento basado en la superposición de imágenes tomadas en microscopía confocal a distintas longitudes de onda mediante biomapping.

6.4 Inmunodetección de la proteína Reelina en tejido cerebral de rata adulta.

Para este estudio hemos utilizado por una parte tejido cerebral y espinal de 13 ratas Spague-Dawley adultas jóvenes (180-320 gr.). Las ratas fueron criadas en el animalario de la Facultad de Medicina de la U.A.M. Los animales usados no habían sido expuestos a manipulación experimental previa. Todos los procedimientos relacionados con el manejo y sacrificio de estos animales se llevaron a cabo de acuerdo con las normativas de la Unión Europea (Directiva EEC 86/609) y bajo supervisión del Comité de Bioética de nuestra Universidad.

Para la fijación, corte en congelación, pretratamiento del tejido y desenmascaramiento de antígeno seguimos un protocolo ya publicado (Martínez-Cerdeño y cols., 2003), salvo que en estos animales no utilizamos postfijación

(protocolo 14). Los cerebros fueron cortados coronalmente en congelación a 40 μm . De cada encéfalo de rata escogimos luego una colección de 15-20 secciones representativas a diversos niveles coronales.

La inmunotinción se llevó a cabo empleando 3 IgG monoclonales, G142 (1:400, Calbiochem, San Diego, CA, USA), CR-50 (amablemente cedido por el Dr. Masaharu Ogawa, Kiken, Japón, 1:100), y G10 (1:400, Chemicon, Temecula, CA, USA), dirigidas contra dominios cercanos pero no solapados de la región N-terminal de Reelina (Tissir y Goffinet, 2003). Como anticuerpo secundario usamos suero de conejo policlonal anti-IgG de ratón (1:200, Chemicon) ligado a biotina. Este anticuerpo secundario fue luego marcado con avidin-peroxidasa y revelado mediante histoquímica de peroxidasa utilizando Diaminobencidina (DAB) cromógeno.

Asegurar la especificidad del inmunomarcado era capital para la interpretación y validez de nuestros resultados. Por ello nos planteamos una serie exhaustiva de controles para detectar cualquier marcado inespecífico (ver Figura 16).

- a) En primer lugar, como ya se ha mencionado, nos planteamos el uso sistemático de tres IgGs monoclonales anti-Reelina distintas. Todas produjeron un marcado cualitativamente idéntico, si bien el CR-50 y el G10 mostraron en general una intensidad de marcado ligeramente menor.
- b) Omisión del protocolo de desenmascaramiento de antígeno. Aunque la especificidad y ausencia de falsos positivos de este tipo de pretratamientos esté firmemente establecida (véase Shi y cols., 2001, para una revisión reciente), buscamos confirmarlo directamente en nuestro ensayo. En estas condiciones obtuvimos una intensa reducción global del marcado, persistiendo sin embargo un marcado tenue en la mayoría de poblaciones celulares y áreas de neuropilo.
- c) Omisión del anticuerpo primario, que produjo una completa ausencia de marcado.
- d) Preadсорción del anticuerpo primario con sobrenadante de un medio de cultivo de células Cos transfectadas con el gen de Reelina de ratón y posteriormente concentrado unas 50 veces en columnas de filtración de 100.000 Da de corte de peso molecular, que nos fue amablemente cedido por el Dr. José Antonio del Río, Parc Científic-Universidad de Barcelona. Realizamos la preadsorción en estas condiciones porque no existe Reelina purificada disponible comercialmente ni, hasta donde sabemos, en laboratorios de investigación. A

diluciones elevadas de las IgGs anti-Reelina (1:800 142; 1:300 CR-50) obtuvimos desaparición total del marcado. A la dilución de trabajo habitual de dichos anticuerpos (1:400, 1:100, respectivamente) obtuvimos una marcada atenuación general sin ninguna pérdida selectiva. Dado que no conocemos la concentración de Reelina en el sobrenadante utilizado, interpretamos este hecho como una insuficiente preadsorción a esas diluciones más bajas.

- e) Preadsorción con sobrenadante de células expuestas al proceso de transfección sin plásmido (*mock transfected*), igualmente cedidas por el Dr. Del Río: Este experimento produjo una tinción completamente normal.
- f) Omisión de anticuerpos e incubación de 12 horas en Avidin-peroxidasa, previa al revelado inmunohistoquímico. Este experimento tuvo por objeto descartar la posibilidad de una reacción con la biotina endógenamente presente en el tejido (McKay y cols., 2004). No obtuvimos de este modo marcaje alguno.
- g) Revelado mediante un anticuerpo generado en cabra y marcado con Alexa 568 (Molecular Probes). Este experimento tuvo por objeto descartar algún tipo de reacción cruzada del anticuerpo secundario y/o reacción con la biotina endógena. El marcaje fluorescente fue idéntico al obtenido en los controles normales revelados con avidin-peroxidasa, quedando así la existencia de tales artefactos.
- h) Por último, para evitar cualquier precipitado inespecífico no utilizamos intensificación con metal en el revelado con DAB, obteniendo un patrón idéntico al que se visualiza con DAB solo.

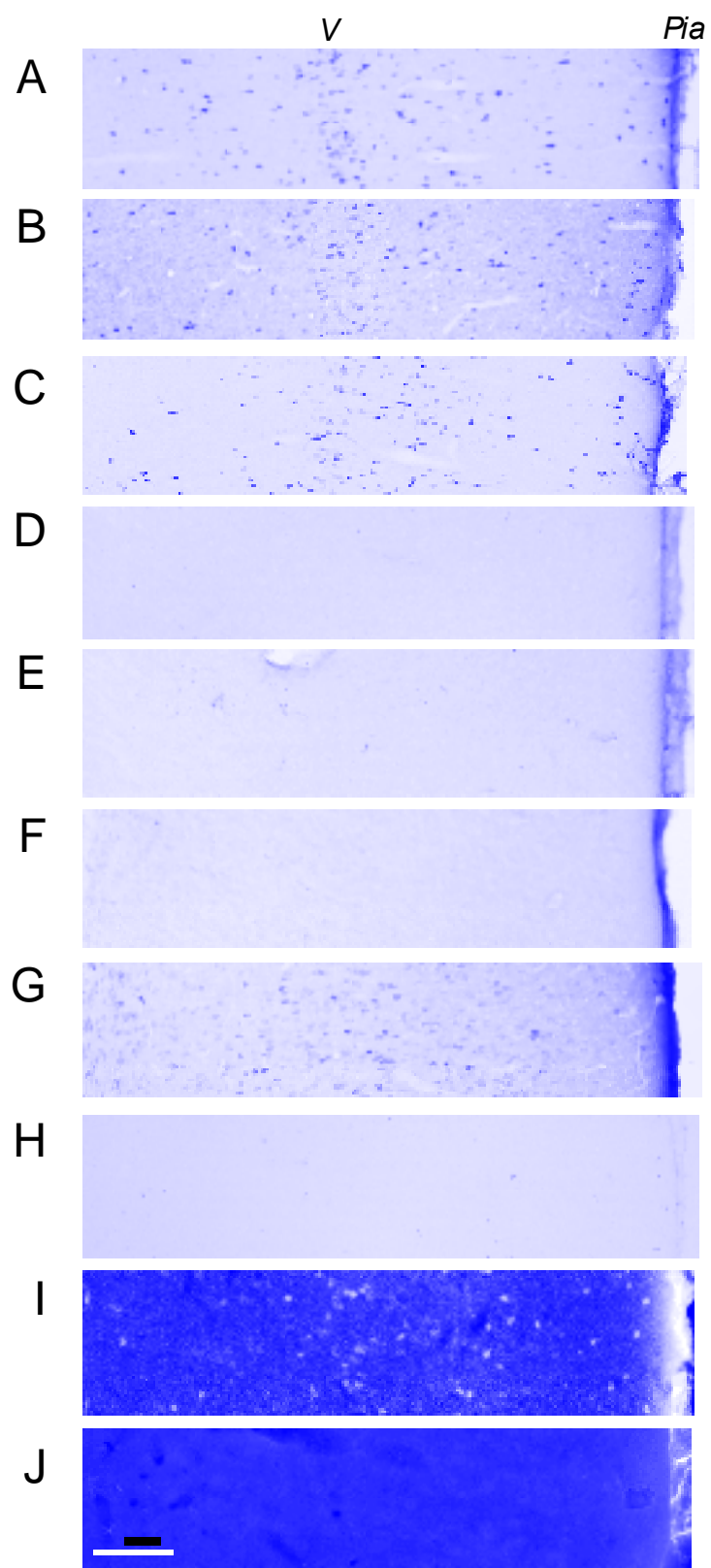
En tejido de 3 ratas combinamos el inmunomarcado de Reelina con el de ácido gamma-aminobutírico (GABA) (protocolo 5). Para ello combinamos “en cóctel” IgG anti-Reelina 142 con suero anti-GABA generado en conejo (Sigma, 1:500). Los anticuerpos secundarios utilizados fueron sueros policlonales de cabra anti-conejo marcado con Alexa 568 (1:100, Molecular Probes) y anti-ratón marcado con Alexa 488 (1:100, Molecular Probes). El tejido de estos animales se había procesado de modo idéntico al descrito para los demás, salvo el hecho de que en la perfusión se añadió 0,2% de glutaraldehído a la solución fijadora.

Para examinar la posible correlación entre la distribución de cuerpos Reelina positivos y los compartimentos estriales del caudado-putamen, se realizó una inmunohistoquímica en cortes adyacentes a los cortes de estriado utilizados para el

anticuerpo G142 utilizando el anticuerpo policlonal anti-MOR (Receptor Mu Opiode) (1:4000, DiaSorin), amablemente cedido por el Dr. Garzón, para poder revelar estriomas. Como anticuerpo secundario usamos suero policlonal anti-IgG de cabra (1:400, Vector Labs.) ligado a biotina. Este anticuerpo secundario fue luego marcado con avidin-peroxidasa y revelado mediante histoquímica de peroxidasa utilizando Diaminobencidina (DAB) cromógeno.

Para asegurarnos de la especificidad en el marcaje en determinadas estructuras corticales, tales como el estriado o el tálamo dorsal, donde no se habían realizado hibridaciones *in situ*, llevamos a cabo el experimento de Western blot a partir de lisados de isocorteza parietal como control, ya que es una región donde nuestros datos concuerdan con los datos de ISH publicadas (Alcántara y cols., 1998); del estriado y de tálamo dorsal. Para este experimentos profundimos dos ratas adicionales con suero salino estéril durante 5 minutos, para así asegurarnos que nuestro tejido no contuviese trazados de sangre, donde se puede encontrar bajos niveles de la proteína Reelina (Smalheiser y cols., 2000). Tras la extracción del cerebro, éste se bloqueó en rodajas de 0.5 mm de grosor. La disección de las regiones cerebrales se realizó bajo lupa. Se añadió a cada región disecada 1 ml de buffer de lisis, la mezcla se homogeneizó mecánicamente, para posteriormente ser desnaturalizada con calor. Cada muestra de lisado (30 IL de estriado, 30 IL de tálamo dorsal y 10 IL de corteza parietal) se analizaron en calles paralelas en un gel de electroforesis, que primero se dejó correr a 75 mV durante 10 min, y después a 150 mV durante 65 minutos. La escalera que nos indicaba el peso molecular discurrió en otra calle paralela. Las proteínas así separadas se pasaron a una membrana de Protan nitrocelulosa (Scheleicher & Schuell, Dassel, Germany) (150 mA, una noche a 4°C), usando un sistema de Mini-Transblot (BioRad, Hercules, CA, USA). La membrana de nitrocelulosa conteniendo las proteínas separadas mediante electroforesis fue incubada después en buffer Tris salino con 0.4% de Tween-20 (TBST) y 10 % de BSA durante 2 h. Posteriormente se incubó en agitación con el anticuerpo monoclonal 142 anti-Reelina (1:400) diluido en TBST. Tras lavados seriados en TBST, la membrana se incubó por una hora en anticuerpo anti-ratón ligado a peroxidasa en suero de cabra (BioRad, 1:10000). La tinción se visualizó exponiendo la membrana a un film Hyperfilm-ECL (Konica-Minolta) en un sistema de detección rápida electroquimiluminiscente (ECL Western Blotting System, Amersham, Piscataway, NJ, USA) (Figura 17).

Figura 16 (página siguiente). Panel donde se muestran distintos cortes coronales de un mismo animal con distintos experimentos control. (A) Incubación con anticuerpo monoclonal 142 (1:400); (B) Incubación con anticuerpo monoclonal CR50 (1:400); (C) Incubación con anticuerpo monoclonal G10 (1:400). Todos estos revelados se realizaron sin utilizar intensificación con níquel en el revelado. (D) Inmunohistoquímica con desmascaramiento de antígenos y ausencia de primario. Revelado con intensificación con níquel (E) Inmunohistoquímica sin desmascaramiento de antígenos y revelado con intensificación con níquel. (F) Experimento incubando el anticuerpo previamente preadsorbido. (G) Experimento el tejido incubando con MOCK (H) Inmunohistoquímica con desmascaramiento de antígenos, pero sin primario y sin secundario. (I) Inmunofluorescencia en el rojo cercano para Reelina. (J) Control negativo (ausencia de primario) para (I). Barra de calibración: 200 μm .



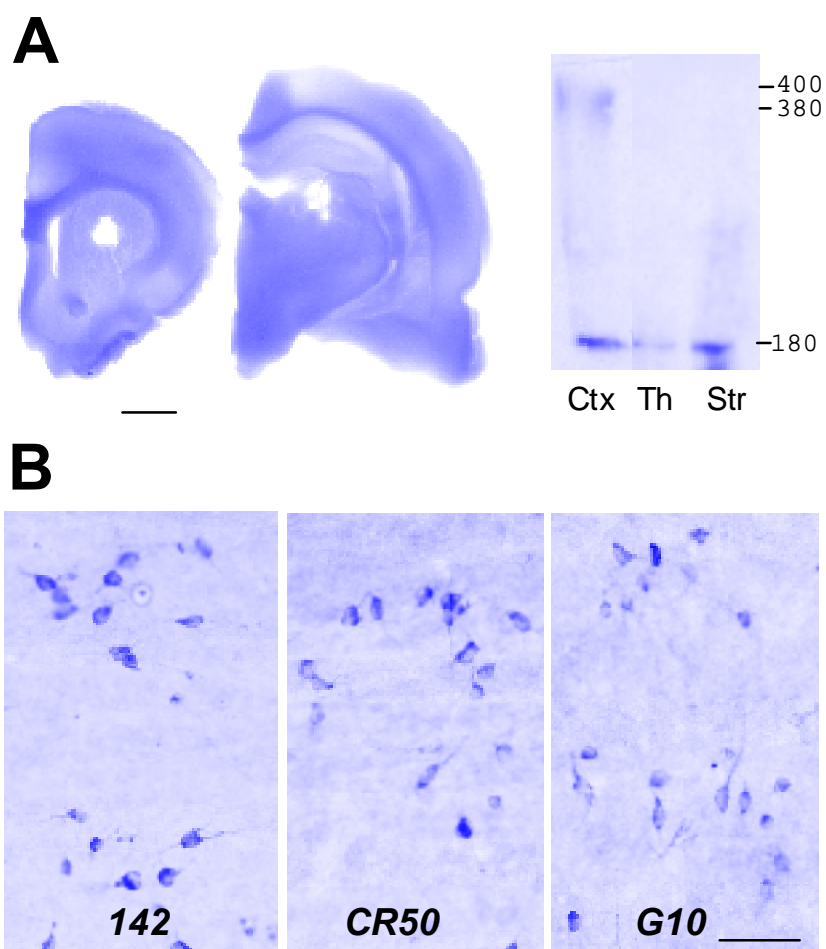


Figura 17. (A) Imágenes de campo claro de las rodajas de tejido donde se pueden observar las secciones que se utilizaron para realizar el western. Obsérvese el patrón obtenido de tres bandas, en función de la fragmentación sufrida por la proteína tras el splicing. (B) Imágenes de células del núcleo talámico (seccionado para el western) AD, inmunorreactivas a los tres anticuerpos anti-Reelina. Barras de calibración: 1 mm (A), 100 μ m (B).

Protocolos experimentales

Protocolo 1: tinción de Nissl	
1. Etanol 70%	Toda una noche
2. Agua destilada	Un lavado rápido
3. Violeta de Cresilo ¹	4-5 min. (45°C en agitación)
4. Agua destilada	Dos pases rápidos
5. Etanol 70%	30 seg. – 1 min.
6. Etanol 96%	30 seg. – 1 min.
7. Cloroformo 100%	10 min. (en agitación)
8. Etanol 96%	Un pase rápido
9. Diferenciador ²	Bajo control visual (en agitación)
10. Etanol 100%	Un pase rápido
11. Xilol	9 x 5 min. (xilol limpio en cada paso)
12. Cubrir las secciones	
¹ Solución de Violeta de Cresilo: 2,5 ml de ácido acético 10% + 500 ml de violeta de cresilo al 1% en agua destilada (esta última solución se filtra) ² Diferenciador: Para 1 litro: 17 ml de ácido acético glaciado + 983 ml de etanol 96%	

Protocolo 2: inmunofluorescencia para NeuN	
PBS 0.1M	3 x 5 min. RT
PREINCUBACIÓN Goat Serum 10%, BSA 3%, TX100 1% en PBS	2h RT
INCUBACIÓN PRIMARIO Goat Serum 3,3%, BSA 1%, TX100 0.3%, Mouse antiNeuN 1:400 en PBS	2 noches, 4 °C , en agitación suave
PBS 0.1M 5X10min RT	4x15 min.
INCUBACIÓN SECUNDARIO Goat Serum 3,3%, BSA 1%, TX100 0.3%, Goat anti-mouse Alexa Fluor 568 1:100 en PBS	6h, sobre hielo, en agitación suave y oscuridad
PBS 0.1M	5X5min.
RT	
Montaje	

Protocolo 3: inmunofluorescencia para GABA	
PBS 0.1M	3 x 5 min. RT
PREINCUBACIÓN Goat Serum 10%, BSA 3%, TX100 1% en PBS	2h RT
INCUBACIÓN PRIMARIO Goat Serum 3,3%, BSA 1%, TX100 0.3%, AntiGABA 1:500 en PBS	2 noches, 4 °C , en agitación suave
PBS 0.1M 5X10min RT	4x15 min.
INCUBACIÓN SECUNDARIO Goat Serum 3,3%, BSA 1%, TX100 0.3%, Goat Anti Rabbit Alexa Fluor 647 1:100 en PBS	6h, sobre hielo, en agitación suave y
oscuridad	
PBS 0.1M	5X5min.
RT	
Montaje	

Protocolo 4: inmunofluorescencia doble para GABA y Calbindina 28K	
PBS 0.1M	3 x 5 min. RT
PREINCUBACIÓN Goat Serum 10%, BSA 3%, TX100 1% en PBS	2h RT
INCUBACIÓN PRIMARIO Goat Serum 3,3%, BSA 1%, TX100 0.3%, AntiGABA 1:500, Mouse anti-calbindin 1:1000 en PBS	2 noches, 4 °C , en agitación suave
PBS 0.1M 5X10min RT	5x10 min.
INCUBACIÓN SECUNDARIO Goat Serum 3,3%, BSA 1%, TX100 0.3%, Goat Anti Rabbit Alexa Fluor 568 1:100, Goat anti-mouse Alexa Fluor 488 1:100 en PBS	6h, sobre hielo, en agitación suave y
oscuridad	
PBS 0.1M	5X5min.
RT	
Montaje	

Protocolo 5: inmunofluorescencia doble para GABA y Reelina	
PBS 0.1M	3 x 5 min. RT
DESENMASCARAMIENTO DE EPÍTOPOS TCS	90 °C, 10 min. en vapores de baño, sin
agitación	
PREINCUBACIÓN Goat Serum 10%, BSA 3%, TX100 1% en PBS	2h RT

INCUBACIÓN PRIMARIO Goat Serum 3,3%, BSA 1%, TX100 0.3%, AntiGABA 1:500, Mouse anti-Reelina 1:400 en PBS 2 noches, 4 °C , en agitación suave	
PBS 0.1M 5X10min RT	5x10 min.
INCUBACIÓN SECUNDARIO Goat Serum 3,3%, BSA 1%, TX100 0.3%, Goat Anti Rabbit Alexa Fluor 647 1:100, Goat anti-mouse Alexa Fluor 568 1:100 en PBS 6h, sobre hielo, en agitación suave y oscuridad	
PBS 0.1M	5X5min.
RT	
Montaje	

Protocolo 6: inmunofluorescencia para somatostatina	
PBS 3 X 5 min	3 x 5 min.
PREINCUBACIÓN Goat Serum 10%, BSA 3%, TX100 1% en PBS 2h RT	
INCUBACIÓN PRIMARIO Goat Serum 3,3%, BSA 1%, TX100 0.3%, SS14 (1: 1000) en PBS 2 noches, 4 °C , en agitación suave	
PBS 0.1M 5X10min RT	4x15 min.
INCUBACIÓN SECUNDARIO Goat Serum 3,3%, BSA 1%, TX100 0.3%, Goat Anti Rabbit 647 1:100 en PBS 6h, sobre hielo, en agitación suave y oscuridad	
PBS 0.1M	5X5min.
RT	
Montaje	

Protocolo 7: inmunofluorescencia doble para somatostatina y Calbindina 28K	
PBS 3 X 5 min	3 x 5 min.
PREINCUBACIÓN Goat Serum 10%, BSA 3%, TX100 1% en PBS 2h RT	
INCUBACIÓN PRIMARIO Goat Serum 3,3%, BSA 1%, TX100 0.3%, SS14 (1: 1000), Mouse anti-calbindin 1:1000 en PBS 2 noches, 4 °C , en agitación suave	
PBS 0.1M 5X10min RT	5x10 min.
INCUBACIÓN SECUNDARIO Goat Serum 3,3%, BSA 1%, TX100 0.3%, Goat Anti Rabbit Alexa Fluor 647 1:100, Goat anti-mouse Alexa Fluor 568 1:100 en PBS 6h, sobre hielo, en agitación suave y oscuridad	
PBS 0.1M	

	5X5min.
RT	
Montaje	

Protocolo 8: inmunofluorescencia doble para somatostatina y Reelina	
PBS 3 X 5 min	3 x 5 min.
DESENMASCARAMIENTO DE EPÍTOPOS TCS	90 °C, 10 min. en vapores de baño, sin agitación
PREINCUBACIÓN Goat Serum 10%, BSA 3%, TX100 1% en PBS	2h RT
INCUBACIÓN PRIMARIO Goat Serum 3,3%, BSA 1%, TX100 0.3%, SS14 (1: 1000), Mouse anti-Reelina 1:400 en PBS	2 noches, 4 °C , en agitación suave
PBS 0.1M 5X10min RT	5x10 min.
INCUBACIÓN SECUNDARIO Goat Serum 3,3%, BSA 1%, TX100 0.3%, Goat Anti Rabbit Alexa Fluor 647 1:100, Goat anti-mouse Alexa Fluor 568 1:100 en PBS	6h, sobre hielo, en agitación suave y oscuridad
PBS 0.1M	5X5min.
RT	
Montaje	

Protocolo 9: inmunofluorescencia para calbindina 28K	
Lavado PB	3 x 5 min.
Preincubación 7% Normal Goat Serum, 3% BSA, 0,5% Tx-100 en PB	2 horas (temperatura ambiente, en agitación)
Incubación en anticuerpo primario Mouse anti-calbindin 1:1000, en PB con 3% NGS y 0,5% TX-100	2 noches, (4° C, en agitación)
Lavados PB	3x 15 min.
Incubación en anticuerpo secundario Goat anti-mouse Alexa Fluor 568 1:200 en PB con 3% NGS y 0,5% TX-100	6 horas, sobre placa en hielo, en agitación suave
Lavados PB	4x15 min.
Montaje	

Protocolo 10: inmunofluorescencia doble para Calbindina 28K y Reelina	
PBS 3 X 5 min	3 x 5 min.
DESENMASCARAMIENTO DE EPÍTOPOS TCS	90 °C, 10 min. en vapores de baño, sin agitación
PREINCUBACIÓN Goat Serum 10%, BSA 3%, TX100 1% en PBS	2h RT
INCUBACIÓN PRIMARIO Goat Serum 3,3%, BSA 1%, TX100 0.3%, Rabbit anti-calbindin 1:1000, Mouse anti-Reelin 1:400 en PBS	2 noches, 4 °C , en agitación suave
PBS 0.1M 5X10min RT	5x10 min.
INCUBACIÓN SECUNDARIO Goat Serum 3,3%, BSA 1%, TX100 0.3%, Goat Anti Rabbit Alexa Fluor 647 1:100, Goat anti-mouse Alexa Fluor 568 1:100 en PBS	6h, sobre hielo, en agitación suave y oscuridad
PBS 0.1M	5X5min.
RT	
Montaje	

Protocolo 11: inmunofluorescencia para calretinina	
Lavado PB	3 x 5 min.
Preincubación 7% Normal Goat Serum, 3% BSA, 0,5% Tx-100 en PB	2 horas (temperatura ambiente, en agitación)
Incubación en anticuerpo primario Rabbit anti-calretinin 1:1000, en PB con 3% NGS y 0,5% TX-100	2 noches, (4° C, en agitación)
Lavados PB	3x 15 min.
Incubación en anticuerpo secundario Goat anti-rabbit Alexa Fluor 647 1:200 en PB con 3% NGS y 0,5% TX-100	6 horas, sobre placa en hielo, en agitación suave
Lavados PB	4x15 min.
Montaje	

Protocolo 12: inmunofluorescencia doble para Calretinina y Reelina	
PBS 3 X 5 min	3 x 5 min.
DESENMASCARAMIENTO DE EPÍTOPOS TCS	90 °C, 10 min. en vapores de baño, sin agitación

PREINCUBACIÓN Goat Serum 10%, BSA 3%, TX100 1% en PBS	2h RT
INCUBACIÓN PRIMARIO Goat Serum 3,3%, BSA 1%, TX100 0.3%, Rabbit anti-calretinina 1:1000, Mouse anti-Reelin 1:400 en PBS	2 noches, 4 °C , en agitación suave
PBS 0.1M 5X10min RT	5x10 min.
INCUBACIÓN SECUNDARIO Goat Serum 3,3%, BSA 1%, TX100 0.3%, Goat Anti Rabbit Alexa Fluor 647 1:100, Goat anti-mouse Alexa Fluor 568 1:100 en PBS	6h, sobre hielo, en agitación suave y oscuridad
PBS 0.1M	5X5min.
RT	

Protocolo 13: inmunofluorescencia doble para calbindina 28K y calretinina	
Lavado PB	3 x 5 min.
Preincubación 7% Normal Goat Serum, 3% BSA, 0,5% Tx-100 en PB	2 horas (temperatura ambiente, en agitación)
Incubación en anticuerpo primario Mouse anti-calretinin 1:1000, Rabbit anti-calbindin 1:1000 en PB con 3% NGS y 0,5% TX-100	2 noches, (4° C, en agitación)
Lavados PB	3x 15 min.
Incubación en anticuerpo secundario Goat anti-mouse Alexa Fluor 568 1:200, Goat anti-rabbit 647 Alexa Fluor 1:200 en PB con 3% NGS y 0,5% TX-100	3 horas, sobre placa en hielo, en agitación suave
Lavados PB	4x15 min.
Montaje	

Protocolo 14: inmunofluorescencia para Reelina	
PBS 3 X 5 min	3 x 5 min.
DESENMASCARAMIENTO DE EPÍTOPOS TCS	90 °C, 10 min. en vapores de baño, sin agitación
PREINCUBACIÓN Goat Serum 10%, BSA 3%, TX100 1% en PBS	2h RT
INCUBACIÓN PRIMARIO Goat Serum 3,3%, BSA 1%, TX100 0.3%, Mouse anti-Reelina 1:400 en PBS	2 noches, 4 °C , en agitación suave
PBS 0.1M 5X10min RT	5x10 min.
INCUBACIÓN SECUNDARIO	

Goat Serum 3,3%, BSA 1%, TX100 0.3%, Goat anti-mouse Alexa Fluor 568 1:100 en PBS 6h, sobre hielo, en agitación suave y oscuridad	
PBS 0.1M	5X5min.
RT	
Montaje	

Protocolo 15: inmunohistoquímica para Reelina	
PBS 3 X 5 min	3 x 5 min.
INACTIVACIÓN PEROXIDASA H2O2 0,01% en PBS	10min. RT
PBS 0.1M	3X10min.
RT	
DESENMASCARAMIENTO DE EPÍTOPOS TCS	90°C, 10 min. en vapores de baño, sin agitación
PREINCUBACIÓN Goat Serum 10%, BSA 3%, TX100 1% en PBS	2h RT
INCUBACIÓN PRIMARIO Goat Serum 3,3%, BSA 1%, TX100 0.3%, Mouse anti-Reelin (1: 400) en PBS 2 noches, 4 °C , en agitación suave	
PBS 0.1M 5X10min RT	4x15 min.
INCUBACIÓN SECUNDARIO Goat Serum 3,3%, BSA 1%, TX100 0.3%, Goat Anti Mouse biotinilado 1:200 en PBS	2h
RT	
PBS 0.1M	5X5min.
RT	
PB 0.1M	3 x 5 min.
Incubación con complejo avidina-biotina (ABC Vector) ABC en PB (1 gota de A y 1 gota de B por cada 5 ml de solución)	2h
RT	
Lavados PB	3x15 min.
Revelado de la peroxidasa 0,05% DAB + 0,003% H2O2 en PB frío Bajo control visual en microscopio óptico	
PB 0.1M	3X10min.
RT	
Montaje	

Protocolo 16: : inmunohistoquímica para somatostatina “in toto”	
PBS 3 X 5 min	3 x 5 min.
INACTIVACIÓN PEROXIDASA H2O2 0,01% en PBS	10min. RT
PBS 0.1M RT	3X10min.
PREINCUBACIÓN Goat Serum 10%, BSA 3%, TX100 1% en PBS	2h RT
INCUBACIÓN PRIMARIO Goat Serum 3,3%, BSA 1%, TX100 0.3%, SS14 (1: 1000) en PBS	2 noches, 4 °C , en agitación suave
PBS 0.1M 5X10min RT min.	4x15
INCUBACIÓN SECUNDARIO Goat Serum 3,3%, BSA 1%, TX100 0.3%, Goat Anti Rabbit biotilado 1:100 en PBS suave	1 noche, 4 °C , en agitación
PBS 0.1M RT	5X10min.
PB 0.1M RT	3X5min.
Incubación con complejo avidina-biotina (ABC Vector) ABC en PB (1 gota de A y 1 gota de B por cada 5 ml de solución) suave	1 noche, 4 oC , en agitación
Lavados PB min.	3x15
TAS 5min.	3X
<p>Para 100 ml:</p> <p>sol A: 50ml TAS pH6 2,42 gr Sulfato Niquel 0,2 gr D-Glucosa 0,04 gr Cloruro de Amonio</p> <p>sol B: 50 ml dH₂O 0,03 mgr DAB</p> <p>Mezclar ambas</p> <p>Antes de revelar, echar 0,003 gr de glucosa oxidasa para Vol final:100 ml</p>	
TAS min.	3X2
PB 0.1M	3X3

min.
Montaje

Protocolo 17: limpieza y gelatinización de portaobjetos.
1. Dejar toda una noche en solución de limpieza ¹ .
2. Lavar durante cuatro horas en agua corriente fría.
3. Lavar en lavaplatos sin detergente
4. Realizar dos pases de unos segundos por la solución de gelatina ²
5. Colocar en una estufa a 37°C hasta su utilización
<p>¹<u>Solución de limpieza de portaobjetos:</u> Para 1 litro: 850 ml de agua bidestilada + 100 g de Dicromato Potásico + 100 ml de ácido sulfúrico purísimo 96% (añadir el ácido sulfúrico lentamente y agitar con varilla constantemente)</p> <p>²<u>Solución de gelatina:</u> -Solución A: calentar 950 ml de agua destilada hasta 50-60° C y añadir lentamente 20 g de gelatina en polvo. -Solución B: disolver 0,5 g de Chromium Potassium Sulfate en 50 ml de agua destilada. Mezclar A y B, dejar enfriar y filtrar.</p>

Protocolo 18: deshidratación de secciones de inmunoperoxidasa	
1. Etanol 70%	3 min.
2. Etanol 80%	3 min.
3. Etanol 90%	3 min.
4. Etanol 100%	2 x 3min.
5. Xilol	6 x 10 min.

Protocolo 19: deshidratación de secciones con fluorescencia	
1. Etanol 70%	15 seg.
2. Etanol 80%	15 seg.
3. Etanol 90%	15 seg.
4. Etanol 100%	2 x 15 seg.
5. Xilol	6 x 5 min.

SOLUCIONES**PB- Phosphate Buffer 0,1 M, pH 7.4**

Para 1 litro:

Solución A: 27,6 g de fosfato sódico monobásico + 1 l de agua destilada

Solución B: 35,6 g de fosfato sódico dibásico + 1 litro de agua destilada

Stock PB 0,2 M: 115 ml de solución A + 385 ml de solución B

Mezclar 500 ml de PB 0,2M y 500 ml de agua destilada

TAS- Tampón Acetato Sódico, pH 6

Para 1 litro:

13,608 g de acetato sódico (136,08M)

Ajustar el pH a 6.

TCS- Tampón Citrato Sódico, pH 6

Para 100 mililitros:

9.5 ml de ácido cítrico + 41.5 ml citrato sódico + 50 ml de agua destilada

Ajustar el pH a 6.

Solución anticongelante

300 ml de glicerol + 300 ml de etilenglicol + 400 ml de PB 0,05M + 100 ml de tampón F (3,365 g de fosfato sódico monobásico + 0,77 g hidróxido sódico en lentejas + 1 l de agua destilada)

Paraformaldehído 4%

Para 1 litro:

Calentar 500 ml de agua destilada a 60° C. Añadir 40 gr de paraformaldehído, y mantener en agitación.

Puede ser necesario añadir unas gotas de hidróxido sódico para su completa disolución.

Mezclar con 500 ml de PB 0,2M previamente filtrado. Filtrar. Ajustar el pH a 7.4.

RESULTADOS

Hemos examinado la distribución cortical, patrón de arborización axónica y contenido en proteínas de matriz extracelular, ligadoras de calcio y/o neurotransmisores de las neuronas corticales que inervan la capa I, así como de neuronas situadas en regiones subcorticales no talámicas.

Para la descripción de nuestros experimentos comenzaremos primero por la descripción de la localización intra- y extracelular de la proteína Reelina en el cerebro de rata. Posteriormente, se analizará los tipos de interneuronas corticales que pueden contener Reelina y proyectar a capa I.

A continuación, pasaremos a explicar los resultados del estudio de los depósitos epipiales que exploran pequeñas áreas corticales. Primero se describirá el análisis del aporte de GABA a larga distancia, tanto cortico-cortical (ipsilateral) como desde estructuras subcorticales no talámicas. Seguidamente, haremos un análisis cuantitativo del tipo de interneuronas que inervan la capa I bajo los depósitos, analizando para ello su contenido en proteínas ligadoras de calcio y/o neurotransmisores junto con el trazador retrógrado FB. Por último, describiremos nuestras observaciones sobre el patrón tangencial de la arborización y morfología de los axones que inervan la capa I.

I. EXPERIMENTOS DE INMUNODETECCIÓN DE LA PROTEÍNA REELINA EN EL CEREBRO DE RATA.

Los tres anticuerpos monoclonales se utilizaron en secciones de tejido adyacentes y mostraron patrones de marcado estrictamente coincidentes. El marcado delimitó estructuras celulares discretas como algunos somas neuronales, sus dendritas proximales y segmentos de axones iniciales. Además, varias regiones de sustancia gris mostraron un marcado homogéneo prominente que interpretamos como marcado de matriz extracelular (ECM). Aunque la sustancia blanca esencialmente está libre de marcaje, algunos tractos axonales presentan un débil inmunomarcado. En general, la intensidad en el marcaje varía marcadamente entre diferentes poblaciones celulares y áreas de neuropilo, sugiriendo diferencias sustanciales en el contenido de la proteína. Experimentos control paralelos mostraron que el marcaje de la piamadre, paredes de vasos sanguíneos y algunas células ependimales no era específico, por lo que no se describirá.

Los cuerpos neuronales inmunorreactivos para Reelina (ReIn-ir) son numerosos en el

prosencéfalo, mesencéfalo y corteza cerebelosa, mientras que el puente y bulbo raquídeo contienen marcadamente pocas células ReIn-ir. A gran aumento, el marcaje en cuerpos neuronales está siempre ausente del núcleo celular, indicando una localización intracitoplasmática. Su apariencia y distribución a gran aumento es similar tanto en cuerpos débilmente marcados como en los fuertemente marcados. La apariencia del marcaje a gran aumento es irregular, restringido a corpúsculos discretos o a estructuras fusiformes que suelen agruparse tanto en la base de las dendritas como del axón. Estas estructuras ReIn-ir, además, se suelen extender en las dendritas proximales. En algunas neuronas fuertemente marcadas, los axones pueden ser diferenciados a gran aumento como una línea de diámetro muy estrecho ($< 1 \mu\text{m}$) y discontinua, llena de corpúsculos inmunorreactivos (Fig. 18 C). La apariencia de estos corpúsculos bajo la luz del microscopio es consistente con la de las vesículas de secreción neuronal (Cameron y cols., 1993; Derer y cols., 2001).

Las siguientes tablas (tablas 3 y 4) resumen nuestras observaciones sobre la distribución de los somas, axones y neuropilo marcados a lo largo de todo el eje longitudinal del cerebro. La apariencia de las estructuras ReIn-ir está documentada en las figuras (Fig. 18 a 27). Así, el texto a continuación detalla sólo las características más sobresalientes del marcaje.

Tabla 3. Somas neuronales y neuropilo inmunorreactivos para Reelina en áreas telencefálicas.

		Neuronal somata	Neuropil / axons
OLFACTORY BULB			
Main olfactory bulb	Glomerular layer (periglomerular cells)	○ ○ ○	+
	Superficial plexiform layer (tufted cells)	● ● ●	+
	Mitral cell layer	● ● ●	+
	Inner plexiform layer		+
	Granular layer	○	+
Lateral olfactory tract		+++	
Accessory olfactory bulb	● ● ●	+	
OLFACTORY CORTICAL AREAS			
Anterior olfactory nucleus	Molecular layer	○ ○ ○	+++
	Pyramidal layer	○ ○ ○	+
	Multiform layer	○ ○ ○	+
Endopyriform nucleus		+	
Olfactory tubercle		+++	
Nucleus of the lateral olfactory tract		+	
Pyriform cortex	Molecular layer	● ● ●	+++
	Pyramidal layer	○ ○ ○	+
	Polyform layer	○ ○ ○	+
OTHER BASAL TELENCEPHALIC REGIONS			
Preoptic areas		● ● ○ ○	++
Septo-hippocampal junction		○ ○ ○	+
Diagonal band nuclei		● ● ○ ○	+
Septal nuclei	Medial	● ● ○ ○	+++
	Lateral ventral	○ ○ ○ ○	+
	Other	○ ○ ○ ○	+
Substantia innominata / anterior amygdaloid areas		● ● ○ ○	+
Ventral pallidum		○ ○ ○ ○	+
Bed nucleus of stria terminalis		○ ○ ○ ○	+
Stria terminalis (tract and nucleus)		○ ○ ○ ○	+
Globus pallidus		○ ○ ○ ○	+
Striatum		○ ○ ○ ○	+
Amygdaloid complex	Corticomedial group	● ● ○ ○	+++
	Basolateral group	○ ○ ○ ○	+
	Central nuclei	○ ○ ○ ○	+
Dorsal Claustrum + Endopyriform Nucleus	○ ○ ○ ○	+	
HIPPOCAMPAL FORMATION AND PARAHIPPOCAMPAL CORTEX			
Fascia dentata	Str. moleculare	● ● ● ●	+++
	Str. granulare	○ ○ ○ ○	+
	Hilus	● ● ● ○	+
Cornu Ammonis	Str. lacunosum-moleculare	● ● ● ●	+++
	Str. radiatum	● ● ● ●	+
	Str. pyramidale	○ ○ ○ ○	+
	Str. oriens	● ● ● ●	+
	Alveus	○ ○ ○ ○	+
Subicular complex	Str. moleculare	● ● ● ●	++
	Str. pyramidale	○ ○ ○ ○	+
	Str. oriens	○ ○ ○ ○	+
Entorhinal cortex	Layer I	● ● ● ●	+++
	Layer II	● ● ● ●	+
	Layer III	● ● ● ●	+
	Layer IV	○ ○ ○ ○	+
	Layer V	○ ○ ○ ○	+
	White matter (interstitial cells)	● ● ● ●	+
ISOCORTEX			
Layer I	● ● ● ●	+++	
Layer II	● ● ● ●	+	
Layer III	● ● ● ●	+	
Layer IV	○ ○ ○ ○	+	
Layer V	● ● ● ●	+	
Layer VI	○ ○ ○ ○	+	
White matter (interstitial cells)	● ● ● ●	+	

Tabla 4. Somas neuronales y neuropilo inmunorreactivos para Reelina en estructuras diencefálicas y tronco

	Neuronal somata	Neuropil / axons
HYPOTHALAMUS AND PRETHALAMIC STRUCTURES		
Zona incerta + Fields of Forel	○○	+
Reticular thalamic nucleus	○○○	
Ventral lateral geniculate nucleus	○○○	
Entopeduncular nucleus	○○	+
Subthalamic nucleus		
Hypothalamus		
Paraventricular nucleus	●○○	++
Mammillary bodies		
Other hypothalamic nuclei and areas	○○	+
DORSAL THALAMUS AND EPITHALAMUS		
Anterodorsal thalamic nucleus	○○○	+
Dorsal Lateral geniculate, lateral posterior, intralaminar NN	○○	++
Other dorsal thalamus nuclei.		
Habenular nuclei + Fasciculus retroflexus	○	++
PRETECTUM AND MESENCEPHALON		
Pretectal nuclei		
Olivary pretectal nucleus	●○○	++
Other pretectal nuclei	○○○	+
Superior colliculus		
Zonale and Superficial gray strata	●○○	+++
Other strata	○○○	+
Inferior colliculus		
Dorsal cortex	○○○	++
Other subdivisions	○	+
Periaqueductal gray matter	○	+
Terminal nuclei of the accessory optic system	○○○	+++
Substantia nigra	○	+
pars compacta,		
pars reticulata		
Ventral tegmental area	○	
Raphe nuclei	○○○	+
Interpeduncular nucleus	○	+++
PONS, CEREBELLUM, MEDULLA OBLONGATA		
Raphe nuclei	○○	+
Reticular nuclei	○	
Principal, oral and interpolar spinal trigeminal nuclei		
Caudal spinal trigeminal nucleus	○○	+
Basilar pons nuclei	○	+
Superior olivary complex		
Parabrachial complex		
Cochlear nuclei		
granule cell layer	○○○	+
other cochlear nuclei		+
Vestibular nuclei		
Cranial motor nuclei		
Cerebellar cortex		
Molecular layer	○	+++
Purkinje cell layer		
Granular layer	○○○	
White matter		
Deep cerebellar nuclei	○	
Inferior olivary nucleus		+
Ventrolateralreticular nucleus	○○	
Cuneate and gracilis nuclear complex	○	

I.1.1 Inmunorreactividad en el bulbo olfatorio y áreas olfatorias de Reelina.

En el bulbo olfatorio principal (MOB) se encontraron cuatro tipos diferentes de neuronas inmunorreactivas: células mitrales y penachadas, todas presentando marcaje, una subpoblación de células periglomerulares y una subpoblación de células granulares. Además, unas pocas células dispersas en la capa granular, presumiblemente células de Cajal, también presentaban marcaje. La tinción en las células mitrales y penachadas era fuerte y revelaba el soma, dendritas proximales y axones de estas células (Fig. 18 B y C). El marcaje axonal consistía en discretos cúmulos de corpúsculos que eran claramente visibles sólo a gran aumento (Fig. 18 C,

puntas de flecha) y se podían seguir a través de la profundidad de las capas del MOB extendiéndose para unirse al tracto olfatorio lateral (LOT). Como se ha indicado anteriormente, este tipo de marcaje es consistente con la tinción de organelas inmunorreactivas intra-axonales. A bajo aumento, se puede observar el LOT como una débil tinción y, en cambio, el marcaje axonal no es claramente visible. Además, el neuropilo presenta un tenue marcaje en todas las capas celulares del MOB, pero más particularmente en la capa plexiforme interna (IPL) (Fig. 18 B).

La figura 18 ilustra el marcaje en la división lateral del núcleo olfatorio anterior (AOL): el marcaje es similar en las otras divisiones del núcleo olfatorio anterior. Somas celulares aislados con débil reactividad se encuentran presentes en todas las capas celulares. Particularmente la capa III muestra somas multipolares o fusiformes. Las células piramidales de capa II no son inmunorreactivas. Los axones mielínicos del LOT muestran una débil tinción, la cual, a mayor resolución, consiste en corpúsculos inmunomarcados. En contraste con las células inmunorreactivas dispersas, una intensa banda de neuropilo marcado delimita toda la extensión de la subcapa Ia del AOL (Fig. 18 E), y decrece abruptamente en la frontera en la subcapa Ib. A mayor aumento este marcaje aparece como una impregnación homogénea y aforma. Nosotros lo hemos interpretado como Reelina extracelular. Además, algunas neuritas quedan delimitadas por filas de corpúsculos. La inmunotinción del neuropilo está virtualmente ausente en las capas II y III.

La corteza piriforme (Pir) contiene somas celulares Reln-ir en todas sus capas, más prominentemente en la capa II (Fig. 19 A y B). Las células Reln-ir de la capa II eran o piramidales o bipenachadas, y el marcaje solía delimitar sus dendritas proximales y axones. La contratinción con tionina (no ilustrada) muestra que los somas Reln-ir constituyen las filas celulares superficiales de la capa II, mientras que la mayoría de los somas en las partes profundas de la capa no se encuentran marcadas. Había, además, un desplazamiento del marcaje en capa II en sentido rostro-caudal de Pir: las células Reln-ir eran escasas y muy superficiales en Pir rostral, cerca de la transición a AOL, pero progresivamente iban siendo más numerosas y se iban agrupando más estrechamente en niveles intermedios y caudales de Pir, donde constituían el grosor de capa II. Además, en capa III de Pir también se encuentran células fusiformes y multipolares Reln-ir dispersas.

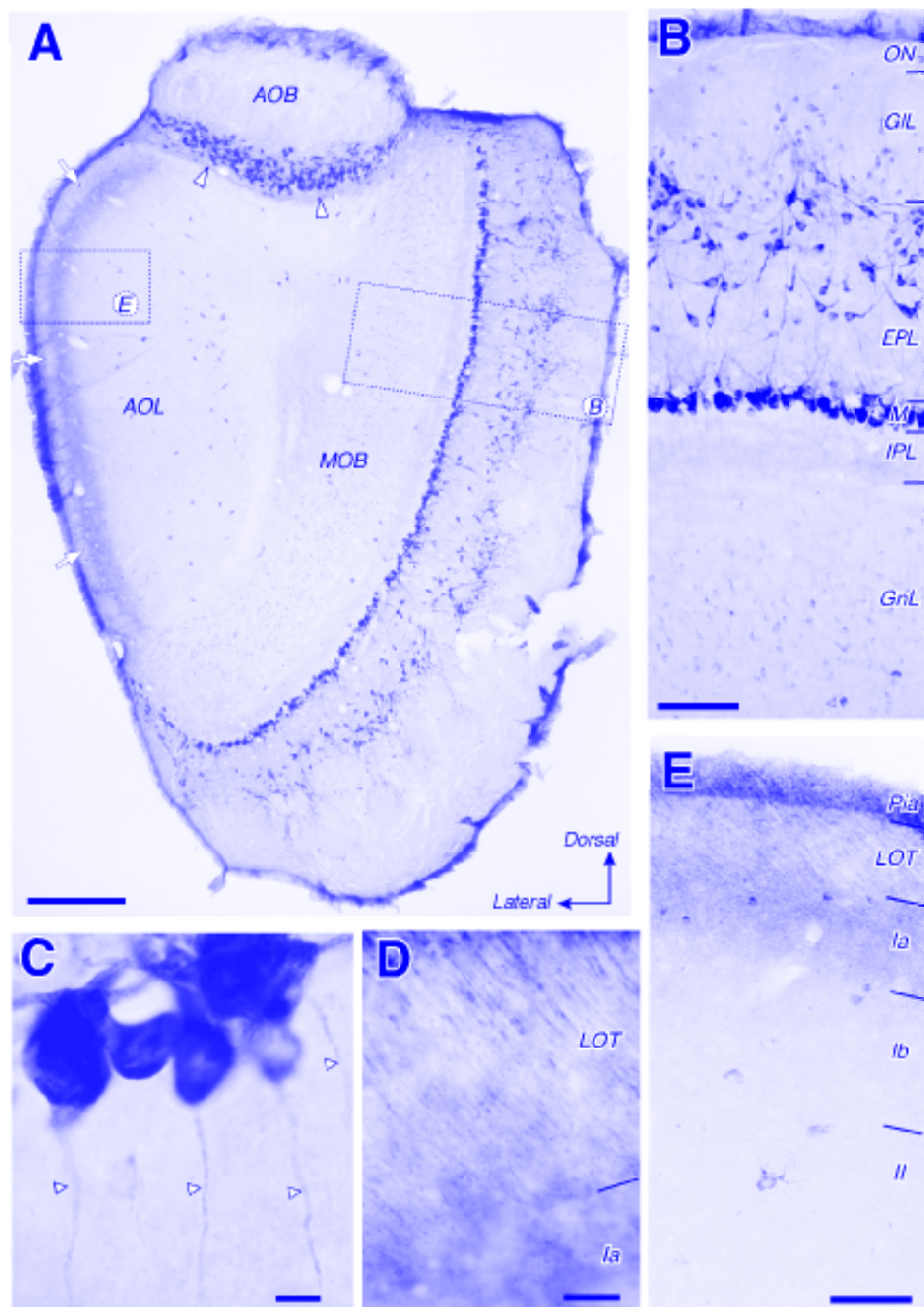


Figura 18. (Página anterior) Inmunotinción de Reelina en el bulbo olfatorio. (A) Vista panorámica de una sección coronal que incluye los bulbos olfatorios principal (MOB) y accesorio (AOB), así como la división lateral del núcleo olfatorio anterior (AOL). Nótese la localización altamente selectiva del marcaje en determinadas capas celulares y/o zonas de neuropilo en cada uno de estos tres campos. Las flechas señalan la localización del tracto olfatorio lateral (LOT), mientras que las puntas de flecha indican la posición de las capas plexiforme interna en MOB. (B) Detalle del marcaje en MOB (recuadro en A). Nótese que virtualmente todas las células penachadas y mitrales son fuertemente reactivas. Además, las subpoblaciones de pequeñas células periglomerulares en la capa glomerular (GL) y de células glomerulares en la capa granular (GnL) también son inmunorreactivas. (C) Vistas a mayor aumento de neuronas mitrales marcadas en MOB. Nótese como Reelina es claramente visible, aparte de en somas y dendritas, en axones (puntas de flechas). (D) Marcaje en los axones del LOT y marcaje amorfo en la subcapa Ia de AOL, presumiblemente extracelular. La superficie pial se encuentra hacia la parte superior. (E) Marcaje en las capas superficiales de AOL (recuadro en A). Nótese la apariencia amorfa del inmunoprecipitado en la parte superficial de capa I (subcapa Ia), que interpretamos como marcaje de matriz extracelular. Los haces de axones en el LOT también muestran inmunorreactividad, aunque con menor intensidad. En estas capas profundas se encuentran somas aislados de células que contienen Reelina. Para otras abreviaturas, ver lista. Barras de calibración, 500 μm (A); 100 μm (B y E); 10 μm (C y D).

Los axones LOT que corren subpialmente en Pir muestran de nuevo un marcaje de corpúsculos discretos a gran aumento; sin embargo, como ya se notó en AOL, este marcaje aparece relativamente débil a bajo aumento. Además, como para el núcleo olfatorio anterior, el neuropilo de la zona externa de la capa I de Pir (subcapa Ia) es notablemente ReIn-ir (Fig. 19 A y B). La extensión y nitidez del borde interno de esta banda de neuropilo fuertemente teñido desciende caudalmente en Pir (compárese Fig. 19 A y B con Fig. 19 D). Además, la subcapa Ib, y las capas II y III de Pir presentan, aunque tenue, un evidente inmunomarcaje de su neuropilo en comparación con, por ejemplo, el marcaje del neuropilo de la amígdala (Fig. 19 D).

Añadido al AOL y Pir, todo el teléncéfalo basal que resta contacta áreas de axones de células mitrales (axones del LOT), llamados tubérculo olfatorio (TuO), el núcleo del tracto olfatorio lateral, y los núcleos cortical (ACo) y medial (AMe) de la amígdala, que contienen una banda de neuropilo fuertemente marcado en la parte externa de su capa subpial (molecular). Algunos de estos núcleos contienen varios somas ReIn-ir en sus filas más profundas; sin embargo, una observación destacable es que el TuO carece de somas celulares ReIn-ir (Fig. 19 A).

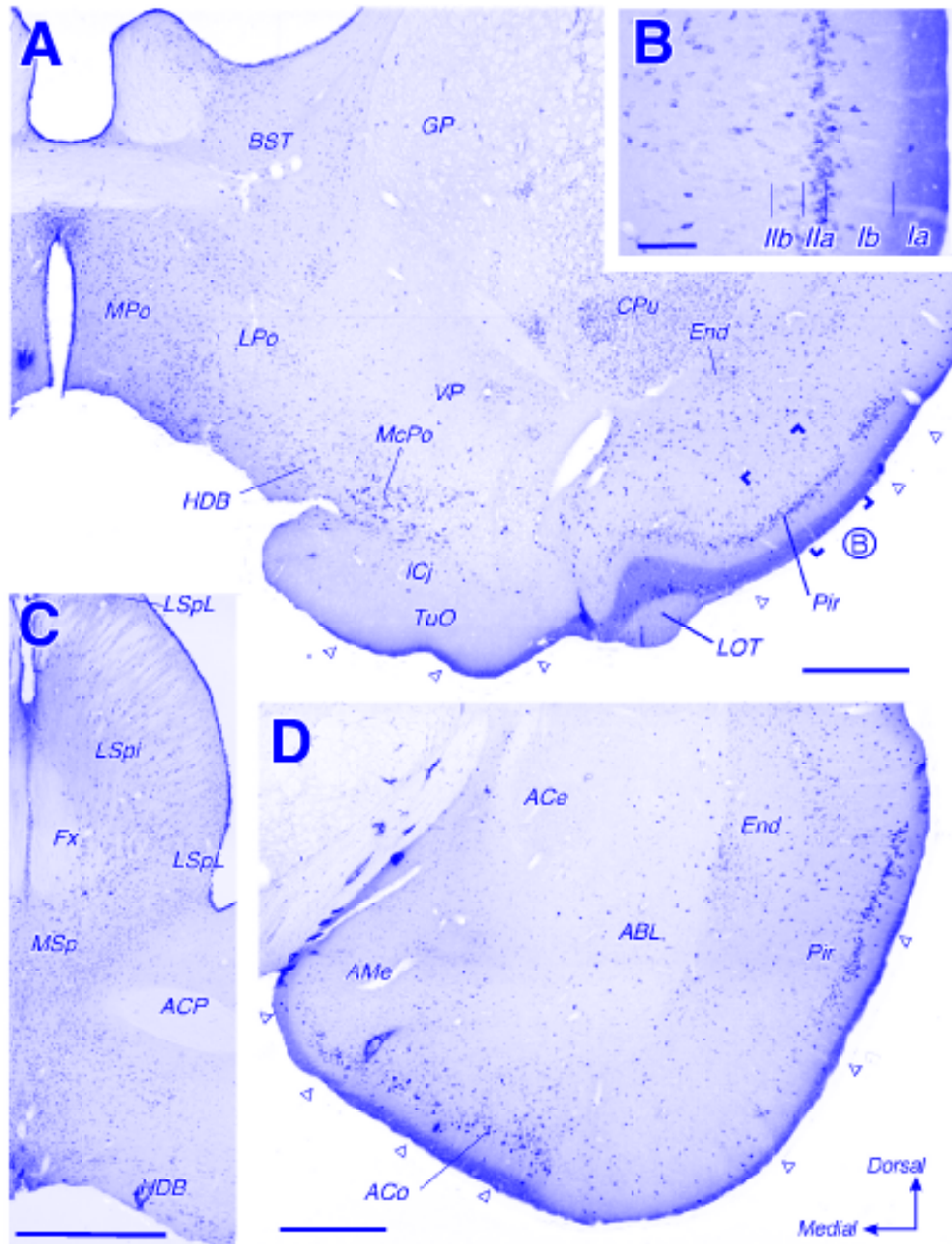


Figura 19. Inmunotinción de Reelina en prosencéfalo basal y lóbulo piriforme. (A, C y D) Vistas panorámicas de secciones coronales en tres niveles diferentes mostrando células y neuropilo inmunorreactivos. Nótese en A y D la banda de neuropilo fuertemente reactivo en la capa superficial de la corteza piriforme (Pir), el tubérculo olfatorio (TuO) y los núcleos amigdalinos cortical (ACo) y medial (AMe); este neuropilo corresponde con la terminación de los axones de células mitrales. La distribución sublaminar de este marcaje en Pir se puede apreciar mejor a mayor aumento (B). En D se puede apreciar, además, neuropilo menos intensamente marcado a través de las capas profundas de Ppir, ACo, AMe y el núcleo endopiriforme (End), mientras dicho neuropilo es mucho menos intenso o se encuentra ausente en las áreas preópticas (PoA), sustancia innominada (SI) y septo medial (MSp). El tubérculo olfatorio, de todas formas, no contiene somas que contengan Reelina. (B) Detalle del inmunomarcaje en las capas superficiales de Pir. La banda de células piramidales fuertemente marcadas en capa II se limita a la parte superficial de la capa (subcapa IIa), mientras que las pirámidas más profundas de esta capa no se encuentran marcadas (IIb). Compárese con Figura 1D. Para otras abreviaturas, ver Lista. Barras de calibración, 500 μm (A, C y D); 100 μm (B).

I.1.2 Inmunorreactividad de Reelina en el septum, amígdala y ganglios basales.

Los núcleos septales contienen numerosas células ReIn-ir (Fig 19 C), pero la intensidad en la tinción varía marcadamente entre los núcleos. Numerosas somas celulares inmunorreactivos están presentes en los núcleos de la banda diagonal (Fig. 18 C y D) y en las áreas preópticas. El área anterior y los núcleos basales y laterales de la amígdala contienen somas ReIn-ir dispersos (Fig. 19 A y D). El núcleo central amigdalino, por el contrario, no contiene somas inmunorreactivos. Nótese (Fig. 19 D) que el neuropilo de los núcleos de la amígdala muestra consistentemente un bajo nivel de tinción respecto a la corteza cerebral adyacente. Como se mencionó anteriormente, el marcaje del neuropilo es fuerte en la parte superficial de la capa molecular de los núcleo corticales y mediales de la amígdala.

Un gran número de neuronas estriatales están débilmente inmunoteñidas (Fig. 20). No intentamos investigar cambios relacionados con la edad; sin embargo, es digno de mención que la inmunotinción en las células estriatales siempre fue mayor en ratas jóvenes adultas (2-5 meses de edad), y menos generalizado e intenso en animales de mayor edad. Las neuronas marcadas son multipolares y rondan las 14-20 μm en su diámetro mayor, sugiriendo que pueden ser neuronas espinosas de tamaño medio. A mayor aumento su marcaje consiste en pequeñas partículas discretas que se distribuyen en el pericarion y tallos de dendritas (Fig. 20 E). Las células ReIn-ir muestran una distribución parcheada e irregular a través del caudado-putamen (CPu). Estas células son más abundantes en niveles rostrales e intermedios del CPu, particularmente en sus porciones ventral y lateral, así como en la región medial del CPu caudal. Por el contrario, las células son escasas en la parte dorsomedial del CPu rostral e intermedio, así como en la parte lateral del CPu caudal. El núcleo accumbens no presenta neuronas marcadas. Grupos de neuronas intensamente ReIn-ir delinean los dominios parcheados dentro del CPu, en un patrón que recuerda a los compartimentos estriosomales del estriado de la rata. Para examinar esta posibilidad, comparamos secciones de tejido inmunomarcadas con Reelina con secciones adyacentes inmunomarcadas para el receptor de μ -opioide, un marcador específico para los compartimentos estriosomales (Fig. 20 A y A'). Esto en principio podría confirmar que los parches de neuronas fuertemente ReIn-ir coinciden con los estriosomas. Sin embargo, el experimento también muestra que varias células ReIn-ir se localizan en la matriz de los compartimentos a lo largo del CPu, particularmente en las porciones

ventrolaterales del núcleo. Análisis de muestras tejido estriatal en Western blot dan evidencia adicional que hace pensar que el inmunomarcaje observado en las neuronas estriatales es específico para la proteína Reelina, e indica que el producto prevalente en el estriado de Reelina es el péptido de 180 KDa (Fig. 17).

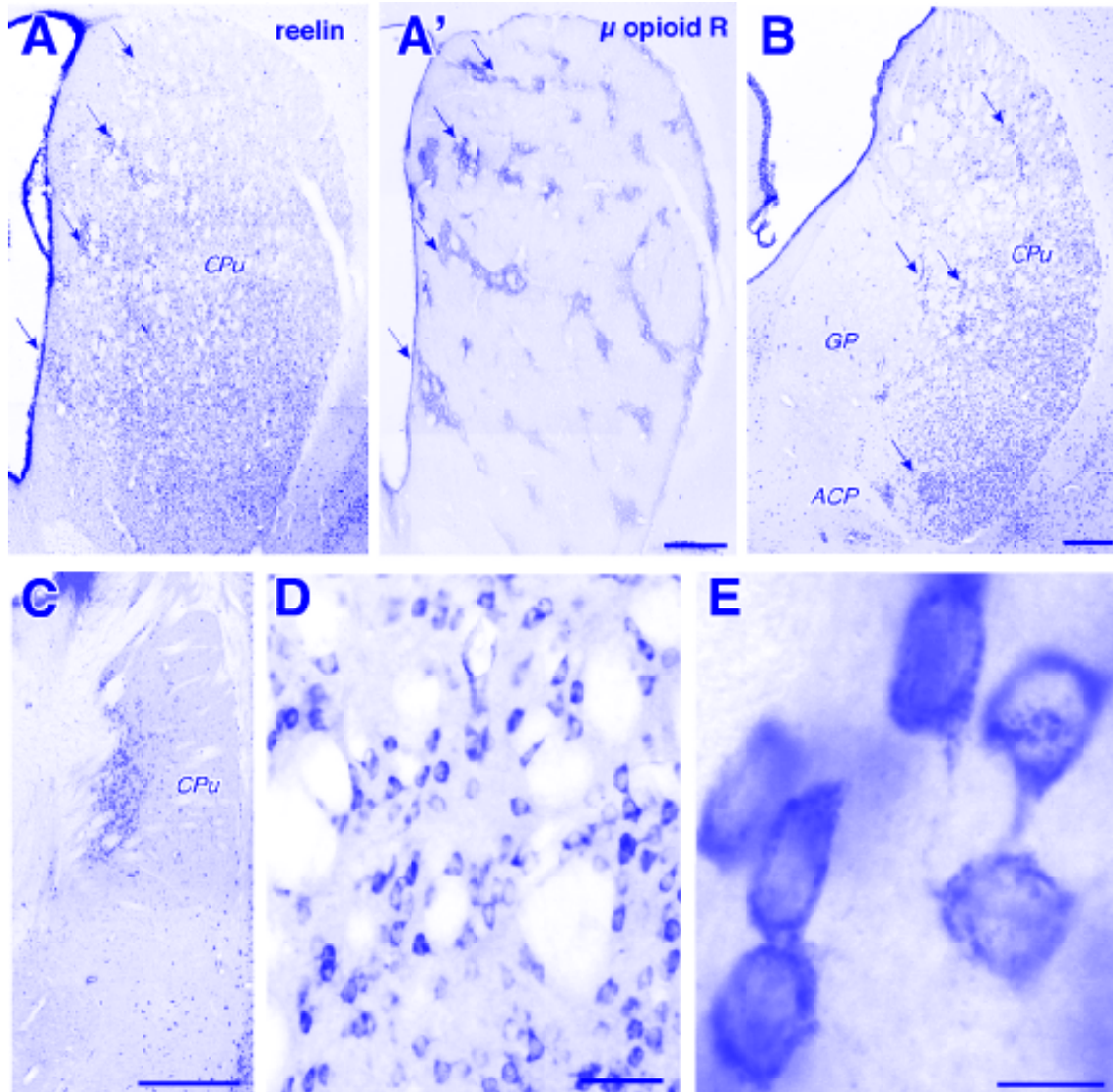


Figura 20. Inmunotinción de Reelina en el estriado. (A) Vista panorámica del caudado-putamen (CPu) inmunoteñido desde la parte rostral del núcleo (bregma + 1mm). Nótese los grandes somas que contienen Reelina en la parte ventral y lateral del CPu y los grupos discretos de células teñidas en la parte dorsal del núcleo (flechas). (A') Sección adyacente del CPu mostrado en A, inmunoteñido para el receptor μ opioide para delinear los compartimentos estriosomales del CPu. Nótese la estrecha similitud entre los estriosomas (flechas) y los grupos celulares ricos en Reelina mostrados en A. (B y C) Secciones coronales inmunoteñidas para Reelina escogidas en los niveles medio (B, bregma - 0.90 mm) o caudal (C, bregma - 3.30 mm) del CPu. Nótese la distribución irregular de somas reactivos. Grupos de neuronas fuertemente reactivas como las mostradas en A se encuentran a través del CPu. En C se puede apreciar las diferentes intensidades de tinción encontradas en el CPu, que presenta la mayoría de sus células marcadas. (E) Soma celular a mayor aumento marcado. Nótese la distribución irregular del inmunoprecipitado en el citoplasma. Para otras abreviaturas, ver Lista. Barras de calibración, 500 μ m (A-C); 50 μ m (D); 10 μ m (E).

El globo pálido dorsal y ventral carece de marcaje excepto por unas ocasionales células multipolares (Fig. 19 A). Numerosas fibras de la *stria terminalis* son ReIn-ir de manera tenue. Asimismo, el núcleo de la *stria terminalis* presenta neuronas débilmente ReIn-ir.

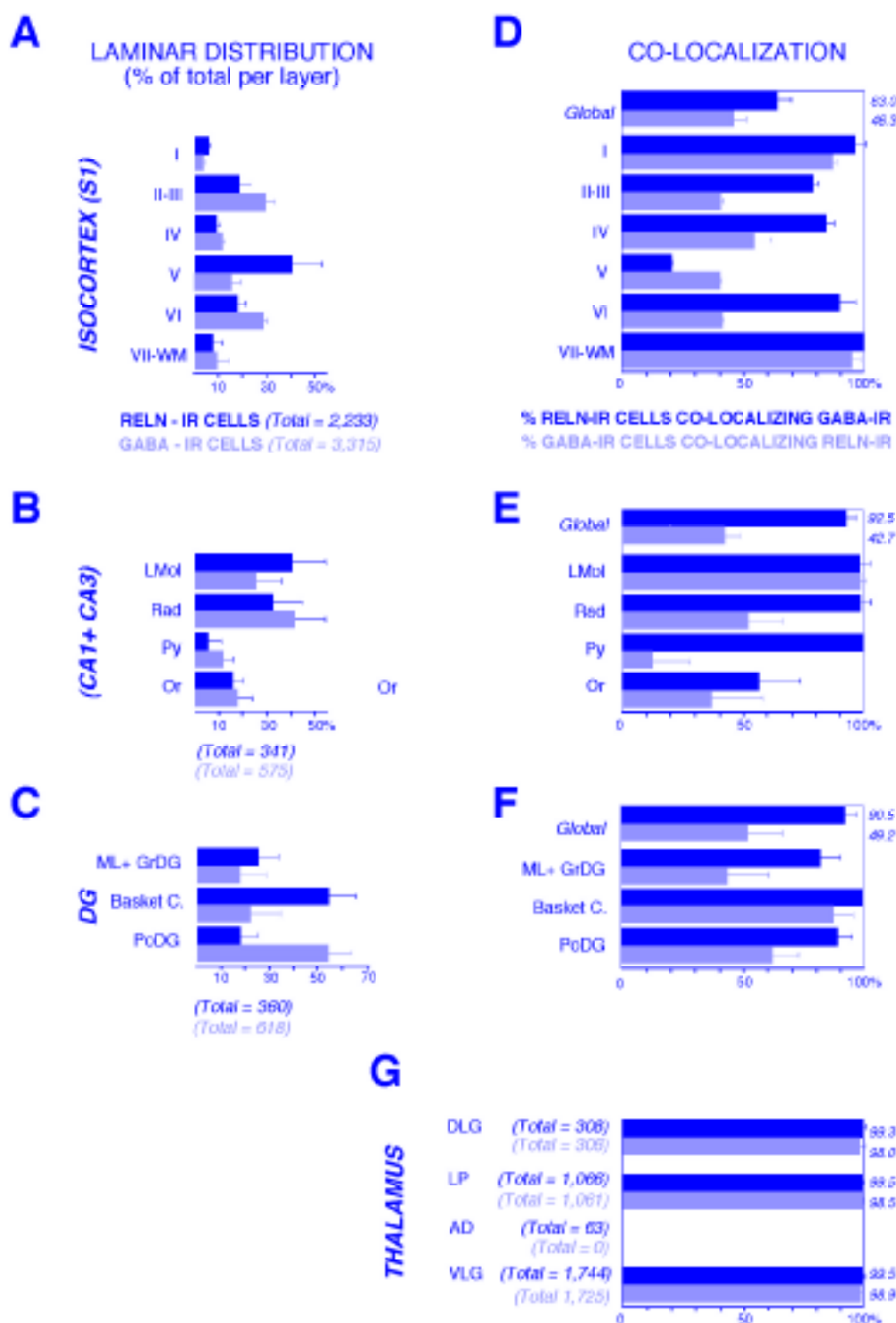
I.1.3 Inmunorreactividad de Reelina en estructuras diencefálicas.

En el tálamo dorsal, los somas ReIn-ir están limitados a unos pocos núcleos. El marcaje más prevalente se observa en los núcleos anterodorsal y paraventricular (Fig. 25 A y D). Numerosas células débilmente teñidas están también presentes en los núcleos intralaminares anteriores como el central medial, paracentral y central lateral. Además, a través de los núcleos geniculado lateral dorsal (GLD) y lateral posterior (LP) está dispersa una evidente población de neuronas ReIn-ir. Estas células del GLD y LP son principalmente bipolares, y sus dendritas se marcan generalmente durante varias centenas de micras (Fig. 25 E). Dichas células son notoriamente más pequeñas (el diámetro mínimo del soma es de $8.5 \pm 1.5 \mu\text{m}$) que las del resto de la población reveladas mediante la contratincción de tiónina o mediante la inmunorreactividad para NeuN (el diámetro mínimo del soma es de $12 \pm 1.3 \mu\text{m}$; compárese la Fig. 25 D y E). Los análisis de Western blot de muestras de tejido del LP proveen de evidencia adicional sobre la especificidad para la proteína Reelina del inmunomarcaje observado en la población de neuronas talámicas. Como en otras regiones cerebrales, el péptido más abundante de Reelina que se detecta en el tálamo es el fragmento de 180 KDa.

Estas observaciones rozan la posibilidad de que las células del GLD y LP sean interneuronas intrínsecas GABAérgicas de cuya existencia se sabe en los núcleos talámicos de la rata (Ohara y cols., 1983). Para investigar esta posibilidad, examinamos el doble marcado GABA y Reelina en el tálamo (Fig 22 G y 23 D). La inmunorreactividad somática para GABA variaba en intensidad ampliamente, como previamente se había descrito (Ohara y cols., 1983). El análisis de colocalización reveló que virtualmente todas las células del LGD contienen GABA. Lo mismo ocurre para las células del LP que son ReIn-ir (Fig. 22 G). Por el contrario, los núcleos talámicos restantes que poseen células ReIn-ir (anterodorsal, paraventricular e intralaminar anterior) no contienen células GABA (Fig. 22 G), tal y como está descrito (Ohara y cols., 1983); por tanto, las células ReIn-ir en estos núcleos serían células de proyección.

El marcaje del neuropilo está ausente en todo el tálamo dorsal, excepto por una débil, aunque consistente, tinción en el LGD y LP.

Figura 22. (Página siguiente). **Distribución laminar y análisis de colocalización de Reelina e inmunorreactividad para GABA en somas celulares del isocortex, formación hipocampal y tálamo.** (A) Distribución laminar de neuronas inmunorreactivas para Reelina (barras negras) o GABA (barras grises) en el isocortex (área S1 en corteza parietal). Las barras representan, para cada marcador, la fracción total de células inmunorreactivas presentes en cada capa. Los números totales de las células inmunorreactivas para cada marcador se muestran debajo del gráfico. Nótese cómo la distribución laminar de las células inmunorreactivas a Reelina (ReIn-ir) es irregular: la capa V, aunque es relativamente poco gruesa, contiene una gran fracción de células ReIn-ir. Por el contrario, las células inmunorreactivas a GABA (GABA-ir) se distribuyen homogéneamente por todas las capas, mientras que las aparentes diferencias entre capas simplemente reflejan el grosor de las capas. (B) Distribución laminar de neuronas inmunomarcadas en el giro dentado. Convenciones gráficas igual que para A. Debido a sus características de localización y fuerte inmunomarcado, las células en cesto se distinguen aquí como una capa celular diferente (“Basket C”). Para otras abreviaturas celulares, véase la Lista. (D) Análisis de colocalización entre Reelina y GABA en las células de la isocorteza. En paralelo, barras para cada marcador, la gráfica muestra la proporción de colocalización (como un porcentaje) respecto a un máximo de 100%. Los datos se han tomado tanto de la corteza en su conjunto (“Global”, fila superior) y para cada capa cortical. Las barras en negro representan el porcentaje de células ReIn-ir colocalizando con el inmunomarcado para GABA. Las barras en gris representan la proporción porcentual de células GABA que colocalizan con ReIn. Nótese que, para cada fila, el espacio en blanco que se extiende hasta el margen (100%) se mantiene para la proporción de células inmunorreactivas correspondiente para cada marcador que no colocaliza con el otro. Sólo alrededor del 20% de las células marcadas para Reelina colocalizan con GABA. Por el contrario, la proporción de células GABA-ir se mantiene igual (alrededor del 45%) para el resto de las capas (II-III, IV y VI). Junto con los datos mostrados en A, estos resultados muestran que la capa V contiene una gran población específica en cada capa de células GABA que contienen Reelina. Como control significativo interno, la colocalización entre GABA y Reelina es virtualmente completa en células de capas tales como capa I (“I”) o la capa subgrísea y sustancia blanca intersticial (“VII-WM”). (E) Análisis de colocalización entre GABA y ReIn en células de CA1 y CA3 del cuerno de Ammon. Misma convención que para D. Para abreviaturas, ver Lista. Las células ReIn-ir y GABA-ir son la misma población de células; por el contrario, el strata hipocampal contiene significativas poblaciones celulares de neuronas GABA-ir que no contienen Reelina. (F) Análisis de colocalización entre inmunorreactividades para Reelina y GABA en el giro dentado. Misma convención gráfica que en D. (G) Análisis de colocalización entre inmunorreactividades para Reelina y GABA en núcleos talámicos. La proporción de colocalización en cada núcleo se muestra separadamente. Debido a que las diferencias en las proporciones de colocalización son extremas, y la distribución de las células inmunorreactivas a Reelina y GABA es altamente anisotrópica, no hay datos conjuntos de los distintos núcleos en una proporción global para el tálamo en su conjunto. Otras convenciones como en D. Para abreviaturas, ver List



La mayoría de las células en el núcleo de la habénula medial es fuertemente Reln-ir (Fig. 25 B). Una población Reln-ir está también presente en los núcleos laterales, aunque la mayoría de las células en este núcleo no están marcadas. El tracto habénulo-interpeduncular muestra un tenue marcaje que, al examinarse a gran aumento, tiene una apariencia similar a la observada para el LOT y el fascículo

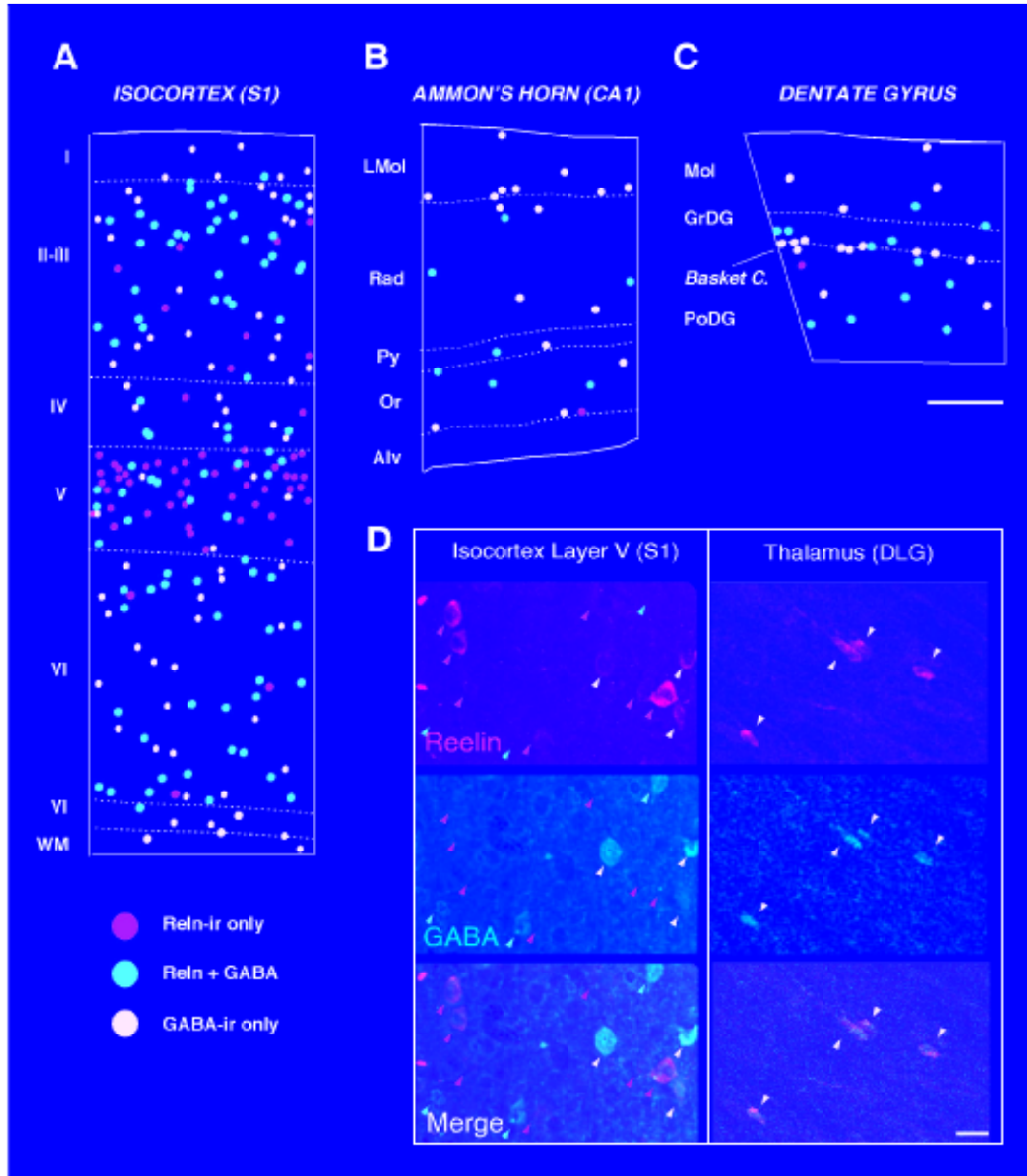


Figura 23. (Página siguiente) **Colocalización entre Reelina y GABA en la corteza cerebral y tálamo.** (A-C) Representación de células inmunomarcadas para Reelina y GABA (círculos en amarillo), células marcadas exclusivamente para Reelina (círculos en azul) y células exclusivamente GABA-ir (círculos en rosa) en ejemplos representativos del isocortex: (A), área CA1 del hipocampo (B) y estrato suprapirámido del giro dentado (C). Nótese en A cómo la población de células Reelin-ir que no contienen GABA se concentra preferentemente en capa V. Nótese también la alta prevalencia de neuronas colocalizando ambos marcadores en células de la capa subpial de las tres áreas. (D) Se muestran cuatro ejemplos de secciones ópticas de confocal de 4 μm de grosor de capa V de isocorteza parietal (columna de la izquierda) y del núcleo talámico geniculado lateral (columna de la derecha). Se muestra la comparación de estas imágenes obtenidas en distintas longitudes de onda (Reelina, cabezas de flecha azules; GABA, cabezas de flecha rosa) en el ejemplo de capa V de la isocorteza. Las cabezas de flecha en amarillo indican la colocalización celular de ambos marcadores. La morfología piramidal de lagunas de las células Reelin-ir se evidencia en este tipo de secciones ópticas. Nótese que todas las células marcadas en el geniculado lateral dorsal colocalizan GABA y Reelina. Barra de calibración, 20 μm .

angular (Fig. 25 C y 26 B). Interesantemente, el neuropilo del núcleo interpeduncular (Fig. 27 A), que es la principal diana de estos axones, es marcadamente ReIn-ir.

Las neuronas marcadas son muy numerosas en varias estructuras pretalámicas (antes conocidas como el “tálamo ventral”, ver Puelles y Rubenstein, 2003), así como en varios núcleos hipotalámicos. El núcleo de la estría medular contiene un grupo de células ReIn-ir estrechamente agrupadas. Una población de pequeñas células ReIn-ir tenues se encuentran dispersas a lo largo del borde interno entre la lámina medular externa y el núcleo reuniens ventral (Figs. 25 A y B); por el contrario, el núcleo talámico reticular carece de marcaje. En la zona inzerta dorsal, campos de Forel y el núcleo entopeduncular se encuentran dispersas células débilmente marcadas. La mayoría de las células en el núcleo geniculado lateral ventral son ReIn-ir; curiosamente, las células en su subnúcleo magnocelular están más marcadas que aquéllas localizadas en el subnúcleo parvocelular o en la hoja entre geniculados (Fig 25 C). El doble marcaje para Reelina y GABA (Fig 22 C) revela que en este núcleo la colocalización es, virtualmente, total.

Los núcleos hipotalámicos paraventriculares se encuentran delineados por una fuerte tinción de las neuronas en la parte dorsal y lateral de sus subdivisiones magnocelulares (Fig. 25 B). Otros subnúcleos están libres de neuronas marcadas. La transición entre el hipotálamo posterior y el mesencéfalo (“PH” en Fig. 25 C) contiene una población de células fuertemente ReIn-ir. Las áreas hipotalámicas lateral y dorsal, sin embargo, contienen sólo neuronas ReIn-ir dispersas, la mayoría de las cuales están débilmente teñidas.

La región pretectal muestra una extensa inmunotinción para Reelina, y todos sus núcleos contiene numerosos somas ReIn-ir. El marcaje en el núcleo de la oliva es remarcable: virtualmente todas sus neuronas están fuertemente marcadas, y su neuropilo está fuertemente inmunomarcado (Fig. 25 C y F).

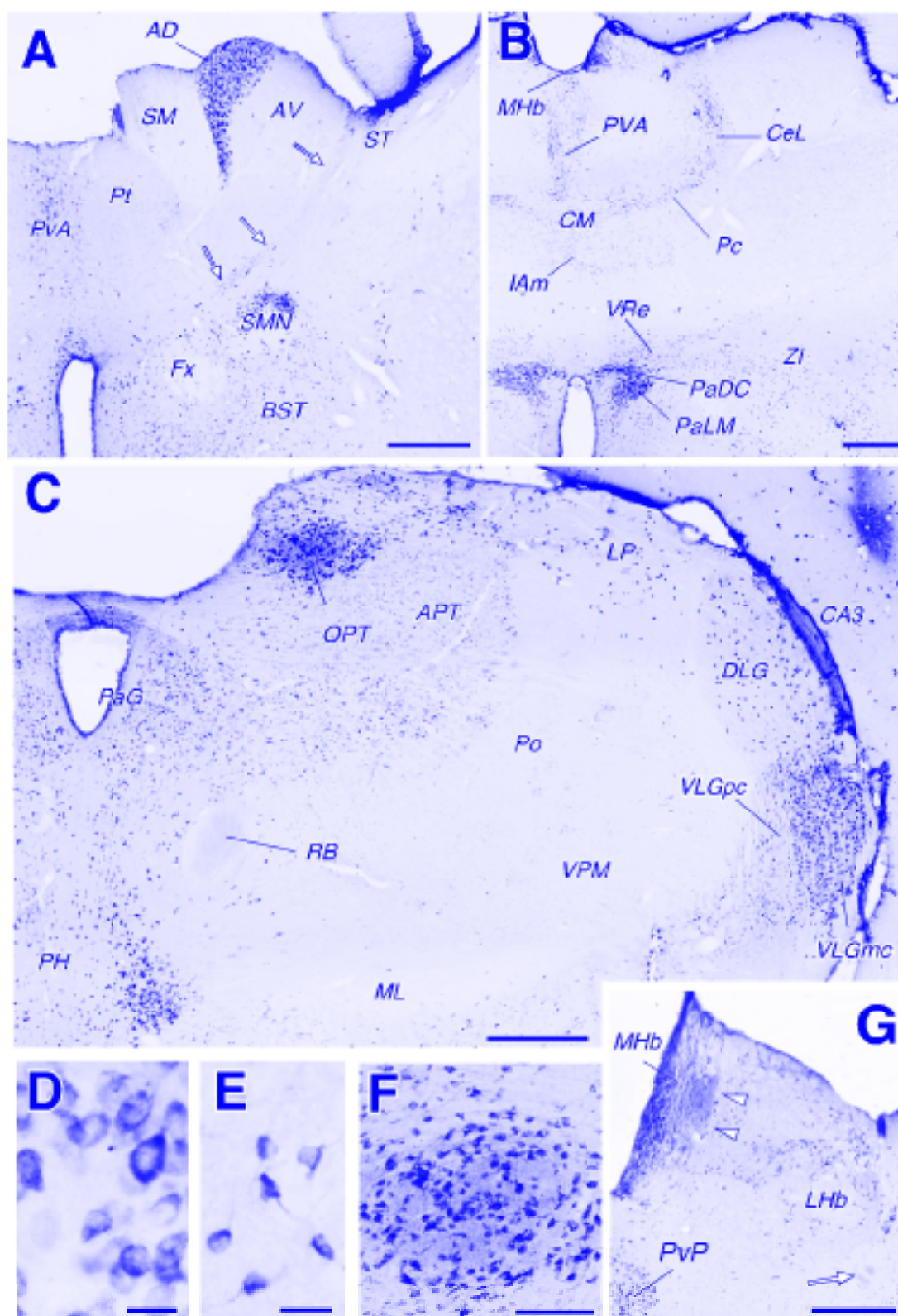


Figura 25. Inmunomarcaje en el diencefalo. (A-C) Panorámicas tomadas a bajo aumento de secciones coronales tomadas desde el polo rostral del tálamo (A, aproximadamente en bregma -1.10), así como a otros dos niveles (B, bregma - 1.80 mm; C, bregma - 4.50 mm). Nótese en A los somas neuronales marcados en los núcleos talámicos anterodorsal (AD) y anterior paraventricular (PvA), y en el núcleo de la estría medular (SMN). Una población de células ReN-ir ubicada en la lámina medular externa se indica mediante flechas. A pesar de su discreta apariencia en el adulto, esta población neuronal es un

remanente de la zona limitans intratálamica durante el desarrollo (Alcántara y cols., 1998). Nótese en C que numerosos somas ReIn-ir están dispersos por los núcleos geniculado lateral dorsal (DLG) y lateral posterior (LP), aunque están prácticamente desaparecidos en los grupos talámicos del ventrobasal (VB) y posterior (Po). Un gran número de células están marcadas en los núcleos del pretecho (APT, OPT), en el hipotálamo posterior (PH) y sustancia gris periacueductal (PaG), así como en el geniculado ventral lateral, particularmente en su parte magnocelular (VLGmc). Los axones del tracto habenulo-interpeduncular también están inmunomarcados; mediante comparación, nótese la ausencia del marcaje en el lemnisco medio (ML). (D) Somas reactivos en el núcleo talámico AD a gran aumento. (E) Células reactivas del DLG a gran aumento. Comparadas con las células del panel anterior (D, a la misma escala), las células del DLG son claramente más pequeñas, dato consistente con los resultados de la inmunofluorescencia doble para ReIn y GABA en el tálamo (Fig. 5). (F) Detalle del marcaje en el núcleo de la oliva en el pretecho (OPT). Nótese que, añadido a sus somas, el neuropilo de OPT es altamente inmunorreactivo. (G) Marcaje en el complejo olivar. Añadido a sus numerosos somas, nótese el fuerte marcaje de algunos haces de axones del trato interpeduncular (flecha). Hay un denso neuropilo reactivo en una porción del núcleo medial de la habénula (puntas de flecha). Para otras abreviaturas, véase Lista. Barras de calibración, 500 μm (A-C y G); 20 μm (D y E); 100 μm (F).

I.1.4 Inmunorreactividad de Reelina en el tronco y en retina.

Entre las regiones del tronco, el techo mesencefálico y la corteza cerebelosa existe una amplia y fuerte inmunotinción de Reelina. Por el contrario, la inmunorreactividad en el puente y bulbo raquídeo está limitado a grupos aislados de células débilmente marcadas.

En el colículo superior es visible un gran número de células ReIn-ir. La mayoría de las neuronas están fuertemente marcadas en el estrato superficial del colículo superior (Fig. 26 B y C). Además, el estrato gris superficial muestra un neuropilo fuertemente ReIn-ir. A mayor resolución, este marcaje consiste en una tinción amorfa y de numerosas neuritas visibles gracias a sus corpúsculos inmunorreactivos. La distribución del neuropilo marcado se corresponde con el patrón de terminación de los axones retinotectales (Sefton y Dreher, 1994; Sakakibara y cols., 2003). Además, tanto las neuronas de los núcleos del tracto óptico accesorio como su neuropilo es ReIn-ir (Fig. 26 B). Estas observaciones nos llevaron a examinar el inmunomarcaje en la retina en rata adulta (Fig. 26 D). Una considerable población de los somas de las células ganglionares de retina, con sus dendritas proximales y sus segmentos iniciales del axón, son ReIn-ir. Además, algunos somas celulares presentan una débil tinción en la capa nuclear interna. Una banda prominente de neuropilo fuertemente reactivo delimita la IPL. Las capas restantes de la retina presentan ausencia de marcaje.

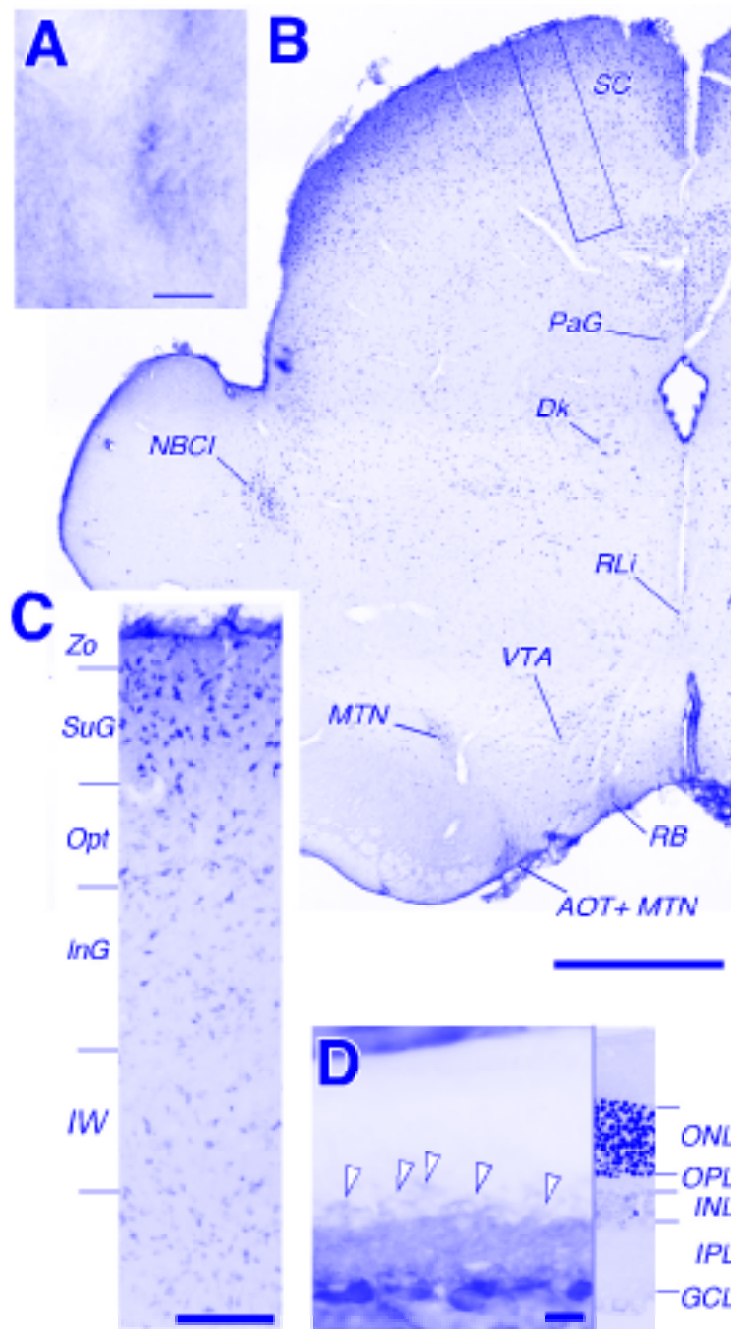


Figura 26. Inmunotinción para Reelina en el mesencéfalo y retina. (A-C) Marcaje en el mesencéfalo rostral. La vista panorámica de una sección coronal (B) a la altura de los colículos superiores muestra numerosos somas y áreas de neuropilo que contienen Reelina. Hay también algunos axones reactivos en el tracto habenulo-interpeduncular (RB); apariencia a mayor aumento de los axones mostrados en A. El colículo superior (SC) está discretamente marcado. Una vista en más detalle de sus capas superiores se ilustra en C. Nótese los somas más intensos se localizan en el estrato zonal (Zo) y el estrato griseum superior (SuG). Además, el neuropilo es fuertemente inmunorreactivo en estas dos capas más superficiales del SC. Grupos adicionales de neuronas Reeln-ir son visibles en el núcleo del brachium del colículo inferior (NBCI), y núcleos de Darkewitsch (Dk) y rafe (RLi). Nótese también el marcaje en el núcleo terminal medial del tracto óptico accesorio y en las fibras de la retina del tracto óptico accesorio (AOT, MTN). (D) Inmunotinción en una sección coronal de la retina. Para referencias citoarquitectónicas, se muestra una sección semifina en paralelo teñida con azul de tolouidina a la derecha del panel. Nótesen los numerosos somas neuronales Reeln-ir en la capa ganglionar (GCL). Algunas células también presentan un débil marcaje en el citoplasma en la capa nuclear interna (INL, puntas de flecha). Una gruesa banda de neuropilo delimita la capa plexiforme interna (IPL). Barras de calibración, 10 μ m (A); 1 mm (B); 100 μ m (C).

El colículo inferior contiene numerosas neuronas marcadas (Fig. 27 A-C). En su mayoría, son más abundantes y están más fuertemente marcadas en la corteza del colículo. La sustancia gris periacueductal también contiene células ReIn-ir, y según nos acercamos a sus porciones dorsales son más numerosas. Asimismo, las grandes neuronas del cercano núcleo de Darkewisch son fuertemente ReIn-ir, y un gran número de neuronas ReIn-ir están presentes en los núcleos del rafe (Fig. 26 B y 27 A, D y E). Algunos núcleos laterales del tegmento relacionados con las vías auditivas, como los núcleos del lemnisco lateral y el núcleo del brachium del colículo inferior (Fig. 26 A), también contienen células débilmente ReIn-ir. El resto de las áreas del tegmento mesencefálico no presentan marcaje o contienen sólo algunas ocasionales células inmunorreactivas.

El núcleo principal del complejo del trigémino y otros núcleos sensoriales y motores craneales carecen de inmunomarcaje. Sin embargo, la porción caudal del núcleo del trigémino a nivel bulbar muestra una débil pero consistente tinción de numerosas células en la subcapa superficial del núcleo, adyacente a las fibras del tracto del trigémino-espinal (Fig. 27 J y K). Además, las células ReIn-ir más evidentes en el bulbo se encuentran en el núcleo reticular ventrolateral: se encuentran células dispersas en el núcleo reticular lateral y núcleos del rafe.

La corteza cerebelosa muestra un neuropilo fuertemente reactivo en la capa molecular y un denso marcaje en la capa de células granulares (Fig. 27 H e I). En la capa molecular se encuentran adicionalmente somas marcados débilmente. Las células de Purkinje y la sustancia blanca cerebelosa no contienen marcaje.

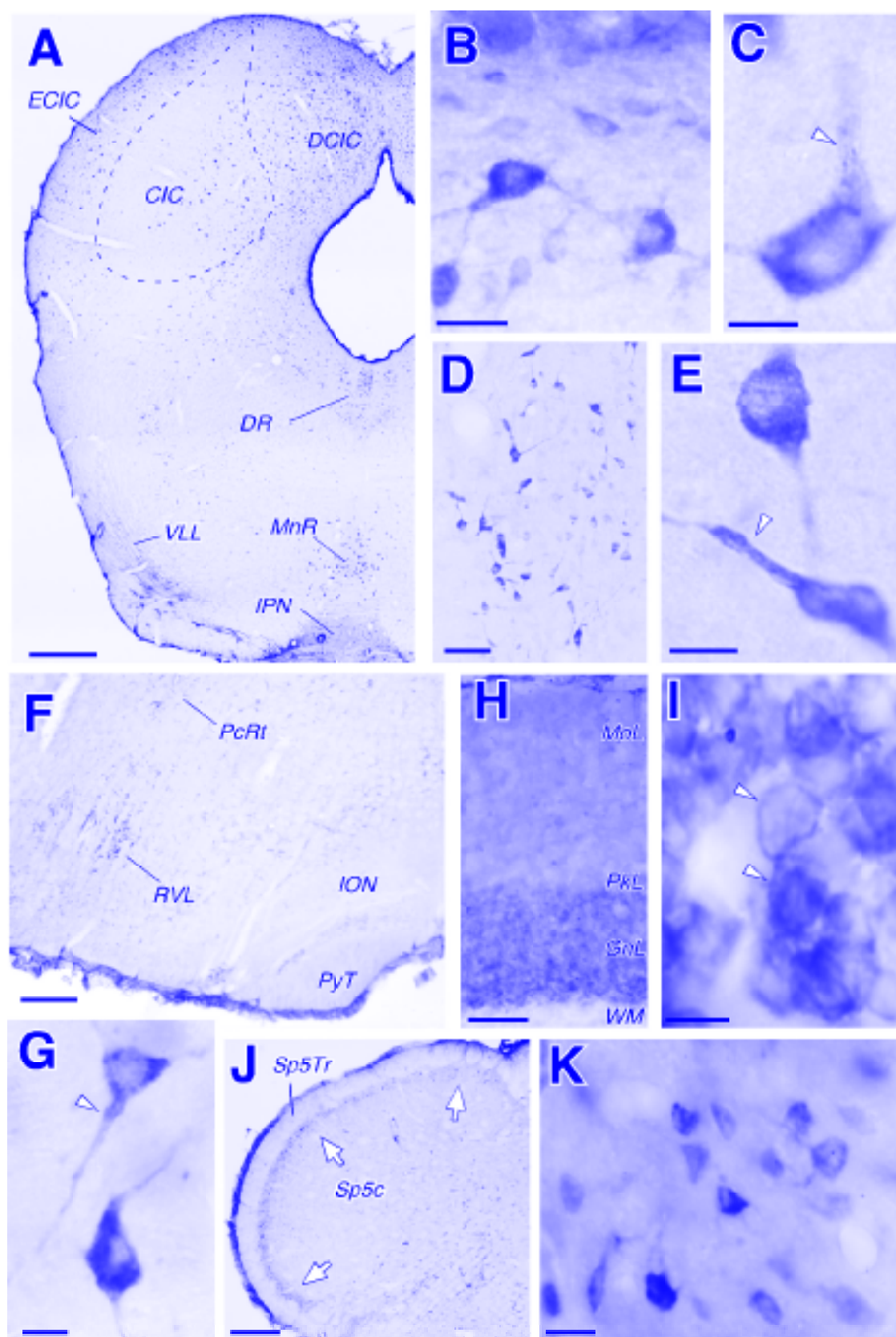


Figura 27. Inmunotinción de Reelina en tronco y cerebelo. (A) Sección coronal a la altura del colículo inferior. Nótese los abundantes somas celulares marcados en corteza externa (ECIC) y corteza dorsal (DCIC) del colículo. (B) Células y neuropilo inmunorreactivos en ECIC. (C) Grandes células multipolares del DCIC. Nótese que, al igual que ocurría en las células reactivas en el telencéfalo, estas neuronas contienen intracelularmente grupos de partículas Reeln-ir en el pericarion y en dendritas

proximales (cabezas de flecha). (D y E) Marcaje en el núcleo medial del rafe. Grupos de partículas alargadas ReIn-ir se localizan en el pericarion y las dendritas de las neuronas (cabezas de flecha en E). (F) Marcaje en la parte ventral del bulbo. Un destacado grupo de neuronas ReIn-ir son visibles en el núcleo reticular lateral ventral (RVL). Nótese la ausencia de marcado en el núcleo de la oliva inferior (ION). (G) Detalle de dos neuronas del RVL. (H e I) Inmunomarcaje de la corteza cerebelosa. Un neuropilo intensamente marcado está presente en la capa molecular (Mol). Las células de Purkinje (PKL) carecen de Reelina, aunque virtualmente todas las células de la capa granular (GnL) son inmunorreactivas. (I) Ejemplo del marcaje citoplasmático de estas células granulares. (J y K) Somas neuronales y neuropilo reactivos (flechas) en la capa superficial del núcleo espinal del trigémino (Sp5c). (K) Neuronas ReIn-ir de esta capa a mayor aumento, rodeadas de abundante inmunomarcaje extracelular. Para otras abreviaturas, véase Lista. Barras de calibración, 500 μm (A y F), 20 μm (B); 10 μm (C, E, G y K); 50 μm (D y H); 100 μm (J); 5 μm (I).

I.1.5 Inmunorreactividad de Reelina en el isocortex y la formación hipocamapal.

Los somas neuronales muestran diferentes intensidades de inmunotinción en todas las capas del isocortex. En la lámina subgrísea (capa VII) se encuentran células ReIn-ir dispersas. La prevalencia de células ReIn-ir en las capas corticales muestra ligeras diferencias entre los campos citoarquitectónicos (Fig. 21 A). Un débil nivel de marcaje aparece a través de la materia gris; este marcaje es mucho más intenso en la parte externa de la capa I, cerca de la piamadre.

La subcapa Ia del isocortex contiene sólo neuronas fuertemente marcadas (diámetro del soma de 15-30 μm) de forma multipolar, pero sin una orientación definida de su dendrita (Fig. 21 B). El soma de unas pocas de estas neuronas se encuentra localizado en la superficie del cortex, justo bajo la pía. Tanto la subcapa Ib como las capas I-VII contienen varios tipos de pequeñas células (diámetro de 7-15 μm) débilmente teñidas, y células de tamaño medio (15-30 μm de diámetro) intensamente teñidas que recuerdan a las interneuronas de soma bipolar o multipolar (Fig. 21 D).

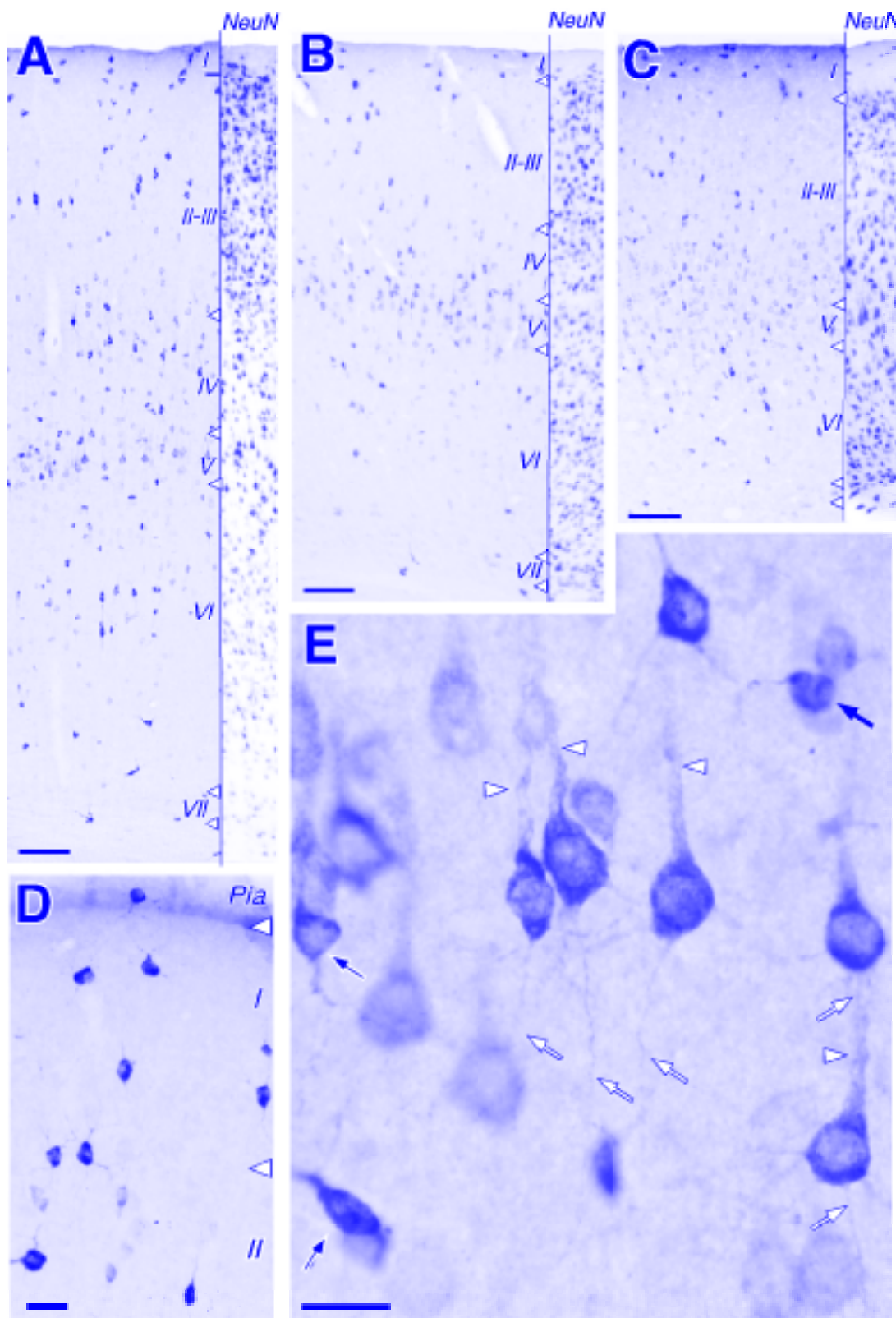
Además, numerosas neuronas piramidales de capa V en todas las áreas corticales son ReIn-ir (Fig. 21 A). En conjunto, la mayoría de estas células piramidales presentan un marcaje de intensidad débil a moderada. En áreas con una bien diferenciada capa V, como la corteza sensorial somática y motora, las células más intensamente marcadas se localizan preferentemente en la subcapa Va. Células piramidales más tenues están presentes en la capa III de algunas áreas dorsomediales como la corteza cingular (Fig. 21 A). La apariencia del marcaje a mayor aumento en los somas de estas células piramidales es idéntico al que poseen las otras células ReIn-

ir en todo el cerebro: irregular y corpusculado, y siempre ausente del núcleo celular, indicando su localización intracelular (Fig. 21 E). Algunos de estos grumos se extienden hasta 50 μm dentro del tallo de la dendrita apical. En conjunto, este patrón es consistente con la apariencia al microscopio óptico del retículo endoplasmático y las cisternas del Golgi de células piramidales corticales (De Camilli y cols., 1986; Martínez-Cerdeño y cols., 2002).

El tamaño y la morfología de las neuronas de capa V evidencia que la mayoría de ellas son células piramidales. Sin embargo, debido a que la inmunotinción no revelaba todo su árbol dendrítico, realizamos una doble tinción para Reelina y GABA en secciones únicas. El análisis de este material (Figs. 22 A y D, y 23 A y D) reveló que mientras que alrededor del 90 % de las células ReIn-ir colocalizaban con GABA en todas las capas corticales, sólo alrededor del 20 % de las células ReIn-ir colocalizaban con GABA en capa V. Estas observaciones confirmarían que numerosas células piramidales no GABAérgicas de capa V contienen Reelina intracelular. Por otra parte, el análisis de la doble tinción reveló que la colocalización es virtualmente completa en capas I y VII, pero no en otras capas.

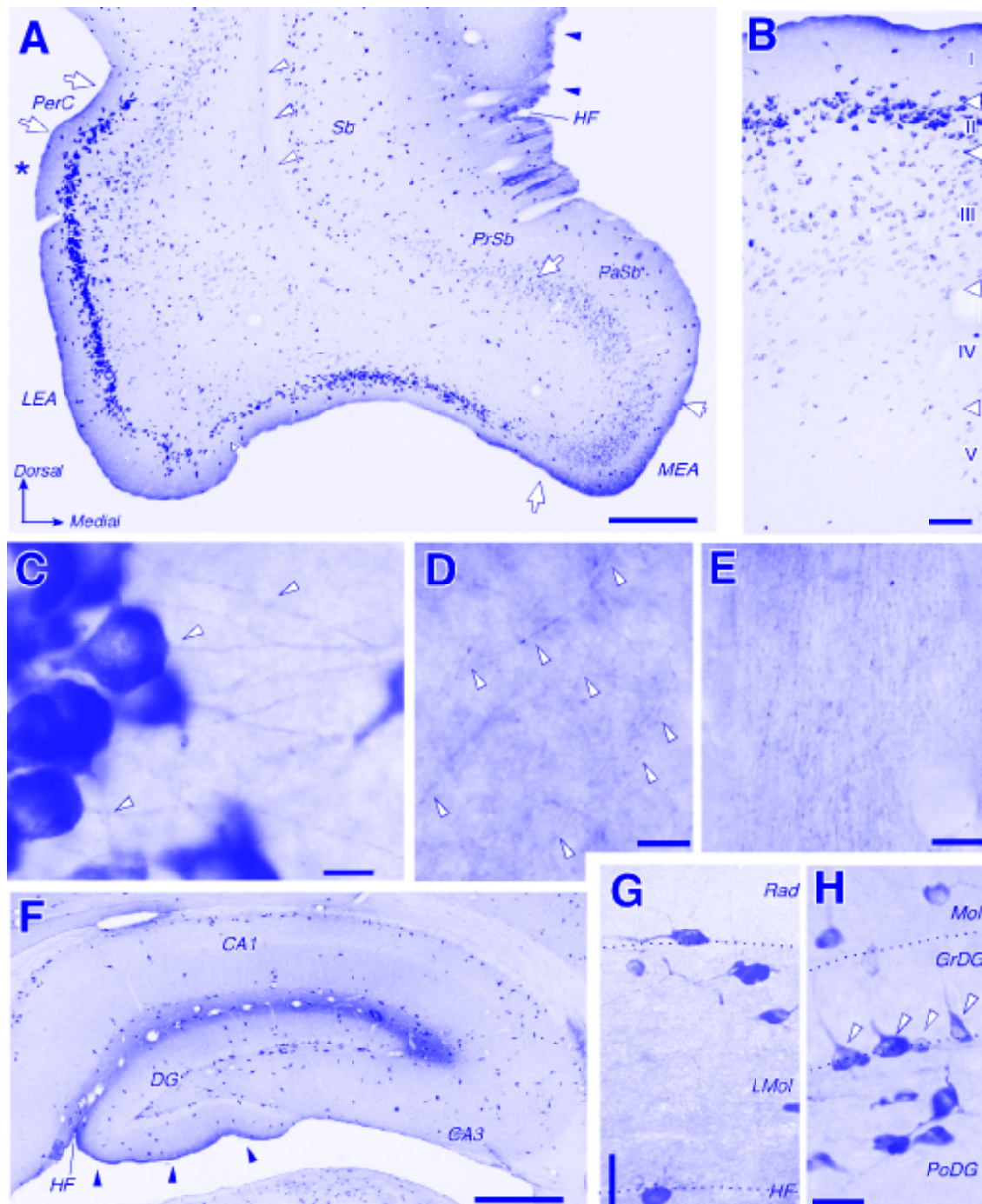
La capa I de las áreas entorrinales contiene un marcado menor número de células ReIn-ir que la capa I de las áreas subcorticales o subiculares. La comparación con secciones paralelas inmunoteñidas con NeuN (no mostrado) parece indicar que esta diferencia refleja simplemente el menor número de neuronas que hay en conjunto en capa I de la corteza entorrinal comparada con la de la isocorteza. En el área entorrinal lateral (LEA), gran número de células piramidales de capa II son fuertemente ReIn-ir (Fig. 24 A-C).

Figura 21. (Página siguiente). **Inmunotinción de Reelina en la corteza cerebral.** (A-C) Ejemplos de secciones coronales del área somatosensorial primaria (A), área visual primaria (B) y corteza cingular (C). Para su comparación citoarquitectónica se muestra una sección adyacente inmunoteñida para NeuN alineada a la derecha de cada una. Nótese que los somas reactivos para Reelina se encuentran en todas las capas corticales, bastante más numerosos en la capa V, así como en la sustancia blanca subcortical. Un neuropilo tenuemente marcado se observa a través de la sustancia gris cortical, haciéndose más evidente en la parte externa de capa I, cerca de la superficie pial. Este marcaje no es un artefacto de borde del precipitado de DAB; compárese por ejemplo con el tejido reactivo para NeuN. El neuropilo marcado de capa I se hace particularmente en la corteza cingular. (D) Detalle del marcaje en las capas superficiales de la corteza somatosensorial. Nótese las neuronas de morfología multipolar o fusiforme fuertemente marcadas en estas capas. (E) Neuronas de capa V a mayor aumento en la corteza somatosensorial. Numerosas células piramidales de gran tamaño presentan inmunomarcaje intracitoplasmático que delinea el núcleo celular y se extiende hacia las dendritas proximales (cabezas de flechas) así como al axón (flechas en blanco). Algunas interneuronas de capa V también son reactivas a Reelina (flechas en negro). Para abreviaturas, ver Lista. Barras de calibración, 250 μm (A-C); 20 μm (D y E).



La contratincción con tionina reveló que, en efecto, virtualmente todas las células en capa II eran ReIn-ir. Las células piramidales de capa III están también marcadas, aunque con menor intensidad (Fig 24 A y B). En la profundidad de la corteza del LEA, las neuronas inmunomarcadas son menos numerosas y están más dispersas. Además, todas las capas del LEA contenían otras neuronas marcadas con una forma multipolar o fusiforme. El marcaje del neuropilo está presente en la parte superficial la capa I del LEA, que es un área terminal de los axones que conforman el LOT (Price, 1973). A diferencia del LEA, las células piramidales en la capa II del área entorrinal medial (MEA) muestran uniformemente una intensidad tenue de tinción en los somas (Fig. 24 A). Los axones de las células de capa II de la corteza entorrinal muestran el mismo tipo de marcaje en corpúsculos descrito anteriormente para los axones de las células mitrales. A pesar de la naturaleza relativamente débil y discontinua de este marcaje, y del hecho de que no utilizamos intensificación con metal en el revelado con DAB, es posible seguir estos axones, a 1000 X, hasta entrar en la sustancia blanca y llegar a su convergencia en el fascículo angular y su entrada en el subículo (Fig 24 C y E).

Figura 24. (Página siguiente) **Inmunotinción para Reelina en la corteza parahipocampal e hipocampo.** (A) Vista panorámica del área hipocampal y áreas adyacentes en una sección coronal que dista aproximadamente de bregma – 6.33 mm. Las flechas en blanco indican los bordes de área. Las cabezas de flecha indican los axones marcados an el haz angular bajo el subículo (Sb, detalle en E). Nótese la distribución heterogénea y la intensidad de tinción de las poblaciones neuronales ReIn-ir en varias áreas. El marcajes del neuropilo es visible en la capa I de las áreas entorrinales (LEA y MEA). (B) Detalle del inmunomarcajes en la corteza entorrinal lateral (LEA). Nótese que la mayoría de las células piramidales de capa II y III contienen Reelina. (C) Detalle a mayor aumento del inmunomarcaje en somas y axones (cabezas de flecha) de neuronas de proyección de la capa II del LEA. (D y E) Detalle a mayor aumento del inmunomarcaje en supuestos axones entorrinales provenientes de capa II que corren en capas profundas del área entorrinal lateral (D, puntas de flechas) y en el haz angular bajo el subículo (E, compárese con las puntas de flechas en A). (F) Vista panorámica del marcaje en el hipocampo dorsal, tomado de una sección coronal que dista aproximadamente -4.30 de bregma. Nótese la fuerte inmunorreactividad que presentan las neuronas en los estratos oriens, lacunoso-molecular y radiado del cuerno de Ammon (CA1, CA3) y en el hilo del giro dentado (DG). Además de somas marcados, hay una banda muy bien delimitada por un neuropilo fuertemente reactivo a través del estrato lacunoso-molecular de CA y el tercio superior de la capa molecular de DG. Este marcaje en el neuropilo está presente tanto en el estrato suprapiramidal (dentro de la fisura del hipocampo –HF-, delimitada por los vasos sanguíneos) como en el infrapiramidal (cabezas de flecha) del DG. El neuropilo marcado corresponde a la conocida distribución terminal de los axones de las neuronas de proyección del LEA. Un marcaje similar, aunque menos intenso, puede observarse alrededor del HF en A. (G) Detalle de CA1. Células ReIn-ir se localizan preferentemente cerca del borde entre el estrato lacunoso-molecular (LMol) y el radiado (Rad). (H) Detalle de las células marcadas en DG. Interneuronas de gran tamaño contienen Reelina en las capas polimórfica (PoDG), granular (GrFD) y molecular (Mol) de estas áreas; sin embargo, las células granulares no contienen Reelina. Las cabezas de flecha marcan las grandes células en cesto dispuestas a lo largo del borde de GnFD y PoDG. Para otras abreviaturas, véase la Lista. Barras de calibración, 500 μ m (A y D); 100 μ m (B); 10 μ m (C y E); 25 μ m (G y H).



Resulta muy llamativo que el área donde terminan estos axones en el hipocampo (la parte superficial de la capa molecular del giro dentado (DG) y el estrato lacunoso-molecular del cuerno de Ammon (CA); Amaral y Witter, 1994) está delimitado por una banda de neuropilo fuertemente inmunorreactivo (Fig. 24 F). Se debe recordar que los axones de las neuronas en la capa III del LEA están también proyectando al estrato lacunoso-molecular del CA (Deller y cols., 1996). Tomadas en su conjunto, estas observaciones indican que la vía entorrino-hipocampal (células de

origen, axones y neuropilo terminal) presentan una fuerte inmunotinción en roedores adultos.

La mayoría de las células piramidales en el estrato piramidal del pre- y parasubiculo son ReIn-ir. Además, algunas células con forma de interneurona se localizan en la capa I y, aunque menos frecuente, también en el estrato piramidal de estas áreas (Fig. 24 A). Propiamente en el subículo, las células piramidales no están marcadas.

Las células piramidales en los campos del CA del hipocampo (CA1-CA3) no están marcadas. Estas áreas contienen, sin embargo, varias poblaciones de interneuronas multipolares o bipolares fuertemente inmunoteñidas, generalmente mostrando marcaje en sus dendritas proximales (Fig. 24 F-H). La distribución laminar de células ReIn-ir es muy heterogénea en CA1-CA3 (Fig. 24 F y G). Numerosas células están marcadas a lo largo del borde entre el estrato oriens y el lacunoso-molecular, así como en la profundidad de la parte profunda del estrato oriens. El estrato radiato y piramidal presenta células adicionales dispersas. La doble inmunotinción de Reelina y GABA reveló que virtualmente todas las células en el estrato lacunoso-molecular colocalizan ambos (Figs 22 B y E, y 23 B).

En el DG, varias poblaciones de interneuronas son también ReIn-ir; sin embargo, no hay marcaje en las células granulares (Fig. 24 F y H). Una gran población de células en cesto presentan fuerte inmunorreactividad. La colocalización de GABA y Reelina es virtualmente completa en las células en cesto (Fig. 22 C y F, y 23 C). La capa molecular del DG contiene relativamente pocas neuronas marcadas. Como se mencionó anteriormente, una banda de neuropilo fuertemente teñido cubre la parte externa de la capa molecular del DG y del estrato lacunoso-molecular del CA (Fig. 24 F). La apariencia a alta resolución de este marcaje del neuropilo reveló de nuevo una tinción amorfa y numerosas filas de partículas en forma de corpúsculos dispuestos en hilera que interpretamos como neuritas marcadas.

I.6 Depósitos de FastBlue e inmunofluorescencia para Reelina colocalizando con somatostatina, calbindina y calretinina.

Para clarificar de forma cuantitativa el tipo de interneurona que pudiera proyectar a capa I y así, pudiera estar secretando Reelina a su matriz extracelular, se conjugó la batería de anticuerpos anti-SOM, anti-CB y anti-CR con el anticuerpo para Reelina (ver Material y Métodos, protocolos 8, 10, 12) junto con el trazador FB.

El análisis del material revela que en todas las capas corticales se encuentran células SOM+ (presuntas células de Martinotti) que contienen Reelina. Sin embargo, en nuestro análisis con FB, las células FB+ SOM+ ReIn+ se encuentran preferentemente en capas II-III y V. De igual forma, las células FB+ CB+ que contienen Reelina también parecen localizarse en capas II-III y V, aunque en mayor número total que las células FB+ SOM+ ReIn+ (Fig. 28). Puede que este aumento en el número de células FB+ CB+ ReIn+ sea debido a que parece que no sólo las células GABAérgicas pueden contener CB (ver apartado II.3.3 de Resultados), sino que hay células piramidales q pudieran ser CB+ y que, a su vez, pudieran contener ReIn (DeFelipe , 1997; Hof y cols., 1999).

Como para los marcadores anteriores, en todas las capas corticales de las tres cortezas analizadas se pueden localizar células CR+ que colocalizan ReIn. Pero, en líneas generales, las células que parece que llegarían a capa I (FB+ CR+ ReIn+) se localizan en capas II-III, a poca distancia de capa I. Sólo aparecen somas FB+ CR+ ReIn+ localizados en capa V en el análisis del área cortical V1 (Fig. 28).

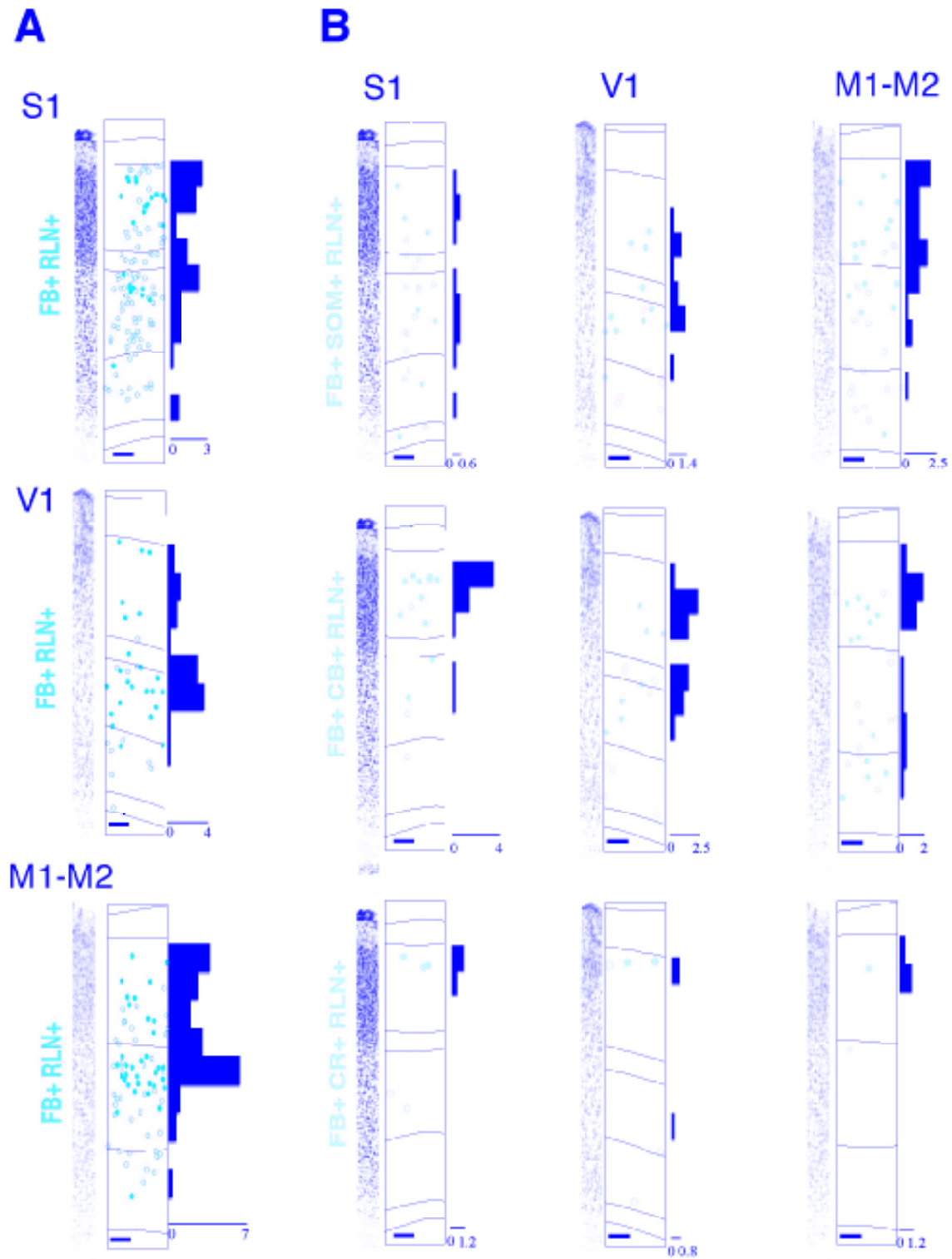


Figura 28. A. Representación de inmunofluorescencia simple para Reelina (RLN) sobre secciones de tejido con depósitos de FB. Cada célula inmunorreactiva es un círculo. Si además es FB+ el círculo se representa relleno. Para cada tipo de corteza la gráfica representa la media de células FB+ RLN+ (para cuatro casos por cada tipo de corteza) según su distancia a capa I. Barra de calibración: 100µm. B. Representación de inmunofluorescencia doble para Reelina (RLN) y SOM; RLN y CB; y RLN y CR sobre secciones de tejido con depósitos de FB. Cada célula inmunorreactiva es un círculo. Si además es FB+ el círculo se representa relleno. Las gráficas adyacentes representan la media de células FB+ RLN+ SOM+ / FB+ RLN+ CB+ / FB+ RLN+ CR+ para cuatro casos por tipo de corteza según su distancia a capa I. Barra de calibración: 100µm.

II. COMPOSICIÓN DEL NEUROPILO. EXPERIMENTOS DE DEPÓSITOS EPIPIALES EN LA CORTEZA CEREBRAL.

Para la identificación de las neuronas corticales y subcorticales no talámicas que inervan directamente la capa I de la corteza cerebral hemos realizado una serie de depósitos epipiales del trazador retrógrado FB restringidos a pequeñas regiones corticales, explorando las áreas corticales somatosensorial (S1), visual (V1) y motora (M1-M2). No tenemos entre los casos válidos ningún experimento que explore selectivamente otras áreas corticales.

Primero hemos querido estudiar cuantitativa y cualitativamente el origen de los aferentes de larga distancia a capa I. Pasaremos a describir el origen de los aferentes cortico-corticales ipsilaterales a capa I y su naturaleza bioquímica. A continuación, describiremos el origen y la naturaleza de los aferentes a capa I desde estructuras subcorticales no talámicas. Por último, estudiaremos la identidad y naturaleza de los aferentes corticales a corta distancia a capa I.

II.1 Aferentes cortico-corticales ipsilaterales a capa I.

La Figura 30 muestra representaciones planas de la capa I de la corteza cerebral de rata, con los límites entre distintas áreas corticales (véase Figura 13 de Material y Métodos), sobre la que hemos dibujado la localización y extensión de los depósitos analizados en esta Tesis, y en las que se ilustra la localización cortical de las neuronas ipsilaterales que inervan cortico-corticalmente a larga distancia el área representada en color azul de capa I. Se diferencian en la representación los somas localizados en capas superiores (II-III) de las localizadas en capas inferiores (V-VI). La zona en azul oscuro representa la zona donde el trazador penetra algunas decenas de micras en la capa I, siendo evidente una impregnación intensa del neuropilo de esta capa.

Se escogieron algunos cortes en los que se estudió la colocalización entre FB y el neurotransmisor inhibitorio GABA. Se analizaron áreas corticales adyacentes al depósito y áreas más alejadas. No se encontraron células en ninguno de estos casos que contuvieran GABA y que proyectaran a capa I. Véase Figura 29.

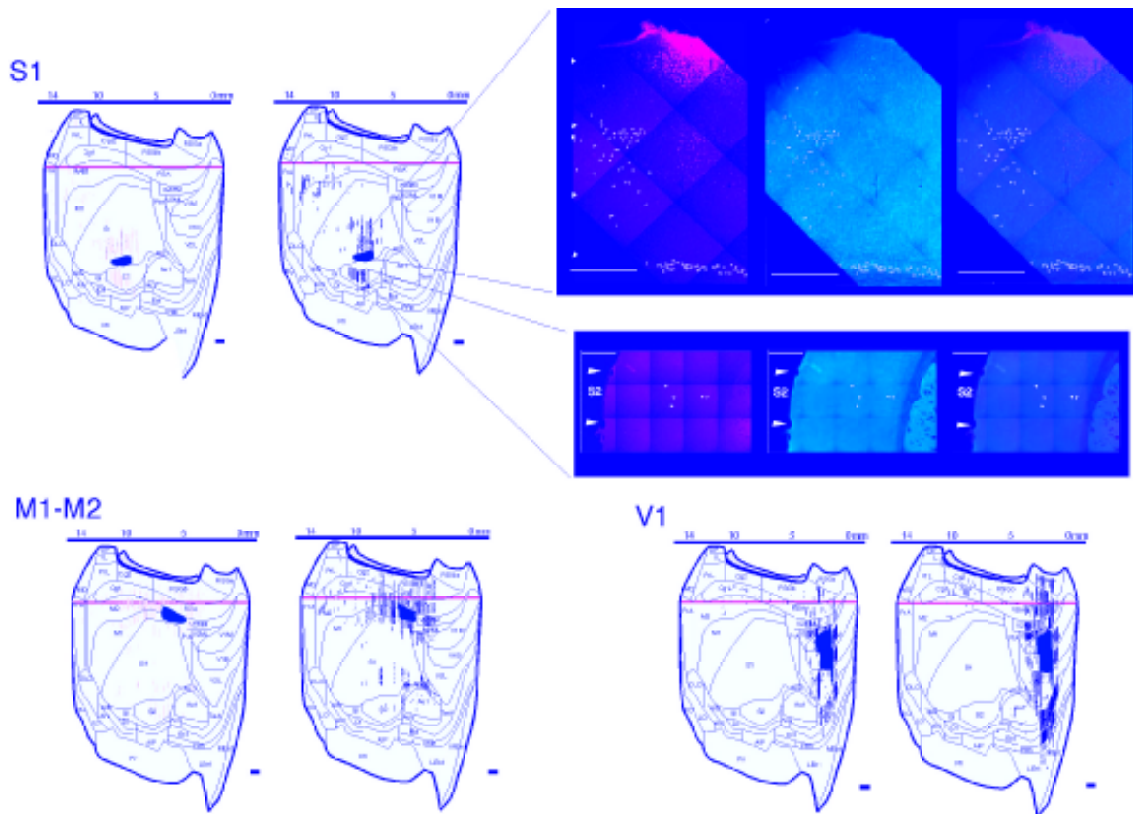


Figura 29. Representación topográfica de los somas retrógradamente marcados (FB+) en un esquema de corteza de rata aplanada según su localización en capas superiores (II-III, mapa de la izquierda para cada área) o inferiores (V-VI, mapa de la derecha). Representación del depósito epipial en azul. S1 El depósito se encuentra localizado en el área S1. Al lado y arriba, ejemplo de biomapping ($3\mu\text{m}$ de grosor) tomado con microscopía confocal para FB y GABA, donde se muestra que tanto las células FB+ (en verde) de capa VII como las células FB+ de áreas adyacentes son GABA(-) (en rojo). Al lado y abajo, células cuyas proyecciones son ipsilaterales cortico-corticales a distancia a capa I también son GABA(-). Barra de calibración: $578\mu\text{m}$. M1-M2 El depósito se encuentra localizado en el área M1-M2. V1 El depósito se encuentra localizado en el área V1. Barra de calibración esquema corteza aplanada de rata: 1mm.

II.2 Aferentes a capa I desde estructuras subcorticales no talámicas.

En la siguiente serie de experimentos estudiamos la localización de neuronas en estructuras subcorticales que inervan pequeñas regiones de capa I en tres áreas corticales distintas (S1, M1, V1). En cada caso ilustramos de nuevo el depósito (en azul oscuro) sobre la representación plana del hemisferio cortical con una zona en azul intenso. En esta Tesis no se incluyó el tálamo como estructura a estudiar, ya que ya ha sido recientemente documentada su inervación por nuestro grupo (Rubio-Garrido y cols., 2006).

Los depósitos afectaron a áreas pequeñas, en la mayoría de los casos en torno a $1\text{-}2\text{ mm}^2$. Es de destacar que en estos depósitos, aún localizados en pequeñas áreas corticales, pudimos identificar un gran número de neuronas marcadas a lo largo del eje

rostro-caudal del cerebro de rata. La Tabla 5 muestra el número de neuronas contadas en cada caso, expresadas en porcentaje, teniendo en cuenta que sólo una de cada cinco secciones (separadas 160 μm) fue analizada para este fin. A continuación examinamos el resultado de una serie de experimentos representativos que cubren las regiones estudiadas del hemisferio cerebral.

	M1-M2	M1-MPt	S1	V1
<i>Claustro</i>	5,82010582		11,86440678	18,46590909
<i>VDB</i>	4,232804233			
<i>HDB</i>	11,11111111	5,617977528	3,389830508	5,397727273
<i>ACbC</i>	0,529100529			
<i>MCPO</i>	1,587301587	1,123595506		
<i>MPA</i>	3,703703704			0,284090909
<i>LPO</i>	0,529100529			0,852272727
<i>Re</i>	2,116402116	3,370786517		6,25
<i>VRe</i>	1,587301587	5,617977528		
<i>B</i>	1,587301587	10,11235955	6,779661017	
<i>Pe</i>	3,174603175			0,568181818
<i>VLH</i>	2,116402116			0,852272727
<i>TuLH</i>	2,116402116			0,284090909
<i>EAM</i>	0,529100529			
<i>AA</i>	3,703703704			0,568181818
<i>SIB</i>	1,058201058			
<i>PLH</i>	2,116402116			5,397727273
<i>PHD</i>	1,058201058	1,123595506		3,977272727
<i>ZIR</i>	1,058201058			0,568181818
<i>ZIV</i>	1,058201058			0,568181818
<i>ZID</i>	21,16402116	26,96629213		1,704545455
<i>A13</i>	3,174603175			1,988636364
<i>Nv</i>		3,370786517		2,556818182
<i>SIB</i>		3,370786517	3,389830508	0,568181818
<i>LSI</i>			1,694915254	0,852272727
<i>IPACL</i>		4,494382022		0,568181818
<i>PLH</i>		4,494382022	16,94915254	
<i>EAM</i>			10,16949153	0,284090909
<i>EAC</i>		3,370786517		0,284090909
<i>VLH</i>		3,370786517		
<i>AcbC</i>				1,136363636

Tabla 5. Porcentaje de células encontradas en las estructuras talámicas que aparecen comunes a las tres áreas corticales estudiadas, respecto al total de células encontradas para cada caso en todas las estructuras subcorticales. Se ha analizado una serie de cinco. Se resaltan en gris las áreas que presentan más del 10% de las células en esas estructuras.

II.2.1 Depósitos en la corteza frontal dorsal.

En los siguientes casos, los depósitos estuvieron centrados en la región dorsal y anterior del hemisferio, involucrando al área motora.

En el caso ♀23 (Figura 30), el depósito se centró sobre regiones posteriores del área motora (M1, M2). En el caso ♀09M1 (Figura 31) el depósito cayó además sobre el área de asociación parietal medial (PtA en figura 13 B). Las estructuras subcorticales no talámicas que inervan directamente capa I en estos casos se encuentran localizadas en el prosencéfalo basal: estriado, núcleo basal de Meynert, núcleo accumbens, banda diagonal, sustancia innominada; así como en estructuras diencefálicas (área hipotalámica anterior, posterior, dorsal, ventral y lateral; reuniens, zona incerta); y el complejo amigdalino (Tabla 5).

II.2.2 Depósitos en la corteza somestésica.

Como ejemplo de corteza somestésica S1 se ilustra el caso ♀09S1 (Figura 31). Las estructuras subcorticales no talámicas que inervan directamente capa I de este área se encuentran también localizadas en el prosencéfalo basal: estriado, núcleo basal de Meynert, banda diagonal, sustancia innominada; así como en estructuras diencefálicas (áreas hipotalámicas anterior, posterior, ventral y lateral; y zona incerta). A diferencia de la inervación recibida por la capa I del área motora, no se encuentran neuronas marcadas retrógradamente ni en núcleo accumbens, ni en reuniens ni en complejo amigdalino (Tabla 4).

II.2.3 Depósitos en la corteza visual.

Los siguientes casos están localizados en áreas visuales. De ellos mostramos el caso ♀02, en el que el depósito está centrado sobre el área visual primaria (V1 o área 17), en sus porciones más mediales, que se corresponde con el segmento monocular (Figura 32).

Las estructuras subcorticales no talámicas que inervan directamente capa I de este área vuelven a repetir el mismo patrón que para los dos anteriores: prosencéfalo basal: estriado, núcleo basal de Meynert, núcleo accumbens, banda diagonal, sustancia innominada; así como en estructuras diencefálicas (áreas hipotalámicas anterior, posterior, ventral y lateral; reuniens, zona incerta). A semejanza del caso ♀09S1 anterior, en el complejo amigdalino no se encuentran neuronas marcadas retrógradamente (Tabla 5). Se aprovechó en este caso para analizar estructuras

mesencéfalicas. Se encontraron células retrógradamente marcadas en rafe y área tegmental ventral.

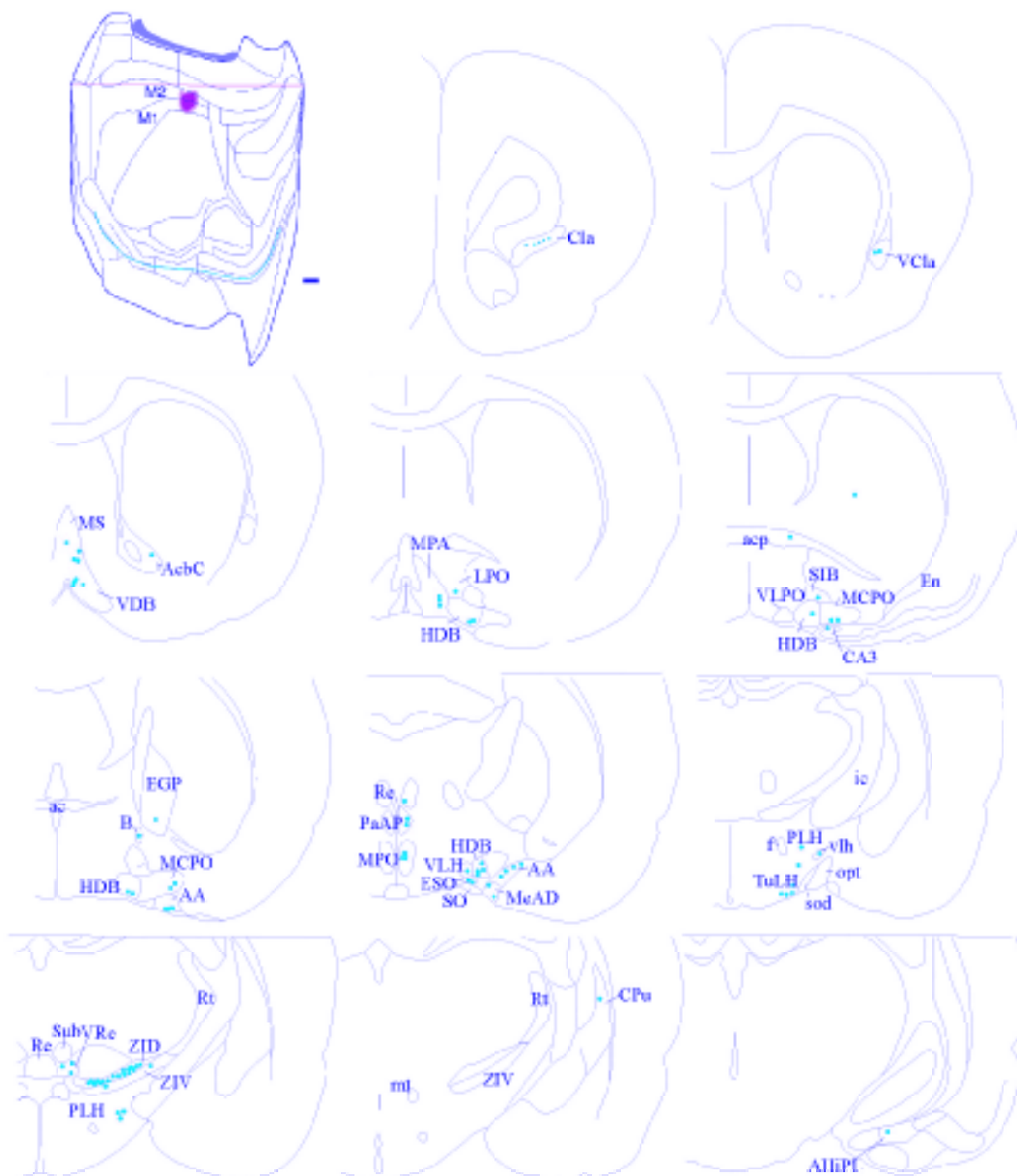


Figura 30. Experimento de depósito epipial de FB en la corteza motora (depósito representado en azul) (caso ♀23). Representación en cortes coronales de la localización de células subcorticales no talámicas proyectantes a capa I. Cada punto es una célula marcada retrógradamente. Barra de calibración: 1mm.

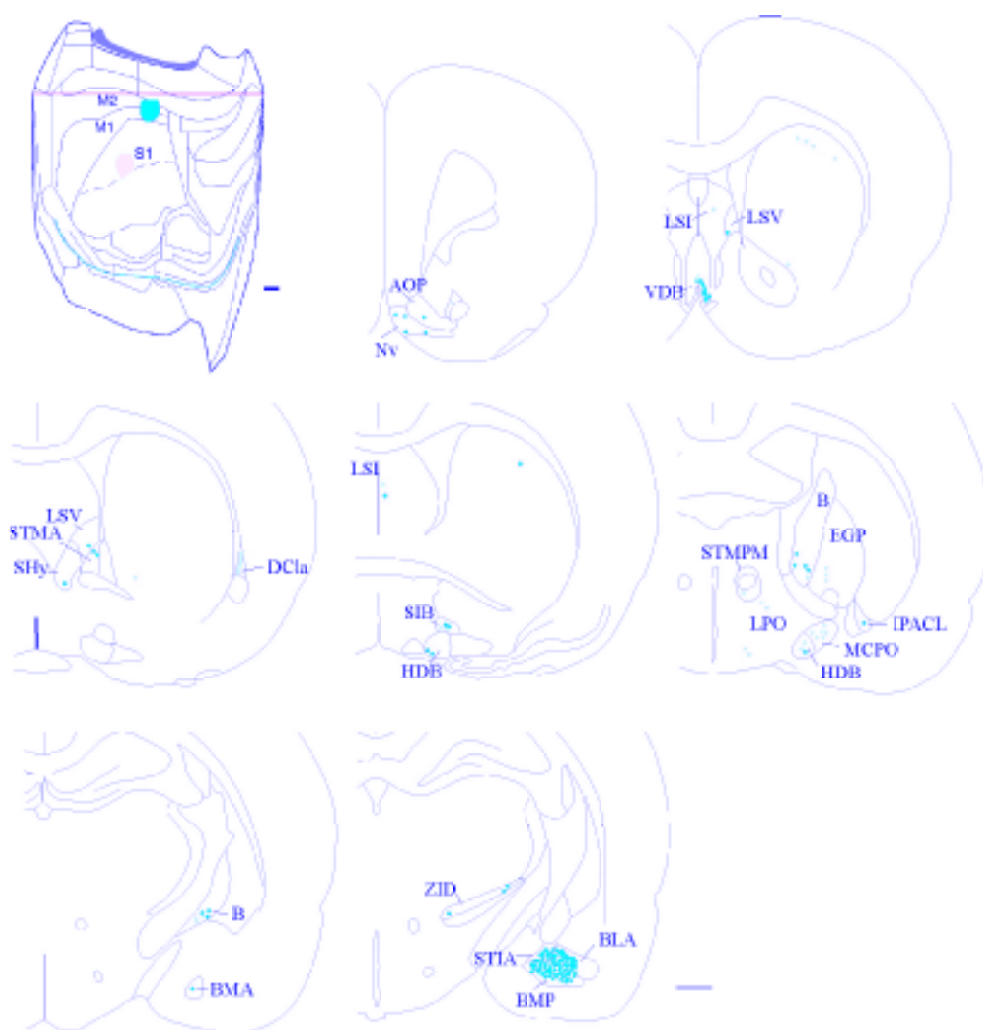


Figura 31. Caso ♀09. Representación en cortes coronales de la localización de células subcorticales no talámicas proyectantes a capa I en un caso con depósito epipial doble. Depósito de FB en M1-M2 (depósito representado en rojo) y de DY en S1 (depósito representado en amarillo). Cada punto es una célula retrógradamente marcada. Su color sigue el código de colores de los depósitos (se representan en rojo o amarillo, según si corresponde al depósito M1-M2 o al de S1, respectivamente). Barra de calibración: 1mm.

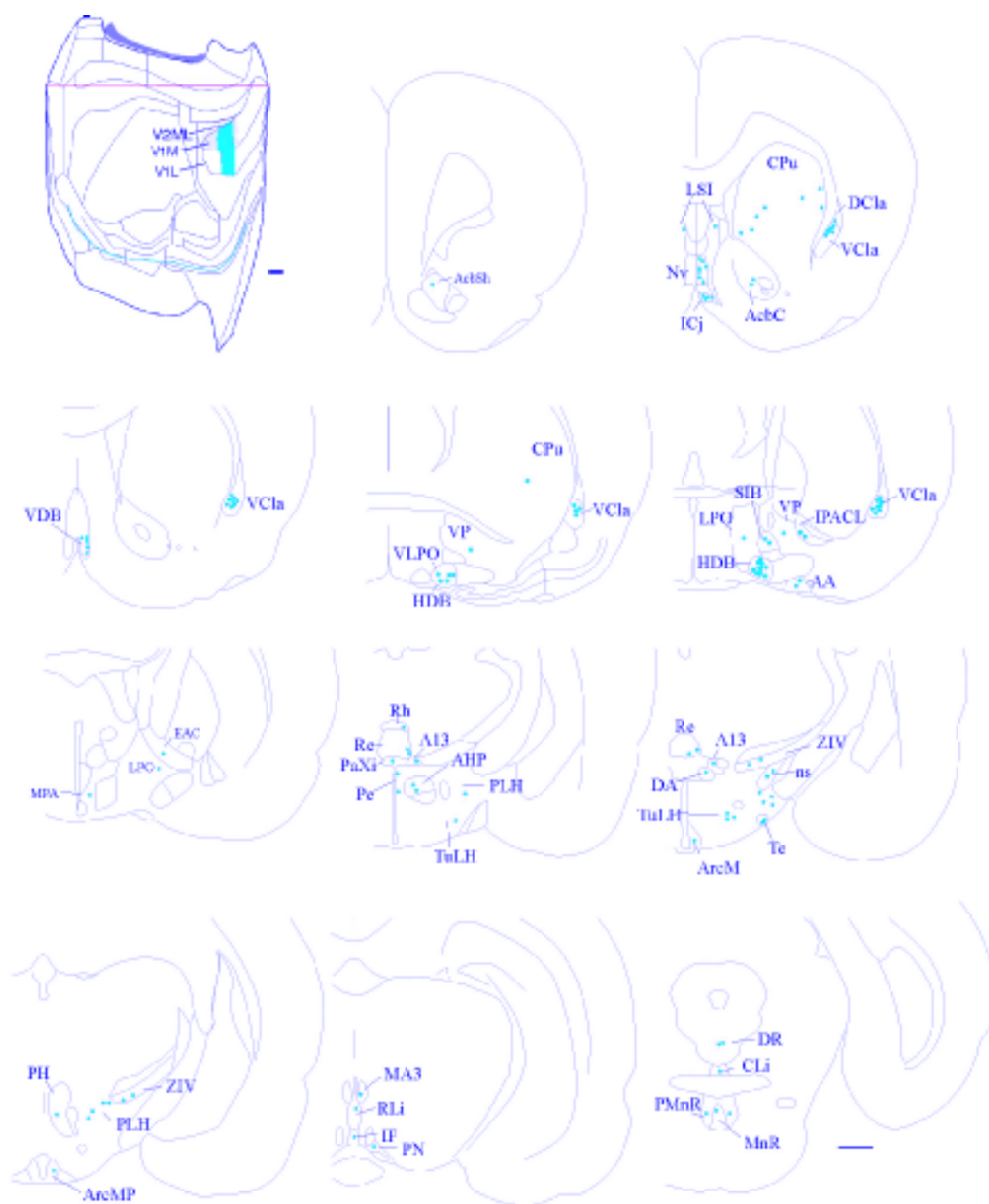


Figura 32. Representación en cortes coronales de la localización de células subcorticales no talámicas proyectantes a capa I. Depósito de FB en V1 (depósito representado en rojo) . El color de las células retrógradamente marcadas en las diferentes estructuras se representan, siguiendo el código de color, en rojo. Barra de calibración: 1mm.

II.3 Inervación GABAérgica subcortical a capa I.

Se han descrito diversas estructuras telencefálicas subcorticales no talámicas tales como el claustró (Kowiński y cols, 2001), prosencéfalo basal (Sarter y Bruno), 2004 y zona incerta (Nicoletis y cols., 1995; Lin y cols., 1997) que contienen GABA y que alcanzan capa I.

Con el fin de estudiar la posible presencia de GABA en las neuronas que inervan desde estas estructuras la capa I cortical, realizamos experimentos de inmunofluorescencia frente a GABA en una de cuatro series para los tres casos de depósitos epipiales de FB (áreas corticales S1, V1, M1-M2). La Figura 33 muestra ejemplos de nuestro análisis de colocación del trazador y GABA en las células de las áreas subcorticales analizadas.

En la tabla 6 se ilustran los resultados obtenidos para cada depósito. La inmunolocalización varía en cada zona analizada según el área cortical estudiada. Nuestros resultados revelan que, aunque las tres áreas analizadas para cada caso proyectan a capa I, no todas dotan de inhibición a dicha capa. Sólo el EGP parece que podría dotar de inhibición a la capa I de los tres tipos de corteza analizados, mientras que el claustró y la zona incerta dorsal sólo parecen dotar de inhibición a la capa I del área somatosensorial. Además, el tamaño y morfología de las células inmunorreactivas a GABA del EGP nos hace pensar que sean realmente células del núcleo basal de Meynert (Fig. 33).

	Claustró			EGP			ZID		
	CÉLS	GABA	%	CÉLS	GABA	%	CÉLS	GABA	%
S1	13	1	7,69	17	10	58,82	10	5	50
V1	11	0	0	5	3	60	0	0	0
M1	9	0	0	23	6	26,08	2	0	0

Tabla 6. Tabla resumen donde se da el número de células totales FB+, el número de células FB+ GABA+ y el % de células GABA en distintas estructuras subcorticales no talámicas que proyecten a capa I.

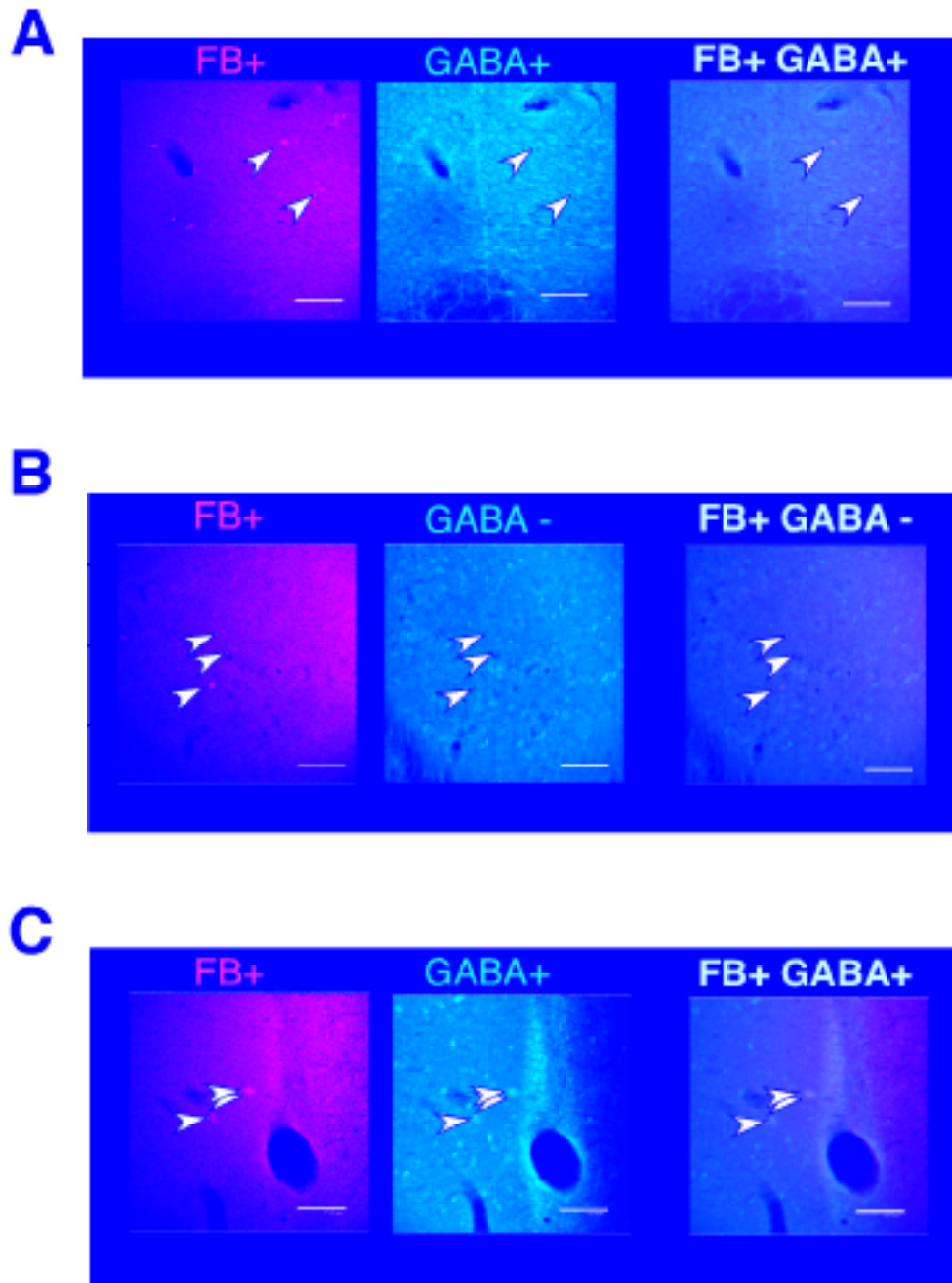


Figura 33. Ejemplos de imágenes de 4µm de grosor tomadas con microscopía confocal en distintas estructuras (zona incerta, claustrum y globo pálido externo) para diferentes áreas corticales estudiadas. En verde, células FB+; en rojo, células GABA+. Las flechas indican la posición de las células en cada imagen. A. Células de Zona Incerta dorsal marcadas retrógradamente con FB desde el depósito en S1 e inmunorreactivas para GABA. B. Células del Claustrum marcadas retrógradamente con FB desde el depósito en M1 y no inmunorreactivas para GABA. C. Células del Globo Pálido Externo (hipotéticamente del núcleo basal de Meynert) marcadas retrógradamente desde el depósito en V1 e inmunorreactivas para GABA. Barra de calibración: 175 µm.

II.4 Aferentes corticales locales. Análisis de las interneuronas situadas radialmente bajo el depósito epipial de FastBlue.

Tras haber estudiado el origen del plexo inhibitorio a larga distancia a capa I que, en principio, tendría poca relevancia respecto al aporte inhibitorio a capa I del plexo de origen local, en este apartado nos proponemos estudiar el aporte GABAérgico cortical local cualitativa y cuantitativamente.

Para la identificación de las neuronas corticales analizamos las regiones corticales dispuestas radialmente bajo los depósitos epipiales del trazador retrógrado FB, estudiando, por este orden, las áreas corticales somatosensorial (S1), visual (V1) y motora (M1-M2).

Se han analizado cuatro animales de los que se obtuvieron cinco series. Una serie se utilizó para realizar Nissl, y el resto de cada serie para inmunofluorescencias para NeuN (Mouse anti NeuN, Chemicon, 1:400); GABA (rabbit anti GABA, Sigma, 1:400); Calbindina (mouse anti Calbindin y rabbit anti Calbindin, Chemicon, 1:1000); Somatostatina (rabbit anti Somatostatin, Peninsula Lab, 1:1000); Calretinina (rabbit anti Calretinin, Chemicon, 1:1000) y Reelina (mouse anti Reelin, Chemicon, 1:400). Para visualizar los anticuerpos se utilizaron anticuerpos secundarios goat anti rabbit (Alexa GAR I=647, Molecular Probes, 1:100) y goat anti mouse (Alexa GAM I= 546, Molecular Probes, 1:100) (ver en Material y Métodos los protocolos 2-14). El análisis se realizó para cada inmunofluorescencia en cada tipo de corteza con depósito tomando imágenes de confocal mediante *biomapping* cada tres micras de grosor (ver Material y Métodos). Sobre las imágenes tomadas para cada animal se agrupó, en función de su distancia a capa I, las células rellenas de trazador e inmunopositivas para cada anticuerpo. Se realizó la media para cada grupo de células así tomado entre los cuatro animales, y se representó en gráficas estandarizadas (ver en Material y Métodos el apartado 6.3 *Caracterización bioquímica de las neuronas corticales que inervan capa I*).

A continuación se pasará a describir los resultados obtenidos para los tres tipos de corteza estudiadas mediante la combinación de marcadores en inmunofluorescencias dobles y/o sencillas y el trazador FB.

II.4.1 Depósitos de FastBlue e inmunofluorescencia para NeuN.

Las células de glía y las neuronas pueden tener alojado en capa I algún tipo de prolongación. Para realizar una estimación de las células de glía y neuronas que puedan estar captando el trazador en capa I, se estudió la colocalización de FB con el anticuerpo anti-NeuN, específico para neuronas y no para glía. El estudio en las tres

áreas corticales muestra que prácticamente el 100% de las células que captan FB son neuronas, y que alguna célula de glía aislada en capas inferiores (capa VI) puede estar llegando a capa I (Figura 34).

II.4.2 Depósitos de FastBlue e inmunohistofluorescencia para GABA.

Las neuronas que están captando FB pueden ser diferenciadas en glutamatérgicas (células piramidales, su dendrita apical se aloja en capa I) o GABAérgicas (interneuronas, cuyo axón está llegando a capa I). Para examinar el grado de coincidencia entre las células rellenas retrógradamente de FB y su contenido en el neurotransmisor de naturaleza inhibitoria GABA, se procedió a coger una serie de un total de cinco para realizar la inmunofluorescencia de dicho neurotransmisor, en un total de cuatro animales. El estudio se realizó metódicamente en los cuatro animales contando las células GABAérgicas en columnas corticales (de ~200µm de ancho bajo el halo de FB de capa I) que a su vez contenían FB.

Del análisis se desprende que las células GABAérgicas se localizan en cada una de las capas corticales (II-III a VI) en los tres tipos de corteza analizadas (motora, somatosensorial y visual). Las células GABAérgicas que proyectan a capa I también se localizan en todas las capas. Sin embargo, parece que tienden a aumentar su número en las capas superiores (II-III) (Fig. 35) (alrededor del 60% de las células GABA de esta capa proyectan a capa I). No obstante, en la comparación de células GABA proyectantes a capa I respecto a células no GABAérgicas proyectantes se encuentra en capas inferiores (capa V en M1, capa VI en S1 y capa IV en V1). Es digno de mención la mayor similitud que existe entre las cortezas S1 y M1-M2 que ambas respecto a V1.

II.4.3 Depósitos de FastBlue e inmunohistoquímica para GABA y calbindina.

El contenido en proteínas ligadoras de calcio de las células GABAérgicas o interneuronas corticales es un método que puede ser utilizado para su clasificación (DeFelipe, 1993). Una de estas proteínas ligadoras de calcio utilizadas es calbindina (CB). Sin embargo, el número de neuronas CB+ parece ser mayor que las células GABA+ en capas superiores II-III (Fig. 35). Es por ello por lo que nos planteamos

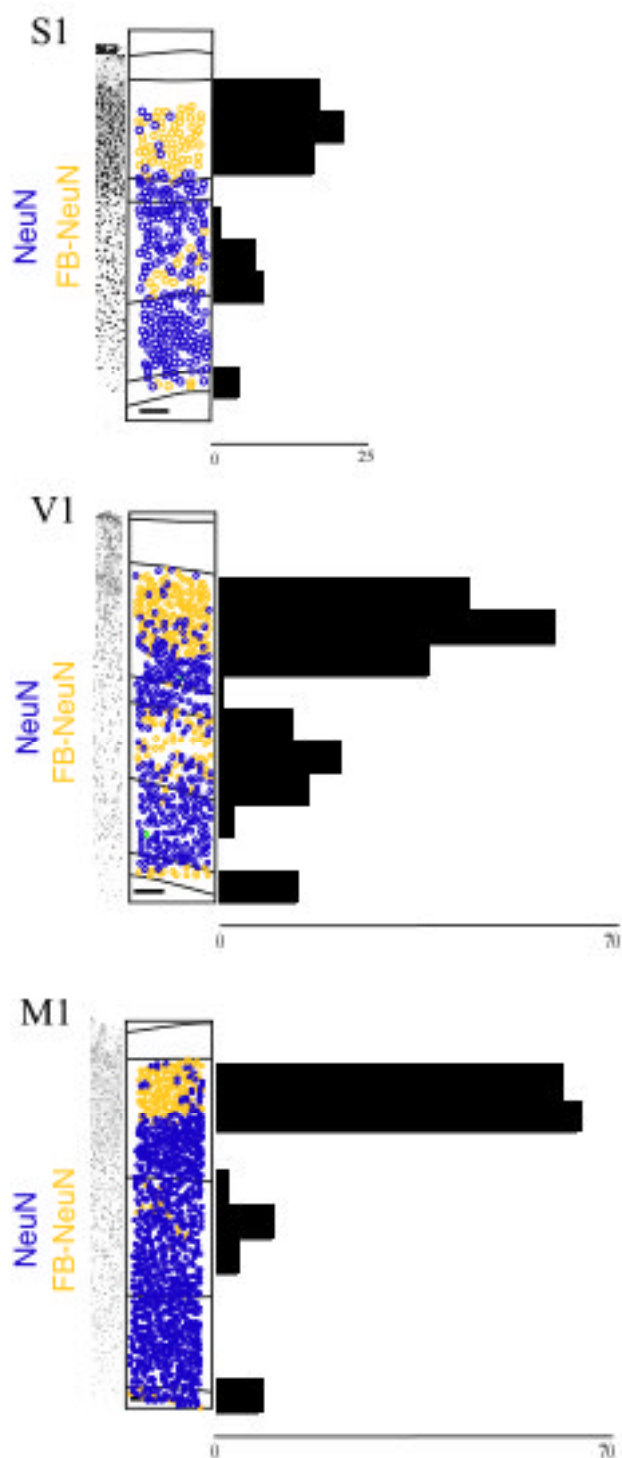


Figura 34. Representación de un caso de inmunofluorescencia simple para NeuN (azul) colocalizando con FB (amarillo) sobre secciones de tejido con depósitos de FB y sus posterior dibujo. Cada célula inmunorreactiva es un círculo. Si además es FB+ el círculo se representa relleno. La gráfica representa, en cada análisis, la media (para cuatro animales) de células inmunorreactivas para el/los marcador/es correspondientes. Barra de calibración: 100µm.

tener una estimación de las células que son GABA y CB y, que además, puedan estar proyectando a capa I.

El planteamiento y el análisis para abordar esta cuestión es igual al anterior, con la salvedad de que para esta inmunofluorescencia se utilizan dos primarios, un rabbit anti-GABA y un mouse anti-CB, revelados los anticuerpos secundarios ligados a un fluoróforo Alexa con emisión en el rojo lejano (647 nm) y en el rojo (546 nm) respectivamente.

En los tres tipos de corteza analizadas, menos del 40 % de las células GABA expresan, en cada capa, calbindina (CB). Sin embargo, entre un 60-80 % de estas células GABA+ y CB+ de capa II-III proyectan a capa I (es decir, son FB+ GABA+ y CB+). En general, según nuestro análisis, todas las capas, excepto capa IV del área V, presentan células FB+ GABA+ CB+ (Fig. 35). Hemos de recordar que, de acuerdo con el esquema actualmente aceptado (véase tabla I), las células FB+ GABA+ CB+ pueden ser básicamente dos tipos de interneuronas corticales: células de Martinotti y células doble-bouquet.

II.4.4 Depósitos de FastBlue e inmunohistoquímica de somatostatina y calbindina.

El contenido en el neurotransmisor somatostatina (SOM+) es una característica que poseen las interneuronas conocidas como células de Martinotti (Markram, 2003). Dentro de este grupo de interneuronas otro marcador que las caracteriza es su inmunorreactividad para calbindina (Ma y cols, 2006). Para examinar cuántas células SOM+ están proyectando a capa I y cuál es su disposición en corteza en función de la distancia a capa I, así como su contenido en CB, nos propusimos realizar el mismo planteamiento que para el apartado anterior. Se realizó inmunofluorescencia doble para SOM (rabbit anti-SOM) y CB (mouse anti-CB) en cuatro animales por cada caso de depósito epipial de FB (S1, V1 y M1). El análisis fue igual que para los anteriores (Figura 36).

Del estudio se puede desprender que las células SOM+ que alcanzan capa I se distribuyen por todas las capas corticales aunque se localizan mayoritariamente en capas II-III (Fig. 36) (de un 45% en M1 a un 65 % en V1 de células que son SOM+ son, además, FB+). Además, en todas las capas se pueden encontrar células que coexpresan SOM y CB y que proyectan a capa I (células FB+ SOM+ CB+), aunque de nuevo parece haber una tendencia a aumentar su número en capas II-III, según nos acercamos a capa I (Fig. 36). Concretamente, en las capas II-III las células SOM+

colocalizan CB del 50% (en V1) al 70% (M1). De éstas, del 40% (en M1 y S1) al 70% (en V1) proyectan a capa I (Figura 36).

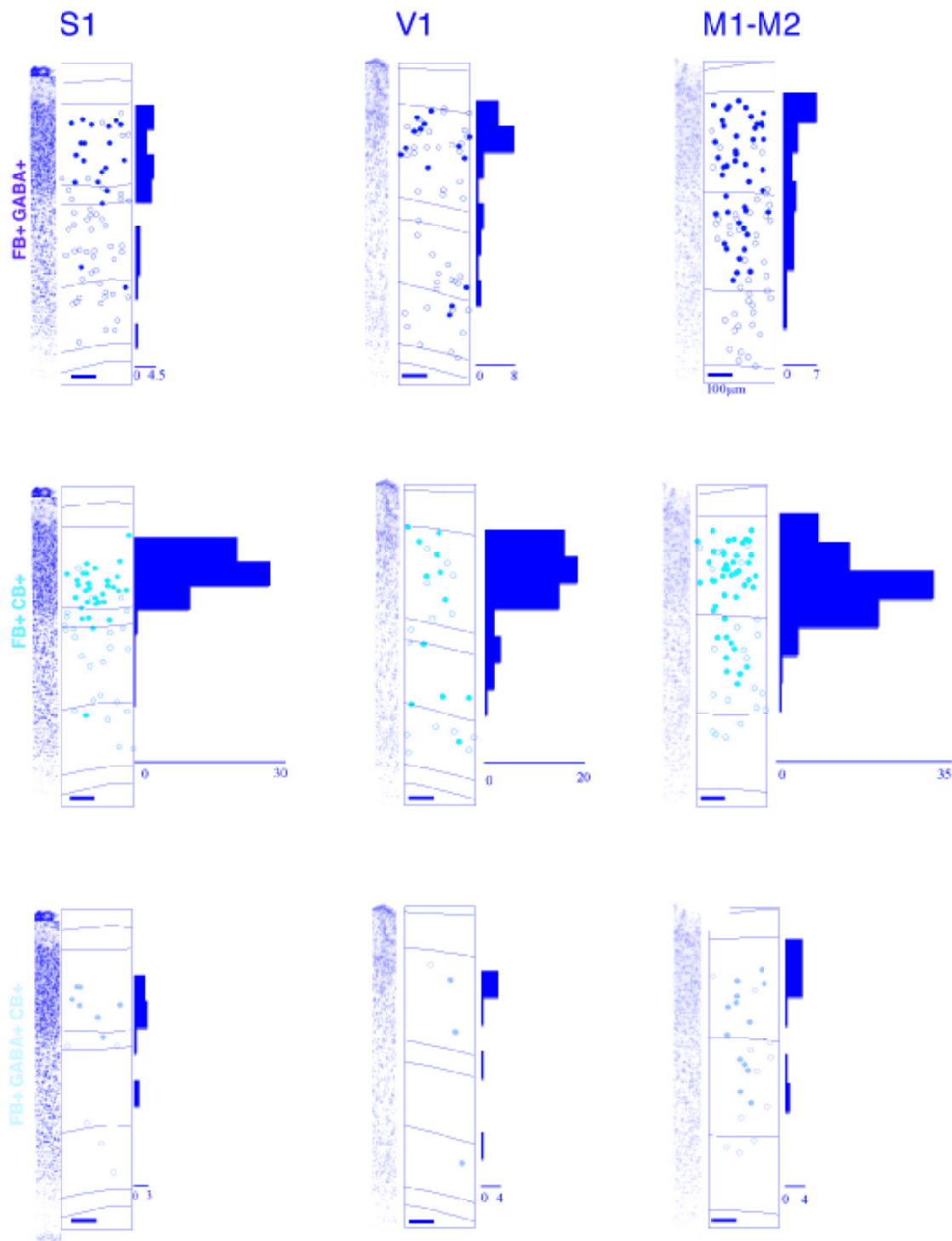


Figura 35. (Página anterior). Representación de un caso de inmunofluorescencia para GABA y CB sobre secciones de tejido con depósitos de FB y sus posterior dibujo. Cada célula inmunorreactiva es un círculo. Si además es FB+ el círculo se representa relleno. La gráfica representa, en cada análisis, la media (para cuatro animales) de células inmunorreactivas para el/los marcador/es correspondientes. Barra de calibración: 100µm.

II.4.5 Depósitos de FastBlue e inmunohistoquímica de calretinina y calbindina.

Se ha descrito utilizando relleno intracelular (tras registro electrofisiológico) en corteza frontal de rata, que las células bipolares y doble-bouquet pueden proyectar su axón a capa I (Kawaguchi y Kubota, 1993; Kawaguchi, 1995). Las células doble-bouquet pueden ser caracterizadas por su contenido en calretinina (CR), otro tipo de proteína ligadora de calcio, y CB (Markram y cols., 2004). Asimismo, las células bipolares expresan CR (CR+), pero no CB. Para poder abarcar el estudio sobre el número de células que están marcadas retrógradamente y que sean CR+ y CB+ (en principio células doble-bouquet) o CR+ y CB- (en principio células bipolares), el planteamiento y el análisis es igual que para los apartados anteriores.

Nuestro análisis indica que en todas las cortezas se encuentran células CR+ que proyectan a capa I. Su distribución se restringe a capas II-III y V en las tres áreas, aunque en V1 además, también aparecen en capa IV (Fig. 37). Concretamente, en capas superiores, de un 60% (S1) a un 70 % (M1 y V1) de las células CR+ proyectan a capa I.

Respecto a las células CR+ CB+ que alcanzan capa I, éstas se localizan básicamente en la primera mitad de capa II-III en los tres tipos de corteza, con el añadido de capa V en V1 (Fig. 37). Concretamente, de un 10 % (V1 y S1) a un 50 % (M1) de las células CR+ colocalizan con CB. De las que colocalizan CR y CB en capas II-III, proyectan a capa I la gran mayoría (70%-80% en los tres tipos de corteza).

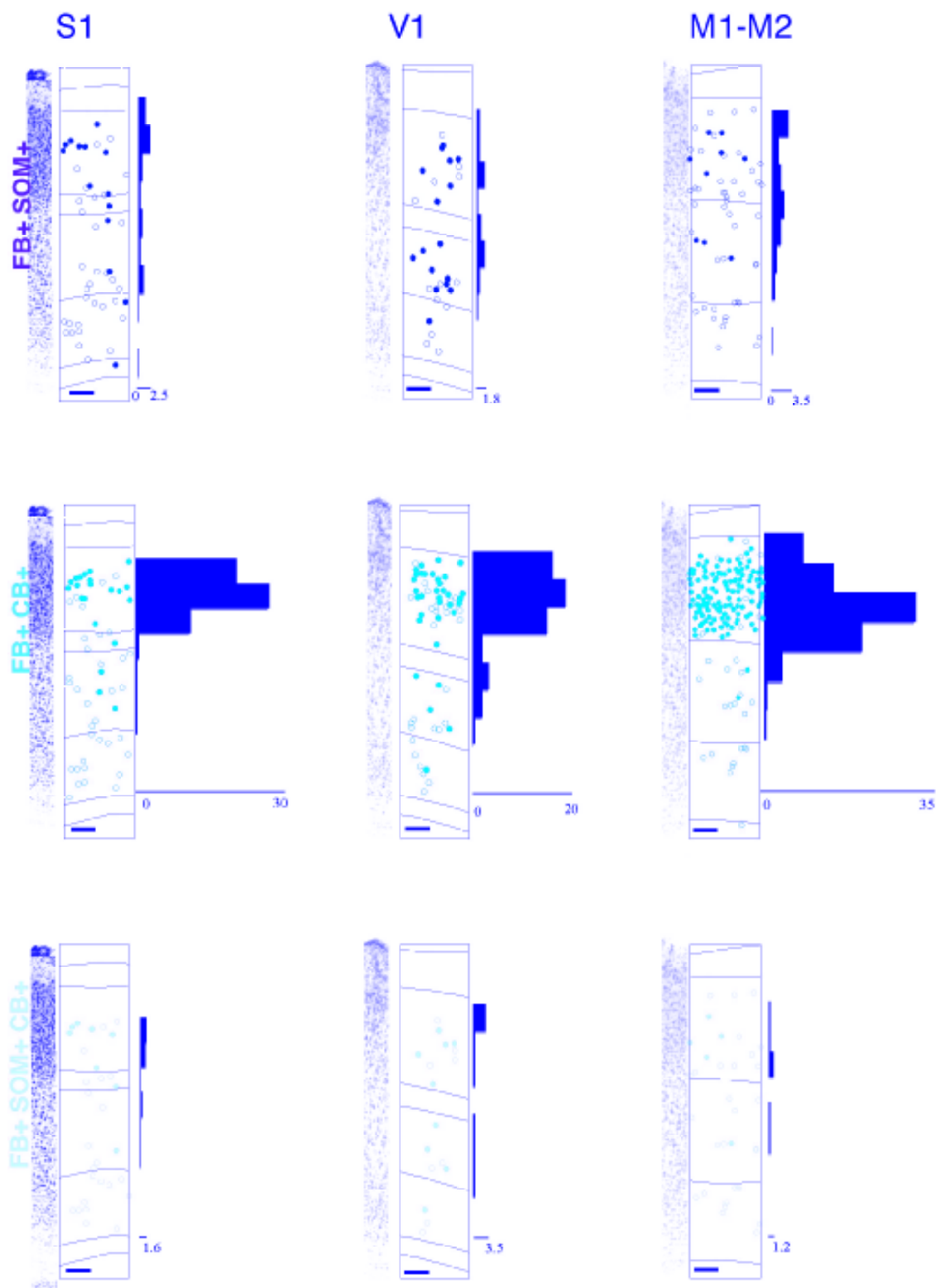


Figura 36. Representación de un caso de inmunofluorescencia doble para somatostatina (SOM) y calbindina (CB) sobre secciones de tejido con depósitos de FB. Cada célula inmunorreactiva es un círculo. Si además es FB+ el círculo se representa relleno. La gráfica representa la media de células FB+ SOM+ / FB+ CB+ / FB+ SOM+ y CB+ para cuatro casos según su distancia a capa I. Barra de calibración: 100µm.

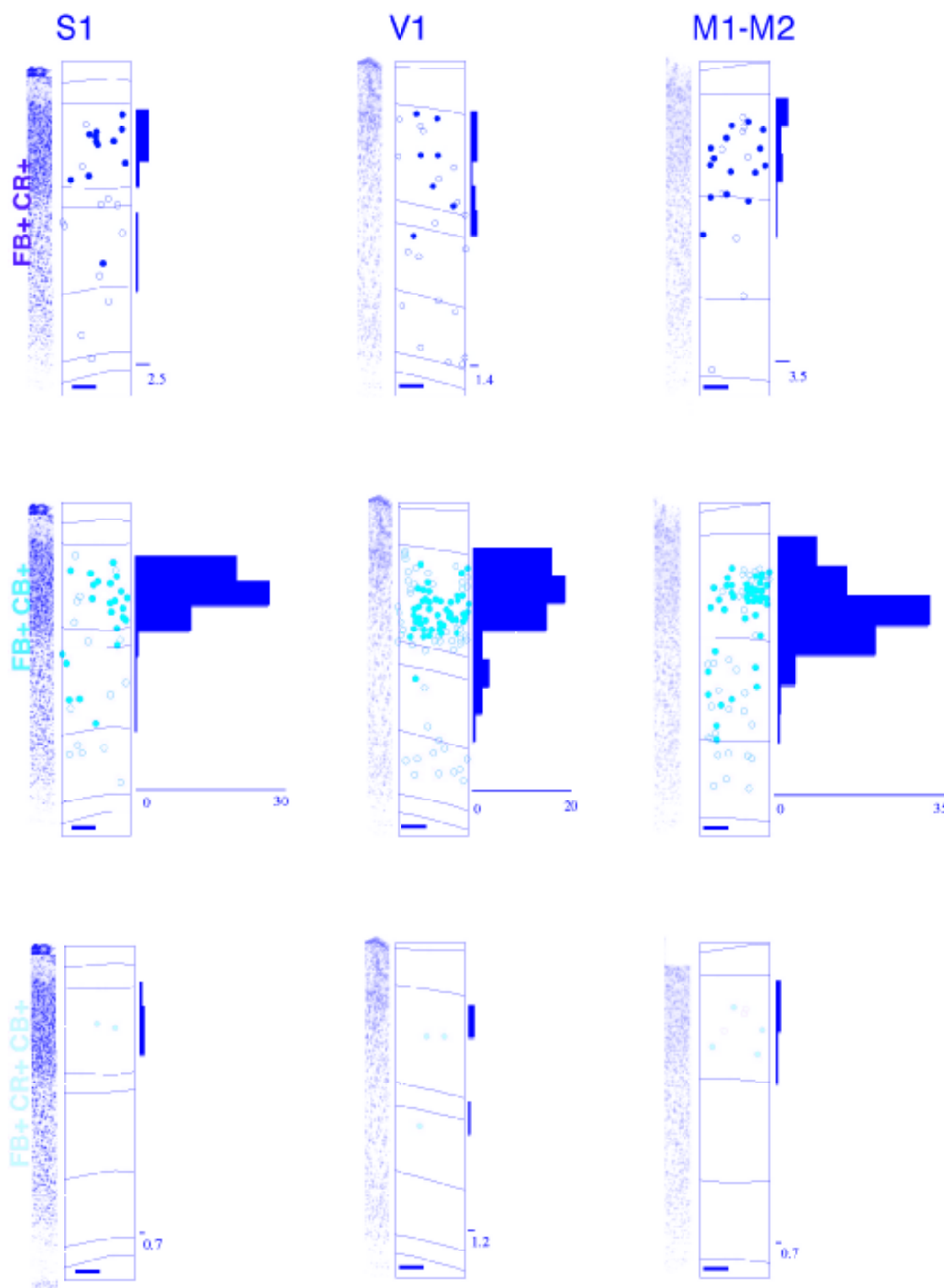


Figura 37. Representación de un caso de inmunofluorescencia doble para calretinina (CR) y calbindina (CB) sobre secciones de tejido con depósitos de FB. Cada célula inmunorreactiva es un círculo. Si además es FB+ el círculo se representa relleno. Las gráficas adyacentes representan la media de células FB+ CR+ / FB+CB+ / FB+ CR+ y CB + según su distancia a capa I para cuatro casos. Barra de calibración: 100µm.

ABREVIATURAS

ABREVIATURAS.

A13	A13 dopamine cells.	GCL	ganglion cell layer
AA	anterior amygdaloid area.	GIL	glomerular layer of the main olfactory bulb
ABL	basal and lateral amygdaloid nuclei	GnL	granule cell layer of the cerebellar cortex
ACbC	Accumbens nucleus (core).	GnMOB	granular layer of main olfactory bulb
AC	anterior commissure	GP	globus pallidus
AcbSh	accumbens nucleus, shell	GrDG	granule cell layer of the dentate gyrus
ACo	cortical amygdaloid nucleus	HDB	nucleus of the horizontal limb of the diagonal band.
ACP	anterior commissure, posterior branch	HF	hippocampal fissure
AD	anterodorsal thalamic nucleus	Hi	hilus layer of the dentate gyrus
AHP	anterior hypothalamic area, posterior part	Iam	interanteromedial thalamic nucleus
AMe	medial amygdaloid nucleus	ICj	islands of Calleja
AOB	accessory olfactory bulb	IF	interfascicular nucleus
AOL	anterior olfactory nucleus, lateral division	InG	intermediate gray stratum of the superior colliculus
AOP	anterior olfactory nucleus, posterior part	INL	inner nuclear layer
AOT	accessory optic tract	ION	inferior olivary nucleus
APT	anterior pretectal nucleus	IPACL	interstitial nucleus of the posterior limb of the anterior commissure, lateral part
ArcMP	arcuate hypothalamic nucleus, medial part	IPL	internal plexiform layer
Au1	primary auditory cortex	IPN	interpeduncular nucleus
B	basal nucleus (Meynert)	ISH	in situ hybridization
BLA	basolateral amygdaloid nucleus, anterior part	LEA	lateral entorhinal area
BMA	basomedial amygdaloid nucleus, anterior part	LHb	lateral habenular nucleus
BMP	basomedial amygdaloid nucleus, posterior part	LMol	stratum lacunosum-moleculare, Ammon's horn
BST	bed nucleus of the stria terminalis	LOT	lateral olfactory tract
CA1	Ammon's horn sector 1	LP	lateral posterior thalamic nucleus
CA3	Ammon's horn sector 3	LPO	lateral preoptic area
CB-ir	calbindin- immunoreactive	LSI	lateral septal nucleus, intermediate part
CeL	centralis lateralis thalamic nucleus	LSpi	lateral septal nucleus, intermediate subnucleus
CIC	inferior colliculus, central nucleus	LSpL	lateral septal nucleus, lateral subnucleus
CLi	caudal linear nucleus of the raphe	LSV	lateral septal nucleus, ventral part
CM	centralis medialis thalamic nucleus	M	mitral cell layer of the main olfactory bulb
CP	caudate putamen (striatum).	MA3	medial accessory oculomotor nucleus
CPu	caudate-putamen	McPo	magnocellular preoptic nucleus
CR-ir	calretinin- immunoreactive	MEA	medial entorhinal area
DA	dorsal hypothalamic area	MHb	medial habenular nucleus
DAB	diaminobenzidine	ML	medial lemniscus
DCIC	inferior colliculus, dorsal cortex	MnR	median raphe nucleus
DCla	Claustro, dorsal part	MOB	main olfactory bulb
DG	dentate gyrus	Mol	molecular layer of the dentate gyrus
Dk	Darkewitsch's nucleus	MoL	molecular layer of the cerebellar cortex
DLG	dorsal lateral geniculate thalamic nucleus	MPO	medial preoptic area
DR	dorsal raphe nucleus	MSp	medial septal nucleus
EAC	sublenticular extended amygdala, central part	MTN	medial terminal accessory optic nucleus
ECIC	inferior colliculus, external cortex	NCBI	nucleus of the brachium of the inferior colliculus
ECM	extracellular matrix	ns	nigrostriatal bundle
EGP	external globus pallidus	NMDAr	N-methyl-d-aspartate receptor
End	endopyriform nucleus	Nv	navicular nucleus of the basal forebrain
EPL	external plexiform layer of the main olfactory bulb	ON	olfactory nerve layer of the main olfactory bulb
Fx	fornix	ONL	outer nuclear layer of the retina
GABA	gamma-aminobutyric acid	OPL	outer plexiform layer of the retina
GABA-ir	gamma-aminobutyric acid immunoreactive	OPT	olivary pretectal nucleus
		Opt	optic stratum of the superior colliculus

PaDC	paraventricular hypothalamic nucleus, dorsal cap	Sb	subiculum
PaG	periaqueductal gray	SC	superior colliculus
PaLM	paraventricular hypothalamic nucleus, lateral magnocellular part	SHy	septohipothalamic nucleus
PaSb	parasubiculum	SIB	substantia innominata (parte basal)
PaXi	paraxiphoid nucleus of thalamus	SM	stria medullaris thalami
Pc	paracentral thalamic nucleus	SMN	nucleus of the stria medullaris thalami
PcRt	parvocellular reticular nucleus	SOM-ir	somatostatin-immunoreactive
PerC	perirhinal cortex	Sp5c	caudal portion of the spinal trigeminal nucleus
Pe	periventricular hypothalamic nucleus.	Sp5Tr	spinal tract of the trigeminal nucleus
PH	posterior hypothalamic nucleus	ST	stria terminalis
PLH	peduncular part of lateral hypothalamus	STIA	bed nucleus of the stria terminalis, intraamygdaloid division
PkL	purkinje cell layer of the cerebellar cortex	STMPM	bed nucleus of the stria terminalis, medial division, posteromedial part
PMnR	paramedian raphe nucleus	SuG	superficial gray stratum of the superior colliculus
PN	paranigral nucleus of the VTA	Te	Teterete hypothalamic nucleus
Po	posterior thalamic nucleus	TuH	tuberal region of lateral hypothalamus
PoDG	polymorph layer of the dentate gyrus	TuO	olfactory tubercle
Ppir	prepyriform cortex	VCl	Claustro, ventral part
ProC	prorhinal cortex	VLGmc	ventral lateral geniculate nucleus, magnocellular part
PrS	presubiculum	VLGpc	ventral lateral geniculate nucleus, parvocellular part
Pt	paratenial thalamic nucleus	VLL	ventral lateral lemniscus nucleus
PvA	anterior paraventricular thalamic nucleus	VLPO	ventrolateral preoptic nucleus
Py	stratum pyramidale, Ammon's horn	VP	ventral pallidum
PvP	posterior paraventricular thalamic nucleus	VPM	medial ventroposterior thalamic nucleus
PyT	pyramidal tract	VRe	ventral reuniens nucleus
Rad	stratum radiatum, Ammon's horn	VTA	ventral tegmental area
RB	retroflex bundle (habenulo-interpeduncular tract)	ZI	zona incerta
Re	reunions thalamic nucleus	ZID	zona incerta, ventral part
Reln-ir	Reelin-immunoreactive	ZIV	zona incerta, dorsal part
Rh	rhomboid thalamic nucleus	ZLI	zona limitans intrathalamica
RLi	rostral linear nucleus of the raphe		
RVL	rostroventrolateral reticular nucleus		
S1	somatosensory area 1, parietal isocortex		

DISCUSIÓN

PARTE I.

Hemos mapeado sistemáticamente la localización de la proteína Reelina en todo el eje rostro-caudal del telencéfalo y tronco cerebral en la rata adulta. Nuestros datos muestran que dicha proteína se encuentra preferentemente en poblaciones de neuronas del telencéfalo y de la corteza cerebelosa, siendo más escasa en puente y bulbo. Estos resultados apoyan los estudios de ISH previos en roedores (Ikeda y Terashima, 1997; Alcántara y cols., 1998; Pesold y cols., 1998; Haas y cols., 2000), confirmando y ampliando los datos disponibles de inmunolocalización (Miyata y cols., 1996; Drakew y cols., 1998; Pesold y cols., 1998; Nishikawa y cols., 1999; Pérez-García y cols., 2001; Martínez-Cerdeño y Clascá, 2002). Además, describimos la presencia de otras áreas de células y neuropilo inmunorreactivos, localizadas en su mayoría en estructuras cerebrales no examinadas previamente en otros estudios.

I.1 ESPECIFICIDAD E INTERPRETACIÓN DEL INMUNOMARCADO.

El marcaje observado incluye cuerpos celulares, dendritas, axones y neuropilo extracelular, que muestran un amplio rango en la intensidad de la tinción. Este patrón es consistente con la expectativa de que, al contrario que en la localización del mRNA de Reelina, el cual se distribuye en el pericarion de las células (D'Arcangelo et al., 1995; Schiffmann et al., 1997; Alcántara y cols., 1998; Haas y cols., 2000), la proteína podría encontrarse en: (1) el retículo endoplásmico del complejo de Golgi de neuronas que la sintetizan (Pappas y cols., 2001; Martínez-Cerdeño y cols., 2002); (2) en vesículas membranosas dentro de los axones para ser transportadas y secretadas (Derer y cols., 2001; Martínez-Cerdeño y cols., 2002, 2003; Pappas y cols., 2003); (3) en la matriz extracelular y membranas de células de los terminales sinápticos de los axones (D'Arcangelo y cols., 1997; Pappas y cols., 2001; Dong y cols., 2003); (4) en las vesículas de endocitosis formadas tras la unión de la proteína a su receptor en la célula diana (D'Arcangelo y cols., 1999; Morimura y cols., 2005); o incluso (5) en el espacio intercelular, antes de que eventualmente pase a formar parte del líquido cefalorraquídeo (Sáez-Valero y cols., 2003; Ignatova y cols., 2004).

Dada esta variedad de alternativas, nos quisimos asegurar de la especificidad del marcaje mediante un set de controles para la inmunotinción (Saper y Sawchenko, 2003, ver Material y Métodos). La coincidencia de los resultados de la batería de controles nos hace pensar que, efectivamente, el marcaje observado es específico para Reelina.

Debemos tener en cuenta que Reelina es una proteína de elevado peso molecular

(~ 420 KDa) con varios dominios funcionalmente diversos, y que, tras su secreción, puede ser fragmentada enzimáticamente. Los anticuerpos monoclonales aquí utilizados reconocen exclusivamente la región N-terminal de la proteína. Concretamente, el anticuerpo CR-50 reconoce los residuos 246-371, mientras que el anticuerpo 142 se une a los residuos 164-189 y el anticuerpo G10 reconoce los residuos 199-245 (D'Arcangelo y cols., 1997; De Bergeyck y cols., 1998). Esta región N-terminal se puede detectar cuando la proteína no está fragmentada, así como en cualquier fragmento que contenga dicha región (Lambert de Rouvroit y cols., 1999; Jossin, 2004). Así, el inmunomarcaje detectado en nuestro material puede corresponder a cualquiera de estas formas de la proteína, no detectando los fragmentos que carecieran de la región N-terminal, alguno de los cuales, sin embargo, son funcionales (Jossin, 2004). La región N-terminal permite la homodimerización de la proteína secretada (Utsonomiya-Tate et al., 2000; Strasser et al., 2004), un proceso que parece ser crucial para el reconocimiento de los receptores en la superficie celular (D'Arcangelo y cols., 1999; Andersen y cols., 2003; Sanada y cols., 2004; Strasser et al., 2004; Morimura y cols., 2005). El anticuerpo CR50 previene de la dimerización y bloquea la función de la proteína *in vitro* e *in vivo* (Ogawa y cols., 1995; Del Rio y cols., 1997; Nakajima y cols., 1997; Kubo y cols., 2002; Zhao y cols., 2004). Además, la región N-terminal es la que se une a los receptores de integrina $\alpha\beta 1$ (Dulabon et al., 2000; Schmid et al., 2005), y esta unión sería importante para una posible regulación local mediada por Reelina de las propiedades adhesivas celulares en los sitios perisinápticos (Rodríguez y cols., 2000; Dong y cols., 2003; Sanada y cols., 2004; Schmid y cols., 2005).

Estudiar la localización subcelular precisa del inmunomarcaje requiere la utilización de microscopía electrónica. Sin embargo, ya a nivel de microscopía óptica los cuerpos fuertemente inmunorreactivos para Reelina en los somas celulares tienen claramente la apariencia del retículo endoplásmico y del complejo de Golgi (De Camilli y cols., 1986). La presencia de Reelina en estas organelas celulares de la vía secretora constitutiva se ha demostrado por los estudios de microscopía electrónica en neuronas de ratón adulto (Pappas y cols., 2001) y macaco (Martínez-Cerdeño y cols., 2002). Además, la mayoría de las poblaciones neuronales con marcaje intracelular recuerdan a las neuronas descritas en los estudios de ISH. Hay, no obstante, algunas incongruencias. Por ejemplo, las células talámicas y estriatales, las cuales no han sido descritas en los estudios previos de ISH como células que contuvieran mRNA de Reelina. Debido a que la especificidad de nuestro inmunomarcaje está firmemente establecida, dichas

incongruencias pueden deberse a dos explicaciones, mutuamente no excluyentes. Primero, estas poblaciones celulares pueden expresar mRNA de Reelina a niveles demasiado bajos para poder ser detectados mediante ISH en secciones gruesas de tejido (Femino y cols., 1998; Speel y cols., 1999). Sólo los resultados negativos usando amplificación de mRNA mediante PCR podría, efectivamente, descartar la presencia de un pequeño número de transcritos de mRNA biológicamente significativos que, debido a mecanismos de regulación post-transcripcional, no tendrían por qué traducirse en bajo número de niveles de proteína (Gygi y cols., 1999; Tian y cols., 2004). Además, la observación de que el marcaje en estas células es morfológicamente equivalente al descrito en otras células descritas como células que contienen mRNA de Reelina (compárese, por ejemplo, las Figuras 18A, 20E, 21E, 24C, 25D y E, 27C, G y E, o 27I) también sugiere que existe expresión de Reelina en ellas. Una segunda posibilidad es que el marcaje revele Reelina internalizada en vesículas después de unirse a sus receptores lipoprotéicos (D'Arcangelo y cols., 1999; Morimura y cols., 2005); así, estas células no tendrían por qué expresar mRNA de Reelina.

I.2 REELINA SECRETADA ES ABUNDANTE EN ALGUNOS NEUROPILOS RICOS EN ESPINAS.

Numerosas áreas de neuropilo muestran un inmunomarcaje punteado y variable en intensidad. No pudimos diferenciar si este tipo de marcaje correspondía a Reelina localizada dentro de las finas terminales axónicas, o en dendritas distales y espinas, o si se localizaba, una vez secretada, en la ECM. Sin embargo, la apariencia del inmunomarcaje en microscopía óptica recuerda mucho a la descrita para otras moléculas de la ECM (Dityatev y Schachner, 2003). Curiosamente, el mayor nivel de intensidad se encuentra en neuropilos como el estrato lacunoso-molecular de CA1, la subcapa Ia de la corteza piriforme, la subcapa Ia del isocortex o la capa molecular de la corteza cerebelosa, neuropilos conocidos por su elevada concentración de espinas dendríticas. Este tipo de tinción del neuropilo se ha descrito en regiones cerebrales equivalentes en roedores, carnívoros y primates, incluyendo humano (Miyata y cols., 1996; Drakew y cols., 1998; Pesold y cols., 1998; Rodríguez y cols., 2000; Pérez-García y cols., 2001; Martínez-Cerdeño y Clascá, 2002; Martínez-Cerdeño y cols., 2002, 2003; Deguchi y cols., 2003; Roberts y cols., 2005). Los estudios en microscopía electrónica han identificado Reelina secretada cerca de las dendritas y en lugares extrasinápticos de las espinas dendríticas (Rodríguez y cols., 2000; Pappas y cols., 2001, 2003). En el

cerebro adulto, las espinas dendríticas son lugares donde ocurren cambios estructurales rápidos inducidos por la actividad que se han correlacionado con cambios duraderos a largo plazo en la eficacia sináptica, tales como la potenciación o depresión a largo plazo (Yuste y Bonhoeffer, 2001; Dityatev y Schachner, 2003; Berardi y cols., 2004; Oray y cols., 2004). Además, existe evidencia directa para la remodelación de las espinas inducida por la actividad en algunos de los neuropilos anteriormente descritos ricos en el contenido de Reelina (Geinisman y cols., 1992; Klintsova y Greenough, 1999; Weeks y cols., 1999; Yuste y Bonhoeffer, 2001; Oray y cols., 2004).

La evidencia de la que disponemos sobre la implicación de Reelina en la modulación de la plasticidad sináptica ha aumentado rápidamente en los últimos años (D'Arcangelo, 2005). Debido a su conocida habilidad para influenciar la adhesividad de membrana y/o la dinámica del citoesqueleto durante el neurodesarrollo, el hecho de encontrarnos inmunomarcaje en áreas de neuropilo, cerca de las espinas dendríticas, nos hace pensar que podría estar, de algún modo, regulando la remodelación sináptica (Impagnatiello y cols., 1998; Rodríguez y cols., 2000; Rice y cols., 2001). Hay datos que sugieren que detrás de esta acción podría estar actuando un mecanismo serín-proteásico (Quatrochi y cols., 2002; Dityatev y Schachner, 2003). Estudios electrofisiológicos en rodajas de hipocampo muestran que la señalización mediada por Reelina a través de sus receptores lipoprotéicos, los cuales están implicados en la modulación de la potenciación a largo plazo, podría ser una evidencia directa para la implicación de Reelina en plasticidad sináptica (Weeber y cols., 2002). Se ha demostrado recientemente que este efecto depende de la señalización mediada por Reelina a través de una variante de splicing del receptor Apoer2 que modularía directamente el receptor NMDA (NMDAr) (Beffert y cols., 2005; Chen y cols., 2005). El NMDAr es una molécula clave en la inducción de la potenciación a largo plazo, y cambios sinápticos estructurales y funcionales dependientes de la actividad. Recientemente se ha demostrado que la señalización mediada por Reelina regula la composición de las subunidades del NMDAr, por lo que Reelina estaría implicada en la regulación de periodos críticos para la plasticidad sináptica durante el desarrollo tardío (Sinagra y cols., 2005). Nuestros datos sobre la elevada concentración selectiva de Reelina en varios neuropilos ricos en espinas dendríticas podrían, por tanto, indicar que Reelina se encuentra en principio disponible en estos circuitos corticales para eventualmente poder modular cambios en la actividad sináptica.

I.3 TRANSPORTE Y SECRECIÓN A DISTANCIA DE REELINA EN VÍAS NERVIOSAS ADULTAS.

En el cerebro, Reelina es transportada por axones y secretada sólo por neuronas (D'Arcangelo y cols., 1997; Alcántara y cols., 1998; Derer y cols., 2001; Pappas y cols., 2003); así, las fuentes de Reelina en una ECM dada se pueden localizar en neuronas y/o terminales de una vía aferente que sintetice Reelina.

La mayoría de los neuropilos reactivos para Reelina descritos en este trabajo contienen al menos algunas neuronas que expresan Reelina, que serían una fuente obvia de Reelina para la proteína encontrada en la ECM. Curiosamente, sin embargo, nuestros datos también muestran que una vía aferente extrínseca podría ser una fuente de Reelina. Esta posibilidad es particularmente clara para la proyección de las células mitrales a áreas olfativas del telencéfalo basal. Las células mitrales adultas expresan altos niveles de mRNA de Reelina (Alcántara y cols., 1998), sus axones (LOT) contienen partículas inmunorreactivas (Pappas y cols., 2003; presentes resultados), y sus campos terminales en la subcapa Ia de la capa molecular de las áreas olfativas (Price, 1973) y se corresponden exactamente con las áreas fuertemente inmunorreactivas (Misaki y cols., 2004; presentes resultados). Que las células mitrales originen estas áreas de neuropilo reactivo para Reelina está, además, apoyado por el hecho de que algunas de estas áreas, como el tubérculo olfatorio y AOL, están prácticamente desprovistos de neuronas locales que expresen Reelina (Figs. 18E y 19A). Un patrón equivalente lo presentan las células de origen, axones y neuropilo terminal de otras vías largas. Por ejemplo, las células de las capas entorrinales II y III expresan mRNA de Reelina (Alcántara y cols., 1998; Haas y cols., 2000), y sus axones contienen partículas inmunorreactivas (Figs. 24 C-E), así como su neuropilo terminal en el CA y DG se corresponde exactamente con una banda intensa de tinción para Reelina en la ECM (Fig. 24F). Una situación similar debe estar ocurriendo en algunas proyecciones retino-mesencefálicas (Fig. 26). La distribución observada del neuropilo teñido en las capas superficiales de los colículos superiores y los núcleos ópticos accesorios, los cuales reciben proyecciones desde la retina, sugiere que algunas células de los ganglios de la retina secretan Reelina en las áreas diana del mesencéfalo. La presencia del mRNA de Reelina y la misma proteína en una población de células ganglionares de la retina apoya (Schiffmann et al., 1997; Rice et al., 2001; presentes resultados) apoyan adicionalmente esta posibilidad. En otros casos, la fuente de niveles elevados de proteína en la ECM parece que se localizan a corta distancia. Esto fue primeramente descrito para los

axones de las células granulares del cerebelo que secretan Reelina en la ECM de la capa molecular (Miyata y cols., 1996; Pesold y cols., 1998; presentes resultados). Igualmente, el marcado del neuropilo en la subcapa Ia de isocorteza (Pesold y cols., 1998; Rodríguez y cols., 2000, 2002; Pérez-García y cols., 2001; Deguchi y cols., 2003; Roberts y cols., 2005; presentes resultados) se debe originar, al menos en parte, en la innervación selectiva de esta subcapa por las células de Martinotti (Wang y cols., 2004), la mayoría de las cuales expresan, en principio, Reelina en la isocorteza adulta (Alcántara y cols., 1998; Pesold y cols., 1998, 1999).

En resumen, la evidencia de la que disponemos es consistente con la posibilidad de que Reelina sea acumulada en algunas áreas de neuropilo alejadas de los somas celulares que la estarían sintetizando, e incluso en áreas donde las células no la expresan. Se requerirían experimentos de lesión axonal, o experimentos con agentes bloqueantes del transporte axonal, para confirmar de un modo directo el posible flujo axonal de Reelina en algunas de estas vías, pudiendo darnos, incluso, una medida sobre la secreción de Reelina.

I.4 TIPOS CELULARES INMUNORREACTIVOS EN EL TELENCEFALO.

La morfología y distribución de las interneuronas inmunorreactivas en la isocorteza, corteza entorrinal e hipocampo apoyan las observaciones de estudios anteriores en roedor adulto (Ikeda y Terashima, 1997; Alcántara y cols., 1998; Drake y cols., 1998; Pesold y cols., 1998, 1999; Haas y cols., 2000; Pérez-García y cols., 2001). En el hipocampo, todas las células teñidas muestran la morfología típica de interneuronas y, además, colocalizan con GABA (Figs. 24, 24G y H). En la corteza entorrinal, Reelina se localiza tanto en células piramidales de capas II-III como en interneuronas (Figs. 24A y B). En la isocorteza, Reelina se localiza en numerosas interneuronas en todas las capas, pero también en una considerable población de células piramidales no GABAérgicas en capa V. Estas observaciones son importantes, ya que apoyan los datos de Pesold (Pesold y cols., 1998, 1999) que mostraban un bajo pero consistente nivel tanto de mRNA como de proteína en las células piramidales, datos contrarios a estudios que concluyeron que en la isocorteza sólo expresaban o contenían Reelina las interneuronas (Alcántara y cols., 1998; Pérez-García y cols., 2001). En concreto, Pesold y cols. informaron de que alrededor de un 30% de las células de la isocorteza que expresan el mRNA de Reelina no eran GABAérgicas, y prestaron atención a que algunas de ellas tenían una morfología piramidal. Nuestros datos (Figs.

20, 22 y 23) confirman y amplían estas observaciones, mostrando que, en efecto, una gran población de células piramidales no GABAérgicas de capa V contienen Reelina.

Curiosamente, estos hallazgos en roedor adulto están en consonancia con los datos aportados para numerosas células piramidales de isocorteza de primate adulto, incluyendo humanos (Rodríguez y cols., 2000; Martínez-Cerdeño y cols., 2002; Deguchi y cols., 2003; Roberts y cols., 2005).

Además, en rata numerosas neuronas estriatales contienen bajos niveles de Reelina (Fig. 19), en concordancia con los datos disponibles para carnívoros adultos (Martínez-Cerdeño y cols., 2003) y primates no humanos (Martínez-Cerdeño y cols., 2002). El contenido de Reelina de estas neuronas parece apagarse durante la edad adulta. Las células reactivas más intensas se encuentran preferentemente localizadas en los compartimentos estriosomales. Estos hallazgos concuerdan con los datos publicados sobre el mRNA de Reelina (Alcántara y cols., 1998) y proteína (Nishikawa y cols., 1999) en estriado postnatal en roedores, con una localización preferencial en los estriosomas. Alcántara y cols., (1998), de todas formas, no detectaron mRNA de reelina en el estriado de ratón adulto; debido a que las ribosondas utilizadas en los mismos experimentos no parece que pudieran detectar bajos niveles de mRNA en células piramidales en isocorteza de adulto, es posible que tampoco detectasen bajos niveles de mRNA en el estriado. Otra alternativa es que nuestro inmunomarcaje en neuronas estriatales corresponda a la Reelina internalizada en endosomas (D'Arcangelo y cols., 1999; Morimura y cols., 2005).

Los presentes resultados que varios núcleos dorsales del tálamo contienen células reactivas. Las células marcadas en los núcleos anterodorsal, paraventricular e intralaminar anterior deben corresponder a neuronas de proyección, ya que estos núcleos carecen de interneuronas intrínsecas en roedores (Arcelli y cols., 1997). Por otra parte, la distribución, morfología y la estricta y consistente colocalización con GABA indican que las neuronas que contienen Reelina en los núcleos DLG y LP (Fig. 22) corresponden a las interneuronas descritas en estos núcleos del tálamo de rata (Ohara y cols., 1983; Arcelli y cols., 1997).

Las células que contienen Reelina son numerosas en otras regiones diencefálicas (Puelles y Rubenstein, 2003) como el epitálamo, zona limitans intratálámica (ZLI; Kitamura y cols., 1997), pretálamo y pretecho. Durante el desarrollo, curiosamente, la eminencia pretalámica y derivados de ZLI expresan altos niveles de mRNA de Reelina (Alcántara y cols., 1998). Aquí hemos mostrado que Reelina sigue presente en los

derivados adultos de estas estructuras embrionarias (Kitamura y cols., 1997; Alcántara y cols., 1998; Nakagawa y O'Leary, 2001; Hayes y cols., 2003) como el núcleo geniculado lateral, la lámina intergeniculada, las neuronas de la lámina medular externa, reuniens ventral y algunos subnúcleos del núcleo paraventricular hipotalámico.

I.5 OBSERVACIONES COMPARATIVAS.

Complementando los datos publicados en macaco y hurón (Martínez-Cerdeño y cols., 2002, 2003), los datos aquí presentados en rata revelan un patrón básico conservado de localización de la proteína Reelina en poblaciones equivalentes neuronales, tractos de axones y áreas de neuropilos del telencéfalo. Tal consistencia hace relevantes las diferencias observadas entre especies en el contenido de la proteína en determinadas poblaciones neuronales. Este es el caso, por ejemplo, de las células piramidales o el de las células talámicas. Virtualmente todas las células piramidales de isocorteza contienen Reelina en macaco; en la rata, son muchas de las células piramidales de capa V las que la contienen; en cambio, en el hurón sólo algunas ocasionales células piramidales de capa V son inmunorreactivas. En macaco, el subículo y las células piramidales de CA son inmunorreactivas; en rata, sólo las células piramidales del parasubículo contienen Reelina, y en hurón no existe reactividad ni para las células piramidales en el CA ni en el subículo. Asimismo, en macaco y hurón, un gran número de neuronas contienen Reelina a través de todo el tálamo, mientras que en rata este tipo de células queda limitado a unos pocos núcleos talámicos. La evidencia disponible gracias a los fósiles y a la genética molecular indica que rata y macaco debieron divergir de un ancestro común hace 80-90 millones de años, mientras que la línea del hurón se debió separar antes, hace unos 90-100 millones de años (Murphy y cols., 2004). Así, desde una perspectiva evolutiva, no debe sorprendernos las diferencias interespecíficas encontradas sobre el procesamiento de la proteína ni de su expresión por diferentes poblaciones neuronales, aún más si se comparan estructuras telencefálicas que han evolucionado independientemente en cada linaje (Striedter, 2004). Además, la comparación entre las tres especies indica que Reelina es más abundante y está más ampliamente distribuida en el cerebro de primate; esto es llamativo considerando que Reelina regula los sustratos sinápticos para el aprendizaje y la memoria (D'Arcangelo, 2005).

PARTE II.

La presente tesis aporta la primera descripción sistemática de la población de neuronas GABAérgicas corticales y subcorticales que forman el denso y característico neuropilo GABA de capa I. Nuestros resultados muestran que el mayor aporte inhibitorio (alrededor del 90%) proviene de interneuronas corticales situadas en todas las capas corticales, en especial de las células de Martinotti. Curiosamente, este resultado se repite en los resultados obtenidos para Reelina.

El 10% restante de los axones GABA lo aportarían estructuras subcorticales no talámicas. Estos axones corresponderían en su mayoría a poblaciones de neuronas magnocelulares situadas en el prosencéfalo basal, en torno al globo pálido. Otra estructura que inerva capa I y que es inmunorreactiva a GABA es la zona incerta, aunque en menor medida.

II.1 CONSIDERACIONES METODOLÓGICAS.

Para identificar los somas de origen de los axones que inervan la capa I hemos empleado una técnica de impregnación transpial de esta capa con trazadores axonales retrógrados. En nuestros resultados, las neuronas marcadas desde la capa I son mucho más abundantes que lo que se infiere de los trabajos publicados previamente, en los que esta cuestión, además, se había examinado de un modo menos sistemático. Por ello, aunque usamos una técnica ya empleada, discutiremos algunas de las modificaciones en el procedimiento de aplicación del trazador y en los métodos de análisis, que explican, a nuestro juicio, las importantes diferencias entre nuestros hallazgos y los de estudios previos.

Los dos objetivos fundamentales al realizar estos depósitos fueron: a) limitar el depósito a la capa I cortical y b) conseguir con el trazador rellenar el soma de las neuronas corticales y subcorticales a larga distancia desde la capa I, teniendo en cuenta que es posible que solo una fracción mínima de toda la membrana axonal entrase en contacto con el depósito. En relación a este último punto, el modo en que se examinan los resultados tiene mucha importancia, a la hora de detectar las neuronas tenuemente marcadas y distinguir las sin error de la señal de fondo.

Un método empleado en algunos estudios previos fue la inyección directa del trazador en la capa I (Parnavelas y cols., 1981; Penny y cols., 1982; Mitani y cols., 1987). Como estos depósitos tienden a ser esferoideos, para evitar la contaminación de capas profundas debían ser necesariamente de tamaño muy pequeño; probablemente por ello, obtuvieron un escaso marcado retrógrado. La alternativa empleada por otros

autores fue la utilización de depósitos epipiales del trazador. En este caso, el trazador se aplica fuera del propio tejido neural, desde donde debe atravesar la envoltura meníngea, la lámina basal y la membrana limitante glial hasta acceder al neuropilo. Además, el trazador así depositado puede ser lavado por el líquido cefalorraquídeo. En estas condiciones, la impregnación de la capa I por el trazador depende del juego entre la capacidad de penetración del trazador y la permeabilidad de la meninge, lámina basal y membrana limitante glial

Para lograr facilitar el paso del trazador a través de la piamadre y limitante glial los distintos autores probaron estrategias diferentes. En ocasiones, la piamadre fue perforada directamente, otras veces, se aplicaron previamente al depósito del trazador, detergentes o fricciones con agentes irritantes como el ácido acético (Carey y cols., 1979a, 1979b; Rieck y Carey 1984, 1985; Rausell y Avendaño, 1985; Avendaño y cols., 1990; Rausell y Jones, 1991, 1992).

El tipo de trazador empleado también es un elemento importante, ya que la capacidad “lesiva” del mismo sobre las meninges puede facilitar su penetración. En este sentido, los fluorocromos como DY y FB son más lesivos que HRP (Bentivoglio y cols., 1980; Köbbert y cols., 2000). Las distintas concentraciones del trazador también ha sido un factor tenido en cuenta. En animales de mayor tamaño como el mono, se han empleado concentraciones más altas que en otros de menor tamaño como la rata (Rausell y Jones, 1991, 1992; Mitchell y Cauller, 2001).

Otra estrategia adicional utilizada para facilitar la penetración ha sido prolongar el tiempo de exposición al trazador, dejándolo “*in situ*” el tiempo de supervivencia del animal. Además de facilitar la penetración, la exposición prolongada puede tener mucha importancia para hacer posible el relleno del soma de neuronas cuyos axones estén muy ramificados, ya que aunque la captación por unidad de tiempo sea escasa, se favorece la progresiva acumulación del trazador en el soma.

Nuestra experiencia indica que en la rata, cuando las concentraciones de fluorocromos son mayores al 2%, es difícil que el trazador quede limitado a la capa I, incluso aunque el tiempo de exposición sea breve (como sugiere el análisis de los depósitos ilustrados por Mitchell y Cauller, 2001). Sin embargo, en la exposición prolongada (7 días) a concentraciones menores parece alcanzarse un punto de equilibrio, en el que el trazador no sobrepasa la capa I, y se consigue un buen relleno de las neuronas talámicas.

Además, pensamos que el modo de examen del material obtenido también tiene mucha importancia para explicar las diferencias entre nuestros resultados y los de estudios previos. La capacidad de detectar células marcadas depende, por tratarse de fluorocromos, a) de la señal fluorescente emitida, que es directamente proporcional a la intensidad con que son excitados, por ello hemos utilizado fuentes ultravioleta de mercurio de 100W, y b) de la capacidad de los objetivos para captar la emisión fluorescente (que depende directamente del área de la lente). En este sentido, nosotros hemos empleado objetivos Nikon WD, con diámetros de la lente mayores que los estándar. Otra crucial modificación al método de análisis respecto a todos los estudios anteriores ha sido realizar el análisis del marcado sobre imágenes digitales, eliminando los problemas de fotoblanqueado inherentes al examen bajo la luz ultravioleta al aumento que se requiere para resolver adecuadamente la presencia de marcado.

Un problema siempre presente en los estudios neuroanatómicos basados en depósitos de trazadores es la interpretación de la zona desde la que existe transporte efectivo del trazador. En nuestros resultados observamos que un halo fluorescente que se extiende en muchos casos a todo el grosor de la capa I. Sin embargo, el análisis del patrón de marcado en el tálamo indica que la captación y el transporte del trazador solo se ha originado en la zona más superficial de la capa (subcapa Ia) (Rubio-Garrido y cols., 2007).

El uso de los anticuerpos utilizados en la presente tesis (GABA, SOM, CB, CR, Reelina) ha sido previamente descrita en la literatura, y todos los anticuerpos empleados han mostrado tener una alta especificidad para sus antígenos correspondientes en distintas regiones cerebrales (Kawaguchi y Kubota, 1998; Gonchar y Burkhalter, 2002; Martínez-Cerdeño, 2002, 2003). No obstante, se realizaron controles adicionales para cada anticuerpo. En cada inmunohistoquímica e inmunofluorescencia, la omisión del anticuerpo primario de la solución de incubación (como control negativo) hizo desaparecer la señal inmunorreactiva en todos nuestros experimentos. Además, y también para cada anticuerpo primario, se utilizaron de diferentes casas comerciales y/o de distinto huésped, así como distintos revelados (histoquímica y fluorescencia), obteniéndose siempre similares resultados. Adicionalmente para el anticuerpo de Reelina se caracterizó la especificidad con un experimento de preadsorción y western (véase Material y Métodos). También se comprobó que el método de

desemascaramiento de epítomos no afectaba la detección de los antígenos por los anticuerpos.

Para las inmunohistoquímicas de marcaje simple a nivel de microscopía óptica elegimos el método de la inmunoperoxidasa debido a que el producto de la reacción inmune es un precipitado de color marrón que difunde por los perfiles neuronales inmunorreactivos, haciéndolos fácilmente reconocibles en las secciones de tejido (Graham y Karnovsky, 1965, 1966). También utilizamos este método para determinar la especificidad y concentración ideal de los anticuerpos primarios. En los estudios de inmunofluorescencias analizadas mediante microscopía confocal, se utilizaron anticuerpos secundarios unidos a fluorocromos con distintas longitudes de ondas para así evitar el entrecruzamiento de señales (crosstalk). Además, con el objetivo de comprobar si la inmunofluorescencia correspondía o no a autofluorescencia del tejido, se obtuvieron imágenes control de secciones de tejido en donde se había omitido el anticuerpo primario, siendo reemplazado por suero normal de la especie del anticuerpo secundario.

Respecto al fijador utilizado en el estudio de la caracterización de células GABAérgicas proyectantes a capa I, se analizaron los animales perfundidos con PFA 4%. Esto nos permitía el uso de todos los anticuerpos primarios para su combinación, incluyendo el rabbit anti-GABA. Se realizaron pruebas control para el anticuerpo anti-GABA mediante inmunohistoquímicas en animales perfundidos con PFA 4% con o sin glutaraldehído (al 0.2% y al 2%). Los resultados obtenidos no diferían significativamente de un tejido a otro. Sí se observó, sin embargo, una mayor penetración del anticuerpo. Estos resultados estarían acordes a los estudios de Pow y cols. (1995) sobre el uso de PFA 4% en la detección de neurotransmisores mediante inmunohistoquímica. Según sus resultados (y los obtenidos en esta tesis), para esta técnica, el uso de PFA (sin glutaraldehído) sigue dotando de la misma capacidad de reconocimiento y especificidad para el anticuerpo, y sólo variaría su penetración en el grosor del tejido, que aumentaría; además, el uso de PFA 4% (comparado al uso de los fijadores que contienen glutaraldehído) permitiría disminuir la autofluorescencia del tejido (Pow y cols., 1995).

Añadido a lo anterior, en nuestros resultados obtuvimos, tal y como estaba ya descrito (DeFelipe y cols., 1997; Hof y cols., 1999), que no todas las células CB+ contienen GABA, por lo que en general, no consideramos que estemos detectando GABA de manera inespecífica en nuestras inmunofluorescencias.

Para los métodos de recuento se ha realizado la toma de microfotografías cada 4 μm de grosor moviéndonos en el eje z , y hemos analizado todo el grosor del tejido. Hemos tenido en cuenta el volumen de los somas en el tejido para asegurarnos que hubiera una correcta colocalización para los distintos marcadores escogidos en las células marcadas retrógradamente. Tras el recuento de los somas positivos para cada marcador en cada segmento (aproximadamente 200 μm de ancho para cada caso), se realizaron las gráficas del número de células así marcadas como la media de éstas entre cuatro animales. Esto nos puede dar una idea de la disposición laminar de las células proyectantes según nos acercamos a capa I cortical. Sin embargo, como sólo hemos estudiado cuatro animales, estamos en el límite del número mínimo de casos para realizar una buena estadística poblacional.

Debido a que nuestro material nos permitía disponer de una serie para estudiar las células GABA+ proyectantes a capa I, contamos en tres animales el número total de este tipo de células en corteza y en estructuras subcorticales, y las tomamos como un todo. De aquí se pudo sacar una proporción, de nuevo aproximada, del número de células GABA proyectantes ubicadas en estructuras subcorticales respecto a las encontradas en corteza, expresadas cada una como un porcentaje del total. De este cálculo se desprende que, en principio, aproximadamente el 90 % de la inhibición que le llega a capa I estaría procediendo de la propia corteza. Para el cálculo de células proyectantes GABA+ en núcleo subcortical dado, el cálculo se hizo estudiando en todo el núcleo las células GABA+ FB+ respecto al total de células FB+ en una serie cada caso de depósito. Este razonamiento de cálculo ha sido el utilizado en esta tesis siempre que se ha querido conocer los porcentajes de células proyectantes para algún marcador respecto del total de células positivas para el marcador deseado (por ejemplo, el cálculo de células SOM+ proyectantes es respecto al total de células SOM+; ver apartado II.4.4 de Resultados). Una vez más, todos estos cálculos nos darían proporciones aproximativas, ya que jugamos con una serie por animal y disponemos del número mínimo de animales para realizar una buena estadística.

II.2 LOS AFERENTES CORTICO-CORTICALES A CAPA I DE LARGA DISTANCIA NO SON GABAÉRGICOS.

Hemos analizado la distribución de los somas que proyectan ipsilateralmente a capa I de tres áreas corticales (S1, V1 y M1). Nuestros datos son consistentes con estudios similares previos sobre la inervación cortico-cortical de la capa I de cortezas

somatosensorial primaria (Cauller y cols., 1998) y motora primaria (Mitchel y Cauller, 2001). En esta tesis, además, se describen por primera vez la distribución de los somas cuyos axones inervan capa I en corteza visual primaria. La distribución de estos somas es similar al descrito para las cortezas somatosensorial primaria (Cauller y cols., 1998) y motora primaria (Mitchel y Cauller, 2001). En él, los somas proyectantes también se distribuyen en las áreas asociativas secundarias y corteza cingular y retrosplenial. Este patrón se correspondería con el patrón básico de proyección retrógrada o *feedback*, es decir, son proyecciones que estarían reentrando al área primaria la información procesada en un área cortical de orden superior (Cauller y Connors, 1994; Cauller y cols., 1998).

Los datos que hemos obtenido sobre la naturaleza de estas proyecciones a capa I muestran que, al menos ipsilateralmente, todas serían excitatorias, ya que carecen de inmunorreactividad para GABA (ver Resultados). Esto está en concordancia con la creencia de que sólo las células excitatorias proyectan extrínsecamente de área a área cortical (Conti y Manzoni, 1994) y con los datos obtenidos en trabajos de electrofisiología (Swadlow, 1974). Hay algunos autores, sin embargo, que en rata han descrito proyecciones de naturaleza GABAérgica ipsilaterales del área 18 a la 17 y viceversa (McDonald y Burkhalter, 1993), de SII a SI (Fabri y Manzoni, 1996) o, incluso, a través del cuerpo calloso (Gonchar y cols., 1995). Sin embargo, en estos trabajos se realizaban inyecciones que ocupaban todo el grosor de la corteza, por lo que no se podía identificar exclusivamente si las células GABA que parecen proyectar extrínsecamente alcanzaban capa I. Con nuestro método de depósito de trazador epipial, no se ha encontrado ningún soma GABA retrógradamente marcado.

Además, tal y como estaba descrito en la literatura, nuestros datos confirman que en la rata existe una masiva proyección a capa I cortical desde neuronas situadas en la capa VII (Clancy y Cauller, 1999). La localización de estas células se extiende en el eje rostro-caudal y en el antero-medial a partir del depósito epipial, donde estarían convergiendo sus proyecciones axonales. Nuestro análisis descarta por primera vez su posible naturaleza GABAérgica, ya que estas neuronas marcadas retrógradamente desde capa I no presentan inmunorreactividad positiva para GABA. Este es el primer estudio que profundiza en la caracterización de las células de la lamina subgrisea proyectantes a capa I.

II.3 LOS AXONES DEL PROSENCÉFALO BASAL Y DE ZONA INCERTA PROYECTAN A CAPA I Y CONTIENEN GABA.

Nuestros resultados muestran que las estructuras no talámicas que inervan la capa I se localizan a lo largo de todo el eje rostro-caudal, desde el prosencéfalo basal hasta el tronco del encéfalo, aunque en una proporción menor (~10%) respecto a la inervación a capa I originada en la propia corteza (~90%). Estos resultados son el primer estudio sistemático que recoge las estructuras subcorticales no talámicas que proyectan específicamente a capa I. La literatura indicaba que, en roedores, una posible fuente del neuropilo GABAérgico podía provenir de aferentes a larga distancia desde determinadas estructuras subcorticales no talámicas (Nicolelis y cols., 1995; Kowiński y cols., 2001; Sarter y Bruno, 2004). Hemos examinado estas estructuras (claustró, prosencéfalo basal y zona incerta) realizando una colocación entre el trazador retrógrado FB y el marcador GABA. De las tres estructuras, nuestros datos indican que sólo el EGP proyecta de manera inhibitoria los tres tipos de corteza analizadas (S1, V1, M1). El tipo de células marcadas retrógradamente e inmunorreactivas a GABA parecen corresponder a la población de neuronas magnocelulares que conforman el núcleo basal de Meynert (Mufson y cols., 2003). Este núcleo destaca como fuente de inervación a la corteza. La proyección desde el prosencéfalo basal está bien documentada en la literatura, que indica que es dispersa en su origen y se distribuye en corteza de un modo difuso (Avendaño y Llamas, 1984; Sarter y Bruno, 2003). Aunque se conocía que en rata existe una proyección de naturaleza inhibitoria desde el prosencéfalo basal (Gritti y cols., 1997; Sarter y Bruno, 2003), este es el primer estudio que muestra que este tipo de inervación puede alcanzar capa I.

Este trabajo también es el primer estudio dirigido exclusivamente a la inervación específica de capa I cortical en la identificación de la naturaleza inhibitoria de las supuestas células de la zona incerta. Nuestros resultados muestran que, en principio, sólo la capa I del área cortical S1 estaría recibiendo inhibición desde zona incerta dorsal, en una proporción de 1:2 respecto al total de células proyectantes encontradas. Que sea S1 quien reciba inhibición desde esta estructura subtalámica está en concordancia con los datos aportados por Nicolelis y cols., (1995), cuyas inyecciones en todo el grosor cortical se restringían a esta área.

Los datos obtenidos para el claustró son los primeros aportando una colocación con GABA (véase Kowiński y cols., 2001). En roedores, su proyección a capa I cortical está ya recogida en la literatura (Zhang y cols., 2001). Sin embargo, su

naturaleza no está bien caracterizada (véase Kowiński y cols., 2001). Nuestros datos muestran que, al menos la inervación que llega a capa I es, en general, no GABAérgica. Esto parece apoyar la evidencia existente que hay en carnívoros, la cual apunta que la proyección claustró-cortical es, exclusivamente, excitatoria (Pérez-Cerda y cols., 1996).

II.4 EL ORIGEN FUNDAMENTAL DEL PLEXO GABAérgico EN CADA PUNTO DE CAPA I CORTICAL SON LAS INTERNEURONAS SITUADAS BAJO ESE PUNTO.

La característica fundamental de la evolución y el desarrollo cortical es su parcelación en áreas citoarquitectónicas funcionalmente distintas. Éstas están compuestas por columnas radiales de neuronas que comparten propiedades funcionales comunes, reciben información de la periferia y se interconectan mediante una profusa asociación de axones (Rakic, 2006). La minicolumna cortical, tomada como la unidad funcional de la corteza, está separada en un eje que contiene las neuronas piramidales de capa V y una matriz alrededor de células piramidales ubicadas en capa II-III. Estas dendritas apicales están alojadas en capa I inmersas en un neuropilo denso GABAérgico (Jones, 1984; Vogt, 1991; Cauller, 1995; Shlosberg y cols., 2003). Nuestros resultados muestran que este neuropilo inhibitorio está formado básicamente (~90%) por tres tipos de interneuronas corticales dispuestas radialmente desde el depósito superficial del trazador. Su identificación bioquímica mostró que se trata de células reactivas en su mayoría a SOM+ y SOM+CB+ en todas las capas y, en menor medida, CR+ y CR+CB+.

Las células de Martinotti son células GABAérgicas localizadas en todo el grosor cortical cuyo axón, por definición, alcanza y arboriza en capa I cortical. Bioquímicamente se caracterizan por contener SOM (Wang y cols., 2004). Sin embargo, no todas las células reactivas a SOM+ son células de Martinotti, pero sí lo son si además proyectan a capa I (DeFelipe, 1997; Gonchar y Burkhalter, 1997; Kawaguchi y Kondo, 2002; Markram y cols., 2004; Ma y cols., 2006). Las células doblemente marcadas con SOM y CB nos estarían marcando un subtipo de células de Martinotti caracterizadas en roedores en la capa II-III de corteza (Ma y cols., 2006). Nuestros resultados confirman y extienden estos datos a capas inferiores (V-VII).

Por otra parte, el contenido en CB y CR en las células doble-bouquet está bien caracterizado en roedores y en primate humano y no humano (Kawaguchi y Kubota,

1996; DeFelipe, 1997; del Río y DeFelipe, 1997; Gonchar y Burkhalter, 1997; Markram y cols., 2004). Además, las células bipolares sólo son reactivas a CR (Kawaguchi y Kubota, 1996; DeFelipe, 1997; Gonchar y Burkhalter, 1997; Markram y cols., 2004). Tradicionalmente se ha registrado en la literatura que las células doble-bouquet inervaban dendritas basales, y no dendritas apicales, y que sus dendritas alcanzan todo el grosor de capa I (DeFelipe, 1997). Sin embargo, Kawaguchi (1995) mostró que el axón de células bipolares y doble-bouquet previamente registradas en capa II-III (algunos somas también se encontraron en el borde de capa V) en corteza frontal de rata podía inervar capa I, independientemente de su árbol dendrítico. Se ha descrito en capa I neuropilo reactivo para CR y CB de calcio tanto en primate (DeFelipe y cols., 1999) como en roedores (Shlosberg y cols., 2003). Es posible, por tanto, que el origen de este neuropilo pudiera provenir de células bipolares y doble-bouquet. Alternativamente, las células intrínsecas de capa I también presentan reactividad para CR y CB (datos no mostrados; Markram y cols., 2004), y sus axones típicamente inervan capa I recorriéndola horizontalmente (Hestrin y Armstrong, 1996; Zhou y Hablitz, 1996; Markram y cols., 2004).

Debido a que nuestro método de depósito epipial puede ser captado tanto por el axón como por la dendrita que se aloje en la mitad externa de capa I, y que los axones de las células bipolares y doble-bouquet que llegan a capa I no suelen ni invadir la mitad externa de capa I ni arborizar en esta capa I (Kawaguchi, 1995), es posible que el marcaje retrógrado de FB en somas CR+ y CR+CB+ sea debido, más posiblemente, a que sean las dendritas las que estén captando el trazador en capa I.

II.5 LAS INTERNEURONAS CORTICALES QUE INERVAN CAPA I CORTICAL SECRETAN REELINA.

Nuestros datos confirman estudios previos en roedores que señalan a las células GABAérgicas como células que contienen Reelina (Alcántara y cols., 1998; Pesold y cols., 1998), de manera constitutiva e independiente de calcio (Lacor y cols., 2000). Nuestros datos muestran que su aporte a la capa I se realizaría justamente por las células GABAérgicas que la están inervando (células de Martinotti), tal y como apuntaban trabajos de ISH de Reelina y colocolización con proteínas ligadoras de calcio y neuropéptidos en ratón (Alcántara y cols., 1998). Curiosamente, a este tipo de células se las ha dado un papel modulador sobre las células piramidales (de Felipe, 1993; Freund and Buzsáki, 1996). Por el contrario, las células en candelabro y en cesto

carecen aparentemente de la expresión de Reelina (Alcántara y cols., 1998).

Además, datos previos en roedores muestran que en capas II-III no se dan células CB+ que pudieran expresar Reelina (Alcántara y cols., 1998). Nuestros datos en rata muestran que en las capas superiores II-III sí se localizan células GABAérgicas que contienen CB y Reelina, ampliando pues, resultados previos. La existencia de células CB+ en capas superiores está bien caracterizado para roedores, carnívoros y primates (Hof y cols., 1999). Es también bien conocida la variabilidad de los niveles de proteínas ligadoras de calcio que pueden presentar las células (DeFelipe y cols., 1997; Hof y cols., 1999). En el ratón adulto no hay un estudio dirigido exclusivamente a estudiar las células CB+ que aparecen en corteza. Podría ocurrir así, que la concentración de anticuerpos utilizada por Alcántara y cols. (1998) para marcar interneuronas en su estudio de colocalización con ISH para reelina en ratón, fuera demasiado baja para la detección de todas las células que pudieran contener CB, o bien que en el ratón no se dé la misma citoarquitectura para las células CB+ como está descrita en rata.

CONCLUSIONES

En la presente Tesis hemos realizado un estudio sistemático sobre los componentes corticales y subcorticales que conforman el neuropilo GABAérgico de capa I, así como sobre la fuente de la proteína Reelina en neuritas y matriz extracelular de capa I. También se ha estudiado de manera sistemática la localización exacta de la proteína Reelina en el cerebro de la rata adulta.

Las principales conclusiones son:

1. Nuestros datos confirman y extienden los datos publicados hasta ahora sobre la localización de la proteína Reelina en rata.
2. Reelina se localiza a lo largo de todo el eje rostro-caudal del cerebro, y es más abundante en estructuras telencefálicas.
3. Reelina se encuentra presente en neuritas y matriz extracelular de capa I cortical, especialmente en neuropilos ricos en espinas dendríticas.
4. Hay evidencia de que Reelina sufre transporte axonal desde estructuras subcorticales alejadas y es secretada por ellas a la matriz extracelular.
5. Tanto células piramidales como interneuronas corticales contienen Reelina. Su secreción a la matriz extracelular de capa I podría venir dada por las células de Martinotti, células bipolares y células doble-bouquet.
6. La capa I presenta un abigarrado neuropilo GABAérgico. Los axones aferentes de larga distancia cortico-corticales, aunque abundantes, no se encuentran, en principio, como su fuente GABAérgica. Asimismo, la capa VII no posee células inmunorreactivas a GABA que proyecten a capa I.
7. Alrededor del 10 % de los axones GABAérgicos que alcanza capa I procede básicamente de una población de neuronas magnocelulares situadas en el prosencéfalo basal, en torno al globo pálido. Además, la zona incerta parece que podría estar aportando GABA exclusivamente a la capa I de SI. En cambio, el claustró no estaría, en general, aportando GABA a capa I.
8. El contingente más numeroso de axones GABA que llegan a capa I procede de interneuronas situadas radialmente bajo cada región cortical. Estas se sitúan en capas II-VI.
9. De entre las interneuronas que proyectan a capa I, la población más numerosa serían las células de Martinotti situadas en capas II-V, aunque preferentemente se localizan en capas II-V. Una población de células doble-bouquet y bipolares también podría proyectar a capa I.

BIBLIOGRAFÍA

- Aboitiz F, Morales D, Montiel J. (2003) The evolutionary origin of the mammalian isocortex: towards an integrated developmental and functional approach. *Behav Brain Sci.* 26(5):535-52.
- Alcántara S, Ruiz M, D’Arcangelo G, Ezan F, de Lecea L, Curran T, Sotelo C, Soriano E (1998). Regional and cellular patterns of reelin mRNA expression in the forebrain of the developing and adult mouse. *J Neurosci* 18: 7779-99.
- Amaral DG, Insausti R. (1992) Retrograde transport of D-[3H]-aspartate injected into the monkey amygdaloid complex. *Exp Brain Res.* 88(2):375-88.
- Amaral, D.G., Witter, M.P. (1994) Hippocampal formation. In Paxinos, G. (Ed.), *The Rat Nervous System*, 2nd edn. Academic Press, San Diego, pp. 443–493.
- Amiry-Moghaddam M, Frydenlund DS, Ottersen OP (2004). Anchoring of aquaporin-4 in brain: molecular mechanisms and implications for the physiology and pathophysiology of water transport. *Neuroscience* 129: 999-1010.
- Andersen, O.M., Benhayon, D., Curran, T., Willnow, T.E. (2003) Differential binding of ligands to the apolipoprotein E receptor 2. *Biochemistry*, 42, 9355–9364.
- Ang ES Jr, Haydar TF, Gluncic V, Rakic P. (2003) Four-dimensional migratory coordinates of GABAergic interneurons in the developing mouse cortex. *J Neurosci.* 23(13):5805-15.
- Arcelli, P., Frassoni, C., Regondi, M.C., De Biasi, S., Spreafico, R. (1997) GABAergic neurons in mammalian thalamus: a marker of thalamic complexity? *Brain Res. Bull.*, 42, 27–37.
- Avendaño C, Llamas A (1984). Thalamic and nonthalamic direct subcortical projections to association areas of the cat’s cerebral cortex. En *Cortical Integration*. Reinoso-Suárez F, Ajmone-Marsan C (Eds.) New York, Raven Press, pp: 195-221.
- Avendaño C, Stepniewska I, Rausell E, Reinoso-Suárez F (1990). Segregation and heterogeneity of thalamic cell populations projecting to superficial layers of posterior parietal cortex: a retrograde tracer study in cat and monkey. *Neuroscience* 39: 547-59.
- Azmitia, E.C., Segal, M. (1978) An autoradiographic analysis of the differential ascending projections of the dorsal and median raphe nuclei in the rat. *J. Comp. Neurol.* 179, 641-668.
- Bacon SJ, Headlam AJ, Gabbott PL, Smith AD. (1996) Amygdala input to medial prefrontal cortex (mPFC) in the rat: a light and electron microscope study. *Brain Res.* 720(1-2):211-9.
- Barbas H, Rempel-Clower N. (1997) Cortical structure predicts the pattern of corticocortical connections. *Cerebral Cortex.* 7:635-46.
- Barbas H, Saha S, Rempel-Clower N, Ghashghaei T. (2003) Serial pathways from primate prefrontal cortex to autonomic areas may influence emotional expression. *BMC Neurosci.* 10;4:25.
- Barstad K. E., Bear M. F. (1990) Basal forebrain projections to somatosensory cortex in the cat. *J. Neurophysiol.* 64 (4):1223-32.
- Baumann N y Pham-Dinh D. (2001) Biology of oligodendrocyte and myelin in the Mammalian Central Nervous System. *Physiol Rev* 81:871-927.
- Bayer L, Serefin M, Eggermann E, Saint-Mleux B, Machard D, Jones BE, Muhlethaler, M (2004). Exclusive postsynaptic action of hypocretin-orexin on sublayer 6b cortical neurons. *J Neurosci* 24(30): 6760-4.
- Benhayon, D., Magdaleno, S., Curran, T. (2003) Binding of purified Reelin to ApoER2 and VLDLR mediates tyrosine phosphorylation of Disabled-1. *Brain Res. Mol. Brain Res.*, 112, 33–45.
- Benes FM, Berretta S. GABAergic interneurons: implications for understanding schizophrenia and bipolar disorder. *Neuropsychopharmacology.* 2001 Jul;25(1):1-27.
- Bentivoglio M, Kuypers HG, Castman-Berrevoets CE, Loewe H, Dann O (1980). Two new fluorescent retrograde neural tracers which are transported over long distances. *Neurosci*

Lett 18: 25-30.

Beffert U, Weeber EJ, Durudas A, Qiu S, Masiulis I, Sweatt JD, Li WP, Adelman G, Frotscher M, Hammer RE, Herz J. (2005) Modulation of synaptic plasticity and memory by Reelin involves differential splicing of the lipoprotein receptor Apoer2. *Neuron* 18;47(4):567-79.

Berardi N, Pizzorusso T, Maffei L. (2004) Extracellular matrix and visual cortical plasticity: freeing the synapse. *Neuron*. 44(6):905-8.

Berger T, Larkum ME, Lüscher H-R (2001). A high I_h channel density in the distal apical dendrite of layer 5 pyramidal cells increases bidirectional attenuation of EPSPs. *J Neurophysiol* 85: 855–868.

Bormann J. (2000) The 'ABC' of GABA receptors. *Trends Pharmacol Sci.*21(1):16-9.

Boyson, S.J., McGonigle, P., Molino., P.B. (1986) Quantitative autoradiographic localization of the D1 and D2 subtypes of dopamine receptors in rat brain. *J. Neurosci.* 6, 3177-3188.

Brightman MW (1965). The distribution within the brain of ferritin injected into cerebrospinal fluid compartments. II. Parenchymal distribution. *Am J Anat* 117: 193-219.

Buhl EH, Singer W. (1989) The callosal projection in cat visual cortex as revealed by a combination of retrograde tracing and intracellular injection. *Exp Brain Res.* 75(3):470-6.

Callaway EM. (2002) Cell type specificity of local cortical connections. *J Neurocytol.* 31(3-5):231-7.

Cameron, P., Mundigl, O. & De Camilli, P. (1993) Traffic of synaptic proteins in polarized and nonpolarized cells. *J. Cell Sci. Suppl.*, 17, 93–100.

Campbell MJ, Lewis DA, Foote SL, Morrison JH (1987). Distribution of choline acetyltransferase-, serotonin-, dopamine-beta-hydroxylase-, tyrosine hydroxylase-immunoreactive fibers in monkey primary auditory cortex. *J Comp Neurol* 261: 209-20.

Carey RG, Fitzpatrick D, Diamond IT (1979a). Thalamic projections to layer I of striate cortex

shown by retrograde transport of horseradish peroxidase. *Science* 203: 556-9.

Carey RG, Fitzpatrick D, Diamond IT (1979b). Layer I of striate cortex of *Tupaia glis* and *Galago senegalensis*: projections from thalamus and claustrum revealed by retrograde transport of horseradish peroxidase. *J Comp Neurol* 186: 393-437.

Cauli B, Audinat E, Lambolez B, Angulo MC, Ropert N, Tsuzuki K, Hestrin S, Rossier J. Molecular and physiological diversity of cortical nonpyramidal cells. *J Neurosci.* 1997 May 15;17(10):3894-906.

Caulier LJ, Connors BW (1994). Synaptic physiology of horizontal afferents to layer I in slices of rat SI neocortex. *J Neurosci* 14: 751-62.

Caulier LJ (1995). Layer I of primary sensory neocortex: where topdown converges upon bottom-up. *Behav Brain Res* 71: 163–70.

Caulier LJ, Clancy B, Connors BW (1998). Backward cortical projections to primary somatosensory cortex in rats extend long horizontal axons in layer I. *J Comp Neurol* 390: 297–310.

Chen, Y., Beffert, U., Ertunc, M., Tang, T.-S., Kavalali, E.T., Bezprozvanny, I. and Herz, J. (2005) Reelin modulates de NMDA receptor activity in cortical neurons. *J. Neurosci.*, 25:8209–8216.

Clancy B, Caulier LJ (1999). Widespread projections from subgriseal neurons (layer VII) to layer I in adult rat cortex. *J Comp Neurol* 407: 275-86.

Clapham DE. (1995) Calcium signaling. *Cell.* 80:259–268

Clascá F, Avendaño C, Roman-Gindo A, Llamas A, Reinoso-Suarez F (1992). Innervation from the claustrum of the frontal association and motor areas: axonal transport studies in the cat. *J Comp Neurol* 326: 402-422.

Clascá F, Llorente V, Martínez-Cerdeño V, Rubio-Garrido P. (2000) Early development of the layer I/marginal zone thalamocortical system in the ferret. *Eur J Neurosci* 12 Suppl 11:178.

Conti F., Manzoni T. (1994) The neurotransmitters and postsynaptic action of

- callosally projecting neurons, *Behav. Brain Res.* 64 :37-53.
- Cont F, Weinberg RJ. (1999) Shaping excitation at glutamatergic synapses. *Trends Neurosci.*22(10):451-8.
- Costa C, Harding B, Copp AJ. (2001) Neuronal migration defects in the Dreher (*Lmx1a*) mutant mouse: role of disorders of the glial limiting membrane. *Cereb Cortex.* 11(6):498-505.
- Creutzfeldt O. (1995) General neurophysiology of the cortex. *Cortex cerebri* Oxford: Oxford Science Publishers (pp) 131-163.
- Dammerman RS, Noctor SC, Kriegstein AR. Extrinsic GABAergic innervation of developing neocortical layer 1 in organotypic slice co-cultures. *J Comp Neurol.* 2000 Jul 17;423(1):112-20.
- D'Arcangelo, G., Miao, G.G., Chen, S.C., Soares, H.D., Morgan, J.I., Curran, T. (1995) A protein related to extracellular matrix proteins deleted in the mouse mutant *reeler*. *Nature*, 374, 719–723.
- D'Arcangelo, G., Nakajima, K., Miyata, T., Ogawa, M., Mikoshiba, K., Curran, T. (1997) Reelin is a secreted glycoprotein recognized by the CR-50 monoclonal antibody. *J. Neurosci.*, 17, 23–31.
- D'Arcangelo, G., Homayouni, R., Keshvara, L., Rice, D.S., Sheldon, M., Curran, T. (1999) Reelin is a ligand for lipoprotein receptors. *Neuron*, 24, 471–479.
- D'Arcangelo, G. (2005) Apoer2: a reelin receptor to remember. *Neuron*, 47, 471–473.
- de Bergeyck, V., Naerhuyzen, B., Goffinet, A.M. & Lambert de Rouvroit, C. (1998) A panel of monoclonal antibodies against reelin., the extracellular matrix protein defective in *reeler* mutant mice. *J. Neurosci. Methods*, 82, 17– 24.
- De Camilli, P., Moretti, M., Donini, S.D., Walter, U. y Lohmann, S.M. (1986) Heterogeneous distribution of the cAMP receptor protein RII in the nervous system, evidence for its intracellular accumulation on microtubules, microtubule-organizing centers and in the area of the Golgi complex. *J. Cell Biol.*, 103, 189–203.
- DeFelipe J. (1993) Neocortical neuronal diversity: chemical heterogeneity revealed by colocalization studies of classic neurotransmitters, neuropeptides, calcium-binding proteins, and cell surface molecules. *Cereb Cortex.* 3(4):273-89.
- DeFelipe J. (1997) Types of neurons, synaptic connections and chemical characteristics of cells immunoreactive for calbindin-D28K, parvalbumin and calretinin in the neocortex. *J. Of Chem. Neuroanat.* 14; 1-19.
- Defelipe J, Gonzalez-Albo MC, Del Rio MR, Elston GN. (1999) Distribution and patterns of connectivity of interneurons containing calbindin, calretinin, and parvalbumin in visual areas of the occipital and temporal lobes of the macaque monkey. *J Comp Neurol.* 412(3):515-26.
- DeFelipe J, Arellano JI, Gomez A, Azmitia EC, Munoz A. (2001) Pyramidal cell axons show a local specialization for GABA and 5-HT inputs in monkey and human cerebral cortex. *J Comp Neurol.* 23;433(1):148-55.
- Degenetais E, Thierry AM, Glowinski J, Gioanni, Y (2002). Electrophysiological properties of pyramidal neurons in the rat prefrontal cortex: an in vivo intracellular recording study. *Cereb Cortex* 12: 1-16.
- Deguchi, K., Inoue, K., Avila, W.E., Lopez-Terrada, D., Antalffy, B.A., Quattrocchi, C.C., Sheldon, M., Mikoshiba, K., D'Arcangelo, G., Armstrong, D.L. (2003) Reelin and disabled-1 expression in developing and mature human cortical neurons. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, 62, 676–684.
- Deller T, Haas CA, Naumann T, Joester A, Faissner A, Frotscher M. (1997) Up-regulation of astrocyte-derived tenascin-C correlates with neurite outgrowth in the rat dentate gyrus after unilateral entorhinal cortex lesion. *Neuroscience.* 81(3):829-4.
- Deller T, Haas CA, Frotscher M. (2000) Reorganization of the rat fascia dentata after a unilateral entorhinal cortex lesion. Role of the extracellular matrix. *Ann N Y Acad Sci.* 911:207-20.
- del Rio MR, DeFelipe J. (1997) Double bouquet cell axons in the human temporal neocortex: relationship to bundles of myelinated axons and colocalization of calretinin and calbindin D-28k immunoreactivities. *J Chem Neuroanat.* 13(4):243-51.
- Del Rio, J.A., Heimrich, B., Borrell, V., Forster,

- E., Drakew, A., Alcántara, S., Nakajima, K., Miyata, T., Ogawa, M., Mikoshiba, K., Derer, P., Frotscher, M., Soriano, E. (1997) A role for Cajal-Retzius cells and reelin in the development of hippocampal connections. *Nature*, 385, 70–74.
- Derer P (1979). Evidence for the occurrence of early modifications in de 'glia limitans' layer of the reeler mutant mouse. *Neurosci Lett* 13: 195-202.
- Derer, P., Derer, M. & Goffinet, A. (2001) Axonal secretion of Reelin by Cajal- Retzius cells: evidence from comparison of normal and Reln (Orl) mutant mice. *J. Comp. Neurol.*, 440, 136–143.
- Deschenes M, Bourassa J, Pinault D (1994). Corticothalamic projections from layer V cells in rat are collaterals of long-range corticofugal axons. *Brain Res* 664(1-2): 215-9
- Deschenes M, Veinante P, Zhang ZW (1998). The organization of corticothalamic projections: reciprocity versus parity. *Brain Res Brain Res Rev* 28: 286-308.
- Dityatev A, Schachner M. (2003) Extracellular matrix molecules and synaptic plasticity. *Nat Rev Neurosci.* 4(6):456-68.
- Dong, E., Caruncho, H., Liu, W.S., Smalheiser, N.R., Grayson, D.R., Costa, E., Guidotti, A. (2003) A reelin–integrin receptor interaction regulates Arc mRNA translation in synaptoneuroosomes. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 100, 5479–5484.
- Douglas RJ, Martin KA. A functional microcircuit for cat visual cortex. *J Physiol.* 1991;440:735-69.
- Drakew A, Frotscher M, Deller T, Ogawa M, Heimrich B. (1998) Developmental distribution of a reeler gene-related antigen in the rat hippocampal formation visualized by CR-50 immunocytochemistry. *Neuroscience*. 82(4):1079-86.
- Dulabon, L., Olson, E.C., Taglienti, M.G., Eisenhuth, S., McGrath, B., Walsh, C.A., Kreidberg, J.A., Anton, E.S. (2000) Reelin binds alpha3beta1 integrin and inhibits neuronal migration. *Neuron*, 27, 33–44.
- Eisenman LM (1985). Uptake of the fluorescent tracer fast blue from the cerebrospinal fluid of the rat. *Neurosci Lett* 60: 241-6.
- Erickson AC, Couchman JR (2000). Still more complexity in mammalian basement membranes. *J Histochem Cytochem* 48: 1291-306.
- Escobar MI, Pimienta H, Caviness VS Jr, Jacobson M, Crandall JE, Kosik KS (1986). Architecture of apical dendrites in the murine neocortex: dual apical dendritic systems. *Neuroscience*. 17: 975-89.
- Fairen A, Valverde F. (1979) Specific thalamocortical afferents and their presumptive targets in the visual cortex. A Golgi study. *Prog Brain Res*. 51:419-38.
- Fairén A, DeFelipe J, Regidor J. (1984) Nonpyramidal neurons: general account. *Cerebral cortex* New York: Plenum Press: 201-53.
- Fabri M. and Manzoni T. (1996) Glutamate decarboxylase immunoreactivity in corticocortical projecting neurons of rat somatic sensory cortex. *Neuroscience* 72:435–448.
- Fedelman ML. Pyramidal neurons. (1984) *Cerebral cortex*. New York: Plenum Press:123-200.
- Felleman DJ, Van Essen DC (1991). Distributed hierarchical processing in the primate cerebral cortex. *Cereb Cortex* 1: 1-47.
- Femino, A.M., Fay, F.S., Fogarty, K. & Singer, R.H. (1998) Visualization of single RNA transcripts in situ. *Science*, 280, 585–590.
- Feneis H y Dauber W. (2006) *Nomenclatura anatómica ilustrada* (5ª ed). Ed. Masson
- Flames N y Marín O. (2005) Developmental mechanisms underlying the generation of cortical interneuron diversity. *Neuron*. 5;46(3):377-81.
- Foote SL, Morrison JH (1987). Extrathalamic modulation of cortical function. *Annu Rev Neurosci* 10: 67-95.
- Freund TF, Buzsáki G (1996) Interneurons of the hippocampus. *Hippocampus* 6:347– 470.
- Fujiyama F, Furuta T, Kaneko T (2001). Immunocytochemical localization of candidates for vesicular glutamate transporters in the rat cerebral cortex. *J Comp Neurol* 435: 379-87.
- Gabbott PL, Somogyi P. (1986). Quantitative distribution of GABA-immunoreactive neurons

- in the visual cortex (area 17) of the cat. *Exp Brain Res.* 61(2):323-31.
- Gao WJ, Zheng ZH (2004). Target-specific differences in somatodendritic morphology of layer V pyramidal neurons in rat motor cortex. *J Comp Neurol* 476: 174-85.
- Geinisman, Y., de Toledo-Morrell, L., Morrell, F., Persina, I.S., Rossi, M. (1992) Structural synaptic plasticity associated with the induction of longterm potentiation is preserved in the dentate gyrus of aged rats. *Hippocampus*, 2, 445-456.
- Ghashghaei HT, Hilgetag CC, Barbas H.(2007) Sequence of information processing for emotions based on the anatomic dialogue between prefrontal cortex and amygdala. *Neuroimage*. 1;34(3):905-23.
- Gilbert CD. (1983) Microcircuitry of the visual cortex. *Ann Rev Neurosci.* 6: 217-47.
- Gibson JR, Beierlein M, Connors BW. (2005) Functional properties of electrical synapses between inhibitory interneurons of neocortical layer 4. *J Neurophysiol*. 93(1):467-80.
- Giros A, Morante J, Gil-Sanz C, Fairen A, Costell M. (2007) Perlecan controls neurogenesis in the developing telencephalon. *BMC Dev Biol.* 7:29.
- Gonchar Y.A., Johnson P.B. and Weinberg R.J. (1995) GABA-immunopositive neurons in rat neocortex with contralateral projections to S-I. *Brain Res.* 697:27-34.
- Gonchar Y, Burkhalter A. (1997) Three distinct families of GABAergic neurons in rat visual cortex. *Cereb Cortex* 7: 347-58.
- Gonchar Y, Burkhalter A. (1999) Connectivity of GABAergic calretinin-immunoreactive neurons in rat primary visual cortex. *Cereb Cortex*. 9(7):683-96.
- Gonchar Y, Turney S, Price JL, Burkhalter A. (2002) Axo-axonic synapses formed by somatostatin-expressing GABAergic neurons in rat and monkey visual cortex. *J Comp Neurol*. 443(1):1-14.
- Graham RC Jr, Karnovsky MJ. (1965) The histochemical demonstration of monoamine oxidase activity by coupled peroxidatic oxidation. *J Histochem Cytochem*. 13(7):604-5.
- Graham RC Jr, Karnovsky MJ. (1966) The early stages of absorption of injected horseradish peroxidase in the proximal tubules of mouse kidney: ultrastructural cytochemistry by a new technique. *J Histochem Cytochem*. 14(4):291-302.
- Gritti I, Mainville L, Mancina M, Jones BE. (1997) GABAergic and other noncholinergic basal forebrain neurons, together with cholinergic neurons, project to the mesocortex and isocortex in the rat. *J Comp Neurol*. 383(2):163-77.
- Gu, Q., Patel, B., Singer, W. (1990) The laminar distribution and postnatal development of serotonin-immunoreactive axons in the cat primary visual cortex. *Exp. Brain Res.* 8:257-266.
- Gu Q. (2002) Neuromodulatory transmitter systems in the cortex and their role in cortical plasticity. *Neuroscience*. 111(4):815-35.
- Guillery RW, Feig SL, Van Lieshout, DP (2001). Connections of higher order visual relays in the thalamus: a study of corticothalamic pathways in cats. *J Comp Neurol* 438: 66-85.
- Guillery RW. (2005) Is postnatal neocortical maturation hierarchical? *Trends Neurosci*. 28(10):512-7.
- Gupta A, Wang Y, Markram H. (2000) Organizing principles for a diversity of GABAergic interneurons and synapses in the neocortex. *Science*. 14;287(5451):273-8.
- Gygi, S.P., Rochon, Y., Franza, B.R., Aebersold, R. (1999) Correlation between protein and mRNA abundance in yeast. *Mol. Cell Biol.*, 19, 1720-1730.
- Haas, C.A., Deller, T., Krsnik, Z. & Tielsch, A., Woods, A., Frotscher, M. (2000) Entorhinal cortex lesion does not alter reelin messenger RNA expression in the dentate gyrus of young and adult rats. *Neuroscience*, 97, 25-31.
- Halfter W, Dong S, Yip YP, Willem M, Mayer U (2002). A critical function of the pial basement membrane in cortical histogenesis. *J Neurosci* 22: 6029-40.
- Hallman LE, Schofield BR, Lin C-S (1988). Dendritic morphology and axons collaterals of corticotectal, corticopontine, and callosal neurons in layer V of primary visual cortex of the hooded rat. *J Comp Neurol* 272: 149-60.

- Haman BN, Amaral DG, Alonso AA (2002). Morphological and electrophysiological characteristics of layer V neurons of the rat lateral entorhinal cortex. *J Comp Neurol* 451: 45-61.
- Hayes, S.G., Murray, K.D. & Jones, E.G. (2003) Two epochs in the development of gamma-aminobutyric acidergic neurons in the ferret thalamus. *J. Comp. Neurol.*, 463, 45-65.
- Herkenham M (1986). New perspectives on the organization and evolution of nonspecific thalamocortical projections. En *Cerebral Cortex Vol 5*, Jones EG, Peters A (eds.) New York, Plenum, pp: 403-445.
- Hestrin S, Armstrong WE (1996). Morphology and physiology of cortical neurons in layer I. *J Neurosci* 16(17): 5290-300.
- Heuer H, Christ S, Friedrichsen S, Brauer D, Winckler M, Bauer K, Raivich G (2003). Connective tissue growth factor: a novel marker of layer VII neurons in the rat cerebral cortex. *Neuroscience* 119(1): 43-52.
- Hof R, Glezer II, Condé F, et al. (1999) Cellular distribution of the calcium-binding proteins parvalbumin, calbindin, and calretinin in the neocortex of mammals: phylogenetic and developmental patterns. *Journal of Chemical Neuroanatomy*.16:77-116.
- Houser CR, Hendry SH, Jones EG, Vaughn JE (1983). Morphological diversity of immunocytochemically identified GABA neurons in the monkey sensory-motor cortex. *J Neurocytol* 12: 617-38.
- Ichinohe N, Fujiyama F, Kaneko T, Rokland KS (2003). Honeycomb-like mosaic at the border of layers 1 and 2 in the cerebral cortex. *J Neurosci* 23: 1372-82.
- Ichinohe N, Rockland KS (2004). Region specific micromodularity in the uppermost layers in primate cerebral cortex. *Cereb Cortex* 14: 1173-84.
- Ignatova, N., Sindic, C.J., Goffinet, A.M. (2004) Characterization of the various forms of the Reelin protein in the cerebrospinal fluid of normal subjects and in neurological diseases. *Neurobiol. Dis.*, 15, 326-330.
- Iijima K, Sato M, Kojima N, Ohtomo K. (1992) Immunocytochemical and in situ hybridization evidence for the coexistence of GABA and tyrosine hydroxylase in the rat locus ceruleus. *Anat Rec.* 234(4):593-604.
- Iijima K. (1993) Chemocytology of the rat locus ceruleus. *Histol Histopathol.* 8(3):581-91.
- Ikeda, Y. y Terashima, T. (1997) Expression of reelin, the gene responsible for the reeler mutation, in embryonic development and adulthood in the mouse. *Dev. Dyn.*, 210, 157-172.
- Impagnatiello F, Guidotti AR, Pesold C, Dwivedi Y, Caruncho H, Pisu MG, Uzunov DP, Smalheiser NR, Davis JM, Pandey GN, Pappas GD, Tueting P, Sharma RP, Costa E. (1998) A decrease of reelin expression as a putative vulnerability factor in schizophrenia. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 95(26):15718-23.
- Innocenti GM, Clarke S, Kraftsik R. Interchange of callosal and association projections in the developing visual cortex. *J Neurosci.* 1986 May;6(5):1384-409.
- Janusonis S, Gluncic V, Rakic P (2004). Early serotonergic projections to Cajal-Retzius cells: relevance for cortical development. *J Neurosci* 18: 1764-74.
- Jones EG (1984). History of cortical cytology. En *Cerebral Cortex*, vol 1. Cellular Components of the Cerebral Cortex. A Peters y EG Jones Eds. Plenum Press, New York, pp: 1-32.
- Jones EG (1998a). A new view of specific and nonspecific thalamocortical connections. *Adv Neurol* 77: 49-71.
- Jones EG (1998b). Viewpoint: the core and matrix of thalamic organization. *Neuroscience* 85: 331-45.
- Jones EG (2001). The thalamic matrix and thalamocortical synchrony. *Trends Neurosci* 24: 595-601.
- Jones EG (2002). Thalamic circuitry and thalamocortical synchrony. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 357: 1659-73.
- Jossin, Y., Ignatova, N., Hiesberger, T., Herz, J., Lambert de Rouvroit, C., Goffinet, A.M. (2004) The central fragment of Reelin, generated by proteolytic processing in vivo, is critical to its function during cortical plate development. *J. Neurosci.*, 24, 514-521.
- Kaneko T, Fujiyama F (2002). Complementary distribution of vesicular glutamate transporters

- in the central nervous system. *Neurosci Res* 42: 243-50.
- Karlen SJ, Krubitzer L. (2006) The evolution of the neocortex in mammals: intrinsic and extrinsic contributions to the cortical phenotype. *Novartis Found Symp.* 270:146-59;
- Kasper EM, Lubke J, Larkman AU, Blakemore C (1994). Pyramidal neurons in layer 5 of the rat visual cortex. III. Differential maturation of axon targeting, dendritic morphology, and electrophysiological properties. *J Comp Neurol* 339: 495-518.
- Kawaguchi Y, Kubota Y. (1993) Correlation of physiological subgroupings of nonpyramidal cells with parvalbumin- and calbindinD28k-immunoreactive neurons in layer V of rat frontal cortex. *J Neurophysiol.* 70(1):387-96.
- Kawaguchi Y. (1995) Physiological Subgroups of Nonpyramidal Cells with Specific Morphological Characteristics in Layer II/III of Rat Frontal Cortex. *The Journal of Neuroscience* 15(4): 2638-2655.
- Kawaguchi Y, Kubota Y. (1996) Physiological and morphological identification of somatostatin- or vasoactive intestinal polypeptide-containing cells among GABAergic cell subtypes in rat frontal cortex. *J Neurosci.* 16(8):2701-15.
- Kawaguchi Y, Kubota Y. (1997) GABAergic cell subtypes and their synaptic connections in rat frontal cortex. *Cereb Cortex* 7: 476-86.
- Kawaguchi Y, Kubota Y. (1998) Neurochemical features and synaptic connections of large physiologically-identified GABAergic cells in the rat frontal cortex. *Neuroscience* 85 (3): 677-701.
- Kawaguchi Y, Kondo S (2002) Parvalbumin, somatostatin and cholecystokinin as chemical markers for specific GABAergic interneuron types in the rat frontal cortex. *J Neurocytol* 31: 277-87.
- Keros S, Hablitz JJ. (2005) Ectopic action potential generation in cortical interneurons during synchronized GABA responses. *Neuroscience.* 131(4):833-42.
- Kitamura, K., Miura, H., Yanazawa, M., Miyashita, T., Kato, K. (1997) Expression patterns of Brx1 (Rieg gene), Sonic hedgehog, Nkx2.2, Dlx1 and Arx during zona limitans intrathalamica and embryonic ventral lateral geniculate nuclear formation. *Mech. Dev.*, 67, 83-96.
- Klintsova, A.Y., Greenough, W.T. (1999) Synaptic plasticity in cortical systems. *Curr. Opin. Neurobiol.*, 9, 203-208.
- Köbber C, Apps R, Bechmann I, Lanciego JL, Mey J, Thanos S. (2000) Current concepts in neuroanatomical tracing. *Prog Neurobiol* 62: 327-51.
- Koester SE, O'Leary DDM (1992). Functional classes of cortical projection neurons develop dendritic distinctions by class-specific sculpting of an early common pattern. *J Neurosci* 12: 1382-93.
- Koralek KA, Olavarria J, Killackey HP. (1990) Areal and laminar organization of corticocortical projections in the rat somatosensory cortex. *J Comp Neurol.* 8;299(2):133-50.
- Kowiński P, Timmermans JP, Morys J. (2001) Differentiation in the immunocytochemical features of intrinsic and cortically projecting neurons in the rat claustrum -- combined immunocytochemical and axonal transport study. *Brain Res.* 29;905(1-2):63-71.
- Krettek JE, Price JL. (1977) Projections from the amygdaloid complex to the cerebral cortex and thalamus in the rat and cat. *J Comp Neurol.* 172(4):687-722.
- Kubo, K., Mikoshiba, K. & Nakajima, K. (2002) Secreted Reelin molecules form homodimers. *Neurosci. Res.*, 43, 381-388.
- LaBerge D. (2006) Apical dendrite activity in cognition and consciousness. *Conscious Cogn.* 15(2):235-57.
- Lacor PN, Grayson DR, Auta J, Sugaya I, Costa E, Guidotti A. (2000) Reelin secretion from glutamatergic neurons in culture is independent from neurotransmitter regulation. *Proc Natl Acad Sci USA.* 97(7):3556-61.
- Lamme VAF, Super H, Spekreijse H (1998). Feedforward, horizontal and feedback processing in the visual cortex. *Curr Opin Neurobiol* 8: 529-535.
- Lambert de Rouvroit, C., de Bergcyck, V., Cortvrindt, C., Bar, I., Eeckhout, Y., Goffinet, A.M. (1999) Reelin, the extracellular matrix protein deficient in reeler mutant mice, is processed by a metalloproteinase. *Exp. Neurol.*,

156, 214–217.

Larkum ME, Kaiser KM, Sakmann B (1999). Calcium electrogenesis in distal apical dendrites of layer 5 pyramidal cells at a critical frequency of back-propagating action potentials. *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 14600-4

Larkum ME, Zhu JJ (2002). Signaling of layer 1 and whisker-evoked Ca²⁺ and Na⁺ APs in distal and terminal dendrites of rat neocortical pyramidal neurons in vitro and in vivo. *J Neurosci* 22: 6991–7005.

Larkum ME, Senn W, Luscher HR (2004). Top-down dendritic input increases the gain of layer 5 pyramidal neurons. *Cereb Cortex* 14(10): 1059-70.

Larkum ME, Waters J, Sakmann B, Helmchen F. (2007) Dendritic spikes in apical dendrites of neocortical layer 2/3 pyramidal neurons. *J Neurosci*. 22;27(34):8999-9008.

Le Brun Kempner T. y Galaburda AM. Principles of cytoarchitectonics. Cerebral cortex. New York: Plenum Press; 1984. p. 35-57.

Le Vay S. y Sheik H. (1981) The visual claustrum of the cat. *The Journal of Neurosci*. 1(9): 956-980.

Lewis, D.A., Campbell, M.J., Foote, S.L., Goldstein, M., Morrison, J.H. (1987) The distribution of tyrosine hydroxylase-immunoreactive fibers in primate neocortex is widespread but regionally specific. *J. Neurosci*. 7, 279-290.

Lewis DA. (1991) Distribution of choline acetyltransferase-immunoreactive axons in monkey frontal cortex. *Neuroscience*. 40(2):363-74.

Lewis DA, Hashimoto T, Volk DW. (2005) Cortical inhibitory neurons and schizophrenia. *Nat Rev Neurosci*. 6(4):312-24.

Li J, Schwark HD. (1994) Distribution and proportions of GABA-immunoreactive neurons in cat primary somatosensory cortex. *J Comp Neurol*. 15;343(3):353-61.

Lidov, H.G.W., Grzanna, R., Molliver, M.E. (1980) The serotonin innervation of the cerebral cortex in the rat. An immunohistochemical analysis. *Neuroscience* 5, 207-227.

Lin CS, Nicolelis MA, Schneider JS, Chapin JK. (1990) A major direct GABAergic pathway

from zona incerta to neocortex. *Science*. 248(4962):1553-6.

Lin RC, Nicolelis MA, Zhou HL, Chapin JK (1996). Calbindin-containing non-specific thalamocortical projecting neurons in the rat. *Brain Res* 711: 50-5.

Lin RC, Nicolelis MA, Chapin JK. (1997) Topographic and laminar organizations of the incertocortical pathway in rats. *Neuroscience* 81(3):641-51.

Lin JS. (2000) Brain structures and mechanisms involved in the control of cortical activation and wakefulness, with emphasis on the posterior hypothalamus and histaminergic neurons. *Sleep Med Rev*. 4(5):471-503.

Ling EA, Wong WC. (1993) The origin and nature of ramified and amoeboid microglia: a historical review and current concepts. *Glia*. 7(1):9-18.

Liu, Y., Cynader, M. (1994) Postnatal development and laminar distribution of noradrenergic fibers in cat visual cortex. *Dev. Brain Res*. 82, 90-94.

Liu WS, Pesold C, Rodriguez MA, Carboni G, Auta J, Lacor P, Larson J, Condie BG, Guidotti A, Costa E. (2001) Down-regulation of dendritic spine and glutamic acid decarboxylase 67 expressions in the reelin haploinsufficient heterozygous reeler mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 13;98(6):3477-82.

Liu J, Morel A, Wannier T, Rouiller EM. (2002) Origins of callosal projections to the supplementary motor area (SMA): a direct comparison between pre-SMA and SMA-proper in macaque monkeys. *J Comp Neurol*. 28;443(1):71-85.

Lorente de Nó, R (1938). The cerebral cortex: architecture, intracortical connections and motor projections. En: *The Physiology of the Nervous System*, Fulton JF (Ed). Oxford University Press: Oxford, London pp. 291-340.

Luppino G, Rizzolatti G. (2000) The organization of the frontal motor cortex. *News Phys Sciences*. 15:219-24.

Llamas A, Clascá F, Avendaño C (1989). Amigdaloid innervation of the frontal cortex in cats. *Rev Esp Fisiol* 45 (Suppl): 139-149.

Llinás RR, Leznik E, Urbano FJ (2002). Temporal binding via cortical coincidence

- detection of specific and nonspecific thalamocortical inputs: a voltage-dependent dye-imaging study in mouse brain slices. *Proc Natl Acad Sci USA* 99(1): 449-54
- Ma Y, Hu H, Berrebi AS, Mathers PH, Agmosn A. (2006) Distinct subtypes of somatostatin-containing neocortical interneurons revealed in transgenic mice. *J Neurosci.* 26: 5069-82.
- Marín O, Rubenstein JL (2001). A long, remarkable journey: tangential migration in the telencephalon. *Nat Rev Neurosci* 2: 780-90.
- Marín-Padilla M (1992). Ontogenesis of the pyramidal cell of the mammalian neocortex and developmental cytoarchitectonics: a unifying theory. *J Comp Neurol* 321: 223-40.
- 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.
- Martínez-Cerdeño V, Clasca F. (2002) Reelin immunoreactivity in the adult neocortex: a comparative study in rodents, carnivores, and non-human primates. *Brain Res Bull.* 1;57(3-4):485-8.
- Martínez-Cerdeño, V., Galazo, M.J., Cavada, C., Clascá, F. (2002) Reelin immunoreactivity in the adult primate brain. Intracellular localization in projecting and local circuit neurons of the cerebral cortex, hippocampus and subcortical regions. *Cereb. Cortex*, 12, 1298–1311.
- Martínez-Cerdeño V, Galazo MJ, Clasca F. (2003) Reelin-immunoreactive neurons, axons, and neuropil in the adult ferret brain: evidence for axonal secretion of reelin in long axonal pathways. *J Comp Neurol.* 463(1):92-116.
- 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.
- Maunsell JH, van Essen DC (1983). The connections of the middle temporal visual area (MT) and their relationship to a cortical hierarchy in the macaque monkey. *J Neurosci* 12: 2563-2586.
- McDonald C.T. and Burkhalter A. (1993) Organization of long-range inhibitory connections within rat visual cortex. *J. Neurosci.* 13: 768–781.
- McDonald AJ. (1996) Glutamate and aspartate immunoreactive neurons of the rat basolateral amygdala: colocalization of excitatory amino acids and projections to the limbic circuit. *J Comp Neurol.* 12;365(3):367-79.
- McDonald AJ. (2003) Is there an amygdala and how far does it extend? An anatomical perspective. *Ann N Y Acad Sci.* 985:1-21.
- McKay, B.E., Molineux, M.L. & Turner, R.W. (2004) Biotin is endogenously expressed in select regions of the rat central nervous system. *J. Comp. Neurol.*, 473, 86–96.
- Merriam EB, Netoff TI, Banks MI. (2005) Bistable network behavior of layer I interneurons in auditory cortex. *J Neurosci.* 29;25(26):6175-86.
- Misaki, K., Kikkawa, S., Terashima, T. (2004) Reelin-expressing neurons in the anterior commissure and corpus callosum of the rat. *Brain Res. Dev. Brain Res.*, 148:89-96.
- Mitani A, Itoh K, Mizuno N (1987). Distribution and size of thalamic neurons projecting to layer I of the auditory cortical fields of the cat compared to those projecting to layer IV. *J Comp Neurol* 257: 105-21.
- Mitchell BD, Cauller LJ. (2001) Corticocortical and thalamocortical projections to layer I of the frontal neocortex in rats. *Brain Res* 921: 68-77.
- Miyashita T, Nishimura-Akiyoshi S, Itohara S, Rockland KS. (2005) Strong expression of NETRIN-G2 in the monkey claustrum. *Neuroscience.*136(2):487-96.
- Miyata T, Nakajima K, Aruga J, Takahashi S, Ikenaka K, Mikoshiba K, Ogawa M. (1996) Distribution of a reeler gene-related antigen in the developing cerebellum: an immunohistochemical study with an allogeneic antibody CR-50 on normal and reeler mice. *J Comp Neurol.* 372(2):215-28.
- Molnar Z, Cheung AF. (2006) Toward the classification of subpopulations of layer V pyramidal projection neurons. *Neurosci Res* 55: 105-15.
- Morimura, T., Hattori, M., Ogawa, M. & Mikoshiba, K. (2005) Disabled-1 regulates the intracellular trafficking of reelin receptors. *J. Biol. Chem.*, 280, 16901–16908.
- Morrison, J.H., Grzanna, R., Molliver, M.E.,

- Coyle, J.T. (1978) The distribution and orientation of noradrenergic fibers in neocortex of the rat: an immunofluorescence study. *J. Comp. Neurol.* 181:17-40.
- Morrison, J.H., Foote, S.L., Molliver, M.E., Bloom, F.E., Lidov, H.G.W. (1982) Noradrenalinergic and serotonergic fibers innervate complementary layers in monkey primary visual cortex: an immunohistochemical study. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79, 2401-2405.
- Morse DE, Low FN. (1972) The fine structure of the pia mater of the rat. *Am J Anat* 133: 349-67.
- Mufson EJ, Ginsberg SD, Ikonovic MD, DeKosky ST. (2003) Human cholinergic basal forebrain: chemoanatomy and neurologic dysfunction. *J Chem Neuroanat.* 26(4):233-42.
- Murphy, W.J., Pevzner, P.A. & O'Brien, S.J. (2004) Mammalian phylogenomics comes of age. *Trends Genet.*, 20, 631–639.
- Nakagawa, Y., O'Leary, D.D. (2001) Combinatorial expression patterns of LIM-homeodomain and other regulatory genes parcellate developing thalamus. *J. Neurosci.*, 21, 2711–2725.
- Nakajima, K., Mikoshiba, K., Miyata, T., Kudo, C., Ogawa, M. (1997) Disruption of hippocampal development in vivo by CR-50 mAb against reelin. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 94, 8196–8201.
- Nicholson C, Sykova E. (1998) Extracellular space structure revealed by diffusion analysis. *Trends Neurosci.* 21(5):207-15.
- Nicolelis MA, Chapin JK, Lin RC. (1995) Development of direct GABAergic projections from the zona incerta to the somatosensory cortex of the rat. *Neuroscience* 65(2):609-31.
- Nieuwenhuys R. (1994) The neocortex. An overview of its evolutionary development, structural organization and synaptology. *Anat Embryol* 190: 307-37.
- Nimchinsky EA, Hof PR, Young WG, Morrison JH. (1996) Neurochemical, morphologic, and laminar characterization of cortical projection neurons in the cingulate motor areas of the macaque monkey. *J Comp Neurol.* 7;374(1):136-60.
- Nishikawa, S., Goto, S., Hamasaki, T., Ogawa, M., Ushio, Y. (1999) Transient and compartmental expression of the reeler gene product reelin in the developing rat striatum. *Brain Res.*, 850, 244–248.
- Niu S, Renfro A, Quattrocchi CC, Sheldon M, D'Arcangelo G. (2004) Reelin promotes hippocampal dendrite development through the VLDLR/ApoER2Dab1 pathway. *Neuron.*8;41(1): 71-84.
- Noctor SC, Flint AC, Weissman TA, Dammerman RS, Kriegstein AR (2001). Neurons derived from radial glial cells establish radial units in neocortex. *Nature* 409: 714-20
- Novikova L, Novikov L, Kellerth JO (1997). Persistent neuronal labeling by retrograde fluorescent tracers: a comparison between Fast Blue, Fluoro-Gold and various dextran conjugates. *J Neurosci Meth* 74: 9-15.
- Ogawa, M., Miyata, T., Nakajima, K., Yagyu, K., Seike, M., Ikenaka, K., Yamamoto, H. & Mikoshiba, K. (1995) The reeler gene-associated antigen on Cajal-Retzius neurons is a crucial molecule for laminar organization of cortical neurons. *Neuron*, 14, 899–912.
- Ohara, P.T., Lieberman, A.R., Hunt, S.P. & Wu, J.Y. (1983) Neural elements containing glutamic acid decarboxylase (GAD) in the dorsal lateral geniculate nucleus of the rat; immunohistochemical studies by light and electron microscopy. *Neuroscience*, 8:189–211.
- Olavarria J, Van Sluyters RC. (1983) Widespread callosal connections in infragranular visual cortex of the rat. *Brain Res.* 21;279(1-2):233-7.
- Olson IR, Chun MM, Allison T (2001). Contextual guidance of attention. Human intracranial event-related potential evidence for feedback modulation in anatomically early, temporally late stages of visual processing. *Brain* 124: 1417–1425.
- Oray, S., Majewska, A., Sur, M. (2004) Dendritic spine dynamics are regulated by monocular deprivation and extracellular matrix degradation. *Neuron*, 44, 1021–1030.
- Pappas, G.D., Kriho, V. & Pesold, C. (2001) Reelin in the extracellular matrix and dendritic spines of the cortex and hippocampus: a comparison between wild type and heterozygous reeler mice by immunoelectron microscopy. *J. Neurocytol.*, 30, 413–425.

- Pappas, G.D., Kriho, V., Liu, W.S., Tremolizzo, L., Lugli, G. & Larson, J. (2003) Immunocytochemical localization of reelin in the olfactory bulb of the heterozygous reeler mouse: an animal model for schizophrenia. *Neurol. Res.*, 25, 819–830.
- Parnavelas JG, Chatzissavidou A, Burne RA (1981). Subcortical projections to layer I of the visual cortex, area 17, of the rat. *Exp Brain Res* 41: 184-7.
- Paxinos G, Watson C (1998). The rat brain in stereotaxic coordinates. Academic Press, San Diego.
- Penny GR, Itoh K, Diamond IT (1982). Cells of different sizes in the ventral nuclei project to different layers of the somatic cortex in the cat. *Brain Res* 242: 55-65.
- Perea G, Araque A. (2006) Synaptic information processing by astrocytes. *J Physiol Paris*. 99(2-3):92-7.
- Perea G, Araque A. (2007) Astrocytes potentiate transmitter release at single hippocampal synapses. *Science*. 317(5841):1083-6.
- Pérez-Cerda F., Martínez-Millán L., Matute C. (1996) Anatomical evidence for glutamate and/or aspartate as neurotransmitters in the geniculo-, claustr-, and cortico-cortical pathways to the cat striate cortex. *J. Comp. Neurol.* 373 422–432.
- Pérez-García CG, González-Delgado FJ, Suárez-Sola ML, Castro-Fuentes R, Martín-Trujillo JM, Ferrer-Torres R, Meyer G. (2001) Reelin-immunoreactive neurons in the adult vertebrate pallium. *J Chem Neuroanat.* 21(1):41-51.
- Pesold, C., Impagnatiello, F., Pisu, M.G., Uzunov, D.P., Costa, E., Guidotti, A. y Caruncho, H.J. (1998) Reelin is preferentially expressed in neurons synthesizing gamma-aminobutyric acid in cortex and hippocampus of adult rats. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 95, 3221–3226.
- Pesold C, Pisu MG, Impagnatiello F, Uzunov DP, Caruncho HJ. (1998) Simultaneous detection of glutamic acid decarboxylase and reelin mRNA in adult rat neurons using in situ hybridization and immunofluorescence. *Brain Res Brain Res Protoc.* 3(2):155-60.
- Pesold C, Liu WS, Guidotti A, Costa E, Caruncho HJ. (1999) Cortical bitufted, horizontal, and Martinotti cells preferentially express and secrete reelin into perineuronal nets, nonsynaptically modulating gene expression. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 96(6):3217-22.
- Peters A, Jones EG. (1984) Classification of cortical neurons. *Cerebral cortex*. New York: Plenum Press.: 107-21.
- Peters A (1991). Aging in monkey cerebral cortex. En *Cerebral Cortex* vol. 9. Normal and altered states of function. Peters A, Jones EG eds. Plenum Press, New York: 485-510.
- Peters A, Sethares C (2002). The effects of age on the cells in layer 1 of primate cerebral cortex. *Cereb Cortex* 12: 27-36.
- Peters Y, Barnhardt NE, O'Donnell P. (2004) Prefrontal cortical up states are synchronized with ventral tegmental area activity. *Synapse*. 52(2):143-52.
- Phillipson OT. (a) (1979) A Golgi study of the ventral tegmental area of Tsai and interfascicular nucleus in the rat. *J Comp Neurol.*187(1):99-115.
- Phillipson OT. (b) (1979) The cytoarchitecture of the interfascicular nucleus and ventral tegmental area of Tsai in the rat. *J Comp Neurol.* 187(1):85-98.
- Polleux F, Morrow T, Ghosh A (2000). Semaphorin 3A is a chemoattractant for cortical apical dendrites. *Nature* 404: 567-73.
- Pow DV, Wright LL, Vaney DI. (1995) The immunocytochemical detection of amino-acid neurotransmitters in paraformaldehyde-fixed tissues. *J Neurosci Methods.* 56(2):115-23.
- Price, J.L. (1973) An autoradiographic study of complementary laminar patterns of termination of afferent fibers to the olfactory cortex. *J. Comp. Neurol.*, 150, 87–108.
- Prieto JJ, Peterson BA, Winer JA (1994). Laminar distribution and neural targets of GABAergic axon terminals in cat primary auditory cortex (AI). *J Comp Neurol* 334: 383-402.
- Prieto JJ, Peterson BA, Winer JA. (1994) Morphology and spatial distribution of GABAergic neurons in cat primary auditory cortex (AI). *J Comp Neurol.* 15;344(3):349-82.
- Pesold C, Liu WS, Guidotti A, Costa E,

- Puelles L (2001). Brain segmentation and forebrain development in amniotas. *Brain Res Bull* 55: 695-710.
- Puelles, L. & Rubenstein, J.L. (2003) Forebrain gene expression domains and the evolving prosomeric model. *Trends Neurosci.*, 26: 469–476.
- Qi HX, Jain N, Preuss TM, Kass JH. (1999) Inverted pyramidal neurons in chimpanzee sensorimotor cortex are revealed by immunostaining with monoclonal antibody SMI-32. *Somatosens Mot Res.* 16(1):49-56.
- Quattrocchi, C.C., Wannenes, F., Persico, A.M., Ciafre, S.A., D'Arcangelo, G., Farace, M.G., Keller, F. (2002) Reelin is a serine protease of the extracellular matrix. *J. Biol. Chem.*, 277, 303–309.
- Rash BG, Grove EA. (2006) Area and layer patterning in the developing cerebral cortex. *Curr Opin Neurobiol.* 16(1):25-34.
- Rakic P (1972). Mode of cell migration to the superficial layers of fetal monkey neocortex. *J Comp Neurol.* 145: 61-83.
- Rakic P. (1988) "Specification of cerebral cortical areas". *Science* 241 (4862): 170–176.
- Rakic S, Zecevic N. (2003) Emerging complexity of layer I in human cerebral cortex. *Cereb Cortex.* 13(10): 1072-83.
- Rakic P. (2006) A century of progress in corticogenesis: from silver impregnation to genetic engineering. *Cereb Cortex.* 16 Suppl 1:i3-17.
- Rausell E, Avendaño C (1985). Thalamocortical neurons projecting to superficial and to deep layers in parietal, frontal and prefrontal regions in the cat. *BrainRes.* 347: 159-65.
- Rausell E, Jones EG (1991) Histochemical and immunocytochemical compartments of the thalamic VPM nucleus in monkeys and their relationship to the representational map. *J Neurosci* 11: 210-25
- Rausell E, Jones EG (1992). Chemically distinct compartments of the thalamic VPM nucleus in monkeys relay principal and spinal trigeminal pathways to different layers of the somatosensory cortex. *J Neurosci* 11: 226-37.
- Raynolds GP, Beasley CL. (2001) Gabaergic neuronal subtypes in the human frontal cortex development and deficits in schizophrenia. *Journal of Chemical Neuroanatomy.* 22:95-100.
- Reep RL, Goodwin GS. (1988) Layer VII of rodent cerebral cortex. *Neurosci Lett.* 90(1-2):15-20.
- Reep RL. (2000) Cortical layer VII and persistent subplate cells in mammalian brains. *Brain Behav Evol* 56(4): 212-34.
- Rice DS, Curran T. (2001) Role of the reelin signaling pathway in central nervous system development. *Annu Rev Neurosci.* 24:1005-39.
- Richfield EK, Young AB, Penney JB. (1989) Comparative distributions of dopamine D-1 and D-2 receptors in the cerebral cortex of rats, cats, and monkeys. *J Comp Neurol.* 286(4):409-26.
- Rieck R, Carey RG. (1984) Evidence for a laminar organization of basal forebrain afferents to the visual cortex. *Brain Res.* 297(2):374-80.
- Rizzolatti G, Luppino G. (1998) The organization of the cortical motor system: new concepts. *Electroencephalography and Clinical Neurophysiology.* 106:238-96.
- Roberts, R.C., Xu, L., Roche, J.K., Kirkpatrick, B. (2005) Ultrastructural localization of reelin in the cortex in post-mortem human brain. *J. Comp. Neurol.*, 482, 294–308.
- Rockland KS, Pandya DN. (1986) Topography of occipital lobe commissural connections in the rhesus monkey. *Brain Res.* 12;365(1):174-8.
- Rodriguez MA, Pesold C, Liu WS, Kriho V, Guidotti A, Pappas GD, Costa E. (2000) Colocalization of integrin receptors and reelin in dendritic spine postsynaptic densities of adult nonhuman primate cortex. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 97(7):3550-5.
- Rubio-Garrido P, Perez-de-Manzo F, Clasca F. (2007) Calcium-binding proteins as markers of layer-I projecting vs. deep layer-projecting thalamocortical neurons: A double-labeling analysis in the rat. *Neuroscience.*
- Sáez-Valero, J., Costell, M., Sjogren, M., Andreasen, N., Blennow, K., Luque, J.M. (2003) Altered levels of cerebrospinal fluid reelin in frontotemporal dementia and Alzheimer's disease. *J. Neurosci. Res.*, 72, 132–136.
- Sakakibara, S., Misaki, K., Terashima, T.

- (2003) Cytoarchitecture and fiber pattern of the superior colliculus are disrupted in the Shaking Rat Kawasaki. *Brain Res. Dev. Brain Res.*, 141:1–13.
- Sanada, K., Gupta, A., Tsai, L.H. (2004) Disabled-1-regulated adhesion of migrating neurons to radial glial fiber contributes to neuronal positioning during early corticogenesis. *Neuron*, 42, 197–211.
- Saper CB. (1985) Organization of cerebral cortical afferent systems in the rat. II. Hypothalamocortical projections. *J Comp Neurol*. 1;237(1):21-46.
- Saper, C.B., Sawchenko, P.E. (2003) Magic peptides, magic antibodies: guidelines for appropriate controls for immunohistochemistry. *J. Comp. Neurol.*, 465, 161–163.
- Sarter M y Bruno JP. (2002) The neglected constituent of the basal forebrain corticopetal projection system: GABAergic projections. *European Journal of Neuroscience* 15, 1867-73.
- Schiffmann, S.N., Bernier, B., Goffinet, A.M. (1997) Reelin mRNA expression during mouse brain development. *Eur. J. Neurosci.*, 9, 1055–1071.
- Schiller J, Schiller Y, Stuart G, Sakmann B (1997). Calcium action potentials restricted to the distal apical dendrites of rat neocortical pyramidal neurons. *J Physiol (Lond)* 505: 605–616.
- Schmid, R.S., Jo, R., Shelton, S., Kreidberg, J.A., Anton, E.S. (2005) Reelin, integrin and Dab1 interactions during embryonic cerebral cortical development. *Cereb. Cortex*, 15, 1632–1636.
- Schmued LC, Fallon JH (1986). Fluoro-Gold: a new fluorescent retrograde axonal tracer with numerous unique properties. *Brain Res* 377: 147-54.
- Sefton, A.J., Dreher, B. (1994) Visual System. In: Paxinos, G. (Ed.), *The Rat Nervous System*, 2nd edn. Academic Press, San Diego, pp. 833–898.
- Shepherd GM, Brayton RK, Miller JP, Segev I, Rinzel J, Rall W. (1985) Signal enhancement in distal cortical dendrites by means of interactions between active dendritic spines. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 82(7):2192-5.
- Shi SR, Cote RJ, Taylor CR. (2001) Antigen retrieval techniques: current perspectives. *J Histochem Cytochem*. 49(8):931-7.
- Shlosberg D, Patrick SL, Buskila Y, Amitai Y (2003). Inhibitory effect of mouse neocortex layer I on the underlying cellular network. *Eur J Neurosci* 18(10): 2751-9.
- Sinagra, M., Verrier, D., Frankova, D., Korwek, K.M., Blahos, J., Weeber, E.J., Manzoni, O.L. & Chavis, P. (2005) Reelin, very-low-density lipoprotein receptor, and apolipoprotein E receptor 2 control somatic NMDA receptor composition during hippocampal maturation in vitro. *J. Neurosci.*, 25, 6127–6136.
- Sjöström PJ, Häusser M. (2006) A cooperative switch determines the sign of synaptic plasticity in distal dendrites of neocortical pyramidal neurons. *Neuron*. 20;51(2):227-38.
- Somogyi P, Tamas G, Lujan R, Buhl EH (1998). Salient features of synaptic organisation in the cerebral cortex. *Brain Res Brain Res Rev* 26: 113-35.
- Sosulina L, Meis S, Seifert G, Steinhäuser C, Pape HC. (2006) Classification of projection neurons and interneurons in the rat lateral amygdala based upon cluster analysis. *Mol Cell Neurosci*. 33(1):57-67.
- Speel, E.J., Hopman, A.H. & Komminoth, P. (1999) Amplification methods to increase the sensitivity of in situ hybridization: play card(s). *J. Histochem. Cytochem.*, 47, 281–288.
- Stamp JA, Semba K. (1995) Extent of colocalization of serotonin and GABA in the neurons of the rat raphe nuclei. *Brain Res*. 677(1):39-49.
- Strasser, V., Fasching, D., Hauser, C., Mayer, H. & Bock, H.H., Hiesberger, T., Herz, J., Weeber, E.J., Sweatt, J.D., Pramatarova, A., Howell, B., Schneider, W.J., Nimpf, J. (2004) Receptor clustering is involved in Reelin signaling. *Mol. Cell Biol.*, 24, 1378–1386.
- Striedter, G.F. (2004) *Principles of Brain Evolution*. Sinauer, Sunderland, MA.
- Stuart G, Sakmann B (1994). Active propagation of somatic action potentials into neocortical pyramidal cell dendrites. *Nature* 367: 69–72.
- Swadlow H.A. (1974) Properties of antidromically activated callosal neurons and

- neurons responsive to callosal input in rabbit binocular cortex. *Exp. Neurol.* 43: 424 – 444.
- Swanson LW. (2003) The amygdala and its place in the cerebral hemisphere. *Ann N Y Acad Sci.* 985:174-84.
- Takeuchi, Y., Sano, Y. (1984) Serotonin nerve fibers in the primary visual cortex of the monkey. Quantitative and immunoelectronmicroscopical analysis. *Anat. Embryol.* 169:1-8.
- Thomson AM, Bannister AP (2003). Interlaminar connections in the neocortex. *Cereb Cortex* 13: 5-14.
- Tian, Q., Stepaniants, S.B., Mao, M., Weng, L., Feetham, M.C., Doyle, M.J., Yi, E.C., Dai, H., Thorsson, V., Eng, J., Goodlett, D., Berger, J.P., Gunter, B., Linseley, P.S., Stoughton, R.B., Aebersold, R., Collins, S.J., Hanlon, W.A., Hood, L.E. (2004) Integrated genomic and proteomic analyses of gene expression in mammalian cells. *Mol. Cell Proteomics*, 3, 960–969.
- Tissir F, Goffinet AM. (2003) Reelin and brain development. *Nat Rev Neurosci.* 4(6):496-505.
- Utsunomiya-Tate, N., Kubo, K., Tate, S., Kainosho, M., Katayama, E., Nakajima, K. & Mikoshiba, K. (2000) Reelin molecules assemble together to form a large protein complex, which is inhibited by the function-blocking CR-50 antibody. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 97, 9729–9734.
- Valverde F, FacalValverde MV, Santacana M, Heredia M. (1989) Development and differentiation of early generated cells of sublayer VIb in the somatosensory cortex of the rat. A combined Golgi and autoradiographic study. *J Comp Neurol* 290: 11840.
- Valverde F. (2002) Estructura de la corteza cerebral. Organización intrínseca y análisis comparativo del neocortex *Rev. Neurol.* 34 (8): 758-780.
- Van der Krans A, Hoogland PV (1983). Labeling of neurons following intravenous injections of fluorescent tracers in mice. *J Neurosci Meth* 9: 95-103.
- Veinante P, Lavallee P, Deschenes M (2000). Corticothalamic projections from layer 5 of the vibrissal barrel cortex in the rat. *J Comp Neurol* 424(2): 197-204.
- Veinante P, Deschenes M (2003). Single-cell study of motor cortex projections to the barrel field in rats. *J Comp Neurol* 464(1): 98-103.
- Vercelli A., Assal F. and Innocenti G.M. (1992) Emergence of callosally projecting neurons with stellate morphology in the visual cortex of the kitten. *Exp. Brain. Res.* 90:346–358.
- Vincent SR, Hokfelt T, Skirboll LR, Wu JY. (1983) Hypothalamic gamma-aminobutyric acid neurons project to the neocortex. *Science*.220(4603):1309-11.
- Voelker CC, Garin N, Taylor JS, Gahwiler BH, Hornung JP, Molnar Z (2004). Selective neurofilament (SMI-32, FNP-7 and N200) expression in subpopulations of layer V pyramidal neurons in vivo and in vitro. *Cereb Cortex* 14(11): 1276-86
- Vogt BA (1991). The role of layer I in cortical function. En *Cerebral Cortex* Vol. 9. Peters A, Jones EG (eds.). New York, Plenum Press, pp:49-80.
- Voigt, T., de Lima, A.D. (1991) Serotonergic innervation of the ferret cerebral cortex. I. Adult pattern. *J. Comp. Neurol.* 314:403-414.
- Wang Y, Gupta A, Markram H. (1999) Anatomical and functional differentiation of glutamatergic synaptic innervation in the neocortex. *J Physiol Paris.* 93(4):305-17.
- Wang Y, Toledo-Rodriquez M, Gupta A, Wu C, Silberberg G, Luo J, Markram, H (2004). Anatomical, physiological and molecular properties of Martinotti cells in the somatosensory cortex of the juvenile rat. *J Physiol* 561: 65-90.
- Watakabe A, Ohsawa S, Hashikawa T, Komatsun Y, Yamamori Y (2004). A comparative analysis of layer-specific genes in mammalian neocortex. Program No. 44.22. 2004 Abstract Viewer/Itinerary Planner. Washington, DC: Society for Neuroscience, 2004. Online.
- Watakabe A, Komatsu Y, Nawa H, Yamamori T. Gene expression profiling of primate neocortex: molecular neuroanatomy of cortical areas. *Genes Brain Behav.* 2006.
- Weeber EJ, Beffert U, Jones C, Christian JM, Forster E, Sweatt JD, Herz J. (2002) Reelin and ApoE receptors cooperate to enhance hippocampal synaptic plasticity and learning. *J Biol Chem.* 18; 277(42):39944-52.

- Weeks, A.C., Ivanco, T.L., Leboutillier, J.C., Racine, R.J. & Petit, T.L. (1999) Sequential changes in the synaptic structural profile following long-term potentiation in the rat dentate gyrus. I. The intermediate maintenance phase. *Synapse*, 31, 97–107.
- Weinberg RJ. (1999) Glutamate: an excitatory neurotransmitter in the mammalian CNS. *Brain Res Bull.* 50(5-6):353-4.
- Whitford KL, Dijkhuizen P, Polleux F, Ghosh A (2002). Molecular control of cortical dendrite development. *Annu Rev Neurosci* 25: 127-49.
- Williams SR, Stuart GJ (2002). Dependence of EPSP efficacy on synapse location in neocortical pyramidal neurons. *Science* 295: 1907–1910.
- Wiser AK, Callaway EM (1996). Contributions of individual layer 6 pyramidal neurons to local circuitry in macaque primary visual cortex. *J Neurosci* 16(8): 2724-39.
- Wyss JM, Van Groen T, Sripanidkulchai K (1990). Dendritic bundling in layer I of granular retrosplenial cortex: intracellular labeling and selectivity of innervation. *J Comp Neurol* 295: 33-42.
- Yamaguchi T, Sheen W, Morales M. (2007) Glutamatergic neurons are present in the rat ventral tegmental area. *Eur J Neurosci.* 25(1):106-18.
- Yuste R, Gutnick MJ, Saar D, Delaney KR, Tank DW (1994). Ca²⁺ accumulations in dendrites of neocortical pyramidal neurons: an apical band and evidence for two functional compartments. *Neuron* 13(1): 23-43.
- Yuste, R., Bonhoeffer, T. (2001) Morphological changes in dendritic spines associated with long-term synaptic plasticity. *Annu. Rev. Neurosci.*, 24, 1071–1089.
- Zecevic N, Rakic P (2001). Development of layer I neurons in the primate cerebral cortex. *J Neurosci* 21: 5607-19.
- Zhang X, Hannesson DK, Saucier DM, Wallace AE, Howland J, Corcoran ME. (2001) Susceptibility to kindling and neuronal connections of the anterior claustrum. *J Neurosci.* 15;21(10):3674-87.
- Zhao S, Förster E, Chai X, Frotscher M. (2003) Different signals control laminar specificity of commissural and entorhinal fibers to the dentate gyrus. *J Neurosci.* 23(19):7351-7.
- Zhao, S., Chai, X., Forster, E. & Frotscher, M., (2004) Reelin is a positional signal for the lamination of dentate granule cells. *Development*, 131, 5117– 5125.
- Zhou FM, Hablitz JJ (1996). Morphological properties of intracellularly labeled layer I neurons in rat neocortex. *J Comp Neurol* 376(2): 198-213.