

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
Departamento de Biología Celular



**CARACTERIZACIÓN Y DISTRIBUCIÓN DE LOS
TERMINALES EN CANDELABRO EN LA CORTEZA
CEREBRAL: RELACIÓN CON EL SEGMENTO INICIAL
DEL AXÓN**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR

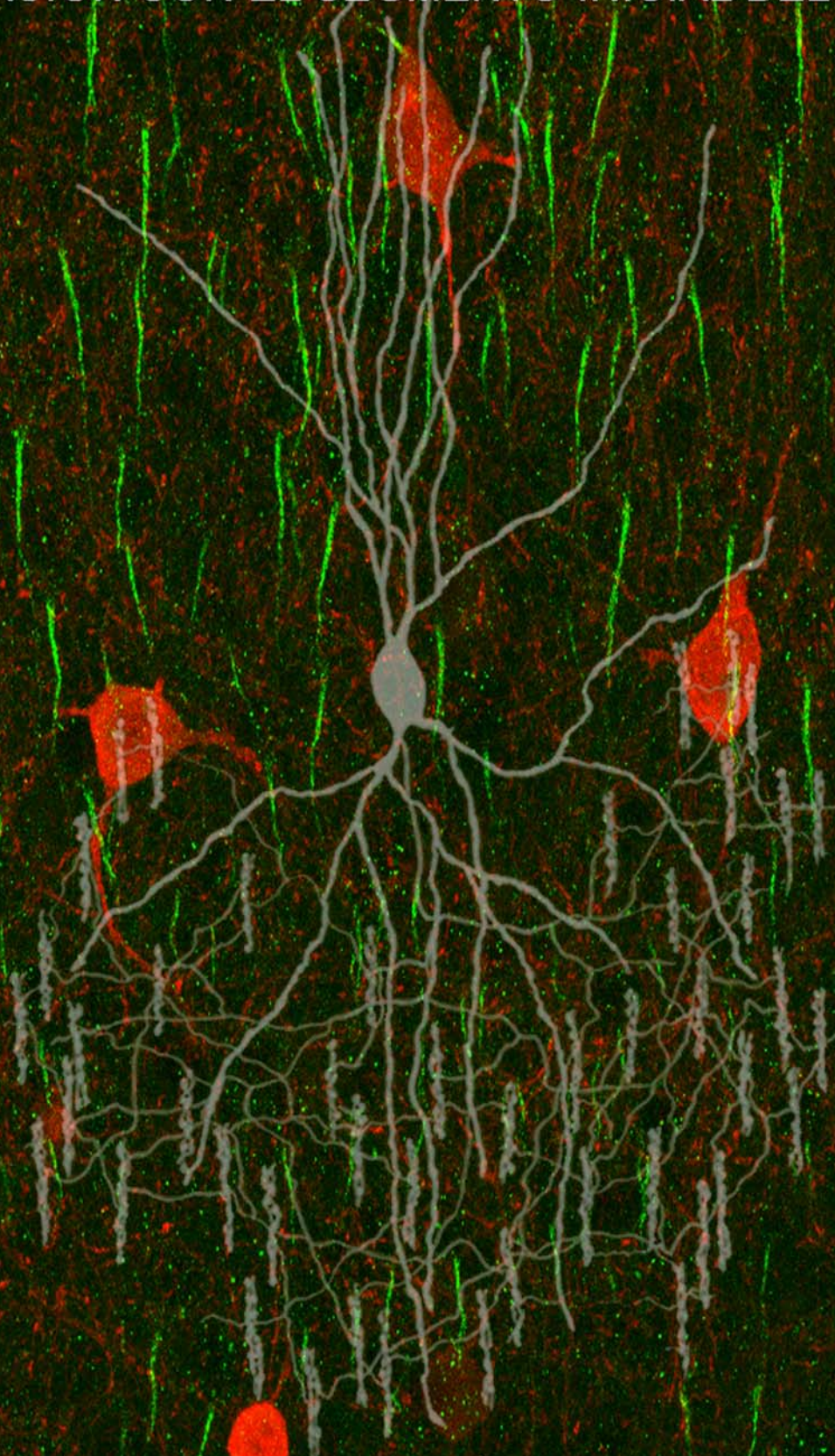
M^a del Carmen Inda García

Bajo la dirección de los doctores
Alberto Muñoz Céspedes
Javier DeFelipe Oroquieta

Madrid, 2008

- **ISBN: 978-84-692-0085-8**

**CARACTERIZACIÓN Y DISTRIBUCIÓN DE LOS
TERMINALES EN CANDELABRO EN LA CORTEZA CEREBRAL.
RELACIÓN CON EL SEGMENTO INICIAL DEL AXÓN**



María del Carmen Inda García
Madrid, 2008.

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
Departamento de Biología Celular

Memoria para optar al grado de Doctor en Ciencias Biológicas presentada
por

MARÍA DEL CARMEN INDA GARCÍA

Realizada en el Instituto Cajal (CSIC) bajo la dirección de
Dr. Alberto Muñoz Céspedes
Prof. Javier DeFelipe Oroquieta

Vº. Bº de los directores de la Tesis,

Alberto Muñoz Céspedes

Javier DeFelipe Oroquieta

La doctoranda,

María del Carmen Inda García

Dr. Alberto Muñoz Céspedes,
Facultad de Biología, Universidad Complutense de Madrid

Prof. Javier DeFelipe Oroquieta,
Profesor de Investigación del Instituto Cajal (C.S.I.C.)

HACEN CONSTAR:

Que Doña María del Carmen Inda García ha realizado bajo su dirección el trabajo de su Tesis Doctoral "CARACTERIZACIÓN Y DISTRIBUCIÓN DE LOS TERMINALES EN CANDELABRO EN LA CORTEZA CEREBRAL. RELACIÓN CON EL SEGMENTO INICIAL DEL AXÓN", que ha llevado a cabo con el mayor aprovechamiento. Revisado el presente trabajo, quedan conformes con su presentación para ser juzgado. Y para que conste y surta los efectos oportunos, lo firma en Madrid a 10 de Marzo de 2008,

Fdo. Dr. Alberto Muñoz Céspedes

Dr. Javier DeFelipe Oroquieta

Tanto tiempo esperando este momento y ahora me faltan las palabras para resumir en unas líneas lo que han significado para mí estos cuatro años.

En primer lugar, quiero agradecer a mis directores. Al Dr. Alberto Muñoz, la oportunidad de venir a Madrid, y empezar una de las etapas más importantes de mi vida. Y al Profesor Javier de Felipe, por su apoyo, su cercanía y su buen humor.

Mucho ha cambiado este laboratorio desde que llegué, pero siempre se ha caracterizado por un ambiente de respeto y cordialidad. Agradecer a Lidia A, Inma, Shira, Ruth y Ángel por sus consejos y sus ánimos. A Rodrigo por sus historias. A Juncal, Ana e Isabel, por estar siempre dispuestas a echarme una mano. A Paula por hacerme sonreír. A los chicos del comedor, a Eva por el "IChing", a María, por las largas charlas, por ser tan especial. A Jon, por su inestimable ayuda en los primeros momentos, porque siempre recordaré las tardes de patinaje en el retiro. Valéis mucho y os merecéis lo mejor.

No habría sido lo mismo sin las "Silvers", le habéis dado vida a este laboratorio. Gracias por ser además de compañeras, amigas. A Virgi y Pablo por los momentos de cafés, por escucharme, ayudarme y animarme. A Lidia peke, por ser tan dulce y paciente, por acompañarme en los momentos difíciles, por dejar de taladrar y ponerse conmigo a imprimir.

Del laboratorio del Profesor José María Delgado guardo buenos recuerdos, por ello gracias todos, en especial a Elena "Chuli" y José Luis S. Gracias a Ángel Carrión que sin saberlo me regaló una brújula, que guiará siempre mi rumbo científico. A Lidia y Juande, por ser unos "papis", por vuestros consejos y ánimos, por abrirme las puertas de vuestra casa de Londres, primera parada en la búsqueda de mi futuro.

En mi camino conocí a los becarios del CIB, a Marian, Juan, Marta, Lu, Eva, Afri, Jimena, Ander, Vero... por tantos buenos momentos fuera del laboratorio, por los conciertos, por "la Camocha"... En especial a los "machos CIB" Asier y Rodri. A Amaia por invitarme a los carnavales de su pueblo. A Sonia, por el faro de Trafalgar. A Gaizka, marqués de tierras vascas, por ser un fiel amigo con quien espero compartir grandes aventuras. Y por supuesto, a Úrsula por ser la hermana que nunca tuve y por vivir conmigo las etapas más importantes de mi vida. Mil gracias, porque mi vida en Madrid ha sido especial por compartirla con vosotros.

Por otro lado, quiero agradecer a mis amigos de Huelva su admiración a mi trabajo, y en especial a Juan, por ser el amigo con quien siempre puedo contar. A mis primos y tíos, porque "Arcos" siempre estará en nosotros. A mis hermanos, a José por las largas charlas nocturnas, a Pablo porque esté donde esté, cuando suene "Rhapsody in blue" te escucharé a ti.

Gracias a mis padres y abuelos, por enseñarme a vivir y por animarme a tomar mi propio camino. En concreto, a mi abuelo por su disciplina y sus bromas. A mi padre por su cariño y por ser el primero en enseñarme el mundo microscópico. A mi madre, la mujer a la que más admiro en el mundo, por sus sabios consejos y su apoyo incondicional. Y finalmente, a mi abuela, por agarrar mi mano en la oscuridad, por cuidarme, por sus historias, por rezar por mí en los exámenes (para evitar "las papilas gustativas"), y por tantas cosas... Pronto sin ser médico, como tú querías, seré doctora. Por todo y por más, cada una de las palabras de ese trabajo son especialmente para ti.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. ASPECTOS GENERALES DE LA CORTEZA CEREBRAL.....	3
1.2. TIPOS DE CORTEZA CEREBRAL DE LOS MAMÍFEROS.....	3
1.2.1. Neocorteza.....	3
1.2.2. Formación del Hipocampo.....	6
1.2.3. Paleocorteza: Corteza Piriforme y Complejo Claustroromigdalino.....	7
1.3. TIPOS DE NEURONAS CORTICALES.....	7
1.3.1. Células piramidales.....	8
1.3.2. Neuronas sin espinas – interneuronas.....	8
1.4. CÉLULAS EN CANDELABRO.....	10
1.4.1. Definición y breve historia.....	10
1.4.2. Morfología.....	10
1.4.3. Distribución y características bioquímicas.....	11
1.4.4. Características fisiológicas.....	13
1.4.5. Patologías relacionadas con alteraciones de las células en candelabro.....	15
1.5. SEGMENTO INICIAL DEL AXÓN DE LAS CELULAS PIRAMIDALES.....	15
1.5.1. El segmento inicial del axón: características funcionales.....	15
1.5.2. Estructura del segmento inicial del axón, similitudes con los nodos de Ranvier.....	16
1.5.3. Presencia de pIkBa en el segmento inicial del axón. Ruta de señalización de NFκB y su implicación en el desarrollo axonal.....	17
2. OBJETIVOS	19
3. ARTÍCULOS DE INVESTIGACIÓN	23
3.1. <i>Morphology and Distribution of Chandelier Cell Axon Terminals in the Mouse Cerebral Cortex and Claustroromigdaloid Complex. Cereb Cortex.</i> (2008) en prensa.....	25
3.2. <i>The Distribution of Chandelier Cell Axon Terminals that Express the GABA Plasma Membrane Transporter GAT-1 in the Human Neocortex. Cereb Cortex.</i> (2007) Sep; 17(9):2060-71.....	41
3.3. <i>Phosphorylated IkBa expression in the normal and epileptic human cerebral cortex</i>	55
3.4. <i>Voltage-gated ion channels in the axon initial segment of human cortical pyramidal cells and their relationship with chandelier cells. Proc Natl Acad Sci U S A.</i> 2006 Feb 21; 103(8):2920-5.....	67
3.5. <i>Expression of voltage-gated sodium and Kv1.2 potassium channels in the human temporal neocortex</i>	75
4. DISCUSIÓN	85
4.1. DISTRIBUCIÓN DE LOS TERMINALES EN CANDELABRO INMUNO-REACTIVOS PARA GAT-1.....	87
4.1.1. Consideraciones metodológicas.....	87
4.1.2. Variación de la densidad de los terminales en candelabro inmuno-reactivos para GAT-1 en la corteza cerebral.....	88
4.1.2.1. Variación de la densidad de los terminales en candelabro inmuno-reactivos para GAT-1 entre áreas neocorticales.....	88
4.1.2.2. Diferencias en el patrón de distribución entre capas de la neocorteza.....	89
4.1.2.3 Distribución de los terminales en candelabro en la formación del hipocampo.....	90
4.1.3. Distribución de los terminales-en candelabro en áreas telencefálicas no corticales.....	90
4.1.3.1. Distribución de los terminales-en candelabro en la Corteza piriforme.....	90
4.1.3.2. Distribución de los terminales-en candelabro en el Complejo Claustroromigdalino.....	91
4.1.4. Relación entre los terminales en candelabro y los segmentos iniciales del axón. Morfología, complejidad de los terminales en candelabro y evolución.....	91
4.1.5. Variación en la densidad de los terminales en candelabro entre individuos.....	92

ÍNDICE

4.2. CANALES IÓNICOS REGULADOS POR VOLTAJE Y PROTEÍNAS ASOCIADAS EN EL SEGMENTO INICIAL DEL AXÓN DE CÉLULAS PIRAMIDALES E INTERNEURONAS.....	93
4.2.1. Implicaciones funcionales de las células en candelabro.....	93
4.2.2. Caracterización de los componentes fundamentales de los nodos de ranvier y de los segmentos iniciales del axón en la neocorteza humana.....	93
4.2.3. Canales de sodio dependientes de voltaje.....	94
4.2.4. Canales de potasio dependientes de voltaje.....	94
4.2.5. Diferente distribución de los canales de Na y de K dependientes de voltaje en el segmento inicial del axón de células piramidales y de los nodos de ranvier.....	95
4.2.6. Distribución de los canales de Na y K en el segmento inicial del axón de las interneuronas de la neocorteza humana.....	96
4.2.7. Modulación del disparo del potencial de acción en el segmento inicial del axón por las células en candelabro.....	97
4.2.8. Presencia de pIkB α en el segmento inicial del axón. Ruta de señalización de NF κ B y su implicación en el desarrollo axónico.....	98
4.2.9. Acumulación de pIkB α en la neocorteza temporal y formación del hipocampo en pacientes de epilepsia.....	99
5. CONCLUSIONES.....	101
6. BIBLIOGRAFÍA.....	105

INTRODUCCIÓN

1.1. ASPECTOS GENERALES DE LA CORTEZA CEREBRAL

Uno de los logros evolutivos más destacables del sistema nervioso central es la presencia en diferentes grupos de vertebrados de una lámina superficial de células nerviosas conocida como corteza cerebral. A lo largo de la evolución, la corteza cerebral ha aumentado en complejidad y tamaño relativo. En los anfibios, la región paleal telencefálica está formada por una única lámina celular situada en la región periventricular. Sin embargo, en los reptiles aparece ya una estructura de tres capas comparable a las estructuras allocorticales (paleocorteza y archicorteza) del cerebro de los mamíferos, en los cuales además surge una estructura de seis capas denominada neocorteza (Brodmann, 1909; Vogyt y Vogt, 1919; revisado en Valverde, 2002). El desarrollo relativo de la neocorteza con respecto al volumen total del cerebro aumenta en los mamíferos a medida que se incrementa el cociente de encefalización. Es decir, gran parte del aumento del cerebro se debe al incremento de la neocorteza (Figura 1), que ha alcanzado su máxima expansión y diferenciación en los primates. Sin embargo, las capacidades cognitivas del hombre no parecen estar simplemente relacionadas con un aumento del tamaño del cerebro. Se considera, que el desarrollo de la neocorteza conlleva la aparición de nuevas áreas corticales y cambios en la organización que darían lugar a una arquitectura diferente y especializada. Por ello, el estudio comparado de la neocorteza es indispensable para establecer los principios generales de la organización cortical y de su evolución.

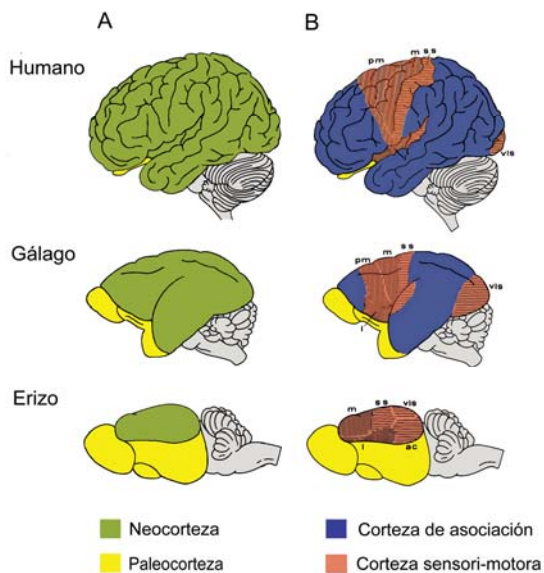


Figura 1. A. Proporción relativa de superficie neocortical con respecto al volumen total del cerebro en diferentes especies de mamíferos: hombre, gálgalo (primate prosimio) y erizo. B. Proporción relativa de corteza asociativa con respecto a la corteza sensorimotora en las mismas especies. Modificado de Nieuwenhuys (1994).

1.2. TIPOS DE CORTEZA CEREBRAL DE LOS MAMÍFEROS

1.2.1. Neocorteza.

Históricamente, la organización de la corteza cerebral ha sido objeto de numerosos estudios que han tratado de describir tanto los elementos básicos que la componen como las conexiones existentes entre ellos. La neocorteza está compuesta por neuronas, células neurogliales, vasos sanguíneos y fibras nerviosas. La introducción del método de Golgi (Golgi, 1873), para el estudio de la microanatomía de la corteza cerebral permitió visualizar detalladamente los componentes de la corteza y crear los primeros esquemas de organización (Figura 2).

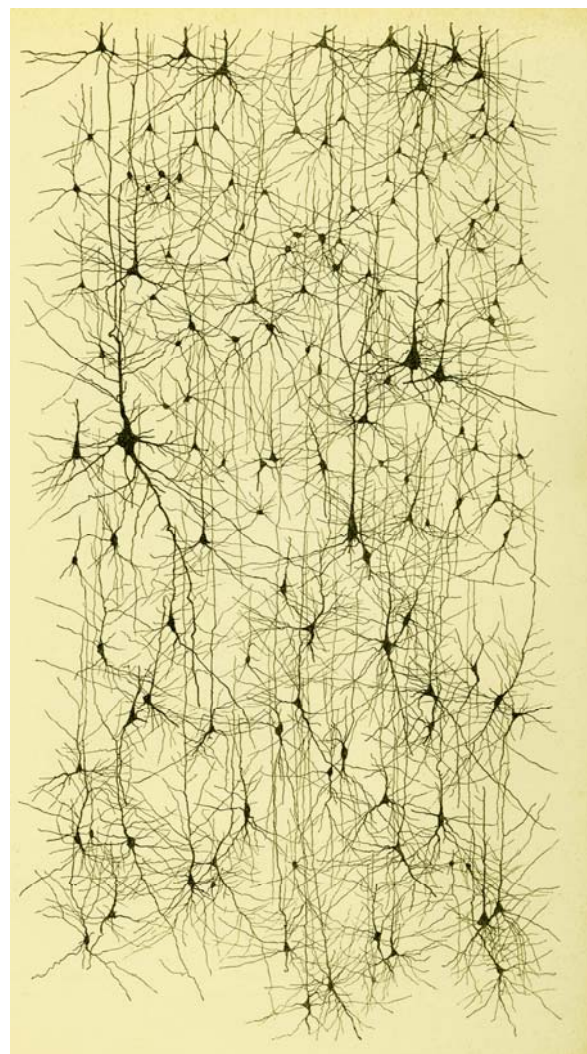


Figura 2. Dibujo de neuronas de la corteza cerebral humana teñidas con el método de Golgi. Tomada de Kolliker (1893)

En 1938, Lorente de Nó propuso que la corteza cerebral estaba organizada en “unidades elementales de operación”, que consistían en pequeños cilindros verticales formados por agrupaciones de neuronas que atraviesan todas las capas corticales. Esta teoría fundamentó la hipótesis de la organización columnar,

desarrollada posteriormente por diversos equipos liderados por Mountcastle, Hubel y Wiesel (revisado en Hubel y Wiesel, 1977; Mountcastle, 1978, 1997). Mountcastle propuso una organización vertical compuesta por dos tipos de columnas: las minicolumnas y las macrocolumnas (Mountcastle, 1978, 1997). Una minicolumna o unidad básica modular, constituiría la unidad funcional más pequeña de la corteza cerebral, estaría formada por grupos de células interconectadas dentro de un cilindro vertical de 25-30 micras de diámetro. El ensamblaje de varias minicolumnas daría lugar a una macrocolumna, (aproximadamente de 300-600 micras de diámetro) que mediante la interacción de varias minicolumnas, sería la unidad de distribución y procesamiento complejo de la información (Mountcastle, 1997). Además de su organización vertical, la neocorteza está estructurada de manera laminar formada generalmente por seis capas celulares horizontales o paralelas a la superficie pial. Sin embargo, la neocorteza es heterogénea funcionalmente y en sus características citoarquitectónicas, ya que la composición laminar varía dependiendo de la región cortical y de la especie.

Citoarquitectura de la neocorteza: capas y áreas

La primera descripción de las capas corticales fue realizada por Meynert en 1867, que concluía que existían cinco capas. Desde entonces hasta ahora, han existido numerosas clasificaciones y denominaciones. En la actualidad, una de las descripciones más utilizada es la de Brodmann que distingue, en general, seis capas o láminas numeradas desde la uno (capa más externa) a la seis (la más profunda, adyacente a la

sustancia blanca) y que presentan diferencias en cuanto a la densidad celular y tipos celulares que incluyen (Jones, 1984):

- Capa I. Plexiforme o molecular. Se caracteriza por tener una densidad celular muy baja.
- Capa II. Presenta una densidad muy elevada de células piramidales pequeñas.
- Capa III. Se subdivide en dos subláminas: una subcapa IIIa superficial que presenta células piramidales pequeñas, y una subcapa IIIb profunda que está poblada por células piramidales grandes.
- Capa IV. Se caracteriza por presentar una elevada densidad de células granulares que la diferencia de las capas III y V adyacentes. Esta capa permite dividir la corteza en capas supra- e infragranulares.
- Capa V. Presenta células piramidales de tamaño medio y grande.
- Capa VI. Está poblada por neuronas heterogéneas en su morfología. Contiene un gran número de células piramidales modificadas con morfología polimórfica.

Esta organización laminar presenta variaciones en toda la extensión de la neocorteza (Figura 3). Según Von Economo (1929), la estructura cortical puede reducirse a cinco tipos fundamentales en base al desarrollo relativo de dos tipos de células principales, las neuronas granulares y las piramidales:

- *Corteza de tipo agranular (tipo 1)*: destaca por su gran espesor y por presentar prácticamente ausencia total de células granulares. Las células piramidales de capas III y V son grandes y están bien diferenciadas.
- *Corteza de tipo frontal (tipo 2)*: presenta una elevada densidad neuronal y seis capas bien definidas. Se caracteriza por sus células piramidales grandes y células fusiformes diferenciadas de las capas III y V y por un espesor reducido de las capas II y IV.

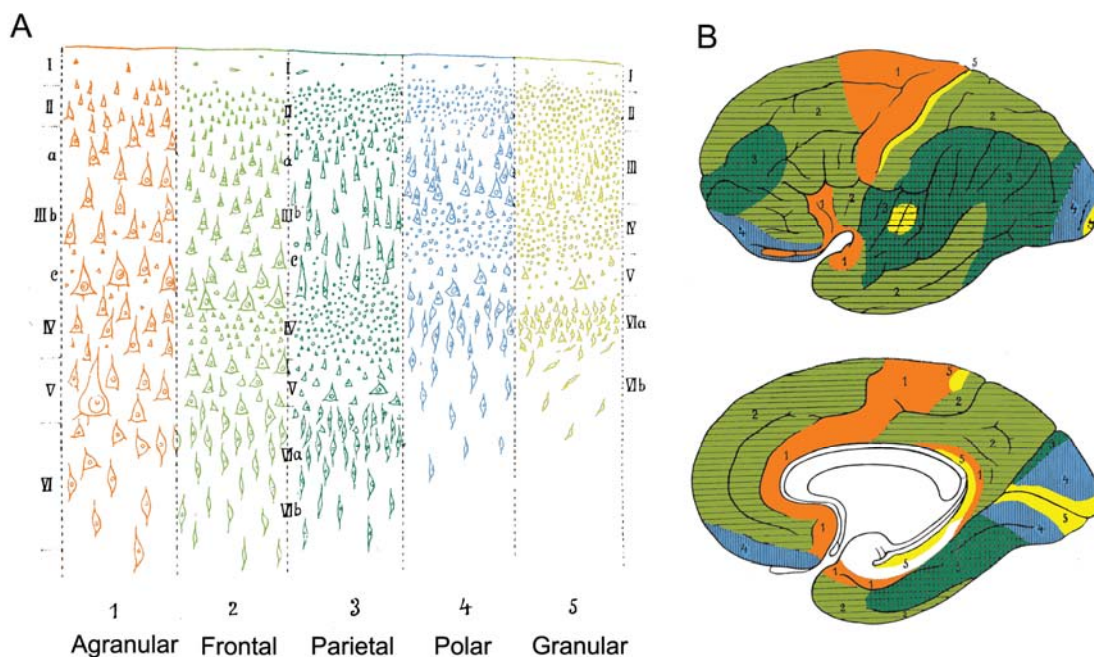


Figura 3. A. Esquema representativo de los distintos tipos de neocorteza. B, distribución de cada tipo en las diferentes regiones de la neocorteza, según Von Economo (1929)

- *Corteza de tipo parietal (tipo 3)*: las capas II y IV presentan un mayor espesor y densidad de neuronas que en el tipo 2. Las capas III y V son delgadas y con células pequeñas de distribución poco regular.
- *Corteza de tipo polar (tipo 4)*: de menor grosor que los tipos 1-3 y con unas capas II y IV bien diferenciadas.
- *Corteza de tipo agranular o coniocorteza (tipo 5)*: muy delgada constituida por neuronas pequeñas agrupadas densamente. La capa IV presenta diversas subdivisiones.

En la actualidad aunque no existe un criterio unificado para clasificar las regiones neocorticales, éstas se suelen agrupar en base a criterios citoarquitectónicos, hodológicos y funcionales en: áreas sensoriales, áreas motoras y áreas de asociación. En los mamíferos más primitivos la mayor parte de la neocorteza está ocupada por áreas sensoriales y motoras, separadas por áreas de asociación muy reducidas (Brodmann, 1909; Garey, 1994). En las últimas décadas, diversos estudios sobre la organización de la neocorteza humana y de otros primates, sugieren un incremento en las áreas de asociación especialmente en las áreas parieto-temporal y frontal (Felleman y Van Essen, 1991; Preus y Goldman-Rakic, 1991 a,b; Van Essen y cols., 1998; Petrides y Pandya, 1999, Figura 1). En el hombre, el número de áreas identificadas por diferentes autores es muy variable, siendo el más utilizado el mapa cortical de Brodmann (1909), que distingue 47 áreas (Figura 4).

Las áreas sensoriales son zonas de la corteza cerebral que reciben aferencias de los núcleos específicos del tálamo de relevo de cada modalidad sensorial, se caracterizan principalmente por tener una capa IV prominente y una capa V relativamente delgada. Llevan a cabo el procesamiento de las distintas modalidades sensoriales, y están organizadas ordenadamente en función de las características de los estímulos que procesan. Por ejemplo, la corteza visual se localiza en el lóbulo occipital e incluye las áreas 17 y 18 de Brodmann. El área 17, o área visual primaria (V1), es heterotípica de estructura granular tipo 5 (Von Economo, 1929), también se le denomina corteza estriada por presentar la estria externa de Billager o de Gennari. El área 18, o corteza visual secundaria (V2), es de tipo polar o 4 (Von Economo, 1929).

Las áreas motoras se localizan en el lóbulo frontal y se caracterizan por tener una capa IV muy reducida o ausente (corteza agranular) y una capa V bastante desarrollada. La corteza motora se divide en tres regiones principales: la corteza motora primaria (área 4), la corteza premotora (área 6) y la corteza motora suplementaria. El área motora primaria está implicada en la organización de los movimientos voluntarios, la corteza premotora de los movimientos voluntarios en relación con impulsos sensoriales, y el área motora suplementaria está relacionada con la planificación de los movimientos y con la iniciación de los mismos.

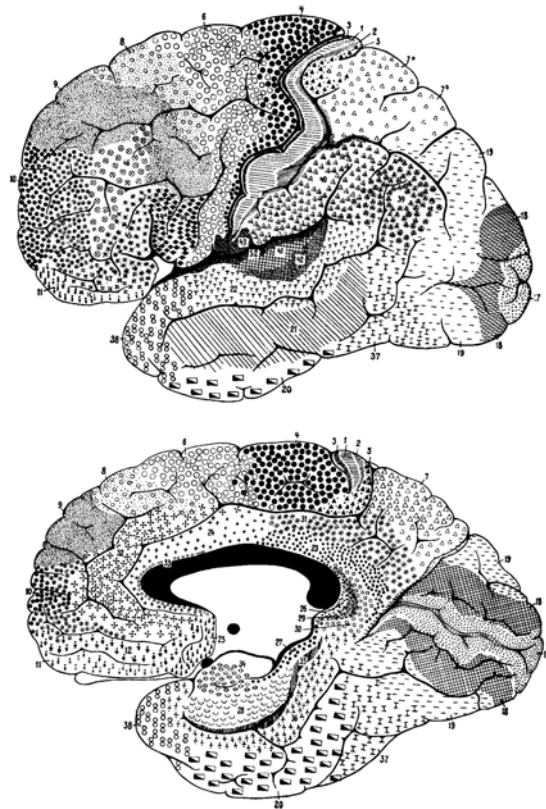


Figura 4. Divisiones citoarquitectónicas según Brodmann de la corteza cerebral humana. A: vista lateral. B: vista mesial. Tomado de Brodmann, 1909.

Las áreas asociativas se caracterizan por tener menor densidad celular en las capas IV y V. Son zonas que integran múltiples señales y que cumplen funciones muy diversas. En el presente trabajo hemos estudiado diversos aspectos de las áreas asociativas humanas del lóbulo temporal (áreas 38, 20, 21, y 22 de Brodmann), presentan una citoarquitectura típica de seis capas (tipo 2 según Von Economo, 1929). Interviene en el procesamiento de señales visuales y auditivas y se ha relacionado con procesos de atención y memoria. Así mismo, hemos estudiado las áreas de Brodmann asociativas frontolaterales 8, 9, 10, 44, 45, 46; frontales orbitarias 11, 12, 13, 14, 47, cinguladas 32 y 24 (Brodmann, 1913; Preuss, 1995; Fuster, 2002). Todas estas áreas presentan una prominente capa IV granular y una organización típica de seis capas de tipo 2 o 3 según Von Economo (1929). A pesar de que no es posible adscribir una función específica a cada una de las áreas de la corteza prefrontal, existe un acuerdo general sobre la tardía evolución de la corteza prefrontal y su directa implicación en las funciones más complejas, como el procesamiento cognitivo o la memoria ejecutiva. Así, se le adscriben funciones de planificación del comportamiento en función de la experiencia acumulada y de elaboración de estrategias motoras. También se le ha relacionado con memorias de tipo espacial. Por ello, existe una gran controversia para establecer la homología entre las diferentes áreas prefrontales de espe-

cies de mamíferos. Según ciertos autores, en roedores, carnívoros y otras especies se puede hablar de corteza prefrontal si se compara la corteza medial frontal con la corteza promotora y cingular anterior en los primates (Preuss, 1995). La corteza de la región frontal lateral de los roedores, no presenta una capa IV bien desarrollada y se considera principalmente de naturaleza motora (Preuss, 1995). Las áreas frontales orbitarias y cingulares constituyen la corteza límbica de asociación. recibe gran parte de sus entradas desde la arquicorteza y la paleocorteza y áreas adyacentes relacionadas, y están en directa relación con los procesos de emoción y memoria.

1.2.2. Formación del Hipocampo

La formación del hipocampo (Figura 5) o *archicorteza* es una estructura fundamental en procesos de aprendizaje y consolidación de la memoria (Thompson y kim, 1996). Está compuesta por dos tipos de corteza: allocorteza y perialocorteza, e incluye el giro dentado, el hipocampo propio, el complejo subicular y la corteza entorrinal (Amaral e Insausti, 1990). El giro dentado, el asta de Amón y el subículo están formados por allocorteza, la cual está compuesta por tres láminas: capa molecular, capa celular y capa polimórfica. El pre- y para subículo y la corteza entorrinal son áreas perialocorticales. La perialocorteza (o proisocorteza) incluyen áreas corticales de transición entre allocorteza e isocorteza que presenta una laminación en seis capas más o menos diferenciadas.

En el giro dentado, la capa molecular está ocupada por las dendritas de las células granulares y presenta algunas interneuronas polimórficas dispersas. La capa celular es una lámina estrecha densamente poblada por células de tipo granular, por lo que se denomina capa granular. Los axones de estas células forman las fibras musgosas. Por debajo del estrato granular se extiende la capa polimórfica. En esta lámina (en primates) se sitúan las dendritas basales de las células granulares (Seress y Mrzljak, 1987). Hay autores que emplean el término hilus para definir al área ocupada por la capa polimórfica del giro dentado (Amaral e Insausti, 1990; Freund y Buzsáki, 1996).

El hipocampo propio está formado por el asta de Amón o *cornu ammonis* (CA). Presenta seis estratos desde la superficie ventricular a la cisura del hipocampo: *alveus*, estrato *oriens*, estrato piramidal, estrato radiado, estrato lagunoso-molecular. Estas cinco capas se agrupan en tres capas típicas de la allocorteza, considerando el *alveus* y el estrato *oriens* como la capa polimórfica, y el estrato piramidal como la capa celular, y los estratos radiado y lagunoso-molecular, como la capa molecular. El asta de Amón es heterogénea en su distribución medio-lateral en cuanto a sus características citoarquitectónicas y hodológicas, por lo que se han propuesto distintas divisiones regionales (Ramón y Cajal, 1911; Lorente de Nó, 1934), en la

actualidad la nomenclatura más comúnmente empleada es la de Lorente de Nó (1934), que diferencia los campos CA4-CA1. No es evidente la diferenciación de CA2 en mamíferos no primates, por lo que en estas especies el asta de Amón queda frecuente simplificada a los campos CA3 y CA1 (Amaral y Witter, 1989; Freund y Buzsáki, 1996).

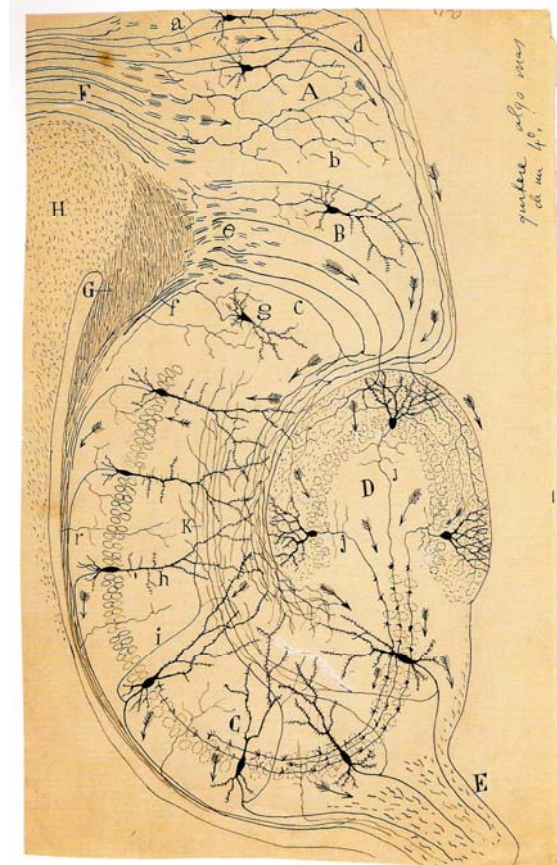


Figura 5. Esquema de estructura y conexiones del asta de amón. Tomado de Cajal (1901).

El complejo subicular se compone del subículo, presubículo y parasubículo. El presubículo y parasubículo y la corteza entorrinal son áreas perialocorticales. La perialocorteza presenta una laminación en seis capas más o menos diferenciadas. La capa I o molecular, similar a la capa I isocortical; las capas II-VI se distribuyen característicamente en dos láminas: lámina superficial (capas II y III) y lámina profunda (capas V y VI). Estas láminas están separadas por una zona parvo- o acelular más o menos evidente, la *lamina dissecans* (Insausti y cols., 1995). El subículo se encuentra adyacente a CA1 y en su extremo medial se sitúa por debajo del presubículo. Se caracteriza por presentar células piramidales grandes y porque el lugar del estrato oriens de los campos Amónicos está ocupado por una capa de células piramidales pequeñas y densamente distribuidas que dan paso a neuronas fusiformes en el límite con la sustancia blanca subyacente. El presubículo se sitúa superficial al extremo medial subicular; en su porción más lateral, frecuentemente se encuentra disgregado en islotes de

células situadas en la capa molecular subicular. El parasubiculo se sitúa en el extremo medial del giro parahipocámpico y se diferencia porque sus células piramidales tienden a ser más grandes y encontrarse más dispersas que en el presubiculo (Braak, 1980). Sin embargo, ambos campos presentan mucha variabilidad en su citoarquitectura en diferentes niveles rostro-caudales y medio-laterales, por lo que no siempre resulta sencilla su diferenciación precisa (Braak, 1980). Así mismo, se han propuesto numerosas divisiones de la corteza entorhinal en diferentes regiones citoarquitectónicas (Rose, 1927; Macchi, 1951; Braak, 1980; Braak y Braak, 1992; Insausti y cols., 1995). No obstante, la delimitación y caracterización de los campos no siempre es evidente, dado que estos se distribuyen formando un continuo y las características citoarquitectónicas aparecen mezcladas en zonas de transición entre campos (Insausti y cols., 1995).

1.2.3. Paleocorteza (Corteza Piriforme) y Complejo Claustroamigdalino

La corteza olfatoria, principal componente del paleocortex, comprende el bulbo olfatorio, tubérculo olfatorio y corteza piriforme. La corteza piriforme constituye la mayor parte de la corteza olfatoria, y presenta una amplia red de conexiones topográficamente organizadas con otras estructuras cerebrales. Recibe fibras aferentes principalmente de las células mitrales del bulbo olfatorio, pero también de la amígdala, corteza entorhinal, corteza piriforme contralateral y núcleos subcorticales. La proyección eferente de la corteza piriforme alcanza la corteza insular, el hipotálamo, el núcleo dorsomedial del tálamo, la amígdala, la corteza entorhinal, el subículo, el núcleo endopiriforme, el claustró y la corteza piriforme contralateral. Posee tres capas: una superficial o molecular donde se ramifican los axones de las células mitrales, una segunda capa de células piramidales de tamaño mediano y una tercera capa polimorfa donde se sitúan las neuronas piramidales de mayor tamaño. Por su sencilla estructura en comparación con otras áreas sensoriales, y por su implicación en aprendizaje olfatorio ha sido objeto de gran interés para el estudio del procesamiento sensorial (revisado en Suzuki y Bekkers, 2007).

El complejo claustróamigdalino está formado por una porción subpaleal, compuesta por los núcleos medial y central, y una porción paleal (Figura 6; Puelles y cols., 2000, Puelles, 2001; Martínez-García y cols., 2002). La porción paleal está compuesta por dos componentes: las áreas superficiales o amígdala cortical y las profundas o amígdala basolateral. La amígdala cortical incluye áreas olfatorias y vomeronasales secundarias (McDonald, 1998; Martínez-García y cols., 2002): la amígdala cortical anterior y la amígdala cortical posterolateral, que reciben información olfatoria directa desde el bulbo olfatorio principal; y la amígdala cortical posteromedial cuyas aferentes

proviene del bulbo accesorio. La amígdala basolateral incluye los núcleos basolateral, basomedial y lateral. A su vez estas regiones paleales son derivadas del pallium lateral y ventral en función de su situación topográfica. Los derivados del pallium lateral comprenden: la amígdala posterolateral cortical, la parte anterior y posterior de los núcleos basolaterales y la parte dorsal del claustró. Los derivados del pallium ventral, de situación profunda al tracto olfativo lateral y dorsal a territorios estriales (Puelles y cols., 2000), son: la amígdala cortical anterior, la amígdala cortical posteromedial, la amígdala hipocámpica, el núcleo lateral de la amígdala, la parte ventral del núcleo basolateral y la parte posterior del núcleo basomedial de la amígdala, el núcleo endopiriforme y la parte ventral del claustró.

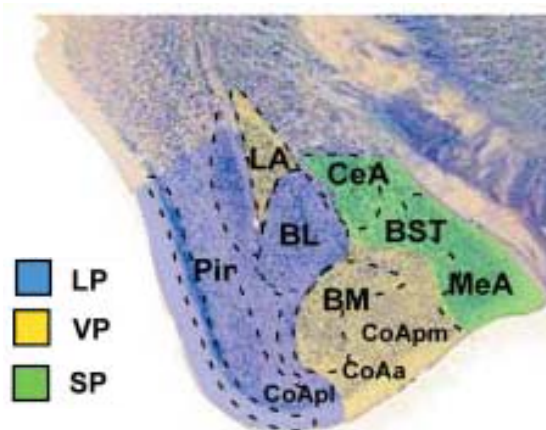


Figura 6. Sección coronal de amígdala de mamíferos donde se muestra el origen embrionario de los núcleos de la amígdala (CoApl, CoAa, CoApm, LA, BL, BM, ME, CE) en diferentes colores: azul, derivados del pallium lateral (LP); amarillo, derivados del pallium ventral (VP); verde, derivados del subpallium (SP). Tomado de Moreno y González (2007).

1.3. TIPOS DE NEURONAS CORTICALES

En la corteza cerebral existe una amplia diversidad de tipos neuronales cuya clasificación todavía está sometida a debate (revisado en DeFelipe y cols., 2005). Utilizando el método de Golgi (Golgi, 1873), Cajal clasificó las neuronas corticales como células de axón largo y células de axón corto (Cajal, 1892; revisado en DeFelipe, 2002). Desde entonces, se utilizan los términos de células de axón largo o de proyección, para designar a las células piramidales, y células de axón corto o interneuronas, que corresponden a las células no piramidales. En la actualidad, se conoce una gran diversidad de tipos neuronales corticales que se dividen, en general, según la presencia o no de espinas dendríticas. Las neuronas con espinas incluyen a las células piramidales y las células estrelladas con espinas. Las neuronas piramidales constituyen el tipo neuronal más abundante de la corteza, representan el 70-85% de la población neuronal total, se localizan en todas las capas corticales excepto en la capa I y son virtualmente las únicas neuronas de proyección de la corteza. Las células estrelladas con es-

pinas son, con algunas excepciones, células de axón corto (interneuronas) confinadas principalmente a las capas medias, y presentan diferentes morfologías dependiendo de la especie y área cortical (Fairén et al., 1984; Lund, 1984). Por el contrario, las neuronas sin espinas, o con escasas espinas, representan un 15-30% de la población neuronal, constituyen un grupo muy heterogéneo de células de axón corto o interneuronas y están presentes prácticamente en todas las capas y regiones corticales.



Figura 7. Dibujo realizado por Cajal de una célula piramidal de la corteza cerebral del ratón impregnada con el método de Golgi. Se ilustra la estructura típica de la célula piramidal. “a, [dendritas basales]; b [parte superior del dibujo], tallo radial [o dendrita apical]; P, penacho [dendrítico] terminal; c, colaterales del axón; e, porción inferior de éste exento de colaterales; b [parte inferior del dibujo], sustancia blanca.” Esta figura fue reproducida en la *Textura del sistema nervioso del hombre y de los vertebrados* (Cajal 1899b, 1904, figuras 9 y 668).

1.3.1. Células piramidales

Las neuronas piramidales son excitadoras, utilizan glutamato como neurotransmisor y dan lugar a la mayor parte de las sinapsis excitadoras corticales (White, 1989; Jones, 1984; Lund, 1984; revisado en DeFelipe y Fariñas, 1992). Morfológicamente se caracterizan por la forma piramidal u ovoide de su soma (Figura 7) del que surge la dendrita apical, que asciende hacia la superficie pial de la corteza, y, radialmente, las dendritas basales (Cajal, 1892). La dendrita apical forma el penacho dendrítico terminal que

frecuentemente alcanza la capa I, pero también puede acabar en capas inferiores, como ocurre con las células piramidales de la capa IV (Feldman, 1984). Toda la superficie de las dendritas está cubierta de espinas, excepto las 10-20 μm proximales (revisado en Elston y DeFelipe, 2002). Las espinas dendríticas de las células piramidales representan el principal elemento postsináptico de las sinapsis excitadoras en la neocorteza, mientras que el tallo dendrítico establece conexiones principalmente con interneuronas inhibitorias (véase sección 1.3.2). El axón de la célula piramidal, surge directamente desde el soma o bien de la parte proximal de una dendrita basal. El axón sigue un curso descendente hacia la sustancia blanca emitiendo colaterales locales (DeFelipe, 1994; figura 7). Las células piramidales de cada capa cortical participan en distintos circuitos sinápticos y envían sus proyecciones a diferentes regiones del sistema nervioso. En general, las capas supragranulares (II-III) contienen los somas de las células piramidales responsables de una gran parte de las conexiones cortico-corticales (ipsi- y contralaterales). Las capas infragranulares (V, VI) contienen las células piramidales cuya proyección alcanza el tálamo, núcleos subcorticales extratálámicos, y otras áreas corticales (Feldman, 1984; Jones, 1984; White, 1989).

1.3.2. Neuronas sin espinas - interneuronas

Las células no piramidales sin espinas dendríticas, denominadas habitualmente interneuronas, constituyen la mayoría de las neuronas de axón local. Utilizan mayoritariamente GABA como neurotransmisor (revisado en Houser y cols., 1984) siendo, por tanto, inhibitorias, aunque existen algunas excepciones (Peters y cols., 1990; Gonchar y cols., 1995; Fabri y Manzoni, 1996). En la corteza cerebral de los mamíferos se han descrito una gran variedad de interneuronas con diferentes características morfológicas, bioquímicas y fisiológicas (Figura 8; DeFelipe, 1993). A pesar de que actualmente no existe un consenso generalizado en cuanto a la clasificación definitiva de las interneuronas (DeFelipe y cols., 2005) se han identificado diferentes tipos en función de varios criterios basados en patrones de distribución, aferencias sinápticas y dianas de proyección, así como en propiedades morfológicas, electrofisiológicas y moleculares (revisado en DeFelipe y cols., 2005).

Las interneuronas presentan características bioquímicas muy heterogéneas. La aplicación de técnicas de doble marcaje para visualizar la localización simultánea de varias sustancias (Vincent y cols., 1982), reveló que una neurona puede expresar uno o varios neurotransmisores o sustancias neuroactivas. Posteriormente, el empleo de estas técnicas de colocalización para el estudio de las interneuronas GABAérgicas mostró que pueden expresar varios neurotransmisores (o sus enzimas de síntesis) y neuropéptidos [óxido nítrico sintasa (NOS), tirosina hidróxilasa (TH), colin-acetiltransferasa (ChAT), somatostatina

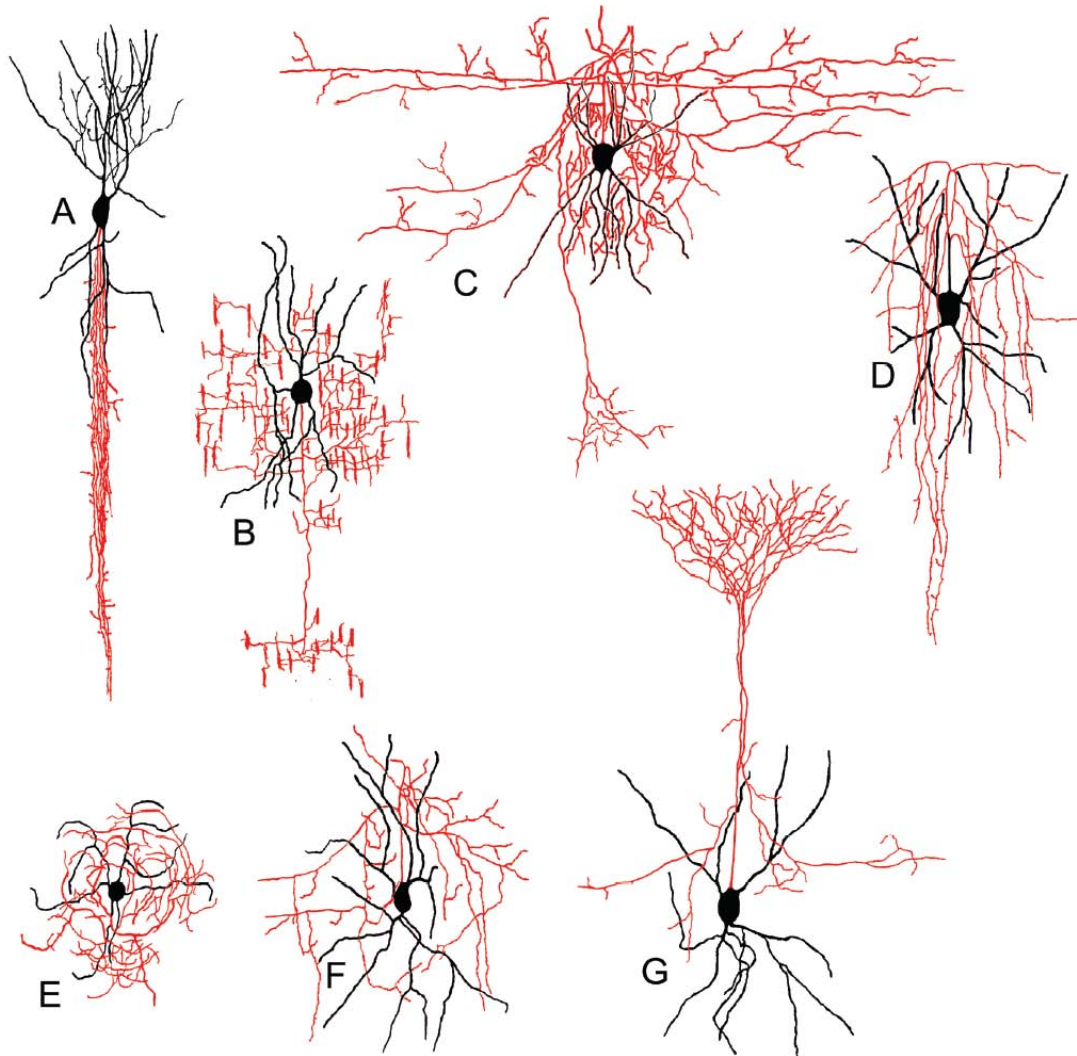


Figura 8. Dibujos de diferentes tipos morfológicos de interneuronas, en negro el soma y el árbol dendrítico, y en rojo la arborización axónica. A: célula de *double bouquet*, B: célula en candelabro, C: célula en cesto grande, D: célula con axón en arcadas, E: célula neurogliaforme o aracniforme, F: interneurona común, G: célula de Martinotti. Modificado de DeFelipe (1993).

(SOM), colecistoquinina (CCK), neuropéptido Y (NPY), polipéptido vasoactivo intestinal (VIP) y taquinina (TK)], así como diversas proteínas fijadoras de calcio [calbindina (CB), calretinina (CR) y parvalbúmina] (revisado en DeFelipe, 1993; 1997; DeFelipe y cols., 2005).

Las interneuronas pueden también ser reconocidas por sus características morfológicas, como su patrón de arborización dendrítica y axónica (figura 8). La arborización axónica puede estar restringida dentro del área ocupada por el campo dendrítico, como sucede en las células neurogliaformes, las células en cesto pequeñas y las células en candelabro. Las células en cesto grandes, las neuronas Cajal-Retzius y las neuronas bipeñachadas horizontales se caracterizan por poseer colaterales axónicas y/o dendritas largas y horizontales. Por último las células de doble bouquet, las células de Martinotti, las neuronas con arcadas axonales, las células bipolares y las células tipo II se caracterizan por poseer colaterales axónicas y/o dendritas largas y verticales.

Además, las interneuronas se pueden clasificar en cuatro grupos atendiendo a la región de la célula piramidal con la que establecen sinapsis (Figura 9; revisado en DeFelipe, 2002). Así, las células axo-dendríticas, que incluyen entre otras a las células de *double bouquet*, forman sinapsis casi exclusivamente con las dendritas (tallos o espinas). Las células axo-somatodendríticas, que incluyen a diversos tipos de “células en cesto” forman sinapsis preferentemente con el soma y también la parte proximal de las dendritas. Las células axo-dendrosomáticas incluyen tipos de interneuronas cuya clasificación no está bien definida y forman múltiples sinapsis tanto con el soma como con las dendritas, pero preferentemente con éstas. Por último, las células axo-axónicas, representadas únicamente por las células en candelabro, en las que se centra el presente trabajo, forman múltiples sinapsis con el segmento inicial del axón de las neuronas piramidales. Hasta el momento se conoce poco acerca de la contribución detallada de cada tipo de interneurona a la dinámica de los microcircuitos corti-

cales (Monyer and Markram, 2004; DeFelipe et al., 2005; Dimitriu et al., 2006). Uno de los objetivos fundamentales de este trabajo consiste en ampliar el conocimiento en este sentido mediante el análisis morfológico de la innervación axo-axónica por parte de las células en candelabro.

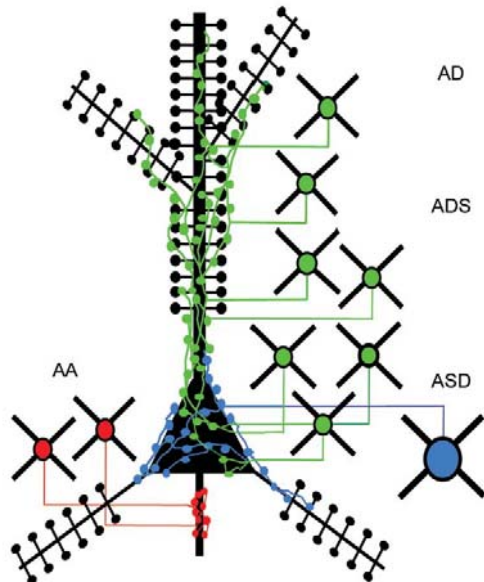


Figura 9. Esquema básico de las conexiones sinápticas establecidas entre las interneuronas y las células piramidales. Se distinguen cuatro tipos de interneuronas según la región de la célula piramidal con la que establecen sinapsis. AD: células axo-dendríticas. ADS: células axo-dendrosomáticas. ASD: células axo-somatodendríticas. AA: células axo-axónicas.

1.4. CÉLULAS EN CANDELABRO

1.4.1. Definición y breve historia

El estudio de las células en candelabro (células Ch) tiene una historia relativamente corta. La primera mención a estas neuronas la realizó Szentágothai y Arbib en 1974, en la capa III de la corteza cerebral. En base a sus preparaciones de Golgi estos autores describieron los axones de las células Ch con forma de agrupaciones “similares a uvas” que parecían disponerse alrededor de las dendritas apicales de las células piramidales. En el siguiente año, Szentágothai (1975) realizó una descripción más detallada de estas neuronas; destacando que sus terminales axónicos formaban cilindros de botones verticales, que se asemejan a los candiles de un candelabro (Figura 10). En este mismo año, Jones (1975) describió neuronas similares cuyos axones formaban segmentos terminales orientados verticalmente en la corteza somatosensorial del mono haciendo sinapsis con las dendritas apicales de las células piramidales y se refirió a ellas como células de axón corto o interneuronas de tipo 4 (Figura 10A). El paso más importante en la interpretación del papel de estas neuronas en los circuitos corticales fue dado por Somogyi (1977), que exami-

nando la corteza visual de la rata, caracterizó con el método de Golgi y microscopía óptica y electrónica, las sinapsis simétricas entre terminales de las células Ch con los segmentos iniciales del axón de las neuronas piramidales. Como mencionamos previamente, muchas interneuronas establecen sinapsis sobre distintas regiones postsinápticas de las células piramidales. Sin embargo, las células Ch son únicas al establecer sinapsis exclusivamente con el segmento inicial del axón (SIA), dominio celular especializado en la generación de potenciales de acción. De hecho, representan la principal fuente de sinapsis sobre el SIA de las células piramidales (Somogyi 1977; Fairén and Valverde 1980; Peters et al. 1982; Somogyi et al. 1982, 1985; Freund et al. 1983; DeFelipe et al. 1985, 1989; Williams and Lacaille 1992; Buhl et al. 1994; DeFelipe 1999). Por lo tanto, a diferencia de las neuronas que inervan compartimentos dendríticos y somáticos, se considera que las células Ch ejercen una fuerte influencia en el control de la actividad de las células piramidales (Miles et al. 1996; DeFelipe 1999).

1.4.2. Morfología

La morfología completa de las células Ch se ha visualizado utilizando el método de Golgi (Figura 10A, Jones, 1975; Szentágothai, 1975; Somogyi 1977; Fiaren y Valverde 1980; Peters y cols., 1982; Somogyi y cols., 1982; DeFelipe y cols., 1985; Kisvárdy y cols., 1986; Marin-Padilla, 1987; Lewis y Luna, 1990; DeFelipe, 1999). Las células Ch pueden considerarse como bipolares siguiendo la clasificación de Feldman y Peters (1978). Las células Ch presentes en las capas II-III de la corteza visual de rata y gato presentan un soma entre fusiforme, esférico y ovoide de tamaño medio aunque es variable (10-30 micras) con arborización dendrítica ascendente y descendente dando un aspecto de forma de “llama”. (Szentágothai, 1973; Somogyi, 1977; Fairén y Valverde, 1980; Peters y cols., 1982; Soriano y cols., 1990). El axón parte de la zona inferior del soma o de una de las principales dendritas descendentes, y se ramifica profusamente tras un corto curso descendente (Somogyi, 1977; Fairén y Valverde, 1979). El axón de la célula Ch puede ejercer su función alrededor de 200-300 micras en dirección tangencial (Somogyi, 1977, Fairén y Valverde, 1980). La principal arborización del axón tiene lugar alrededor del cuerpo celular (Jones, 1975; Tömböl, 1978), algunas células Ch se caracterizan por un segundo plexo axónico situado en capas corticales profundas e incluso en la sustancia blanca (Fairén y Valverde, 1980). En general, este patrón de ramificación axónica se mantiene en la corteza visual de rata, gato y mono, donde se han descrito células Ch cuyas ramificaciones del axón, se presentan en capas II-III y en capa VI, respectivamente (Somogyi, 1977; Lund y cols., 1979). Sin embargo, la morfología del plexo axónico es variable, no constituyendo por si mismo un criterio identificador de este

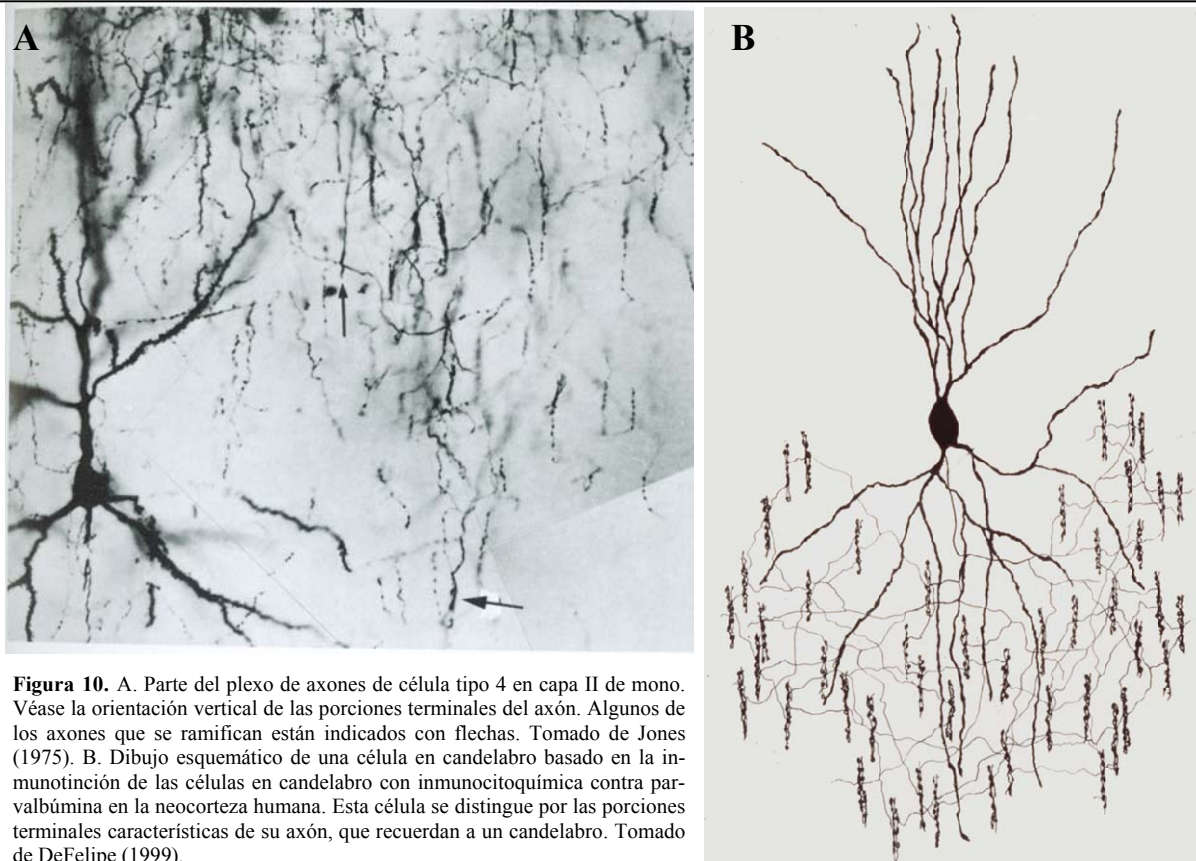


Figura 10. A. Parte del plexo de axones de célula tipo 4 en capa II de mono. Véase la orientación vertical de las porciones terminales del axón. Algunos de los axones que se ramifican están indicados con flechas. Tomado de Jones (1975). B. Dibujo esquemático de una célula en candelabro basado en la inmunotinción de las células en candelabro con inmunocitoquímica contra parvalbúmina en la neocorteza humana. Esta célula se distingue por las porciones terminales características de su axón, que recuerdan a un candelabro. Tomado de DeFelipe (1999).

tipo neuronal (Fairén y Valverde, 1980). De hecho, Tömböl, (1978) incluso establece dos variedades de células Ch en corteza visual del mono en base a la orientación horizontal y vertical de su plexo axónico. Asimismo, el axón de las células Ch en la formación del hipocampo se ramifica a lo largo de la capa granular del giro dentado siguiendo un curso horizontal de 300 a 600 micras (Soriano y cols., 1990) y en el complejo subicular también se han diferenciado dos tipos de células Ch (tipos I y II) en función de la orientación vertical y horizontal de la arborización axonal (Soriano y cols., 1993). Por todo esto, únicamente las porciones terminales del axón son claramente representativas de las células Ch.

Los terminales Ch se han descrito como agregados de 10 a 20 micras de longitud en la corteza visual de la rata y están formados por botones de 1-2 micras de diámetro (Somogyi, 1977; Peters y cols., 1982) y entre 20 y 50 en corteza visual de gato (Fairén y Valverde, 1980; Fariñas y DeFelipe 1991). Estos terminales Ch pueden presentar distintos grados de complejidad (Figura 11 B y C), desde una simple fila de tres a cinco dilataciones axónicas hiladas por una única fibra de conexión, a complicados cilindros verticales huecos en los que hasta 50 botones aparecen conectados por varias trenzas axonales (Fairén y Valverde, 1980; Soriano y cols., 1990, 1993; Peters y cols., 1982). Además de contactos sinápticos se han descrito algunas uniones adherentes entre el SIA de las células piramidales y los terminales Ch, (Fairén y Valverde, 1980; Peters y cols., 1982).

1.4.3. Distribución y características bioquímicas

Desde el descubrimiento de las células Ch numerosos autores han centrado sus estudios en el análisis de su distribución, en diferentes tipos de áreas corticales, capas y especies. Se han utilizado para ello distintas metodologías, desde el método de Golgi hasta técnicas de inmunohistoquímica, e inmunofluorescencia con microscopio óptico y electrónico y microscopía láser confocal. Las células Ch están presentes en diferentes tipos de corteza: paleocorteza, archicorteza y neocorteza, incluyendo corteza piriforme, entorrinal, subículo, hipocampo, giro dentado y corteza cingulada (Szentágothai y Arbib, 1974; Jones, 1975; Fairén y Valverde, 1980; Somogyi y cols., 1982, 1983b, 1985; Soriano y Frotscher, 1989; Soriano y cols., 1990, 1993; Schmidt y cols., 1993; Buhl y cols., 1994; Gabbott y Bacon, 1996; Martínez y cols., 1996; Mikkonen y cols., 1997; Arellano y cols., 2002). Asimismo, los terminales Ch están presentes en la corteza cerebral de distintas especies de mamíferos (Figura 12), incluyendo rata (Somogyi 1977; Minelli et al. 1995; Tamas and Szabadics 2004; Hardwick y cols., 2005), cobaya (Gulyas et al. 1993), gato (Fairén and Valverde 1980; Fariñas and DeFelipe 1991), conejo (Muller-Paschinger et al. 1983), ratón (Chiu et al. 2002), hurón (Krimmer and Goldman-Rakic 2001), mono (Somogyi et al. 1982, 1983; DeFelipe et al. 1985) y en el hombre (Kisvarday et al. 1986; DeFelipe 1999; Arellano y cols., 2002; Lewis et al. 2005).

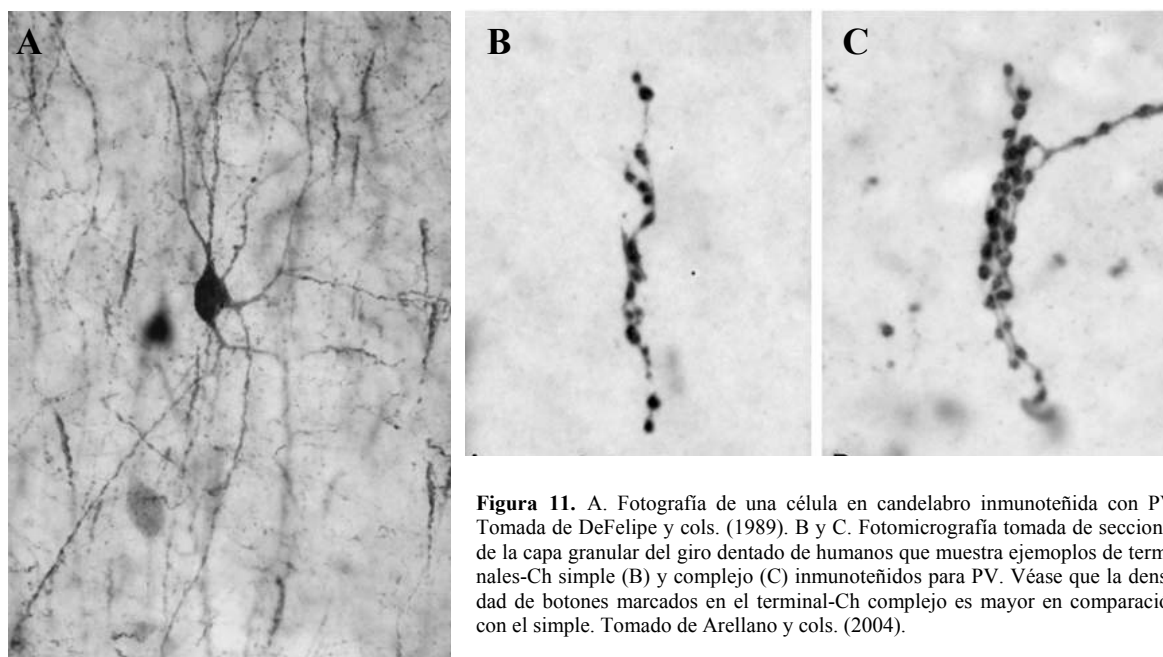


Figura 11. A. Fotografía de una célula en candelabro inmunoteñida con PV. Tomada de DeFelipe y cols. (1989). B y C. Fotomicrografía tomada de secciones de la capa granular del giro dentado de humanos que muestra ejemplos de terminales-Ch simple (B) y complejo (C) inmunoteñidos para PV. Véase que la densidad de botones marcados en el terminal-Ch complejo es mayor en comparación con el simple. Tomado de Arellano y cols. (2004).

A pesar de esta amplia distribución, la inhibición en el SIA de las células piramidales parece no ser homogénea entre especies, regiones corticales, capas y poblaciones neuronales.

Las células Ch son heterogéneas químicamente y se ha demostrado mediante métodos inmunocitoquímicos que expresan diferentes combinaciones de sustancias en distintas regiones, capas y especies. Los estudios inmunocitoquímicos para GABA o su enzima sintetizadora (glutámico descarboxilasa, GAD) corroboraron las observaciones previas mediante análisis morfológico que sugerían que las células Ch son GABAérgicas y por tanto inhibitorias (Peters y cols., 1982; Freund y cols., 1983; DeFelipe y cols., 1985; Somogyi y cols., 1985; Buhl y cols., 1994). La identificación de la proteína fijadora de calcio parvalbúmina (PV) como marcador inmunocitoquímico de las células Ch supuso un paso importante en su estudio (figura 11A, 13A y C; DeFelipe y cols., 1989; Schmidt y cols., 1993; Woo et al. 1998; Melchitzky et al. 1999). Sin embargo, el marcaje con PV no es exclusivo de las células Ch ya que la PV también está presente en células en cesto. Asimismo, en algunas regiones las células Ch expresan calbindina D-28k (Del Río y DeFelipe, 1997), pero no calretinina y contienen factor liberador de corticotropina (Lewis y cols., 1989; Lewis y Lund, 1990), pero no otros neuropéptidos, como colecistoquinina, somatostatina, neuropéptido Y, polipéptido intestinal vasoactivo y tachiquininas (revisado en DeFelipe y Fariñas, 1992). También se han descrito terminales Ch inmunorreactivos para la forma polisializada de la molécula de adhesión neural (PSA-NCAM, Figura 13 B, C, E y D; Arellano et al. 2002). Todos estos datos han sugerido la existencia de diferentes subpoblaciones de células Ch en la corteza cerebral, cada una diferenciándose por sus características bioquímicas. Esto supone una dificultad añadida para los estudios de distribución de

estas células, dado que las diferencias observadas entre áreas, capas y especies pueden deberse no sólo a la existencia de diferentes proporciones de células o terminales Ch sino también a la presencia de diferentes subpoblaciones (Arellano y cols., 2002).

La heterogeneidad bioquímica de las células Ch y la ausencia de un marcador específico que identifique toda su estructura ha dificultado el estudio de los circuitos corticales en los que están implicadas. De hecho, existen pocos trabajos que estudien el patrón de conectividad aferente y eferente de las células Ch. Parece que las células Ch reciben sinapsis simétricas y asimétricas en soma y dendritas pero no en su SIA (Peters y cols., 1982; Soriano y cols., 1990, 1993). En cuanto a las dianas de proyección de las células Ch se acepta ampliamente que los terminales Ch inervan exclusivamente el SIA de las células piramidales de la neocorteza (Szentagothai y Arbib 1974; Jones 1975; Somogyi 1977; Fairen y Valverde 1980; Peters y cols., 1982; Somogyi y cols., 1982, 1985; Freund y cols., 1983), células estrelladas de capa IV (Fairén y Valverde, 1980) y las células granulares de giro dentado de la formación hipocámpal (Soriano y cols., 1990; Arellano, 2004). Sin embargo, algunos trabajos han sugerido que los terminales Ch además inervan otros elementos como el SIA de otros tipos celulares, como células no piramidales en corteza somatosensorial de mono (Sloper y Powel, 1979) o incluso que las colaterales axónicas que aparentemente no forman terminales Ch contactan con otros tipos celulares (Peters y cols., 1982). Sin embargo, este tipo de sinapsis axo-axónicas que implican el SIA de células no piramidales son muy escasas en comparación con las de las células piramidales (Sloper y Powel, 1979).

A pesar de la existencia de numerosos estudios de distribución, no existe un análisis detallado y sistemático acerca de la densidad de terminales Ch en la corteza cerebral humana y del ratón. Poco se sabe acerca

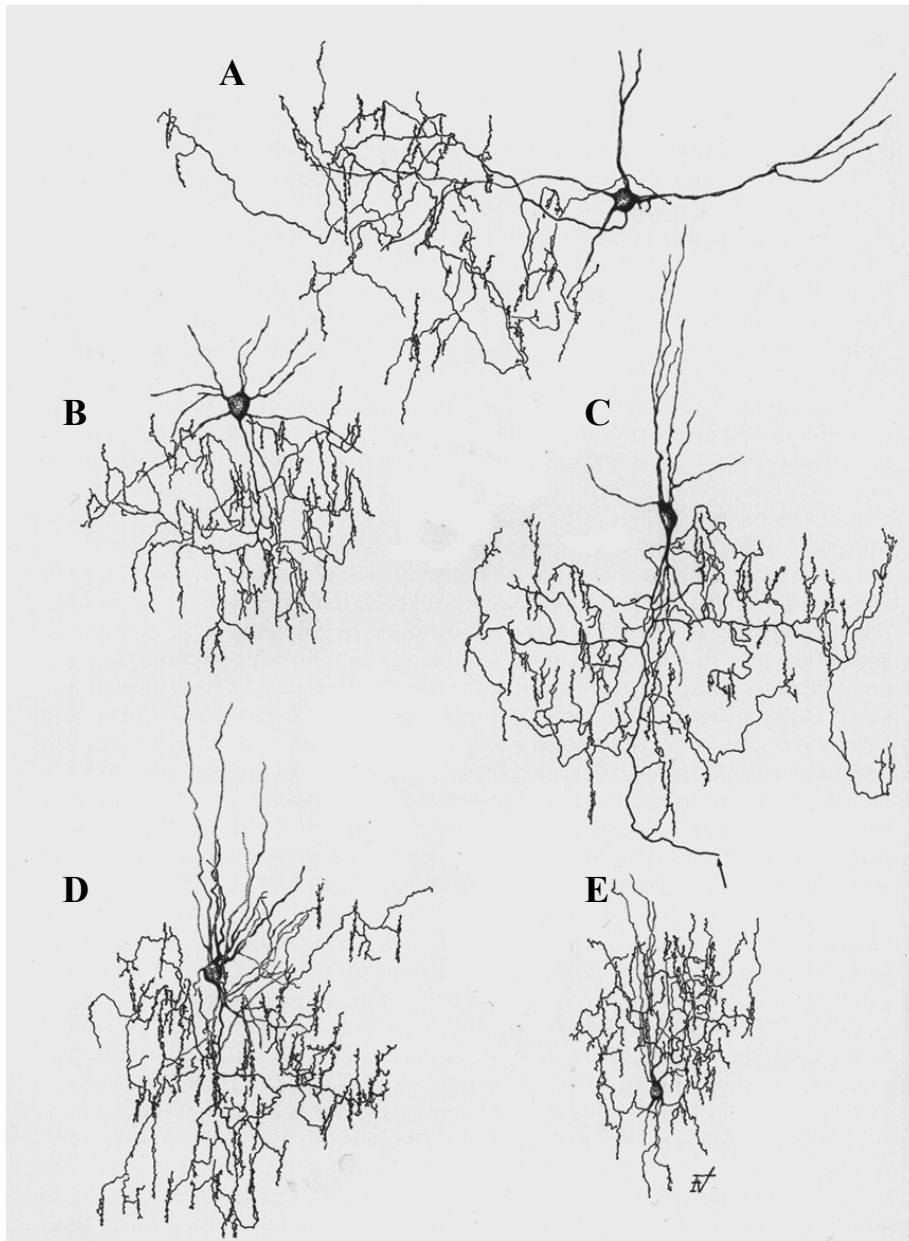


Figura 12. Células en candelabro teñidas con el método de Golgi, de la corteza cerebral de distintas especies de mamíferos. A. erizo, B. ratón, C. conejo, D. gato, E. mono. Tomada de Valverde (1984).

de la especificidad de las dianas de proyección de los terminales Ch. Parece ser que una célula Ch inerva un gran número de SIAs, e incluso puede que un único SIA de una célula piramidal sea inervado por una o varias células Ch (reviewed in DeFelipe 1999). Además, el número de aferencias sinápticas en el SIA difiere en función de la edad, localización y la diana de proyección de las células piramidales (DeFelipe et al. 1985; Fariñas and DeFelipe 1991; Cruz y cols., 2003). En el presente trabajo, utilizaremos métodos inmunocitoquímicos con anticuerpos para parvalbúmina (PV) y el transportador de GABA 1 (GAT-1) (DeFelipe y González-Albo, 1998) que se han descrito como los métodos de marcaje más general, prominente y completo de terminales Ch (Figura 13D).

1.4.4. Características fisiológicas

La mayoría de las sinapsis GABAérgicas de la corteza cerebral contactan con las células piramidales (Johnson y Burkhalter, 1996) y cuando se activan suprimen la excitación en las neuronas postsinápticas (Ferster y Jagadeesh, 1992). El efecto inhibitorio puede implicar hiperpolarización y bloqueo del disparo de potenciales de acción (Miles y cols., 1996) o inducir cambios de la conductancia de membrana que reducen la amplitud de las respuestas excitadoras (Borg-Graham y cols., 1998). Las células Ch se clasifican como interneuronas de disparo rápido y varios grados de acomodación de frecuencia de disparo (revisado en Howard y cols., 2005). La generación de potenciales de acción en las células Ch induce eventos postsináp-

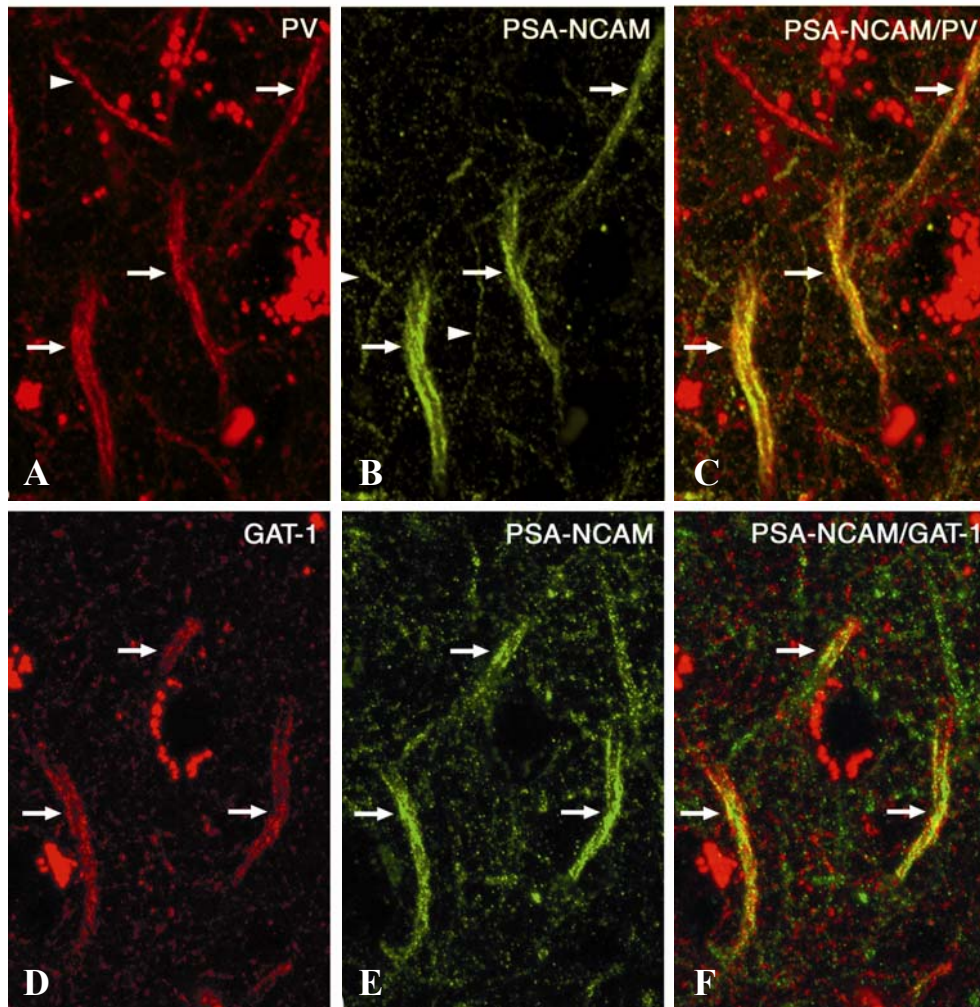


Figura 13. Series de imágenes de microscopía confocal de la misma sección y campo tomada de la capa III de la corteza entorrinal (hombre 23 años) para ilustrar el doble marcaje de terminales en candelabro (flechas). Los terminales-Ch positivos para PSANCAM se muestran en verde (B y E), mientras que las imágenes rojas muestran los terminales inmunoreactivos para PV y GAT-1 (A y D, respectivamente). Véase que PV y GAT-1 colocalizan con PSANCAM (C y F, respectivamente), formando cilindros alrededor de los SIAs de las células piramidales. Tomada de Arellano y cols. (2002).

ticos inhibitorios en las células piramidales que están mediados por receptores $GABA_A$ y modulados por receptores $GABA_B$ presinápticos (Buhl y cols., 1994). Algunos estudios electrofisiológicos *in vivo* realizados en los últimos años (Klausberger y cols., 2003) han comenzado a caracterizar, además de los efectos de las células Ch sobre sus dianas postsinápticas, su función global dentro de los circuitos corticales. Dichos estudios, principalmente realizados en el hipocampo, sugieren que las células Ch contribuyen a la sincronización de las respuestas de las neuronas principales del hipocampo y a las oscilaciones a distintas frecuencias, como el ritmo theta (4-8 Hz), que ocurre durante la exploración del medio y el sueño REM, y las ráfagas rápidas (120-200Hz), que ocurren durante el sueño de ondas lentas. Se han registrado diferentes formas de disparo en células Ch en el estrato piramidal de hipocampo observándose durante el ritmo theta, un aumento sincrónico de la tasa disparo en antifase con el de las células piramidales. Asimismo, durante el sueño de ondas lentas se ha demostrado que las células Ch generan potenciales de acción justo

antes del inicio de las ráfagas rápidas (Klausberger y cols., 2003). Se ha estimado que cada célula Ch origina entre 200 y 300 terminales Ch capaces de hacer contacto con un número equivalente de células piramidales (Somogyi y cols., 1985). Además, algunos estudios han sugerido la existencia de un acoplamiento eléctrico de distintas neuronas Ch a través de uniones de tipo GAP a nivel dendrítico (Klausberger y cols., 2003). De este modo, las células Ch participarían en la sincronización y actividad oscilatoria de grandes poblaciones de neuronas piramidales (Somogyi y cols., 1983; Klausberger y cols., 2003). En resumen, las células Ch representan la principal fuente de sinápsis en el SIA (ver sección 1.4.1) por ello se considera que ejercen un papel fundamental en el control de la excitabilidad celular, inhibiendo la generación y propagación retrógrada de potenciales de acción y participando en la sincronización de los patrones de disparo de grandes poblaciones de células piramidales en los diferentes estados de consciencia (Cobb et al., 1995; Klausberger y cols., 2004; Howard et al., 2005; Szabadics y cols., 2006).

1.4.5. Patologías relacionadas con alteraciones de las células en candelabro

El hecho de que las células Ch participen en el control inhibitorio y en la sincronización de las respuestas de las neuronas piramidales sugiere que alteraciones patológicas de estas células podrían tener consecuencias importantes en el correcto funcionamiento de los circuitos corticales. De hecho, algunas patologías neurológicas y psiquiátricas importantes como la epilepsia y la esquizofrenia (DeFelipe, 1999; Lewis y cols., 2004; Wittner y cols., 2001) se han relacionado con alteraciones morfológicas y neuroquímicas de las células Ch. En pacientes diagnosticados con esquizofrenia se han descrito, en neuronas GABAérgicas de la corteza prefrontal dorsolateral, disminuciones de los niveles del RNAm de PV (Hashimoto y cols., 2003), de la enzima sintetizadora de GABA GAD67 y del transportador de GABA GAT-1 (Volk y cols., 2002). Asimismo, en material procedente de dichos pacientes se observó una pérdida de terminales Ch inmunorreactivos para GAT-1 (Woo y cols. 1998; Konopaske y cols., 2006) y un aumento de receptores GABA_A- α 2 en el SIA (Volk y cols., 2002; Volk y Lewis., 2002). Funcionalmente, esto podría corresponder con una disminución de producción de GABA que conlleva una disminución de la recaptación presináptica y el aumento de receptores postsinápticos, como mecanismos compensatorios (Lewis y cols., 2004, 2005). En la corteza de pacientes con epilepsia del lóbulo temporal, también se han descrito una pérdida de células PV-positivas y de terminales Ch, que coincide con disminución de marcaje para GAD (DeFelipe, 1993; Marco y cols., 1996; Marco y DeFelipe, 1997). Además de la pérdida de células Ch, se han descrito la presencia de formaciones en candelabro hipertróficas inmuno-reactivas para PV, CB y GAT-1 en diferentes regiones de la formación del hipocampo de pacientes epilépticos (Arellano y cols., 2004). Asimismo se han observado alteraciones en el número y la composición de los subtipos de receptores de GABA_A (Loup y cols., 2000) y una reducción de la expresión de los receptores de GABA_B en las células granulares de giro dentado de estos pacientes (Muñoz y cols., 2002). La mayoría de las hipótesis acerca de la actividad epileptogénica se basan en el desequilibrio de los sistemas excitadores (glutamatérgicos) e inhibidores (GABAérgicos) en los circuitos corticales. Se desconoce si estas alteraciones observadas son causa o consecuencia de la hiperexcitabilidad de la red. Sin embargo, teniendo en cuenta que las células Ch ejercen su efecto en una región crítica para el control de la actividad neuronal y que una sola célula Ch puede estar regulando grandes poblaciones neuronales, estas alteraciones pueden ser un componente clave para el establecimiento de la actividad epileptogénica (revisado en DeFelipe, 1999).

Uno de los objetivos de nuestro estudio es caracterizar los patrones de distribución de terminales Ch

en diversas áreas de la corteza cerebral humana para establecer las bases de estudio de sus posibles alteraciones en diversas patologías. Asimismo, pretendemos estudiar los patrones de distribución de los terminales Ch en la corteza cerebral del ratón como base para poder interpretar posteriormente la contribución de sus alteraciones al desarrollo de la esquizofrenia y la epilepsia en modelos murinos de estas patologías (Smart y cols., 1998; Chen et al, 2004; Cobos et al, 2005; Zhu y cols., 2004; Lewis y cols., 2005; Nabeshima y cols., 2006; Romero y cols., 2006).

1.5. SEGMENTO INICIAL DEL AXÓN DE LAS CELULAS PIRAMIDALES

1.5.1. El segmento inicial del axón: características funcionales

El SIA de las células piramidales corticales es un compartimento celular único implicado en la regulación de la excitabilidad neuronal y la generación de los potenciales de acción y por lo tanto, en la conversión los potenciales postsinápticos (generados en las dendritas y en el soma) en las distintas frecuencias de potenciales de acción que representan la salida neuronal (Stuart y Sakmann, 1994; Colbert and Johnston, 1996; Stuart et al., 1997). En los años 50 se sugirió por primera vez que el inicio del potencial de acción ocurre en el SIA (Hodgkin y Huxley, 1952). A lo largo de los años, muchos estudios han tratado de demostrar la presencia de potenciales de acción e incluso su generación en otras localizaciones neuronales como en las dendritas (Hirsch y cols., 1995), el soma (Buzsaki y cols., 1996) y en regiones del axón alejadas del SIA. De hecho, estudios recientes han sugerido que los potenciales de acción en las células piramidales corticales de la capa V (Colbert y Pan, 2002) y las células de Purkinje del cerebelo se generan en el primer nodo de Ranvier (Clark y cols., 2007). Para que esto se produzca, el potencial resultante de la integración de los potenciales postsinápticos debería estar por debajo del potencial umbral de apertura de los canales de Na del SIA y superar el valor umbral de los canales de Na del primer nodo de Ranvier. En estas circunstancias, los canales de Na dependientes de voltaje en el SIA servirían para propagar retrógradamente los potenciales de acción al soma y dendritas. Las diferencias de umbral del potencial de acción entre el SIA y los nodos de Ranvier podrían depender de resistencia axial, del diámetro, longitud y densidad de los canales de Na pero también podrían reflejar diferencias en la distribución de los canales de Na y K dependientes de voltaje o en las isoformas presentes en cada una de las regiones. Estas variaciones podrían determinar el umbral para el inicio del potencial de acción en cada lugar. Para entender cómo se convierten las entradas sinápticas en una determinada salida neuronal, es esencial en primer lugar comprender la organización de los dominios donde se generan los potenciales de acción.

1.5.2. Estructura del segmento inicial del axón, similitudes con los nodos de Ranvier

El SIA y los nodos de Ranvier presentan una estructura y componentes moleculares semejantes. Ramón y Cajal en 1928, dedujo que los nodos contenían componentes moleculares específicos. Sus observaciones presagiaron estudios ultraestructurales y moleculares posteriores en cuanto a organización de los componentes de los nodos de Ranvier (Arroyo y Scherer, 2000). Tanto en el sistema nervioso central como en el periférico, las fibras mielinizadas están organizadas en distintos dominios: los nodos de Ranvier, las regiones paranodales y yuxtaparanodales, y las regiones internodales (Salzer, 1997; Arroyo y Scherer, 2000). Esta organización, producto de la expresión selectiva en los distintos dominios axonales de complejos multiproteicos específicos formados por moléculas de adhesión, canales iónicos, y moléculas de anclaje al citoesqueleto (Salzer., 2003), es crítica para la conducción saltatoria del impulso nervioso y es el resultado de interacciones complejas y poco conocidas entre los axones y las células gliales (Peles y Salzer, 2000). Los canales de Na⁺ y K⁺ dependientes de voltaje están segregados espacialmente y distribuidos simétricamente en los nodos de Ranvier, restringidos a las regiones nodales y yuxtaparanodales, respectivamente, las cuales están separadas por la región paranodal (Figuras 14 y 15; Arroyo y Scherer, 2000; Rasband y Trimmer, 2001; Salzer, 2003).

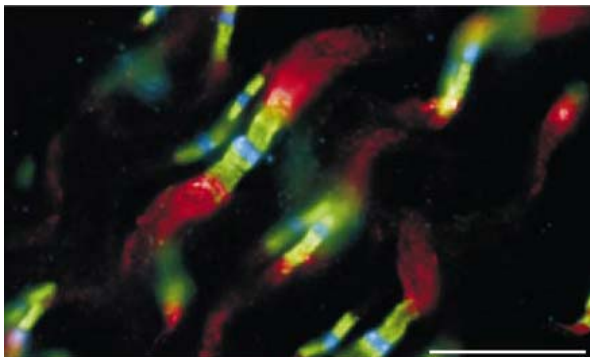


Figura 14: Imagen de fluorescencia de Nodo de Ranvier de nervio óptico de rata con un triple marcaje para canales de Na (azul), Caspr (verde), y canales Kv1.2 (rojo). Barra de escala: 10µm, Tomado de Rasband y Trimmer (2001).

Los canales de Na⁺ dependientes de voltaje son complejos heterotriméricos, con una subunidad α que forma el canal y dos subunidades β transmembrana, (Figura 15B; Catterall, 2000). Los canales de Na⁺ forman parte de un complejo multiprotéico en el SIA y en los nodos de Ranvier (Peles y Salzer, 2000). Cada subunidad β del canal de Na⁺ contiene un dominio similar al de las inmunoglobulinas que fomenta la adhesión homofílica; e interacciona con componentes de la matriz extracelular (Isom, 2002) y con la Neurofascina y Nr-CAM (componentes de la superfamilia de moléculas de adhesión LICAM). Estas interacciones contribuyen a la organización del complejo nodal (Bennett y Lambert, 1999; Ratcliffe y cols., 2001).

Un componente clave de este complejo Na/NrCAM/ Neurofascina es la proteína Anquirina G que se une a los canales de Na⁺ (Davis y cols., 1996; Bennett y Lambert, 1999; Garrido y cols., 2003). La familia anquirina presenta una región de repeticiones de dominios ANK que median el reconocimiento de un gran número de proteínas entre las que se encuentran factores de transcripción y proteínas NFKappa/IKappaB (Cramer y Muller, 1999). La anquirina G, a su vez, se une a la espectrina IV β , una isoforma de espectrina que se localiza en tanto en los nodos como en los SIA (Berghs y cols., 2000; Komada y Soriano, 2002). Se supone que la espectrina IV β proporciona la unión entre el complejo del canal y el citoesqueleto de actina (Bennett y Gilligan, 1993, Komada y Soriano, 2002). Además de los canales de Na⁺ dependientes de voltaje, recientemente se ha descrito en la región nodal de los nodos de Ranvier la presencia de canales de K⁺ Kv3.1b (Devaux y cols., 2003) y KCNQ2, un canal M que regula la excitabilidad neuronal (Cooper y Jan, 2003; Scherer y Arroyo., 2002).

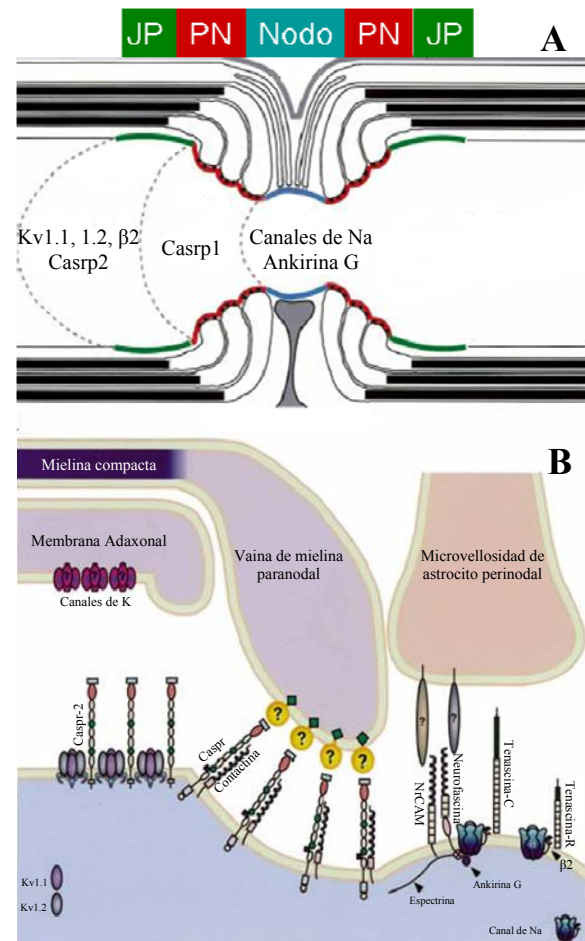


Figura 15. A: representación esquemática de las regiones nodal, paranodal (PN) y juxtaparanodal (JP) del nodo de Ranvier. B: Dibujo esquemático de las posibles interacciones en cis y trans entre los componentes moleculares de los nodos, paranodos y juxtaparanodos (Arroyo y Scherer 2000).

La región paranodal se caracteriza por la aposición sobre la membrana axónica de procesos astrogliales denominadas uniones de tipo septal, por su

similitud con las uniones septales de invertebrados (Einheber y cols., 1997). A las que se les ha asignado diferentes funciones: anclar los bucles de mielina al axón, formar una barrera de difusión parcial en el espacio periaxonal, y demarcar los dominios axónicos limitando la difusión lateral de los componentes de la membrana (Rosenbluth, 1995). Se ha descrito el complejo de moléculas de adhesión Contactina y Caspr o paranodina como componente fundamental de estas uniones de tipo septal (Figura 15B; Einheber y cols., 1997; Menegoz y cols., 1997; Bhat y cols., 2001). Caspr se expresa en neuronas, es una glicoproteína intrínseca de membrana que se localiza en el axolema paranodal, y está íntimamente asociada a contactina (Figura 15B; Peles y cols., 1997). Su dominio citoplasmático contiene una secuencia de unión para la proteína 4.1 que a su vez puede unirse al citoesqueleto de actina (Arroyo y Scherer, 2000). La isoforma de 155KDa de Neurofascina se expresa en los paranodos en la glia mielinizante e interacciona con el complejo Caspr-Contactina (Charles y cols., 2002).

La región yuxtaparanodal se encuentra justo por debajo de la vaina de mielina compacta inmediatamente adyacente a la región paranodal (Figura 15). La membrana axónica en la región yuxtaparanodal presenta una agrupación de canales rectificadores tardíos, Kv1.1 y Kv1.2 (Wang y cols., 1993; Rasband y cols., 1998). Kv1.1 y Kv1.2 están asociados con Caspr2 (Figura 15B), una proteína neuronal que es estructuralmente similar a Caspr pero que contiene además en su carboxilo terminal una secuencia de unión a dominios PDZ. Las proteínas con dominios PDZ están implicadas en el anclaje y agrupamiento de estos canales a la sección yuxtaparanodal (Poliak y cols., 1999). Aunque las conexiones entre la membrana yuxtaparanodal axonal y las vainas de mielina no se han descrito, es posible que Caspr2 tenga una proteína complementaria en la membrana de las células gliales, como se ha observado para Caspr (Arroyo y Scherer, 2000).

Aunque tenemos una idea aproximada de los constituyentes de los distintos dominios, nodal, yuxtaparanodal y paranodal, las moléculas clave que regulan el ensamblaje y la agrupación de estos dominios a la membrana no es conocida aún (Sherman y Brophy, 2005). Los SIA parecen tener una composición molecular similar pero no idéntica a los nodos de Ranvier. Estudios previos en distintos tipos neuronales han descrito la presencia de ankirina G, espectrina IV β , canales de Na⁺ y proteínas de la familia L1CAM en los SIA (Bennett y Chen, 2001, Devaux y cols., 2004).

Las proteínas de adhesión localizadas en el SIA se han relacionado, además de con procesos de ensamblaje y agrupamiento de canales iónicos a regiones específicas de membrana, con mecanismos de señalización que guían procesos migratorios durante el desarrollo. De hecho, estudios previos sugieren la implicación de las moléculas de adhesión del SIA en la señalización para la localización específica del termi-

nal-Ch en el desarrollo de la corteza (Ango y cols., 2004). Debido a la escasez de datos sobre la distribución de los canales de Na y K dependientes de voltaje y de las proteínas asociadas (espectrina-IV, ankirina G y Caspr2) en el SIA de las células piramidales, en el presente trabajo, nos proponemos estudiar la distribución detallada de moléculas relevantes para el funcionamiento de los SIAs de la corteza cerebral humana. Asimismo, pretendemos caracterizar la posible relación entre la distribución de los canales iónicos del SIA con la distribución de los terminales Ch.

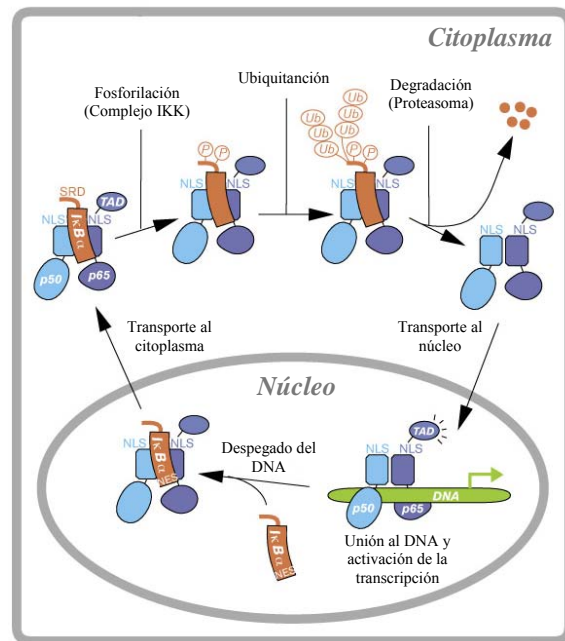


Figura 16. Diagrama esquemático de la vía de regulación de NFκB. IκB determina la localización subcelular de NFκB, evita su entrada al núcleo y promueve su salida al citoplasma, actuando como adaptador. Las subunidades de NFκB, p50 y p65 se muestran con colores celeste y violeta, respectivamente. IκBα aparece en marrón y el DNA en color verde (Cramer y Muller, 1999).

1.5.3. Presencia de pIκBα en el segmento inicial del axón. Ruta de señalización de NFκB y su implicación en el desarrollo axonal

Las neuronas del sistema nervioso central se caracterizan por una activación constitutiva del factor de transcripción NFκB. Dicha activación promueve la supervivencia neuronal protegiendo a las neuronas de la muerte celular por apoptosis, por lo que la vía NFκB podría unir actividad neuronal a supervivencia (Schultz y cols., 2006). El complejo inactivo NFκB consiste en un heterodímero p50-p65, se encuentra retenido en el citoplasma por unión al factor inhibidor IκB, que enmascara su secuencia de localización nuclear (NLS, Figura 16). Estudios llevados a cabo mayoritariamente en el sistema inmune, han demostrado la activación de receptores, presencia de citoquinas o moléculas de adhesión provocan la activación de la kinasa IKK, que produce la fosforilación en

las serinas 32 y 36 de I κ B, provocando la liberación del NF κ B y su translocación al núcleo donde actúa como factor de transcripción de numerosos genes implicados en supervivencia celular, apoptosis y regulación de la homeostasis respuestas inflamatorias. A su vez pI κ B se ubiquitina y degrada en el proteasoma (DiDonato y cols., 1997; Mercurio y cols., 1997; Yaron y cols., 1998).

La importancia de la activación de la vía de NF κ B se pone se manifiesto por el hecho de que ratones knock-out para las proteínas IKKs e I κ B α mueren en fase embrionaria o perinatal y presentan deformaciones craneoencefálicas entre otras anormalidades.

Estudios recientes *in vivo* e *in vitro* han descrito en la membrana del SIA de neuronas de rata, además de las moléculas de adhesión anteriormente citadas algunas de las moléculas relacionadas con la vía de NF κ B (Fig 16). Por una parte, IKK y P65 se encuentran asociadas al citoesqueleto, a través de la ankirina (Cramer y Muller, 1999), mientras que pI κ B α se presenta asociado a microtúbulos en el SIA de neuronas

de corteza, hipocampo, cerebelo y áreas subcorticales de la rata (Schultz y cols. , 2006).

Hasta el momento se desconocen las funciones que podría desempeñar la activación de la vía NF κ B en el SIA. Estudios previos sugieren que la presencia de pI κ B α es independiente de la generación de los potenciales de acción (Schultz y cols., 2006), pero es necesaria para la concentración de ankirina G y canales de Na y el correcto desarrollo del axón (Sanchez-Ponce y cols. 2008). En nuestro trabajo proponemos validar al pI κ B α como marcador del SIA en la corteza cerebral humana y del ratón, y de este modo, utilizarlo como herramienta para estudiar la distribución de los terminales Ch en relación a los SIAs en situación control. Asimismo, debido a las alteraciones que se producen en los terminales Ch en situaciones patológicas (véase apartado 1.4.5) pretendemos estudiar en la neocorteza y formación del hipocampo de pacientes con epilepsia del lóbulo temporal, si la expresión del pI κ B α en el SIA depende de la inervación GABAérgica por parte de las células en candelabro.

OBJETIVOS

El objetivo principal de la presente tesis doctoral consiste en el estudio de la organización de los segmentos iniciales del axón de las neuronas de la corteza cerebral. En primer lugar, se analizará la inervación GABAérgica de los segmentos iniciales del axón de las células piramidales por parte de los terminales axónicos de las interneuronas en candelabro.

Para ello abordaremos los siguientes objetivos concretos:

1. Análisis de la densidad y los patrones de distribución de los terminales en candelabro en distintas regiones de la corteza cerebral y el complejo claustroromigdalino del ratón, en relación con la distribución de los segmentos iniciales del axón y con el origen embrionario de los distintos territorios.
2. Análisis de la densidad y los patrones de distribución de los terminales en candelabro en las distintas áreas y capas de la neocorteza humana en relación con la densidad neuronal de cada una de ellas.
3. Valoración de la forma fosforilada del inhibidor I κ B α (pI κ B α) como marcador de los segmentos iniciales del axón de las neuronas de la corteza cerebral. Estudio de su distribución.
4. Estudio de la distribución de los canales de Na⁺ y de K⁺ dependientes de voltaje, así como de sus proteínas asociadas en la neocorteza temporal humana
5. Estudio de la distribución de los canales de Na⁺ y de K⁺ dependientes de voltaje, en el segmento inicial del axón en relación con la distribución de los terminales en candelabro.

ARTÍCULOS DE INVESTIGACIÓN

3.1. Morphology and distribution of chandelier cell axon terminals in the Mouse Cerebral cortex and Claustroamygdaloid complex.
***Cerebral Cortex* (2008) in press**

Morphology and Distribution of Chandelier Cell Axon Terminals in the Mouse Cerebral Cortex and Claustroramygdaloid Complex

M.C. Inda^{1,2}, J. DeFelipe² and A. Muñoz^{1,2}¹Department of Cell Biology, Universidad Complutense, 28040 Madrid, Spain. ²Instituto Cajal, CSIC, 28002 Madrid, Spain.

Chandelier cells represent a unique type of cortical GABAergic interneuron whose axon terminals (Ch-terminals) only form synapses with the axon initial segments (AISs) of some pyramidal cells. Here, we have used immunocytochemistry for the high-affinity plasma membrane transporter GAT-1 and the calcium binding protein parvalbumin to analyze the morphology and distribution of Ch-terminals in the mouse cerebral cortex and claustroramygdaloid complex. In general, two types of Ch-terminals were distinguished on the basis of their size and the density of the axonal boutons that made up the terminal. Simple Ch-terminals were made up of one or two rows of labeled boutons, each row consisting of only 3 to 5 boutons. In contrast, complex Ch-terminals were tight cylinder-like structures made up of multiple rows of boutons. Simple Ch-terminals were detected throughout the cerebral cortex and claustroramygdaloid complex, the complex type was only occasionally found in certain regions whereas in others they were very abundant. These results indicate that there are substantial differences in the morphology and distribution of Ch-terminals between different areas and layers of the mouse cerebral cortex. Furthermore, we suggest that the distribution of complex Ch-terminals may be related to the developmental origin of the different brain regions analyzed.

Keywords: axon initial segment, pyramidal neuron, plkB α , parvalbumin, hippocampus, GABA, interneurons

Introducción

In the mammalian cerebral cortex, the diversity of GABAergic interneurons has been demonstrated through their morphological, electrophysiological and molecular properties. However, the contribution of each type of interneuron to cortical microcircuits in the various cortical areas, layers and mammalian species is at present poorly understood (e.g., reviewed in Monyer and Markram, 2004; DeFelipe et al., 2005; Yáñez et al., 2005; Dumitriu et al., 2006). Together with basket cells, Chandelier cells represent fast-spiking GABAergic interneurons that express the calcium binding protein parvalbumin (PV). These cells help to control the timing of hyperpolarizations, regulating the firing of pyramidal cells and shaping the network output and the rhythms generated in different states of consciousness (Cobb et al., 1995; Klausberger et al., 2003, 2004; Whittington and Traub, 2003; Howard et al., 2005; Somogyi and Klausberger, 2005; Inda et al., 2006). The axon terminals of chandelier cells form short vertical rows of boutons (Ch-terminals) resembling candlesticks (Szentágothai and Arbib, 1974; Jones, 1975), and they specifically contact the axon initial segment (AIS) of cortical principal cells (see DeFelipe, 1999 for a review), a region critical for the generation of axon potentials (e.g., Stuart and Sakmann, 1994). Thus, chandelier cells are thought to exert a strong inhibitory effect on pyramidal cell output (reviewed in Miles et al., 1996; DeFelipe, 1999; Howard et al., 2005; but see Szabadics et al 2006). Inhibitory inputs to the AIS of pyramidal cells from Ch-terminals have been demonstrated in different mammalian species, although they are not homogeneously distributed. Indeed, they may differ both in their density (i.e., the number of boutons that make up the Ch-terminals) and in their chemical content, as a function of age, species, cortical region and layer, or according to the projection target of the pyramidal cells (see Inda et al., 2007 and refer-

ences therein). In fact, dramatic differences between distinct areas and layers of the human neocortex were identified in systematic studies using immunocytochemical techniques to analyze the density and distribution of Ch-terminals containing the high-affinity plasma membrane transporter GAT-1 (Inda et al., 2007). However, the extent to which this differential distribution may be extrapolated to other mammalian species must be explored since the relative abundance or characteristics of particular types of interneurons may vary between species (Ballesteros-Yáñez et al., 2005; DeFelipe et al., 2005).

Current research on interneurons increasingly relies on the use of transgenic mice with genetic tags for particular populations of interneurons. Combined anatomical, physiological and molecular analysis of these animals provides valuable data to clarify the roles played by each particular type of interneuron in cortical microcircuits (Monyer and Markram, 2004; Dumitriu et al., 2006). In addition, intense research in mice over recent years has focused on the developmental processes responsible for generating interneuron diversity in the neocortex (Butt et al., 2005; Flames and Marín, 2005). However, it is remarkable that no systematic studies have yet been performed on the possible regional differences in the morphology and distribution of Ch-terminals in the mouse cerebral cortex. Since alterations in chandelier cells in humans are associated with important neurological disorders such as epilepsy (DeFelipe et al., 1999; Wittner et al., 2001; Arellano et al., 2004) and schizophrenia (Lewis et al., 2005), such studies could be useful to interpret the specific alterations in chandelier cells that might contribute to these disorders in rodent models of these diseases (Chen et al, 2004; Cobos et al, 2005; Nabeshima et al, 2006; Lewis et al, 2005; Peters et al, 2005; Romero et al, 2006; Smart et al, 1998; Zhu et al, 2004).

In the present study, we have used GAT-1 immunocytochemistry to analyze the distribution of Ch-terminals in various areas of the archicortex (hippocampal formation), paleocortex (olfactory or piriform cortex) and neocortex, derived from distinct progenitor domains of the developing pallial telencephalon (medial, lateral and dorsal pallium, respectively), and in the claustroramygdaloid complex which is of a mixed developmental origin (Puelles et al., 2000; Puelles and Rubenstein, 2003; Campbell, 2003). In addition, to further analyze the morphology of Ch-terminals and their relationship with the AIS of pyramidal cells, we analyzed double-immunostained brain sections to study the distribution of PV and phosphorylated-plkB (pIkBa), a molecule involved in the NF- κ B signalling pathway that accumulates at the AIS (Schultz et al, 2006; Sanchez-Ponce et al., 2008). The results indicate that there are remarkable differences in the morphology and distribution of Ch-terminals between areas and layers of the mouse pallial telencephalon.

Materials and Methods

C57BL/6 mice (n=8 males, aged between 30 and 32 days) were sacrificed by administering a lethal intraperitoneal injection of sodium pentobarbital and they were then perfused intracardially

with saline solution followed by 4% paraformaldehyde in 0.1 M phosphate buffer, pH 7.4 (PB). All experiments were performed in accordance with the guidelines established by the European Union regarding the use and care of laboratory animals. The brain of each animal was removed, post-fixed by immersion in the same fixative for 24 h at 4 °C and serial coronal sections (50 µm thick) were obtained with the aid of a Vibratome (Vibratome, St. Louis, MO, USA). The sections then were batch-processed for immunocytochemical staining and some sections adjacent to those used for immunocytochemistry were Nissl stained.

Immunohistochemistry

Sections were first treated for 30 min with a solution of 0.5% hydrogen peroxide and 50% ethanol in PB to inactivate the endogenous peroxidases. Subsequently, the sections were rinsed in PB and preincubated for 1 hour at room temperature in a stock solution containing 3% normal goat or horse serum (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) in PB with Triton X-100 (0.25%). Thereafter, the sections were incubated for 48 hours at 4 °C in the same stock solution containing the rabbit anti-GAT-1 antiserum (1:2000; Chemicon, Temecula, CA, USA), rabbit antiphospho (Ser32)-IKB α (1:1000; Cell Signaling Technology, Boston, MA, USA), Mouse anti-PV (1:4000, Swant, Bellinzona, Switzerland) or the mouse anti-neuron-specific nuclear protein (NeuN, 1:4000; Chemicon, Temecula, CA, USA) antibody. The sections were washed in PB, incubated in biotinylated horse anti-mouse or goat anti-rabbit secondary antibodies (1:200; Vector), and processed using the Vectastain ABC immunoperoxidase kit (Vector). Antibody labeling for conventional light microscopy was visualized with 0.05% 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB; Sigma, St. Louis, MO, USA) and 0.01% hydrogen peroxide. The sections were rinsed in PB, mounted on glass slides, dehydrated, cleared with xylene and coverslipped. Controls were included in all the immunocytochemical procedures, either by replacing the primary antibody with preimmune goat or horse serum in some sections, by omitting the secondary antibody, or by replacing the secondary antibody with an inappropriate secondary antibody. No significant immunolabeling was detected under these control conditions. Light microscopy images were captured using a digital camera (Olympus DP70) attached to a BX51 Olympus microscope. Adobe Photoshop 7.0 software was used to generate the figures (Adobe Systems Inc., San Jose, CA, USA). The density of complex Ch-terminal was estimated by counting them at a magnification of 400x (using a 40x objective) in at least ten 36,300 µm² regions selected at random from each of the different brain areas analyzed. However, in the CA1-3 fields and the dentate gyrus, the ten regions analyzed were 7,500 µm². The NeuroLucida package (MicroBrightField, Williston, VT, USA) was used to plot GAT1-ir Ch-terminals.

Fluorescent immunostaining:

Sections were double-labeled by incubating them in a combination of rabbit anti-phospho-IKB α (Ser32) and mouse anti PV antibodies in PB with Triton X-100 (0.25%) and 1.5% normal goat and horse serum. The sections were then rinsed and incubated for 2 h at room temperature in biotinylated goat anti-rabbit secondary antibodies (1:200, Vector). After rinsing in PB, the sections were incubated for 2 h at room temperature in Alexa Fluor 488 conjugated streptavidin (1:2,000 Molecular Probes, Eugene, OR, USA) and Alexa 594 conjugated horse anti-mouse (1:2,000, Molecular Probes). The sections were then washed, mounted in antifade mounting medium (Invitrogen/Molecular Probes Eugene, OR, USA), and examined with a Leica (Cambridge, U.K.) TCS 4D confocal laser scanning microscope. Z sections were recorded at 1–2 µm intervals through separate channels (Scanware; Leica). Subsequently, Adobe Photoshop 7.0 software (Adobe Systems Inc.) was used to construct composite images from each optical series by combining the images recorded through both channels. The different telencephalic areas examined were identified on the basis of the anteroposterior and mediolateral coordinates of Hof et al (2000) and according to Paxinos and Franklin (2001). The nature of these structures was later confirmed by analyzing the distinctive cytoarchitectonic features of the areas in adjacent Nissl-stained or Neu-N-immunostained sections

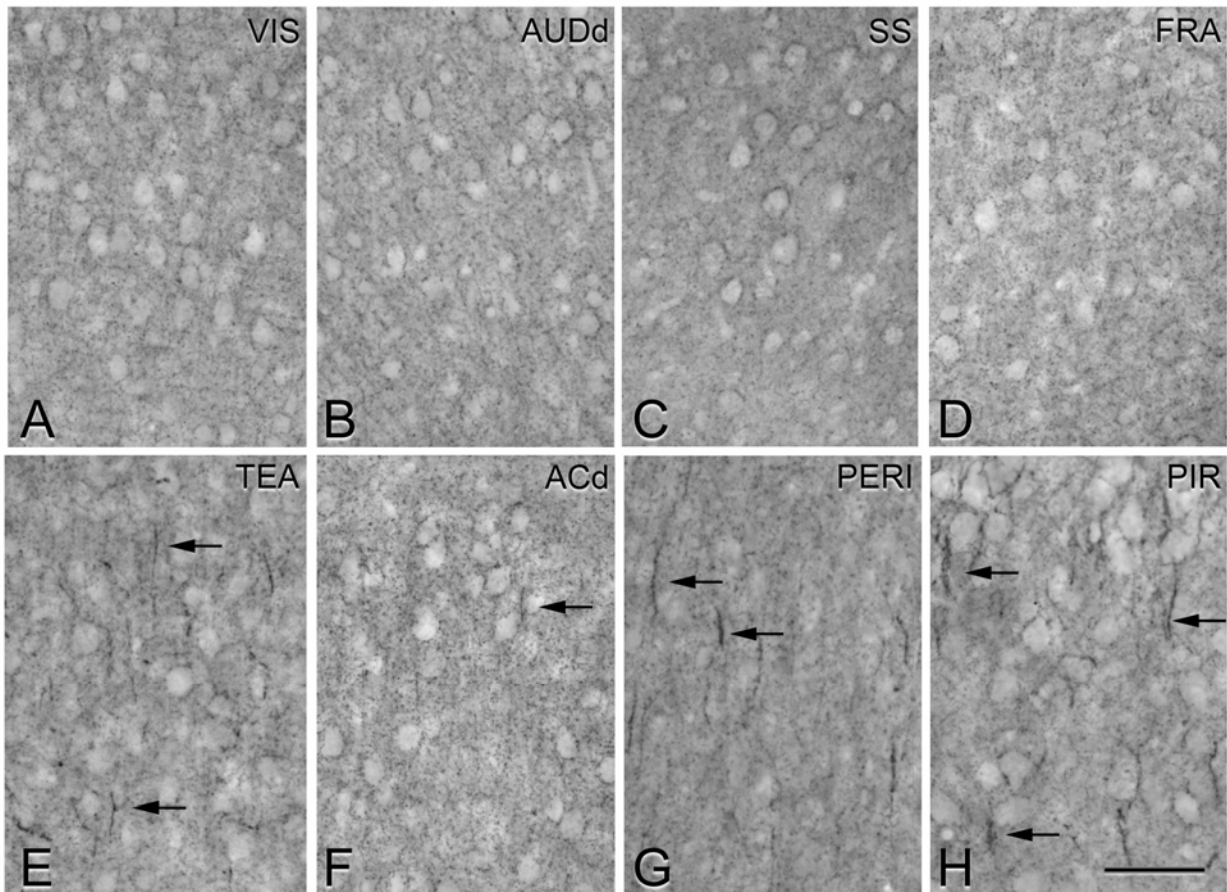
Results

General considerations

The observations on the distribution of Ch-terminals are presented according to the developmental origin of the cortical structures in the different histological territories of the developing mouse pallium (medial, dorsal and lateral pallium: Figs. 1-5). The medial pallial cortical derivatives analyzed in the present study (Figs. 2, 5) involved the three layered allocortical areas (archicortex or hippocampal formation) including the dentate gyrus, hippocampus proper, subiculum, entorhinal cortex. The dorsal pallial cortical derivatives analyzed included different neocortical or isocortical areas: the primary and secondary sensory areas (visual, auditory and somatosensory), the primary and secondary motor areas, the associative (frontal, parietal and temporal), orbital prelimbic, infralimbic, dorsal peduncular, cingulate, insular and retrosplenial cortical areas (Figs. 1, 3 and 5). Finally, the lateral pallial derivatives included the piriform cortex (Figs. 1, 4 and 5). In addition, we analyzed the distribution of Ch-terminals in the claustramygdaloid complex, but due to the mixed developmental origin of its different regions, we considered this complex separately (Figs. 4 and 5). The regions of the claustramygdaloid complex examined include a group of cortical layered structures and non-layered nuclei derived from the following structures: the lateral pallium (posterolateral cortical amygdala, the dorsal part of the basolateral nucleus of the amygdala and the dorsolateral claustrum); the ventral pallium (anterior and posteromedial cortical amygdala, posterior part of the basomedial nucleus, ventral part of the basolateral nucleus of the amygdala, lateral nucleus of the amygdala, amygdalohippocampal area, ventromedial claustrum and the endopiriform nuclei); and the subpallium (central and medial nuclei of the amygdala).

- *GAT-1 immunostaining:* In all the areas examined, numerous terminal-like puncta were labeled in the neuropil by GAT-1 immunocytochemistry and around unstained cell bodies (Figs. 1-6). However, as described previously in the cerebral cortex of other species, the elements that are most intensely labeled are the Ch-terminals (DeFelipe and González-Albo 1998; Conti et al., 2004; Inda et al., 2007). GAT-1-immunoreactive (-ir) Ch-terminals were found in many cortical and non-cortical areas but they had very different morphologies and distributions in the different areas (see below). In general, two types of Ch-terminal were observed that were differentiated by their size and the density of axonal boutons that made up the Ch-terminals. For the sake of simplicity, these terminals will be referred to as “simple” and “complex” based on the earlier definitions from Golgi stained material (e.g. Fairén and Valverde, 1980; DeFelipe et al., 1985). Simple Ch-terminals were made up of one or two rows of labeled boutons, each row consisting of only 3 to 5 boutons. This kind of terminal was difficult to visualize but they appeared to be distributed throughout the cortex in double labeling experiments (see below). By contrast, complex Ch-terminals were readily detected as tight cylinderlike structures comprised of multiple rows of boutons, and they were present in specific areas and layers. Thus, we will mainly refer to complex Ch-terminals unlike otherwise specified.

- *PikBa immunostaining:* pIkB α immunostaining was characterized by the Sorong labeling of numerous AISs in all layers and areas (Figs. 2-4, 6 and 7). The somata and proximal portions of dendrites of some neurons were also immunostained but generally, less intensely than the AIS. These



AISs were identified as short, thin and smooth processes with a characteristic “eyelash like” appearance that extended distally from the soma (arrows in Figs. 2B, D, F; 3B, D, F, H; 4B, D, F, H; 7A, D, G, and J). In all the areas studied, pIkBa-ir AIS were so numerous that although no quantitative Studies have been performed, it seemed that the AIS of every neuron was immunoreactive for pIkBa. Therefore, the distribution of pIkBa-ir AIS was not homogeneous across different areas and layers but rather, it varied with the neuronal density. In addition, differences in the size and orientation of the pIkBa-ir AISs also existed in the different areas and layers.

In the present study, we used pIkBa immunostaining to confirm and further characterize the innervation of AIS in the different areas examined. More specifically, simple Ch-terminals are often difficult to distinguish from other punctate structures and processes identified as containing GAT-1 or PV, particularly when the labeling of these elements in the neuropil is very dense or when the neuron packing is very high (e.g. the granule cell layer of the dentate gyrus, Fig. 2A, B). Therefore, we used pIkBa immunostaining (in double labeling experiments) as a marker of the AIS in order to verify the existence of simple Ch-terminals in those areas where they were hard to detect (Fig. 7G-L). Furthermore, pIkBa immunostaining is an excellent tool to interpret the possible relationship between variations in the density and morphology (length) of Ch-terminals. For example, to examine whether cortical regions with longer pIkBa-ir AISs show more complex Ch-terminals or whether all pIkBa-ir AISs are innervated by GAT-1 (or PV)-ir Ch-terminals.

Single labeling experiments

Distribution of GAT-1-ir Ch-terminals in cortical areas derived from the medial palium: archicortex (hippocampal formation)

Immunocytochemistry for GAT-1 identified numerous terminal-like punctate structures in the neuropil that surrounded unlabeled cell bodies in the various fields of the hippocampal formation, including: the dentate gyrus, hippocampus proper, subiculum, presubiculum, parasubiculum and entorhinal cortex and the perirhinal cortex. In the dentate granule cell layer, GAT-1-ir Ch-terminals were mainly of the simple type and they were difficult to distinguish from the punctate staining (Fig. 2A, 5). As shown in adjacent sections immunostained for pIkBa (Fig. 2B), the labeled AISs were very thin and extended tortuously between the densely packed granule cell somata, making it even more difficult to identify Ch-terminals with GAT-1 or PV immunocytochemistry. In the stratum pyramidale of CA1-CA3 fields, both simple and complex Ch-terminals were observed, as well as the intense GAT-1-ir perisomatic punctuate staining (Figs. 2C, 5, 6G). Complex Ch-terminals were more abundant in the CA1 than in the CA3 (Fig. 5, Table 1). Less dense GAT-1-ir terminal-like puncta were detected in the neuropil and as expected, no GAT-1-ir Ch-terminals were found in the molecular and polymorphic layers of the dentate gyrus, or in the strata oriens, radiatum and lacunosum-moleculare of Ammon’s horn. In the pyramidal cell layer of the subiculum, presubiculum and parasubiculum, GAT-1 immunostaining revealed the presence of simple Ch-terminals and sparsely distributed complex Ch-terminals. However, both immunostaining of perisomatic

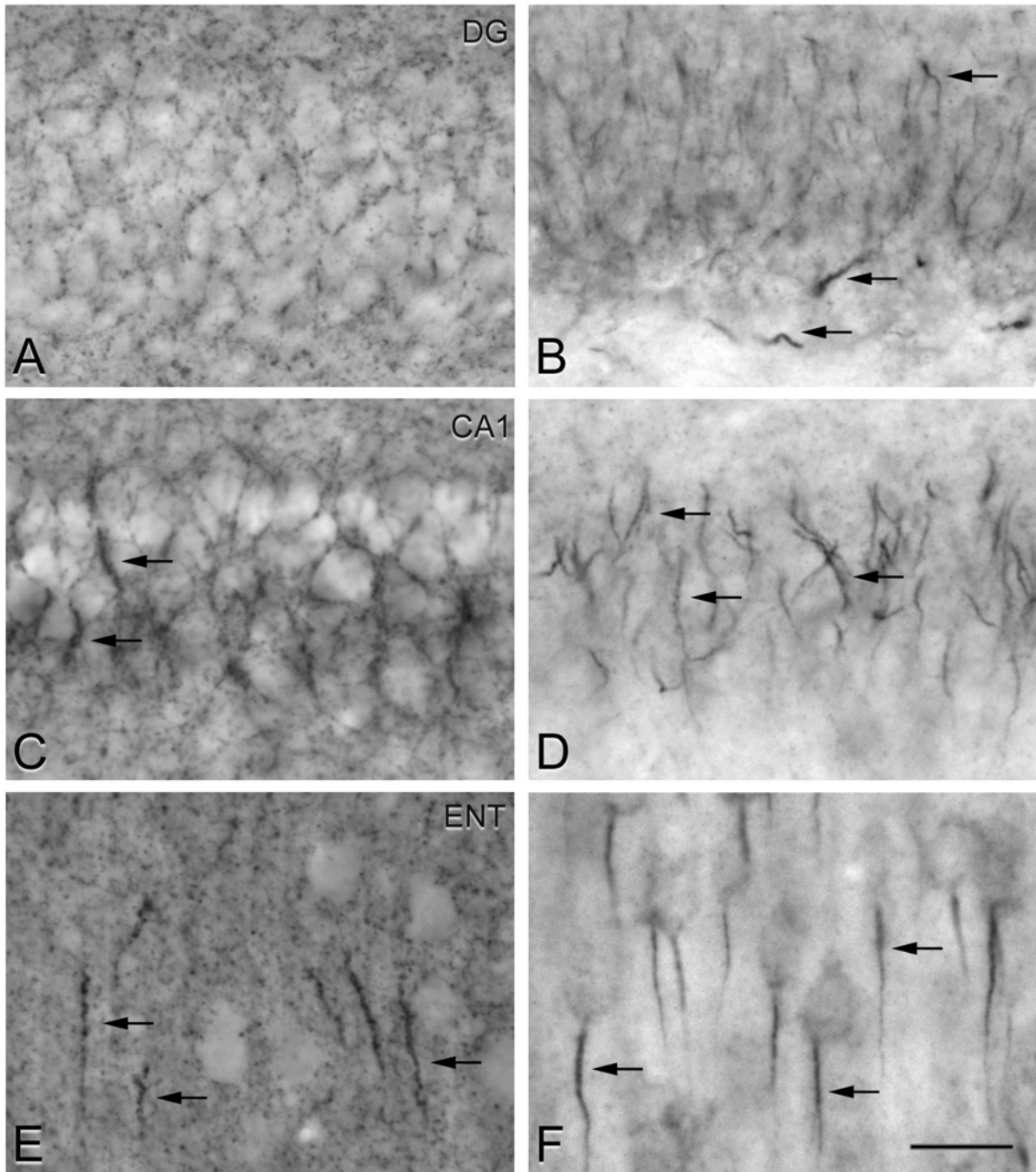


Figure 2: Photomicrographs from GAT-1-immunostained (A, C and E) and plkB α immunostained (B, D and F) adjacent sections showing the distribution of GAT-ir perisomatic boutons and complex Ch-terminals (arrows in A, C and E) and plkB α -ir AISs (arrows in B, D and E) in derivatives of the medial pallium including the granule cell layer of the dentate gyrus (A and B), pyramidal layer of CA1 (C and D), and entorhinal cortex (E and F). Note the abundance of complex Ch-terminals and the intensity of their GAT-1 immunostaining in CA1 and the entorhinal cortex. Scale bar: 20 μ m.

boutons and of the Ch-terminals was less intense than in the CA fields (Fig. 5). Finally, in the entorhinal cortex (Figs. 2E, 5, 6D) and the perirhinal cortex (Figs. 1G, 5), complex GAT-1-ir Ch-terminals were very prominent and except for layer I, they were labeled intensely in all cortical layers, (Figs. 2E, 5, 6D). In the entorhinal cortex plkB α -ir AISs were also very prominent (Fig. 2F and see the relative abundance of complex Ch-terminals in these regions in Table 1). *Distribution of GAT-1-ir Ch-terminals in cortical areas derived from the dorsal pallium: neocortex*

There were dramatic differences in the neocortex with re-

gards the relative abundance of complex GAT1-ir Ch-terminals (Table 1, Fig. 5). In contrast to the abundance of terminal-like punctate structures, very few complex Ch-terminals immunostained for GAT-1 were found in the primary and secondary visual (Figs. 1A, 5), somatosensory (Figs. 1C, 3A and 5), auditory dorsal area (Figs. 1B and 5), orbital, insular, retrosplenial (Fig. 5) motor (Figs. 3C and 5) and in the frontal (Fig 1D) and parietal associative areas of the neocortex. Indeed, despite the prominence of AIS in the adjacent plkB α immunostained sections, simple GAT-1-ir Ch-terminals were mostly identified (Fig. 3B and D). In

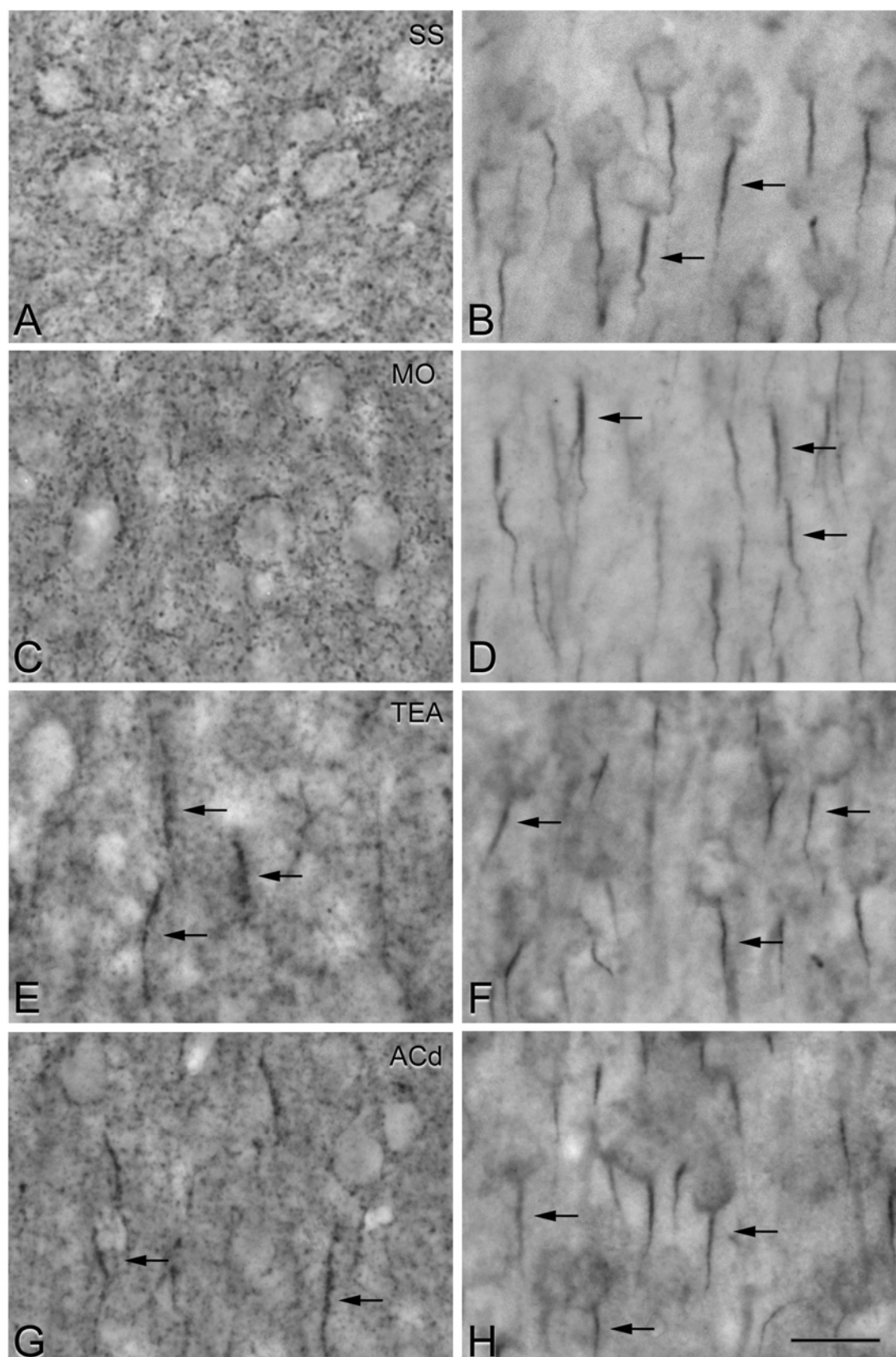


Figure 3: Photomicrographs from GAT-1-immunostained (A, C, E and G) and plkB α immunostained (B, D, F and H) adjacent sections taken from dorsal pallium derived neocortical areas including the primary somatosensory (A and B), primary motor (C and D), temporal associative (E and F) and anterior cingulate (G and H) areas. Note that despite the presence in all areas of abundant and radially oriented plkB α -ir AISs (arrows in B, D, F and H) and GAT-ir perisomatic boutons, complex GAT-ir Ch-terminals are absent in sensory (A) and motor (C) areas. In contrast, complex GAT-ir Ch-terminals are present in infragranular layers of temporal associative (E) and supragranular layers of anterior cingulate (G) cortices. Scale bar: 20 μ m.

contrast, in the ventral part of the secondary auditory cortex, and in the temporal associative cortex (Figs. 1E, 3E) complex GAT-1-ir Ch-terminals were observed mainly in the infragranular layers. Finally, in the cingulate (Figs. 1F, 3G), dorsal peduncular, infralimbic and prelimbic cortical areas, complex GAT-1-ir Ch-terminals were distributed throughout layers II-VI, although they were most abundant in layer II.

Distribution of GAT-1-ir Ch-terminals in areas derived from the lateral pallium: paleocortex

Within the paleocortex, complex GAT-ir Ch-terminals were widely distributed in layers II and III of the piriform cortex, where they were very abundant (Fig. 5, Table 1) and intensely immunostained (Figs. 1H, 4A, 5 and Table 1). In contrast to the neocortex where both GAT-1-ir Ch-terminals and pIkB α -ir AISs were distributed regularly with a radial orientation, in the piriform cortex they were more randomly distributed. Despite the abundance of complex GAT-ir Ch-terminals in the piriform cortex, no complex GAT-ir Ch-terminals were found in adjacent peripaleocortical areas such as the insular cortex. Therefore, the limit between the anterior piriform cortex and the insular cortex was easily distinguished by the sharp decrease in the density of complex GAT-ir Ch-terminals.

Distribution of GAT-1-ir Ch-terminals in the claustramygdaloid complex

According to the specific patterns of gene expression (see Puelles et al., 2000; Martínez-García et al., 2002; Puelles and Rubenstein, 2003; Medina et al., 2004; Moreno and González, 2006), the claustramygdaloid complex represents the caudal part of several telencephalic histogenetic territories (lateral pallium, ventral pallium and subpallium). These territories include both laminated (cortical) and non-laminated (nuclear) components, some of which contained numerous complex GAT-1-ir Ch-terminals.

- Derivatives of the lateral pallium: The structures derived from the lateral pallium in the claustramygdaloid complex include the posterolateral part of the cortical nucleus of the amygdala. In this region, large and radially oriented complex Ch-terminals were intensely labeled for GAT-1 in layers II and III (Figs 4C and 5). In addition, complex GAT-1-ir Ch-terminals were found in the non-laminated derivatives of the lateral pallium, including the dorsolateral claustrum and the dorsal part of the basolateral nucleus of the amygdala where they were more abundant and intensely stained (Fig 4E and Table 1).

- Derivatives of the ventral pallium: The ventral pallium gives rise to the anterior and posteromedial zones of the cortical amygdala where radially-oriented complex GAT-1-ir Ch-terminals were observed in layers II and III (not shown). In addition, nonlaminated derivatives of the ventral pallium include areas in which complex GAT-1-ir Ch-terminals were found such as the lateral, basolateral (ventral part) and basomedial (posterior part) nuclei of the amygdala, the amygdalo-hippocampal area, the ventromedial claustrum and the endopiriform nuclei (Table 1).

- Derivatives of the subpallium: In contrast to the subdivisions of the claustramygdaloid complex derived from pallial territories, no complex GAT-1-ir Ch-terminals could be identified in the subpallial amygdala, including the central amygdala (Fig 4G) and the medial amygdala (Table 1).

- Dual immunofluorescence

There are no commercial antibodies available to perform

reliable dual immunohistochemistry for GAT-1 and pIkB α . Hence, to directly analyse the relationship between the morphology of Ch-terminals and the AIS, we have used antibodies against PV in combination with pIkB α antibodies, since antibodies against PV mostly recognize the same Ch-terminals as those directed against GAT-1 (see DeFelipe and González-Albo, 1998). In addition to Ch-terminals, PV immunocytochemistry stained nonpyramidal cell bodies, and a dense plexus of axonal and dendritic processes in the principal cell layers of the areas examined, as shown previously (Fig. 6). Although PV and GAT-1 did not colocalize in all Ch-terminals, PV-ir Ch-terminals were generally distributed in a morphological, regional and laminar pattern similar to the staining for GAT-1 (Fig. 6). Nevertheless, Ch-terminals were more difficult to distinguish by PV immunostaining than by GAT-1 immunostaining, mainly due to the presence of numerous PV-ir dendritic and axonal processes that masked the Ch-terminals. The scarcity of complex Ch-terminals in some areas of the paleocortex, archicortex or neocortex, initially observed by specific GAT-1 immunostaining was confirmed by PV immunostaining. However, experiments with double-labeling for pIkB α and PV (Fig. 7) revealed that the lack of complex PV-ir Ch-terminals does not imply the absence of PV innervation of the AIS. In the cortical areas where no complex Ch-terminals were observed, the use Z-stack confocal microscopy reconstructions revealed that some of the pIkB α -ir AISs were innervated by a few or no PV-ir boutons, suggesting that the density of GABAergic synaptic contacts with the AIS formed by complex Ch-terminals was low in these cortical regions (Fig. 7G-I). Finally, in all areas where complex Ch-terminals could be identified (either by GAT-1 or PV immunostaining), complex PV-ir Ch-terminals mostly innervated the distal portion of the pIkB α -ir AIS of pyramidal cells (Fig. 7J-L). In contrast, adjacent pIkB α -ir AIS were seen to be innervated by relatively few PV-ir boutons or they lacked such innervation. Therefore, in these latter regions some AIS were innervated by complex Ch-terminals, others by simple Ch-terminals while others were apparently not innervated by PV-ir chandelier cells at all.

Discussion

The main finding of this study is that although chandelier cells populate the entire pallial telencephalon, there are substantial differences in the distribution of complex GAT-1-ir Ch-terminals in the distinct regions and layers of both the cerebral cortex and claustramygdaloid complex. In the cerebral cortex, complex GAT-1-ir Ch-terminals were generally scarce in areas derived from the dorsal pallium (neocortex). By contrast, these terminals were particularly dense in the piriform and entorhinal cortex, which derive from the lateral and the medial cortex, respectively. In the claustramygdaloid complex, GAT-1-ir complex Ch-terminals were found in those areas derived from the pallium but not in the nuclei derived from the subpallium.

Distribution of Ch-terminals in non-neocortical telencephalic areas

This study indicates that complex GAT-1-ir Ch-terminals are the most widely distributed and intensely stained in the piriform cortex, which is a paleocortical area derived from the lateral pallium. In the archicortex, complex GAT-1-ir Ch-terminals were most prominent in the entorhinal and perirhinal cortices, followed by the subicular complex and

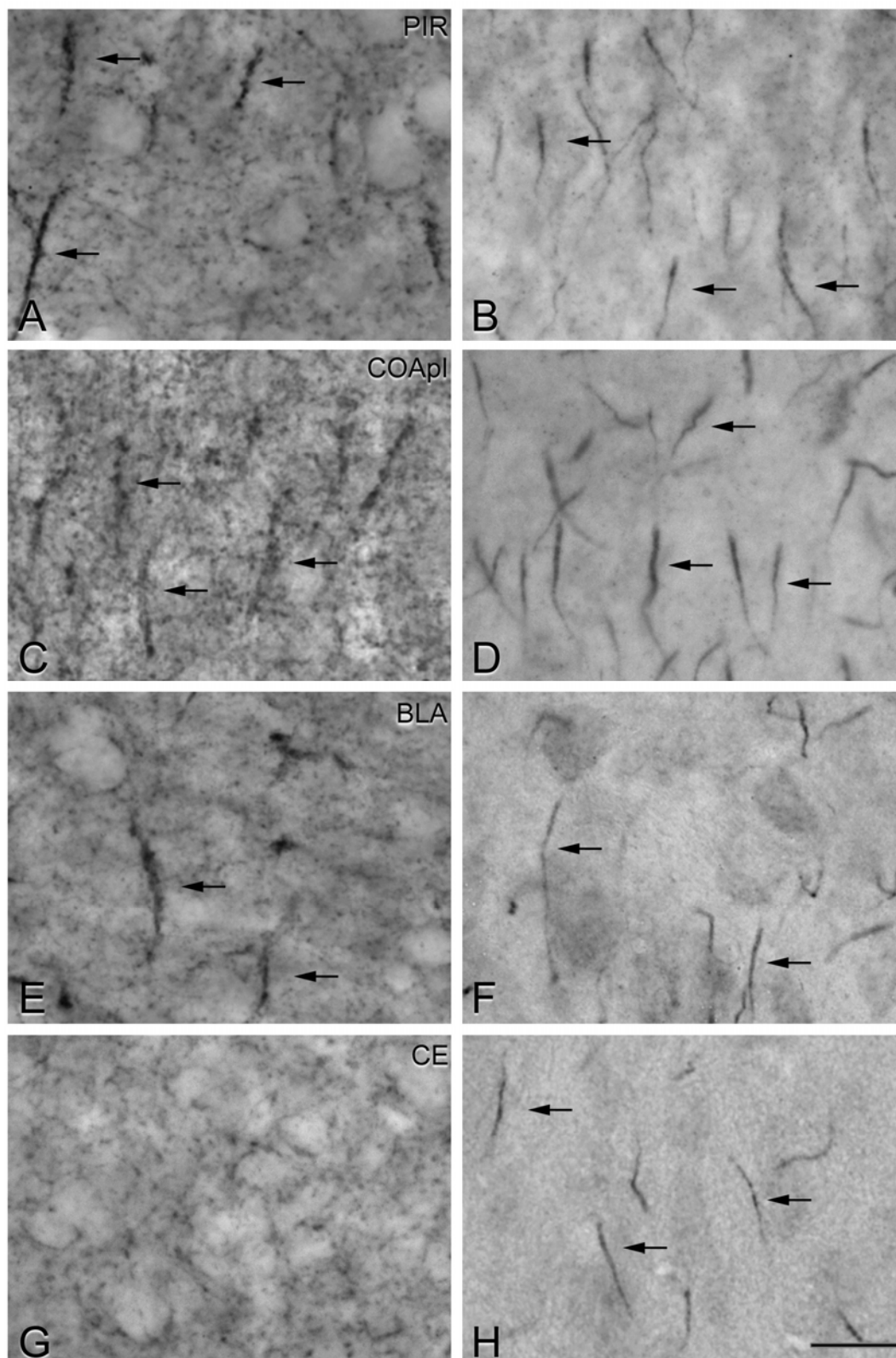
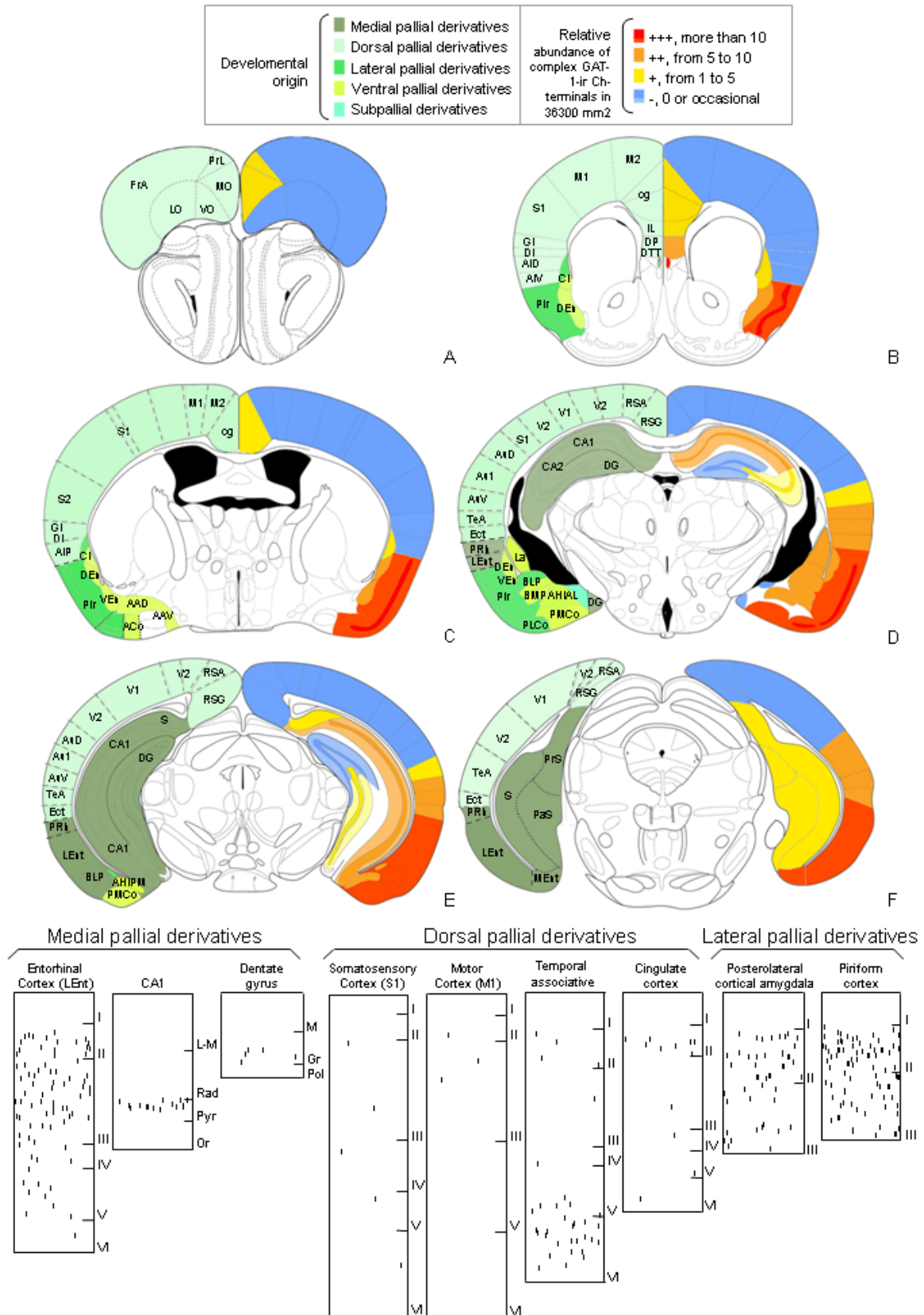


Figure 4: Photomicrographs from adjacent GAT-1-immunostained (A, C, E and G) and plkB α immunostained (B, D, F and H) sections from the piriform cortex (A and B) and from different regions of the amygdala (C-H). In the piriform cortex, large and intensely immunostained complex GAT-ir Ch-terminals (arrows in A) are present in layers II and III in parallel to the distribution of plkB α -ir AISs (arrows in B). In the amygdala, note that complex GAT-1-ir Ch-terminals distribute in structures derived from the lateral pallium and ventral pallium, as respectively shown in C and E (arrows) for the cortical amygdala (posterolateral part, COApl) and the basolateral nucleus (BLA). In contrast, only GAT-ir perisomatic boutons and no complex GAT-ir Ch-terminals are present in those structures of the amygdala derived from the subpallium, as shown in G for the central nucleus. Scale bar: 20 μ m.



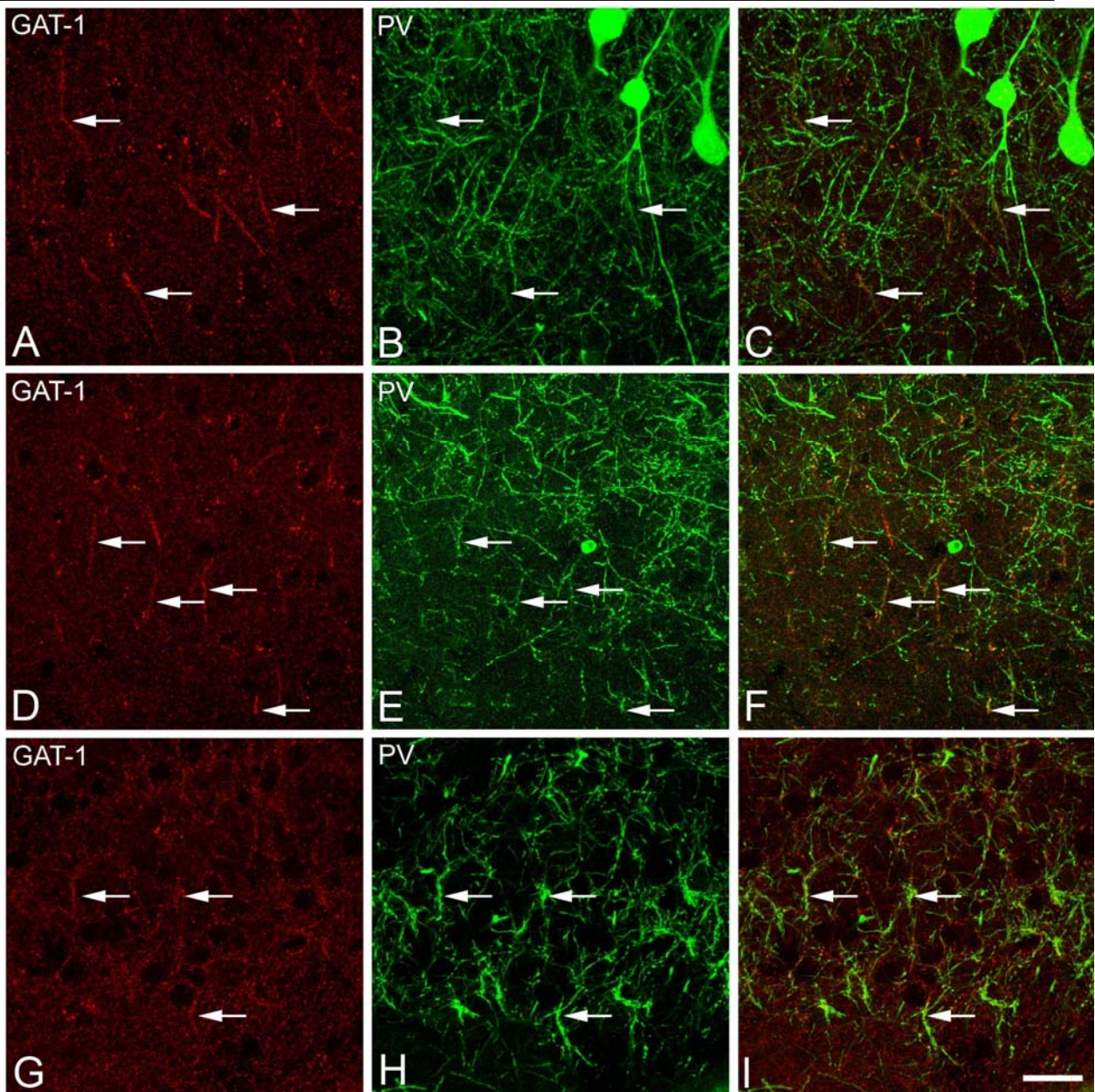


Figure 5: Pairs of confocal images from the same section and field showing the colocalization of GAT-1 (red) and PV (green) immunostaining in complex Ch terminals (arrows) in the piriform cortex (A-B), the enthorinal cortex (D-E) and CA3 field of the hippocampus (G-H). Panels C, F and I were obtained by combining images A and B, D and E, and G and H, respectively. Images D-E represent stacks of xx optical sections obtained at steps of x μm in the z axis (total xx μm). Scale bar: xx μm in D-E and xx μm in G-I.

then by the hippocampal formation. In this latter structure, these terminals were found in the stratum pyramidale of the CA1-CA3 and only occasionally in the granule cell layer of the dentate gyrus. These results are in agreement with previous light and electron microscopy studies in the hippocampal formation of humans that noted the presence of chandelier cells in the hippocampus and dentate gyrus, mainly in Golgi stained and PV immunostained material (humans: Seress et al., 1993; Wittner et al., 2001; Arellano et al. 2004; rats: Kosaka, 1983; Somogyi et al., 1983a,b, 1985; Soriano and Frotscher, 1989; Ribak et al., 1990; Soriano et al., 1990; Li et al., 1992; Gulyás et al., 1993; Halasy and Somogyi, 1993; Buhl et al., 1994a,b; Han et al., 1993; reviewed in Freund and Buzsáki, 1996)

In addition, here we demonstrated the presence of numerous complex GAT1-ir Ch-terminals in certain regions of the

claustramygdaloid complex, including the pallial part of the amygdala. This area contains excitatory (presumably glutamatergic) projection neurons, like the cerebral cortex and the claustrum (Swanson and Petrovich, 1998; Swanson, 2000), and it includes structures that originate from the lateral and ventral pallium (McDonald, 1998; Puelles et al., 2000, 2001; Martínez-García et al., 2002; Sah et al., 2003; Stenman et al., 2003; Medina et al., 2004; Remedios et al., 2004; Tole et al., 2005; García-López et al., 2007). This observation is in line with previous studies in the rat showing dense PV-ir Ch-terminals in these regions (Kemppainen and Pitäken, 2000). In contrast, complex GAT-1-ir Ch-terminals were not observed in the regions of the amygdala derived from the subpallium (centromedial amygdaloid area), which are similar to the striatum and pallidum, and that are rich in GABAergic projection neu-

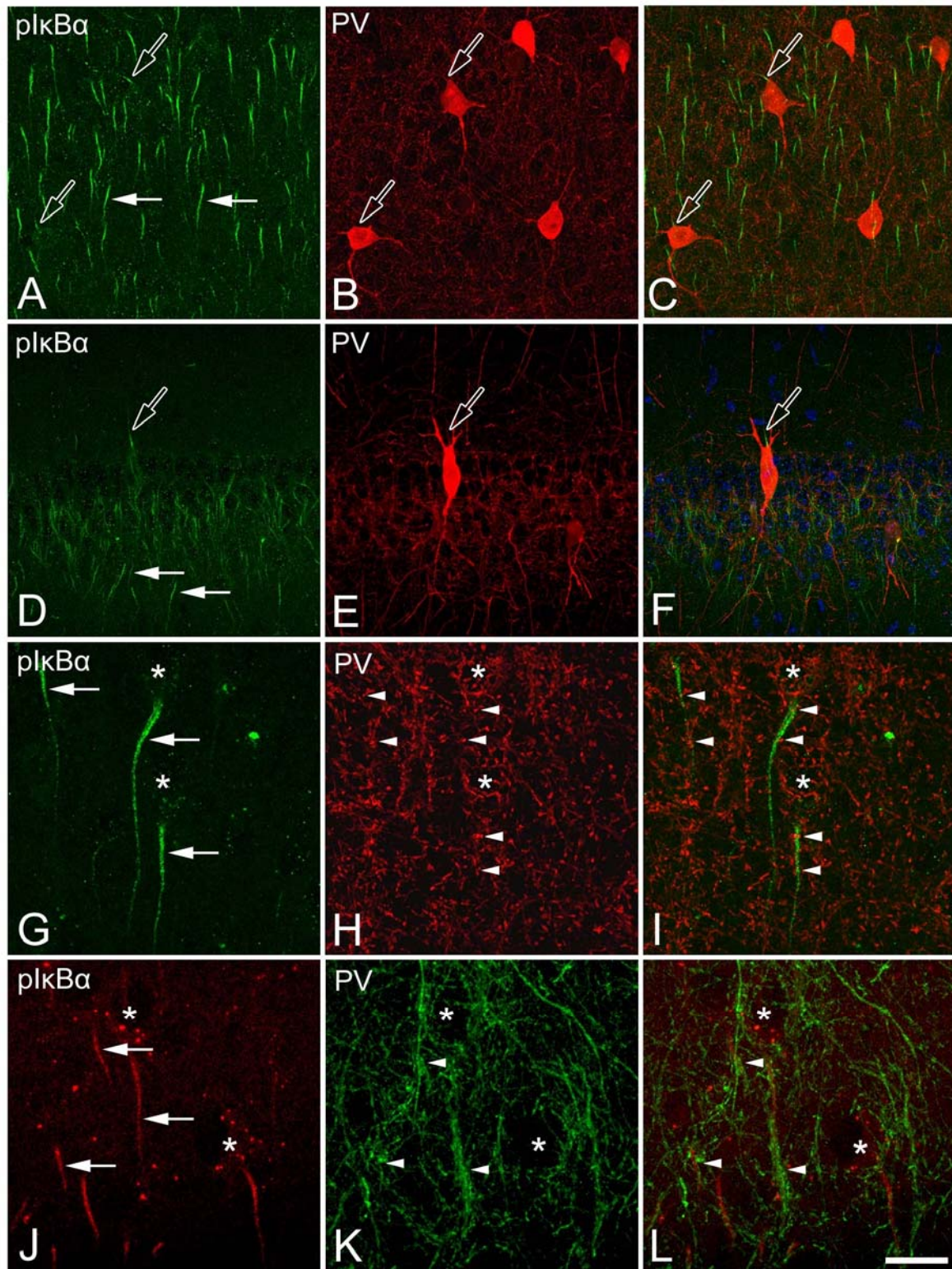


Figure 6: Pairs of confocal images from the same section and field showing the relationship between plkB α immunostaining in the AIS (arrows) and the PV-ir GABAergic innervation in somatosensory (A-C), visual (G-I), temporal associative (J-L) neocortical areas and in CA1 region of the hippocampus (D-F). Panels C, E, I and L were obtained by combining images A and B, D and E, G and H, and J and K, respectively. Note that in sensory areas including the visual cortex (G-I) only a small number of PV positive boutons (arrow heads in G-I) contact the AIS from pyramidal cells and do not form complex Ch-terminals. In contrast, plkB α -ir AISs of pyramidal cells in other areas, including the temporal associative cortex (J-L), is innervated, especially at their distal aspect, by a large amount of PV positive boutons that form complex Ch-terminals. Asterisks in G-L indicate the location of pyramidal cell bodies. Note that in addition to the AIS from pyramidal cells, plkB α -ir is also present in the AIS from PV-ir interneurons (hollow arrows in A-E). Images A-C represent stacks of xx optical sections obtained at steps of x μ m in the z axis (total xx μ m). Scale bar: xx μ m in D-E and xx μ m in G-L.

CEREBRAL CORTEX			CLAUSTROAMYGDALOID COMPLEX								
Archicortex (Medial pallium)	Neocortex (Dorsal pallium)	Paleocortex (Lateral pallium)	Lateral pallium	Ventral pallium	Subpallium						
CA1	++	AID	-	Pir	+++	BLA	++	ACo	++	CE	-
CA2	++	AIP	-			BLP	++	AHiAL	++	ME	-
CA3	+	AIV	-			Cld	+	AHiPM	++		
DG	-	APC	-			PLCo	+++	BLV	++		
DTT	+++	Au1	-					BMP	++		
MEnt	+++	AuD	-					Clv	+		
LEnt	+++	AuV	+					DEn	++		
PaS	+	cg	+					La	++		
PrS	+	DI	-					PMCo	+++		
S	+	DP	++					VEN	++		
		Ect	++								
		FrA	-								
		GI	-								
		IL	+								
		M1	-								
		M2	-								
		PRh	++								
		S1	-								
		S2	-								
		TeA	++								
		V1	-								
		V2	-								

AAD: Anterior amygdaloid area dorsal part

AAV: Anterior amygdaloid area ventral part

ACo: Anterior cortical amygdala

AHiAL: Amygdalohippocampal area, anterolateral part

AHiPM: Amygdalohippocampal area, posteromedial part

AID: Agranular insular cortex, dorsal part

AIP: Agranular insular cortex, posterior part

AIV: Agranular insular cortex, ventral part

APC: Associative parietal cortex

Au1: Primary auditory cortex

AuD: Secondary auditory cortex, dorsal area

AuV: Secondary auditory cortex, ventral area

BLA: Basolateral nucleus of the amygdala

BLP: Basolateral nucleus of the amygdala, posterior part

BLV: Basolateral nucleus of the amygdala ventral part

BMP: Basomedial nucleus of the amygdala, posterior part

CA1: Field CA1 of hippocampus

CA2: Field CA2 of hippocampus

CA3: Field CA3 of hippocampus

cg: Cingulate cortex

CE: Central nucleus of the amygdala

Cld: Claustrum, dorsal part

Clv: Claustrum, ventral part

DEn: Dorsal endopiriform nucleus

DG: Dentate gyrus

DI: Dysgranular insular cortex

DP: Dorsal peduncular cortex

DTT: Dorsal tenia tecta

Ect: ectorhinal cortex

FrA: Frontal association cortex

IL: Infralimbic cortex

GI: Granular insular cortex

La: Lateral amygdaloid nucleus

LEnt: Lateral entorhinal cortex

M1: Primary motor cortex

M2: Secondary motor cortex

ME: Medial nucleus of the amygdala

MEnt: Medial entorhinal cortex

PaS: Parasubiculum

Pir: Piriform cortex

PLCo: Posterolateral cortical amygdala

PMCo: Posteromedial cortical amygdala

PRh: Perirhinal cortex

PrS: Presubiculum

S: Subiculum

S1: Primary somatosensory cortex

S2: Secondary somatosensory cortex

TeA: Temporal association cortex

V1: Primary visual cortex

V2: secondary visual cortex

VEN: Ventral endopiriform nucleus

The number of complex GAT-1-ir Ch-terminals were counted with a magnification of 400 (an objective of 40x) in images of 36300 μm^2 of the different regions analyzed, except for CA1-3 fields and dentate gyrus which were of 7500 μm^2 . Relative abundance of complex GAT-1-ir Ch terminals: -, 0 or occasional; +, from 1 to 5; ++, from 5 to 10; +++, more than 10.

rons (Swanson and Petrovich, 1998; Swanson, 2000 Puelles et al., 2000, 2001; Sah et al., 2003; Stenman et al., 2003). Thus, the presence of complex Ch-terminals in the claustrumamygdaloid complex might be related to the presence or absence of glutamatergic projecting neurons.

Morphology and distribution of Ch-terminals in the neocortex

Simple and complex Ch-terminals.

Previous studies with the Golgi method have identified both simple and complex Ch-terminals in the visual cortex of the rat (Peters et al., 1982) and the cat (Fairén and Valverde, 1980), the somatosensory cortex of the monkey (DeFelipe et al., 1985) and in various areas of the human neocortex (Inda et al., 2007). However, the finding that complex Ch-terminals are essentially restricted to certain areas and layers in the mouse neocortex probably reflects the existence of species specific differences in the distribution of simple and complex Ch-terminals. Simple Ch-terminals are certainly harder to identify in PV or GAT-1 immunostained sections because it is difficult to distinguish them within the dense plexus of immunostained elements. Nevertheless, double staining tissue for PV and pIkBa makes it relatively easy to define labeled terminals that innervate the AIS (see Fig. 7). Still, it is possible that not all axo-axonic terminals originate from chandelier cells, since other types of interneurons occasionally establish synapses with the AIS of pyramidal neurons (Fariñas and DeFelipe, 1991; Gonchar et al., 2002). Thus, what we consider simple Ch-terminals may include some terminals from other types of interneurons.

- Density of Ch-terminals in different areas

No previous studies have examined the distribution of Ch-terminals in the various cortical areas of the mouse or rat. However, in the monkey (Lewis et al., 1989; Akil and Lewis, 1992; Conde et al., 1996; Elston and Gonzalez-Albo, 2003) and in humans (Inda et al., 2007), it has been shown that there is generally a higher density of terminals innervating the AIS in association areas of the neocortex than in primary sensory areas. Indeed, quantitative studies of the density of GAT-1-ir Ch-terminals in the human neocortex have shown remarkable differences both between areas and also between distinct layers (Inda et al., 2007). In the primary sensory cortex, including the visual cortex, complex GAT-1-ir (or PV-ir) Ch-terminals are virtually absent in the mouse although they are present in the human primary sensory cortex, albeit in a relatively small numbers (Inda et al., 2007). In addition, in the motor areas and frontal and parietal associative cortex, very few complex Ch-terminals were found in mice, whereas this kind of terminals were frequently found in these areas of the human neocortex (Inda et al., 2007). In the mouse auditory and temporal associative areas, complex GAT-1-ir Ch-terminals were virtually restricted to the infragranular layers. Furthermore, chandelier cells express different substances depending on the cortical region and layer (e.g., del Río and DeFelipe 1997; Arellano et al., 2002; for a review see DeFelipe, 1999). In this regard, the development of cortical interneurons occurs in a region- and cell subtype-specific manner (Xu et al., 2004; Butt et al., 2005; Liadis et al., 2007). Thus, it is possible that there are specific mechanisms that guide the migration of different morphological and neurochemical types of chandelier cells, restricting or concentrating them in particular regions of the cerebral cortex.

Possible functional significance

The substantial differences found between areas and layers are probably related to their different functional attributes, and they suggest that chandelier cells contribute differentially to cortical circuits (anatomically and physiologically) according to their location. For example, in the cat visual cortex the AISs of pyramidal cells projecting to the thalamus established extremely few synapses (from 1 to 5), when compared to callosal pyramidal cells (from 16 to 23) and ipsilateral corticocortical pyramidal cells (from 22 to 28: Fariñas and DeFelipe, 1991). Since in the mouse neocortex complex GAT-1-ir Ch-terminals were observed in large numbers in the infragranular layers of the auditory and temporal associative areas alone, it is possible that this type of Ch-terminal is related to the innervation of a subpopulation of pyramidal cells that project to particular sites.

Pyramidal neurons also show remarkable differences regarding the complexity of the dendritic trees and number of dendritic spines in each area (i.e., the number presumptive excitatory glutamatergic inputs: see Elston 2002, 2003 for a review). However, there does not appear to be a general rule regarding the relationships between pyramidal morphology and the density of AIS innervation. For example, complex Ch-terminals are relatively few in area 18 of the human cortex whereas in area 10 of the prefrontal cortex they are very abundant (Inda et al., 2007). In these cortical areas, the number of dendritic spines of the presumptive pyramidal neurons innervated by Ch-terminals is relatively low in area 18 when compared to area 10 (Elston et al., 2001). Thus, pyramidal cells in the visual cortex theoretically integrate fewer synaptic inputs than in the prefrontal cortex and, due to a lower density of GABAergic Ch-terminals, they are subjected to a less powerful inhibitory control at the level of the AIS. However, in the mouse, Ch-terminals are mostly simple in all the neocortical areas but there are significant differences in the number of dendritic spines on pyramidal cells in the different neocortical areas (Ballesteros-Yáñez et al., 2006; Ballesteros, Bourgeois, Changeux and DeFelipe, unpublished results). Thus, it seems that there is no relationship between the weight of the excitatory inputs to pyramidal cells and the density of the GABAergic innervation at the level of AIS, at least in the mouse neocortex.

The differences in the GABAergic inhibition of the AIS by chandelier cells also occur postsynaptically in the rat cerebral cortex. Indeed, postsynaptic AIS GABAA receptors of supragranular pyramidal cells are enriched in the $\alpha 2$ subunit, whereas the $\alpha 3$ subunit predominates in the infragranular layers (Fritschy et al., 1998). Therefore, chandelier cells seem to exert their activity through different numbers of axo-axonic terminals that might result from different degrees of chandelier cell convergence or due to chandelier cells forming simple or complex terminals (further discussed in DeFelipe et al., 1985), and through different types of postsynaptic GABAA receptors, depending on the cortical area and layer in which they are found. Further studies will be necessary to elucidate the functional significance of these microanatomical cortical differences.

Finally, our limited knowledge of the comparative morphology of particular types of interneurons in the cerebral cortex is mostly based on studies performed with the Golgi method (e.g. Fairén et al., 1984). However, the inconsistencies and incomplete staining obtained with the Golgi method makes it difficult to interpret the similarities or differences between these studies. It was evident here that complex Ch-terminals are relatively abundant in the mouse

paleocortex and archicortex, structures derived from the medial and lateral pallium, respectively. Moreover, such terminals are largely absent in many neocortical areas derived from the dorsal pallium. By contrast, in studies performed in humans, numerous complex Ch-terminals were found throughout the whole cerebral cortex (see Arellano et al., 2002, 2004; Inda et al., 2007 and references therein), suggesting that evolutionarily there is a trend towards an increase in the complexity of the axonal arborization of chandelier cells as the neocortex expanded and differentiated.

Acknowledgements: This work was supported by the Ministerio de Educación y Ciencia grants BFU2006-03855 to A.M. and BFU2006-13395 to J. de F.

Reference List

- Akil M, Lewis DA. (1992). Postnatal development of parvalbumin immunoreactivity in axon terminals of basket and chandelier neurons in monkey neocortex. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 16:329-37.
- Arellano JI, Munoz A, Ballesteros-Yanez I, Sola RG, DeFelipe J. (2004). Histopathology and reorganization of chandelier cells in the human epileptic sclerotic hippocampus. *Brain*. 127:45-64.
- Buhl EH, Halasy K, Somogyi P. (1994). Diverse sources of hippocampal unitary inhibitory postsynaptic potentials and the number of synaptic release sites. *Nature*. 368:823-828.
- Buhl EH, Han ZS, Lorinczi Z, Stezhka VV, Karnup SV, Somogyi P. (1994). Physiological properties of anatomically identified axo-axonic cells in the rat hippocampus. *J Neurophysiol*. 71:1289-1307.
- Butt SJ, Fuccillo M, Nery S, Noctor S, Kriegstein A, Corbin JG, Fishell G. (2005). The temporal and spatial origins of cortical interneurons predict their physiological subtype. *Neuron*. 48:591-604.
- Campbell K. (2003). Dorsal-ventral patterning in the mammalian telencephalon. *Curr Opin Neurobiol*. 13:50-56.
- Chen C, Westenbroek RE, Xu X, Edwards CA, Sorenson DR, Chen Y, McEwen DP, O'Malley HA, Bharucha V, Meadows LS, Knudsen GA, Vilaythong A, Noebels JL, Saunders TL, Scheuer T, Shrager P, Catterall WA, Isom LL. (2004). Mice lacking sodium channel beta1 subunits display defects in neuronal excitability, sodium channel expression, and nodal architecture. *J Neurosci*. 24:4030-4042.
- Cobb SR, Buhl EH, Halasy K, Paulsen O, Somogyi P. (1995). Synchronization of neuronal activity in hippocampus by individual GABAergic interneurons. *Nature*. 378:75-78.
- Cobos I, Calcagnotto ME, Vilaythong AJ, Thwin MT, Noebels JL, Baraban SC, Rubenstein JL. (2005). Mice lacking *Dlx1* show subtype-specific loss of interneurons, reduced inhibition and epilepsy. *Nat Neurosci*. 8:1059-1068.
- Conde F, Lund JS, Lewis DA. (1996). The hierarchical development of monkey visual cortical regions as revealed by the maturation of parvalbumin-immunoreactive neurons. *Brain Res Dev Brain Res*. 96:261-276.
- Conti F, Minelli A, Melone M. (2004). GABA transporters in the mammalian cerebral cortex: localization, development and pathological implications. *Brain Res Brain Res Rev*. 45:196-212.
- DeFelipe J, Hendry SH, Jones EG, Schmechel D. (1985). Variability in the terminations of GABAergic chandelier cell axons on initial segments of pyramidal cell axons in the monkey sensory-motor cortex. *J Comp Neurol*. 231:364-384.
- DeFelipe J, Gonzalez-Albo MC. (1998). Chandelier cell axons are immunoreactive for GAT-1 in the human neocortex. *Neuroreport*. 9:467-470.
- DeFelipe J. (1999). Chandelier cells and epilepsy. *Brain*. 122:1807-1822.
- Dumitriu D, Cossart R, Huang J, Yuste R. (2007). Correlation between axonal morphologies and synaptic input kinetics of interneurons from mouse visual cortex. *Cereb Cortex*. 17:81-91.
- Elston GN, Gonzalez-Albo MC. (2003). Parvalbumin-, calbindin-, and calretinin-immunoreactive neurons in the prefrontal cortex of the owl monkey (*Aotus trivirgatus*): a standardized quantitative comparison with sensory and motor areas. *Brain Behav Evol*. 62:19-30.
- Fairén A, Valverde F. (1980). A specialized type of neuron in the visual cortex of cat: a Golgi and electron microscope study of chandelier cells. *J Comp Neurol*. 194:761-779.
- Fariñas I, DeFelipe J. (1991). Patterns of synaptic input on corticocortical and corticothalamic cells in the cat visual cortex. II. The axon initial segment. *J Comp Neurol*. 304:70-77.
- Flames N, Marin O. (2005). Developmental mechanisms underlying the generation of cortical interneuron diversity. *Neuron*. 46:377-381.
- Freund TF, Buzsáki G. (1996). Interneurons of the hippocampus. *Hippocampus*. 6:347-470.
- Fritschy JM, Weinmann O, Wenzel A, Benke D. (1998). Synapse-specific localization of NMDA and GABA(A) receptor subunits revealed by antigen-retrieval immunohistochemistry. *J Comp Neurol*. 390:194-210.
- García-López M, Abellán A, Legaz I, Rubenstein JL, Puelles L, Medina L. (2008). Histogenetic compartments of the mouse centromedial and extended amygdala based on gene expression patterns during development. *J Comp Neurol*. 506:46-74.
- 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*. 443:1-14.
- Gulyás AI, Miles R, Hajos N, Freund TF. (1993). Precision and variability in postsynaptic target selection of inhibitory cells in the hippocampal CA3 region. *Eur J Neurosci*. 5:1729-1751.
- Halasy K, Somogyi P. (1993). Subdivisions in the multiple GABAergic innervation of granule cells in the dentate gyrus of the rat hippocampus. *Eur J Neurosci*. 5:411-429.

3.2. *The distribution of chandelier cell axon terminals that Express the GABA plasma membrane transporter GAT-1 in the human Neocortex.*
Cerebral Cortex (2007), 17: 2060-2071.

The Distribution of Chandelier Cell Axon Terminals that Express the GABA Plasma Membrane Transporter GAT-1 in the Human Neocortex

M.C. Inda^{1,2}, J. DeFelipe¹ and A. Muñoz^{1,2}

¹Instituto Cajal, CSIC, 28002 Madrid, Spain and ²Department of Cell Biology, Universidad Complutense, 28040 Madrid, Spain

Chandelier cells represent a unique type of cortical GABAergic interneuron whose axon terminals (Ch-terminals) form synapses exclusively with the axon initial segments of pyramidal cells. In this study, we have used immunocytochemistry for the high-affinity plasma membrane transporter-1 (GAT-1) to analyze the distribution and density of Ch-terminals in various cytoarchitectonic and functional areas of the human neocortex. The lowest density of GAT-1-immunoreactive (-ir) Ch-terminals was detected in the primary and secondary visual (areas 17 and 18) and in the somatosensory areas (areas 3b and 1). In contrast, an intermediate density was observed in the motor area 4 and the associative frontolateral areas 45 and 46, whereas the associative frontolateral areas 9 and 10, frontal orbital areas 11, 12, 13, 14, and 47, associative temporal areas 20, 21, 22, and 38, and cingulate areas 24 and 32 displayed the highest density of GAT-1-ir Ch-terminals. Despite these differences, the laminar distribution of GAT-1-ir Ch-terminals was similar in most cortical areas. Hence, the highest density of this transporter was observed in layer II, followed by layers III, V, VI, and IV. In most cortical areas, the density of GAT-1-ir Ch-terminals was positively correlated with the neuronal density, although a negative correlation was detected in layer III across all cortical areas. These results indicate that there are substantial differences in the distribution and density of GAT-1-ir Ch-terminals between areas and layers of the human neocortex. These differences might be related to the different functional attributes of the cortical regions examined.

Keywords: axon initial segment, cerebral cortex, GABA, inhibition, interneurons

Introduction

A large variety of gamma-aminobutyric acid (GABA)-ergic neurons with different morphological, molecular, and physiological characteristics has been described in the mammalian cerebral cortex. Chandelier cells are one of the best characterized cortical GABAergic interneurons because they are readily distinguished by their vertical rows of boutons in the terminal portion of their axons (Ch-terminals), which resemble candlesticks (Szentagothai and Arbib 1974; Jones 1975). Many interneurons establish synapses at different postsynaptic regions, both with pyramidal cells and interneurons. However, chandelier cells are unique because Ch-terminals only establish synapses with the axon initial segments (AIS) of pyramidal cells. Indeed, these cells represent the main source of the AIS synapses (Somogyi 1977; Fairen and Valverde 1980; Peters et al. 1982; Somogyi et al. 1982, 1985; Freund et al. 1983; DeFelipe et al. 1985, 1989; Williams and Lacaille 1992; Buhl et al. 1994; DeFelipe 1999). The AIS is a critical region in controlling cell excitability and the generation of axon potentials, thereby determining the axonal output of principal cells (Stuart and Sakmann 1994; Colbert and Johnston 1996).

Thus, in contrast to interneurons that target membrane compartments of dendrites and somata, chandelier cells have traditionally been presumed to exert a strong influence on the output of pyramidal cells (Miles et al. 1996; DeFelipe 1999). Ch-terminals are found in different cortical areas and species, including rats (Somogyi 1977; Minelli et al. 1995; Tamas and Szabadics 2004), guinea pigs (Gulyas et al. 1993), cats (Fairen and Valverde 1980; Fariñas and DeFelipe 1991), rabbits (Muller-Paschinger et al. 1983), mice (Chiu et al. 2002), ferrets (Kramer and Goldman-Rakic 2001), monkeys (Somogyi et al. 1982, 1983; DeFelipe et al. 1985), and humans (Kisvarday et al. 1986; DeFelipe 1999; Lewis et al. 2005). However, it has become increasingly clear that inhibitory inputs to the AIS of pyramidal cells are not homogeneous across species, cortical regions, layers, or neuronal populations. In addition to occasional synapses from other types of interneurons (e.g., Gonchar et al. 2002), the single AIS of pyramidal cells may be innervated by one or a few chandelier cells (reviewed in DeFelipe 1999). Moreover, the number of synaptic inputs to the AIS differs as a function of age, location, and the projection target of the pyramidal cells (DeFelipe et al. 1985; Fariñas and DeFelipe 1991; Cruz et al. 2003). Chandelier cells are chemically heterogeneous and it has been shown that they express different combinations of substances in distinct layers and species, including the GABA transporter GAT-1; the calcium-binding proteins parvalbumin (PV) and calbindin D-28k; the peptide corticotrophin releasing factor; and the polysialylated form of the neural cell adhesion molecule (DeFelipe et al. 1989; Lewis et al. 1989; Lewis and Lund 1990; Schmidt et al. 1993; Conde et al. 1994; del Rio and DeFelipe 1994; Woo et al. 1998; DeFelipe 1999; Melchitzky et al. 1999; Arellano et al. 2004). Nevertheless, no systematic studies on the distribution and the density of Ch-terminals in the various cortical areas of the human neocortex have been performed.

In the present study, we have used GAT-1 immunocytochemistry to quantify the density of Ch-terminals because GAT-1-immunoreactive (-ir) Ch-terminals are easy to distinguish from other punctate terminal-like labeled structures in the neuropil (DeFelipe and Gonzalez-Albo 1998). We have examined the distribution of Ch-terminals as well as the density of GAT-1-ir Ch-terminals with respect to the total neuron density in each layer. The results reveal that there are significant differences in the distribution and density of GAT-1-ir Ch-terminals between the different areas and layers of the human neocortex.

Materials and Methods

In this study, we have used human autopsy brain tissue obtained 2-3 h post-mortem (kindly supplied by Dr R. Alcaraz, Forensic Pathology Service, Basque Institute of Legal Medicine, Bilbao, Spain), from 3 normal males who died in traffic accidents (M1, M7, and M8 aged 23, 49, and 69 years, respectively). The brain tissue was cut into 1.5-cm-thick coronal

slices and initially fixed by immersion for 24 h in 4% paraformaldehyde diluted in 0.1 M pH 7.4 phosphate buffer (PB). Thereafter, small blocks of neocortical tissue were selected and postfixed for 1–2 days in the same fixative. The tissue was obtained from the somatosensory (areas 1 and 3b), visual (areas 17 and 18), motor (area 4), associative frontal (dorsolateral [areas 9, 10, 45, 46] and orbitary [areas 11, 12, 13, 14, 47]), associative temporal (areas 20, 21, 22, and 38), and limbic cingulate (areas 24, 32) neocortical areas. Blocks from the different Brodmann's areas of the cortex were selected from each brain according to their surface anatomy, using the patterns of the gyri and sulci. The identification of each cortical area was later confirmed by analyzing the distinctive cytoarchitectonic features of Nissl-stained sections.

After fixation, all the specimens were immersed in graded sucrose solutions and they were stored in a cryoprotectant solution at -20°C . Serial sections (100 μm) of the cortical tissue were obtained using a vibratome, and the sections from each region and case were batch processed for immunocytochemical staining. The sections immediately adjacent to those stained immunocytochemically were Nissl stained in order to identify the cortical areas and the laminar boundaries.

Immunostaining

Sections were first treated for 30 min with a solution of 0.5% hydrogen peroxide and 50% ethanol in PB to inactivate the endogenous peroxidase activity. Subsequently, the sections were rinsed in PB and preincubated for 1 h at room temperature in a stock solution containing 3% normal goat or horse serum (Vector Laboratories, Burlingame, CA) in PB with Triton X-100 0.25%. Thereafter, the sections were incubated for 48 h at 4°C in the same stock solution containing rabbit-anti-GAT-1 antiserum (1:500; Chemicon, Temecula, CA) or mouse-anti-neuron-specific nuclear protein (Neu-N) antibodies (1:4000; Chemicon). The sections were washed in PB, incubated in horse-anti-mouse or goat-anti-rabbit biotinylated secondary antibodies (1:200; Vector), and processed using the Vectastain ABC immunoperoxidase kit (Vector). Antibody labeling was visualized with 0.05% 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride (Sigma, St Louis, MO) and 0.01% hydrogen peroxide. The sections were rinsed in PB, mounted on glass slides, dehydrated, cleared with xylene, and coverslipped. Controls were included in all the immunocytochemical procedures, either by replacing the primary antibody with preimmune goat or horse serum in some sections, omitting the secondary antibody, or replacing the secondary antibody with an inappropriate secondary antibody (i.e., an antibody directed against another species). No significant immunolabeling was detected under these control conditions.

Quantification and Statistical Analysis

A BX51 Olympus microscope equipped with a motorized stage and a DP70 digital camera, and the NeuroLucida package (MicroBrightField, Williston, VT) were used to plot all GAT-1-ir Ch-terminals visualized at a final magnification of $\times 400$, in 3 randomly selected radial strips. Adjacent Neu-N-immunostained sections were used to trace the contour lines corresponding to the individual cortical layers within each strip. The density of GAT-1-ir Ch-terminals in each cortical layer was estimated by dividing the number of GAT-1-ir Ch-terminals by the surface area of each layer in the cortical strip.

With the aid of the NeuroLucida software (MicroBrightField Inc., Version 6.0, Williston) and a $\times 4$ objective, we first defined a 1-mm-wide strip across the cortex in Neu-N-immunostained sections from each cortical area and case, each of which extended from the pial surface to the white matter. We divided each strip into 1-mm-wide rectangles (counting fields), which corresponded to the radial extent of each cortical layer. The contours of these fields were then superimposed onto video images from adjacent GAT-1-immunostained sections in order to count Ch-terminals on the computer screen. The NeuroLucida package permits the complete surface of the previously defined counting fields to be scanned ($\times 40$ objective), with successive and nonoverlapping frames (17 250 μm^2). All Ch-terminals throughout the entire thickness of the section were counted within an unbiased counting frame (Gundersen 1977). Ch-terminals touching the exclusion lines were not counted.

The neuronal density was estimated stereologically in each cortical area and layer by counting the nuclei in 30- μm -thick randomly selected

optical dissectors of Neu-N-immunostained sections using a $\times 100$ oil-immersion objective (West and Gundersen 1990). A minimum of 30 optical dissectors per layer and cortical area were studied using a motorized stage and the Olympus Cast grid system (Denmark).

We applied a statistical factorial model that was designed with nested multiple comparisons of 4 factors, 2 fixed (layer and area) and 2 random (human and pseudoreplicas), each measurement made in every layer, cortical area, and case. In this model we excluded either layer IV when examining differences between the areas or areas 4 and 24 (agranular areas) to detect differences between the layers. The SAS system 8v (SAS Institute Inc. Cary, NC) was used in this analysis. One-way analysis of variance with T3 Dunnett post hoc comparison was then performed with the SPSS statistical package software (SPSS Inc., Chicago, IL) in order to study the differences between the layers and areas. Spearman's tests were used to study the possible correlations.

To generate the figures, light microscopic images were captured using a digital camera (Olympus DP50) attached to an Olympus light microscope, and Adobe Photoshop 7.0 software was used to generate the figure plates (Adobe Systems Inc., San Jose, CA).

Results

In the human cerebral cortex, GAT-1 immunocytochemistry labels numerous terminal-like puncta in the neuropil and around unstained cell bodies throughout cortical layers I–VI (Figs 1 and 2). However, as described previously the elements that are most intensely labeled are the Ch-terminals (DeFelipe and González-Albo 1998). GAT-1-ir Ch-terminals were found in

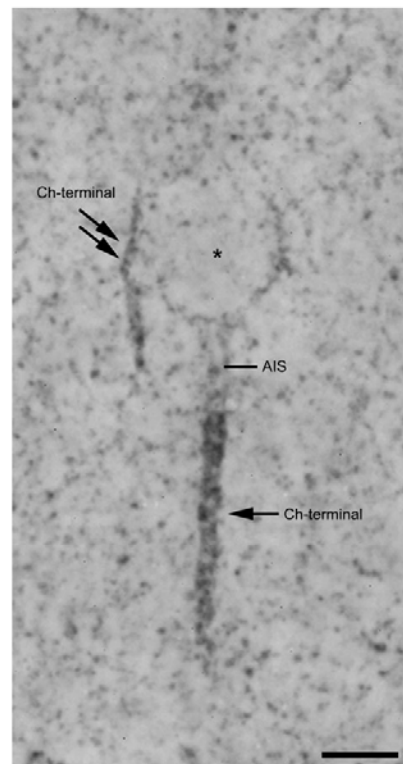


Figure 1. Photomicrograph showing GAT-1-ir Ch-terminals (arrows) innervating the AIS of pyramidal cells in layer III of area 10. The asterisk indicates the position of the pyramidal cell soma. A small GAT-1-ir Ch-terminal indicated with 2 arrows also can be distinguished, despite the fact that the unlabeled cell of origin of the AIS is not visible in this section. Scale bar: 10, 5 μm .

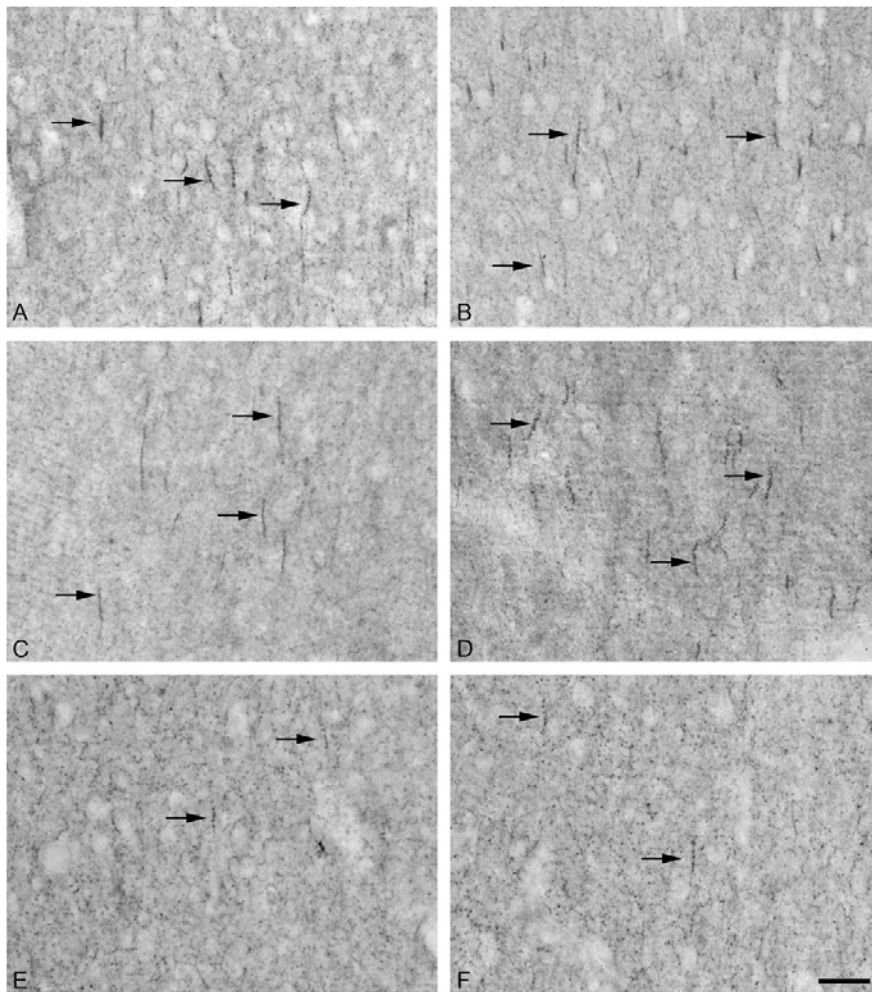


Figure 2. Low-power photomicrographs showing the distribution of GAT-1-ir Ch-terminals (arrows) in layers II (A and B), III (C, E, and F), and VI (D) of areas 21 (A), 9(B), 10 (C), 47(D), 17 (E), and 18 (F). Note the low density of GAT-1-ir Ch-terminals in layer III of the primary (E) and secondary (F) visual areas when compared with the frontal associative areas (C and D). Scale bar: 40 μ m.

all cortical areas but by plotting their distribution it became apparent that there were dramatic differences between each cortical area and layer (Figs 3 and 4).

Density of GAT-1-ir Ch-Terminals

The global density of GAT-1-ir Ch-terminals was compared between each individual and it was seen to be highest in the tissue from M1 followed by that from M7. The lowest density of GAT-1-ir Ch-terminals was observed in the cortical tissue from the individual M8 (Fig. 5). However, the differences in the density of GAT-1-ir Ch-terminals were not statistically significant either between subjects or between replicates (the different measurements made in each layer, cortical area, and case). Nevertheless, there were clear differences in the mean density of GAT-1-ir Ch-terminals between different cortical areas and layers ($P < 0.0001$, see below). For this reason, we will present the data from both each individual case and the averages of the values obtained in the 3 cases.

When the densities observed in the 3 cases were averaged, there were clear differences in the mean density of GAT-1-ir Ch-terminals between different cortical areas ($P < 0.0001$, Fig. 6A). In general, the different cortical areas analyzed could be divided into 3 main groups according to the density of GAT-1-ir Ch-terminals. Group I contained the lowest density of GAT-1-ir Ch-terminals (mean \pm standard error [SE]: 39.23 ± 2.84), and included the primary and secondary sensory areas, both visual areas 17 and 18 and somatosensory areas 3b and 1. In group II, the motor area 4 and associative frontolateral areas 45 and 46 displayed intermediate densities (80.15 ± 5.80). In contrast, group III displayed the highest mean density (124.66 ± 3.43) and it comprised the associative frontolateral areas 9 and 10, the frontal orbital areas 11, 12, 13, 14, and 47, the associative temporal areas 20, 21, 22, and 38, and cingulate areas 24 and 32. No significant differences were found in the density of the GAT-1-ir Ch-terminals between individual layers or in the mean values of cortical areas within each group (Table 1). However, all the cortical areas of group I showed significant differences in

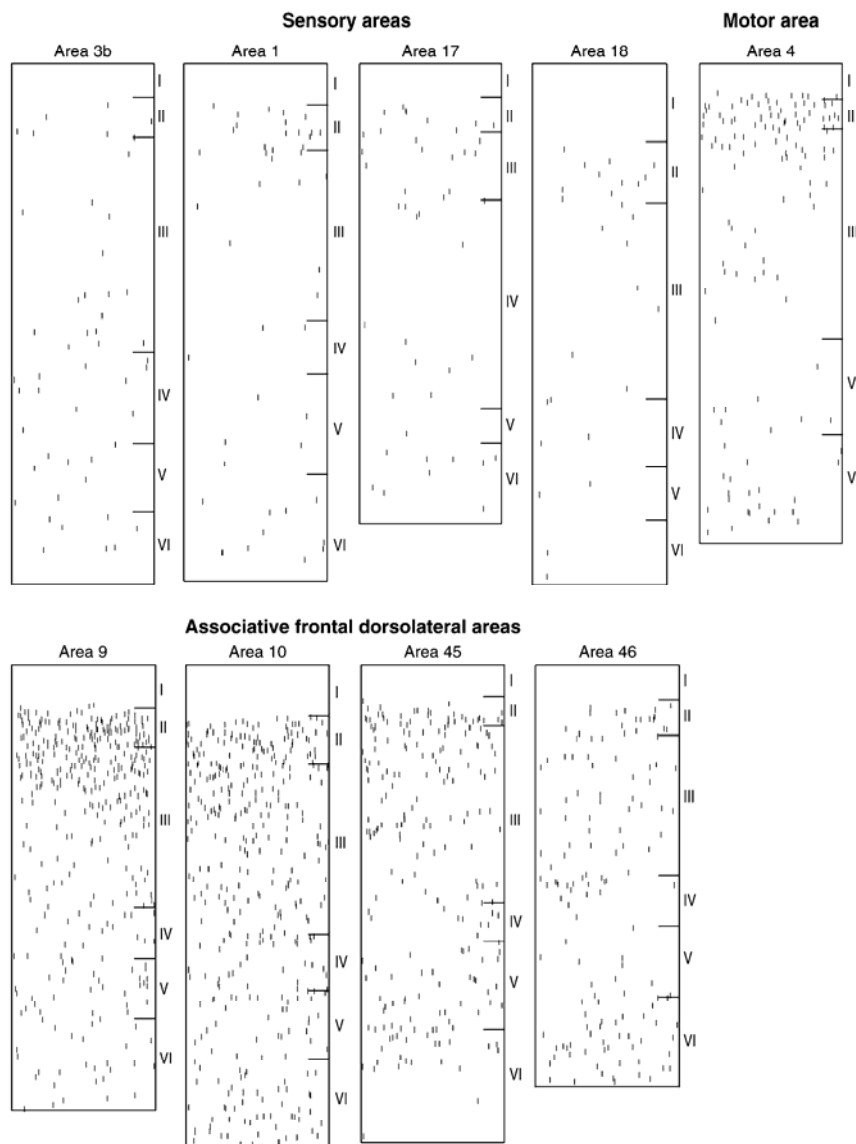


Figure 3. Schematic drawings based on Neurolucida plots made with a $\times 40$ objective showing the laminar patterns of GAT-1-ir Ch-terminals in sensory, motor, and associative frontal dorsolateral areas of the M1 brain. Note the scarcity of GAT-1-ir Ch-terminals in sensory areas. Despite the differences in density, a similar distribution of GAT-1-ir Ch-terminals was found in most areas.

the density of these terminals when compared with cortical areas in group III (Table 1). Only certain areas of group II showed significant differences in the density of GAT-1-ir Ch-terminals with the areas included in group I or III (Table 1).

Laminar Distribution of GAT-1-ir Ch-Terminals

When the data from all the cortical areas were averaged, each of the 3 brains showed a similar laminar distribution of GAT-1-ir Ch-terminals (Fig. 6B). The highest density of GAT-1-ir Ch-terminals corresponded to layer II (mean \pm SE; 188.08 ± 7.34), which was significantly greater than that in the other layers ($P < 0.0001$). Layer III displayed an intermediate density of Ch-

terminals (119.28 ± 5.28), significantly different to all layers except layer VI ($P < 0.01$). Finally, the lowest density of Ch-terminals was found in layers IV and V (80.43 ± 4.86 and 94.80 ± 4.66 , respectively). Significant differences were found between the mean density of GAT-1-ir Ch-terminals in layers IV ($P < 0.001$) and V ($P < 0.05$) with that in other layers except layers V and IV, respectively. Finally, in layer VI the density of Ch-terminals (117.89 ± 5.03) was significantly different from that in all the other layers except that in layer III ($P < 0.05$).

The laminar distribution of GAT-1-ir Ch-terminals in sensory, motor, frontolateral associative, temporal associative, and cingulate areas is shown in Figures 3, 4, 7, and 8. Note that the

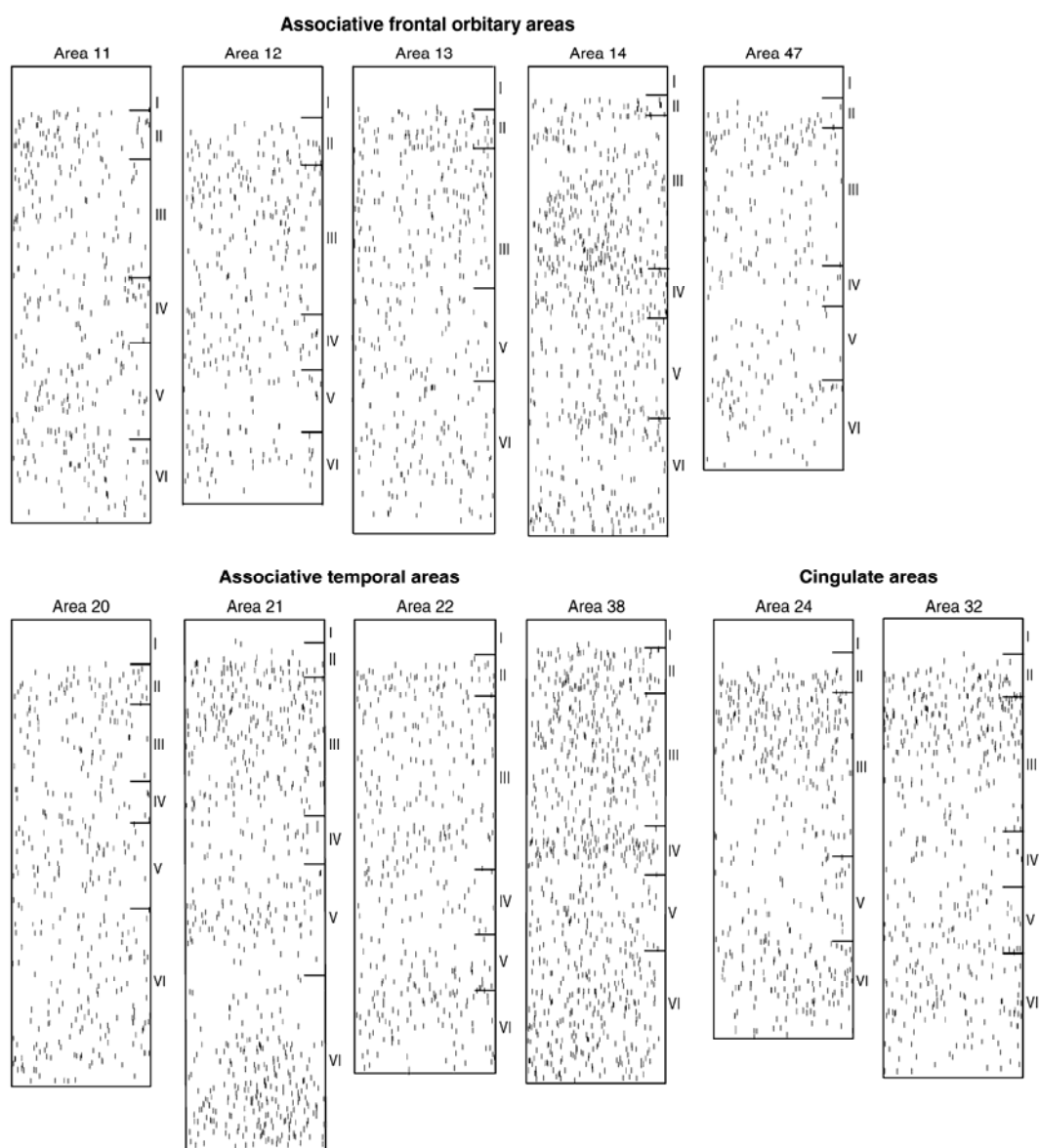


Figure 4. Schematic drawings based on NeuroLucida plots made with a $\times 40$ objective showing the laminar patterns of GAT-1-ir Ch-terminals in associative frontal orbitary, associative temporal, and cingulate areas of the M1 brain. Note the similar distribution of GAT-1-ir Ch-terminals in the different cortical areas.

distribution of these terminals is fairly similar in the 3 brains analyzed (Figs 7 and 8). The significance of the comparisons between the different layers across the different areas analyzed is illustrated in Table 1. In general, when significant differences were observed in the density of GAT-ir Ch-terminals between areas, they were mostly due to significant differences in layers III and VI. Layer II presented a homogeneously high density of GAT-1-ir Ch-terminals with no significant differences between most cortical areas. In contrast, the density of terminals in layer II of areas 1 and 18 was significantly lower when compared with most cortical areas of group III. In most areas other than the temporal lobe, a tendency toward a lower density of GAT-1-ir Ch-terminals was observed in layers IV and V, although the

differences between areas did not generally reach statistical significance.

Correlation between the Density of GAT-1-ir Cb-Terminals and that of Neu-N-ir Neurons

In an attempt to detect possible correlations between the density of Neu-N-ir neurons and the number of GAT-ir Ch-terminals, we compared these parameters in 6 representative cortical areas: the sensory areas 17 and 18, motor area 4, associative areas 9 and 21, and cingulate area 24 (Figs 7-9). When these variables were analyzed in individual cortical layers from distinct cytoarchitectonic areas, an inverse correlation was found in layer III (Spearman's ρ -0.664 , $P = 0.03$). Thus, in

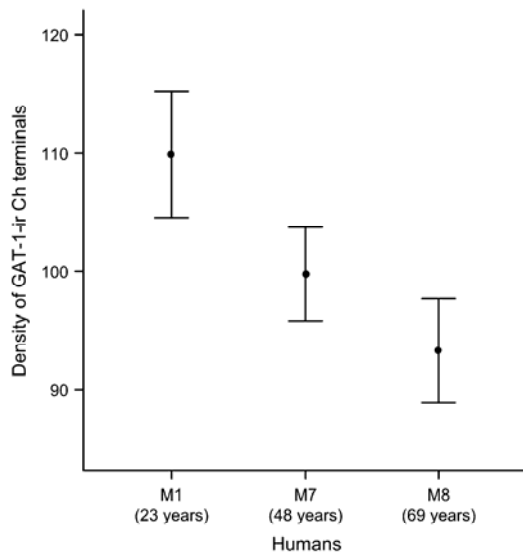


Figure 5. Chart indicating the average density \pm SE of Ch-terminals immunostained for GAT-1 in the neocortex of the individuals M1, M7, and M8. Note the decline in the mean density of GAT-1-ir Ch-terminals with age, although the differences were not statistically significant.

areas with a higher neuronal density in layer III (i.e., areas 17 and 18) there was a lower density of GAT-1-ir Ch-terminals (Figs 7-9). Likewise, a similar trend was found in layers II and IV but this did not reach statistical significance (Spearman's rho -0.457 $P = 0.56$ and Spearman's rho -0.493 $P = 0.62$, respectively). In contrast, the number of GAT-1-ir Ch-terminals was not correlated with neuronal density in layers V and VI.

When neuronal density and the density of GAT-1-ir Ch-terminals were analyzed in the cortical layers of each individual cytoarchitectonic area, a direct correlation was found in areas 4, 9, 17, and 24. As such, the higher density of GAT-1-ir Ch-terminals was associated with a higher density of neurons in the layers of these areas (Spearman's rho for areas 4, 9, 17, 24 = 0.83^{**} , 0.65^{**} , 0.68^{**} , 0.53^{*} ; $*P < 0.05$, $**P < 0.01$).

Discussion

Through studying GAT-1 immunohistochemistry, we have been able to quantify the density and distribution of Ch-terminals in different areas and layers of the human neocortex. This analysis has revealed both similarities and differences between distinct cytoarchitectonic areas and cortical layers. Thus, we found that the distribution of Ch-terminals is not homogeneous in the cortex and we consider that these differences are probably related to the different functional attributes of the cortical region or layer examined.

Variation in the Density of Ch-Terminals between Individuals

In this study, we found that the global density of GAT-1-ir Ch-terminals decreased with age. Indeed, there was a 15% decrease in the 69-year-old individual when compared with the tissue obtained from the 23 year old. However, this difference was not statistically significant and because we only analyzed one individual of each age, the differences could merely be due to

interindividual variability. Thus, it is clear that further studies on tissue from more subjects will be necessary to verify the age-related decline in the density of GAT-1-ir Ch-terminals in the human neocortex. Nevertheless, these results are consistent with the age-related decline in GAT-1-ir Ch-terminals reported in layer III of the monkey cortex (Cruz et al. 2003). Such a decline does not seem to represent an age-dependent decrease in the number of neurons. Neither neuronal density (Pakkenberg et al. 2003) nor the density of PV-ir cell somata (including chandelier cells; Bu et al. 2003) have been seen to change as a function of age in the human neocortex. Thus, age-related axonal retraction by chandelier cells and/or a decrease of GAT-1 expression or antigenicity at Ch-terminals with age may well account for the current observations. However, because there are relatively few chandelier cells a loss of some of these may pass unnoticed when the whole population of neurons is considered in stereological studies. It will be necessary to examine the pyramidal cell AISs by electron microscopy to better define the processes involved in this loss of GAT-1-labeled terminals.

Variation in the Density of GAT-1-ir Ch-Terminals between Areas

There were significant differences in the density of GAT-1-ir Ch-terminals between the distinct areas of the human neocortex analyzed, suggesting a regional specialization of the inhibitory circuits in which they are involved. In the 3 brains analyzed, the primary and secondary sensory areas (areas 17, 18, 3b, and 1) displayed the lowest density of GAT-1-ir Ch-terminals, the motor (area 4) and associative frontolateral areas 45 and 46 displayed intermediate values, whereas the frontolateral areas 9 and 10, the frontal orbitary areas 11, 12, 13, 14, and 47, the temporal areas 20, 21, 22, and 38, and the cingulate areas 24 and 32 contained the highest mean density of GAT-1-ir Ch-terminals. Although detailed studies of the density and distribution of Ch-terminals have not been performed previously in the human neocortex, these results are consistent with observations that there is generally a higher density of Ch-terminals in high-order association areas than in primary sensory areas in the monkey (Lewis et al. 1989; Akil and Lewis 1992; Conde et al. 1996; Elston and Gonzalez-Albo 2003). Furthermore, the results are consistent with those showing that double bouquet cells, another important component of cortical GABAergic circuits, are not homogeneously distributed throughout the neocortex but that they also display rather dramatic differences in their density between areas (Yáñez et al. 2005). Previous electron microscopy and tract tracing studies (Fariñas and DeFelipe 1991), as well as the analysis of Golgi-stained material (Lewis and Lund 1990) have shown that Ch-terminals are present in the cat and monkey visual cortex. However, it is difficult to obtain an idea about the distribution of Ch-terminals in electron microscope studies or in Golgi studies due to the inconsistency of the Golgi method and the relatively few AIS examined by electron microscopy. Therefore, the scarcity of GAT-1-ir Ch-terminals in the primary visual cortex observed here, as in other sensory areas, is best compared with other cortical areas examined using the same methodology. There are several possible explanations for the differences in the density of GAT-1-ir Ch-terminals between areas. Because not all pyramidal cells are necessarily innervated by Ch-terminals (e.g., see Fariñas and DeFelipe 1991), a smaller proportion of the pyramidal cells in sensory areas could be innervated by Ch-terminals than in associative areas. Alternatively, there may be less GAT-1 protein

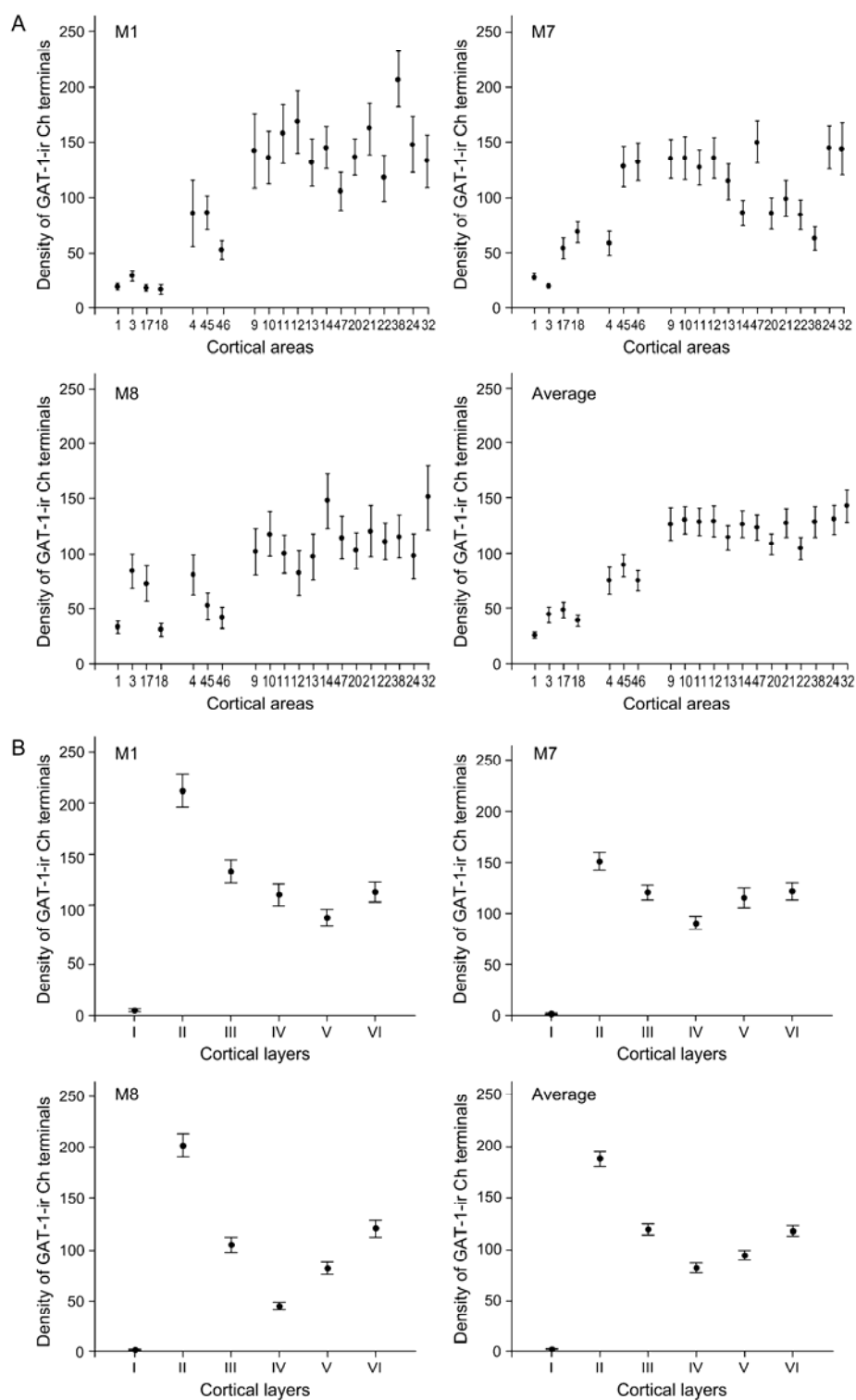


Figure 6. Charts indicating the average density \pm SE of Ch-terminals immunostained for GAT-1 in the different cortical areas (A) and layers (B) of the human brains M1, M7, and M8. Note that similar values were obtained for each area in the 3 cases. When the average values from the 3 cases are considered (A), cortical areas can be grouped according to the density of GAT-1-ir Ch-terminals. Note also that similar laminar patterns of GAT-1-ir Ch-terminals were found in the 3 brains (B).

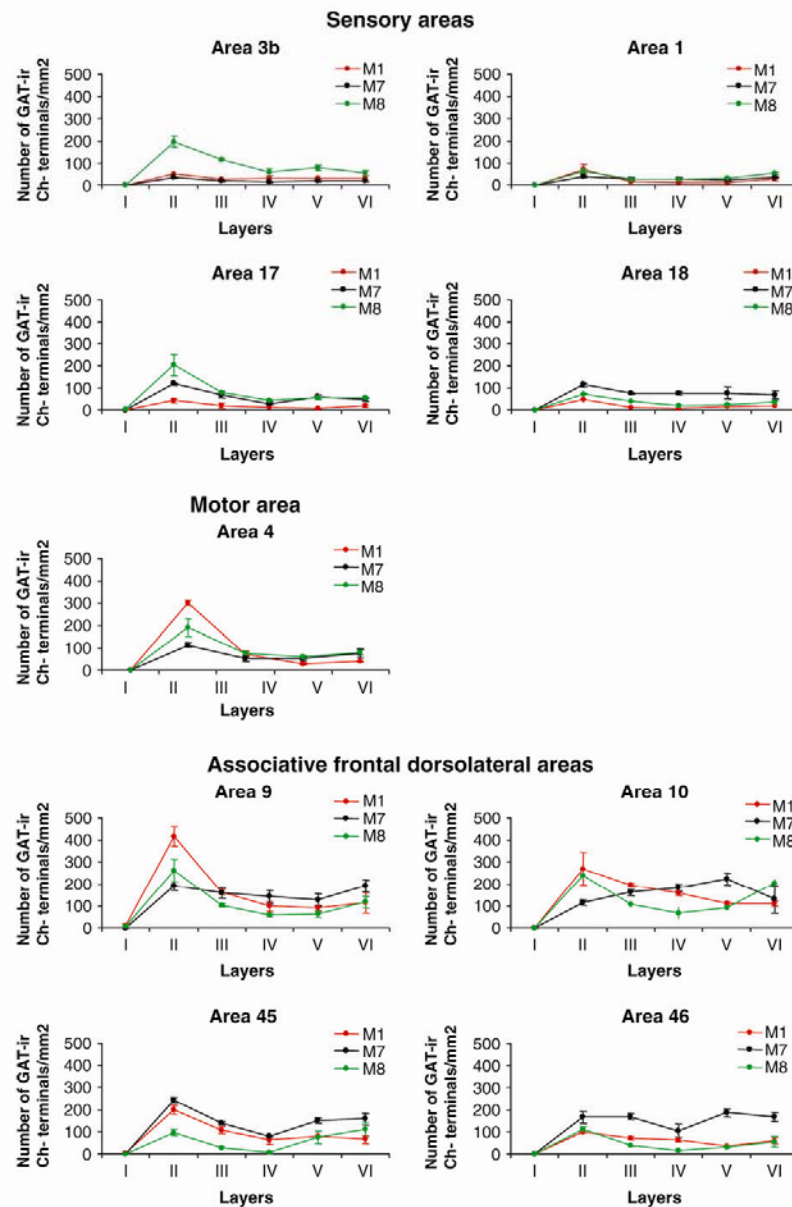


Figure 7. Graphs indicating the density of GAT-1-ir Ch-terminals in the different layers of sensory, motor, and associative frontal dorsolateral areas of the M1, M7, and M8 brains. Note that despite the differences in density, the same laminar patterns were generally found in each cortical area in the 3 individuals.

in Ch-terminals in sensory areas implying that many terminals in these regions contain quantities of protein that are below the levels of detection for the immunocytochemical methods used. Furthermore, it is possible that at least some Ch-terminals in sensory cortical areas could use other types of GABA transporters.

Laminar Distribution of GAT-1-ir Ch-Terminals in the Cerebral Cortex

The present results also indicate that there are differences in the density of GAT-1-ir Ch-terminals between the distinct

cortical layers. The highest density of GAT-1-ir Ch-terminals was observed in layer II followed by layers III, V, VI, and IV. Previous studies have shown that there are differences in the density of synaptic terminals that contact the AIS of pyramidal cells located in different layers. For instance, in the monkey temporal and sensory-motor cortex, and in the cat visual cortex, the AIS of pyramidal neurons in layers II–III are more densely innervated by chandelier cell synapses than those in layers V and VI (Sloper and Powell 1979; DeFelipe et al. 1985; Fariñas and DeFelipe 1991; DeFelipe 1999). Because the pyramidal cells located in different layers project to different sites (Jones 1984;

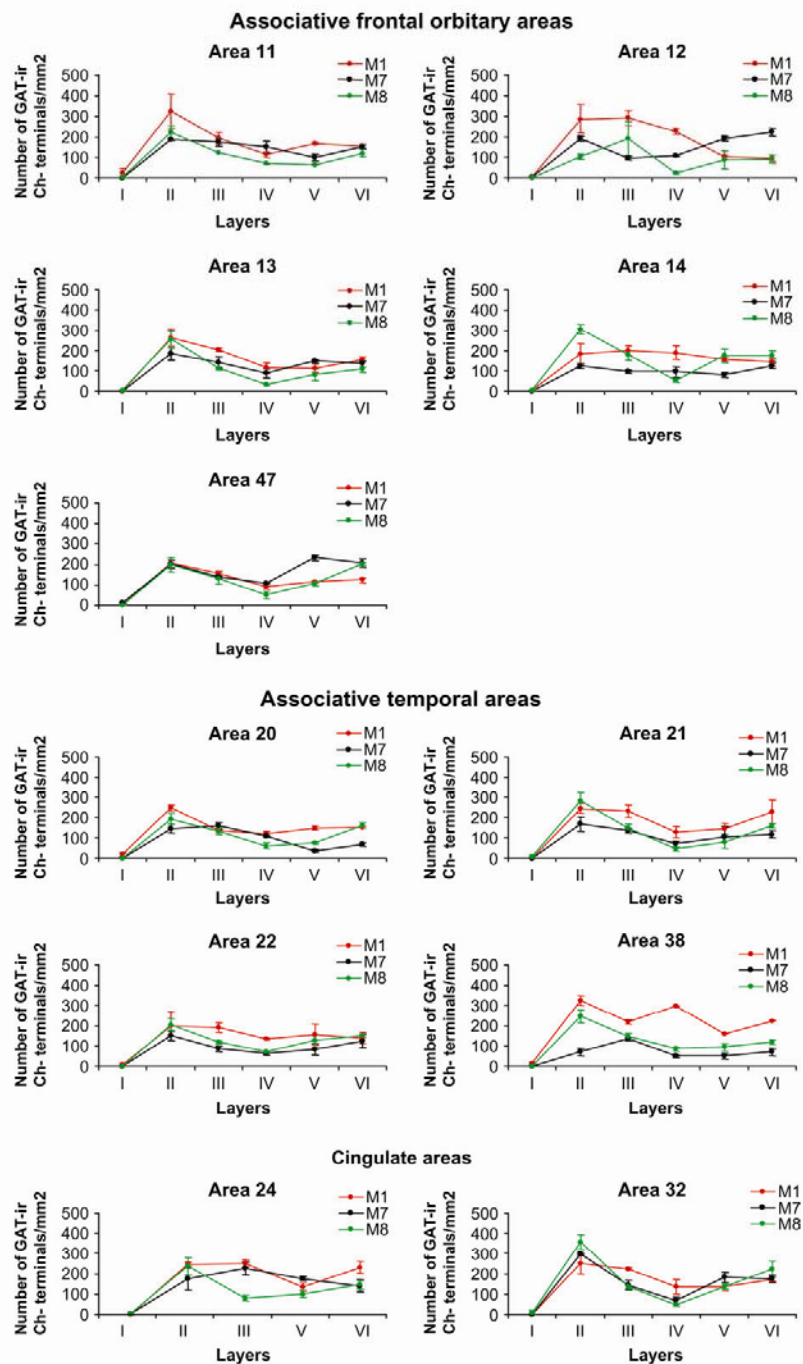


Figure 8. Graphs indicating the density of GAT-1-ir Ch-terminals in the different layers of associative frontal orbitary, associative temporal, and cingulate areas in the M1, M7, and M8 brains. Note that despite the differences in density, the same laminar patterns were generally found in each cortical area in the 3 individuals. See layer I in area 38 of the M1 brain as an exception.

White 1989), the changes in the density of GAT-1-ir Ch-terminals observed between layers might be related to the laminar distribution of pyramidal cell populations projecting to particular sites.

In addition, it has been shown in the rat neocortex that postsynaptic GABA_A receptors at the AIS of supragranular pyramidal cells are enriched with the $\alpha 2$ subunit, whereas in infragranular layers the $\alpha 3$ subunit predominates (Fritschy et al.

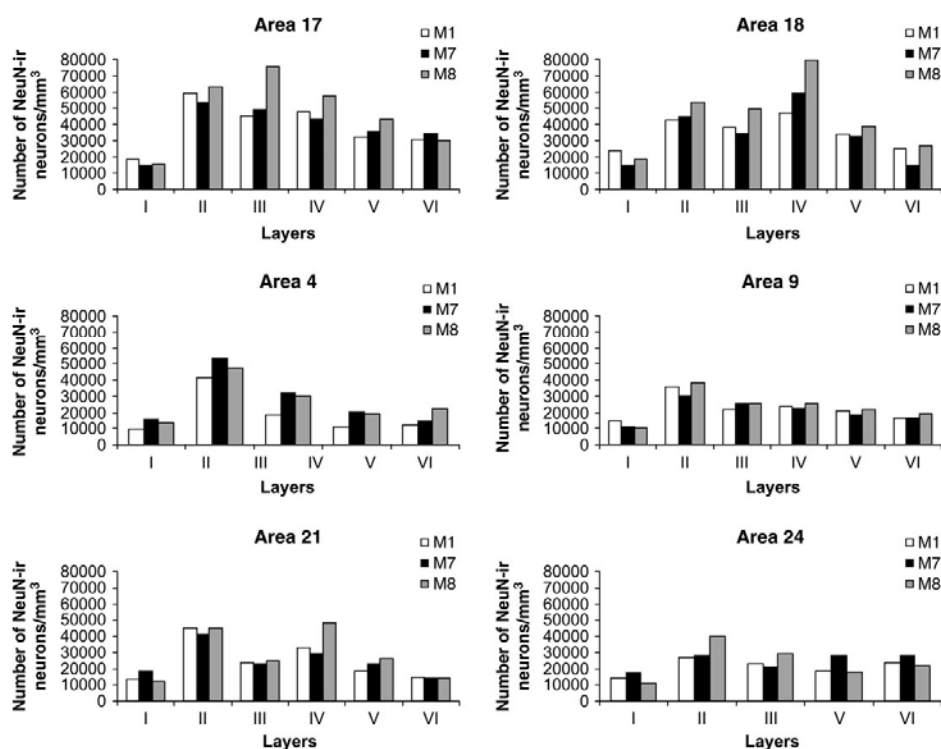


Figure 9. Bar diagrams illustrating the neuronal density (M1, M7, and M8) in sensory (areas 17 and 18), motor (area 4), dorsolateral associative (area 9), temporal associative (area 21), and cingulate (area 24) areas.

1998). Thus, it is possible that chandelier cells exert their activity through different types of postsynaptic GABA_A receptors depending on the cortical layer in which they are found. Finally, a direct correlation was observed between the density of GAT-1-ir Ch terminals and neuronal density in areas 4, 9, 17, and 24. This was not the case in areas 18 and 21 where there was no correlation between GAT-1-ir Ch-terminals and neuronal density. Hence, there is a remarkable heterogeneity in the density and distribution of GAT-1-ir Ch-terminals, suggesting that chandelier cells contribute differentially to cortical circuits (anatomically and physiologically) according to the cortical area or layer in which they are situated.

Notes

This work was supported by the Ministerio de Ciencia y Tecnología grants BFI 2003-01018 and BFU2006-03855 to A.M. and BFI 2003-02745 and BFU2006-13395 to J.F. We thank Laura Barrios (Department of Statistics, CTI, CSIC, Madrid, Spain) for her assistance in the statistical analysis. *Conflict of Interest* None declared.

Address correspondence to A. Muñoz, Instituto Cajal, CSIC, Av. Dr Arce 37, 28002 Madrid, Spain. Email: amunoz@cajal.csic.es.

References

Akil M, Lewis DA. 1992. Postnatal development of parvalbumin immunoreactivity in axon terminals of basket and chandelier neurons in monkey neocortex. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 16:329-337.

Arellano JI, Muñoz A, Ballesteros-Yanez I, Sola RG, DeFelipe J. 2004.

Histopathology and reorganization of chandelier cells in the human epileptic sclerotic hippocampus. *Brain*. 127:45-64.

Bu J, Sathyendra V, Nagykerly N, Geula C. 2003. Age-related changes in calbindin-D28k, calretinin, and parvalbumin-immunoreactive neurons in the human cerebral cortex. *Exp Neurol*. 182:220-231.

Buhl EH, Halasy K, Somogyi P. 1994. Diverse sources of hippocampal unitary inhibitory postsynaptic potentials and the number of synaptic release sites. *Nature*. 368:823-828.

Chiu CS, Jensen K, Sokolova I, Wang D, Li M, Deshpande P, Davidson N, Mody I, Quick MW, Quake SR, et al. 2002. Number, density, and surface/cytoplasmic distribution of GABA transporters at presynaptic structures of knock-in mice carrying GABA transporter subtype 1-green fluorescent protein fusions. *J Neurosci*. 22:10251-10266.

Colbert CM, Johnston D. 1996. Axonal action-potential initiation and Na⁺ channel densities in the soma and axon initial segment of subicular pyramidal neurons. *J Neurosci*. 16:6676-6686.

Conde F, Lund JS, Jacobowitz DM, Baimbridge KG, Lewis DA. 1994. Local circuit neurons immunoreactive for calretinin, calbindin D-28k or parvalbumin in monkey prefrontal cortex: distribution and morphology. *J Comp Neurol*. 341:95-116.

Conde F, Lund JS, Lewis DA. 1996. The hierarchical development of monkey visual cortical regions as revealed by the maturation of parvalbumin-immunoreactive neurons. *Brain Res Dev Brain Res*. 96:261-276.

Cruz DA, Egan SM, Lewis DA. 2003. Postnatal development of pre- and postsynaptic GABA markers at chandelier cell connections with pyramidal neurons in monkey prefrontal cortex. *J Comp Neurol*. 465:385-400.

DeFelipe J. 1999. Chandelier cells and epilepsy. *Brain*. 122 (Pt 10): 1807-1822.

DeFelipe J, Gonzalez-Albo MC. 1998. Chandelier cell axons are immunoreactive for GAT-1 in the human neocortex. *Neuroreport*. 9:467-470.

- DeFelipe J, Hendry SH, Jones EG. 1989. Visualization of chandelier cell axons by parvalbumin immunoreactivity in monkey cerebral cortex. *Proc Natl Acad Sci USA*. 86:2093-2097.
- DeFelipe J, Hendry SH, Jones EG, Schmechel D. 1985. Variability in the terminations of GABAergic chandelier cell axons on initial segments of pyramidal cell axons in the monkey sensory-motor cortex. *J Comp Neurol*. 231:364-384.
- del Rio MR, DeFelipe J. 1994. A study of SMI 32-stained pyramidal cells, parvalbumin-immunoreactive chandelier cells, and presumptive thalamocortical axons in the human temporal neocortex. *J Comp Neurol*. 342:389-408.
- Elston GN, Gonzalez-Albo MC. 2003. Parvalbumin-, calbindin-, and calretinin-immunoreactive neurons in the prefrontal cortex of the owl monkey (*Aotus trivirgatus*): a standardized quantitative comparison with sensory and motor areas. *Brain Behav Evol*. 62:19-30.
- Fairen A, Valverde F. 1980. A specialized type of neuron in the visual cortex of cat: a Golgi and electron microscope study of chandelier cells. *J Comp Neurol*. 194:761-779.
- Fariñas I, DeFelipe J. 1991. Patterns of synaptic input on corticocortical and corticothalamic cells in the cat visual cortex. II. The axon initial segment. *J Comp Neurol*. 304:70-77.
- Freund TF, Martin KA, Smith AD, Somogyi P. 1983. Glutamate decarboxylase-immunoreactive terminals of Golgi-impregnated axo-axonic cells and of presumed basket cells in synaptic contact with pyramidal neurons of the cat's visual cortex. *J Comp Neurol*. 221:263-278.
- Fritschy JM, Weinmann O, Wenzel A, Benke D. 1998. Synapse-specific localization of NMDA and GABA(A) receptor subunits revealed by antigen-retrieval immunohistochemistry. *J Comp Neurol*. 390:194-210.
- 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*. 443:1-14.
- Gulyas AI, Miles R, Hajos N, Freund TF. 1993. Precision and variability in postsynaptic target selection of inhibitory cells in the hippocampal CA3 region. *Eur J Neurosci*. 5:1729-1751.
- Gundersen HJG. 1977. Notes on the estimation of the numerical density of arbitrary profiles: the edge effect. *J Microsc*. 111:219-223.
- Jones EG. 1975. Varieties and distribution of non-pyramidal cells in the somatic sensory cortex of the squirrel monkey. *J Comp Neurol*. 160:205-267.
- Jones EG. 1984. Laminar distribution of cortical efferent cells. In: Peters A, Jones EG, editors. *Cellular components of the cerebral cortex*. New York: Plenum Press.
- Kisvarday ZF, Adams CB, Smith AD. 1986. Synaptic connections of axo-axonic (chandelier) cells in human epileptic temporal cortex. *Neuroscience*. 19:1179-1186.
- Krimer LS, Goldman-Rakic PS. 2001. Prefrontal microcircuits: membrane properties and excitatory input of local, medium, and wide arbor interneurons. *J Neurosci*. 21:3788-3796.
- Lewis DA, Foote SL, Cha CI. 1989. Corticotropin-releasing factor immunoreactivity in monkey neocortex: an immunohistochemical analysis. *J Comp Neurol*. 290:599-613.
- Lewis DA, Hashimoto T, Volk DW. 2005. Cortical inhibitory neurons and schizophrenia. *Nat Rev Neurosci*. 6:312-324.
- Lewis DA, Lund JS. 1990. Heterogeneity of chandelier neurons in monkey neocortex: corticotropin-releasing factor- and parvalbumin-immunoreactive populations. *J Comp Neurol*. 293:599-615.
- Melchitzky DS, Sesack SR, Lewis DA. 1999. Parvalbumin-immunoreactive axon terminals in macaque monkey and human prefrontal cortex: laminar, regional, and target specificity of type I and type II synapses. *J Comp Neurol*. 408:11-22.
- Miles R, Toth K, Gulyas AI, Hajos N, Freund TF. 1996. Differences between somatic and dendritic inhibition in the hippocampus. *Neuron*. 16:815-823.
- Minelli A, Brecha NC, Karschin C, DeBiasi S, Conti F. 1995. GAT-1, a high-affinity GABA plasma membrane transporter, is localized to neurons and astroglia in the cerebral cortex. *J Neurosci*. 15:7734-7746.
- Muller-Paschinger IB, Tombol T, Petsche H. 1983. Chandelier neurons within the rabbits' cerebral cortex. A Golgi study. *Anat Embryol (Berl)*. 166:149-154.
- Pakkenberg B, Pelvig D, Marner L, Bundgaard MJ, Gundersen HJ, Nyengaard JR, Regeur L. 2003. Aging and the human neocortex. *Exp Gerontol*. 38:95-99.
- Peters A, Proskauer CC, Ribak CE. 1982. Chandelier cells in rat visual cortex. *J Comp Neurol*. 206:397-416.
- Schmidt S, Braak E, Braak H. 1993. Parvalbumin-immunoreactive structures of the adult human entorhinal and transeorhinal region. *Hippocampus*. 3:459-470.
- Sloper JJ, Powell TP. 1979. A study of the axon initial segment and proximal axon of neurons in the primate motor and somatic sensory cortices. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 285:173-197.
- Somogyi P. 1977. A specific 'axo-axonal' interneuron in the visual cortex of the rat. *Brain Res*. 136:345-350.
- Somogyi P, Freund TF, Cowey A. 1982. The axo-axonic interneuron in the cerebral cortex of the rat, cat and monkey. *Neuroscience*. 7:2577-2607.
- Somogyi P, Freund TF, Hodgson AJ, Somogyi J, Beroukas D, Chubb IW. 1985. Identified axo-axonic cells are immunoreactive for GABA in the hippocampus and visual cortex of the cat. *Brain Res*. 332:143-149.
- Somogyi P, Nunzi MG, Gorio A, Smith AD. 1983. A new type of specific interneuron in the monkey hippocampus forming synapses exclusively with the axon initial segments of pyramidal cells. *Brain Res*. 259:137-142.
- Stuart GJ, Sakmann B. 1994. Active propagation of somatic action potentials into neocortical pyramidal cell dendrites. *Nature*. 367:69-72.
- Szentagothai J, Arbib MA. 1974. Conceptual models of neural organization. *Neurosci Res Program Bull*. 12:305-510.
- Tamas G, Szabadics J. 2004. Summation of unitary IPSPs elicited by identified axo-axonic interneurons. *Cereb Cortex*. 14:823-826.
- West MJ, Gundersen HJ. 1990. Unbiased stereological estimation of the number of neurons in the human hippocampus. *J Comp Neurol*. 296:1-22.
- White EL. 1989. *Cortical Circuits: synaptic organization of the cerebral cortex. Structure, function and theory*. Boston: Birkhäuser.
- Williams S, Lacaille JC. 1992. GABA(B) receptor-mediated inhibitory postsynaptic potentials evoked by electrical stimulation and by glutamate stimulation of interneurons in stratum lacunosum-moleculare in hippocampal CA1 pyramidal cells in vitro. *Synapse*. 11:249-258.
- Woo TU, Whitehead RE, Melchitzky DS, Lewis DA. 1998. A subclass of prefrontal gamma-aminobutyric acid axon terminals are selectively altered in schizophrenia. *Proc Natl Acad Sci USA*. 95:5341-5346.
- Yáñez IB, Muñoz A, Contreras J, González J, Rodríguez-Veiga E, DeFelipe J. 2005. Double bouquet cell in the human cerebral cortex and a comparison with other mammals. *J Comp Neurol*. 486:344-360.

3.3. *Phosphorylated I κ B α expression in the normal and epileptic human cerebral cortex.*

Phosphorylated I κ B α expression in the normal and epileptic human cerebral cortex

M.C. Inda^{1,2}, L. Blázquez², D. Sánchez¹, J. DeFelipe² and A. Muñoz²

¹Department of Cell Biology, Universidad Complutense, Madrid, Spain. ²Instituto Cajal, CSIC, Madrid, Spain.

Constitutive activation of nuclear factor- κ B (NF- κ B) in neurons coordinates the expression of genes that are necessary to protect neurons from apoptotic cell death. In rodents, several molecules involved in NF- κ B activation, such as phosphorylated-I κ B α (pI κ B α), are enriched in the axon initial segment (AIS). This unique axonal compartment regulates the generation of axon potentials and, in cortical pyramidal cells, is under the control of GABAergic chandelier cells axon terminals (Ch-terminals). We aimed to explore in the human cerebral cortex whether pI κ B α is expressed in the AISs of pyramidal cells and the possible relationship with alterations of PV-positive Ch-terminals in the epileptic hippocampus. Thus, we examined the sclerotic hippocampus of epileptic patients to analyze whether alterations in the GABAergic innervation of the AIS affect the expression of pI κ B α . We used single and double immunocytochemical techniques, with antibodies against pI κ B α and various markers of the AISs and Ch-terminals, in sections from the lateral neocortex and the hippocampal formation of patients with temporal lobe epilepsy. We show here that pI κ B α expression is enriched in the AIS of normal human neocortical and hippocampal neurons. Moreover, despite the alterations of GABAergic inputs to the AIS from chandelier cells in the sclerotic hippocampal formation of epileptic patients, there was expression of pI κ B α in the AIS of the surviving neurons in the dentate gyrus and CA fields. The expression of pI κ B α in the AIS is probably a general feature of the cerebral cortex that appears to be independent of its synaptic innervation.

Keywords: Axon initial segment, pyramidal cells, chandelier cells, neocortex, hippocampus temporal lobe epilepsy.

Introducción

In the mammalian CNS, constitutive activation of the dimeric transcription factor Nuclear Factor- κ B (NF- κ B), coordinates the gene expression of elements that protect neurons from apoptotic cell death (Kaltschmidt et al., 1995; Barger et al., 1995; Schmidt-Ullrich et al., 1996; Bhakar et al., 2002; Karin and Lin, 2002; reviewed in Kaltschmidt et al., 2005; Meffert and Baltimore, 2005). Activation of NF- κ B requires the phosphorylation of inhibitory I κ B proteins by the I κ B kinase, and the ensuing release of I κ B unmasks the nuclear localization sequence in NF- κ B provoking its translocation to the nucleus (Baeuerle and Baltimore, 1988; Beg and Baldwin, 1993; Huxford et al., 1998; Jacobs and Harrison, 1998). Once in the nucleus, NF- κ B activates NF- κ B-dependent gene expression, while pI κ B α is polyubiquitinated and degraded by the 26S proteasome (DiDonato et al., 1997; Mercurio et al., 1997; Yaron et al., 1998). Recent *in vivo* and *in vitro* studies in the rat (Schultz et al., 2006) have shown that the components of the NF- κ B pathway are compartmentalized in neurons from different brain regions, and that the axon initial segment (AIS) is enriched in several molecules involved in NF- κ B activation, including phosphorylated-I κ B α (pI κ B α), activated I κ B kinase, and phosphorylated p65. In humans, previous immunocytochemical studies have shown neuronal expression of p65 in the normal and epileptic cerebral cortex (Crespel et al., 2002) and in the cerebral cortex from patients with Alzheimer disease (Terai et al., 1996). However, the pattern of expression of markers of NF- κ B activation and its presence in the AISs in the human cerebral cortex remains unexplored.

The AIS of cortical pyramidal neurons is a unique axonal compartment involved in the regulation of cell excitability, the generation of axon potentials and the conversion of synaptic inputs into neuronal output (Stuart and Sakmann, 1994; Colbert and Johnston, 1996). This is mainly thought to be due to the high concentration of voltage-dependent Na⁺ and K⁺ channels that are found specifically in the AIS. The local accumulation of these channels is maintained by the activity of cytoskeletal interacting proteins and adhesion molecules that asymmetrically target them to the AIS and that promote a partial spatial segregation (Inda et al., 2006). Other molecules that regulate pyramidal cell excitability such as 5-HT_{1A}, GABAA and GABAB receptors and KCNQ2/3 channels have also been identified in the AIS (Fritschy et al., 1998; Winckler and Mellman, 1999; Winckler et al., 1999; DeFelipe, et al., 2001; Jenkins and Bennett, 2001; Muñoz et al., 2002; Komada and Soriano, 2002; Ango et al., 2004; Arellano et al., 2004). This compartmentalization of the AIS is important in the context of cortical circuits, particularly those in which chandelier cells participate. These cells are powerful GABAergic interneurons that exclusively establish synapses with the AIS and they are indeed the source of the majority of AIS synapses in principal cells (reviewed in Somogyi et al., 1982; DeFelipe, 1999). Moreover, these cells mostly innervate the distal region of the AIS, a domain that is characterized by a high density of K⁺ channels (DeFelipe et al., 2001; Inda et al., 2006). Chandelier cells are considered to control the generation and back propagation of action potentials, as well as participating in complex activities such as the synchronization of firing patterns of large populations of pyramidal cells in different states of consciousness (see Cobb et al., 1995; Klausberger et al., 2004; Howard et al., 2005; Szabadics et al., 2006).

Although previous studies have indicated that the NF- κ B pathway may link neuronal activity to neuronal cell survival (Bhakar et al., 2002; Meffert et al., 2003; Fridmacher et al., 2003, but see Schultz et al., 2006), the precise mechanisms and physiological functions of constitutive NF- κ B activation in neurons are unclear. Moreover, the significance of the localization of NF- κ B signaling to the AIS remains unknown (Schultz et al., 2006). In the present study, we have analyzed the expression of pI κ B α in the human cerebral cortex. We have used double immunocytochemical staining for pI κ B α and voltage-gated sodium channels or parvalbumin (PV), a marker of chandelier terminals (Ch-terminals; DeFelipe et al., 1989), to examine whether pI κ B α expression is restricted to particular domain of the AIS. We also assessed the relationship between the pI κ B α immunostaining and PV-positive Ch-terminals. A number of profound alterations in chandelier cells arise in the sclerotic hippocampus of epileptic patients. These alterations may include the loss of Ch-terminals, the increase in the complexity of these terminals and changes in the expression of their neurochemical characteristics in different fields of the same hippocampal formation (Arellano et al., 2004; Muñoz et al., 2007). Therefore, in the present study another main

goal was to examine the hippocampus of patients with hippocampal sclerosis to study whether alterations in the GABAergic innervation of the AIS by Ch-terminals affect the expression of pIkBa. The results reveal that expression of pIkBa in the AIS is apparently independent of the innervation of this axonal compartment.

Materials and Methods

The tissue corresponding to the human hippocampal formation and temporal neocortex (Brodmann's areas 20 and 21) was obtained following surgical treatment of 6 patients diagnosed with intractable temporal lobe epilepsy (Neurosurgery Service, Hospital de la Princesa, Madrid, Spain). According to the Helsinki Declaration, the patient's consent was obtained in all cases (British Medical Journal, 302: 1194, 1991) and all the protocols were approved by the Institutional Ethical Committee (Protocols 4/2002 and 14/2002; Hospital de la Princesa, Madrid, Spain). This material has been used in previous studies (Arellano et al., 2004; Arion et al., 2006; Muñoz et al., 2007). Tailored temporal lobectomy plus amygdalohippocampectomy was performed in all cases under electrocorticography guidance. After surgery, the lateral neocortex and mesial structures were subjected to standard neuropathological assessment. All the lateral neocortical biopsies used were electrophysiologically and histologically normal whereas the hippocampal formation displayed hippocampal sclerosis (neuronal loss, granular cell dispersion and mossy fiber proliferation in the dentate gyrus) and a varying degree of neuronal loss and gliosis was observed in the stratum pyramidale of the CA fields. For further information on the material see Arellano et al. (2004) and Muñoz et al. (2007).

Following removal, the tissue samples were immersed in cold 4% paraformaldehyde in 0.1 M phosphate buffer pH 7.4 (PB) for 24 h. Tissue blocks were cryoprotected in 30% sucrose in PB and stored at -20°C in a solution of glycerol, ethylene glycol and PB. Vibratome sections (50-100 μm thick) were immunolabeled using the following antibodies: Rabbit anti Ser32-phosphorylated Ikappa-Balpha (pIkBa, 1:1000, Cell Signalling Technology, Frankfurt, Germany), mouse anti voltage-gated Na^+ channels (1:100; Sigma, Saint Louis, USA), and mouse-anti-PV (1: 4000, Swant, Bellinzona, Switzerland). Sections were immunolabeled by standard immunoperoxidase procedures using the avidin-biotin method with the appropriate secondary biotinylated antibodies diluted 1:200 (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA). Staining was performed with the Vectastain ABC immunoperoxidase kit (Vector) with DAB (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) as the chromogen. Adjacent sections Nissl-stained with thionine or immunostained with the mouse-anti-neuron-specific nuclear protein antibody (NeuN, 1:4000; Chemicon, Temecula, CA, USA) were used to define the cytoarchitectonic borders between different areas and layers. The sections were dehydrated, cleared with xylene, coverslipped, and studied and photographed with a digital Olympus DP70 camera adapted to an Olympus BX51 microscope (Olympus Corporation, Tokyo, Japan).

Other sections were double labeled to visualize both pIkBa and the Na^+ channels, PV or NeuN using specific primary antibodies. The sections were then rinsed and incubated for 2h at room temperature in goat anti-rabbit biotinylated secondary antibodies (Vector). After rising in PB, the sections were incubated for 2h at room temperature in streptavidin coupled to Alexa fluor 488 (1:1000; Molecular Probes, Eugene, OR, USA) and goat anti-mouse antibodies coupled to alexa 594 (1:1000, Molecular Probes). The sections were then washed, mounted in 50% glycerol in PB and examined with a Leica TCS 4D confocal laser scanning microscope. Z-sections were recorded at 0.5-2 μm intervals through separate channels (Scanware, Leica, Cambridge, UK). Subsequently, Micrografix Picture Publisher (Micrografix, Dallas, TX) and Adobe Photoshop (Adobe Systems Inc., San Jose, CA) software was used to construct composite images from each series by combining the images recorded through both channels, and to generate the figures.

Results

The distribution of pIkBa in biopsies from human temporal neocortex and hippocampal formation from epileptic pa-

tients (n=6) was visualized by both light and fluorescence immunocytochemical techniques. All epileptic patients showed the typical histopathological signs of hippocampal sclerosis (Arellano et al., 2004). Accordingly, in these hippocampi the normal-looking areas were referred to as "non-sclerotic regions", whereas the areas showing clear neuronal loss and gliosis in CA1 were referred to as "sclerotic regions". Furthermore, those transitional areas between the sclerotic and non-sclerotic regions were referred to as "border sclerotic regions" (Muñoz et al., 2007).

pIkBa immunoreactivity in the normal human temporal neocortex

The biopsy material included temporal neocortical regions that were considered to be normal since this material did not show histological alterations and the electrocorticographic pattern was normal with no epileptiform activity (Arellano et al., 2004). The pattern of pIkBa immunostaining was characterized by the strong labeling of numerous AISs throughout all layers of the human cerebral cortex, although there was a higher density and intensity of staining in the supragranular when compared to the infragranular layers (arrows in Figs. 1 and 2). The somata and the proximal portions of the dendrites of neurons were also immunostained but the labeling intensity was generally lower than that of the AIS (Fig. 1B). These AIS were identified as thin, short, and smooth processes with a characteristic "eyelash-like" appearance and they extended distally from the soma (DeFelipe et al., 2001). In the temporal neocortex, there were so many AIS labeled for pIkBa (Fig. 1A) that although no quantitative studies have been performed, in pIkBa/NeuN double labeled sections it seemed that the AIS of most neurons in supragranular layers was immunoreactive for pIkBa (not shown). The processes that accumulated pIkBa were identified as AIS in sections double labeled for pIkBa and voltage-gated Na^+ channels (VGSC, Fig.1C-E). In cortical layers II-VI, there is a high density of Na^+ channels distributed along the length of the AIS of pyramidal neurons (Fig. 1D, Inda et al., 2006). In pIkBa/VGSC double-labeling experiments, the majority of AISs that were labeled for pIkBa were also immunoreactive for VGSC (Fig.1C-E). In addition, the AIS of non-pyramidal neurons were also pIkBa-ir (not shown).

The AIS of pyramidal cells were frequently found to be innervated by PV-positive Ch-terminals (Fig.1F-H) that were identified as short, vertical rows of buttons located at a certain distance below the unstained somata of pyramidal cells from which the AIS innervated by the PV-ir Ch-terminals originated (DeFelipe et al., 1989; Del Rio and DeFelipe, 1994; Inda et al., 2006). In sections double-stained for PV and pIkBa (Fig.1F-H), the majority of the pIkBa-ir AISs were innervated by PV-ir Ch-terminals (arrow in Fig.1G) which surrounded the distal region of the AISs (arrow in Fig.1F). Therefore, since pIkBa immunoreactivity was distributed along the length of the AIS from the somata, it was clear that the expression of pIkBa was unrelated to the innervation by PV-ir Ch-terminals, which only innervated a segment of the AIS (Fig.1H).

pIkBa immunoreactivity in the epileptic hippocampus

In patients with hippocampal sclerosis, there was a significant loss of pIkBa-ir AISs in the sclerotic regions of the hilus/CA4 region and of the stratum pyramidale of CA1, consistent with the cell loss observed in adjacent Nissl-stained sections (Fig. 2). However, both in sections from

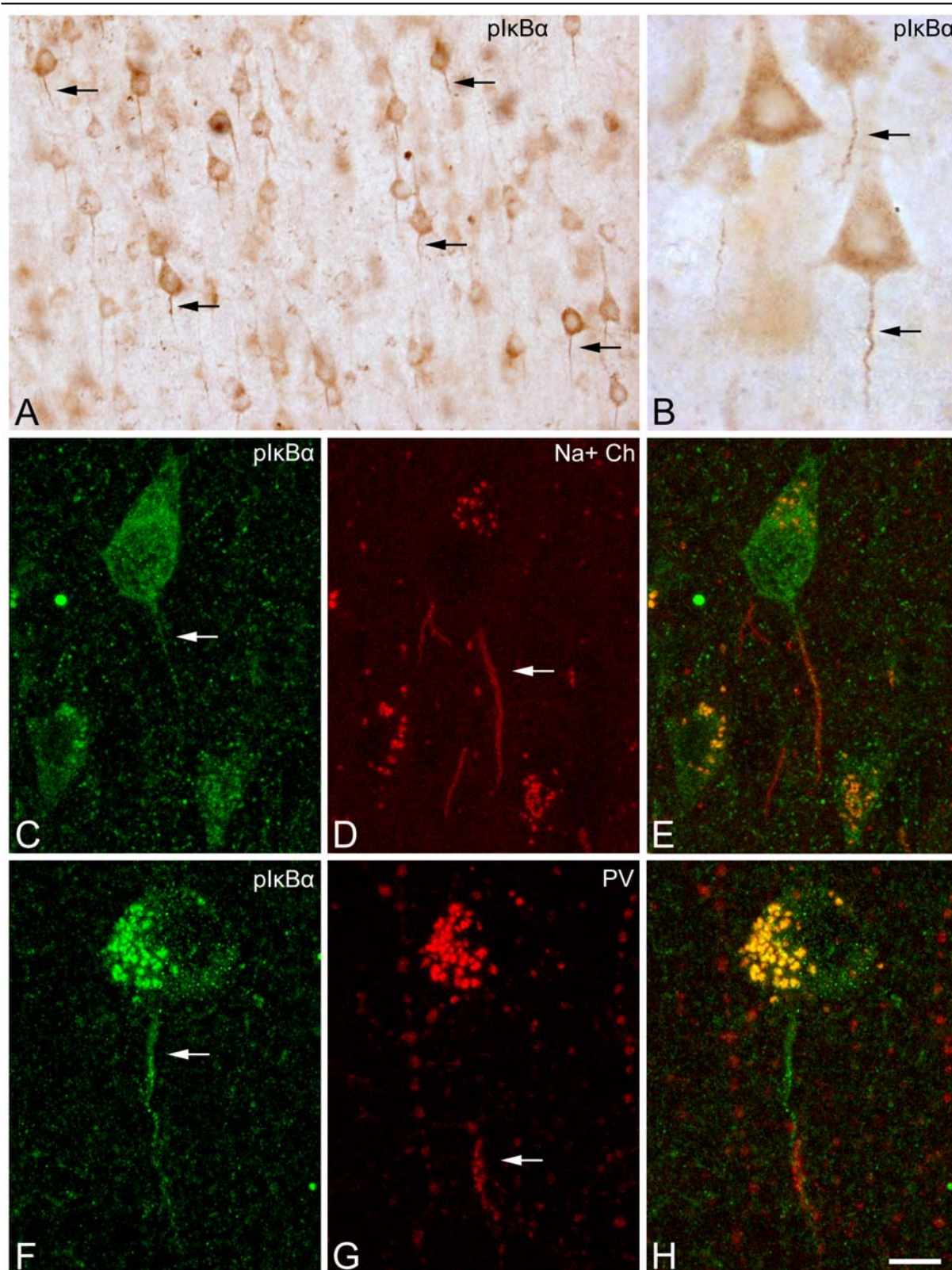


Figure 1: A-B Photomicrographs showing the distribution plkB α in the AIS from neurons in layer III of the human temporal neocortex. Panels C-H Confocal images from the same section and microscopic fields illustrating double labeling for plkB α and VGSC (C-E), or for plkB α and PV (F-H) in the AIS of pyramidal cells from the human temporal neocortex. Panels E and H were obtained by merging the images in C and D, and F and G, respectively. Note the colocalization of plkB α and VGSC (arrows in C and D) in the AIS of pyramidal cells. Note that in F-H, the plkB α is distributed along the length of the AIS, whereas the PV-ir Ch-terminals (arrow in G) only innervate the distal region of the AIS. The images in C-E represent stacks of 10 optical sections obtained at a distance of 1 μ m in the z axis (total: 9 μ m). The images in F-H represent stacks of 5 optical sections obtained at a distance of 1 μ m in the z axis (total: 5 μ m). Scale bar: 35 μ m in A, 8.5 μ m in B and 9.5 μ m in C-H.

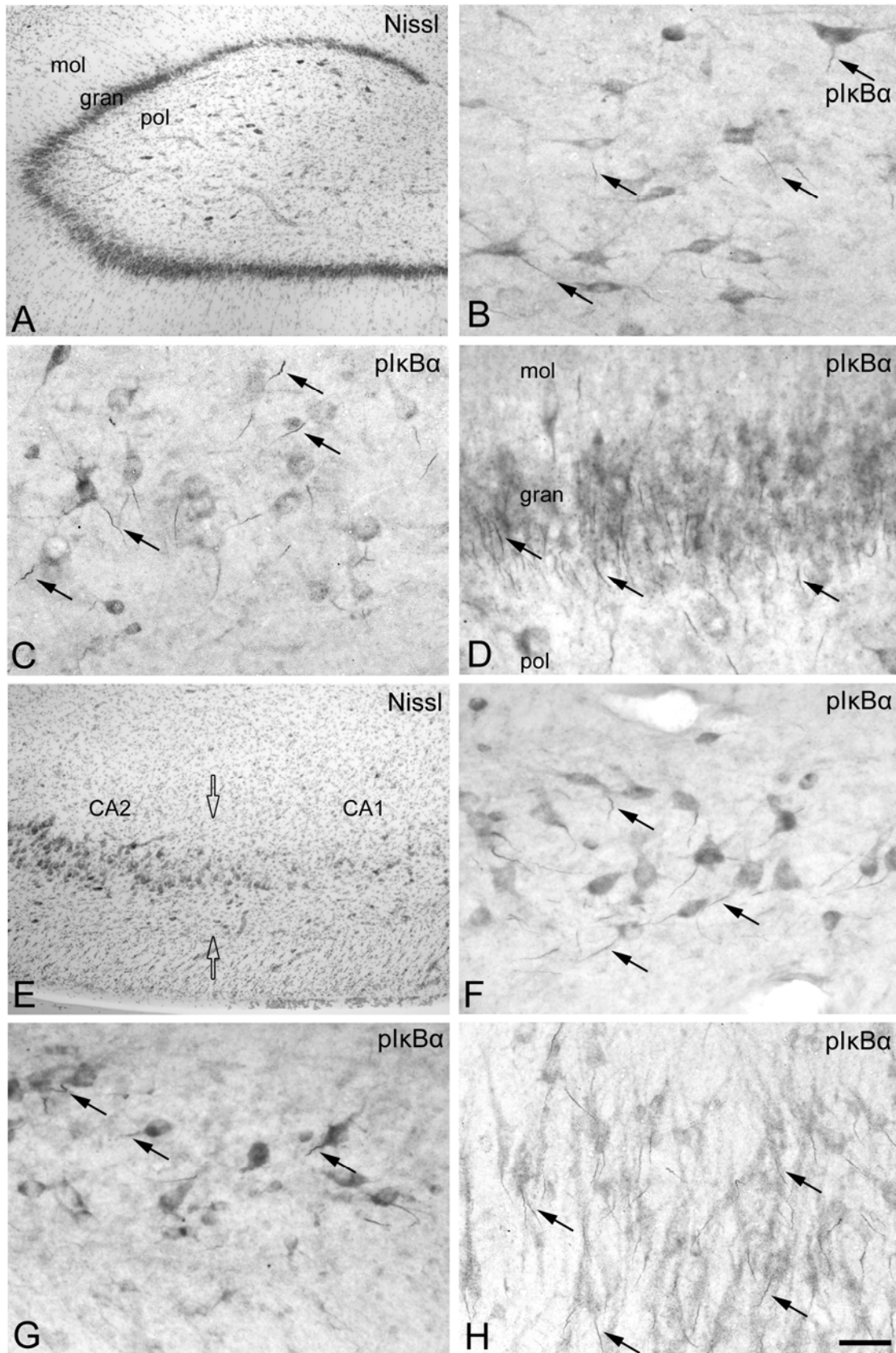


Figure 2: Photomicrographs from Nissl-stained (A, and E) and plkB α immunostained (B, C, D, F-H) sections of the hippocampal formation and subicular regions from a temporal lobe epileptic patient. Panels A and E show zones of neuronal loss in the Hilus/CA4 region (A) and in the CA1 sclerotic region (E). The arrows in E indicate the limits between the sclerotic CA1 region and the less-severely affected CA2 field. The arrows in B, C, D, F and G show immunostaining for plkB α in the AIS of granular neurons (D), and in the surviving neurons in the polymorphic layer of the dentate gyrus (B), in the stratum pyramidale of the CA4 (C) and CA2 fields (F), and in the sclerotic zone of CA1 (G). Panel H shows plkB α immunostaining in the AIS of pyramidal neurons in layer III of the subiculum. Scale bar: 260 μ m in A and E; 50 μ m in B, C, F, G and H and 26 μ m in C, and D.

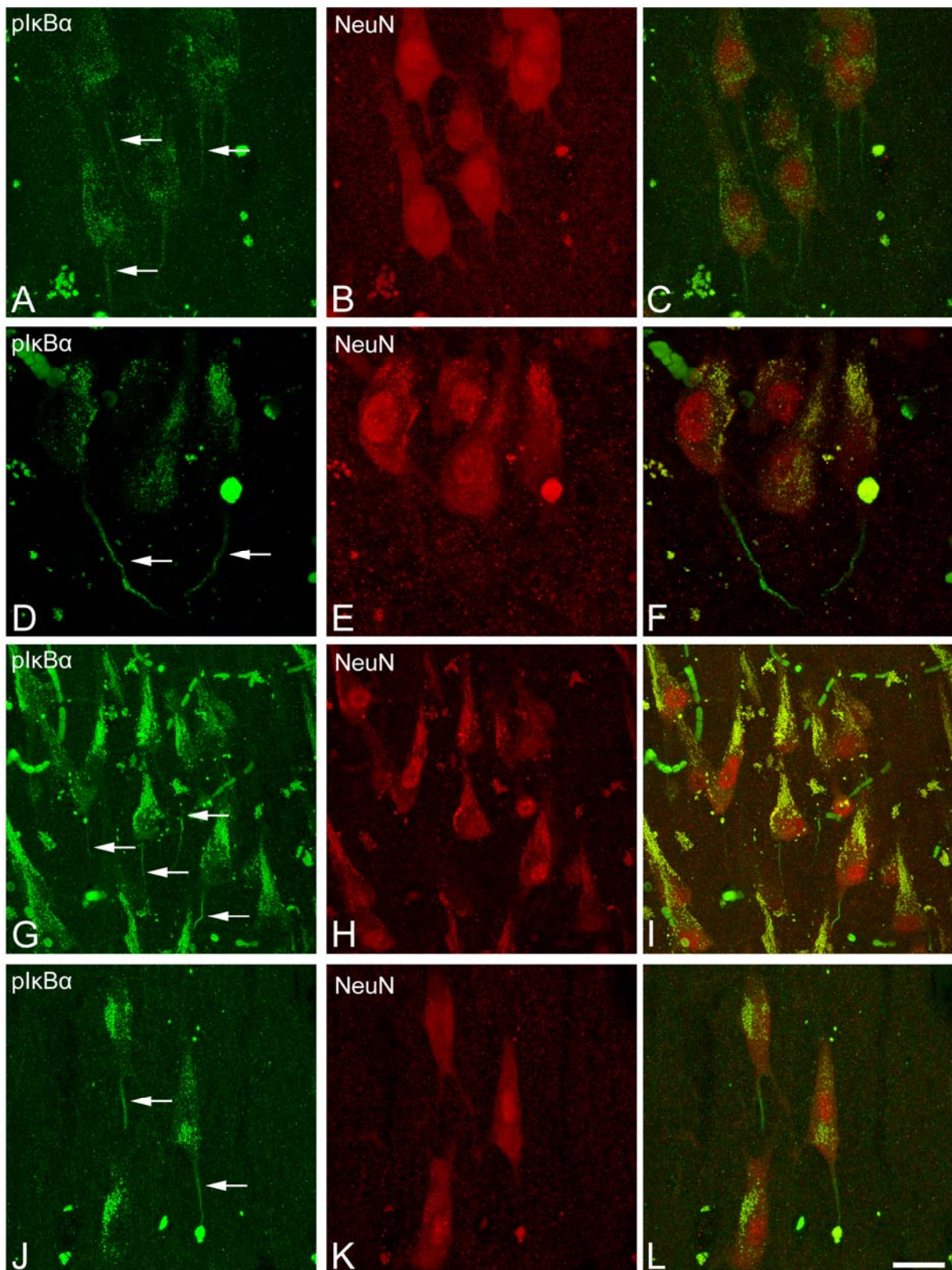


Figure 3: Confocal images from the same section and field showing plkB α immunostaining of the AIS (green) in NeuN immunostained (red) surviving neurons in the sclerotic (D-F) and non-sclerotic (A-C: adjacent to CA2; G-I: adjacent to the subiculum) CA1 regions of the hippocampus and subiculum (J-L) from an epileptic patient with hippocampal sclerosis. The images in C, F, I and L were obtained after combining images A and B, D and E, G and H, and J and K respectively. Note that in all regions the AIS of most neurons were immunoreactive for plkB α . Panels A-C represent stacks of 14 optical sections obtained at steps of 1 μ m in the z axis (total 13 μ m). Panels D-F represent stacks of 18 optical sections obtained at steps of 1 μ m in the x axis (total 17 μ m). Panels G-I represent stacks of 21 optical sections obtained at steps of 1 μ m in the z axis (total 20 μ m). Images J-L represent stacks of 14 optical sections obtained at steps of 0,5 μ m in the z axis (total 6,5 μ m) Scale bar: 22 μ m in A-C, 15 μ m in D-F, 31 μ m in G-I and 22 μ m in J-L.

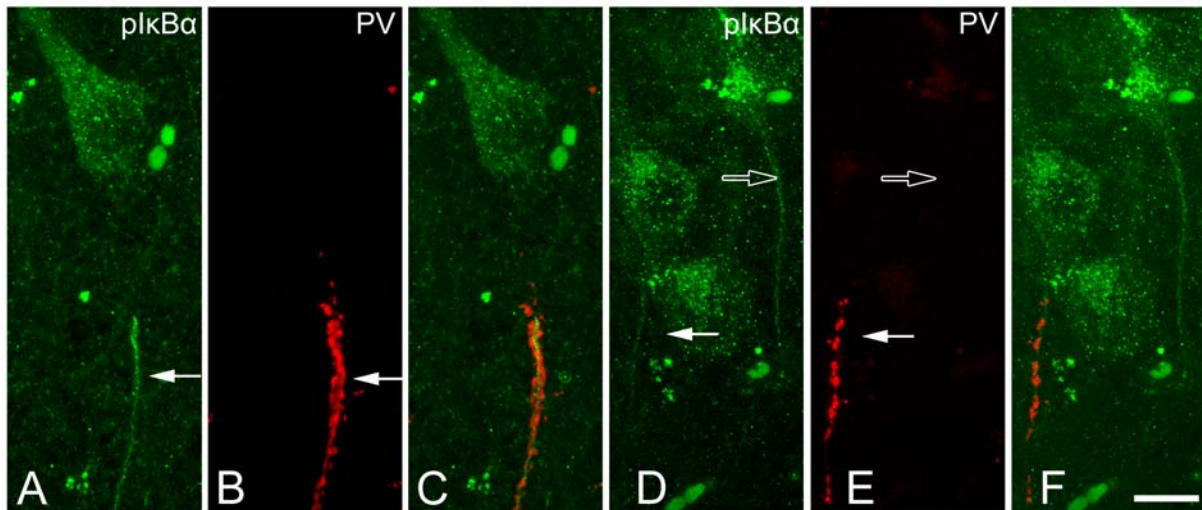


Figure 4: Confocal images from the same section and field showing the relationship between pIkBa immunostaining in the AIS (green) and the PV-ir GABAergic innervation (red) in the sclerotic CA1 and border regions of the hippocampus from an epileptic patient with hippocampal sclerosis. Panels C and F were obtained by combining images A and B, and D and E, respectively. Note that the AIS of the surviving pyramidal neurons innervated by either normally looking (arrow in E) or hypertrophic (arrow in B) Ch-terminals or neurons devoid of GABAergic innervation on the AIS (hollow arrow in E and F) are immunoreactive for pIkBa (arrows in A and D). Images A-C represent stacks of 9 optical sections obtained at steps of 1 μm in the z axis (total 8 μm). Images D-F represent stacks of 13 optical sections obtained at steps of 1 μm in the z axis (total 12 μm). Scale bar: 12 μm in D-F and 15 μm in G-I.

the epileptic hippocampus labeled for pIkBa alone (Fig. 2) or in those double stained for pIkBa and Neu-N (Fig. 3), the AIS of many surviving neurons were immunoreactive for pIkBa in the granular and polymorphic layers of the dentate gyrus (Fig. 2B, D), as well as in the stratum pyramidale of the CA4 (Fig. 2C) CA3, CA2 (Fig. 2F), or the sclerotic (Figs. 2G; 3D-F) and non-sclerotic (Fig. 3 A-C, G-I) regions of CA1. Furthermore, the AIS of numerous neurons in all layers of the apparently normal subiculum were pIkBa-ir (Figs. 2H, 3J-I).

Consistent with previous studies that used biopsy material obtained from epileptic patients with hippocampal sclerosis (Arellano et al., 2004; Muñoz et al., 2007), we found prominent alterations of inhibitory circuits in the subiculum/CA1 border region and in the sclerotic CA1 region. These alterations were characterized by the presence of PV-ir basket formations or Ch-terminals that were significantly denser and more complex than those seen in normal regions. Alternatively, neurons lacking PV-ir terminals around the soma and the AIS were present (Fig. 4). Double-labeling experiments were performed to determine whether those neurons lacking PV-positive innervation or those that were hyperinnervated by PV-ir Ch-terminals expressed pIkBa. In PV/pIkBa-ir double-labeled sections, the surviving neurons in the sclerotic CA1 and border regions expressed pIkBa regardless of the extent of PV-ir innervation to the AIS (Fig. 4).

Discussion

The main findings of this study are: 1) In the human neocortex and hippocampus pIkBa is present in the AIS of both pyramidal and non-pyramidal neurons; 2) the expression of pIkBa is independent of the innervation of this axonal compartment; and 3) the expression of pIkBa is apparently not affected in surviving neurons within the epileptogenic hippocampal formation of patients with temporal lobe epilepsy.

The presence of pIkBa in the AIS of neurons in the human cerebral cortex is in accordance with the results from a previous study where pIkBa and other elements of the NF-

κB pathway, such as activated IKK α/β and phosphorylated Ser536-p65, were found in the AIS of neurons in different regions of the rodent brain. These observations suggest that pIkBa expression at the AIS is a general feature of the cerebral cortex, maintaining NF- κB active in neurons (Schultz et al., 2006). However, the lower density of pIkBa-ir AIS in the infragranular layers and the weaker intensity of immunostaining than in the supragranular layers in neurons of the human neocortex (present results) contrasts with the widespread distribution of pIkBa-ir AIS in the rodent brain (Schultz et al., 2006, our own observations). Nevertheless, this could be related to the differential fixation of superficial versus deep cortical layers in the biopsy samples fixed by immersion.

In layer III pyramidal cells of the human temporal neocortex, VGSC are distributed throughout the length of the AIS. These channels are thought to form heteromultimeric complexes with βIV -spectrin and ankyrin-G (Inda et al., 2006), which probably also include the adhesion molecules neurofascin and NrCAM of the L1 family as seen in the rodent AIS (Jenkins and Bennet, 2001; Davis et al., 1993, 1996; Lambert et al., 1997; Zhou et al., 1998; Tait et al., 2000). In contrast, Kv1.2 K⁺ channels and the associated adhesion protein Caspr2 accumulate at the distal aspect of the AIS (Inda et al., 2006). Since N-CAM mediated adhesion at the membrane increases NF κB binding to DNA and NF κB regulated gene transcription in cerebellar granule cells (Krushel et al., 1999; Crossin and Krushel, 2000), pIkBa accumulation at the AIS might be related to the presence of adhesion molecules at the AIS. However, since pIkBa is associated with fasciculated microtubules rather than with the membrane in the AIS of rodent neurons (Schultz et al., 2006), it seems unlikely that pIkBa interacts with the VGSC/ βIV -spectrin/ankyrin-G complex in human cortical cells. In contrast, the kinase that phosphorylates I $\kappa\text{B}\alpha$, colocalizes with pIkBa and βIV -spectrin in the rat AIS, and it is associated with the membrane (Schultz et al., 2006). Although the distribution of this kinase in human pyramidal cells remains unknown, pIkBa is distributed throughout the entire AIS while the Kv1.2/Caspr2 complex is restricted to the distal AIS (Inda et al., 2006). Thus, the restriction of

I κ B kinase with the AIS membrane and the consequent phosphorylation-induced activation of NF- κ B signaling might be related to the VGSC/neurofascin/NrCAM/ β IV-spectrin/ankyrin-G complex rather the Kv1.2/Caspr2 complex. The clustering and retention of VGSC (Garrido et al., 2003) and of KCNQ2 and KCNQ3 K⁺ channels (Pan et al., 2006) at the nodes of Ranvier and in the AIS is dependent on the presence of a highly conserved short motif that mediates interactions with ankyrin-G. Whether a similar motif is present at the IKK should be evaluated in conjunction with immunoprecipitation and pull-down experiments to clarify the mechanisms that govern the accumulation of IKK/pI κ B α at the AIS.

In the human temporal neocortex, the innervation of the AIS of pyramidal neurons by Ch-terminals is thought to participate in restricting the distribution of Kv1.2 K⁺ channels to the distal AIS (Inda et al., 2006). The expression of pI κ B α throughout the extent of the AIS in human pyramidal cells (present study) indicates that pI κ B α accumulation at the AIS is independent of GABAergic inputs. The *in vitro* and *in vivo* clustering of pI κ B α in immature hippocampal neurons prior to synaptogenesis is further evidence that the accumulation of pI κ B α in the AIS is independent of the presence of presynaptic elements (Schultz et al., 2006; unpublished observations). The accumulation of pI κ B α in the AIS of some surviving neurons in the sclerotic and border regions of CA1 of tissue from epileptic patients, with abnormally dense Ch-terminals innervation, or with no PV-ir terminals around the AIS, (see Arellano et al., 2004) further supports this hypothesis.

Previous studies indicated that the NF- κ B pathway may link neuronal activity to neuronal cell survival (Bhakar et al., 2002; Meffert et al., 2003; Fridmacher et al., 2003). Here we show that as in non-sclerotic zones, the AIS of numerous neurons in the sclerotic and border zones express pI κ B α , areas that are probably involved in the generation of epileptiform activity (Cohen et al., 2002, 2003). Thus, the presence of neurons with a labeled AIS in regions with dramatic neuronal loss in the sclerotic regions of the epileptic hippocampus suggests that the presence of pI κ B α is not related to the vulnerability of neurons to damage. However, we do not know whether the cells that disappeared in these sclerotic regions were those that previously displayed alterations in the expression of pI κ B α in the AISs. Furthermore, the present results indicate that I κ B kinase-mediated phosphorylation of I κ B α , pI κ B α accumulation, and NF- κ B activation in the AIS is not associated with epileptiform activity. This is in accordance with studies in cultured rodent hippocampal neurons demonstrating that the clustering of pI κ B α and I κ B kinase activation persisted despite the TTX-mediated suppression of action potentials for up to 24 h (Schultz et al., 2006). In this regard it is important to point out that the AIS is not only an essential neuronal compartment for the generation and back propagation of action potentials (Stuart and Sakmann, 1994; Colbert and Johnston, 1996), and in the establishment of a diffusion barrier that supports appropriate sorting of axonal membrane proteins (Winckler et al., 1999), but it also controls anterograde and retrograde transport mechanisms between the soma and more distal regions of the axon. The interactions between these processes, pI κ B α accumulation and NF- κ B activation in the AIS await further clarification.

Acknowledgements: We thank Dr. RG Sola and his team (Neurosurgery Service, Hospital de la Princesa, Madrid, Spain) for providing the tissue from epileptic patients and for their contributions. We also thank R.F. Senso for techni-

cal assistance. This work was supported by the Ministerio de Educación y Cultura grants BFU2006-03855 to A.M. and BFU2006-13395 to J. de F. We confirm that we have read the Journal's position on issues involved in ethical publication and affirm that this report is consistent with those guidelines

Reference

- Ango F, di Cristo G, Higashiyama H, Bennett V, Wu P, Huang ZJ. (2004) Ankyrin-based subcellular gradient of neurofascin, an immunoglobulin family protein, directs GABAergic innervation at purkinje axon initial segment. *Cell* 119:257-272.
- Arellano JI, Munoz A, Ballesteros-Yanez I, Sola RG, DeFelipe J. (2004) Histopathology and reorganization of chandelier cells in the human epileptic sclerotic hippocampus. *Brain* 127:45-64.
- Arion D, Sabatini M, Unger T, Pastor J, onso-Nanclares L, Ballesteros-Yanez I, Garcia SR, Munoz A, Mirmics K, DeFelipe J. (2006) Correlation of transcriptome profile with electrical activity in temporal lobe epilepsy. *Neurobiol Dis* 22:374-387.
- Arroyo EJ, Scherer SS. (2000) On the molecular architecture of myelinated fibers. *Histochem Cell Biol* 113:1-18.
- Bauerle PA, Lenardo M, Pierce JW, Baltimore D. (1988) Phorbol-ester-induced activation of the NF-kappa B transcription factor involves dissociation of an apparently cytoplasmic NF-kappa B/inhibitor complex. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 53 Pt 2:789-798.
- Barger SW, Horster D, Furukawa K, Goodman Y, Kriegstein J, Mattson MP. (1995) Tumor necrosis factors alpha and beta protect neurons against amyloid beta-peptide toxicity: evidence for involvement of a kappa B-binding factor and attenuation of peroxide and Ca²⁺ accumulation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:9328-9332.
- Beg AA, Baldwin AS, Jr. (1993) The I kappa B proteins: multifunctional regulators of Rel/NF-kappa B transcription factors. *Genes Dev* 7:2064-2070.
- Bhakar AL, Tannis LL, Zeindler C, Russo MP, Jobin C, Park DS, MacPherson S, Barker PA. (2002) Constitutive nuclear factor-kappa B activity is required for central neuron survival. *J Neurosci* 22:8466-8475.
- Bhakar AL, Tannis LL, Zeindler C, Russo MP, Jobin C, Park DS, MacPherson S, Barker PA. (2002) Constitutive nuclear factor-kappa B activity is required for central neuron survival. *J Neurosci* 22:8466-8475.
- Cobb SR, Buhl EH, Halasy K, Paulsen O, Somogyi P. (1995) Synchronization of neuronal activity in hippocampus by individual GABAergic interneurons. *Nature* 378:75-78.
- Cohen I, Navarro V, Clemenceau S, Baulac M, Miles R. (2002) On the origin of interictal activity in human temporal lobe epilepsy *in vitro*. *Science* 298:1418-1421.
- Cohen I, Navarro V, Le Duigou C, Miles R. (2003) Mesial temporal lobe epilepsy: a pathological replay of developmental mechanisms? *Biol Cell* 95:329-333.
- Colbert CM, Johnston D. (1996) Axonal action-potential initiation and Na⁺ channel densities in the soma and axon initial segment of subicular pyramidal neurons. *J Neurosci* 16:6676-6686.
- Crespel A, Coubes P, Rousset MC, Brana C, Rougier A, Rondouin G, Bockaert J, Baldy-Moulinier M, Lerner-Natoli M. (2002) Inflammatory reactions in human medial temporal lobe epilepsy with hippocampal sclerosis. *Brain Res* 952:159-169.
- Crossin KL, Krushel LA. (2000) Cellular signaling by neu-

- ral cell adhesion molecules of the immunoglobulin superfamily. *Dev Dyn* 218:260-279.
- Davis JQ, Bennett V. (1993) Ankyrin-binding activity of nervous system cell adhesion molecules expressed in adult brain. *J Cell Sci Suppl* 17:109-117.
- Davis JQ, Lambert S, Bennett V. (1996) Molecular composition of the node of Ranvier: identification of ankyrin-binding cell adhesion molecules neurofascin (mucin+/third FNIII domain-) and NrCAM at nodal axon segments. *J Cell Biol* 135:1355-1367.
- Davis JQ, McLaughlin T, Bennett V. (1993) Ankyrin-binding proteins related to nervous system cell adhesion molecules: candidates to provide transmembrane and intercellular connections in adult brain. *J Cell Biol* 121:121-133.
- DeFelipe J. (1999) Chandelier cells and epilepsy. *Brain* 122 (Pt 10):1807-1822.
- 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* 433:148-155.
- DeFelipe J, Hendry SH, Jones EG. (1989) Visualization of chandelier cell axons by parvalbumin immunoreactivity in monkey cerebral cortex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86:2093-2097.
- Deisz RA. (2002) Cellular mechanisms of pharmacoresistance in slices from epilepsy surgery. *Novartis Found Symp* 243:186-199.
- Del Rio MR, DeFelipe J. (1994) A study of SMI 32-stained pyramidal cells, parvalbumin-immunoreactive chandelier cells, and presumptive thalamocortical axons in the human temporal neocortex. *J Comp Neurol* 342:389-408.
- DiDonato JA, Hayakawa M, Rothwarf DM, Zandi E, Karin M. (1997) A cytokine-responsive IkappaB kinase that activates the transcription factor NF-kappaB. *Nature* 388:548-554.
- Dzhala VI, Talos DM, Sdrulla DA, Brumback AC, Mathews GC, Benke TA, Delpire E, Jensen FE, Staley KJ. (2005) NKCC1 transporter facilitates seizures in the developing brain. *Nat Med* 11:1205-1213.
- Fridmacher V, Kaltschmidt B, Goudeau B, Ndiaye D, Rossi FM, Pfeiffer J, Kaltschmidt C, Israel A, Memet S. (2003) Forebrain-specific neuronal inhibition of nuclear factor-kappaB activity leads to loss of neuroprotection. *J Neurosci* 23:9403-9408.
- Fritschy JM, Weinmann O, Wenzel A, Benke D. (1998) Synapse-specific localization of NMDA and GABA(A) receptor subunits revealed by antigen-retrieval immunohistochemistry. *J Comp Neurol* 390:194-210.
- Fukuda A. (2005) Diuretic soothes seizures in newborns. *Nat Med* 11:1153-1154.
- Garrido JJ, Giraud P, Carlier E, Fernandes F, Moussif A, Fache MP, Debanne D, Dargent B. (2003) A targeting motif involved in sodium channel clustering at the axonal initial segment. *Science* 300:2091-2094.
- Howard A, Tamas G, Soltesz I. (2005) Lighting the chandelier: new vistas for axo-axonic cells. *Trends Neurosci* 28:310-316.
- Huxford T, Huang DB, Malek S, Ghosh G. (1998) The crystal structure of the IkappaBalpha/NF-kappaB complex reveals mechanisms of NF-kappaB inactivation. *Cell* 95:759-770.
- Inda MC, DeFelipe J, Munoz A. (2006) Voltage-gated ion channels in the axon initial segment of human cortical pyramidal cells and their relationship with chandelier cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:2920-2925.
- Jacobs MD, Harrison SC. (1998) Structure of an IkappaBalpha/NF-kappaB complex. *Cell* 95:749-758.
- Jenkins SM, Bennett V. (2001) Ankyrin-G coordinates assembly of the spectrin-based membrane skeleton, voltage-gated sodium channels, and L1 CAMs at Purkinje neuron initial segments. *J Cell Biol* 155:739-746.
- Jenkins SM, Bennett V. (2002) Developing nodes of Ranvier are defined by ankyrin-G clustering and are independent of paranodal axoglial adhesion. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:2303-2308.
- Kaltschmidt B, Widera D, Kaltschmidt C. (2005) Signaling via NF-kappaB in the nervous system. *Biochim Biophys Acta* 1745:287-299.
- Kaltschmidt C, Kaltschmidt B, Baeuerle PA. (1995) Stimulation of ionotropic glutamate receptors activates transcription factor NF-kappa B in primary neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:9618-9622.
- Kaltschmidt C, Kaltschmidt B, Henkel T, Stockinger H, Baeuerle PA. (1995) Selective recognition of the activated form of transcription factor NF-kappa B by a monoclonal antibody. *Biol Chem Hoppe Seyler* 376:9-16.
- Karin M, Lin A. (2002) NF-kappaB at the crossroads of life and death. *Nat Immunol* 3:221-227.
- Klausberger T, Marton LF, Baude A, Roberts JD, Magill PJ, Somogyi P. (2004) Spike timing of dendrite-targeting bistratified cells during hippocampal network oscillations in vivo. *Nat Neurosci* 7:41-47.
- Komada M, Soriano P. (2002) [Beta]IV-spectrin regulates sodium channel clustering through ankyrin-G at axon initial segments and nodes of Ranvier. *J Cell Biol* 156:337-348.
- Krushel LA, Cunningham BA, Edelman GM, Crossin KL. (1999) NF-kappaB activity is induced by neural cell adhesion molecule binding to neurons and astrocytes. *J Biol Chem* 274:2432-2439.
- Lambert S, Davis JQ, Bennett V. (1997) Morphogenesis of the node of Ranvier: co-clusters of ankyrin and ankyrin-binding integral proteins define early developmental intermediates. *J Neurosci* 17:7025-7036.
- Lerner-Natoli M, Montpied P, Rousset MC, Bockaert J, Rondouin G. (2000) Sequential expression of surface antigens and transcription factor NFkappaB by hippocampal cells in excitotoxicity and experimental epilepsy. *Epilepsy Res* 41:141-154.
- Meffert MK, Baltimore D. (2005) Physiological functions for brain NF-kappaB. *Trends Neurosci* 28:37-43.
- Meffert MK, Chang JM, Wiltgen BJ, Fanselow MS, Baltimore D. (2003) NF-kappa B functions in synaptic signaling and behavior. *Nat Neurosci* 6:1072-1078.
- Mercurio F, Zhu H, Murray BW, Shevchenko A, Bennett BL, Li J, Young DB, Barbosa M, Mann M, Manning A, Rao A. (1997) IKK-1 and IKK-2: cytokine-activated IkappaB kinases essential for NF-kappaB activation. *Science* 278:860-866.
- Munoz A, Arellano JI, DeFelipe J. (2002) GABABR1 receptor protein expression in human mesial temporal cortex: changes in temporal lobe epilepsy. *J Comp Neurol* 449:166-179.
- Munoz A, Munoz A, DeFelipe J, Alvarez-Leefmans FJ. (2006) Cation-chloride cotransporters and GABAergic innervation in the human epileptic hippocampus. *Epilepsia* In press.
- Pan Z, Kao T, Horvath Z, Lemos J, Sul JY, Cranston SD, Bennett V, Scherer SS, Cooper EC. (2006) A common ankyrin-G-based mechanism retains KCNQ and NaV channels at electrically active domains of the axon. *J Neurosci* 26:2599-2613.

- Peles E, Salzer JL. (2000) Molecular domains of myelinated axons. *Curr Opin Neurobiol* 10:558-565.
- Salzer JL. (2003) Polarized domains of myelinated axons. *Neuron* 40:297-318.
- Scherer SS. (1999) Nodes, paranodes, and incisures: from form to function. *Ann N Y Acad Sci* 883:131-142.
- Scherer SS, Arroyo EJ. (2002) Recent progress on the molecular organization of myelinated axons. *J Peripher Nerv Syst* 7:1-12.
- Schmidt-Ullrich R, Memet S, Lilienbaum A, Feuillard J, Raphael M, Israel A. (1996) NF-kappaB activity in transgenic mice: developmental regulation and tissue specificity. *Development* 122:2117-2128.
- Schultz C, König HG, Del Turco D, Politi C, Eckert GP, Ghebremedhin E, Prehn JH, Kogel D, Deller T. (2006) Coincident enrichment of phosphorylated I kappa-Balpha, activated IKK, and phosphorylated p65 in the axon initial segment of neurons. *Mol Cell Neurosci* 33:68-80.
- Somogyi P, Freund TF, Cowey A. (1982) The axo-axonic interneuron in the cerebral cortex of the rat, cat and monkey. *Neuroscience* 7:2577-2607.
- Stuart G, Spruston N, Sakmann B, Hausser M. (1997) Action potential initiation and backpropagation in neurons of the mammalian CNS. *Trends Neurosci* 20:125-131.
- Stuart GJ, Sakmann B. (1994) Active propagation of somatic action potentials into neocortical pyramidal cell dendrites. *Nature* 367:69-72.
- Tait S, Gunn-Moore F, Collinson JM, Huang J, Lubetzki C, Pedraza L, Sherman DL, Colman DR, Brophy PJ. (2000) An oligodendrocyte cell adhesion molecule at the site of assembly of the paranodal axo-glial junction. *J Cell Biol* 150:657-666.
- Terai K, Matsuo A, McGeer PL. (1996) Enhancement of immunoreactivity for NF-kappa B in the hippocampal formation and cerebral cortex of Alzheimer's disease. *Brain Res* 735:159-168.
- Winckler B, Forscher P, Mellman I. (1999) A diffusion barrier maintains distribution of membrane proteins in polarized neurons. *Nature* 397:698-701.
- Winckler B, Mellman I. (1999) Neuronal polarity: controlling the sorting and diffusion of membrane components. *Neuron* 23:637-640.
- Yaron A, Hatzubai A, Davis M, Lavon I, Amit S, Manning AM, Andersen JS, Mann M, Mercurio F, Ben Neriah Y. (1998) Identification of the receptor component of the I kappa-Balpha-ubiquitin ligase. *Nature* 396:590-594.
- Zhou D, Lambert S, Malen PL, Carpenter S, Boland LM, Bennett V. (1998) AnkyrinG is required for clustering of voltage-gated Na channels at axon initial segments and for normal action potential firing. *J Cell Biol* 143:1295-1304.

3.4. *Voltage-gated ion channels in the axon initial segment of human cortical pyramidal cells and their relationship with chandelier cells.*
PNAS (2006), 103: 2920-2925.

Voltage-gated ion channels in the axon initial segment of human cortical pyramidal cells and their relationship with chandelier cells

Maria Carmen Inda^{*,†}, Javier DeFelipe^{††}, and Alberto Muñoz^{*,†}

^{*}Departamento de Biología Celular, Universidad Complutense de Madrid, Jose Antonio Novais 2, 28040 Madrid, Spain; and [†]Instituto Cajal, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Avenida Doctor Arce 37, 28002 Madrid, Spain

Communicated by Edward G. Jones, University of California, Davis, CA, December 28, 2005 (received for review November 24, 2005)

The axon initial segment (AIS) of pyramidal cells is a critical region for the generation of action potentials and for the control of pyramidal cell activity. Here we show that Na⁺ and K⁺ voltage-gated channels, together with other molecules involved in the localization of ion channels, are distributed asymmetrically in the AIS of pyramidal cells situated in the human temporal neocortex. There is a high density of Na⁺ channels distributed along the length of the AIS together with the associated proteins spectrin β IV and ankyrin G. In contrast, Kv1.2 channels are associated with the adhesion molecule Caspr2, and they are mostly localized to the distal region of the AIS. In general, the distal region of the AIS is targeted by the GABAergic axon terminals of chandelier cells, whereas the proximal region is innervated, mostly by other types of GABAergic interneurons. We suggest that this molecular segregation and the consequent regional specialization of the GABAergic input to the AIS of pyramidal cells may have important functional implications for the control of pyramidal cell activity.

inhibition | interneurons | neocortex

To understand how synaptic input is converted into neuronal output, it is first essential to fully comprehend the organization of the sites where the action potential is generated. Because of the high concentration of voltage-dependent Na⁺ and K⁺ channels in the axon initial segment (AIS), it has commonly been assumed that this region is the site with the lowest threshold, and, as such, it must be the first site at which the action potential is generated. However, some studies have suggested that action potentials initiate beyond the AIS (1, 2). Indeed, it has been shown recently that action potentials in cortical layer V pyramidal cells (3) and Purkinje cells of the cerebellum (4) are first generated at the first node of Ranvier. Under these circumstances, voltage-dependent Na⁺ channels in the AIS would serve to back-propagate action potentials into the soma and dendrites. Differences in the action potential threshold between the AIS and the nodes of Ranvier might depend on axial resistivity, the diameter, length, and the density of voltage-dependent Na⁺ channels (5). Furthermore, the different biophysical properties of ion channels in the AIS and nodes of Ranvier might reflect the differences in the distribution of voltage-dependent Na⁺ and K⁺ channels or in the molecular isoforms expressed in these structures. Such variations might determine the threshold for the initiation of the action potential at each site.

Chandelier cells are a particular type of GABAergic interneuron whose axon terminals [chandelier cell axon terminals (Ch-terminals)] specifically contact the AIS of cortical pyramidal cells. Alterations in the connectivity of chandelier cells have been associated with syndromes such as epilepsy (6) and schizophrenia (7), and it has traditionally been presumed that chandelier cells are key elements that control the output of pyramidal cells (1, 8–10). However, if action potentials are initiated in the first node of Ranvier, they would be propagated in a retrograde manner to the AIS, where they can be reproduced and back-

propagated to the soma and dendrites. In this case, GABAergic synapses established by chandelier cells would not only control the output of pyramidal cells but also influence the back-propagation of action potentials, modulating the integration of information in the soma and dendrites. In fact, recent studies have shown that rather than simply shunting action potentials in pyramidal cells, chandelier cells participate in complex activities such as the synchronization of the firing patterns of large populations of hippocampal pyramidal cells in different states of consciousness (11, 12).

Voltage-dependent Na⁺ and K⁺ channels are spatially segregated and symmetrically distributed at the nodes of Ranvier. Both in the central and peripheral nervous system, they are restricted to specific isolated membrane domains, the nodal and juxtaparanodal regions, respectively, which are separated by the paranodal region (13, 14). Their restricted and defined distribution is maintained by the expression of key molecules involved in defining the localization of ion channels. These molecules include proteins that interact with the cytoskeleton, such as the spectrin β IV and ankyrin G, and adhesion molecules such as Neurofascin, NrCAM, Caspr, and Caspr2. The presence of some of these molecules has also been reported in the AIS of cerebellar Purkinje cells and of cortical cells in the rat, together with other molecules that regulate pyramidal cell excitability such as 5-HT_{1A} and GABA_B receptors in humans and KCNQ2/3 channels in rats (15–20). However, the precise distribution of voltage-dependent Na⁺ and K⁺ channels and related molecules in the pyramidal cell AIS and their spatial relationship with the GABAergic Ch-terminals has not yet been explored.

In the present study, we have examined the relationship between Ch-terminals and the regional distribution of both voltage-dependent Na⁺ and K⁺ channels and associated proteins such as spectrin β IV, ankyrin G, and Caspr2 in the AIS of pyramidal cells in the human temporal neocortex. The results indicate that these molecules are distributed asymmetrically in the AIS, displaying a partial spatial segregation. Furthermore, we found that chandelier cells mostly innervated the distal region of the AIS, a domain that is characterized by a high density of K⁺ channels.

Results

Voltage-Gated Na⁺ Channels (VGSC). When we analyzed the distribution of VGSC in layers II–VI of the neocortex, numerous strongly labeled VGSC-immunoreactive (ir) AISs were observed (Figs. 1 and 2*A*), but no somata or dendrites were labeled. Indeed, they were so numerous that although we did not attempt

Conflict of interest statement: No conflicts declared.

Freely available online through the PNAS open access option.

Abbreviations: AIS, axon initial segment; Ch-terminals: chandelier cell axon terminals; ir, immunoreactive; VGSC, voltage-gated Na⁺ channels.

[†]To whom correspondence should be addressed. E-mail: defelipe@cajal.csic.es.

© 2006 by The National Academy of Sciences of the USA

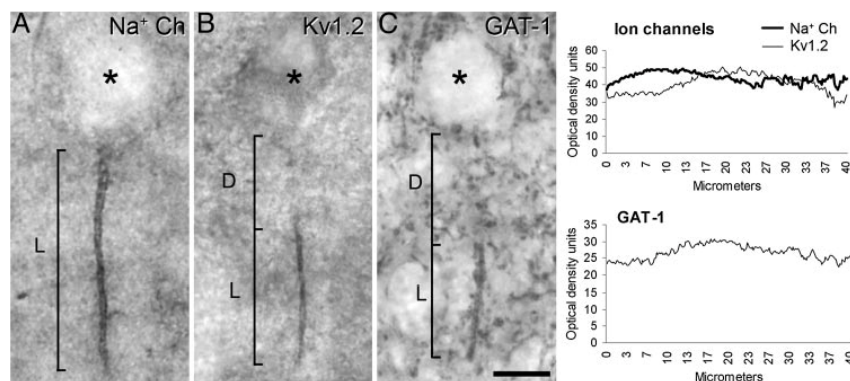


Fig. 1. Distribution of Na⁺ and K⁺ voltage channels in the AIS of pyramidal cells and their relationship with Ch-terminals. (A and B) Photomicrographs showing the AIS of pyramidal cells from the human temporal neocortex immunostained for VGSC (A) and Kv1.2 (B). (C) Photomicrograph showing a GAT-1-ir Ch-terminal. In A and B, L indicates how the length of the VGSC- and Kv1.2-ir AIS was measured, respectively. In C, L indicates the length of the GAT-1-ir Ch-terminal. D indicates the distance from the base of the pyramidal cell body to the beginning of the AIS labeled for Kv1.2 (B) or to the GAT-1-ir Ch-terminal (C). The asterisks indicate the location of pyramidal cell bodies. (Scale bar: 10 μ m.) (C Right) The plots shown are presented as a function of the mean distance from the cell body based on optical density readings of the immunostaining for Na⁺ and Kv1.2 channels along the AIS (Upper) or for GAT-1 Ch-terminals (Lower). Note that immunostaining for the VGSC is present along the whole length of the AIS, whereas for Kv1.2, the staining is restricted to the distal region of the AIS that is contacted by GAT-1-ir Ch-terminals (See Fig. 3 D–F).

to perform a quantitative study, it appeared that the AISs of all neurons were VGSC-positive. The labeled AISs extended distally for ≈ 11 – 40μ m (mean length \pm SD: $23.12 \pm 7.05 \mu$ m; $n = 180$ in layer III) from their somata of origin.

Spectrin β IV. Whereas spectrin β IV immunoreactivity was weak in the soma of pyramidal cells, the AISs of these cells were intensely labeled (Fig. 2 B and E). The spectrin β IV immunostaining in the AIS extended distally from the somata of origin for ≈ 11 – 47μ m (mean length \pm SD: 25.6 ± 6.8 ; $n = 212$ in layer III). In double-labeling experiments, nearly all AISs in layer III that were labeled for VGSC (136 of 138; 98.5%) were also immunoreactive for spectrin β IV (Fig. 2 A–C).

Ankyrin G. Ankyrin G immunocytochemistry labeled the AIS of relatively few cells, although numerous dendritic processes were labeled, as were the somata of a sparse population of pyramidal neurons distributed through layers II–VI (Fig. 2 D). Only the AISs in 23 of 163 spectrin β IV-ir cells (14%) were immunostained for ankyrin-G (Fig. 2 D–F). Thus, ankyrin G immunocytochemistry labels the AIS of a subpopulation of pyramidal cells that coexpress VGSC and spectrin β IV.

GAT-1 Labeling of Ch-Terminals. GAT-1-ir Ch-terminals (Figs. 1, 2H, and 3E) ranged in length from 10 to 39 μ m in layer III (mean length \pm SD: $22.2 \pm 5.5 \mu$ m; $n = 210$), and they were usually located ≈ 8 – 19μ m (mean distance \pm SD: $13.4 \pm 2.8 \mu$ m; $n = 22$) below the unstained somata of the pyramidal cells from which the AIS innervated by the GAT-1-ir Ch-terminals originated. In sections double-labeled for GAT-1 and VGSC, the GAT-1-ir Ch-terminals surrounded most VGSC-ir pyramidal cell axons (Fig. 2 G–I). Moreover, it was clear that there was a regional specialization of the AIS because VGSC immunoreactivity was distributed along the length of the AIS from the somata, whereas the majority of GAT-1-ir Ch-terminals only innervated the distal region of the VGSC-ir AIS (Fig. 2 G–I).

Kv1.2. Kv1.2 immunocytochemistry revealed the presence of numerous labeled AISs in all cortical layers (Figs. 1 and 3 A and D). In layer III, these Kv1.2-ir AISs ranged in length from 7 to 27 μ m (mean length \pm SD: $14.82 \pm 4.54 \mu$ m; $n = 116$). However, Kv1.2 immunostaining did not extend along the

whole length of the AIS; rather it was confined to the more distal region (Fig. 3 A–D).

Caspr2. Caspr2 immunocytochemistry also labeled numerous AISs ranging in length from 11 to 26 μ m (mean length \pm SD: $15.85 \pm 3.12 \mu$ m; $n = 79$ in layer III) with a similar pattern to that observed for Kv1.2. Indeed, in sections labeled for both Kv1.2 and Caspr2, the immunostaining for Caspr2 was specific to the distal AIS in perfect register with the distribution of Kv1.2 (Fig. 3 A–C). Of the AISs that were labeled by antibodies against Kv1.2, 92% were also labeled for Caspr2. Indeed, labeling for Caspr2 failed to coincide with that for Kv1.2 in only 8 of 99 AISs labeled for Kv1.2. Furthermore, in sections double-labeled for Kv1.2 and GAT-1, Kv1.2 channels were restricted to the distal region of the AIS in register with the region that is innervated by GAT-1-ir Ch-terminals (Fig. 3 D–F). It should be noted that VGSC and Caspr2 also colocalized in the AIS of the majority of pyramidal cells in double-labeled sections. Only 3 of 102 VGSC-ir AISs were not labeled by antibodies against Caspr2. Therefore, both VGSC and Kv1.2 overlapped in the distal AIS, whereas the proximal AISs were characterized by the presence of VGSC and the absence of Kv1.2 (Figs. 2 and 3) and Ch-terminals.

Discussion

The basis for the generation and saltatory propagation of action potentials is the exquisite molecular architecture of nerve fibers, notably in the segregation of voltage-gated ion channels into distinct membrane domains (13, 21–24). This segregation is achieved through specific sorting mechanisms coupled to the anchoring and clustering of these proteins in the plasma membrane. The ion channels that underlie excitability are compartmentalized into sharply defined subcellular regions and form heteromultimeric complexes that also contain intracellular scaffolding, adapter, and cytoskeleton proteins, transmembrane proteins, and extracellular matrix elements (see below). The similarities in the membranes of the AIS and the nodes of Ranvier (25, 26) extend to the presence of an electron-dense membrane undercoat that is necessary to cluster the voltage-gated ion channels (27). However, whereas the molecular architecture of the nodes of Ranvier has been extensively studied in the rat CNS and peripheral nervous system, much less is known

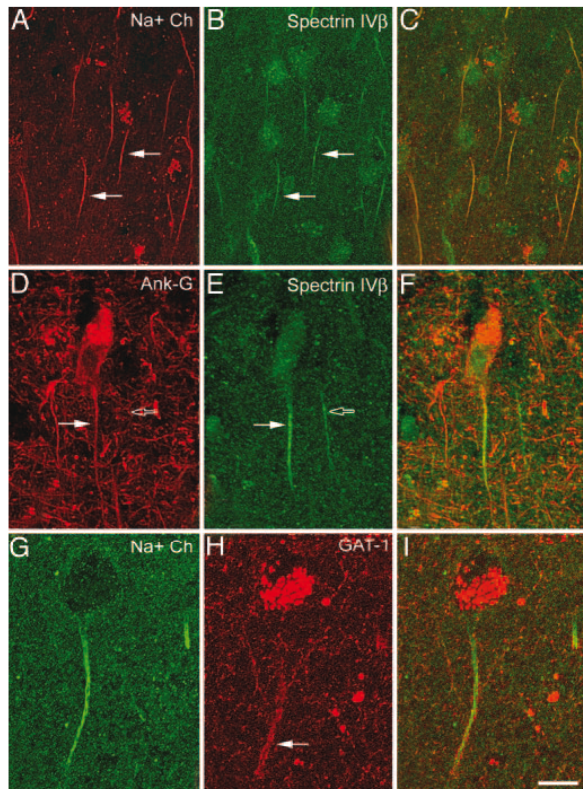


Fig. 2. Confocal images from the same section and microscopic field illustrating double labeling for VGSC (Na⁺ Ch) and spectrin β IV (A–C), ankyrin G and spectrin β IV (D–F), and VGSC and GAT-1 (G–I) in the AIS of pyramidal cells from the human temporal neocortex. C, F, and I were obtained after combining images A and B, D and E, and G and H, respectively. Note the colocalization of VGSC and spectrin β IV (filled arrows in A and B) and of ankyrin G and spectrin β IV (filled arrows in D and E) in the AIS of pyramidal cells. Open arrows in D and E point to the AIS of a pyramidal cell immunoreactive for spectrin β IV, which does not colocalize ankyrin G. Note in G–I that the VGSC are distributed along the length of the AIS from the somata, whereas the GAT-1-ir Ch-terminals (filled arrow in H) innervate only the distal region of the AIS. Images A–C represent stacks of 15 optical sections obtained at a distance of 1.5 μ m in the z axis (total: 22 μ m). Images D–F represent stacks of seven optical sections obtained at a distance of 1.4 μ m in the z axis (total: 9 μ m). Images G–I represent stacks of six optical sections obtained at a distance of 1.3 μ m in the z axis (total: 7 μ m). (Scale bar: A–C, 25 μ m; D–I, 15 μ m.)

about the AIS. We present a morphological description of the distribution of voltage-dependent Na⁺ and K⁺ channels in the AIS of human pyramidal cells. The results indicate that some features observed in the AIS are common to the nodes of Ranvier, particularly regarding the molecules with which ion channels may associate. However, the results also indicate fundamental differences in ion channel distribution between the AIS and the nodes of Ranvier.

VGSC. VGSC are responsible for the rapid inward sodium currents and the consequent depolarization required for the induction of the action potential and saltatory conduction (28, 29). The anti-pan-sodium channel antibody used in the present study recognizes all of the known vertebrate Na⁺ channel isoforms (30), and, therefore, it is thought to reflect the complete repertoire of VGSC in the AIS, where they are distributed along its whole length. At the nodal region of the nodes of Ranvier,

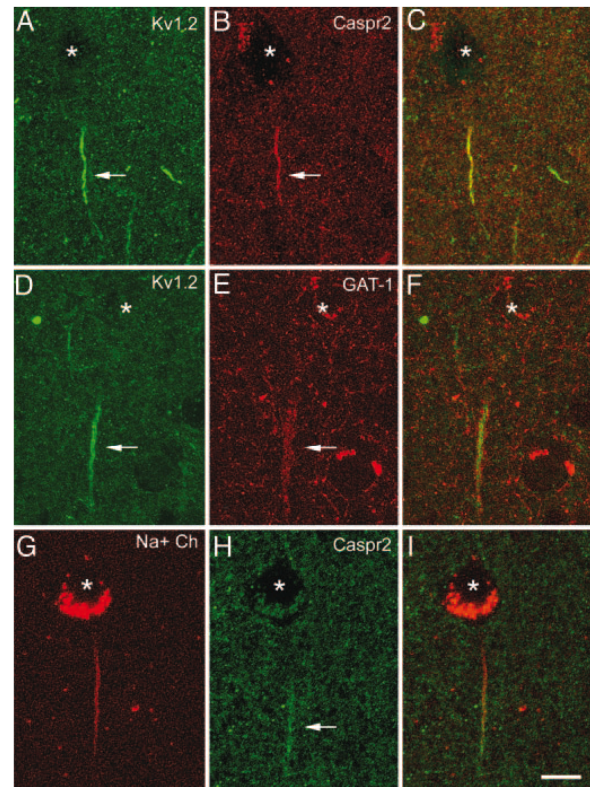


Fig. 3. Confocal images from the same section and microscopic field illustrating double labeling for Kv1.2 and Caspr2 (A–C), Kv1.2 and GAT-1 (D–F), and VGSC and Caspr2 (G–I) in the human temporal neocortex. The asterisks indicate the location of the pyramidal cell bodies. C, F, and I were obtained after combining the images A and B, D and E, and G and H, respectively. Note that Kv1.2 immunostaining is confined to the distal region of the AIS where Caspr2 is also expressed (filled arrows in A and B). This distal AIS specifically receives GABAergic innervation from the GAT-1-ir Ch-terminals (filled arrows in D and E). VGSC and Kv1.2 partially overlap at the distal AIS (filled arrow in F), whereas the proximal AIS is characterized by the presence of VGSC and the absence of Kv1.2 (D–I). Images A–C represent stacks of nine optical sections obtained at a distance of 1.1 μ m in the z axis (total: 9 μ m). Images D–F and G–I represent stacks of four optical sections obtained at a distance of 1.1 μ m in the z axis (total: 3 μ m). (Scale bar: 11 μ m.)

VGSC are clustered at a high density. In these structures, they are associated with the underlying actin-spectrin cytoskeleton through the adaptor protein ankyrin G and to NrCAM and neurofascin 186, nodal cell adhesion molecules of the Ig superfamily (13, 14). The same molecular interactions seem to occur in the AIS in different neuronal populations of the rat CNS, where NrCAM and neurofascin 186 have been shown to be concentrated (18, 31–35). In addition, spectrin β IV has been seen to concentrate at the AISs of both neocortical and hippocampal cells, where it might be involved in the localization of VGSC and ankyrin G (19, 36, 37). In keeping with these studies, the AISs of human neocortical pyramidal cells express VGSC and spectrin β IV, which colocalize along the length of the AIS in virtually all pyramidal cells. However, we observed little colocalization with ankyrin G. The antibody used in the present study to recognize ankyrin G identifies a single protein of between 200 and 300 kDa that might correspond to only one of the established nodal isoforms (270 kDa). Hence, it may not recognize the 480-kDa (33, 34, 38) or the 97-kDa (39, 40)

isoforms previously identified as nodal components in the CNS. Therefore, because the 270-kDa isoform of ankyrin G seems to be present in only $\approx 15\%$ of the human neocortical pyramidal cells (this study), different ankyrin G polypeptides or other anchoring proteins might participate in the clustering of VGSC in the AIS of specific pyramidal cell populations.

Voltage-Dependent K⁺ Channels. Voltage-dependent K⁺ channels of the Kv1 subfamily of *Shaker*-type delayed-rectifying K⁺ channels are present at the nodes of Ranvier where they are found in the juxtaparanodal axonal membrane beneath the overlying compact myelin (41–44). Kv1 channels generate low-threshold voltage-dependent outward currents that seem to regulate the action potential threshold. They contribute to the repolarization of single-action potentials, they modulate action potential duration and frequency, and they maintain the inter-nodal resting potential (29, 34, 45, 46). Juxtaparanodal Kv channels are composed of various heteromultimeric combinations of pore-forming Kv1 α (Kv 1.1, 1.2, 1.4, and 1.6) and the associated cytoplasmic Kv β 2 subunits (42, 44, 47, 48). In the juxtaparanodal region, Kv1.1 and Kv1.2 have been shown to colocalize with, and to interact and/or cluster with, Caspr2, a member of the neuixin superfamily (49, 50). Indeed Caspr2 also interacts with other proteins necessary for the accumulation of Kv channels at the juxtaparanodal region and for their interaction with the actin-spectrin cytoskeleton (14, 51–56). The present results show that in human neocortical pyramidal cells, Kv1.2 channels are clustered at and colocalize with the adhesion molecule Caspr2 exclusively in the distal domain of the AIS. This region of the AIS is innervated by Ch-terminals, and it is therefore devoid of myelin. In contrast, Kv1.2 is located beneath the compact myelin sheath at the juxtaparanodes. Whether Caspr2 or other adhesion molecules that might be present at the distal region of the AIS specifically interact with the adhesion molecules of Ch-terminals is a possibility that should be further evaluated.

Differential Distribution of Voltage-Dependent Na⁺ and K⁺ Channels at the AIS and the Node of Ranvier. At the nodes of Ranvier, VGSC and Kv1.2 are symmetrically distributed and spatially segregated. Indeed, VGSC and Kv1.2 are confined to the nodal and juxtaparanodal regions, respectively, separated by the paranodal region (14, 24). The present results show that in contrast to the nodes of Ranvier, voltage-dependent Na⁺ and K⁺ channels are only partially segregated in the AIS and that there is a certain degree of overlap in the distal portion of the AIS. Whether this difference might be relevant to define the physiological attributes of action potentials generated in the AIS when compared to those in the nodes of Ranvier should be further studied.

The spatial distribution of ion channels is another relevant molecular difference between the nodes of Ranvier and the AIS. At the nodes of Ranvier, ion channels are symmetrically distributed, and VGSC in the nodal region are flanked by K⁺ channels expressed in the juxtaparanodal regions. In contrast, in the AIS, the Kv1.2 channels are exclusively found in the distal domain where VGSC are expressed. It is important to note that over the first 3 weeks of postnatal development in the rat peripheral nervous system, Kv1 channel clustering is often asymmetrical (50%), and channels may be found exclusively in the distal juxtaparanode (46). However, this asymmetrical distribution is transient, lasting only until the end of the third postnatal week, and it may lead to instabilities in the propagation of the action potential (46). Thus, it is of interest to determine what the functional consequences of the asymmetrical distribution of voltage-gated Na⁺ and K⁺ channels are in the AIS of human neocortical cells. This distribution may be particularly relevant to the generation of the action potential and for the directionality of action potential transmission.

Modulation of Action Potential Firing at the AIS by Chandelier Cells.

In different neuronal types, including Purkinje cells of the cerebellum (4) and pyramidal cells of the subiculum (1) and neocortex (3), it has been shown that action potentials are first generated beyond the AIS. Indeed, this event occurs at the first node of Ranvier, which shows a lower threshold for the initiation of the action potential. Action potentials generated at distal axonal locations then invade the soma and dendrites, a process that depends on the presence of VGSC at the AIS that serve to back-propagate action potentials into the soma and dendrites (1–5). Inhibition of the AIS by GABAergic inputs from chandelier cells or through other neurotransmitters would dissociate the soma from the site of action potential initiation. As a result, it would not only be suited for orthodromic inhibition that would simply suppress the initiation of the action potential but also for antidromic inhibition. This latter type of inhibition might have important consequences in controlling the back-propagation of action potentials, influencing the level of neuronal output to the soma and the dendritic tree that is necessary for the integration of information (57). In fact, recent studies indicate that chandelier cells, together with other interneurons, are involved in complex activities. These actions contribute to ensuring well timed hyperpolarization that regulates the firing of pyramidal cells and shapes the network output and the rhythms generated in different states of consciousness (11, 12, 58–61).

The present study shows that Ch-terminals innervate the distal region of the AIS where voltage-gated K⁺ channels are located. On the other hand, the proximal region of the AIS shows a high density of VGSC, which seem to be less accessible to the inhibitory influence of Ch-terminals. This proximal region is likely to be innervated by other types of interneurons that occasionally form synapses with the AIS (62, 63). The precise point at which the action potential is initiated in human cortical cells is not yet known. Nevertheless, it seems that inhibition by the selective innervation of the distal AIS by Ch-terminals in human pyramidal cells might be directionally selective (60), being more effective from either the soma to the axon or vice versa. This directional selectivity, and the consequent pattern of action potential firing and back-propagation in pyramidal cells, might vary depending on the regulation of K⁺ conductances at the AIS by different neurotransmitter systems such as the serotonergic and cholinergic ascending systems (17, 39, 40, 64). These regulatory systems, together with chandelier cells and other types of GABAergic interneurons, might modify the physiological requirements for the generation of action potentials and, possibly, the location at which the action potential is initiated in human pyramidal cells. This regulation may occur through their direct action on the AIS, an intriguing possibility that has to be evaluated in further studies.

Materials and Methods

Human neocortical tissue from the anterolateral temporal cortex was obtained by surgical resection from one male and four female patients diagnosed with intractable temporal lobe epilepsy with a mesial origin (age range = 21–54 years). All patients were evaluated presurgically by scalp electroencephalography (EEG), interictal single-photon emission computer tomography, magnetic resonance imaging (MRI) 1.5 T, and videoelectroencephalography that included the use of 19 scalp electrodes placed according to the international 10–20 system and foramen-ovale electrodes. Informed consent was obtained individually for all patients, having been previously approved by ethical committee of the “Hospital de la Princesa” (Madrid). During surgery, electrocorticography was performed with a grid of 4 \times 5 electrodes embedded in Sylastic. The electrodes were placed directly over the exposed lateral temporal cortex, and they were of 1.2 mm in diameter with a 1 cm center-to-center interelectrode distance (Add-Tech, Racine, WI). Recordings were sam-

pled at 400 Hz with a bandwidth of 1–70 Hz and over a minimum period of 20 min, by using a 32-channel Easy EEG II system (Cadwell, Kennewick, WA). Spiking areas were identified as electrodes showing spikes (<80 ms) or sharp waves (80–200 ms) with a mean frequency >1 spike/min. Nonspiking areas were defined as electrodes where no spikes, sharp waves, or slow activity was observed. Photographs of the placement of the electrodes were taken before grid removal, and the anatomical location of the spiking and nonspiking areas was defined before tissue excision.

In all cases, tailored temporal lobectomy and amygdalohypocampectomy was performed under electrocorticography guidance. After surgery, the lateral neocortex and mesial structures were subjected to standard neuropathological assessment. All of the lateral neocortical biopsies were histologically normal, whereas the hippocampal formation displayed neuronal loss and gliosis (hippocampal sclerosis). In the present study, only normal nonspiking areas of the lateral neocortex were used. Biopsy samples were fixed in cold 4% paraformaldehyde in 0.1 M phosphate buffer at pH 7.4 (PB) for 4–5 h at 4°C. Vibratome sections (100 μ m thick) were immunolabeled by using the following antibodies: mouse anti-Na⁺ channels (1:100; Sigma), mouse anti-K⁺ channel Kv1.2 (1:50; Upstate Biotechnology, Lake Placid, NY), mouse anti-ankyrin G (1:150; Zymed), chicken anti-spectrin β IV (1:100, gift from M. Komada, Tokyo Institute of Technology, Yokohama, Japan; see ref. 19), rabbit anti-GAT-1 (1:500; Chemicon), and rabbit anti-Caspr2 (1:250; United States Biological).

The mouse anti-Na⁺ channel antibody used was raised against a synthetic peptide derived from the intracellular III-IV loop of Na⁺ channel, which is identical in all known vertebrate Na⁺ channels. Mouse Kv1.2 antibodies were generated against a fusion protein corresponding to amino acids 428–499 of rat heart Kv1.2, and they recognize the Shaker-related α -subunit Kv1.2 in different species, including humans. Chicken anti- β IV spectrin antibodies were raised against the variable region (amino acids 2,171–2,345 of β IV e1-spectrin) expressed in *Escherichia coli* as a glutathione S-transferase fusion protein (19). Mouse anti-ankyrin G antibodies were raised against a synthetic peptide derived from the spectrin-binding domain of the human ankyrin G protein. These antibodies identify a single protein of between 200 and 300 kDa on Western blots, react with all splice forms of ankyrin G containing a spectrin-binding domain, and do not cross-react with related ankyrin isoforms. Rabbit anti-Caspr2 was raised against a C-terminus peptide corresponding to intracellular amino acid residues 1,315–1,331 of human Caspr2. Rabbit anti-GAT-1 was generated against a C-terminus peptide (amino acids 588–599) of the rat GAT-1.

Sections were single-labeled or double-labeled by using the following combinations of primary antibodies: Na⁺ channels

with spectrin β IV, ankyrin G, Caspr2, and GAT-1 or Kv1.2 with Caspr2 and GAT-1. The sections were then rinsed and incubated for 2 h at room temperature in biotinylated secondary antibodies directed against one of the primary antibodies used in each combination (rabbit anti-chicken, goat anti-rabbit, horse anti-mouse, or rabbit anti-goat as appropriate). After rinsing in PB, the sections were incubated for 2 h at room temperature in streptavidin coupled to Alexa Fluor 488 (1:1,000; Molecular Probes) and goat anti-mouse or goat anti-rabbit coupled to Alexa 594 (1:1,000, Molecular Probes) directed against the other primary antibody used. The sections were then washed, mounted in 50% glycerol in PB, and examined with a Leica (Cambridge, U.K.) TCS 4D confocal laser scanning microscope. Z sections were recorded at 1–2 μ m intervals through separate channels (Scanware; Leica). Subsequently, Micrografx PICTURE PUBLISHER (Dallas) and PHOTOSHOP (Adobe Systems, San Jose, CA) software were used to construct composite images from each series by combining the images recorded through both channels and to generate the figures.

Identification and Quantitative Analysis of the AIS and Ch-Terminals.

The AIS was readily identified as a short, thin, and smooth process with a characteristic “eyelash-like” appearance (Fig. 1*A* and *B*). In contrast, GAT-1-ir Ch-terminals were identified as short, vertical rows of buttons (65) that could be clearly distinguished from other labeled elements (Fig. 1*C*). The length of the labeled AIS and the Ch-terminals was measured on microphotographs at a final magnification of $\times 1,000$ (Fig. 1). The somata from which the Na⁺ channel-ir AIS originated were identified because the labeled AIS arose directly from the base of the unlabeled somata (Fig. 1*A*). The cells that gave origin to a Kv1.2-ir AIS were considered to be those unlabeled somata located just above the labeled AIS and in the same plane (Fig. 1*B*). Similarly, the somata of pyramidal cells whose AISs were innervated by GAT-1-ir Ch-terminals were considered to be those located immediately above the labeled Ch-terminal (Fig. 1*C*).

Fluorescence microscopy was used to measure the intensity of staining for the different markers along the AIS. The intensity of immunostaining for Na⁺ and Kv1.2 channels along the AIS ($n = 26$ and 15, respectively) and for GAT-1-ir Ch-terminals ($n = 18$) was quantified by densitometry by using a 3- to 4- μ m-width rectangular sampling tool (IMAGEJ software; Sun Microsystems, Santa Clara, CA), extending from the base of soma to the distal portion of the labeled AIS or Ch-terminal. The means were plotted as a function of the distance from the cell body (Fig. 1).

We thank Dr. Komada for providing the spectrin β IV antibody. This work was supported by “Ministerio de Educación y Ciencia” Grants BFI 2003-01018 (to A.M.) and BFI 2003-02745 (to J.D.).

- Colbert, C. M. & Johnston, D. (1996) *J. Neurosci.* **16**, 6676–6686.
- Stuart, G., Schiller, J. & Sakmann, B. (1997) *J. Physiol. (London)* **505**, 617–632.
- Colbert, C. M. & Pan, E. (2002) *Nat. Neurosci.* **5**, 533–538.
- Clark, B. A., Monsivais, P., Branco, T., London, M. & Hausser, M. (2005) *Nat. Neurosci.* **8**, 137–139.
- Mainen, Z. F., Joerges, J., Huguenard, J. R. & Sejnowski, T. J. (1995) *Neuron* **15**, 1427–1439.
- DeFelipe, J. (1999) *Brain* **122**, 1807–1822.
- Lewis, D. A., Hashimoto, T. & Volk, D. W. (2005) *Nat. Rev. Neurosci.* **6**, 312–324.
- Stuart, G. J. & Sakmann, B. (1994) *Nature* **367**, 69–72.
- Buhl, E. H., Han, Z. S., Lorinczi, Z., Stezhka, V. V., Kamup, S. V. & Somogyi, P. (1994) *J. Neurophysiol.* **71**, 1289–1307.
- Miles, R., Toth, K., Gulyas, A. I., Hajos, N. & Freund, T. F. (1996) *Neuron* **16**, 815–823.
- Cobb, S. R., Buhl, E. H., Halasy, K., Paulsen, O. & Somogyi, P. (1995) *Nature* **378**, 75–78.
- Klausberger, T., Marton, L. F., Baude, A., Roberts, J. D., Magill, P. J. & Somogyi, P. (2004) *Nat. Neurosci.* **7**, 41–47.
- Arroyo, E. J. & Scherer, S. S. (2000) *Histochem. Cell Biol.* **113**, 1–18.
- Poliak, S. & Peles, E. (2003) *Nat. Rev. Neurosci.* **4**, 968–980.
- Winckler, B. & Mellman, I. (1999) *Neuron* **23**, 637–640.
- Winckler, B., Forscher, P. & Mellman, I. (1999) *Nature* **397**, 698–701.
- DeFelipe, J., Arellano, J. I., Gomez, A., Azmitia, E. C. & Munoz, A. (2001) *J. Comp. Neurol.* **433**, 148–155.
- Jenkins, S. M. & Bennett, V. (2001) *J. Cell Biol.* **155**, 739–746.
- Komada, M. & Soriano, P. (2002) *J. Cell Biol.* **156**, 337–348.
- Ango, F., di Cristo, G., Higashiyama, H., Bennett, V., Wu, P. & Huang, Z. J. (2004) *Cell* **119**, 257–272.
- Scherer, S. S. (1999) *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **883**, 131–142.
- Peles, E. & Salzer, J. L. (2000) *Curr. Opin. Neurobiol.* **10**, 558–565.
- Scherer, S. S. & Arroyo, E. J. (2002) *J. Peripher. Nerv. Syst.* **7**, 1–12.
- Salzer, J. L. (2003) *Neuron* **40**, 297–318.
- Palay, S. L., Sotelo, C., Peters, A. & Orkand, P. M. (1968) *J. Cell Biol.* **38**, 193–201.
- Peters, A., Proskauer, C. C. & Kaiserman-Abramof, I. R. (1968) *J. Cell Biol.* **39**, 604–619.
- Matsumoto, E. & Rosenbluth, J. (1985) *J. Neurocytol.* **14**, 731–747.

28. Catterall, W. A. (2000) *Neuron* **26**, 13–25.
29. Hille, B. (2001) *Ion Channels of Excitable Membranes* (Sinauer Associates, Sunderland, MA).
30. Rasband, M. N., Peles, E., Trimmer, J. S., Levinson, S. R., Lux, S. E. & Shrager, P. (1999) *J. Neurosci.* **19**, 7516–7528.
31. Davis, J. Q., McLaughlin, T. & Bennett, V. (1993) *J. Cell Biol.* **121**, 121–133.
32. Davis, J. Q., Lambert, S. & Bennett, V. (1996) *J. Cell Biol.* **135**, 1355–1367.
33. Lambert, S., Davis, J. Q. & Bennett, V. (1997) *J. Neurosci.* **17**, 7025–7036.
34. Zhou, D., Lambert, S., Malen, P. L., Carpenter, S., Boland, L. M. & Bennett, V. (1998) *J. Cell Biol.* **143**, 1295–1304.
35. Tait, S., Gunn-Moore, F., Collinson, J. M., Huang, J., Lubetzki, C., Pedraza, L., Sherman, D. L., Colman, D. R. & Brophy, P. J. (2000) *J. Cell Biol.* **150**, 657–666.
36. Berghs, S., Aggujaro, D., Ditz, R., Jr., Maksimova, E., Stabach, P., Hermel, J. M., Zhang, J. P., Philbrick, W., Slepnev, V., Ort, T., et al. (2000) *J. Cell Biol.* **151**, 985–1002.
37. Lacas-Gervais, S., Guo, J., Strenke, N., Scarfone, E., Kolpe, M., Jahkel, M., De Camilli, P., Moser, T., Rasband, M. N. & Solimena, M. (2004) *J. Cell Biol.* **166**, 983–990.
38. Zhang, X. & Bennett, V. (1996) *J. Biol. Chem.* **271**, 31391–31398.
39. Devaux, J., Alcaraz, G., Grinspan, J., Bennett, V., Joho, R., Crest, M. & Scherer, S. S. (2003) *J. Neurosci.* **23**, 4509–4518.
40. Devaux, J. J., Kleopa, K. A., Cooper, E. C. & Scherer, S. S. (2004) *J. Neurosci.* **24**, 1236–1244.
41. Chiu, S. Y. & Ritchie, J. M. (1980) *Nature* **284**, 170–171.
42. Wang, H., Kunkel, D. D., Martin, T. M., Schwartzkroin, P. A. & Tempel, B. L. (1993) *Nature* **365**, 75–79.
43. Wang, H., Kunkel, D. D., Schwartzkroin, P. A. & Tempel, B. L. (1994) *J. Neurosci.* **14**, 4588–4599.
44. Mi, H., Deerinck, T. J., Ellisman, M. H. & Schwarz, T. L. (1995) *J. Neurosci.* **15**, 3761–3774.
45. Smart, S. L., Lopantsev, V., Zhang, C. L., Robbins, C. A., Wang, H., Chiu, S. Y., Schwartzkroin, P. A., Messing, A. & Tempel, B. L. (1998) *Neuron* **20**, 809–819.
46. Vabnick, I., Trimmer, J. S., Schwarz, T. L., Levinson, S. R., Risal, D. & Shrager, P. (1999) *J. Neurosci.* **19**, 747–758.
47. Hopkins, W. F., Demas, V. & Tempel, B. L. (1994) *J. Neurosci.* **14**, 1385–1393.
48. Rhodes, K. J., Strassle, B. W., Monaghan, M. M., Bekele-Arcuri, Z., Matos, M. F. & Trimmer, J. S. (1997) *J. Neurosci.* **17**, 8246–8258.
49. Poliak, S., Gollan, L., Martinez, R., Custer, A., Einheber, S., Salzer, J. L., Trimmer, J. S., Shrager, P. & Peles, E. (1999) *Neuron* **24**, 1037–1047.
50. Poliak, S., Gollan, L., Salomon, D., Berglund, E. O., Ohara, R., Ranscht, B. & Peles, E. (2001) *J. Neurosci.* **21**, 7568–7575.
51. Rasband, M. N., Park, E. W., Zhen, D., Arbuckle, M. I., Poliak, S., Peles, E., Grant, S. G. & Trimmer, J. S. (2002) *J. Cell Biol.* **159**, 663–672.
52. Traka, M., Dupree, J. L., Popko, B. & Karageorgos, D. (2002) *J. Neurosci.* **22**, 3016–3024.
53. Traka, M., Goutebroze, L., Denisenko, N., Bessa, M., Nifli, A., Havaki, S., Iwakura, Y., Fukamauchi, F., Watanabe, K., Soliven, B., et al. (2003) *J. Cell Biol.* **162**, 1161–1172.
54. Poliak, S., Salomon, D., Elhanany, H., Sabanay, H., Kiemann, B., Pevny, L., Stewart, C. L., Xu, X., Chiu, S. Y., Shrager, P., et al. (2003) *J. Cell Biol.* **162**, 1149–1160.
55. Girault, J. A., Oguievetskaia, K., Carnaud, M., Denisenko-Nehrbass, N. & Goutebroze, L. (2003) *Biol. Cell* **95**, 447–452.
56. Denisenko-Nehrbass, N., Oguievetskaia, K., Goutebroze, L., Galvez, T., Yamakawa, H., Ohara, O., Carnaud, M. & Girault, J. A. (2003) *Eur. J. Neurosci.* **17**, 411–416.
57. Stuart, G., Spruston, N., Sakmann, B. & Hausser, M. (1997) *Trends Neurosci.* **20**, 125–131.
58. Whittington, M. A. & Traub, R. D. (2003) *Trends Neurosci.* **26**, 676–682.
59. Klausberger, T., Magill, P. J., Marton, L. F., Roberts, J. D., Cobden, P. M., Buzsáki, G. & Somogyi, P. (2003) *Nature* **421**, 844–848.
60. Howard, A., Tamas, G. & Soltesz, I. (2005) *Trends Neurosci.* **28**, 310–316.
61. Somogyi, P. & Klausberger, T. (2005) *J. Physiol.* **562**, 9–26.
62. Farinas, I. & DeFelipe, J. (1991) *J. Comp. Neurol.* **304**, 70–77.
63. Gonchar, Y., Tumey, S., Price, J. L. & Burkhalter, A. (2002) *J. Comp. Neurol.* **443**, 1–14.
64. Cooper, E. C., Harrington, E., Jan, Y. N. & Jan, L. Y. (2001) *J. Neurosci.* **21**, 9529–9540.
65. DeFelipe, J. & Gonzalez-Albo, M. C. (1998) *NeuroReport* **9**, 467–470.

3.5. *Expression of voltage-gated sodium and Kv1.2 potassium channels in the human temporal neocortex.*

Expression of voltage-gated sodium and Kv1.2 potassium channels in the human temporal neocortex.

A. Muñoz^{1,2}, M.C. Inda^{1,2}, Merchán³ and J. DeFelipe²

¹Department of Cell Biology, Universidad Complutense, Madrid, Spain. ²Instituto Cajal, CSIC, Madrid, Spain. ³Department of Anatomy and Embriology, Universidad Complutense, Madrid, Spain.

The axon initial segment and the nodes of Ranvier are critical regions of the neuronal axonal membrane for the generation and propagation of action potentials, respectively, due to the high concentration of voltage-dependent Na⁺ and K⁺ channels in these locations. While detailed information of the molecular architecture of the nodes of Ranvier in rodents is available less, is known about those in humans and about the axon initial segment. In the present study we show by double labeling immunofluorescence experiments that in the human temporal neocortex voltage-dependent Na⁺ and Kv1.2 channels and associated proteins distribute symmetrically and in separated membrane domains in the nodes of Ranvier of myelinated fibers. However, in the AIS of both pyramidal cells and GABAergic interneurons, identified by immunostaining for calbindin, calretinin and parvalbumin, Na⁺ and Kv1.2 channels do not show such a symmetrical distribution. Moreover, in the AIS of interneurons, which lack or show a sparse innervation by GABAergic axon terminals as revealed by GAT-1 immunostaining, voltage-dependent Na⁺ and Kv1.2 channels seem to largely overlap, in contrast to the AIS form pyramidal cells in which they show a partial segregation in relation to the presence of a dense GABAergic innervation by the axon terminals of chandelier cells.

Keywords: inhibition, interneurons, calcium binding proteins, axon initial segment, chandelier cells.

Introducción

The generation of action potentials in nerve fibers is restricted to specific sites of the axonal membrane where voltage gated Na⁺ channels (VGSC) and voltage-dependent potassium channels of the Kv1 subfamily of Shaker-type delayed-rectifying K⁺ channels are highly concentrated, including the axon initial segments (AISs) and the nodes of Ranvier. Previous studies, mainly carried out in the rat, have revealed the molecular architecture of the nodes of Ranvier, more thoroughly at the PNS than at the CNS (reviewed in Poliak and Peles, 2003; Salzer, 2003; Hedstrom and Rasband, 2006). Ion channels in these structures form heteromultimeric complexes that also contain intracellular scaffolding, adapter and cytoskeleton proteins, transmembrane proteins and extracellular matrix elements that provide specific sorting mechanisms that maintain them segregated into sharply defined membrane domains (reviewed in Poliak and Peles, 2003; Salzer, 2003; Hedstrom and Rasband, 2006). However, important differences exist between the nodes of Ranvier in the rat CNS and PNS and between the nodes of Ranvier and the AIS, including the differential involvement of glial cells in the segregation of ion channels and the lack of innervation of the nodes of Ranvier which is in turn present at the AIS (Hedstrom and Rasband, 2006). In the nodes of Ranvier, voltage-dependent Na⁺ and K⁺ channels are spatially segregated and symmetrically distributed at the nodal and juxtapanodal regions respectively, which are separated by the paranodal region. In contrast, recent studies in the human temporal neocortex (Inda et al., 2006) and in the rat retina (van Wart et al., 2007) have revealed fundamental differences in the AIS of pyramidal and ganglionic cells respectively since voltage-dependent Na⁺ and K⁺ channels are asymmetrically distributed and only partially segregated in the AIS, with a certain degree of overlap in the distal portion of the AIS. The relevance of these dif-

ferences to define the physiological attributes of action potentials generated in the AIS when compared to those in the nodes of Ranvier is still unknown. In addition to pyramidal cells, a large variety of GABAergic neurons are present in the mammalian cerebral cortex. Multidisciplinary studies have demonstrated that different types of interneurons differ in a broad range of morphological, molecular and physiological characteristics and in their synaptic relationship with pyramidal cells (Cauli et al., 1997; Kawaguchi and Kubota, 1997; Silberberg et al., 2002; Kawaguchi and Kondo, 2002; Markham et al., 2004; Monyer and Markram, 2004; DeFelipe et al., 2006). Interneurons are biochemically heterogeneous being immunocytochemistry for the calcium-binding proteins calbindin (CB), calretinin (CR) and parvalbumin (PV) a useful tool for the identification of distinct subpopulations (Andressen et al., 1993; DeFelipe, 1993, 1997).

In the present study, we have examined the expression and distribution of both voltage-dependent Na⁺ and K⁺ channels in the human temporal neocortex in an attempt to characterize the nodes of Ranvier and the AIS of interneurons that express CB, CR and PV. The results indicate that the organization of the nodes of Ranvier of myelinated fibers in the human neocortex is similar to that in other species and CNS regions. In addition, the results demonstrate that despite the differences between interneurons and pyramidal cells in action potential firing patterns and in the GABAergic innervation of the AIS, their AISs share some molecular characteristics and organization principles regarding voltage-dependent ion channels.

Materials and Methods

Immunohistochemistry

Human neocortical tissue from the antero-lateral temporal cortex was obtained by surgical resection from one male and four female patients diagnosed with intractable temporal lobe epilepsy with a mesial origin (age range = 21-54 years). Informed consent was obtained individually for all patients, having been previously approved by the ethical committee of the 'Hospital de la Princesa' (Madrid, Spain). Only histologically normal non-spiking areas, as identified by intraoperative electrocorticography, were used (see Inda et al., 2006 for detailed information). Biopsy samples were fixed in cold 4% paraformaldehyde in 0.1M phosphate buffer, pH 7.4 (PB) for 4-5 hours at 4°C. Vibratome sections (100 µm thick) were immunolabeled using the following antibodies: mouse anti-Na⁺ channels (1:100; Sigma, Saint Louis, USA), mouse anti-K⁺ channel Kv1.2 (1:50; Upstate, Lake Placid, NY, USA), rabbit anti-calbindin (CB, 1:4000; Swant, Bellinzona, Switzerland) and rabbit anti-calretinin (CR, 1:4000; Swant), rabbit anti-parvalbumin (PV, 1:1000; Abcam, Cambridge, United Kingdom), rabbit anti-Caspr (1:1000 gift from Dr. Peles), rabbit anti-Caspr2 (1:250, US Biological, Swampscott, MA, USA), rabbit-anti-GAT-1 (1:500; Chemicon, Temecula, CA, USA) and chicken anti-spectrin βIV (1:100, gift from Dr. Komada). Sections were incubated in secondary biotinylated antibodies and the ABC kit, reacted using DAB as chromogen, dehydrated in ethanol, cleared in xylene and coverslipped.

Fluorescent immunostaining:

For double labeling immunofluorescence experiments sections were incubated with the following combinations of primary antibodies: VGSC with CB, CR, PV, spectrin IVb, GAT-1 or Caspr2; Kv1.2 with CB, CR, PV or Caspr2 and GAT-1 with CR, PV or CB. After rising in PB, the sections were incubated in anti mouse biotinylated antibodies and then in streptavidin coupled to Alexa fluor 488 (1: 1000; Molecular Probes, Eugene, OR, USA) and goat anti-rabbit coupled to Alexa 594 (1:1000, Molecular Probes). The sections were then washed, mounted in 50% glycerol in PB and examined with a Leica TCS 4D confocal laser scanning microscope. Z-sections were recorded at 1-2 μ m intervals through separate channels (Scanware, Leica, Cambridge, UK). Subsequently, Micrografx Picture Publisher (Micrografx, Dallas, TX) and Adobe Photoshop (Adobe Systems Inc., San Jose, CA) software was used to construct composite images from each series by combining the images recorded through both channels, and to generate the figures.

Results

Immunostaining for voltage gated Na⁺ channels (VGSC) and Kv1.2 of sections from human temporal neocortex revealed their presence in three different types of axonal processes: 1) the AISs from pyramidal cells, 2) the nodes of Ranvier of myelinated fibers and 3) the AISs from interneurons. In addition, no stained somata or dendritic processes throughout the cortical layers.

1) Pyramidal cell AISs: According to previous studies (Inda et al., 2006) immunostaining for VGSC labeled the AIS of pyramidal cells in layers II-VI. They were readily identified, as a short, thin and smooth immunoreactive processes (Fig. 1A, C, F-H) most of which were radially oriented, extended distally from their somata of origin. They also coexpressed spectrin IVb (Fig. 1F-H). Similarly, Kv1.2 immunocytochemistry labeled numerous labeled pyramidal cell AIS through cortical layers II-VI (Fig. 1B). According to previous studies, many of them were radially oriented and belonged to pyramidal cells whose unlabeled somata were located just above the labeled AIS and in the same plane.

2) Nodes of Ranvier: In addition to the AIS of pyramidal cells, dotted-like VGSC-ir processes were found distributed through the cortical layers and in the white matter (arrow in Fig. 1A, C) They coexpressed spectrin IVb (Fig. 1F-H) and, according to what is known about the nodes of Ranvier, corresponded to the nodal region of myelinated fibers (Fig. 1). The paranodal region was identified, according to previous data in the rat CNS and PNS (Peles et al., 1997, Tait et al, 2000), as two symmetrical axonal regions expressing Caspr and separated (Fig. 1D) by a Caspr immunonegative gap that corresponded to the nodal region (arrow in Fig. 1D). In addition to the AIS of pyramidal cells, Kv1.2 immunocytochemistry revealed the presence of symmetrical immunoreactive processes (Fig. 1B, I-K) which coexpressed Caspr2 as revealed in Kv1.2-Caspr2 double labeling experiments. According to previous studies these Kv1.2-ir processes corresponded to the juxtaparanodal regions of the nodes of Ranvier (arrows in Fig. 1I-K). In VGSC-Caspr2 double labeling experiments (Fig. 1L-N), the three subcellular domains of the nodes of Ranvier were recognized: the nodal region expressing VGSC (red immunostaining in Fig. 1L, N), the juxtaparanodal regions expressing Caspr2 (green immunostaining in Fig. 1M, N) and the VGSC-Caspr2 immunonegative region separating them and corresponding to the paranodal regions (arrows in Fig. 1M, N).

3) AISs from interneurons: In addition to the AISs from pyramidal cells and the nodes of Ranvier, both VGSC and Kv1.2 immunostaining labeled a third category of immunoreactive processes. They were asymmetrical, randomly oriented and distributed scattered though all cortical layers (Figs. 1A, B; 2). In order to investigate whether they corresponded to the AIS of interneurons we performed double labelling experiments combining antibodies for VGSC or Kv1.2 and antibodies directed to calbindin (CB), calretinin (CR) or parvalbumin (PV). In double immunostained sections it was found that most of medium-sized and randomly-oriented VGSC-ir or Kv1.2-ir processes corresponded to the AIS of GABAergic interneurons, immunoreactive for CB, CR or PV (Fig. 2). The AISs of CB-ir, CR-ir or PV-ir interneurons were identified by the expression of VGSC (Fig. 2A-C, G-I and M-O, respectively) and Kv1.2 (Fig. 2D-F, J-L, and P-R, respectively), and it was found to arise either straight from the cell body (Fig.2A-C and M-O) or from a main dendrite (Fig.2D-L and P-R).

GABAergic innervation of the AIS.

According to previous studies (see Inda et al., 2006 and references therein) the AIS from pyramidal cells were found to receive a dense innervation by GABAergic axon terminals from chandelier cells arranged in vertical rows of boutons (Ch-terminals), which resemble candlesticks and that can be readily identified in GAT-1 immunostained sections (arrows in Fig. 3B, E and H). In VGSC/GAT-1 double-stained sections, GAT-1-ir Ch-terminals were found to surround the distal aspect of VGSC-ir AISs of pyramidal cells (Fig. 3 A-C). To further characterize the AIS from interneurons the pattern of GAT-1 immunostaining was analyzed in the surroundings of the cell bodies of CB-ir, CR-ir or PV-ir neurons in double immunostained sections (Fig. 3 D-L) where their AISs distribute (Fig. 2). GAT-1-ir processes in these regions included numerous terminal-like puncta loosely distributed in the neuropil, some of which were found in apposition to CB-ir (Fig. 3 D-F), CR-ir (Fig. 3 G-I) or PV-ir (Fig. 3 J-L) cell bodies and proximal processes (including main dendrites and presumptive AIS). However, no dense formations of GAT-ir boutons, similar to the Ch-terminals, were found to be associated to these proximal processes of interneurons.

Discussion

Myelinated axons are subdivided in morphologically, functionally and molecularly distinct polarized domains including the internodes and those regions able to generate action potentials such as the AIS and the nodes of Ranvier (Poliak and Peles 2003, Salzer 2003; Ogawa et al., 2006). The similarities in the membranes of the AIS and the nodes of Ranvier (1-2) extend to the presence of an electron dense membrane undercoat that is necessary to cluster the voltage-gated ion channels required for the induction of the action potential and saltatory conduction (Colbert and Johnston, 1996). These channels include the VGSC responsible for the rapid inward sodium currents and the consequent depolarization and voltage-dependent potassium channels of the Kv1 subfamily of Shaker-type delayed-rectifying K⁺ channels that generate low-threshold voltage-dependent outward currents that seem to regulate the action potential threshold and to contribute to the repolarization of single action potentials, the modulation of action potential duration and frequency, and to the maintain the internodal resting potential (1-4). Studies from the last years (see Poliak

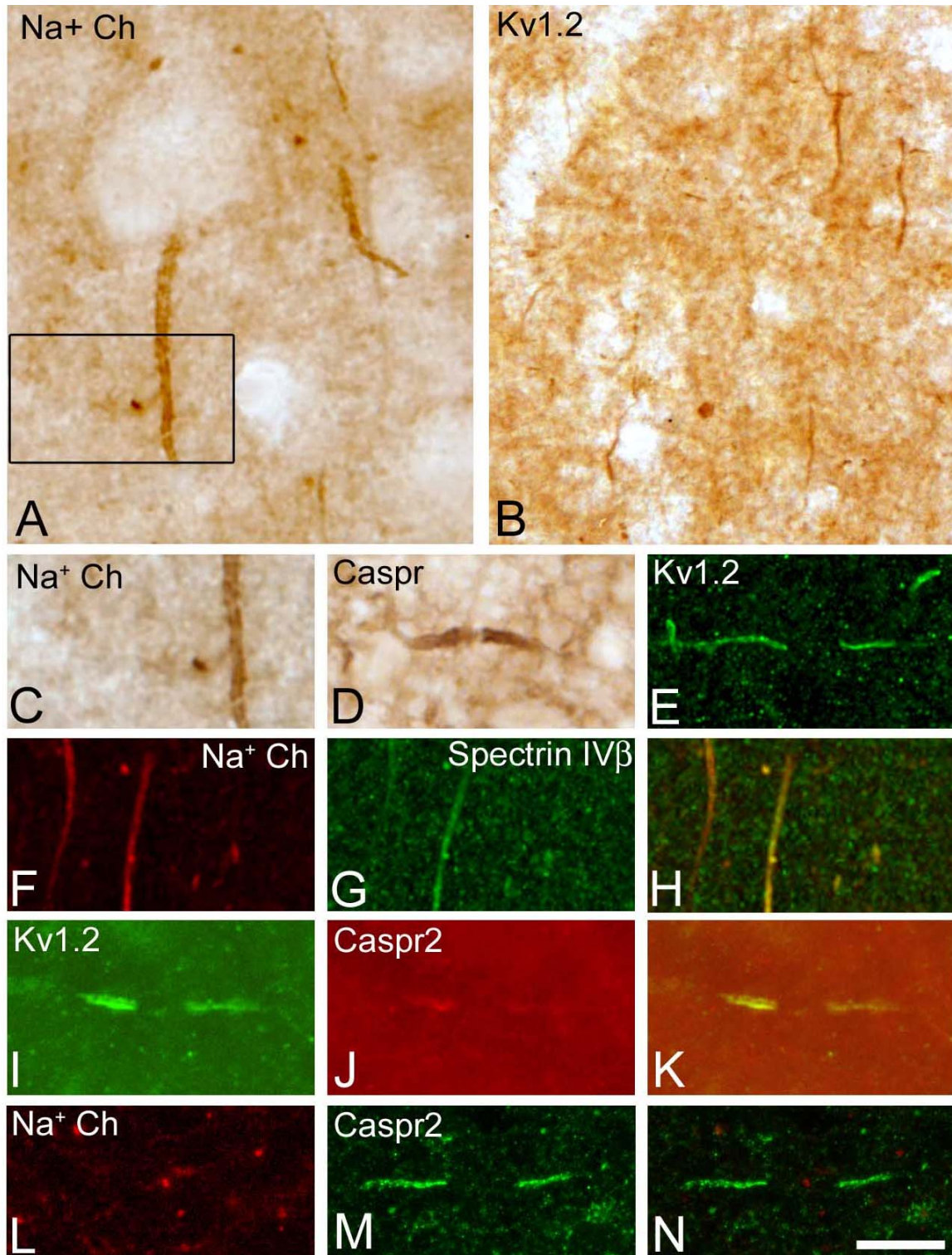


Figure 1: VGSC- (A), Kv1.2 (B, E) and Caspr (D) immunostaining of axonal processes in human temporal neocortex. Boxed area in A is enlarged in C. According to previous studies (Inda et al., 2006) large and radially oriented VGSC-ir (arrows in A and C) and Kv1.2-ir (arrows in B) processes that extend distally below the unlabeled somata of origin (asterisk in A) correspond to the axon initial segment of pyramidal cells. F-N are confocal images from three different microscopic fields of the human temporal neocortex illustrating double labeling for VGSC and spectrin IVb (F-H), Kv1.2 and Caspr2 (I-K) and VGSC and Caspr2 (L-N). Note in F-H that VGSC-ir AISs from pyramidal cells coexpress spectrin IVb (arrows). VGSC-ir structures include dotted processes that also coexpress spectrin IVb (F-H) and that correspond to the nodal region of the nodes of Ranvier (arrow heads in F-H). Kv1.2-ir structures include symmetrical processes (E, I) that colocalize Caspr2 (I, K) and that correspond to the juxtaparanodal regions of the nodes of Ranvier. Double labeling for VGSC and Caspr2 demonstrate that Caspr2-ir juxtaparanodal regions (arrows in M and N) distribute at both sides of the VGSC-ir nodal region (arrow heads in L and N) although separated from the last by the VGSC/Caspr2 negative juxtaparanodal region (hollow arrows in N). In Caspr-immunostained sections the paranodal regions of the nodes of Ranvier can be identified by symmetrically distributed Caspr-positive axon processes (arrows in D) surrounding a non-immunostained dotted GAP (arrow heads in D) which likely correspond to the nodal region. Image E represent a stack of 15 optical sections obtained at a distance of 1.5 μm in the z axis (total: 22 μm). F-H represent stacks of 15 optical sections obtained at a distance of 1.5 μm in the z axis (total: 22 μm). Images I-K represent stacks of 7 optical sections obtained at a distance of 1.4 μm in the z axis (total: 9 μm). Images L-N represent stacks of 6 optical sections obtained at a distance of 1.3 μm in the z axis (total: 7 μm). Scale bar: 25 μm in A-C and 15 μm in D-I

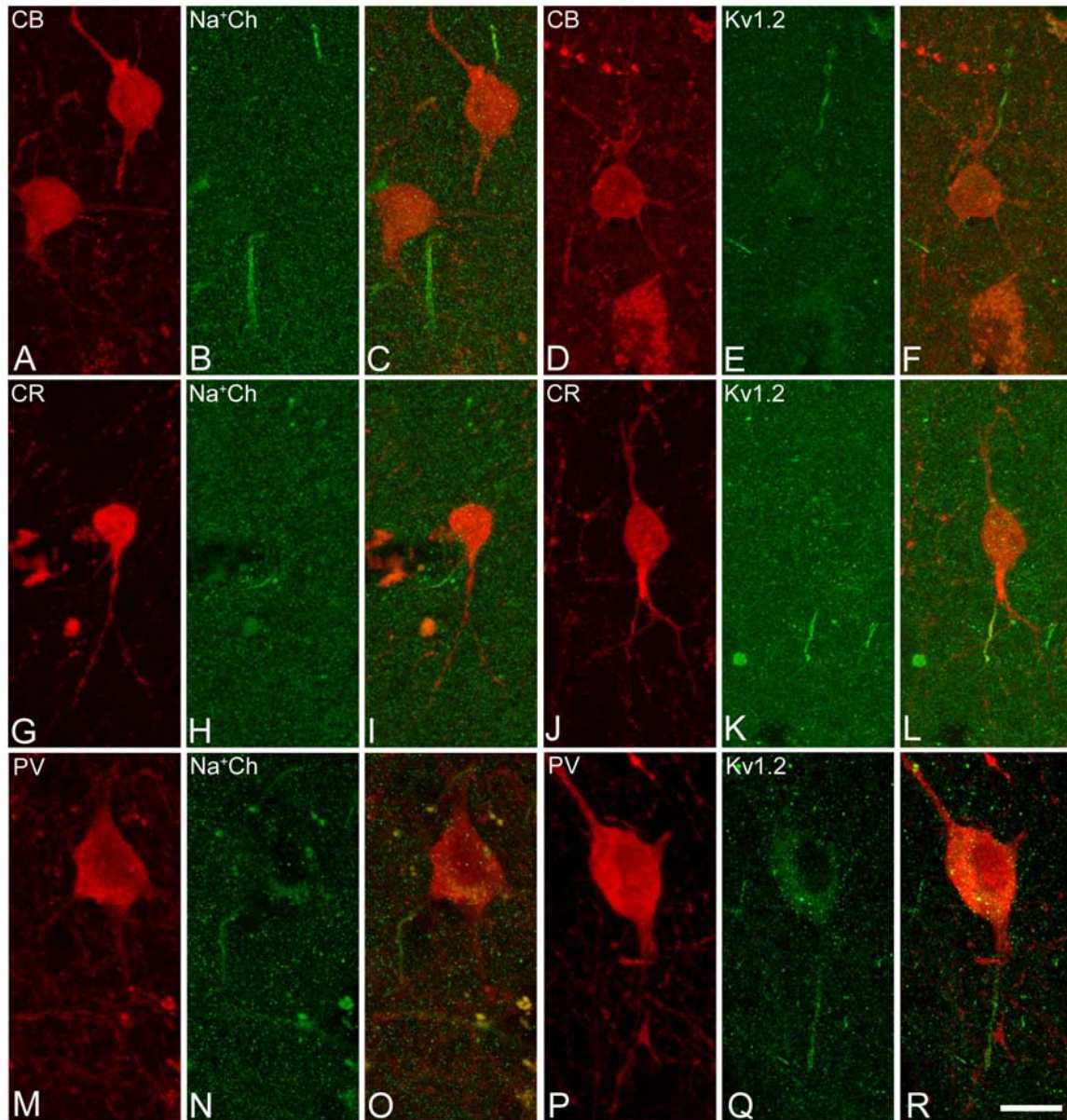


Figure 2: Confocal images from the same section and microscopic field illustrating double labeling for CB and VGSC (A-C) or Kv1.2 (D-F), CR and VGSC (G-I) or Kv1.2 (J-L) and PV and VGSC (M-O) or Kv1.2 (P-R). Note that the axon initial segment of Cb-ir, CR-ir and PV-ir interneurons express VGSC and Kv1.2 and respectively, and it was found to arise either straight from the cell body (A-C and M-O) or from a main dendrite (D-L and P-R). Images A-C represent a stack of 15 optical sections obtained at a distance of 1.5 μm in the z axis (total: 22 μm). D-F represent a stack of 15 optical sections obtained at a distance of 1.5 μm in the z axis (total: 22 μm). G-I represent a stack of 15 optical sections obtained at a distance of 1.5 μm in the z axis (total: 22 μm). J-L represent a stack of 15 optical sections obtained at a distance of 1.5 μm in the z axis (total: 22 μm). M-O represent a stack of 15 optical sections obtained at a distance of 1.5 μm in the z axis (total: 22 μm). P-R represent a stack of 15 optical sections obtained at a distance of 1.5 μm in the z axis (total: 22 μm). Scale bar: 2 \times 5 μm in A-C and 15 μm in D-I

and Peles 2003, Salzer 2003; Ogawa et al., 2006; Inda et al., 2006, van Wart, 2006) show that both the nodes of Ranvier and the AIS do not show a homogeneous distribution of voltage dependent Na^+ and K^+ channels and they can be subdivided in different subdomains characterized by the expression of specific ion channels, adhesion proteins, adapter or scaffolding proteins and a specialized cytoskeleton (see below). In the present study we characterized the expression of VGSC and Kv1.2, and some of their associated proteins, in the nodes of Ranvier and the axon initial segments from pyramidal cells and interneurons of the human neocortex. The results indicate that the organization of the nodes of Ranvier of the human is similar to what previously described in other regions of the rodent CNS.

The results also indicate differences in ion channel distribution between the nodes of Ranvier and the AIS from pyramidal cells and interneurons.

Nodes of Ranvier

Voltage-dependent Na^+ and K^+ channels are spatially segregated and symmetrically distributed at the nodes of Ranvier. VGSC distributed at dotted-like structures that colocalized spectrin bIV and that due to their spatial relationship with the paranodal and juxtaparanodal regions (see below) and according to previous studies were interpreted as the nodal regions of the nodes of Ranvier in which VGSC are associated with the underlying actin-spectrin cytoskeleton

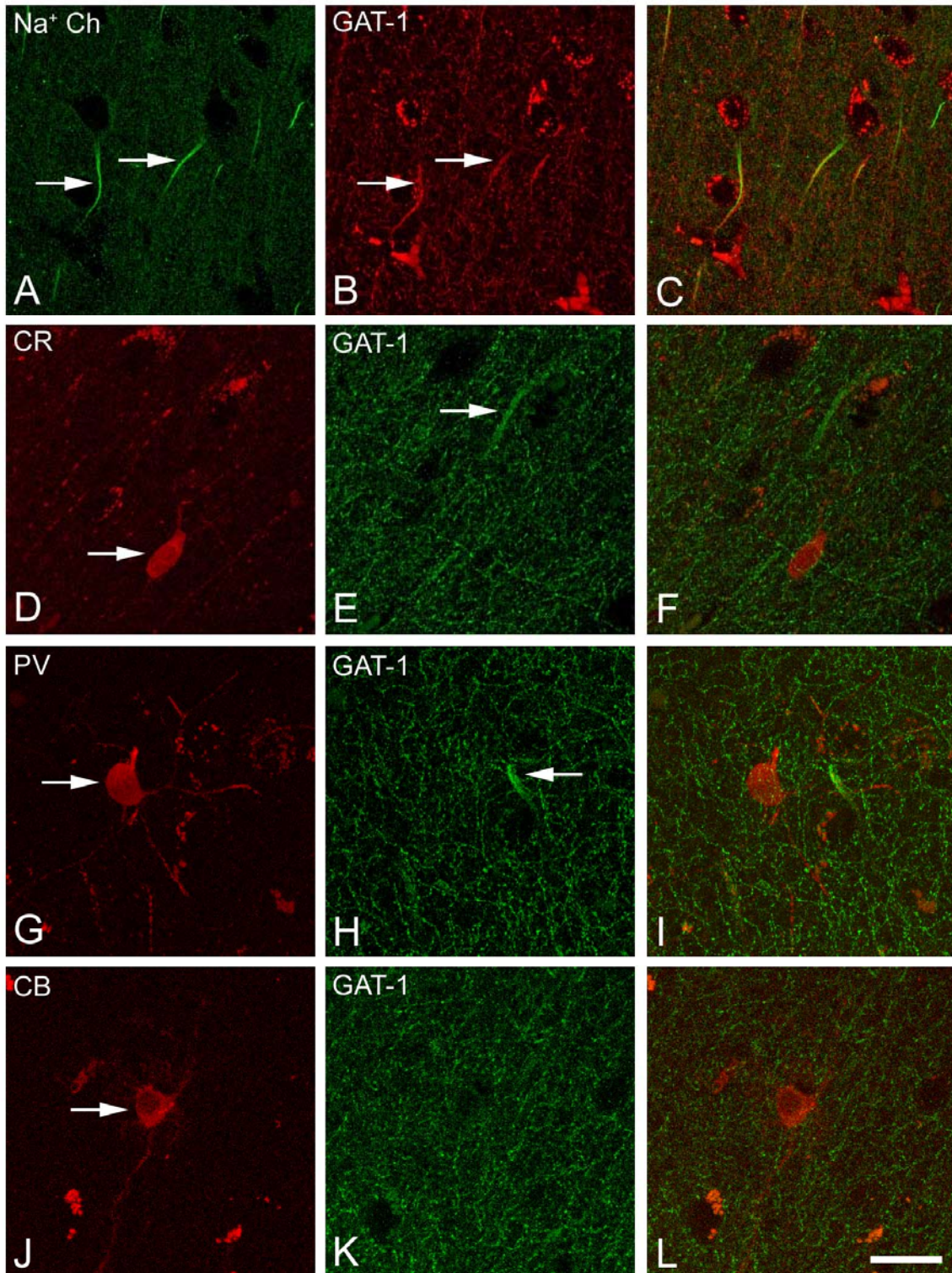


Figure 3: Confocal images from the same section and microscopic field illustrating double labeling for GAT 1 and VGSC (A-C), CR (D-F), PV (G-I) or CB (J-L). Note that the axon initial segment of pyramidal cells, as revealed by VGSC immunostaining (arrows in A) are innervated by GAT-1-ir Ch-terminals (arrows in B). However, the AIS from CR-ir, PV-ir or CB-ir interneurons, which should arise in the immediate surroundings of the cell body (arrows in D, G and J) lack Ch terminals although they might receive a sparse innervation by GAT-1-ir axon terminals, present in the neuropil surrounding the cell bodies. Images A-C represent a stack of 15 optical sections obtained at a distance of 1.5 μm in the z axis (total: 22 μm). D-F represent a stack of 15 optical sections obtained at a distance of 1.5 μm in the z axis (total: 22 μm). G-I represent a stack of 15 optical sections obtained at a distance of 1.5 μm in the z axis (total: 22 μm). J-L represent a stack of 15 optical sections obtained at a distance of 1.5 μm in the z axis (total: 22 μm). Scale bar: 25 μm in A-C and 15 μm in D-I.

through the adaptor protein ankyrin-G and to NrCAM and neurofascin 186, nodal cell adhesion molecules of the immunoglobulin superfamily (1, 2). In addition, Kv.1.2, toget-

her with Caspr2 distributed in the human neocortex in domains symmetrically oriented at both sides of the nodal region but separated from it by two symmetrical gaps co-

responding to the paranodal regions. These Kv1.2-Caspr2 expressing regions were interpreted as the juxtaparanodal axonal membrane that, according to previous studies in the rat, are localized beneath the overlying compact myelin (3-6). In addition to Kv1.2, the juxtaparanodal regions also express Kv1.1 and have been shown to co-localize with, and to interact and/or cluster with Caspr2, a member of the neurexin superfamily (7, 8) which interacts with other proteins necessary for the accumulation of Kv channels and for their interaction with the actin-spectrin cytoskeleton (9-15). Finally, in the present study the nodal and juxtaparanodal regions were found to be separated by two symmetrical domains devoid of ion channels and characterized by the expression of Caspr. According to previous studies they correspond to the paranodal regions characterized by the absence of ion channels, and the expression of Caspr and other axonal proteins such as spectrin aII, spectrin bII and ankyrin B (Ogawa et al., 2006) which function as attachment sites for myelin and as paracellular and membrane protein diffusion barriers (Schafer and Rasband, 2006). In conclusion, the present study shows that the nodes of Ranvier of the human neocortex share the same organization principles and molecular patterns of expression, including those of voltage gated ion channels, previously described in other regions of the rodent CNS.

Axon initial segments

Although previous studies have shown that that AIS of different CNS neurons can be subdivided in proximal and distal subdomains in base of ion channel expression (Inda et al., 2006; van Wart et al., 2007), in contrast to the nodes of Ranvier, voltage-dependent Na⁺ and K⁺ channels are only partially segregated in the AIS and that there is a certain degree of overlap due to the absence at the AIS of an equivalent of the paranodal region of the nodes of Ranvier. Evidence from different studies indicate that similar molecular interactions of VGSC than in the nodes of Ranvier occur in the AIS in different neuronal populations of the rat CNS where, in addition to VGSC, NrCAM, Neurofascin 186, spectrin bIV and ankyrin G have been identified through the length of the AIS (16-21). In keeping with these studies, the present data indicate that the AIS of human neocortical interneurons, including those immunoreactive for PV, CB and CR, also express VGSC. It is to be noted that in ganglionic cells of the rat retina the proximal part of the AIS express Na 1.1 whereas the distal portion expresses Na 1.6 isoform (van Wart et al., 2007). The anti-pan-sodium channel antibody used in the present study and in most of these studies recognizes all the known vertebrate Na⁺ channel isoforms (22) and therefore, it is thought to reflect the complete repertoire of VGSC in these structures although it does not allow us to discriminate between different possible subunits. Whether different subunits are present in the AIS of pyramidal cells as compared to those of interneurons or the nodal region of the nodes of Ranvier, or whether each interneuron population express different types of VGSC structures should be evaluated in further studies.

Previous observations regarding the distribution of Kv1.2 (Inda et al., 2006, van Wart et al., 2007) have demonstrated the regionalization of the AIS from CNS neurons into different subdomains. Together with previous data (Inda et al., 2006), the present results indicate that in human neocortical pyramidal cells, Kv1.2 channels are clustered at and co-localize with the adhesion molecule Caspr2 exclusively in the distal domain of the AIS, a region of the AIS is innervated by Ch-terminals. The mechanisms that produce this

segregation of Kv1.2 channels at the AIS are presently unknown. In a previous study (Inda et al., 2006), the presence of Ch-terminals in apposition to the AIS from pyramidal cells was proposed as a possible mechanism that might help to maintain Kv1.2 channels at the distal aspect of the AIS. However, it is to be noted that in ganglionic cells from the rat retina Kv1.2 channels are excluded from the proximal region of the AIS, where Na 1.1 channels are expressed, and they exclusively concentrate at the distal AIS, where Na1.6 channels are present (van Wart et al., 2006) and which, as far as we are concerned, is not specifically innervated by axon terminals. In the present study, Kv1.2 has been found to accumulate at the AIS of human neocortical interneurons, including those immunoreactive for PV, CB and CR, which account for a large proportion of the whole population of interneurons (DeFelipe, 1997, 1999?). Although no direct assessment has been made, the fact that Kv1.2 positive AIS of interneurons were identified as immunoreactive processes emerging straight from the cell body or a main dendrite indicate that Kv1.2 channels in interneurons distribute through the whole extent of the AIS. With the exception of large PV-ir basket cells whose axons are myelinated, CB-ir, CR-ir and PV-ir interneurons are local circuit interneurons with unmyelinated axons that establish local connections with adjacent elements (see DeFelipe et al., 1984, 1986). Therefore, as is the case in cortical pyramidal cells (Inda et al., 2006) and in contrast to the situation in the juxtaparanodal regions of the myelinated axons, the presence of a compact myelin sheet is not required for Kv1.2 clustering at the AIS from neocortical interneurons. Another important difference between the AIS of pyramidal cells and that from interneurons regards their innervation by GABAergic axon terminals. Whereas pyramidal cell AISs are densely innervated by PV-ir Ch-terminals the present study, together with previous data (references) indicate that cortical interneurons lack a dense GABAergic innervation at the AIS. Whether this is in relation to the apparent lack of segregation of Kv1.2 channels and VGSC at the AIS from interneurons should be explored in future studies.

In conclusion, the present study indicates that the molecular interactions and the segregation of VGSC and Kv1.2 channels at the nodes of Ranvier of myelinated fibers of the human neocortex seems to share the same organization principles to those in other CNS regions and species. In addition, despite the morphological, molecular and physiological differences between pyramidal cells and interneurons, and between different populations of interneurons, their AIS apparently share a similar molecular organization in which, in contrast to the situation at the nodes of Ranvier, voltage gated Na⁺ and K⁺ channels distribute asymmetrically and spatially overlap to a extent that may vary depending on the innervation of the AIS.

Acknowledgements: This work was supported by the Ministerio de Educación y Ciencia grants BFU2006-03855 to A.M. and BFU2006-13395 to J. de F.

Reference

- Arroyo, E. J. & Scherer, S. S. (2000) *Histochem. Cell Biol.* 113, 1-18.
 Poliak, S. & Peles, E. (2003) *Nat. Rev. Neurosci.* 4, 968-980.
 Chiu, S. Y. & Ritchie, J. M. (1980) *Nature* 284, 170-171.
 Wang, H., Kunkel, D. D., Martin, T. M., Schwartzkroin, P. A. & Tempel, B. L. (1993) *Nature* 365, 75-79.
 Wang, H., Kunkel, D. D., Schwartzkroin, P. A. & Tempel,

- B. L. (1994) *J. Neurosci.* 14, 4588-4599.
- Mi, H., Deerinck, T. J., Ellisman, M. H. & Schwarz, T. L. (1995) *J. Neurosci.* 15, 3761-3774.
- Poliak, S., Gollan, L., Martinez, R., Custer, A., Einheber, S., Salzer, J. L., Trimmer, J. S., Shrager, P. & Peles, E. (1999) *Neuron* 24, 1037-1047.
- Poliak, S., Gollan, L., Salomon, D., Berglund, E. O., Ohara, R., Ranscht, B. & Peles, E. (2001) *J. Neurosci.* 21, 7568-7575.
- Rasband, M. N., Park, E. W., Zhen, D., Arbuckle, M. I., Poliak, S., Peles, E., Grant, S. G. & Trimmer, J. S. (2002) *J. Cell Biol.* 159, 663-672.
- Traka, M., Dupree, J. L., Popko, B. & Karagogeos, D. (2002) *J. Neurosci.* 22, 3016-3024.
- Traka, M., Goutebroze, L., Denisenko, N., Bessa, M., Nifli, A., Havaki, S., Iwakura, Y., Fukamauchi, F., Watanabe, K., Soliven, B. et al. (2003) *J. Cell Biol.* 162, 1161-1172.
- Poliak, S., Salomon, D., Elhanany, H., Sabanay, H., Kiernan, B., Pevny, L., Stewart, C. L., Xu, X., Chiu, S. Y., Shrager, P. et al. (2003) *J. Cell Biol.* 162, 1149-1160.
- Poliak, S. & Peles, E. (2003) *Nat. Rev. Neurosci.* 4, 968-980.
- Girault, J. A., Oguievetskaia, K., Carnaud, M., Denisenko-Nehrbass, N. & Goutebroze, L. (2003) *Biol. Cell* 95, 447-452.
- Denisenko-Nehrbass, N., Oguievetskaia, K., Goutebroze, L., Galvez, T., Yamakawa, H., Ohara, O., Carnaud, M. & Girault, J. A. (2003) *Eur. J. Neurosci.* 17, 411-416.
- Davis, J. Q., McLaughlin, T. & Bennett, V. (1993) *J. Cell Biol.* 121, 121-133.
- Davis, J. Q., Lambert, S. & Bennett, V. (1996) *J. Cell Biol.* 135, 1355-1367.
- Lambert, S., Davis, J. Q. & Bennett, V. (1997) *J. Neurosci.* 17, 7025-7036.
- Zhou, D., Lambert, S., Malen, P. L., Carpenter, S., Boland, L. M. & Bennett, V. (1998) *J. Cell Biol.* 143, 1295-1304.
- Tait, S., Gunn-Moore, F., Collinson, J. M., Huang, J., Lubetzki, C., Pedraza, L., Sherman, D. L., Colman, D. R. & Brophy, P. J. (2000) *J. Cell Biol.* 150, 657-666.
- Jenkins, S. M. & Bennett, V. (2001) *J. Cell Biol.* 155, 739-746.
- Rasband, M. N., Peles, E., Trimmer, J. S., Levinson, S. R., Lux, S. E. & Shrager, P. (1999) *J. Neurosci.* 19, 7516-7528.

DISCUSIÓN

Como ya hemos dicho anteriormente, la célula en candelabro es la única interneurona que establece sinapsis exclusivamente con el segmento inicial del axón (SIA) de las células piramidales (ver sección 1.4.1) por ello se les atribuye un papel fundamental en el control de la excitabilidad celular (revisado en DeFelipe, 1999). En este trabajo, mediante métodos de inmunohistoquímica e inmunofluorescencia hemos abordado el estudio de las células en candelabro a dos niveles: distribución cortical y extra-cortical y localización con respecto al SIA de la innervación GABAérgica por parte de las células en candelabro. Nos planteamos el primer objetivo pues a pesar de la existencia de numerosos estudios de distribución, no existe un análisis detallado y sistemático acerca de las densidades de terminales Ch en humano y ratón. En segundo lugar, las células en candelabro no pueden estudiarse sin considerar su diana, el SIA. La anatomía del SIA manifiesta su función, por ello el estudio de la relación de los terminales-Ch con el SIA, englobó también la caracterización de componentes estructurales del SIA en humano (canales de Na y K dependientes de voltaje y proteínas asociadas). De este modo, obtendremos una idea más aproximada de las posibles consecuencias de la inhibición a este nivel por parte de las células en candelabro

4.1. DISTRIBUCIÓN DE LOS TERMINALES EN CANDELABRO INMUNOREACTIVOS PARA GAT-1

En este primer objetivo del estudio, mediante inmunohistoquímica contra el transportador de GABA GAT-1 analizamos de manera sistemática los patrones de distribución de terminales-Ch en regiones corticales y extra-corticales en tejido humano y de ratón. Los resultados muestran que las células en candelabro están presentes en áreas derivadas del pallium dorsal, medial y lateral. Sin embargo, la distribución de terminales-Ch positivos para GAT-1 no es homogénea en la corteza ni en regiones extra-corticales, sino que se han encontrado diferencias sustanciales entre distintas áreas citoarquitectónicas y capas corticales en ambas especies estudiadas.

Por otro lado, la diferencia fundamental entre ratones y primates es que los terminales-Ch se observaron en la paleocorteza y archicorteza de ratón, pero estaban prácticamente ausentes en áreas neocorticales. Al contrario, en la neocorteza de primates, especialmente en humano, los terminales-Ch complejos estaban ampliamente distribuidos a través de todas las áreas corticales. Estas diferencias de distribución entre especies y dentro de la misma especie pueden relacionarse con muchos factores que trataremos a continuación, desde cuestiones metodológicas, heterogeneidad y/o complejidad de las células en candelabro, hasta los diferentes atributos funcionales de las regiones y/o capas analizadas.

4.1.1. Consideraciones metodológicas

En primer lugar, utilizamos inmunohistoquímica contra el transportador de GABA 1 por ser el marcaje más prominente y consistente de terminales en candelabro (DeFelipe y González-Albo, 1998). Sin embargo, dado que las células en candelabro son químicamente heterogéneas (véase apartado 1.4.3) la diferencia de distribución de terminales-Ch encontrada en nuestro estudio podría deberse no sólo a un patrón diferente de localización entre regiones, sino también a distintas subpoblaciones de células en candelabro que expresen diferentes marcadores o diferente combinación de marcadores.

En humano y en ratón se utilizó diferente metodología adaptada a las necesidades de cada caso. En el ratón estudiamos la distribución de terminales-Ch de manera cualitativa, por dos motivos fundamentales: las diferencias eran sustanciales (del tipo todo o nada) y la densidad de candelabros incluso en las zonas más pobladas era reducida, por lo que resulta más informativo un estudio en áreas mayores no tan detallada que utilizar una muestra de tejido menor a grandes aumentos, que podría dar resultados más variables. El trabajo de distribución en humanos consistió en un estudio cuantitativo de las densidades en las distintas áreas y capas neocorticales, así, las diferencias observadas fueron analizadas mediante métodos estadísticos. El disector óptico es el método estereológico más adecuado para estimar un número de estructuras en un volumen de tejido (revisado en Mayhew y Gundersen, 1996); por una parte, nos encontramos con una primera dificultad para utilizar este método dado el bajo número de individuos a analizar; por otro motivo fundamental, sólo fue aplicable en el análisis del número de neuronas en secciones teñidas con NeuN: los candelabros son estructuras anisotrópicas, alargadas y cuya orientación, forma y tamaño varía entre secciones y dentro de una misma sección, por ello es imposible definir un foco en el ecuador de la célula de localización exacta para establecer la reducción teórica de las partículas a contar a punto que se requiere para el método del disector óptico. Sin embargo, a pesar de que los conteos no siguieron las directrices más puristas respecto a la estimación estereológica de partículas y teniendo en cuenta la diferente metodología utilizada en cada especie, se obtuvieron resultados consistentes referentes a la distribución en las áreas neocorticales. Esto, en cierto modo, valida la sistemática del análisis realizado.

Por otro lado, descartamos que las diferencias observadas en nuestro trabajo se deban a los métodos inmunohistoquímicos utilizados, pues todas las secciones fueron procesadas siguiendo el mismo procedimiento, incluso las diferencias de distribución observadas en muchos casos fueron dentro de una misma sección. De cualquier modo, no podemos descartar que la ausencia de terminales-Ch GAT-1-ir en determinadas áreas pueda deberse a una menor cantidad de proteína GAT-1 en los terminales-Ch por de-

bajo de los niveles de detección para el método inmunohistoquímico utilizado. Además se han descrito diferentes tipos de transportadores de GABA (revisado en Conti y cols., 2004), es posible que al menos algunos terminales-Ch utilicen otros tipos diferentes al GAT-1.

4.1.2. Variación de la densidad de los terminales en candelabro inmuno-reactivos para GAT-1 en la corteza cerebral

4.1.2.1. Variación de la densidad de los terminales en candelabro inmuno-reactivos para GAT-1 entre áreas neocorticales

En la neocorteza humana y de ratón hemos demostrado que hay en general, una mayor densidad de terminales que inervan los SIAs en áreas de asociación que en áreas sensoriales primarias (Figura 17). En la corteza sensorial primaria, que incluye la

corteza visual, los terminales complejos están ausentes en el ratón, pero están presentes en las cortezas sensoriales primarias y secundarias humanas (áreas 17, 18, 3b, y 1) aunque en una proporción relativamente baja. En las áreas asociativas temporales y auditivas del ratón, se presentaron terminales-Ch complejos inmunoreactivos para GAT-1, coincidiendo con las áreas temporales humanas 20, 21, 22 y 38 en las que se describieron los niveles más altos de densidades. Sin embargo, en las áreas motoras y cortezas asociativas frontales y parietales no se han encontrado terminales-Ch complejos en el ratón, mientras este tipo de terminales es frecuente en dichas áreas de la neocorteza humana. Concretamente, el área motora (área 4) y las áreas asociativas frontolaterales, áreas 45 y 46, presentaron valores intermedios, mientras que las áreas frontolaterales 9 y 10, las áreas frontales orbitarias 11, 12, 13, 14 y 47 y las áreas cinguladas 24 y 32 contenían la densidad media más alta de terminales-Ch GAT-1-ir. Aunque no existen

- Áreas asociativas frontolaterales (9 y 10)
- Áreas frontales orbitarias (11, 12, 13, 14, 47)
- Áreas Asociativas temporales (20, 21 y 22)
- Áreas temporales límbicas (38)
- Áreas cinguladas (24 y 32)

- Área motora (4)
- Áreas asociativas frontolaterales (45 y 46)

- Áreas sensoriales 1^{arias} y 2^{arias} (17, 18)
- Áreas somatosensoriales (1 y 3)

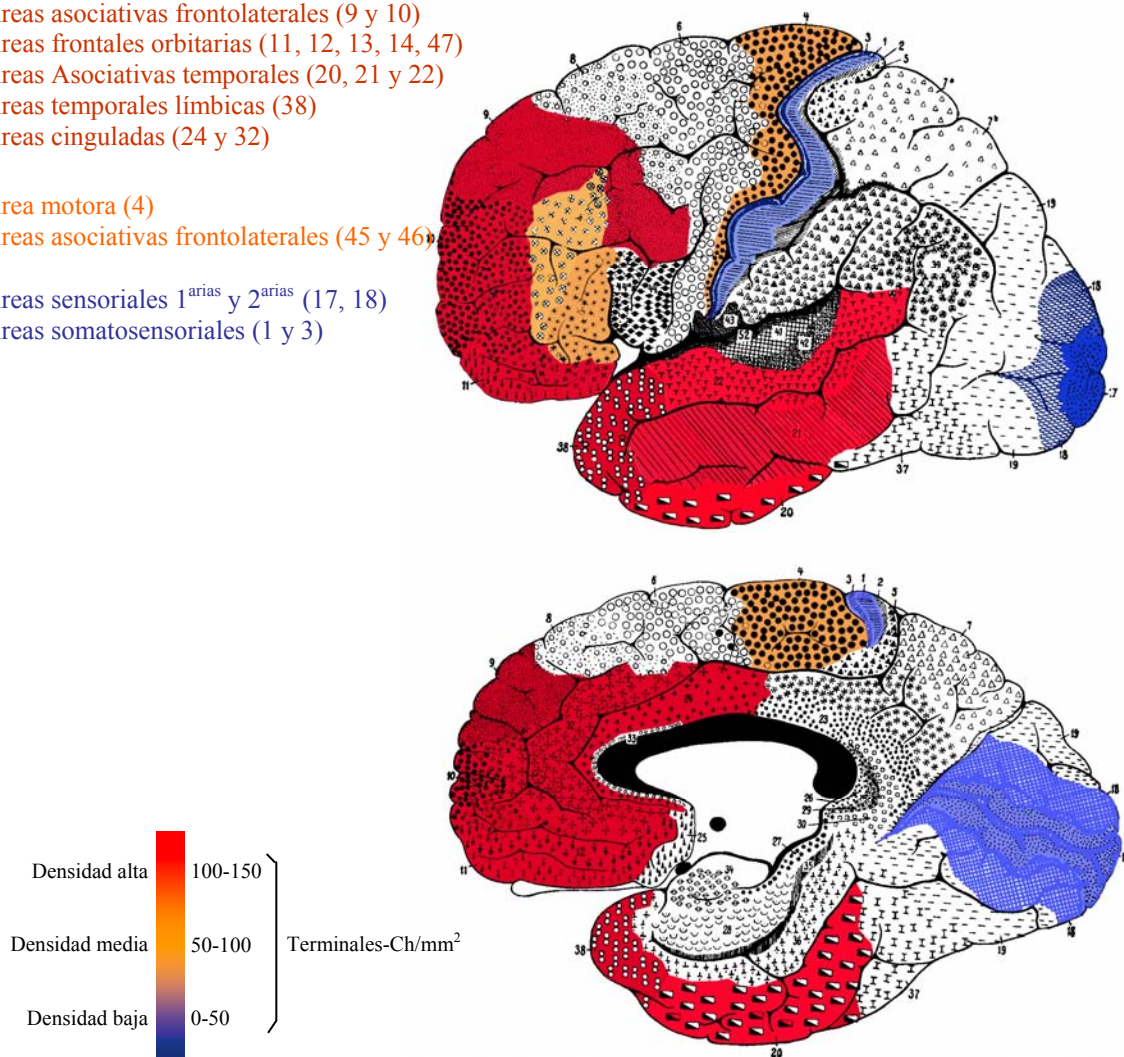


Figura 17. Representación de las densidades de candelabros para cada área en el mapa citoarquitectónico de Brodmann. El color azul corresponde a los niveles más bajos de terminales-Ch inmunoreactivos para GAT-1 (interiores a 50 terminales-Ch/mm²), el color naranja a los niveles intermedios (entre 50 y 100 terminales-Ch/mm²) y el color rojo, a los niveles más altos (entre 50 y 100 terminales-Ch/mm²). En la parte superior se presenta la vista lateral. En la parte inferior, la vista mesial. Modificado de Brodmann (1909).

estudios previos detallados en la neocorteza humana ni de ratón o rata, para comparar con el presente estudio, estos resultados coinciden con observaciones en mono en que hay generalmente una mayor densidad de terminales-Ch que inervan los SIAs en áreas asociativas que en áreas sensoriales primarias (Lewis y cols., 1989; Akil y Lewis, 1992; Conde y cols., 1996; Elston y González-Albo, 2003). Así, se ha demostrado mediante métodos de microscopía electrónica y trazadores retrógrados (Fariñas y DeFelipe, 1991) y método de Golgi (Lewis y Lund 1990) que los terminales-Ch están presentes en la corteza visual de gato y mono. Sin embargo, a pesar de que coincide con la escasez de terminales-Ch GAT-1-ir en la corteza visual primaria y en áreas sensoriales observados en nuestro trabajo, es preferible que los resultados sean comparados con otras especies y áreas corticales examinadas con la misma metodología, dado que es difícil obtener una idea sobre la distribución de terminales-Ch en estudios de microscopía electrónica o en estudios de golgi, debido a la inconsistencia del método de Golgi y los relativamente pocos SIA analizados por microscopía electrónica.

En cualquier caso, dado que no todas las células piramidales están necesariamente inervadas por terminales-Ch (e.j. ver Fariñas y DeFelipe, 1991), podrían estar inervadas una menor proporción de las células piramidales en las áreas sensoriales que en las áreas asociativas. De este modo, las diferencias regionales encontradas en la neocorteza humana y en ratón probablemente están relacionadas con sus diferentes atributos funcionales y sugiere que las células en candelabro contribuyen de manera diferencial a los circuitos corticales (anatómicamente y fisiológicamente) de acuerdo con la localización en la que estén situadas. En este sentido, nuestros resultados también son consistentes con aquellos que muestran que las células double-bouquet, otro componente importante de los circuitos corticales GABAérgicos, no están distribuidas de manera homogénea a través de la neocorteza sino que también presentan diferencias dramáticas de densidad entre áreas (Yáñez y cols., 2005). Por lo tanto, las diferencias significativas en la densidad de terminales-Ch entre las distintas áreas de la neocorteza humana y de ratón, indica una especialización regional de los circuitos inhibitorios en los cuales están implicados. Así mismo, sugieren la existencia de mecanismos específicos que guían la migración de células positivas para PV y las restringen o concentran a regiones particulares de la corteza cerebral.

4.1.2.2. Diferencias en el patrón de distribución entre capas de la neocorteza

Los resultados indican también que hay diferencias en la densidad de terminales GAT-1-ir entre las distintas capas neocorticales tanto en humano como ratón. A pesar de las diferencias, el patrón de distribución laminar de terminales-Ch GAT1-ir fue similar en la mayoría de las áreas neocorticales. En gene-

ral, la densidad más alta de este transportador se observó en las capas II y III; excepto, en las áreas asociativas temporales y auditivas del ratón, donde los terminales-Ch inmunoreactivos para GAT-1 se encontraron principalmente en capas infragranulares.

Estudios previos que han mostrado que existen diferencias en la densidad de terminales sinápticos que contactan con el SIA de células piramidales localizadas en diferentes capas en la corteza prefrontal medial de la rata (Hardwick y cols., 2005; Kemppainen y cols., 2000). Coincidiendo con nuestros resultados, el SIA de las neuronas piramidales de las capas II-III en la corteza temporal y sensori-motora de mono (Sloper y Powell, 1979), y corteza visual de gato (Tombol, 1978; Fariñas y DeFelipe, 1991) y rata (Somogyi, 1977) están más densamente inervadas por células en candelabro que aquellos en capas V y VI. Sin embargo, en la corteza temporal (Del Río y DeFelipe, 1994; DeFelipe y cols., 2001) y entorhinal de humanos, en las capas II y III aparece un marcaje de terminales Ch positivos para PSANCAM (Arellano y cols., 2002) y los terminales Ch PV-ir son más abundantes en capas V y VI. Lo que indica que existen subpoblaciones de células en candelabro con características bioquímicas diferentes y distinto patrón laminar de distribución.

Dado que las células piramidales localizadas en diferentes capas tienen diferentes dianas de proyección (Jones, 1984; White, 1989), los cambios observados en la densidad de terminales-Ch GAT-1-ir entre capas, podría estar relacionado, no solo con la heterogeneidad química de las células en candelabro o con el procedimiento de inmunotinción (véase apartado 4.1.1), sino también con la distribución laminar de las poblaciones de células piramidales que proyectan a sitios particulares (DeFelipe y cols., 2001), que reciben diferentes niveles o tipos de inhibición. Por una parte, como característica específica de las capas supragranulares en la corteza humana y de mono, la mayoría de los SIA inmunoreactivos para 5HT_{1A} eran inervados por terminales-Ch PV-ir en su zona más distal, presentando un mecanismo inhibidor dual, la parte proximal influenciada por fibras serotoninérgicas de una manera paracrina y la parte más distal por GABA de una manera sináptica (Arellano y cols., 2002). Por otro lado, estudios de ME en corteza visual de gato muestran que las neuronas callosas y corticocorticales concentradas en la capa III reciben un número considerable de sinapsis axo-axónicas comparado con las células piramidales de capa VI que proyectan al tálamo (Fariñas y DeFelipe, 1991). Siendo más indicativo de alguna característica de las capas supragranulares que de una población celular única, lo que a su vez, coincide con el bajo número de células Ch teñidas con el método de golgi en capas infragranulares (Jones, 1975; Fairén y Valverde, 1980). Además se ha demostrado que los receptores de GABA_A postsinápticos de las células piramidales supragranulares de rata están enriquecidos en la subunidad $\alpha 2$ mientras que en las capas infragranulares

predomina la a3 (Fritschy y cols., 1998). Por lo tanto, es posible que diferentes subpoblaciones o una misma población de células en candelabro ejerza su actuación a través de diferentes tipos de receptores postsinápticos GABA_A dependiendo de la capa cortical en la que se encuentren.

Todas estas observaciones indican que el SIA de grupos particulares de células de proyección, localizados en capas corticales específicas pueden requerir una densidad de entrada inhibitoria diferente por parte de los terminales-Ch, lo que además puede ser el resultado de diferentes formas de células en candelabro cuyos terminales sean simples o complejos (para una amplia discusión ver DeFelipe y cols., 1985) o de células en candelabro con diferentes grados de convergencia (véase apartado 4.1.4). Por lo tanto, las células en candelabro parecen ejercer su actividad a través de diferente número de terminales axo-axónicos y diferentes tipos de receptores de GABA_A postsinápticos, dependiendo de la capa cortical en el que se encuentren.

4.1.2.3 Distribución de los terminales-Ch en la Formación del Hipocampo

En el cerebro de ratón, los terminales-Ch GAT-1-ir complejos eran más prominentes en las capas II/ III de las cortezas entorhinales y ectorhinales, seguidas por el complejo subicular y a continuación por la formación hipocampal, donde se encontraron en el *stratum pyramidale* de CA1-CA3 y solo ocasionalmente en la capa granular del giro dentado. Estas diferencias de distribución observadas tanto entre la formación del hipocampo y neocorteza y dentro de las regiones del hipocampo, pueden deberse a la organización general más simple del giro dentado, donde las principales neuronas forman una única capa densamente empaquetada (Soriano y cols., 1990). En cualquier caso, nuestros resultados están de acuerdo con previos estudios de microscopía óptica y electrónica en la formación hipocampal de humanos (Seress y cols., 1993; DeFelipe, 1999; Wittner y cols., 2001; Arellano y cols. 2004) mono (Somogyi y cols., 1983), gato (Somogyi y cols., 1985), cobaya (Gulyás y cols., 1993) y rata (Kosaka, 1983; Soriano and Frotscher, 1989; Ribak y cols., 1990; Soriano y cols., 1990, 1993; Li y cols., 1992; Halasy y Somogyi, 1993; revisado en Freund y Buzsáki, 1996) que advirtieron la presencia de células en candelabro en el hipocampo y en el giro dentado, principalmente en material teñido con Golgi y PV.

Generalmente, se mantiene como el circuito básico de la formación hipocampal: las aferentes entorhinales, las fibras musgosas y las colaterales de schaffer (véase apartado 1.2.2). Las células en candelabro junto con las células en cesto podrían proteger el hipocampo de una sobreexcitación dentro de este circuito trisináptico (Soriano y cols., 1990). Así, podría ocurrir que la inhibición GABA-érgica por parte de las células en candelabro sea recurrente sobre las

células granulares. También se han descrito terminales de neuronas GABA-érgicas septales que contactan exclusivamente con cuerpos celulares y dendritas de neuronas GABA-érgicas en el hipocampo (Freund y Antal, 1988), por lo tanto provocando una desinhibición en las células principales del hipocampo (Soriano y cols., 1990). De este modo, a pesar de que se desconoce la contribución exacta de las células en candelabro a la dinámica de los circuitos cerebrales, la distribución observada en nuestro estudio mantienen la hipótesis de que las principales células de todas las áreas hipocampales que participan en la principal cadena excitadora trisináptica están bajo la influencia inhibitoria de las células en candelabro.

4.1.3. Distribución de los terminales en candelabro en áreas telencefálicas no corticales

4.1.3.1. Distribución de los terminales en candelabro en la Corteza piriforme

En nuestro trabajo, hemos descrito la presencia de terminales en candelabro en la corteza piriforme de ratón. La ausencia de terminales-Ch en la capa I y la amplia distribución en las capas II/III coincide con estudios previos en conejo donde observaron el mismo patrón laminar terminales-Ch (Ekstrand y cols., 2001). Sin embargo, no se han descrito en rata, ni en otras especies a pesar de que observaban un intenso marcaje en las mismas capas de interneuronas PV positivas (Kubota y Jones, 1993; Ekstrand y cols., 2001). A pesar de que puede haber diferencias entre especies, dado que la corteza piriforme es una estructura filogenéticamente antigua, es de suponer que hayan podido pasar inadvertidas dentro del grupo de células clasificadas como grandes de morfología multipolar o bipolar localizadas en capas II/III (Zhang y cols., 2006), pues los terminales-Ch son más difíciles de identificar del plexo denso de fibras mediante inmunohistoquímica contra PV que contra GAT1. Así, la presencia de células en candelabro además de otros tipos de interneuronas y la organización de las conexiones sinápticas con las células principales, indican que en la corteza piriforme se mantienen los principios básicos de organización cortical y que estos deben haberse mantenido y refinado durante la evolución como se observa en las estructuras neocorticales de mamíferos superiores.

A la corteza piriforme se le han atribuido además de la codificación olfativa, funciones de asociación en aprendizaje olfativo y participar en procesos de iniciación y propagación en modelos de epilepsia (Wojcik y cols., 2004). Por una parte, los circuitos neuronales de la corteza piriforme median oscilaciones de campo y funciones complejas relacionadas con la integración de claves olfativas con el comportamiento (Zhang y cols. 2006). Dado que las células en candelabro parecen contribuir a la sincronía y oscilación en el hipocampo (Cobb y cols., 1995, Klausberger y cols., 2003), pueden estar ejerciendo en este

sentido un importante papel en las oscilaciones eléctricas que tienen lugar durante el aprendizaje olfativo. Por otro lado, las células en candelabro como hemos visto (vease apartado...) deben estar implicadas en regular los mecanismos de generación y propagación del potencial de acción (Miles y cols., 1996), por lo que es lógico pensar que los procesos de iniciación y propagación de epilepsia que se han descrito en la corteza piriforme (Wojcik y cols., 2004) se deban en gran parte a alteraciones en las células en candelabro que puedan llevar a un desbalance entre los sistemas excitadores e inhibidores, de manera similar a lo que se ha descrito en el hipocampo de pacientes con epilepsia del lóbulo temporal (DeFelipe, 1999).

4.1.3.2. *Distribución de los terminales en candelabro en el Complejo Claustroamigdalino*

En este estudio, demostramos también la presencia de numerosos terminales-Ch complejos en ciertas regiones del complejo claustroramigdalino en ratón, fundamentalmente en estructuras originadas del palium lateral y ventral (McDonald, 1998; Puelles y cols., 2000; Martínez-García y col., 2002; Sah y cols., 2003; Medina y cols., 2004; García-López y cols., 2008). Esta observación está en línea con estudios previos en la rata que muestran densos terminales-Ch inmunoreactivos para PV (Kemppainen y Pitaken, 2000) en estas regiones. En contraste, los terminales-Ch complejos no se observaron en las regiones de la amígdala derivada del subpalium, (área amigdalina centromedial).

En la amígdala, la organización de los circuitos inhibitorios es prácticamente desconocida. La presencia de terminales-Ch dentro de la amígdala indica que existen áreas donde la excitabilidad neuronal es controlada por neuronas GABAérgicas locales, esto sugiere que la distribución de esta inhibición está organizado de una manera topográfica (Kemppainen y Pitaken, 2000). Así, las diferencias observadas entre los distintos núcleos sugieren la presencia de diferentes circuitos inhibitorios. En este sentido, la región palial de la amígdala contiene neuronas excitadoras de proyección (presumiblemente glutamatérgicas), similares a la corteza cerebral y el claustror (Swanson y Petrovich, 1998; Swanson, 2000); y la región subpalial es similar al estriado y al palido, y es rica en neuronas de proyección GABAérgicas (Swanson y Petrovich, 1998; Swanson, 2000; Puelles y cols., 2000, 2001; Sah et al., 2003). Por lo tanto, la presencia de terminales-Ch complejos en el complejo claustroramigdalino podría estar relacionada con la presencia o no de neuronas de proyección glutamatérgicas.

La presencia de terminales en candelabro en los derivados del palium pero no en los derivados del subpalium también puede indicar hechos similares durante el desarrollo en ratas y ratones. En conjunto esto sugiere que las neuronas cuyas dianas son selectivamente el SIA, probablemente no son sólo un componente fundamental de muchas regiones de la corte-

za, si no también de estructuras no-corticales. Por lo tanto, la presencia de terminales-Ch en estas estructuras debe estar relacionada con el importante papel de las células en candelabro en los circuitos del cerebro de ratón.

4.1.4. Relación entre los terminales en candelabro y los segmentos iniciales del axón. Morfología, complejidad de los terminales en candelabro y evolución.

En nuestro estudio, tanto en humano como en ratón, las regiones que presentaron un alto nivel de terminales-Ch complejos intensamente teñidos por inmunohistoquímica convencional contra GAT-1 también mostraban un marcaje punteado (Inda y cols., 2007, 2008). Estos terminales-Ch complejos se encontraron solo en ciertas áreas y capas corticales lo que sugiere una distribución diferencial de terminales-Ch simples y complejos en la corteza cerebral de ratón y en la neocorteza humana.

Con el fin de establecer una relación entre los terminales-Ch y los SIAs utilizamos pIkBa como marcador de SIAs en el cerebro de ratón. Como se ha descrito en estudios previos en ratas (Schultz y cols., 2006), nuestros resultados muestran un marcaje intenso y prominente de los SIAs inmunoreactivos para pIkBa a lo largo de todas las capas y áreas siguiendo patrones citoarquitectónicos de cada región. Por lo tanto, la diferente densidad encontrada entre los terminales-Ch inmunoreactivos para GAT-1 y los SIAs pIkB-ir representa la diferente inervación entre áreas y capas. Por lo tanto, en los derivados del palium dorsal: áreas sensoriales, motoras y asociativas (frontales y parietales) donde no aparecían terminales-Ch robustos, había un intenso marcaje de SIAs pIkB-ir. Esto concuerda con el hecho de que la acumulación de pIkB en el SIA es independiente de la presencia e elementos presinápticos (Schultz y cols., 2006). Los experimentos de doble marcaje revelaron la presencia de filas de botones simples que hacían contacto con los SIAs de las células piramidales. En realidad, los terminales-Ch simples fueron difíciles de identificar en secciones inmunoteñidas con PV o GAT-1 dado que son difíciles de distinguir del plexo denso de elementos inmunoteñidos. Sin embargo, en las secciones con doble inmunohistoquímica para PV y pIkBa era relativamente fácil observar terminales marcados inervando el SIAs, estableciendo entre 3 y 5 contactos sinápticos putativos. Sin embargo, es posible que no todos los terminales axo-axónicos se originen de las células en candelabro, ya que otros tipos de interneuronas establecen sinápsis ocasionales con los SIAs de las neuronas piramidales (Peters y Fairén, 1978; Kisvarday y cols., 1985; Fariñas and DeFelipe, 1991; Gonchar et al., 2002). Además el transportador GAT-1 no es exclusivo de interneuronas, también se ha observado GAT-1 en algunos procesos de astrocitos localizados cercanos a sinápsis simétricas y dispersos en el neuropilo en humano, mono y rata (Conti y

cols., 1998; Minelli y cols., 1995). Por lo tanto, es probable que lo que se consideren terminales-Ch simples incluyen algunos terminales de otros tipos de interneuronas y en algunos casos incluso, procesos de astrocitos. Por otra parte, a pesar de la heterogeneidad química de las células en candelabro (ver revisión DeFelipe 2005), y las diferentes subpoblaciones de terminales-Ch en diferentes áreas y especies descritas (Arellano y cols., 2002). Los terminales-Ch inmunoreactivos para PV y GAT-1 en ratón mostraron patrones de distribución similares (DeFelipe y Gonzalez-Albo, 1998; Hardwick y cols., 2005). Por lo tanto, las células en candelabro que expresan GAT-1 y PV en sus terminales, deben representar la misma subpoblación en los cerebros de ratón.

El conocimiento limitado sobre la morfología comparada de tipos particulares de interneuronas en la corteza cerebral se basa en estudios llevados a cabo con el método de Golgi (Fairén y cols., 1980), lo que dificulta la interpretación de similitudes o diferencias dado lo inconsistente e incompleto de este método. Se han descrito terminales en candelabro simples y complejos en la corteza entorhinal, subicular y giro dentado de la rata (Soriano y cols., 1990, 1993), en la corteza visual de rata (Peters y cols., 1982) y gato (Fairén y Valverde, 1980) y en la corteza somatosensorial de mono (DeFelipe y cols., 1985). Aunque alguna de estas células exclusivamente muestra o una forma o la otra, se desconoce si estas formas simples y complejas pueden proceder de la misma arborización axónica de una única célula en candelabro, (Fairén y Valverde, 1980; Soriano, 1993).

Los terminales-Ch simples estaban formados por una simple fila de botones que contiene entre 5 y 15 varicosidades y los complejos con una densa agregación vertical de hasta 30 botones (Soriano y cols., 1993). Se ha propuesto que la convergencia de colaterales que se originan de diferentes axones a la misma región diana, puede formar la densa agregación de botones verticales que constituyen los terminales en candelabro complejos de la neocorteza y formación hipocámpal en gatos y ratas (Somogyi, 1977; Peters y cols., 1982; Soriano y cols., 1990; Fairén y Valverde, 1980; Freund y cols., 1983). Por lo que los terminales-Ch complejos intensamente marcados que encontramos en ciertas regiones de la neocorteza humana y del cerebro del ratón podrían estar formados por diferentes axones que convergen a la misma neurona postsináptica. Por lo que la variabilidad encontrada entre áreas y capas, como se ha propuesto anteriormente en ratas (Soriano y cols., 1993), podría indicar o que grupos particulares de células de proyección pueden requerir diferente entrada sináptica (véase apartado 4.1.3) de diferentes tipos de células en candelabro, o que hay diferentes grados de convergencia de las células en candelabro sobre un mismo SIA. En este sentido, otro tipo fundamental de interneurona, las células double-bouquet también muestran diferente complejidad de los terminales axónicos, que se distribuyen de manera diferente entre áreas de la neo-

corteza (Yáñez y cols., 2005).

La posibilidad, sin embargo, de que la complejidad de las porciones terminales revele una tendencia evolutiva, es sugerente. En la corteza visual de la rata, las ristas de botones que forman los terminales-Ch tienen una forma relativamente simple (Somogyi, 1977; Peters y cols., 1982). En la corteza visual de gato, por el otro lado, los candiles de los terminales axónicos parecen ser mucho más complicados (Fairén y Valverde, 1980). Por lo tanto, no es sorprendente la baja distribución encontrada en el ratón comparándolo con otras especies de mamíferos y humanos ya que sólo podemos identificar como terminales-Ch los marcados de manera más intensa y robusta. En este estudio fue evidente que los terminales-Ch son relativamente abundantes en la paleocorteza y archicorteza del ratón y que están ausentes en la mayoría de las áreas neocorticales. Sin embargo, estudios previos llevados a cabo principalmente en monos y humanos, se han encontrado numerosos terminales-Ch a través de las áreas neocorticales, paleocorticales y archicorticales, sugiriendo que las células en candelabro muestran una tendencia evolutiva a incrementar la complejidad de sus arborizaciones axonales a medida que la neocorteza se expande y diferencia. En cualquier caso, más estudios serán necesarios para asegurar que estas diferencias de distribución entre áreas y especies se deben a diferencias de densidad, complejidad y/o de convergencia de terminales-Ch.

4.1.5. Variación en la densidad de terminales en candelabro entre individuos

En el estudio realizado con humanos, encontramos que la densidad global de terminales-Ch GAT-1-ir disminuía con la edad. De hecho, había una disminución del 15% en el tejido obtenido del individuo de 69 años de edad comparado con el de 23 años. Sin embargo, estas diferencias no eran estadísticamente significativas y dado que sólo analizamos un individuo de cada edad, las diferencias encontradas podrían deberse únicamente a variabilidad interindividual. Por lo tanto, serían necesarios más estudios con tejido de un mayor número de sujetos, para verificar la disminución de la densidad de terminales-Ch GAT-1-ir relacionada con la edad en la neocorteza humana. No obstante estos resultados, coinciden con la disminución relacionada con la edad en los terminales-ch GAT-1-ir descritos en la capa III de la corteza en monos (Cruz y cols., 2003). Tal declinación no parece representar una disminución dependiente de la edad en el número de neuronas. Ni la densidad neuronal (Pakkenberg y cols., 2003), ni la densidad de los somas inmunoreactivos para PV (que incluyen células en candelabro; Bu y cols., 2003) se ha visto que cambien en función de la edad en la neocorteza humana. Por lo tanto, la retracción axonal de las células en candelabro, la disminución de la expresión de GAT-1, y/o la pérdida de antigenicidad con la edad puede explicar nuestras observaciones.

Sin embargo, dado que hay relativamente pocas células en candelabro, una pérdida de algunas de ellas puede pasar inadvertida cuando se considera a población total de neuronas en estudios estereológicos. Sería necesario examinar los SIA de las células piramidales a microscopía electrónica para definir mejor los procesos implicados en esta pérdida de terminales marcados con GAT-1.

Finalmente, se observó una correlación directa entre la densidad de terminales-Ch GAT-1-ir y la densidad neuronal en áreas 4, 9, 17 y 24. Y no en áreas 18 y 21 en las que no había correlación entre los terminales-Ch GAT-1-ir y la densidad neuronal. Esto implicaría que en las áreas en las que existe una correlación directa, las capas que contengan mayor número de neuronas tendrán, mayor número de candelabros, y viceversa. Por lo tanto, por ésta y por las anteriores observaciones, podemos concluir que hay una heterogeneidad remarkable en la densidad y distribución de los terminales-Ch GAT-1-ir, lo que sugiere que las células en candelabro contribuyen de manera diferente a los circuitos corticales (anatómica y fisiológicamente) de acuerdo con el área y la capa cortical en la que están situadas.

4.2. CANALES IÓNICOS REGULADOS POR VOLTAJE Y PROTEÍNAS ASOCIADAS EN EL SEGMENTO INICIAL DEL AXÓN DE CÉLULAS PIRAMIDALES E INTERNEURONAS

4.2.1. Implicaciones funcionales de las células en candelabro

La importancia fisiológica de las células en candelabro está determinada fundamentalmente porque representan la principal fuente de sinapsis en el SIA. El SIA de las células piramidales corticales es un compartimento único implicado en la regulación de la excitabilidad neuronal, la generación de los potenciales de acción y la conversión de la entrada de los potenciales sinápticos en salida neuronal (Stuart y Sakmann, 1994; Colbert y Johnston, 1996). Por ello, a pesar de que se desconoce la contribución parcial de las células en candelabro a la dinámica de los circuitos corticales, se considera que ejercen un papel fundamental en el control de la excitabilidad celular, evocan eventos inhibidores postsinápticos en las células piramidales (Buhl y cols., 1994), así deben estar implicadas en regular los mecanismos de generación y propagación del potencial de acción (Miles y cols., 1996) y también contribuir a la sincronía y oscilación en el hipocampo tales como el ritmo theta que ocurre durante el sueño de ondas lentas (Cobb y cols., 1995; Klausberger y cols., 2003; véase apartado 1.4.4). Dado que las células en candelabro no pueden estudiarse sin considerar su diana, el SIA, y la anatomía del SIA manifiesta su función, en este trabajo hemos realizado un análisis de los componentes estructurales y su localización respecto a los terminales en candelabro.

4.2.2. Caracterización de los componentes fundamentales de los Nodos de Ranvier y de los segmentos iniciales del axón en la neocorteza humana

La base para la generación y propagación a saltos de los potenciales de acción es la exquisita arquitectura molecular de las fibras nerviosas, principalmente en la segregación de canales iónicos regulados por voltaje en distintos dominios de membrana (Arroyo y Scherer, 2000; Scherer, 1999; Peles y Salzer, 2000; Scherer y Arroyo, 2002; Salzer, 2003). Tanto en el sistema nervioso central como en el periférico, las fibras mielinizadas están organizadas en distintos dominios: el Nodo de Ranvier, las regiones paranodales y yuxtaparanodales, y el internodo (Salzer, 1997; Arroyo y Scherer, 2000). Los canales de Na y K dependientes de voltaje están segregados espacialmente y distribuidos simétricamente en los nodos de ranvier. Los canales de Na y K dependientes de voltaje están restringidos a las regiones nodales y yuxtaparanodales, respectivamente, las cuales están separadas por la región paranodal (véase apartado 1.5.2.). Esta segregación se lleva a cabo a través de mecanismos específicos acoplados al anclaje y agrupamiento de estas proteínas en la membrana plasmática. Los canales iónicos que subyacen a la excitabilidad están compartimentalizados en regiones subcelulares claramente definidas y forman complejos heteromultiméricos que también contienen andamiaje intracelular, adaptadores, y proteínas del citoesqueleto, proteínas transmembranarias, y elementos de la matriz extracelular.

Las similitudes en las membranas del SIA y de los Nodos de Ranvier (Palay y cols., 1968; Peters y cols., 1968) se extienden en presencia de una capa de membrana electro-densa que es necesaria para agrupar los canales iónicos regulados por voltaje (Matsumoto y Rosenbluth, 1985). Sin embargo, mientras la arquitectura molecular de los nodos de ranvier ha sido ampliamente estudiada en el SNC de rata y en sistema nervioso periférico, mucho menos se conoce acerca del SIA. En este estudio caracterizamos la expresión de canales de Na y de Kv1.2, y algunas de sus proteínas asociadas, en los nodos de Ranvier y en el SIA de las células piramidales y las interneuronas de la neocorteza humana. Los resultados indican que la organización de los nodos de Ranvier de humanos es similar a los descritos previamente en otras regiones del SNC de roedores. Los resultados también indican que algunas características observadas en el SIA son comunes a los nodos de ranvier, particularmente en lo que se refiere a las moléculas con las cuales se pueden asociar los canales iónicos. Sin embargo también encontramos diferencias fundamentales de distribución de canales iónicos entre los nodos de Ranvier y el SIA de células piramidales e interneuronas.

4.2.3. Canales de sodio dependientes de voltaje.

Los canales de sodio son responsables de las corrientes de entrada rápida de sodio y la consecuente despolarización que se requiere para la inducción del potencial de acción y la conducción saltatoria (Catterall, 2000).

El anticuerpo de canales de sodio (anti-pan) utilizado en este estudio reconoce todas las isoformas conocidas del canal de sodio en vertebrados (Rasband y cols., 1999), y, por lo tanto se piensa que refleja el repertorio completo de canales de Na en el SIA, donde se distribuyen a lo largo de toda su longitud. Hemos observado también que los canales de Na están distribuidos en estructuras tipo punto que colocan con espectrina IVb y que debido a su relación espacial con las regiones paranodales y yuxtaparanodales (véase más abajo) y de acuerdo con estudios previos fueron interpretados como las regiones nodales de los nodos de Ranvier en las cuales los canales de Na están agrupados en una alta densidad. En estas estructuras, se asocian con el citoesqueleto de actina-espectrina subyacente a través de la proteína adaptadora Ankirina G y a NrCAM y neurofascina 186, moléculas de adhesión celular nodal de la superfamilia de las inmunoglobulinas (Ig) (Arroyo y Scherer, 2000; Poliak y Peles, 2003). Las mismas interacciones moleculares parecen tener lugar en el SIA en diferentes poblaciones neuronales del SNC de rata, donde NrCAM y neurofascina 186 se han demostrado que están concentradas (Davis y cols., 1993; Davis y cols., 1996; Lambert y cols., 1997; Zhou y cols., 1998; Jenkins y Bennett, 2001). Además, la espectrina IV β se ha visto que se concentra en el SIA tanto en células neocorticales como hipocámpales, donde podría estar implicada en la localización de los canales de Na y ankirina G (Berghs y cols., 2000; Komada y Soriano, 2002; Lacas-Gervais y cols., 2004). De acuerdo con estos estudios, el SIA de células piramidales neocorticales en humanos expresa canales de Na dependientes de voltaje y espectrina IV β , que colocaliza a lo largo del SIA en prácticamente todas las células piramidales. Sin embargo, nosotros observamos poca colocalización con ankirina G. El anticuerpo utilizado en este estudio para reconocer a la ankirina G identifica una proteína pequeña de entre 200 y 300 kDa que podría corresponder con solo una de las isoformas nodales establecidas (270 kDa). Por lo tanto, puede que no reconozca la isoforma de 480-kDa (Davis y cols., 1996; Zhou y cols., 1998; Zhang y Bennett 1996) o la de 97-kDa (39, 40) previamente identificadas como componentes nodales del SNC. Así mismo podría ocurrir que fuera otro tipo de ankirina diferente a la G que no fuera reconocida por nuestro anticuerpo la que se localice en el SIA pero con una estructura tal que continúe estableciendo el mismo ensamblaje con los componentes del citoesqueleto y con el complejo canal. La ausencia de cualquier tipo de ankirina modificaría el diseño de inter-

acciones establecido hasta el momento, incluso el anclaje a componentes del citoesqueleto podría ser a través de espectrina directamente (Bennett y Gilligan, 1993). De modo que este ensamblaje descrito principalmente en los nodos de Ranvier (Bennett y Lambert, 1999), puede variar en el SIA (Garrido y cols., 2003). Por ello, dado que la isoforma de ankirina G que parece estar presente en solo el 15% de las células piramidales de la neocorteza humana (en nuestro estudio), diferentes polipéptidos de ankirina G u otras proteínas de anclaje podrían participar en el agrupamiento de los CSDV en el SIA de específicas poblaciones de células piramidales.

4.2.4. Canales de potasio dependientes de voltaje

Los canales de K dependientes de voltaje rectificadores tardíos de la subfamilia Kv 1 se han descrito en los nodos de ranvier en conejos, ratones y ratas principalmente, donde se encuentran en la membrana axonal juxtapanodal por debajo de la mielina compacta (Chiu y Ritchie, 1980; Wang y cols., 1993; Mi y cols., 1995). Así mismo, nosotros encontramos Kv1.2, junto con Caspr2 distribuidos en la neocorteza humana en dominios orientados simétricamente a ambos lados de la región nodal, pero separados de él por dos espacios simétricos que corresponden con las regiones paranodales. Los canales Kv1 generan un umbral bajo de corrientes de salida dependientes de voltaje que parecen regular el umbral del potencial de acción. Contribuyen a la repolarización de los potenciales de acción únicos, individuales, modulan la duración y frecuencia del potencial de acción y mantienen el potencial de reposo internodal (Zhou y cols., 1998; Smart y cols., 1998; Vabnick y cols., 1999). Los canales de Kv juxtapanodales están compuestos por varias combinaciones heteromultiméricas de Kv1 a que forman poros (Kv 1.1, 1.2, 1.4 y 1.6) y las subunidades citoplásmicas asociadas Kv b2 (Wang y cols., 1993; Hopkins y cols., 1994; Mi y cols., 1995; Rhodes y cols., 1997). En la región juxtapanodal, Kv1.1 y Kv1.2 se ha mostrado que colocalizan, interactúan y/o se agrupan con Caspr2, un miembro de la superfamilia de las neurexinas (Poliak y cols., 2001). Es más, Caspr2 también interactúa con otras proteínas necesarias para la acumulación de canales Kv en la región juxtapanodal y para su interacción con el citoesqueleto de actina-espectrina (Rasband y cols., 2002; Poliak y Peles, 2003; Denisenko-Nehrbass y cols., 2003). Finalmente, en el presente estudio, las regiones nodales y yuxtaparanodales en los nodos de Ranvier se encontraron separadas por dos dominios simétricos debido a los canales iónicos y caracterizados por la expresión de Caspr. De acuerdo con estudios previos corresponden con las regiones paranodales caracterizadas por la ausencia de canales iónicos, y la expresión de Caspr y otras proteínas axonales como espectrina aII, espectrina bII y ankirina B (Ogawa y cols., 2006) que funcionan como sitios de

unión para la mielina y como barreras de difusión paracelular y de proteínas de membrana (Schafer y Rasband, 2006).

En resumen, nuestros resultados muestran que en los nodos de ranvier y en las células piramidales de la neocorteza humana, los canales Kv1.2 se agrupan y colocalizan con la molécula de adhesión Caspr2 exclusivamente en la región juxtapanodal y en el dominio distal del SIA, respectivamente. Por una parte, nuestro estudio muestra que los nodos de Ranvier de la neocorteza humana comparten los mismos principios de organización y expresión de patrones moleculares, que incluyen lo de los canales iónicos, descritos previamente en otras regiones del SNC. Por otro lado, se observan similitudes entre los nodos de ranvier y los SIAs en cuanto a la organización de componentes estructurales e interacciones. Sin embargo, los canales de Na y K dependientes de voltaje están segregados espacialmente y simétricamente distribuidos en los nodos de Ranvier y en los SIA se observa cierto grado de solapamiento. Esta región del SIA en las células piramidales está invadida por terminales-Ch, y por lo tanto, desprovista de mielina. Por contraste, Kv1.2 se localiza por debajo de la vaina de mielina compacta en los yuxtaparanodos. A continuación haremos una descripción más amplia acerca de las diferencias observadas y de sus posibles causas durante la segregación en el desarrollo y las consecuencias de las mismas.

4.2.5. Diferente distribución de los canales de Na y de K dependientes de voltaje en el segmento inicial del axón de células piramidales y de los nodos de ranvier.

En los nodos de ranvier, los canales de Na y los Kv1.2 están distribuidos simétricamente y espacialmente segregados, confinados a las regiones nodales y yuxtaparanodales, respectivamente, separados por la región paranodal (Poliak y Peles, 2003; Salzer, 2003). Nuestros resultados muestran que al contrario de los nodos de ranvier, los canales de Na y K dependientes de voltaje sólo están parcialmente segregados en el SIA y hay un cierto grado de solapamiento en la porción distal del SIA, donde se expresan los canales Kv1.2 (Figura 18).

La presencia de los terminales-Ch en aposición con el SIA de células piramidales puede ser un posible mecanismo que ayude a mantener los canales de Kv1.2 en la región distal del SIA. En nuestro trabajo, concordando con otros autores (Somogyi, 1977; Fairén y Valverde, 1980; Peters y cols., 1982; Freund y cols., 1983) encontramos que los terminales Ch se localizan en la región más distal del SIA a cierta distancia del axon hillock y el final del terminal Ch con el comienzo de la vaina de mielina, sin embargo hay controversia en cuanto a la localización de las sinapsis en el SIA. Se ha sugerido una distribución homogénea de las sinapsis en el SIA (Sloper y Powell, 1979) incluso, hay evidencias de una disminución del

número de sinapsis a lo largo del SIA (Fariñas y De-Felipe, 1991). Estas diferencias encontradas pueden atribuirse a la utilización de especies distintas y diferentes áreas corticales, en las que puede variar la localización de las sinapsis en el SIA. Por otra parte, hay que tener en cuenta los diferentes métodos utilizados en cada estudio que dada la heterogeneidad de los terminales Ch pueden dar resultados contradictorios.

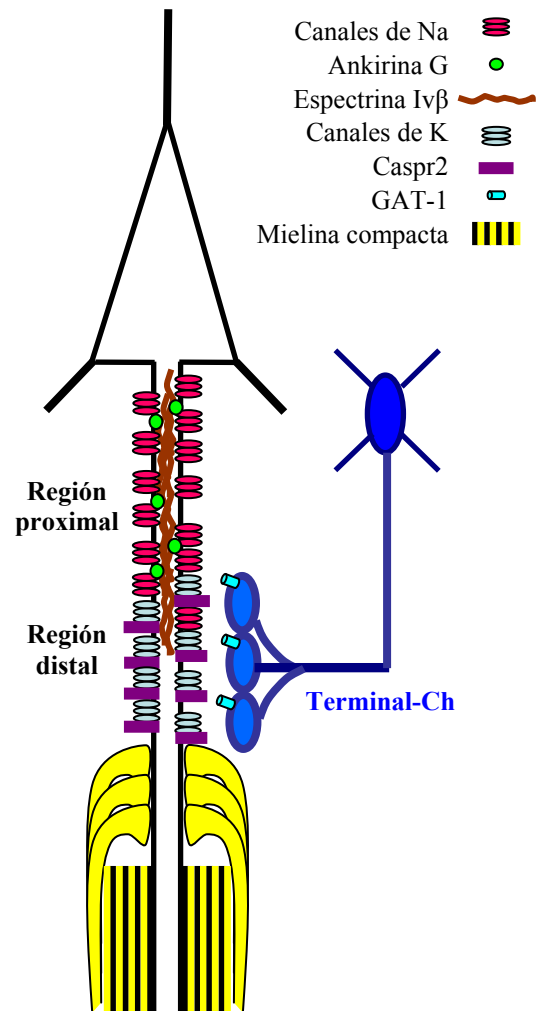


Figura 18. Representación esquemática de la distribución de los canales iónicos y proteínas en el segmento inicial del axón de la célula piramidal de la neocorteza humana. En azul representamos la invasión GABAérgica por parte de la célula en candelabro.

En cualquier caso, los mecanismos que producen la segregación de los canales de Kv1.2 en el SIA hasta el momento, se desconocen. En corteza cerebelosa de roedores adultos, las células en cesto contactan con las células de purkinje a nivel del soma y SIA formando las “sinapsis en pincel”, su compartimento de invasión evoca a las células axo-axónicas de la corteza. Esta focalización hacia una determinada región de invasión puede estar mediada por las proteínas de adhesión de la familia L1CAM y la Neurofascina 186, la única descrita en el SIA de las neuronas de purkinje (Davis y cols., 1996) que se encuentra formando un gradiente a lo largo de los compartimen-

tos SIA-somatodendrítico. Este gradiente, que se pierde en ratones mutantes para Ankirina G, parece ser fundamental para una correcta formación y localización de la “sinapsis en pincel” a nivel del SIA (Ango y cols., 2004). Esto sugiere que determinadas moléculas de adhesión localizadas en la región distal del SIA en células piramidales humanas puedan estar ejerciendo un efecto de señalización similar sobre la localización específica del terminal-Ch en el desarrollo de la corteza.

Por otro lado, en el SIA de células piramidales y en los nodos de Ranvier del SNC también se han descrito las proteínas de adhesión de la familia L1-CAM, tales como neurofascina y NrCAM, concentradas en diferentes tipos neuronales implicadas en la restricción de los canales iónicos dependientes de voltaje a estas regiones (Davis y cols., 1996; Hortsch, 1996; Bennett y Lambert, 1999) (referencias en Arellano y cols., 2002; o véase en el apartado 1.5.2). El hecho de que hayan descrito terminales-Ch positivos para PSANCAM que además expresan GAT-1 en la corteza temporal humana (Arellano y cols., 2002) sugiere que se produzca una interacción con el SIA a través de moléculas de adhesión que puedan mediar mecanismos de anclaje y agrupamiento. De hecho, se han encontrado en estudios de microscopía electrónica uniones adherentes entre los botones de terminales-Ch y el SIA caracterizados por acumulación simétrica de material a ambos lados de la membrana (Fairén y Valverde, 1980; Peters y cols., 1982). De este modo, los terminales-Ch en la corteza cerebral, localizados en la región distal del SIA junto con Caspr2 y kv1.2 podrían estar guiando la regionalización y distribución de moléculas en el SIA durante el desarrollo. Sin embargo, hay que destacar que las células ganglionares de la retina de rata los canales de Kv1.2 están excluidos de la región proximal del SIA (van Wart et al., 2007) y los cuales, hasta donde sabemos no están inervados específicamente por terminales axónicos. Por lo tanto, en base a esto, el terminal-Ch podría no estar ejerciendo ningún efecto sobre el agrupamiento y ensamblaje de los componentes del SIA, ni a la inversa; también podría ocurrir que estos mecanismos varíen entre los distintos tipos celulares.

Por otro lado, las consecuencias funcionales de la distribución de canales de K se ha estudiado en rata; sobre las primeras tres semanas de desarrollo postnatal en el sistema nervioso periférico de rata, el agrupamiento de canales Kv1 es frecuentemente asimétrico (50%), y los canales pueden encontrarse exclusivamente en el yuxtaparanodo distal (Vabnick y cols., 1999). Esta distribución asimétrica es transitoria, durando sólo hasta el final de la tercera semana postnatal y puede llevar a inestabilidad en la propagación del potencial de acción (Vabnick y cols., 1999).

De esta manera, es fundamental determinar las consecuencias funcionales de la distribución asimétrica de los canales de Na y K dependientes de voltaje en el SIA de células de la neocorteza humana. De hecho, estudios recientes en neuronas de capa 5 de

rata han descrito la importancia de esta segregación de los canales en el SIA. Los canales Kv1 estratégicamente posicionados en la región distal del SIA integran las señales subumbrales, proporcionando control sobre la forma del PA, estas modificaciones locales se propagan ortodrómicamente a una distancia significativa en el axón. Lo que indica que los canales Kv1 actúan presinápticamente inhibiendo la liberación de transmisor y por lo tanto ejercen un control inhibitorio potente sobre la amplitud de sinapsis intracorticales (Kole y cols., 2007). Es posible que este control sobre la eficacia sináptica tenga lugar del mismo modo o similar en la neocorteza humana, dada la localización distal de estos canales. Esto refuerza el papel importante del correcto ensamblaje y localización de estos canales iónicos en el SIA. Y sugiere, dada la localización distal en el SIA de los terminales axo-axónicos, nuevas cuestiones acerca de las posibles implicaciones de las células en candelabro en el control de los circuitos corticales.

4.2.6. Distribución de los canales de Na y K en el segmento inicial del axón de las interneuronas de la neocorteza humana

Nuestros datos indican que el SIA de las interneuronas corticales humanas, que incluyen aquellas inmunoreactivas para PV, CB y CR [las cuales constituyen una gran proporción del total de las interneuronas (DeFelipe, 2002; véase apartado 1.4.3)], también expresan canales de Na dependientes de voltaje, con una distribución similar a los encontrados en el SIA de células piramidales, a lo largo de prácticamente toda la estructura. Sin embargo, el anticuerpo utilizado no permite discriminar entre las diferentes subunidades de canales de Na; no sería de extrañar, encontrar al igual que en células ganglionares de rata, diferentes tipos de canales a lo largo del SIA, Na1.1 y 1.6 en las regiones proximales y distales, respectivamente (van Wart y cols., 2007). Por ello, deberá evaluarse en estudios futuros la presencia de diferentes subunidades de canales de Na en el SIA de células piramidales o en la región nodal respecto a interneuronas, o incluso diferentes tipos de canales de Na dependientes de voltaje en diferentes subpoblaciones de interneuronas.

En el presente estudio, los canales de Kv1.2 se encuentran acumulados en el SIA de las interneuronas neocorticales humanas. Aunque no se ha realizado una valoración directa, el hecho de que se hayan identificado SIA positivos para canales de Kv1.2 como procesos que emergen justo del cuerpo celular o de una dendrita principal, indican que los canales de Kv1.2 en las interneuronas se distribuyen a lo largo de toda la extensión del SIA. Con la excepción de grandes células en cesto inmunorreactivas para PV cuyos axones están mielinizados, las interneuronas positivas para CB, CR y PV son interneuronas de circuito local con axones no mielinizados que establecen conexiones locales con elementos adyacentes

(véase DeFelipe y cols., 1985, 1986). Por otro lado, como en el caso de las células piramidales corticales y al contrario que en la situación de las regiones yuxtapanodales de los axones mielinizados (Rasband y cols., 1999; Poliak y cols., 2001; Poliak y Peles, 2003), la presencia de mielina compacta no se requiere para el agrupamiento de los canales de Kv1.2. Otra diferencia importante entre los SIA de las células piramidales y de las interneuronas se refiere a la inervación por axones GABAérgicos. Mientras los SIAs de las células piramidales en general están inervados densamente por los terminales-Ch positivos para PV; el presente estudio, junto con datos previos (Peters y cols. 1982; Fairén y Valverde, 1980; Somogyi y cols., 1982; Kisvarday y cols., 1986) indica que las interneuronas corticales carecen en gran medida de una inervación GABAérgica densa en el SIA. Esto podría explicar la ausencia de segregación de los canales de Na dependientes de voltaje y de Kv1.2 en las interneuronas (véase apartado 4.2.5). Sin embargo, dado que se desconocen los mecanismos que subyacen a la agrupación y ensamblaje en el SIA durante el desarrollo y teniendo en cuenta la controversia existente serán necesarios futuros estudios para elucidar esta cuestión.

En conclusión, nuestro estudio indica que las interacciones moleculares y la segregación de los canales de Na dependientes de voltaje y Kv1.2 en los nodos de Ranvier de las fibras mielinizadas en la neocorteza humana parece compartir los mismos principios de organización que otras regiones del SNC y especies. Además, a pesar de las diferencias morfológicas, moleculares y fisiológicas entre las células piramidales y las interneurona, y entre diferentes subpoblaciones de interneuronas, sus SIAs aparentemente comparten una organización molecular similar, la cual al contrario de la situación de los nodos de Ranvier, los canales de Na y K se distribuyen asimétricamente y solapan espacialmente en su extensión que puede variar dependiendo de su inervación en el SIA.

4.2.7. Modulación del disparo del potencial de acción en el segmento inicial del axón por las células en candelabro

El hecho de que encontremos en nuestro estudio una localización distal de la inervación GABAérgica por parte de las células en candelabro sobre el SIA, sugiere además de una posible interacción con los componentes postsinápticos, implicaciones funcionales acerca de la modulación de la excitabilidad neuronal.

Una de las funciones que se le atribuyen a las células en candelabro es amortiguar la excesiva excitabilidad neuronal (Buhl, 1994). El efecto inhibitorio puede implicar hiperpolarización y bloqueo del disparo de potencial de acción (Miles y cols., 1996) o llevar a cambios de conductancia de membrana que reduce la amplitud de respuestas excitadoras (Borg-Graham y cols., 1998) (véase apartado 1.4.4). Sin

embargo, el punto preciso en el cual se inicia el potencial de acción en las células de la corteza humana todavía no se conoce. En diferentes tipos neuronales, incluyendo las células de Purkinje del cerebelo (Stuart, 1997; Clark y cols., 2005) y las células piramidales del subiculum (Colbert y Johnston, 1996) y neocorteza (Colbert y Pan, 2002), se ha demostrado que los potenciales de acción se generan por primera vez más allá del SIA. Además, este evento ocurre en el primer nodo de Ranvier, lo cual muestra un bajo umbral para el inicio del potencial de acción. Los potenciales de acción que se generan en puntos distales del axón invaden el soma y las dendritas, un proceso que depende de la presencia de CSDV en el SIA que sirven para propagar retrógradamente los potenciales de acción a soma y dendritas (Mainen y cols., 1995; Stuart y cols., 1997; Colbert y Pan, 2002; Clark y cols., 2005;). No obstante, parece que la inhibición por inervación selectiva de la parte distal del SIA en las células piramidales humanas podría ser direccional (Howard y cols., 2005), siendo más efectiva desde el soma al axón o viceversa. En la región distal del SIA se localizan los canales de K regulados por voltaje y la región proximal del SIA muestra una alta densidad de CSDV, lo que parece hacerlos menos accesible a la influencia inhibitoria de los terminales-Ch. Esta región proximal es probable que sea inervada por otros tipos de interneuronas que ocasionalmente forman sinapsis con el SIA (Fariñas y DeFelipe, 1991; Gonchar y cols., 2002). Por otra parte, se ha descrito en la corteza entorrinal y temporal en humanos un marcaje de terminales Ch positivos para PSANCAM distales a los SIAs inmunorreactivos para 5HT1A (Arellano y cols., 2002). Estos sugiere que un mecanismo de inhibición dual controla la actividad de las células piramidales, la parte proximal de los axones piramidales estarían influenciado por serotonina de una manera paracrina, y la parte más distal por GABA de modo sináptico (DeFelipe y cols., 2001). La selectividad direccional mencionada anteriormente, y el patrón consecuente de disparo de potencial de acción y propagación retrógrada en las células piramidales, podrían de este modo, variar dependiendo de la regulación de las conductancias al K el SIA por diferentes sistemas de neurotransmisores como los de sistemas ascendentes serotoninérgico y colinérgico (Cooper y cols., 2001; DeFelipe y cols., 2001; Devaux y cols., 2004).

La inhibición del SIA por la entrada GABAérgica de las células en candelabro o a través de otros neurotransmisores, podría disociar el soma del lugar de inicio del potencial de acción. Como resultado, no sólo recibiría inhibición orthodrómica que simplemente suprimiera el inicio del potencial, sino también la inhibición antidrómica. Este último tipo de inhibición podría tener importantes consecuencias en el control de la propagación retrógrada de los potenciales de acción, que influyen en el nivel de salida neuronal al soma y árbol dendrítico, que es necesario para la integración de información (Stuart y cols.,

1997). De hecho, estudios recientes indican que las células en candelabro, junto con otras interneuronas, están implicadas en actividades complejas. Estas acciones contribuyen a asegurar la hiperpolarización a tiempo que regula el disparo de las células piramidales y da forma a la salida de la red y los ritmos que se generan en diferentes estados de conciencia (Cobb y cols., 1995; Whittington y Traub, 2003; Klausberger y cols., 2003; Klausberger y cols., 2004; Howard y cols., 2005; Somogyi y Klausberger, 2005).

Estos sistemas reguladores, junto con las células en candelabro y otros tipos de interneuronas GABAérgicas, podría modificar los requerimientos fisiológicos para la generación de potenciales de acción y posiblemente, la localización a los cuales se inicia el potencial de acción en las células piramidales humanas. Esta regulación puede tener lugar a través de la acción directa en el SIA, una posibilidad fascinante que tendrá que ser evaluada en estudios posteriores.

4.2.8. Presencia de pIkBa en el segmento inicial del axón. Ruta de señalización de NFκB y su implicación en el desarrollo axónico

La presencia de pIkBa en el SIA de neuronas en la corteza cerebral humana y de ratón está de acuerdo con los resultados de un estudio previo donde pIkBa y otros elementos de la vía NF-κB, tales como la forma activa de IKKα/β y p65 fosforilada en Ser536, se encontraron en el SIA de neuronas en diferentes regiones del cerebro de ratas. A pesar de la menor densidad de SIAs inmunorreactivos para pIkBa y la débil intensidad de marcaje en las capas infragranulares comparadas con las supragranulares en las neuronas de la neocorteza humana que contrasta con la amplia distribución de SIAs pIkBa-ir en el cerebro de roedores (Schultz et al., 2006, nuestras propias observaciones), nuestras observaciones sugieren que la expresión de pIkBa en el SIA es un hecho general de la corteza, manteniéndose constitutivamente activo NF-κB en las neuronas (Schultz et al., 2006). Pues las diferencias observadas en material humano podría estar relacionado con pérdida de inmunogenicidad debido a la diferente fijación por inmersión de las capas corticales superficiales respecto a las profundas de las muestras de biopsias.

Ya que la adhesión mediada por N-CAM en la membrana aumenta la unión de NF-κBα al DNA y la transcripción génica regulada por NF-κBα en las células granulares del cerebelo (Krushel y cols., 1999; Crossin y Krushel, 2000), la acumulación de pIkBa en el SIA podría estar relacionada con la presencia de moléculas de adhesión en el SIA. Por una parte, pIkBa está asociado con microtúbulos fasciculados más que con la membrana en el SIA de neuronas de roedores (Schultz et al., 2006), por lo que parece poco probable que pIkBa interactúe con el complejo canales de Na/espectrina IVB/Ankirina G en las células corticales humanas. Por otro lado, la kinasa que

fosforila a IkBα, colocaliza con pIkBa y espectrina IVB en el SIA de rata, y está asociada con la membrana (Schultz et al., 2006). La distribución de esta kinasa en las células piramidales humanas se desconoce, pero teniendo en cuenta que pIkBa se distribuye a través de todo el SIA mientras que el complejo Kv1.2/Caspr2 está restringido a la parte distal del SIA (Inda et al., 2006), la interacción de la kinasa IkB con la membrana del SIA y la consecuente activación inducida por fosforilación de señalización de NF-κB podría estar relacionada con el complejo Canales de Na/neurofascina/NrCAM/espectrinaIVB/AnkirinaG más que con el complejo Kv1.2/Caspr2. Además, el hecho de que observemos un intenso marcaje de pIkB en el SIA apoya así mismo la presencia de componentes de la familia de la ankirina (véase apartado 4.2.5), pues éstas presentan una región de repeticiones ANK que median el reconocimiento de un gran número de proteínas entre las que se encuentran factores de transcripción y proteínas NfKappa/IKappaB (Cramer y Muller, 1999). Por otra parte, se ha descrito que pIkBa se ubiquitina y degrada en el proteasoma (DiDonato y cols., 1997; Mercurio y cols., 1997; Yaron y cols., 1998). Por lo que puede ocurrir que se observe una acumulación de proteína IkBα fosforilada en el SIA debido a que el sistema de degradación en el proteasoma esté interrumpido a este nivel. Sin embargo, es extraño que se produzcan alteraciones de este tipo en prácticamente todas las células de la corteza y en una región tan especializada como el SIA, lo que sugiere que la localización de pIkBa no se deba a la acumulación de un producto de degradación, sino que por si mismo pueda ejercer una función importante en el SIA que queda por determinar.

Hasta el momento se desconoce el significado funcional que puede tener la activación de la vía de NFκB en el AIS, las señales que la inducen y los efectos que pueden suponer para la supervivencia neuronal, la generación de potenciales de acción, en el establecimiento de la polaridad neuronal y en el crecimiento axonal. Además, estudios en diversos tipos celulares han mostrado indicios de su posible interacción con otras vías de señalización como PI3k, GSK3, PKC, JNK, calcineurina ó Akt (Alzhuerrri y Chang, 2003). Incluso, se ha demostrado este papel anti-apoptótico contra el β-amiloide en neuronas corticales en la enfermedad de alzheimer, así como un papel importante en mecanismos de control del ciclo celular y diferenciación durante el desarrollo (revisado en Chen y cols., 2001). De hecho, estudios recientes (comunicaciones a congresos de Garrido) han puesto de manifiesto que es una molécula que se encuentra en estadios tempranos de fibroblastos en cultivo y parece tener un papel crucial durante la formación del SIA. Estos datos plantean un escenario complejo en el que es posible la implicación pIkBa en la transmisión de una amplia variedad de señales que a su vez podrían regular diversos procesos en el AIS.

Independientemente del papel que realice

pI κ B α , los SIA inmunoreactivos para pI κ B α son indicadores del número de neuronas y la proporción de las mismas inervadas por terminales-Ch en diferentes regiones del cerebro del ratón y en la corteza temporal e hipocampo humano. A la inversa las alteraciones en la inervación GABAérgica del SIA por parte de los terminales Ch podría afectar la expresión de pI κ B α en hipocampo esclerótico, como discutiremos en el siguiente apartado. Por ello, es fundamental estudios con estos marcadores para establecer diferencias de distribución de terminales Ch y conocer el posible papel del pI κ B en el SIA tanto en situaciones normales como en patológicas.

4.2.9. Acumulación de pI κ B α en la neocorteza temporal y formación del hipocampo en pacientes de epilepsia

Un gran número de alteraciones en las células en candelabro surgen en el hipocampo esclerótico de pacientes epilépticos. Estas alteraciones pueden incluir la pérdida de terminales-Ch, el aumento en la complejidad de estos terminales y cambios en la expresión de sus características neuroquímicas en diferentes campos de la misma formación hipocampal (Arellano et al., 2004; véase apartado 1.4.5). Por lo tanto, en este estudio otro objetivo importante era examinar el hipocampo de pacientes con esclerosis hipocampal para estudiar si las alteraciones en la inervación GABAérgica del SIA por terminales-Ch afectan la expresión de pI κ B α .

En nuestro estudio observamos que al igual que en las zonas no escleróticas, el SIA de numerosas neuronas en las zonas escleróticas y bordes expresa pI κ B α , áreas que probablemente estén implicadas en actividad epileptiforme (Cohen y cols., 2006). De manera que, la expresión de pI κ B α aparentemente no está afectada en las neuronas supervivientes dentro de la formación hipocampal de pacientes con epilepsia del lóbulo temporal. La acumulación de pI κ B α en el SIA de algunas neuronas supervivientes de las zonas escleróticas y las regiones bordes de CA1 en el tejido de pacientes epilépticos, con una inervación anormalmente densa de terminales-Ch, o con ausencia de terminales PV-ir alrededor del SIA (Arellano y cols., 2004) mantiene además esta hipótesis. Por lo tanto, la expresión de pI κ B α a través de la extensión del SIA de las células piramidales humanas indica que la acumulación de pI κ B α en el SIA es independiente de la inervación de este compartimento axonal. En este sentido, la agrupación *in vitro* e *in vivo* de pI κ B α en neuronas hipocampales inmaduras previa a la sinaptogénesis es una evidencia más de que la acumulación de pI κ B α en el SIA es independiente de la presencia de elementos presinápticos (Schultz y cols., 2006; observaciones no publicadas).

Por otra parte, la presencia de neuronas con SIA marcados en estas regiones con pérdida neuronal dramática en las regiones escleróticas del hipocampo epiléptico sugiere que la presencia de pI κ B α no está

relacionado con la vulnerabilidad de las neuronas al daño. Sin embargo, no sabemos si estas células que desaparecen en estas regiones escleróticas eran esas que previamente mostraban alteraciones de la expresión de pI κ B α en el SIA. Además, los nuestros resultados indican que la fosforilación mediada por la kinasa I κ B, la acumulación de pI κ B α y la activación de NF- κ B α en el SIA no está asociado con actividad epileptiforme. Esto está de acuerdo con estudios de neuronas hipocampales de roedores en cultivo que demuestran que el agrupamiento de pI κ B α y la activación de la kinasa I κ B persistía a pesar de la supresión de los potenciales de acción mediada por TTX hasta 24 horas (Schultz y cols., 2006). Al respecto es importante señalar que el SIA no es sólo un compartimento esencial para la generación y retropropagación de los potenciales de acción (Stuart y Sakmann, 1994; Colbert y Johnston, 1996), y para el establecimiento de una barrera de difusión que mantiene la organización apropiada de proteínas de membrana (Winckler y cols., 1999), sino que también controla los mecanismos de transporte anterógrado y retrógrado entre el soma y las regiones más distales del axón.

Por todo esto, la acumulación de pI κ B α , la activación de la vía NF- κ B, la estructura e interacción entre los componentes del SIA y su relación con la inervación GABAérgica por parte de las células en candelabro son cuestiones fundamentales que deberán abordarse en estudios futuros desde un enfoque multidisciplinar aunando estudios morfológicos, moleculares y fisiológicos, y de este modo conocer la importancia de cada uno de estos elementos en la dinámica de los circuitos cerebrales y su posible implicación en situaciones patológicas.

CONCLUSIONES

DISTRIBUCIÓN DE TERMINALES EN CANDELABRO

1. Existe una gran heterogeneidad en la distribución y densidad de terminales en candelabro complejos immuno-reactivos para GAT-1. Por tanto existe una gran variabilidad en la innervación GABAérgica del segmento inicial del axón de las neuronas principales en las distintas áreas del telencéfalo en el ratón.

2. En el complejo claustroramigdalino del ratón, los terminales en candelabro están presentes en aquellas áreas derivadas del palium lateral y ventral pero no en las estructuras derivadas del subpalium. Esto sugiere que su distribución podría estar relacionada con el origen embrionario de cada región.

3. En la corteza cerebral del ratón, la paleocorteza (corteza piriforme) presenta la mayor densidad aparente de terminales en candelabro complejos, seguida por las distintas regiones de la archicorteza (formación del hipocampo). La neocorteza presenta la menor densidad de terminales en candelabro complejos, siendo estos en general, más abundantes en las áreas de asociación que en las áreas motoras y sensoriales. Las áreas que carecen de terminales en candelabro complejos se caracterizan por una innervación GABAérgica relativamente escasa de los segmentos iniciales del axón.

4. En la neocorteza cerebral humana, se observan terminales en candelabro complejos inmunoreactivos para GAT-1 en todas las áreas corticales. Sin embargo, existen diferencias significativas entre las distintas regiones. Las áreas sensoriales primarias y secundarias (17, 18, 1 y 3b) presentan la menor densidad. El área motora primaria (4) y las asociativas frontolaterales (45 y 46) presentan niveles intermedios. Mientras que, las áreas asociativas frontales (9, 10, 11, 12, 13, 14 y 47), temporales (20, 21, 22 y 38) y cinguladas (24 y 32) exhiben los valores más altos.

5. A pesar de las diferencias en densidad de terminales en candelabro, el patrón laminar de distribución es común para las distintas áreas de la neocorteza humana. Además, en la mayor parte de las áreas corticales, la densidad de terminales en candelabro presenta una correlación positiva con los valores de densidad neuronal en las distintas capas corticales.

SEGMENTO INICIAL DEL AXÓN

6. Los segmentos iniciales del axón de las neuronas piramidales e interneuronas de la corteza cerebral humana y del ratón, expresan de manera selectiva la forma fosforilada del inhibidor IκBα (pIκBα), por lo que dicha proteína representa un excelente marcador para el estudio de la distribución e innervación GABAérgica de los segmentos iniciales del axón.

7. En el hipocampo esclerótico de pacientes con epilepsia del lóbulo temporal se mantiene la expresión de pIκBα en neuronas cuyo segmento inicial del axón carece de innervación GABAérgica y en aquellas neuronas hiperinnervadas por terminales en candelabro. Esto indica que la expresión de pIκBα es independiente del grado de innervación y de actividad neuronal.

8. En la neocorteza temporal humana los canales de Na⁺ y de K⁺ (Kv1.2) dependientes de voltaje y sus respectivas proteínas asociadas, espectrina IVb y Caspr2, están presentes en los nodos de Ranvier y en los segmentos iniciales del axón tanto de interneuronas como de neuronas piramidales.

9. A diferencia de los nodos de Ranvier, en los segmentos iniciales del axón los canales de Na⁺ y de K⁺ se distribuyen asimétricamente y no están segregados en compartimentos aislados, sino que presentan un grado variable de solapamiento.

10. En las neuronas piramidales los canales de Na⁺ se distribuyen a lo largo de todo el segmento inicial del axón, mientras que los canales Kv1.2 están restringidos a su región distal, que está innervada por las neuronas en candelabro. Sin embargo, en las interneuronas, los canales de Na⁺ y de K⁺ parecen no estar segregados a lo largo del segmento inicial del axón, lo que podría estar relacionado con la ausencia de innervación GABAérgica por parte de terminales en candelabro.

BIBLIOGRAFÍA

- Akil M, Lewis DA. 1992. Postnatal development of parvalbumin immunoreactivity in axon terminals of basket and chandelier neurons in monkey neocortex. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 16:329-337.
- Alzuhherri H, Chang KC. 2003. Calcineurin activates NF-kappaB in skeletal muscle C2C12 cells. *Cell Signal* 15:471-478.
- Amaral DG, Witter MP. 1989. The three-dimensional organization of the hippocampal formation: a review of anatomical data. *Neuroscience* 31:571-591.
- Amaral Dg, Insausti R (1990) Hippocampal formation. En: *The human nervous system*. Paxinos, G. ed. Academic Press. New York. pp. 711-755.
- Ango F, di Cristo G, Higashiyama H, Bennett V, Wu P, Huang ZJ. 2004. Ankyrin-based subcellular gradient of neurofascin, an immunoglobulin family protein, directs GABAergic innervation at purkinje axon initial segment. *Cell* 119:257-272.
- Arellano JJ, DeFelipe J, Munoz A. 2002. PSA-NCAM immunoreactivity in chandelier cell axon terminals of the human temporal cortex. *Cereb Cortex* 12:617-624.
- Arellano JJ, Munoz A, Ballesteros-Yanez I, Sola RG, DeFelipe J. 2004. Histopathology and reorganization of chandelier cells in the human epileptic sclerotic hippocampus. *Brain* 127:45-64.
- Arroyo EJ, Scherer SS. 2000. On the molecular architecture of myelinated fibers. *Histochem Cell Biol* 113:1-18.
- Bennett V, Gilligan DM. 1993. The spectrin-based membrane skeleton and micron-scale organization of the plasma membrane. *Annu Rev Cell Biol* 9:27-66.
- Bennett V, Lambert S. 1999. Physiological roles of axonal ankyrins in survival of premyelinated axons and localization of voltage-gated sodium channels. *J Neurocytol* 28:303-318.
- Bennett V, Chen L. 2001. Ankyrins and cellular targeting of diverse membrane proteins to physiological sites. *Curr Opin Cell Biol* 13:61-67.
- Berghs S, Aggujaro D, Dirx R, Jr., Maksimova E, Stabach P, Hermel JM, Zhang JP, Philbrick W, Slepnev V, Ort T, Solimena M. 2000. betaIV spectrin, a new spectrin localized at axon initial segments and nodes of ranvier in the central and peripheral nervous system. *J Cell Biol* 151:985-1002.
- Bhat MA, Rios JC, Lu Y, Garcia-Fresco GP, Ching W, St Martin M, Li J, Einheber S, Chesler M, Rosenbluth J, Salzer JL, Bellen HJ. 2001. Axon-glia interactions and the domain organization of myelinated axons requires neurexin IV/Caspr/Paranodin. *Neuron* 30:369-383.
- Borg-Graham LJ, Monier C, Fregnac Y. 1998. Visual input evokes transient and strong shunting inhibition in visual cortical neurons. *Nature* 393:369-373.
- Braak E. 1980. On the structure of IIIab-pyramidal cells in the human isocortex. A Golgi and electron microscopical study with special emphasis on the proximal axon segment. *J Hirnforsch* 21:437-442.
- Braak H. 1972. [Pigmentarchitecture of the human cortex cerebri. I. Regio entorhinalis]. *Z Zellforsch Mikrosk Anat* 127:407-438.
- Braak H, Braak E. 1992. The human entorhinal cortex: normal morphology and lamina-specific pathology in various diseases. *Neurosci Res* 15:6-31.
- Brodmann K. 1909. Vergleichende. Lokalisationslehre der Grosshirnrinde in ihren Prinzipien dargestellt auf Grund des Zellenbaues. Leipzig: Barth.
- Brodmann K. 1913. Neue Forschungsergebnisse der Grosshirnrinden-anatomie mit Besonderer Berücksichtigung Anthropologischer Fragen.
- Bu J, Sathyendra V, Nagykerly N, Geula C. 2003. Age-related changes in calbindin-D28k, calretinin, and parvalbumin-immunoreactive neurons in the human cerebral cortex. *Exp Neurol* 182:220-231.
- Buhl EH, Han ZS, Lorinczi Z, Stezhka VV, Karnup SV, Somogyi P. 1994. Physiological properties of anatomically identified axo-axonic cells in the rat hippocampus. *J Neurophysiol* 71:1289-1307.
- Buzsaki G, Penttonen M, Nadasdy Z, Bragin A. 1996. Pattern and inhibition-dependent invasion of pyramidal cell dendrites by fast spikes in the hippocampus in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:9921-9925.
- Cajal SR. 1892. El nuevo concepto de la histología de los centros nerviosos. *Rev. Ciencias Méd.*, 18: 457-476.
- Cajal SR. 1901. Estudios sobre la corteza cerebral humana. IV. Estructura de la corteza cerebral olfativa del hombre y mamíferos. *Trab. Lab. Invest. Biol.Univ. Madrid* 1: 1-140.
- Catterall WA. 2000. From ionic currents to molecu-

- lar mechanisms: the structure and function of voltage-gated sodium channels. *Neuron* 26:13-25.
- Charles P, Tait S, Faivre-Sarrailh C, Barbin G, Gunn-Moore F, Denisenko-Nehrbass N, Guennoc AM, Girault JA, Brophy PJ, Lubetzki C. 2002. Neurofascin is a glial receptor for the paranodin/Caspr-contactin axonal complex at the axoglial junction. *Curr Biol* 12:217-220.
- Chen C, Westenbroek RE, Xu X, Edwards CA, Sorenson DR, Chen Y, McEwen DP, O'Malley HA, Bharucha V, Meadows LS, Knudsen GA, Vilaythong A, Noebels JL, Saunders TL, Scheuer T, Shrager P, Catterall WA, Isom LL. 2004. Mice lacking sodium channel beta1 subunits display defects in neuronal excitability, sodium channel expression, and nodal architecture. *J Neurosci* 24:4030-4042.
- Chen F, Castranova V, Shi X. 2001. New insights into the role of nuclear factor-kappaB in cell growth regulation. *Am J Pathol* 159:387-397.
- Clark BA, Monsivais P, Branco T, London M, Hauser M. 2005. The site of action potential initiation in cerebellar Purkinje neurons. *Nat Neurosci* 8:137-139.
- Cobb SR, Buhl EH, Halasy K, Paulsen O, Somogyi P. 1995. Synchronization of neuronal activity in hippocampus by individual GABAergic interneurons. *Nature* 378:75-78.
- Cobos I, Calcagnotto ME, Vilaythong AJ, Thwin MT, Noebels JL, Baraban SC, Rubenstein JL. 2005. Mice lacking Dlx1 show subtype-specific loss of interneurons, reduced inhibition and epilepsy. *Nat Neurosci* 8:1059-1068.
- Colbert CM, Johnston D. 1996. Axonal action-potential initiation and Na⁺ channel densities in the soma and axon initial segment of subicular pyramidal neurons. *J Neurosci* 16: 6676-6686.
- Colbert CM, Pan E. 2002. Ion channel properties underlying axonal action potential initiation in pyramidal neurons. *Nat Neurosci* 5:533-538.
- Conde F, Lund JS, Lewis DA. 1996. The hierarchical development of monkey visual cortical regions as revealed by the maturation of parvalbumin-immunoreactive neurons. *Brain Res Dev Brain Res* 96:261-276.
- Conti F, Melone M, De Biasi S, Minelli A, Brecha NC, Ducati A. 1998. Neuronal and glial localization of GAT-1, a high-affinity gamma-aminobutyric acid plasma membrane transporter, in human cerebral cortex: with a note on its distribution in monkey cortex. *J Comp Neurol* 396:51-63.
- Conti F, Minelli A, Melone M. 2004. GABA transporters in the mammalian cerebral cortex: localization, development and pathological implications. *Brain Res Brain Res Rev* 45:196-212.
- Cooper EC, Harrington E, Jan YN, Jan LY. 2001. M channel KCNQ2 subunits are localized to key sites for control of neuronal network oscillations and synchronization in mouse brain. *J Neurosci* 21:9529-9540.
- Cooper EC, Jan LY. 2003. M-channels: neurological diseases, neuromodulation, and drug development. *Arch Neurol* 60:496-500.
- Cramer P, Muller CW. 1999. A firm hand on NFkappaB: structures of the IkappaBalpha-NFkappaB complex. *Structure* 7:R1-R6.
- Crossin KL, Krushel LA. 2000. Cellular signaling by neural cell adhesion molecules of the immunoglobulin superfamily. *Dev Dyn* 218:260-279.
- Cruz DA, Eggan SM, Lewis DA. 2003. Postnatal development of pre- and postsynaptic GABA markers at chandelier cell connections with pyramidal neurons in monkey prefrontal cortex. *J Comp Neurol* 465:385-400.
- Davis JQ, McLaughlin T, Bennett V. 1993. Ankyrin-binding proteins related to nervous system cell adhesion molecules: candidates to provide transmembrane and intercellular connections in adult brain. *J Cell Biol* 121:121-133.
- Davis JQ, Lambert S, Bennett V. 1996. Molecular composition of the node of Ranvier: identification of ankyrin-binding cell adhesion molecules neurofascin (mucin+/third FNIII domain-) and NrCAM at nodal axon segments. *J Cell Biol* 135:1355-1367.
- DeFelipe J, Hendry SH, Jones EG, Schmechel D. 1985. Variability in the terminations of GABAergic chandelier cell axons on initial segments of pyramidal cell axons in the monkey sensory-motor cortex. *J Comp Neurol* 231:364-384.
- DeFelipe J, Hendry SH, Jones EG. 1986. A correlative electron microscopic study of basket cells and large GABAergic neurons in the monkey sensory-motor cortex. *Neuroscience* 17:991-1009.
- DeFelipe J, Farinas I. 1992. The pyramidal neuron of the cerebral cortex: morphological and chemical

- characteristics of the synaptic inputs. *Prog Neurobiol* 39:563-607.
- 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* 3:273-289.
- DeFelipe J, Gonzalez-Albo MC. 1998. Chandelier cell axons are immunoreactive for GAT-1 in the human neocortex. *Neuroreport* 9:467-470.
- DeFelipe J. 1999. Chandelier cells and epilepsy. *Brain* 122 (Pt 10):1807-1822.
- DeFelipe J, Arellano JI, Gomez A, Azmitia EC, Muñoz A. 2001. Pyramidal cell axons show a local specialization for GABA and 5-HT inputs in monkey and human cerebral cortex. *J Comp Neurol* 433:148-155.
- DeFelipe J. 2002. Cortical interneurons: from Cajal to 2001. *Prog Brain Res* 136:215-238.
- DeFelipe J, Alonso-Nanclares L, Blatow M, Caputi A, Monyer H. 2005. Anatomical and molecular heterogeneity of cortical GABAergic interneurons. In: Grillner S, editor. *Microcircuits: The Interface between Neurons and Global Brain Function*. Dahlem Workshop Report 93. Cambridge: The MIT Press.
- del Rio MR, DeFelipe J. 1994. A study of SMI 32-stained pyramidal cells, parvalbumin-immunoreactive chandelier cells, and presumptive thalamocortical axons in the human temporal neocortex. *J Comp Neurol* 342:389-408.
- Denisenko-Nehrbass N, Oguievetskaia K, Goutebroze L, Galvez T, Yamakawa H, Ohara O, Carnaud M, Girault JA. 2003. Protein 4.1B associates with both Caspr/paranodin and Caspr2 at paranodes and juxtaparanodes of myelinated fibres. *Eur J Neurosci* 17:411-416.
- Devaux JJ, Kleopa KA, Cooper EC, Scherer SS. 2004. KCNQ2 is a nodal K⁺ channel. *J Neurosci* 24:1236-1244.
- DiDonato JA, Hayakawa M, Rothwarf DM, Zandi E, Karin M. 1997. A cytokine-responsive I κ B kinase that activates the transcription factor NF- κ B. *Nature* 388:548-554.
- Einheber S, Zanazzi G, Ching W, Scherer S, Milner TA, Peles E, Salzer JL. 1997. The axonal membrane protein Caspr, a homologue of neurexin IV, is a component of the septate-like paranodal junctions that assemble during myelination. *J Cell Biol* 139:1495-1506.
- Elston GN, DeFelipe J. 2002. Spine distribution in cortical pyramidal cells: a common organizational principle across species. *Prog Brain Res* 136:109-133.
- Elston GN, Gonzalez-Albo MC. 2003. Parvalbumin-, calbindin-, and calretinin-immunoreactive neurons in the prefrontal cortex of the owl monkey (*Aotus trivirgatus*): a standardized quantitative comparison with sensory and motor areas. *Brain Behav Evol* 62:19-30.
- Fabri M, Manzoni T. 1996. Glutamate decarboxylase immunoreactivity in corticocortical projecting neurons of rat somatic sensory cortex. *Neuroscience* 72:435-448.
- Fairén A, Valverde F. 1980. A specialized type of neuron in the visual cortex of cat: a Golgi and electron microscope study of chandelier cells. *J Comp Neurol* 194:761-779.
- Fairén A, DeFelipe J and Regidor J. 1984. Non pyramidal neurons. General account. En: *Cerebral Cortex. Cellular Components of the Cerebral Cortex*. Vol. 1. Peters A, Jones EG, eds. Plenum Press, Nueva York. pp. 201-253.
- Farinas I, DeFelipe J. 1991. Patterns of synaptic input on corticocortical and corticothalamic cells in the cat visual cortex. II. The axon initial segment. *J Comp Neurol* 304:70-77.
- Feldman ML. 1984. Morphology of the neocortical pyramidal neuron. En: Jones EG., Peters A. *Cerebral Cortex*. New York: Plenum Press. pp. 123-200.
- Felleman DJ, Van E. 1991. Distributed hierarchical processing in the primate cerebral cortex. *Cereb Cortex* 1:1-47.
- Ferster D, Jagadeesh B. 1992. EPSP-IPSP interactions in cat visual cortex studied with in vivo whole-cell patch recording. *J Neurosci* 12:1262-1274.
- Freund TF, Martin KA, Smith AD, Somogyi P. 1983. Glutamate decarboxylase-immunoreactive terminals of Golgi-impregnated axoaxonic cells and of presumed basket cells in synaptic contact with pyramidal neurons of the cat's visual cortex. *J Comp Neurol* 221:263-278.
- Freund TF, Antal M. 1988. GABA-containing neurons in the septum control inhibitory interneurons in the hippocampus. *Nature* 336:170-173.

- Freund TF, Buzsaki G. 1996. Interneurons of the hippocampus. *Hippocampus* 6:347-470.
- Fritschy JM, Weinmann O, Wenzel A, Benke D. 1998. Synapse-specific localization of NMDA and GABA(A) receptor subunits revealed by antigen-retrieval immunohistochemistry. *J Comp Neurol* 390:194-210.
- Fuster JM. 2002. Frontal lobe and cognitive development. *J Neurocytol*. 31: 373-385.
- Garcia-Lopez M, Abellan A, Legaz I, Rubenstein JL, Puelles L, Medina L. 2008. Histogenetic compartments of the mouse centromedial and extended amygdala based on gene expression patterns during development. *J Comp Neurol* 506:46-74.
- Garey LJ. 1994. Brodmann's localization in the cerebral cortex. London: Smith-Gordon.
- Garrido JJ, Giraud P, Carlier E, Fernandes F, Mousif A, Fache MP, Debanne D, Dargent B. 2003. A targeting motif involved in sodium channel clustering at the axonal initial segment. *Science* 300:2091-2094.
- Golgi C. 1873. Sulla struttura Della sostanza grigia del cervello (Comunicazione preventiva). *Gazz. Med. Ital. Lombardia*, 33: 244-246.
- 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* 443:1-14.
- Gonchar YA, Johnson PB, Weinberg RJ. 1995. GABA-immunopositive neurons in rat neocortex with contralateral projections to S-I. *Brain Res* 697:27-34.
- Gulyas AI, Miles R, Hajos N, Freund TF. 1993. Precision and variability in postsynaptic target selection of inhibitory cells in the hippocampal CA3 region. *Eur J Neurosci* 5:1729-1751.
- Halasy K, Somogyi P. 1993. Distribution of GABAergic synapses and their targets in the dentate gyrus of rat: a quantitative immunoelectron microscopic analysis. *J Hirnforsch* 34:299-308.
- Hardwick C, French SJ, Southam E, Totterdell S. 2005. A comparison of possible markers for chandelier cartridges in rat medial prefrontal cortex and hippocampus. *Brain Res* 1031:238-244.
- Hashimoto T, Volk DW, Eggan SM, Mirnics K, Pierri JN, Sun Z.; Sampson AR, Lewis DA. 2003. Gene expression deficits in a subclass of GABA neurons in the prefrontal cortex of subjects with schizophrenia. *J Neurosci*. 23: 6315-6326.
- Hodgkin, A.L., Huxley, A.F., 1952. Currents carried by sodium and potassium ions through the membrane of the giant axon of *Loligo*. *J. Physiol.* 116, 449-472.
- Hopkins WF, Demas V, Tempel BL. 1994. Both N- and C-terminal regions contribute to the assembly and functional expression of homo- and heteromultimeric voltage-gated K⁺ channels. *J Neurosci* 14:1385-1393.
- Hortsch M. 1996. The L1 family of neural cell adhesion molecules: old proteins performing new tricks. *Neuron* 17:587-593.
- Howard A, Tamas G, Soltesz I. 2005. Lighting the chandelier: new vistas for axo-axonic cells. *Trends Neurosci* 28:310-316.
- Hubel DH, Wiesel TN. 1977. Ferrier lecture. Functional architecture of macaque monkey visual cortex. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 198:1-59.
- Inda MC, DeFelipe J, Munoz A. 2006. Voltage-gated ion channels in the axon initial segment of human cortical pyramidal cells and their relationship with chandelier cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*.
- Inda MC, DeFelipe J, Munoz A. 2007. The distribution of chandelier cell axon terminals that express the GABA plasma membrane transporter GAT-1 in the human neocortex. *Cereb Cortex* 17:2060-2071.
- Insausti R, Tunon T, Sobreviela T, Insausti AM, Gonzalo LM. 1995. The human entorhinal cortex: a cytoarchitectonic analysis. *J Comp Neurol* 355:171-198.
- Isom LL. 2002. The role of sodium channels in cell adhesion. *Front Biosci* 7:12-23.
- Jenkins SM, Bennett V. 2001. Ankyrin-G coordinates assembly of the spectrin-based membrane skeleton, voltage-gated sodium channels, and L1 CAMs at Purkinje neuron initial segments. *J Cell Biol* 155:739-746.
- Johnson RR, Burkhalter A. 1996. Microcircuitry of forward and feedback connections within rat visual cortex. *J Comp Neurol* 368:383-398.
- Jones EG. 1975. Varieties and distribution of non-pyramidal cells in the somatic sensory cortex of the squirrel monkey. *J Comp Neurol* 160:205-267.

- Jones EG. 1984. History of Cortical Cytology. En: Jones EG, Peters A. Cerebral Cortex. New York: Plenum Press. pp. 1-28.
- Kempainen S, Pitkanen A. 2000. Distribution of parvalbumin, calretinin, and calbindin-D(28k) immunoreactivity in the rat amygdaloid complex and colocalization with gamma-aminobutyric acid. *J Comp Neurol* 426:441-467.
- Kisvarday ZF, Martin KA, Whitteridge D, Somogyi P. 1985. Synaptic connections of intracellularly filled clutch cells: a type of small basket cell in the visual cortex of the cat. *J Comp Neurol* 241:111-137.
- Kisvarday ZF, Adams CB, Smith AD. 1986. Synaptic connections of axo-axonic (chandelier) cells in human epileptic temporal cortex. *Neuroscience* 19:1179-1186.
- Klausberger T, Magill PJ, Marton LF, Roberts JD, Cobden PM, Buzsaki G, Somogyi P. 2003. Brain-state- and cell-type-specific firing of hippocampal interneurons in vivo. *Nature* 421:844-848.
- Klausberger T, Marton LF, Baude A, Roberts JD, Magill PJ, Somogyi P. 2004. Spike timing of dendrite-targeting bistratified cells during hippocampal network oscillations in vivo. *Nat Neurosci* 7:41-47.
- Kolliker A von. 1893. Handbuch der Gewebelehre des Menschen Vol. II. Nervensystem des Menschen und der Thiere. Engelmann, Leipzig.
- Komada M, Soriano P. 2002. [Beta]IV-spectrin regulates sodium channel clustering through ankyrin-G at axon initial segments and nodes of Ranvier. *J Cell Biol* 156:337-348.
- Kosaka T. 1983. Axon initial segments of the granule cell in the rat dentate gyrus: synaptic contacts on bundles of axon initial segments. *Brain Res* 274:129-134.
- Krushel LA, Cunningham BA, Edelman GM, Crossin KL. 1999. NF-kappaB activity is induced by neural cell adhesion molecule binding to neurons and astrocytes. *J Biol Chem* 274:2432-2439.
- Lacas-Gervais S, Guo J, Strenzke N, Scarfone E, Kolpe M, Jahkel M, De Camilli P, Moser T, Rasband MN, Solimena M. 2004. BetaIVSigma1 spectrin stabilizes the nodes of Ranvier and axon initial segments. *J Cell Biol* 166:983-990.
- Lambert S, Davis JQ, Bennett V. 1997. Morphogenesis of the node of Ranvier: co-clusters of ankyrin and ankyrin-binding integral proteins define early developmental intermediates. *J Neurosci* 17:7025-7036.
- Lewis DA, Foote SL, Cha CI. 1989. Corticotropin-releasing factor immunoreactivity in monkey neocortex: an immunohistochemical analysis. *J Comp Neurol* 290:599-613.
- Lewis DA, Lund JS. 1990. Heterogeneity of chandelier neurons in monkey neocortex: corticotropin-releasing factor- and parvalbumin-immunoreactive populations. *J Comp Neurol* 293:599-615.
- Lewis DA, Volk DW, Hashimoto T. 2004. Selective alterations in prefrontal cortical GABA neurotransmission in schizophrenia: a novel target for the treatment of working memory dysfunction. *Psychopharmacology (Berl)* 174:143-150.
- Lewis DA, Hashimoto T, Volk DW. 2005. Cortical inhibitory neurons and schizophrenia. *Nat Rev Neurosci* 6:312-324.
- Li XG, Somogyi P, Tepper JM, Buzsaki G. 1992. Axonal and dendritic arborization of an intracellularly labeled chandelier cell in the CA1 region of rat hippocampus. *Exp Brain Res* 90:519-525.
- Lorente de No P. 1938. Architectonics and structure of the cerebral cortex. En: Fulton JF. Physiology of the Nervous System. New York: Oxford University Press. pp. 291-330.
- Lund JS. 1984. Spiny stellate neurons. En: Peters A., Jones EG. Cellular components of the cerebral cortex. New York: Plenum Press. 255-308.
- Macchi G. 1951. [Morphology of the anterior pyramidal fasciculus.]. *Riv Patol Nerv Ment* 72:596-599.
- Mainen ZF, Joerges J, Huguenard JR, Sejnowski TJ. 1995. A model of spike initiation in neocortical pyramidal neurons. *Neuron* 15:1427-1439.
- Marco P, Sola RG, Pulido P, Alijarde MT, Sanchez A, Cajal S, DeFelipe J. 1996. Inhibitory neurons in the human epileptogenic temporal neocortex. An immunocytochemical study. *Brain* 119 (Pt 4):1327-1347.
- Marco P, DeFelipe J. 1997. Altered synaptic circuitry in the human temporal neocortex removed from epileptic patients. *Exp Brain Res* 114:1-10.
- Martinez-Garcia F, Martinez-Marcos A, Lanuza E. 2002. The pallial amygdala of amniote vertebrates: evolution of the concept, evolution of the structure

- re. *Brain Res Bull* 57:463-469.
- Matsumoto E, Rosenbluth J. 1985. Plasma membrane structure at the axon hillock, initial segment and cell body of frog dorsal root ganglion cells. *J Neurocytol* 14:731-747.
- Mayhew TM, Gundersen HJ. 1996. If you assume, you can make an ass out of u and me': a decade of the disector for stereological counting of particles in 3D space. *J Anat* 188 (Pt 1):1-15.
- McDonald AJ. 1998. Cortical pathways to the mammalian amygdala. *Prog Neurobiol* 55:257-332.
- Medina L, Legaz I, Gonzalez G, De Castro F, Rubenstein JL, Puelles L. 2004. Expression of Dbx1, Neurogenin 2, Semaphorin 5A, Cadherin 8, and Emx1 distinguish ventral and lateral pallial histogenetic divisions in the developing mouse claustramygdaloid complex. *J Comp Neurol* 474:504-523.
- Meynert T. 1867. Studien uber das pathologisch-anatomische material der Wiener Irren-Anstalt. *Vierteljahrssch.* 3:381-402.
- Menegoz M, Gaspar P, Le Bert M, Galvez T, Burgaya F, Palfrey C, Ezan P, Arnos F, Girault JA. 1997. Paranodin, a glycoprotein of neuronal paranodal membranes. *Neuron* 19:319-331.
- Mercurio F, Zhu H, Murray BW, Shevchenko A, Bennett BL, Li J, Young DB, Barbosa M, Mann M, Manning A, Rao A. 1997. IKK-1 and IKK-2: cytokine-activated I κ B kinases essential for NF- κ B activation. *Science* 278:860-866.
- Mi H, Deerinck TJ, Ellisman MH, Schwarz TL. 1995. Differential distribution of closely related potassium channels in rat Schwann cells. *J Neurosci* 15:3761-3774.
- Miles R, Toth K, Gulyas AI, Hajos N, Freund TF. 1996. Differences between somatic and dendritic inhibition in the hippocampus. *Neuron* 16:815-823.
- Minelli A, Brecha NC, Karschin C, DeBiasi S, Conti F. 1995. GAT-1, a high-affinity GABA plasma membrane transporter, is localized to neurons and astroglia in the cerebral cortex. *J Neurosci* 15:7734-7746.
- Mountcastle VB. 1978. Brain mechanisms for directed attention. *J R Soc Med* 71:14-28.
- Mountcastle VB. 1997. The columnar organization of the neocortex. *Brain* 120 (Pt 4):701-722.
- Munoz A, Arellano JI, DeFelipe J. 2002. GABABR1 receptor protein expression in human mesial temporal cortex: changes in temporal lobe epilepsy. *J Comp Neurol* 449:166-179.
- Nabeshima T, Mouri A, Murai R, Noda Y. 2006. Animal model of schizophrenia: dysfunction of NMDA receptor-signaling in mice following withdrawal from repeated administration of phencyclidine. *Ann N Y Acad Sci* 1086:160-168.
- Nieuwenhuys R. 1994. The neocortex. An overview of its evolutionary development, structural organization and sinaptology. *Anat Embryol (Berl)* 190:307-337.
- Ogawa Y, Schafer DP, Horresh I, Bar V, Hales K, Yang Y, Susuki K, Peles E, Stankewich MC, Rasband MN. 2006. Spectrins and ankyrinB constitute a specialized paranodal cytoskeleton. *J Neurosci* 26:5230-5239.
- Pakkenberg B, Pelvig D, Marner L, Bundgaard MJ, Gundersen HJ, Nyengaard JR, Regeur L. 2003. Aging and the human neocortex. *Exp Gerontol* 38:95-99.
- Palay SL, Sotelo C, Peters A, Orkand PM. 1968. The axon hillock and the initial segment. *J Cell Biol* 38:193-201.
- Palay SL, Sotelo C, Peters A, Orkand PM. 1968. The axon hillock and the initial segment. *J Cell Biol* 38:193-201.
- Peles E, Joho K, Plowman GD, Schlessinger J. 1997. Close similarity between *Drosophila* neurexin IV and mammalian Caspr protein suggests a conserved mechanism for cellular interactions. *Cell* 88:745-746.
- Peles E, Salzer JL. 2000. Molecular domains of myelinated axons. *Curr Opin Neurobiol* 10:558-565.
- Peters A, Fairen A. 1978. Smooth and sparsely-spined stellate cells in the visual cortex of the rat: a study using a combined Golgi-electron microscopic technique. *J Comp Neurol* 181:129-171.
- Peters A, Proskauer CC, Ribak CE. 1982. Chandelier cells in rat visual cortex. *J Comp Neurol* 206:397-416.
- Peters A, Sethares C, Harriman KM. 1990. Different kinds of axon terminals forming symmetric synapses with the cell bodies and initial axon segments of layer II/III pyramidal cells. II. Synaptic junctions. *J Neurocytol.*, 19: 584-600.

- Petrides M, Pandya DN. 1999. Dorsolateral prefrontal cortex: comparative cytoarchitectonic analysis in the human and the macaque brain and cortico-cortical connection patterns. *Eur J Neurosci* 11:1011-1036.
- Preuss TM, Goldman Rakic PS. 1991a. Architectonics of the parietal and temporal association cortex in the strepsirrhine primate Galago compared to the anthropoid primate Macaca. *J. Comp. Neurol* 310: 475-506.
- Preuss TM, Goldman Rakic PS. 1991b. Myelo- and cytoarchitecture of the granular frontal cortex and surrounding regions in the strepsirrhine primate Galago and the anthropoid primate Macaca. *J. Comp. Neurol* 310: 429-474.
- Preuss TM. 1995. Do rats have prefrontal cortex? The Rose-Woolsey-Akert Program. *The Journal of cognitive neuroscience* 7: 1-24.
- Poliak S, Gollan L, Martinez R, Custer A, Einheber S, Salzer JL, Trimmer JS, Shrager P, Peles E. 1999. Caspr2, a new member of the neurexin superfamily, is localized at the juxtaparanodes of myelinated axons and associates with K⁺ channels. *Neuron* 24:1037-1047.
- Poliak S, Gollan L, Salomon D, Berglund EO, Ohara R, Ranscht B, Peles E. 2001. Localization of Caspr2 in myelinated nerves depends on axon-glia interactions and the generation of barriers along the axon. *J Neurosci* 21:7568-7575.
- Poliak S, Peles E. 2003. The local differentiation of myelinated axons at nodes of Ranvier. *Nat Rev Neurosci* 4:968-980.
- Puelles L, Kuwana E, Puelles E, Bulfone A, Shimamura K, Keleher J, Smiga S, Rubenstein JL. 2000. Pallial and subpallial derivatives in the embryonic chick and mouse telencephalon, traced by the expression of the genes *Dlx-2*, *Emx-1*, *Nkx-2.1*, *Pax-6*, and *Tbr-1*. *J Comp Neurol* 424:409-438.
- Rasband MN, Trimmer JS, Schwarz TL, Levinson SR, Ellisman MH, Schachner M, Shrager P. 1998. Potassium channel distribution, clustering, and function in remyelinating rat axons. *J Neurosci* 18:36-47.
- Rasband MN, Peles E, Trimmer JS, Levinson SR, Lux SE, Shrager P. 1999. Dependence of nodal sodium channel clustering on paranodal axoglial contact in the developing CNS. *J Neurosci* 19:7516-7528.
- Rasband MN, Park EW, Zhen D, Arbuckle MI, Poliak S, Peles E, Grant SG, Trimmer JS. 2002. Clustering of neuronal potassium channels is independent of their interaction with PSD-95. *J Cell Biol* 159:663-672.
- Ratcliffe CF, Westenbroek RE, Curtis R, Catterall WA. 2001. Sodium channel beta1 and beta3 subunits associate with neurofascin through their extracellular immunoglobulin-like domain. *J Cell Biol* 154:427-434.
- Rhodes KJ, Strassle BW, Monaghan MM, Bekele-Arcuri Z, Matos MF, Trimmer JS. 1997. Association and colocalization of the Kvbeta1 and Kvbeta2 beta-subunits with Kv1 alpha-subunits in mammalian brain K⁺ channel complexes. *J Neurosci* 17:8246-8258.
- Ribak CE, Nitsch R, Seress L. 1990. Proportion of parvalbumin-positive basket cells in the GABAergic innervation of pyramidal and granule cells of the rat hippocampal formation. *J Comp Neurol* 300:449-461.
- Romero E, Ali C, Molina-Holgado E, Castellano B, Guaza C, Borrell J. 2007. Neurobehavioral and immunological consequences of prenatal immune activation in rats. Influence of antipsychotics. *Neuropsychopharmacology* 32:1791-1804.
- Rosenbluth J, Liang WL, Liu Z, Guo D, Schiff R. 1995. Paranodal structural abnormalities in rat CNS myelin developing in vivo in the presence of implanted O1 hybridoma cells. *J Neurocytol* 24:818-824.
- Sah P, Faber ES, Lopez de AM, Power J. 2003. The amygdaloid complex: anatomy and physiology. *Physiol Rev* 83:803-834.
- Salzer JL. 1997. Clustering sodium channels at the node of Ranvier: close encounters of the axon-glia kind. *Neuron* 18:843-846.
- Salzer JL. 2003. Polarized domains of myelinated axons. *Neuron* 40:297-318.
- Schafer DP, Custer AW, Shrager P, Rasband MN. 2006. Early events in node of Ranvier formation during myelination and remyelination in the PNS. *Neuron Glia Biol* 2:69-79.
- Scherer SS. 1999. Nodes, paranodes, and incisures: from form to function. *Ann N Y Acad Sci* 883:131-142.
- Scherer SS, Arroyo EJ. 2002. Recent progress on the molecular organization of myelinated axons. *J Peripher Nerv Syst* 7:1-12.

- Schultz C, Konig HG, Del Turco D, Politi C, Eckert GP, Ghebremedhin E, Prehn JH, Kogel D, Deller T. 2006. Coincident enrichment of phosphorylated I κ B α , activated IKK, and phosphorylated p65 in the axon initial segment of neurons. *Mol Cell Neurosci*.
- Seress L, Mrzljak L. 1987. Basal dendrites of granule cells are normal features of the fetal and adult dentate gyrus of both monkey and human hippocampal formations. *Brain Res* 405:169-174.
- Seress L, Gulyas AI, Ferrer I, Tunon T, Soriano E, Freund TF. 1993. Distribution, morphological features, and synaptic connections of parvalbumin- and calbindin D28k-immunoreactive neurons in the human hippocampal formation. *J Comp Neurol* 337:208-230.
- Sherman DL, Brophy PJ. 2005. Mechanisms of axon ensheathment and myelin growth. *Nat Rev Neurosci* 6:683-690.
- Sloper JJ, Powell TP. 1979. A study of the axon initial segment and proximal axon of neurons in the primate motor and somatic sensory cortices. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 285:173-197.
- Smart SL, Lopantsev V, Zhang CL, Robbins CA, Wang H, Chiu SY, Schwartzkroin PA, Messing A, Tempel BL. 1998. Deletion of the K(V)1.1 potassium channel causes epilepsy in mice. *Neuron* 20:809-819.
- Somogyi P. 1977. A specific 'axo-axonal' interneuron in the visual cortex of the rat. *Brain Res* 136:345-350.
- Somogyi P, Freund TF, Cowey A. 1982. The axo-axonic interneuron in the cerebral cortex of the rat, cat and monkey. *Neuroscience* 7:2577-2607.
- Somogyi P, Nunzi MG, Gorio A, Smith AD. 1983. A new type of specific interneuron in the monkey hippocampus forming synapses exclusively with the axon initial segments of pyramidal cells. *Brain Res* 259:137-142.
- Somogyi P, Freund TF, Hodgson AJ, Somogyi J, Beroukas D, Chubb IW. 1985. Identified axo-axonic cells are immunoreactive for GABA in the hippocampus and visual cortex of the cat. *Brain Res* 332:143-149.
- Somogyi P, Klausberger T. 2005. Defined types of cortical interneurone structure space and spike timing in the hippocampus. *J Physiol* 562:9-26.
- Soriano E, Frotscher M. 1989. A GABAergic axo-axonic cell in the fascia dentata controls the main excitatory hippocampal pathway. *Brain Res* 503:170-174.
- Soriano E, Nitsch R, Frotscher M. 1990. Axo-axonic chandelier cells in the rat fascia dentata: Golgi-electron microscopy and immunocytochemical studies. *J Comp Neurol* 293:1-25.
- Soriano E, Martinez A, Farinas I, Frotscher M. 1993. Chandelier cells in the hippocampal formation of the rat: the entorhinal area and subicular complex. *J Comp Neurol* 337:151-167.
- Stuart G, Spruston N, Sakmann B, Hausser M. 1997. Action potential initiation and backpropagation in neurons of the mammalian CNS. *Trends Neurosci* 20:125-131.
- Stuart GJ, Sakmann B. 1994. Active propagation of somatic action potentials into neocortical pyramidal cell dendrites. *Nature* 367:69-72.
- Swanson LW, Petrovich GD. 1998. What is the amygdala? *Trends Neurosci* 21:323-331.
- Swanson LW. 2000. What is the brain? *Trends Neurosci* 23:519-527.
- Szabadics J, Varga C, Molnar G, Olah S, Barzo P, Tamas G. 2006. Excitatory effect of GABAergic axo-axonic cells in cortical microcircuits. *Science* 311:233-235.
- Szentagothai J, Arbib MA. 1974. Conceptual models of neural organization. *Neurosci Res Program Bull* 12:305-510.
- Takatsuki K, Kawahara S, Kotani S, Fukunaga S, Mori H, Mishina M, Kirino Y. 2003. The hippocampus plays an important role in eyeblink conditioning with a short trace interval in glutamate receptor subunit delta 2 mutant mice. *J Neurosci* 23:17-22.
- Thompson RF, Kim JJ. 1996. Memory systems in the brain and localization of a memory. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:13438-13444.
- Tombol T, Somogyi G, Hajdu F. 1978. Golgi study on cat hippocampal formation. *Anat Embryol (Berl)* 153:331-350.
- Vabnick I, Trimmer JS, Schwarz TL, Levinson SR, Risal D, Shrager P. 1999. Dynamic potassium channel distributions during axonal development prevent aberrant firing patterns. *J Neurosci* 19:747-758.

- Valverde F. 2002. [Structure of the cerebral cortex. Intrinsic organization and comparative analysis of the neocortex]. *Rev Neurol* 34:758-780.
- Van Essen DC., Drury HA, Joshi S, Miller MI. 1998. Functional and structural zapping of human cerebral cortex: Solutions are in the surfaces. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 788-795.
- Van Wart A, Trimmer JS, Matthews G. 2007. Polarized distribution of ion channels within microdomains of the axon initial segment. *J Comp Neurol* 500:339-352.
- Vogyt C, Vogt O. 1919. Allgemeinere Ergebnisse unserer Hirnforschung. *J. Psychol. Neurol.* 25: 279-462.
- Volk DW, Lewis DA. 2002. Impaired prefrontal inhibition in schizophrenia: relevance for cognitive dysfunction. *Physiol Behav* 77:501-505.
- Volk DW, Pierri JN, Fritschy JM, Auh S, Sampson AR, Lewis DA. 2002. Reciprocal alterations in pre- and postsynaptic inhibitory markers at chandelier cell inputs to pyramidal neurons in schizophrenia. *Cereb Cortex* 12:1063-1070.
- Wang H, Kunkel DD, Martin TM, Schwartzkroin PA, Tempel BL. 1993. Heteromultimeric K⁺ channels in terminal and juxtaparanodal regions of neurons. *Nature* 365:75-79.
- White EL. 1989. *Cortical circuits. Synaptic Organization of the Cerebral cortex.* Boston: Birkhäuser Boston.
- Whittington MA, Traub RD. 2003. Interneuron diversity series: inhibitory interneurons and network oscillations in vitro. *Trends Neurosci* 26:676-682.
- Winckler B, Forscher P, Mellman I. 1999. A diffusion barrier maintains distribution of membrane proteins in polarized neurons. *Nature* 397:698-701.
- Wittner L, Magloczky Z, Borhegyi Z, Halasz P, Toth S, Eross L, Szabo Z, Freund TF. 2001. Preservation of perisomatic inhibitory input of granule cells in the epileptic human dentate gyrus. *Neuroscience* 108:587-600.
- Woo TU, Whitehead RE, Melchitzky DS, Lewis DA. 1998. A subclass of prefrontal gamma-aminobutyric acid axon terminals are selectively altered in schizophrenia. *Proc Natl Acad Sci USA.* 95:5141-5346.
- Yanez IB, Munoz A, Contreras J, Gonzalez J, Rodriguez-Veiga E, DeFelipe J. 2005. Double bouquet cell in the human cerebral cortex and a comparison with other mammals. *J Comp Neurol* 486:344-360.
- Yaron A, Hatzubai A, Davis M, Lavon I, Amit S, Manning AM, Andersen JS, Mann M, Mercurio F, Ben-Neriah Y. 1998. Identification of the receptor component of the IkappaBalpha-ubiquitin ligase. *Nature* 396:590-594.
- Zhang X, Bennett V. 1996. Identification of O-linked N-acetylglucosamine modification of ankyrinG isoforms targeted to nodes of Ranvier. *J Biol Chem* 271:31391-31398.
- Zhou D, Lambert S, Malen PL, Carpenter S, Boland LM, Bennett V. 1998. AnkyrinG is required for clustering of voltage-gated Na channels at axon initial segments and for normal action potential firing. *J Cell Biol* 143:1295-1304.
- Zhu Y, Stornetta RL, Zhu JJ. 2004. Chandelier cells control excessive cortical excitation: characteristics of whisker-evoked synaptic responses of layer 2/3 nonpyramidal and pyramidal neurons. *J Neurosci* 24:5101-5108.

*Y ahora, con la mirada fija en rojo atlántico horizonte,
cual marinero de antaño en el puerto de Dalos,
cruzo la pasarela de embarque a una nueva aventura...*