

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



TESIS DOCTORAL

Estudio de la innervación GABAérgica de neuronas de las distintas capas de la corteza cerebral

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Sandra María Ostos Campillo

DIRECTORES

Alberto Muñoz Céspedes
Javier DeFelipe Oroquieta

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

Facultad de Ciencias Biológicas



TESIS DOCTORAL

**Estudio de la innervación GABAérgica de neuronas de las
distintas capas de la corteza cerebral**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTORA

PRESENTADA POR

Sandra María Ostos Campillo

Directores

Alberto Muñoz Céspedes

Javier DeFelipe Oroquieta

2022

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

Facultad de Ciencias Biológicas

Programa de Doctorado en Biología



TESIS DOCTORAL

**Estudio de la innervación GABAérgica de neuronas de las
distintas capas de la corteza cerebral**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTORA

PRESENTADA POR

Sandra María Ostos Campillo

Directores

Alberto Muñoz Céspedes

Javier DeFelipe Oroquieta

2022

Siempre parece imposible
hasta que se intenta

- Nelson Mandela

AGRADECIMIENTOS

He esperado tanto tiempo este momento que me cuesta encontrar las palabras para resumir en unas pocas líneas lo que han significado para mí estos cinco años.

En primer lugar agradecer a mis directores de tesis, Alberto Muñoz y Javier DeFelipe, la oportunidad de trabajar en este magnífico grupo. Y a mis compañeros de laboratorio, por el buen ambiente y el trato recibido durante mi estancia.

A Isa, por su infinita paciencia, por su apoyo incondicional y por haber estado ayudándome en todo momento. Gracias por tanto.

A Mamen, porque sin ti estos 6 años no hubieran sido lo mismo.

A mis Anas y Giu, porque aquel grupo de trabajo de la Universidad se ha convertido en una pequeña familia, que ha estado y estará siempre en las buenas y en las malas.

A Ana, por ser mi compañera de carreras en el máster, y por estar siempre ahí. A Natalia, Raquel y compañía por formar parte de mi pequeño caos.

A mis padres, a mis hermanos y al resto de mi familia, por su apoyo y cariño incondicional. Por creer siempre en mí y darme alas para valorar.

A Adrián por ser mi compañero de viaje, por no soltarme la mano en ningún momento. Sin ti esto no hubiera sido posible. Por tu cariño, tu paciencia, tus consejos, por ser mi compañero de aventuras y darme lo más bonito de este mundo, nuestra pequeña unicornio, Iris. 3000 veces más.

Sin olvidarme de nadie, a todos aquellos que, aunque brevemente, habéis aparecido en mi vida y habéis puesto vuestro granito de arena para que esto salga adelante, gracias.

ÍNDICE

LISTA DE ABREVIATURAS	1
RESUMEN	2
ABSTRACT	5
INTRODUCCIÓN	8
1. ORGANIZACIÓN INTRÍNSECA DE LA CORTEZA CEREBRAL	8
2. TIPOS CELULARES	11
3. CAPAS CORTICALES	12
4. CIRCUITOS CORTICALES.....	13
4.1 Eferencias subcorticales de la neocorteza	14
4.2 Aferencias de la neocorteza	16
5. NEURONAS DE PROYECCIÓN: SOMA Y SEGMENTO INICIAL DEL AXÓN	18
6. CÉLULAS NO PIRAMIDALES: INTERNEURONAS INHIBIDORAS.....	20
7. INERVACIÓN PERISOMÁTICA	24
7.1 Células en candelabro	25
7.2 Células en cesto.....	26
OBJETIVOS	29
MATERIAL Y MÉTODOS	30
1. OBTENCIÓN Y PROCESAMIENTO DEL TEJIDO.....	30
1.1 Corteza temporal humana	30
1.2 Corteza somatosensorial del ratón	32
1.3 Procesamiento del tejido. Técnicas de inmunofluorescencia.....	32
2. ADQUISICIÓN DE IMÁGENES	34
3. ANÁLISIS DE IMAGEN	35
3.1 Estudio de la densidad laminar de los terminales GABAérgicos	35

3.2	Estudio del tamaño de los somas neuronales y de la densidad de terminales GABAérgicos en aposición al soma neuronal	35
3.3	Estudio de las características morfológicas del segmento inicial del axón y de la densidad de terminales GABAérgicos en aposición al segmento inicial del axón	36
4.	MARCADO RETRÓGRADO DE NEURONAS CORTICOTALÁMICAS PARA EL ESTUDIO DE SU INERVACIÓN PERISOMÁTICA	42
4.1	Inyecciones del trazador retrógrado <i>Fast Blue</i>	42
4.2	Inmunofluorescencia y análisis de imagen	42
5.	CONSIDERACIONES TÉCNICAS	43
6.	ANÁLISIS ESTADÍSTICO Y REPRESENTACIÓN DE LOS RESULTADOS	44
	RESULTADOS	45
1.	DENSIDAD GENERAL DE LOS TERMINALES GABAÉRGICOS EN EL NEUROPILO	46
2.	DENSIDAD DE TERMINALES GABAÉRGICOS EN APOSICIÓN A LOS SOMAS NEURONALES	51
2.1	Superficie de los somas neuronales	51
2.2	Número de terminales GABAérgicos perisomáticos	53
2.3	Densidad de terminales GABAérgicos perisomáticos	57
2.4	Análisis de la correlación entre las variables relacionadas con la inhibición del soma.....	59
3.	DENSIDAD DE TERMINALES GABAÉRGICOS EN APOSICIÓN A LOS SEGMENTOS INICIALES DEL AXÓN	61
3.1	Longitud, diámetro medio y superficie de los segmentos iniciales del axón	62
3.2	Disminución del diámetro a lo largo del segmento inicial del axón	74
3.3	Número de botones vGAT-ir en aposición al segmento inicial del axón	75
3.4	Densidad de botones vGAT-ir en aposición al segmento inicial del axón.....	80
3.5	Distribución de botones vGAT-ir a la largo del segmento inicial del axón.....	82
3.6	Análisis de la correlación entre las variables relacionadas con la inhibición del segmento inicial del axón.....	84

4. COMPARACIÓN ENTRE EL TAMAÑO Y LA INERVACIÓN GABAÉRGICA DEL SOMA Y EL SEGMENTO INICIAL DEL AXÓN.....	85
5. INERVACIÓN GABAÉRGICA DE LAS NEURONAS CORTICOTALÁMICAS DE LA CORTEZA HLS1 DEL RATÓN	87
5.1 Densidad de terminales GABAérgicos en aposición a los somas de neuronas corticotalámicas	90
5.1.1 Superficie de los somas de neuronas corticotalámicas.....	90
5.1.2 Número y densidad de terminales GABAérgicos en aposición al soma de neuronas corticotalámicas.....	90
5.2 Densidad de terminales GABAérgicos en aposición a los segmentos iniciales del axón de neuronas corticotalámicas	92
5.2.1 Longitud, diámetro medio y superficie de los segmentos iniciales del axón de neuronas corticotalámicas.....	92
5.2.2 Número y densidad de terminales GABAérgicos en aposición al segmento inicial del axón de neuronas corticotalámicas.....	94
DISCUSIÓN.....	96
1. CARACTERÍSTICAS MORFOMÉTRICAS DEL SOMA Y DEL SEGMENTO INICIAL DEL AXÓN.....	96
2. INERVACIÓN GABAÉRGICA DEL SOMA Y DEL SEGMENTO INICIAL DEL AXÓN EN LAS NEURONAS PIRAMIDALES.	100
2.1 Heterogeneidad en la inervación GABAérgica de los somas de neuronas piramidales por las interneuronas en cesto.....	100
2.2 Heterogeneidad en la inervación GABAérgica de los segmentos iniciales del axón de neuronas piramidales por las interneuronas en candelabro	103
2.3 Limitaciones técnicas del presente estudio	107
3. INERVACIÓN PERISOMÁTICA DE LAS NEURONAS CORTICOTALÁMICAS.....	108
CONCLUSIONES	110
BIBLIOGRAFÍA.....	112
ARTÍCULOS ANEXADOS.....	123

LISTA DE ABREVIATURAS

AnkG: Ankirina G

NPY+: Positiva para Neuropéptido Y

CT: Neuronas corticotalámicas

Pv+: Positiva para Parvoalbumina

CC: Neuronas corticocorticales

RS: *Regular-spiking*

CCK+: Positiva para Colecistoquinina

SIA: Segmento inicial del axón

EIC: Estructuras Inhibidoras Complejas

SOM+: Positiva para Somatostatina

ELT: Epilepsia del lóbulo temporal

Terminales Ch: Terminales en candelabro

FB: *Fast Blue*

VIP+: Positivo para Péptido intestinal vasoactivo

FS: *Fast-spiking*

vGAT: Transportador vesicular de GABA

HLS1: Área de representación de la extremidad posterior en la corteza somatosensorial primaria

VPL: Núcleo ventral posterolateral talámico

-ir: elementos inmunorreactivos

VPM: Núcleo ventral posteromedial talámico

RESUMEN

Las interneuronas GABAérgicas de la corteza cerebral de los mamíferos son inhibitoras y modulan la actividad y las respuestas de las neuronas piramidales. Las interneuronas corticales se clasifican atendiendo a criterios morfológicos, electrofisiológicos, neuroquímicos, a su origen y distribución laminar y también según la región de las neuronas piramidales con las que establecen contactos sinápticos. Entre las interneuronas se encuentran las células en cesto que inervan de manera selectiva el soma neuronal, y en menor medida la región más proximal de las dendritas; y las neuronas en candelabro o axo-axónicas, que inervan selectivamente el segmento inicial del axón (SIA) de las neuronas piramidales. Para conocer si la inhibición perisomática de las neuronas piramidales es homogénea entre las distintas capas y áreas corticales, la presente Tesis Doctoral ha centrado su estudio cuantitativo en las distintas capas de la neocorteza temporal humana y la neocorteza somatosensorial primaria del ratón, incluyendo la innervación llevada a cabo por los terminales de las neuronas en cesto y en candelabro.

En el presente trabajo, hemos obtenido datos cuantitativos de la densidad de los terminales GABAérgicos en el neuropilo de las distintas capas corticales, así como datos del área del soma y datos del área, longitud y diámetro de los SIAs, que junto con la cuantificación de los terminales en aposición a ambas estructuras, nos ha permitido obtener datos de la densidad de su innervación GABAérgica. Asimismo, hemos obtenido los mismos datos cuantitativos en las neuronas corticotálámicas de la corteza somatosensorial del ratón, una subpoblación de neuronas piramidales de capa VI identificadas en base a técnicas de trazado neuronal, en animales que recibieron inyecciones del trazador *Fast Blue* en el núcleo ventral posteromedial del tálamo.

Para desarrollar este estudio hemos empleado técnicas de inmunofluorescencia múltiple en secciones de la corteza cerebral murina y humana, utilizando simultáneamente anticuerpos frente al transportador vesicular de GABA (vGAT) como marcador de los terminales GABAérgicos, anticuerpos que reconocen a la proteína nuclear neuronal NeuN para marcar los somas neuronales y anticuerpos frente a las proteínas ankirina G y espectrina β IV para marcar el SIA de las neuronas corticales del ratón y humano, respectivamente. Las secciones se

estudiaron mediante microscopía confocal y una vez obtenidas las series de imágenes, se utilizaron técnicas de segmentación, reconstrucción y cuantificación tridimensionales utilizando diversos programas informáticos. El análisis de la densidad general de terminales axónicos GABAérgicos, se realizó mediante la aplicación informática ImageJ mientras que el resto de las variables se estudiaron utilizando el programa Imaris (7.6.4, Bitplane, Switzerland), que permite crear máscaras para obtener valores de volumen, así como segmentar y cuantificar tridimensionalmente objetos en las series de imágenes en base a su intensidad de marcaje. Finalmente, utilizamos la herramienta *Filament*, del programa Imaris, para estudiar el número y la densidad de los terminales GABAérgicos a lo largo de la extensión de los SIAs.

Los resultados de este trabajo indican que la neocorteza temporal humana y la neocorteza somatosensorial de ratón presentan diferencias y patrones laminares específicos, en la densidad de terminales GABAérgicos en el neuropilo, en el tamaño de los somas neuronales y los SIAs, así como en el número y la densidad de botones GABAérgicos en aposición a estos dos dominios neuronales. Estos patrones muestran que, en ambas especies, las neuronas que tienen los somas más grandes y los SIAs con mayor tamaño, longitud y diámetro medio, están presentes principalmente en la capa V, seguidos de las capas III y VI. En cambio, las neuronas con los valores más pequeños en relación al área del soma, y al área, longitud y diámetro medio del SIA, se encuentran en las capas I y IV, también en ambas especies. En las dos regiones corticales hemos observado una correlación positiva entre la superficie del soma neuronal y la del SIA, por lo que las neuronas piramidales con somas de mayor tamaño tienen un SIA con mayor superficie, longitud y diámetro medio.

Respecto a la morfología de los SIAs, hemos observado que la longitud y el diámetro medio de estos no están correlacionadas entre sí, pero ambas variables determinan el área del SIA. Además, observamos que el diámetro del SIA disminuye progresivamente a lo largo de su longitud, pero de manera variable en neuronas de las distintas capas corticales.

Respecto al número de botones GABAérgicos hemos observado que en ambas especies existe una correlación positiva entre la superficie de los somas, o de los SIAs, y el número de los terminales GABAérgicos en aposición a cada uno de estos dominios neuronales. Sin embargo, la densidad de terminales GABAérgicos en aposición a los somas, o a los SIAs no está correlacionada con el tamaño de dichos dominios neuronales, ni con la densidad general de

terminales GABAérgicos en el neuropilo de las distintas capas corticales. Además, en ambas especies, observamos que la densidad de botones GABAérgicos es mayor en el SIA que en el soma y que ambas variables no están correlacionadas.

Por último, en el presente trabajo observamos que las neuronas corticotalámicas no se distinguen de la población general de neuronas de capa VI por el tamaño o la innervación GABAérgica de su soma. Sin embargo, las neuronas corticotalámicas tienen SIAs con menor diámetro y superficie, que los de la población general de neuronas de capa VI, y reciben menos terminales GABAérgicos.

Los resultados de nuestro trabajo demuestran la existencia, tanto en la neocorteza temporal humana como en la corteza somatosensorial del ratón, de una importante variabilidad y especificidad en la inhibición GABAérgica del soma y los SIAs de las neuronas piramidales de las distintas capas corticales, e incluso diferencias entre subpoblaciones neuronales dentro de una capa cortical.

ABSTRACT

GABAergic interneurons in the mammalian cerebral cortex are inhibitory and modulate the activity and responses of pyramidal neurons. Cortical interneurons are classified according to morphological, electrophysiological, and neurochemical criteria, their origin and laminar distribution and according to the region of the pyramidal neurons with which they establish synaptic contacts. Among the types of interneurons are basket cells, that selectively innervate the neuronal soma, and to a lesser extent, the most proximal region of the dendrites, and chandelier cells, or axo-axonal neurons, which selectively innervate the axon initial segment (AIS) of pyramidal neurons.

In order to know whether the perisomatic inhibition of pyramidal neurons is homogeneous between the different layers and cortical areas, the present work has focused on the quantitative characterization of perisomatic inhibition in the different layers of the human temporal neocortex and the primary somatosensory neocortex of the mouse, including that innervation carried out by the terminals of both basket and chandelier neurons. We have obtained quantitative data on the density of GABAergic terminals in the neuropil of the different cortical layers, as well as data regarding the neuronal soma surface area and the length, mean diameter and surface area of the AISs. These data, together with the quantification of the terminals in apposition to these two neuronal domains, allowed us to estimate the density of their GABAergic innervation. Additionally, we have studied the same quantitative parameters in mouse somatosensory cortex corticothalamic neurons, a subpopulation of layer VI pyramidal neurons identified on the basis of tract-tracing techniques, in animals that received injections of the retrograde tracer *Fast Blue* in the ventral posteromedial nucleus of the thalamus.

For this study we have used multiple immunofluorescence techniques in mouse and human cortical sections, using antibodies raised against the vesicular GABA transporter (vGAT) as a marker of GABAergic terminals, antibodies that recognize the neuronal nuclear protein NeuN as a marker of neuronal cell bodies and antibodies directed to ankyrin G and β IV spectrin to label the AIS of mouse and human cortical neurons, respectively. The sections were studied by confocal microscopy and the images obtained were studied by three-dimensional segmentation, reconstruction and quantification techniques using various computer programs. The analysis of

the general density of GABAergic axon terminals was carried out using the ImageJ application, while the rest of the variables were studied using Imaris software (7.6.4, Bitplane, Switzerland) that allows the creation of masks to obtain volume values, as well as the three-dimensional object segmentation and quantification, in the series of images, based on their intensity of immunostaining. Finally, we used the *Filament* tool of Imaris software to study the number and density of GABAergic terminals along the length of the AIS.

The results of the present work indicate that the human temporal neocortex and the mouse somatosensory neocortex show differences and specific laminar patterns in the density of GABAergic terminals in the neuropil, neuronal cell body and AIS size, as well as in the number and density of GABAergic buttons in apposition to these two neuronal domains. These patterns indicate that neurons with the largest cell body and AIS are present primarily in layer V, followed by layers III and VI, in both species. On the other hand, neurons with the lowest values of soma surface area and the lowest values of length, average diameter and surface area of the AIS, are found in layers I and IV, also in both species. We have observed in both cortical regions a positive correlation between the surface area of the neuronal soma and that of the AIS, so that pyramidal neurons with larger somas have an AIS with larger AISs, including surface area, length and average diameter.

Regarding AIS morphology, we have observed that the length and the average diameter of the AISs are not correlated, but both variables determine AIS surface area. In addition, we observed that the AIS diameter of cortical neurons decreases progressively along its length, but in a variable manner in neurons from different cortical layers.

Regarding the number of GABAergic buttons, we have found in both species a positive correlation between the surface of the somas, or AISs, and the number of GABAergic terminals in apposition to each of these neuronal domains. However, the density of GABAergic terminals in opposition to the somas, or to the AISs, is not correlated with the size of these neuronal domains, nor with the general density of GABAergic terminals in the neuropil of the different cortical layers. Furthermore, we observed in both species, that the density of GABAergic buttons is higher in the AIS than in the soma and that these two variables are not correlated.

Finally, in the present work we observed that corticothalamic neurons cannot be distinguished from the general population of layer VI neurons, attending to their size or the GABAergic innervation of their soma. However, corticothalamic neurons have AISs with a smaller diameter and surface area than those of the general population of layer VI neurons and receive less GABAergic terminals.

Altogether, the results of our work demonstrate the existence, both in the human temporal neocortex and in the somatosensory cortex of the mouse, of an important variability and specificity in the GABAergic inhibition of the soma and the AISs of pyramidal neurons of the different cortical layers and even differences between neuronal subpopulations within a cortical layer.

INTRODUCCIÓN

1. ORGANIZACIÓN INTRÍNSECA DE LA CORTEZA CEREBRAL

Entre los acontecimientos más notables que han tenido lugar durante la evolución del cerebro humano se encuentra el aumento de su tamaño y, el gran desarrollo y diferenciación de la corteza cerebral. El aumento de tamaño viene acompañado de un incremento del número de neuronas y de conexiones sinápticas, de forma que el cerebro se hace cada vez más complejo. Así, parece lógico suponer que gracias al aumento de la complejidad de nuestro cerebro ha sido posible el desarrollo espectacular de las funciones cognitivas y de las habilidades artísticas. ¿Pero, qué tiene de especial la neocorteza humana y en qué se diferencia de la de otras especies?

En general, la corteza cerebral de los diferentes grupos de vertebrados contiene un conjunto similar de elementos al de cualquier otra región del sistema nervioso central. Del mismo modo, las propiedades fisiológicas, los neurotransmisores, los receptores y otras moléculas que normalmente se encuentran en las neuronas corticales, no son características exclusivas de la corteza, sino que se encuentran también en diversas regiones del cerebro humano y en el de otras especies.

La neocorteza se considera la región que más ha evolucionado y se ha expandido, particularmente en primates. En los humanos representa al menos el 85% del peso total de los hemisferios cerebrales (Jenkins y Truex, 1963). El aumento del cerebro está relacionado con este incremento del peso total, aunque las capacidades cognitivas del hombre no están relacionadas únicamente con dicho aumento de tamaño. Por tanto, el estudio comparado de la neocorteza es importante para establecer los principios generales de la organización cortical y su evolución. Existen diferencias entre la corteza humana con el resto de los mamíferos a nivel tanto cuantitativo como cualitativo (DeFelipe *et al.*, 2007). Así, el cerebro del ratón, usado tradicionalmente como modelo de estudio en el ámbito de la neurociencia, presenta un número de neuronas aproximadamente 3 órdenes de magnitud menor que la corteza del cerebro humano.

En cuanto a la estructura de la neocorteza, se trata de una región altamente organizada, la cual se puede describir desde dos puntos de vista diferentes. El primero de ellos refleja una distribución de las neuronas en capas paralelas a su superficie; es decir, la organización laminar, que se describe más adelante.

El otro punto de vista desde el que se puede describir la organización de la corteza propone una organización que tiene una base funcional y fue propuesta originalmente por Lorente de Nó en 1938 con el nombre de las “unidades elementales de operación”. Estas unidades constituyen pequeños cilindros verticales formados por agrupaciones de neuronas que atraviesan todas las capas corticales. Esta teoría sirvió para fundamentar 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 columnas en dos niveles de observación diferentes. Por un lado, se encuentra la minicolumna o unidad básica modular (**Figura 1**), que se considera la unidad funcional más pequeña de la corteza cerebral, y está formada por grupos de células interconectadas dentro de un cilindro vertical de 25-30 micras de diámetro. Por otro lado, el ensamblaje de varias minicolumnas da lugar a una macrolumna, (aproximadamente de 300-600 micras de diámetro) que es la unidad de distribución y procesamiento complejo de la información y se organiza mediante la interacción de varias minicolumnas (**Figura 1**) (Mountcastle, 1997; DeFelipe *et al.*, 2007).

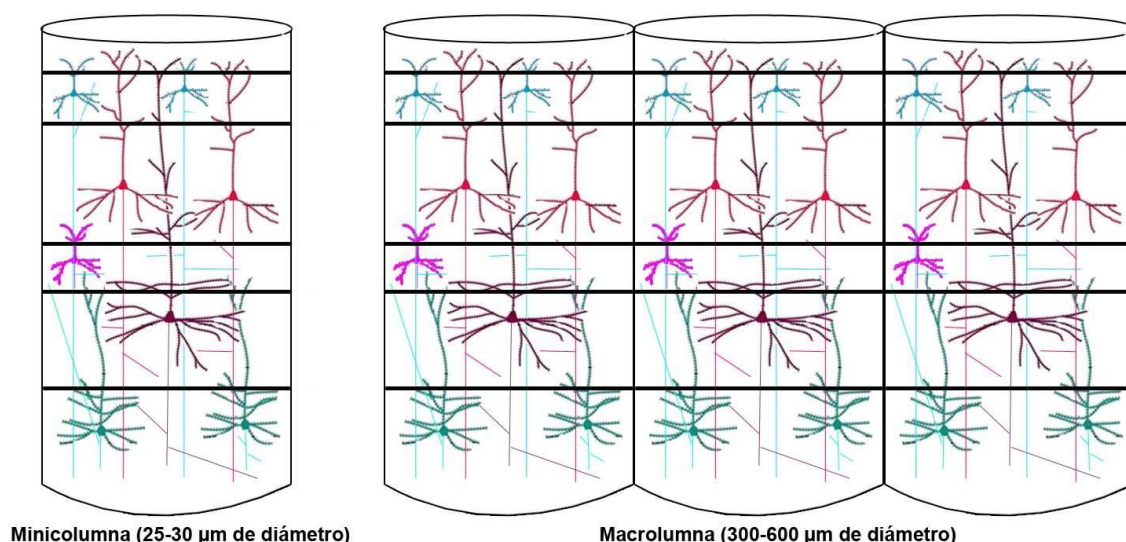


Figura 1. Representación de una minicolumna, cuyo ensamblaje con otras minicolumnas da lugar a una macrolumna.

En la presente tesis, las áreas de estudio de la corteza en las que se ha centrado nuestro trabajo son la corteza somatosensorial primaria de ratón y la corteza temporal humana.

- Corteza somatosensorial primaria de ratón

Se caracteriza por ser el conjunto de módulos de la corteza cerebral responsable de la representación de la superficie corporal en la corteza. Es la corteza cerebral más ampliamente estudiada en roedores debido a su accesibilidad experimental y dentro de esta región se encuentra la representación de la pata trasera o *Hindlimb* (**Figura 2**) que ha sido el objeto del presente estudio.

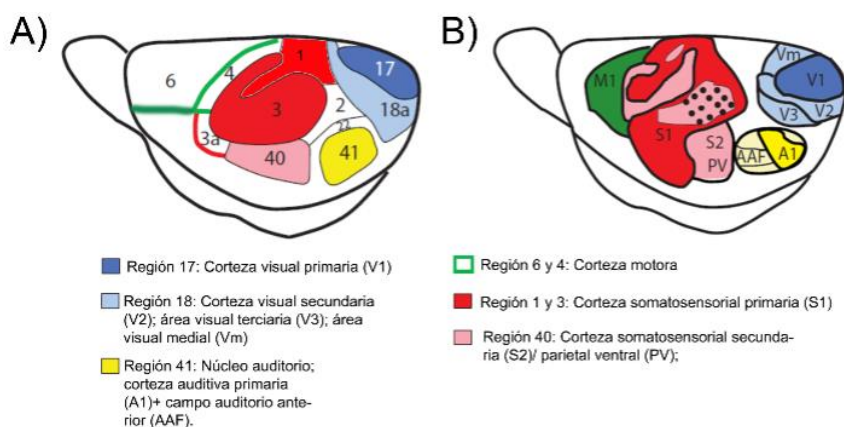


Figura 2. Esquema general de la organización funcional en la corteza cerebral de ratón. En la imagen A se muestra las áreas determinadas por Caviness (1975) con los colores que se les corresponde con su área funcional (imagen B). Modificada de Krubitzer *et al.*, 2011.

- Corteza temporal humana

En el caso de la corteza humana, se ha estudiado la corteza temporal que corresponde a las áreas 21 y 22 de Brodmann. Dicha región cortical está implicada en funciones cerebrales superiores relacionadas con la integración de estímulos sensoriales o consolidación de la memoria.

2. TIPOS CELULARES

Desde los estudios clásicos de Cajal y Rafael Lorente de Nó (1902-1990) sobre la microanatomía de la corteza cerebral, se distinguen dos clases principales de neuronas en la corteza cerebral (incluyendo el hipocampo) y la amígdala (Cajal, 1893, 1911; Lorente de Nó, 1922, 1933, 1934): Células de proyección e interneuronas (**Figura 3**).

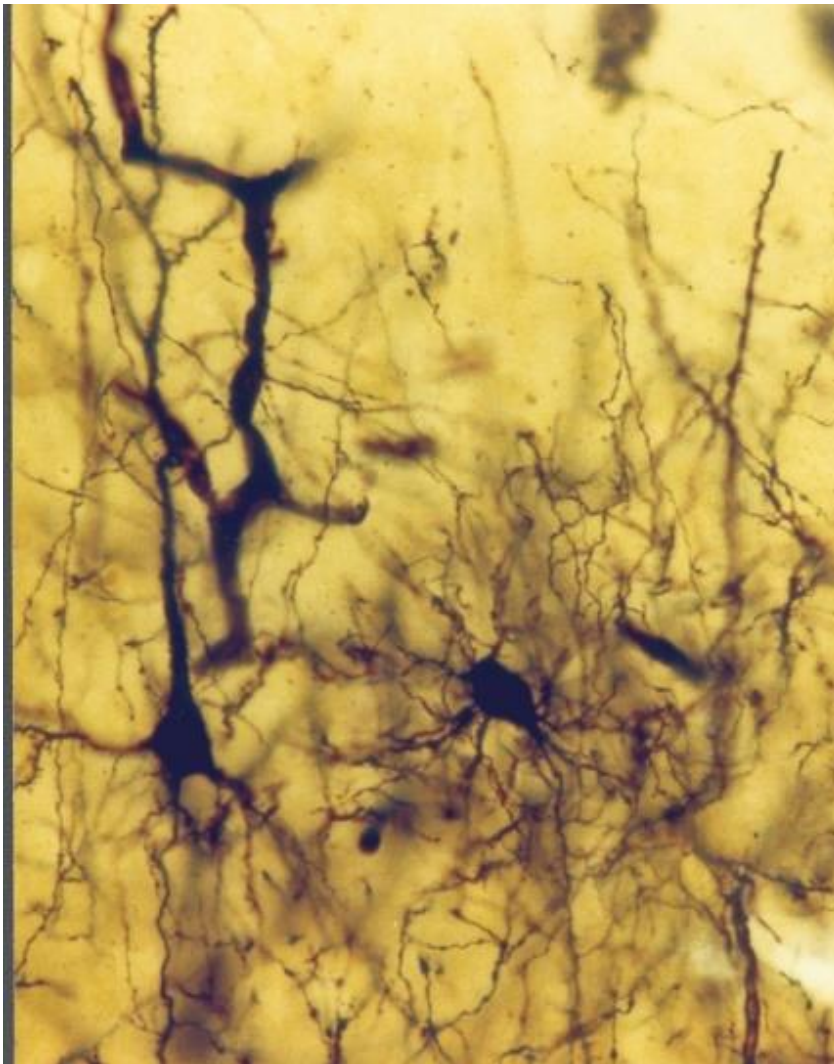


Figura 3. Microfotografía de una preparación de corteza cerebral de gato (polo occipital) teñida con el método de Golgi, para ilustrar los dos tipos principales de neuronas: células piramidales (izquierda) y células no piramidales o interneuronas (derecha). Tomada de DeFelipe y Jones (Cajal on the Cerebral Cortex, Oxford University Press, New York, 1988).

Tras estos estudios, el trabajo colectivo de numerosos laboratorios (revisado en Jones 1981, 1983; Peters y Jones, 1984; White, 1989; Amaral e Insausti, 1990; DeFelipe y Fariñas, 1992;

Freund y Buzsáki, 1996; Somogyi *et al.*, 1998) ha mostrado las dos siguientes características fundamentales de las células de proyección:

- i. Se trata de las células más abundantes (75-85% de la población total de neuronas).
- ii. Con algunas excepciones, son excitadoras y utilizan el glutamato como neurotransmisor.
- iii. Las células de proyección incluyen los siguientes tipos de neuronas: las células piramidales y una subpoblación de células estrelladas con espinas de la neocorteza (interneuronas excitadoras); las células piramidales del hipocampo, complejo subicular y corteza entorrinal; las células granulares y las células musgosas del giro dentado; y, por último, las células con espinas de la amígdala.

Con respecto a las interneuronas, estas carecen o tienen muy pocas espinas. Se caracterizan por su heterogeneidad morfológica y por utilizar el GABA como neurotransmisor, siendo por tanto, inhibitorias.

Dentro de las células piramidales e interneuronas, se distinguen poblaciones por su morfología, conexiones sinápticas y características neuroquímicas y fisiológicas (Peters y Jones, 1984; Freund y Buzsáki, 1996; Kawaguchi y Kubota, 1997, 1998; Somogyi *et al.*, 1998; DeFelipe, 1993, 1997a; Gupta *et al.*, 2000; Markram *et al.*, 2004; DeFelipe *et al.*, 2005).

3. CAPAS CORTICALES

La organización citoarquitectónica laminar de la corteza cerebral refleja una disposición de las neuronas que la forman, ya que se disponen generalmente en seis capas paralelas a la superficie pial. En 1867, Maynert describió la existencia de cinco capas corticales. Desde entonces han existido numerosas clasificaciones y denominaciones, de las cuales la más utilizada es la de Brodmann. Brodmann 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, con diferencias en cuanto a la densidad celular y tipos celulares (Jones, 1984):

- Capa I. Plexiforme o molecular. Es la capa más superficial y se caracteriza por tener una baja densidad neuronal, y contiene principalmente interneuronas. Está compuesta además por numerosas células gliales y prolongaciones axónicas y dendríticas de neuronas que se encuentran en capas profundas.

-Capa II. Capa granular externa. En esta capa encontramos principalmente células granulares y dendritas apicales de neuronas cuyos somas están localizados en las capas inferiores. Además, también hay pequeñas células piramidales e interneuronas GABAérgicas. Junto con la capa III, proporciona la mayor parte de las salidas a otras regiones corticales.

- Capa III. Capa piramidal externa. En esta capa encontramos neuronas piramidales más grandes que las presentes en la capa II. En general, las neuronas de las capas II y III conectan regiones corticales adyacentes e integran varias funciones corticales

- Capa IV. Capa granular interna. Se caracteriza por presentar células piramidales de tamaño semejante a las de la capa II, además de una elevada densidad de células granulares o estrelladas. Recibe la mayoría de las aferencias talámicas y permite dividir la corteza en capas supra- e infragranulares.

- Capa V. Capa piramidal interna. Se subdivide en general en dos subcapas: Va y Vb. En ella se encuentran los somas de las células piramidales más grandes de la corteza, y también contiene parte de las dendritas basales de neuronas de las capas III y IV. Las células piramidales proyectan largos axones que descienden a los ganglios basales, tallo cerebral y médula espinal.

- Capa VI. Capa Polimórfica. Se considera una capa heterogénea con pocas neuronas piramidales grandes y una mayor población de neuronas piramidales pequeñas y neuronas fusiformes perpendiculares a la superficie cortical. Las células piramidales de esta capa proyectan al tálamo, así como a otros núcleos subcorticales extratálámicos y otras áreas corticales.

El tamaño relativo de las distintas capas, las características morfológicas de las neuronas, así como la presencia o ausencia de alguna de ellas (capa IV, alguna de las subcapas de la capa V) permiten dividir a la corteza cerebral en distintas áreas citoarquitectónicas.

4. CIRCUITOS CORTICALES

Una vez descrita la estructura general de la corteza, hablaremos de su funcionamiento. Para ello, debemos comenzar por los circuitos corticales.

El procesamiento de información intracortical se realiza a través de complejos circuitos sinápticos que se establecen por la interacción entre múltiples neuronas de proyección e interneuronas corticales y entre éstas y las aferencias subcorticales (talámicas y extratalámicas) a la corteza. A continuación, nos referiremos a algunos aspectos de los circuitos intracorticales que son especialmente relevantes para la presente Tesis.

4.1 Eferencias subcorticales de la neocorteza

Todas las neuronas corticales de proyección tienen colaterales recurrentes que participan en los circuitos locales, así que no existen capas con una función únicamente de proyección. Las neuronas de proyección de la corteza cerebral son, casi exclusivamente, células piramidales situadas en las capas II, III, V y VI. Existe una organización laminar específica de las células piramidales según su lugar de proyección. Como regla general se puede decir que las conexiones corticocorticales se originan principalmente en las capas corticales superficiales (capas II-III), mientras que las proyecciones subcorticales se originan principalmente en capas profundas. En concreto, la capa V proyecta al cuerpo estriado, el tallo cerebral y la médula espinal, mientras que la capa VI envía eferencias principalmente al tálamo (Jones, 1984; Douglas y Martin, 1990) (**Figura 4**). La capa IV, en general, contiene pocas o ninguna neurona de proyección en la mayoría de las áreas corticales, sin embargo, en el área visual primaria del mono y del gato se ha descrito un tipo de célula estrellada con espinas que proyecta fuera de la corteza (Lund *et al.*, 1975; Shatz, 1977).

Por el contrario, la capa VI se caracteriza por ser una capa heterogénea en cuanto a las diferentes poblaciones que la forman, entre ellas, las neuronas que establecen conexiones con el tálamo. De este modo, se pueden distinguir al menos tres tipos principales de células, según las conexiones que establecen (Thomson, 2010). Estas diferentes poblaciones neuronales también muestran características morfológicas distintas. Así, el 30-50% total de las células piramidales de la capa VI presentan unos árboles axónicos que alcanzan capas superiores (IV y V) y también establecen conexiones con el núcleo sensorial primario del tálamo correspondiente, así como con los núcleos inhibidores como el núcleo reticular talámico (nRT). Dichas neuronas se conocen como corticotalámicas (CT). Algunas de ellas inervan núcleos intermedios y/o regiones de asociación talámicas relacionadas con la modulación de la región sensorial primaria, y que a su vez envían información a las neuronas corticotalámicas de la capa VI. Estas células forman parte

de nuestro estudio, y se han identificado mediante el uso de un trazador retrógrado (Thomson, 2010). Otras poblaciones neuronales de la capa VI son las células corticocorticales (CC) que pueden ser pequeñas células bipolares con árboles dendríticos que extienden a largas distancias horizontalmente; o bien neuronas piramidales, denominadas piramidales invertidas, cuya dendrita apical se dirige a la sustancia blanca. Por último, existe una población de neuronas piramidales con una fina y larga dendrita apical, y largos axones horizontales en su mayoría localizados a las capas profundas, aunque también proyectan al claustrum (Thomson, 2010).

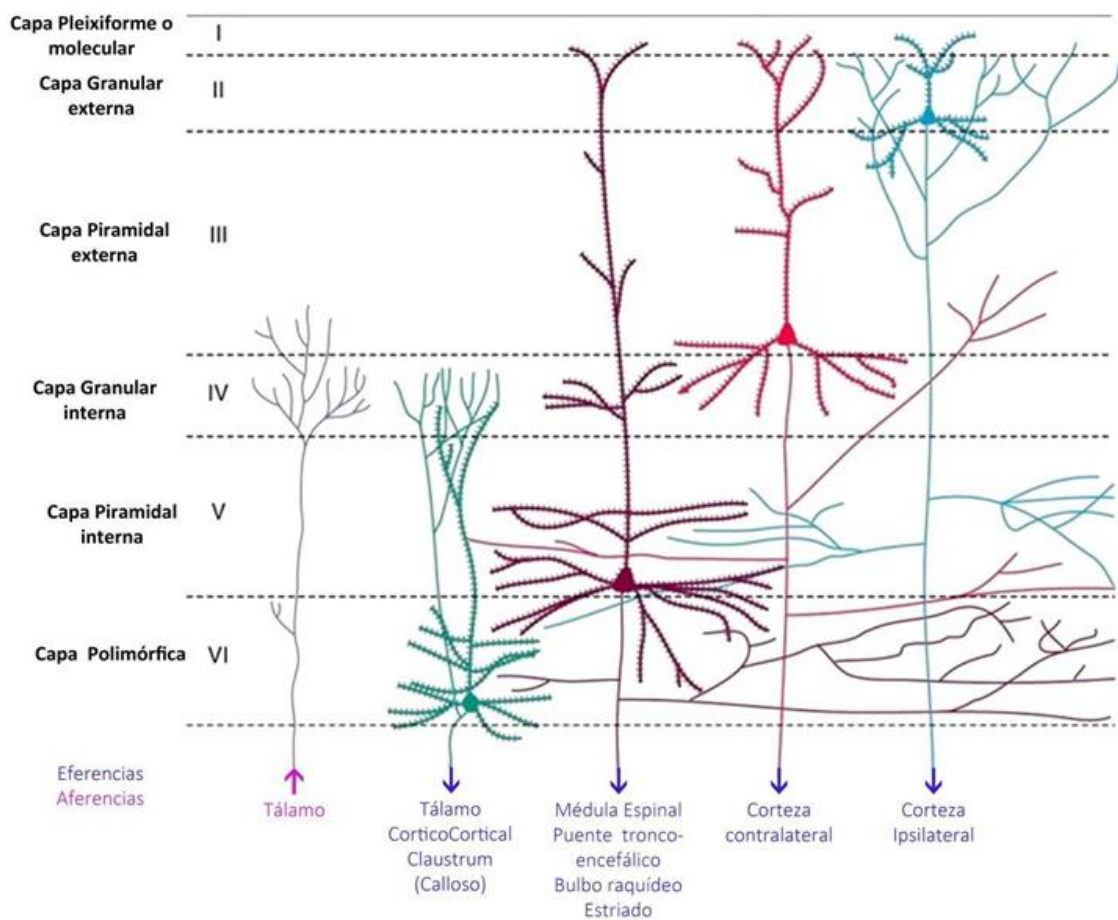


Figura 4. Representación esquemática de las neuronas piramidales presentes en cada una de las capas de la corteza cerebral y los principales sitios de proyección (*output*). Este esquema se basa principalmente en datos obtenidos mediante experimentos de trazado anatómico en el cerebro del mono y del gato. (Adaptada de Jones, 1984).

4.2 Aferencias de la neocorteza

- *Conexiones corticocorticales*

El mayor número de aferencias de la corteza cerebral procede de células piramidales de otras áreas corticales. Se ha estimado que solo 1 de cada 100, o incluso 1 de cada 1000 fibras de la sustancia blanca proviene de aferencias subcorticales (Braitenberg y Schüz, 1991). La mayoría de las fibras de la sustancia blanca están relacionadas con conexiones intra e interhemisféricas. Las fibras de asociación ipsilateral y las fibras callosas terminan en todas las capas corticales pero su principal territorio de distribución es en las capas I-IV, y especialmente en las capas II-III (Cipolloni y Peters, 1983; Innocenti, 1986; Porter y White, 1986; White, 1989; White y Czeiger, 1991; Czeiger y White, 1993). Los axones corticocorticales forman conexiones tanto con células piramidales como con las interneuronas (**Figura 4**).

- *Aferencias subcorticales*

Las aferencias subcorticales pueden ser tanto de origen talámico como extratalámico y forman conexiones tanto con células piramidales como con las interneuronas (**Figura 5**). El tálamo proyecta a todas las áreas corticales y proporciona aferencias a la mayoría de las capas de la corteza, principalmente a la capa I, capas medias (III y/o IV) y capa VI (Jones, 1984; Douglas y Martin, 1990). Aunque el tálamo es la principal fuente subcortical de aferencias a la neocorteza, no es la única. Así existen más de 20 estructuras subcorticales diferentes que proyectan a la neocorteza. Estas estructuras incluyen el claustró, el prosencéfalo basal, los núcleos de rafe dorsal y medial, y el sistema pontinoreticular. La naturaleza de estas aferencias es muy variada, así encontramos fibras GABAérgicas, monoaminérgicas (dopaminérgicas, noradrenérgicas y serotoninérgicas) y colinérgicas (Houser *et al.*, 1985; DeFelipe y Jones, 1988; Goldman-Rakic *et al.*, 1989; Papadopoulos *et al.*, 1989; Beaulieu y Somogyi, 1991; DeFelipe *et al.*, 1991; revisado en Goldman-Rakic, 1996; Okhotin y Kalinichenko, 2002).

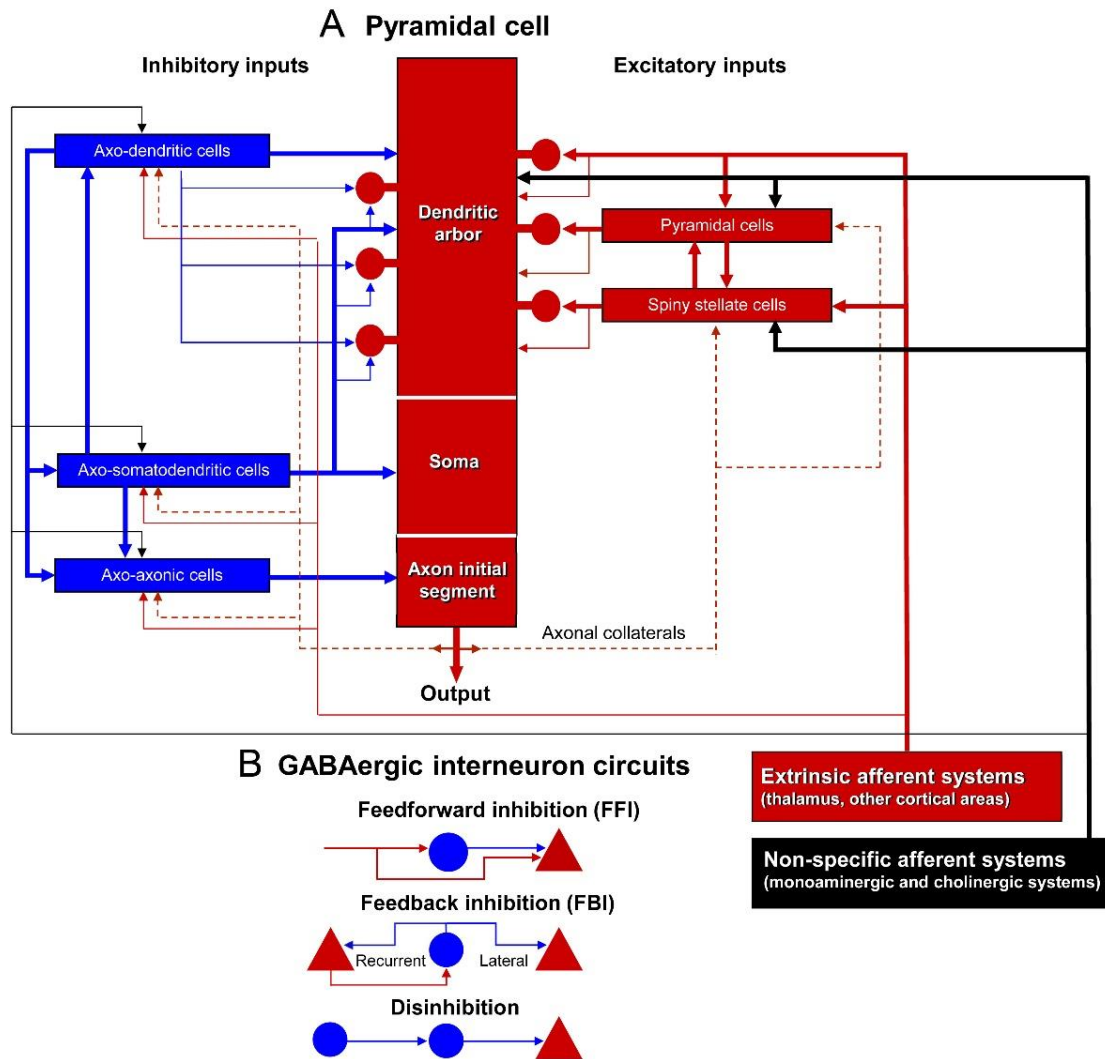


Figura 5. Dibujos esquemáticos que muestran las conexiones sinápticas de las interneuronas con las células piramidales, las conexiones entre las interneuronas, así como las aferencias corticales. Rojo, células glutamatérgicas; azul, células GABAérgicas; negro, aferencias extra-talámicas subcorticales que no utilizan el glutamato o GABA (con algunas excepciones) como neurotransmisores (ej., serotonina, dopamina y acetilcolina). Tomada de DeFelipe y Rudy (2018).

A continuación, vamos a centrarnos en algunas de las características peculiares de las neuronas de la corteza cerebral, y sobre el soma y el SIA de las células piramidales que son los principales temas de estudio de esta Tesis.

5. NEURONAS DE PROYECCIÓN: SOMA Y SEGMENTO INICIAL DEL AXÓN

Las células de proyección, como se ha visto anteriormente, son las neuronas más abundantes en la corteza cerebral. Las neuronas piramidales presentan una estructura polarizada pudiendo dividirse tanto estructural como funcionalmente en diferentes partes. Cajal fue quien propuso que las neuronas se podían dividir en tres regiones funcionalmente distintas: un aparato receptor (formado por las dendritas y el soma), un aparato de emisión (el axón) y un aparato de distribución (la arborización axónica terminal). Estas conclusiones influyeron mucho en los científicos de la época, y las observaciones y teorías de Cajal se confirmaron posteriormente (DeFelipe, 2002).

En cuanto a las dendritas, se puede distinguir una dendrita apical, y un número variable de dendritas basales (DeFelipe y Fariñas., 1992; Spruston, 2008). La dendrita apical se dirige perpendicularmente a la superficie de la corteza, generalmente alcanzando la capa I en la que forma un penacho dendrítico terminal, aunque también puede terminar en capas inferiores como ocurre con las células piramidales de la capa IV (revisado en Thomson, 2010). Por el contrario, las dendritas basales salen radialmente desde la base del soma. Toda la superficie dendrítica, excepto las porciones proximales que parten directamente del soma celular, está cubierta por unas pequeñas protrusiones que reciben el nombre de espinas dendríticas, que fueron descubiertas por Cajal (DeFelipe, 2015).

El soma presenta una forma piramidal u ovoide, del cual parte el axón que se dirige hacia la sustancia blanca y puede abandonar la corteza dirigiéndose a otras áreas corticales o subcorticales emitiendo ramas colaterales y constituyendo la arborización axónica. Dicha estructura es una pieza fundamental en el circuito intracortical, pudiendo distribuirse verticalmente en capas corticales superiores e inferiores, u horizontalmente en la misma capa cortical (DeFelipe y Fariñas, 1992). Además, en la región más proximal del axón se encuentra el SIA, que es la región del mismo capaz de iniciar los potenciales de acción debido a la alta concentración de canales de sodio.

El soma, se trata de la parte central de las neuronas de la cual parten las dendritas y el axón. Contiene los orgánulos típicos de las células eucariotas, y, además de las funciones típicas de

toda célula, en las neuronas desempeña otras funciones específicas como la síntesis de gran parte de los neurotransmisores, así como la integración de las señales eléctricas provenientes de las dendritas o directamente del soma. Dichas señales se transmiten al SIA en el cual se generan los potenciales de acción.

El SIA, es una estructura especializada del axón de las neuronas localizada a una distancia variable del soma; en algunas ocasiones puede incluso partir de una rama de la dendrita apical o de una dendrita basal (Gulledge y Bravo, 2016; Höfflin *et al.*, 2017). Suele medir entre 20 y 60 μm (Jones y Svitkina, 2016). El SIA es considerado un elemento único implicado, no solo en la regulación de la excitabilidad neuronal, sino también en la generación de los potenciales de acción. Debido a la gran densidad de canales de sodio que se sitúan en esta región es capaz de transformar los potenciales postsinápticos (generados en las dendritas y en el soma) en distintas frecuencias de potenciales de acción que representan la salida de información de la neurona (Stuart *et al.*, 1997; Yamada y Kuba, 2016; Höfflin *et al.*, 2017).

Las numerosas interacciones moleculares que permiten el anclaje y la localización precisa de los canales iónicos necesarios para la generación de potenciales de acción son responsables de la estabilidad de la compleja estructura que constituye el SIA. A pesar de esto, diversos estudios han revelado que el SIA no es una estructura estática, sino que puede sufrir procesos de plasticidad morfológica y funcional en respuesta a cambios en la actividad neuronal. Es decir, sus propiedades estructurales (la longitud y/o la localización relativa al soma) sufren cambios que van a ser cruciales en el control homeostático de la excitabilidad neuronal (Yamada y Kuba, 2016).

Por otra parte, se ha descrito una heterogeneidad considerable en la morfología de los SIAs, tanto entre especies, como durante el desarrollo y en las diferentes regiones corticales. Por ejemplo, en el mono tití, la longitud de los SIAs es mayor en la corteza frontal que en la corteza visual. De igual modo, en etapas tempranas del desarrollo en ratones, también se han descrito las mismas diferencias. De hecho, estas características podrían representar un principio general aplicable a diferentes especies de mamíferos y en diferentes etapas del desarrollo (Atapour y Rosa, 2017; Nozari *et al.*, 2017). Otro factor que parece influir en la longitud del SIA, además de la región cerebral y de la edad, es la morfología neuronal, observándose que las neuronas con un soma pequeño tienden a ser más excitables cuando su SIA presenta una longitud intermedia

y está localizado adyacente al soma. En cambio, en las neuronas que tienen un soma más grande tienden a ser más excitables cuando el SIA es más largo y está más separado del soma (Gulledge y Bravo, 2016).

6. CÉLULAS NO PIRAMIDALES: INTERNEURONAS INHIBIDORAS

Las interneuronas comparten algunas características comunes:

- i. Presentan dendritas con pocas o sin espinas, al menos las interneuronas inhibitoras maduras;
- ii. Reciben el nombre de “neuronas de axón local” puesto que la arborización del axón establece sinapsis localmente, pero no llegan a establecer relaciones con otras regiones del cerebro, salvo en una pequeña proporción de neuronas GABAérgicas (revisado en Urrutia-Piñone *et al.*, 2022);
- iii. Pueden recibir sinapsis en sus somas, tanto de tipo excitador como inhibitor.

Como se apuntaba anteriormente, existe una gran variedad de tipos de interneuronas, tanto en la formación del hipocampo como en la neocorteza (**Figura 6**) (Cajal, 1893, 1911; Lorente de Nó, 1922, 1933, 1934; revisado en Ascoli *et al.*, 2008). Los diversos tipos morfológicos de interneuronas se reconocen principalmente por el patrón morfológico de su axón (revisado en Fairén *et al.*, 1984; Freund y Buzsáki, 1996; DeFelipe, 2002; Buzsáki *et al.*, 2004; Ascoli *et al.*, 2008). Por otra parte, en la corteza cerebral se ha identificado un gran número de neurotransmisores (GABA, acetilcolina, óxido nítrico) y neuropéptidos que pueden actuar como neuromoduladores (somatostatina, neuropéptido Y, colecistoquinina), así como otras moléculas, como receptores (diversos tipos y subtipos de receptores de GABA, glutamato, dopamina, serotonina) o canales iónicos (diversos tipos y subtipos de canales de potasio, sodio y calcio). Recientemente, el desarrollo de técnicas transcriptómicas, especialmente de secuenciación de ARN de células individuales (scRNA-seq) han proporcionado nuevos métodos para definir la diversidad celular cortical (por ejemplo, véase Yuste *et al.*, 2020). De este modo, una de las tendencias principales de la investigación sobre la corteza cerebral es tratar de averiguar si cada uno de los tipos morfológicos de neuronas se puede definir también desde un punto de vista molecular y fisiológico, lo que permitiría aportar información fundamental sobre su posible función en el procesamiento de información cortical (Jones y Hendry, 1986; DeFelipe,

1993; Freund y Buzsáki, 1996; Miles *et al.*, 1996; Kawaguchi y Kubota, 1997; Markram *et al.*, 2004; DeFelipe *et al.*, 2005).

Cabe destacar que algunas de estas células se tiñen inmunocitoquímicamente con anticuerpos dirigidos contra las proteínas fijadoras de calcio: parvalbúmina (PV), calbindina y calretinina (Celio, 1986, 1990; Andressen *et al.*, 1993; DeFelipe, 1997a). Los estudios de colocalización de estas proteínas fijadoras de calcio con diversas sustancias en la misma neurona han permitido una caracterización molecular bastante detallada de diversos tipos morfológicos de neuronas. Por ejemplo, la PV se localiza en neuronas que no expresan el péptido colecistoquinina y, por tanto, si un cierto tipo de interneurona se demuestra que contiene PV, indicaría que la interneurona en cuestión no expresa colecistoquinina. Así, se conocen indirectamente las características neuroquímicas de diversos tipos de interneuronas corticales (DeFelipe, 1993; 1997a; Freund y Buzsáki, 1996).

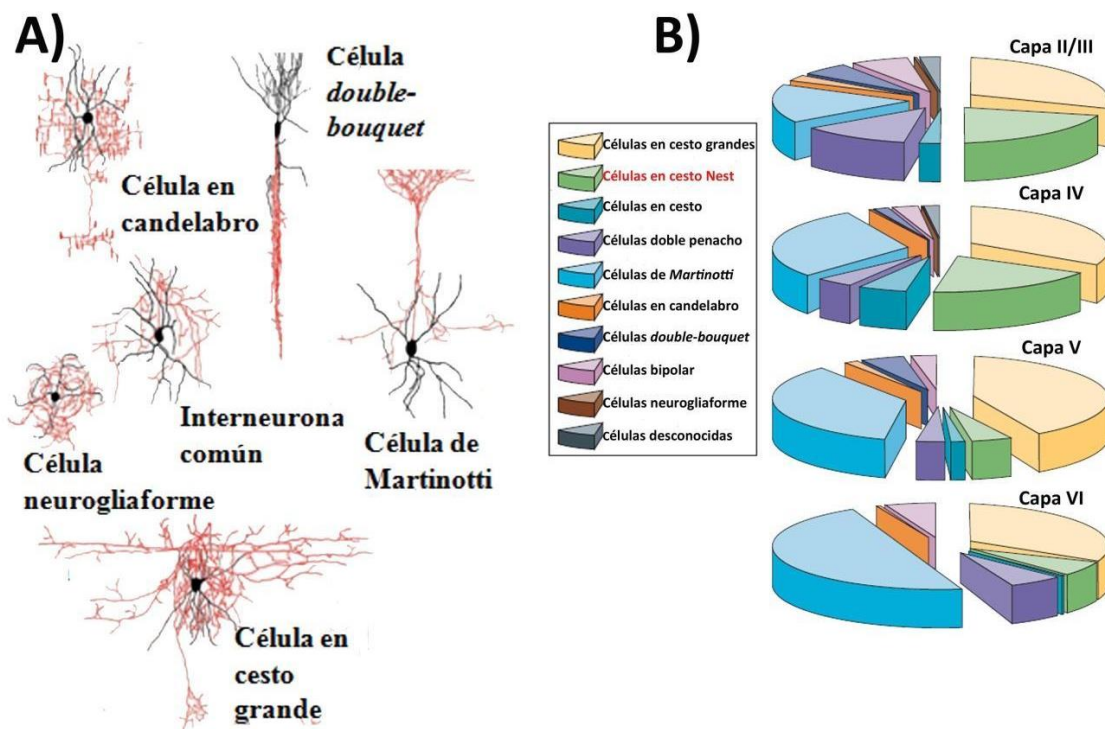


Figura 6. En A, se muestran la morfología de algunas de las principales interneuronas. En B, se muestra la distribución de estas a lo largo de las diferentes capas corticales. Imagen A modificado de DeFelipe (1993); imagen B tomada de Markram *et al.*, 2004.

- Conexiones de las interneuronas con las células piramidales

Según la región de inervación de las neuronas piramidales, se pueden diferenciar cuatro grupos de interneuronas (DeFelipe *et al.*, 2007):

- Interneuronas axo-dendríticas (Células AD): este tipo de interneuronas establecen sinapsis principalmente con los tallos y las espinas dendríticas de las neuronas piramidales. Un ejemplo serían las células de *double bouquet*.
- Interneuronas axo-somatodendríticas (Células ASD): establecen múltiples sinapsis tanto en dendritas como en somas, aunque existe preferencia por el soma. En este grupo estarían las células en cesto clásicas.
- Interneuronas axo-dendrosomáticas (Células ADS): al igual que las ASD, establecen sinapsis con ambas estructuras, pero en este caso existe preferencia por las dendritas. Dentro de este tipo encontramos ciertas células en cesto.
- Interneuronas axo-axónicas o células en candelabro (Células CH): en este caso solo existe este tipo de interneurona que inervan únicamente el SIA. Esto no significa que el SIA esté inervado solamente por las células en candelabro: otras células también pueden formar sinapsis axo-axónicas (Gonchar *et al.*, 2002; *vid.* DeFelipe y Fariñas, 1992).

La forma en que cada uno de estos tipos de interneuronas contacta con cada célula piramidal también es diferente. Puesto que el número de sinapsis GABAérgicas que una pirámide establece es del orden de varios cientos, y las interneuronas que establecen conexiones con las dendritas y somas forman relativamente pocas sinapsis con una célula piramidal dada —se han estimado que una interneurona dada raramente establece más de 20 o 30 contactos sinápticos con una célula piramidal (Peters y Fairén, 1978; Somogyi *et al.*, 1983a; Kisvárdy *et al.*, 1985; Tamás *et al.*, 1997b, 1998; DeFelipe, 1999)—, existe una gran convergencia de interneuronas sobre las dendritas y el soma de las células piramidales (Thomson y Deuchars, 1997; Tamás *et al.*, 1997b; Kawaguchi y Kubota, 1997; 1998; Somogyi *et al.*, 1998; Freund y Buzsáki, 1996). Por el contrario, solamente una o pocas células en candelabro (máximo 5, según algunos autores) son la fuente de prácticamente todas las sinapsis con el SIA, y cada célula en candelabro inerva decenas de células piramidales (Fairén y Valverde, 1980; Peters *et al.*, 1982; Freund *et al.*, 1983;

Somogyi *et al.*, 1983b; revisado en Somogyi *et al.*, 1982; DeFelipe y Fariñas, 1992; Freund y Buzsáki, 1996; DeFelipe 1999; Blazquez-Llorca *et al.*, 2015).

De este modo, numerosas neuronas inhibitorias intervienen en la innervación de las dendritas y el soma de las células piramidales, pero no en la innervación del SIA. Excepto las células en candelabro, los otros tipos de interneuronas GABAérgicas establecen sinapsis tanto con otras interneuronas como con células piramidales (**Figura 7**) —no se conoce en la neocorteza ningún tipo de interneurona que forme sinapsis solo con un tipo determinado de interneurona, aunque en el hipocampo se han descrito ciertos tipos de interneuronas que establecen sinapsis exclusivamente con determinadas interneuronas (Freund y Buzsáki, 1996). Excluyendo las células en candelabro, todas las interneuronas establecen sinapsis con más de una región postsináptica (SIA, soma, tallo dendrítico o espina dendrítica). Además, las interneuronas no forman necesariamente sinapsis solo con otras neuronas, ya que se ha demostrado que ciertas interneuronas establecen sinapsis consigo mismas (autapsis), lo que indica que estas interneuronas están implicadas en la regulación no solo de otras neuronas sino también de su propia actividad (Tamás *et al.*, 1997a; Bacci *et al.*, 2003).

En resumen, como regla general, las interneuronas no muestran una especificidad por un tipo particular de célula postsináptica (piramidal o interneurona) ni por una única región postsináptica. Más bien, se podría decir que las interneuronas muestran preferencia por ciertos elementos postsinápticos.

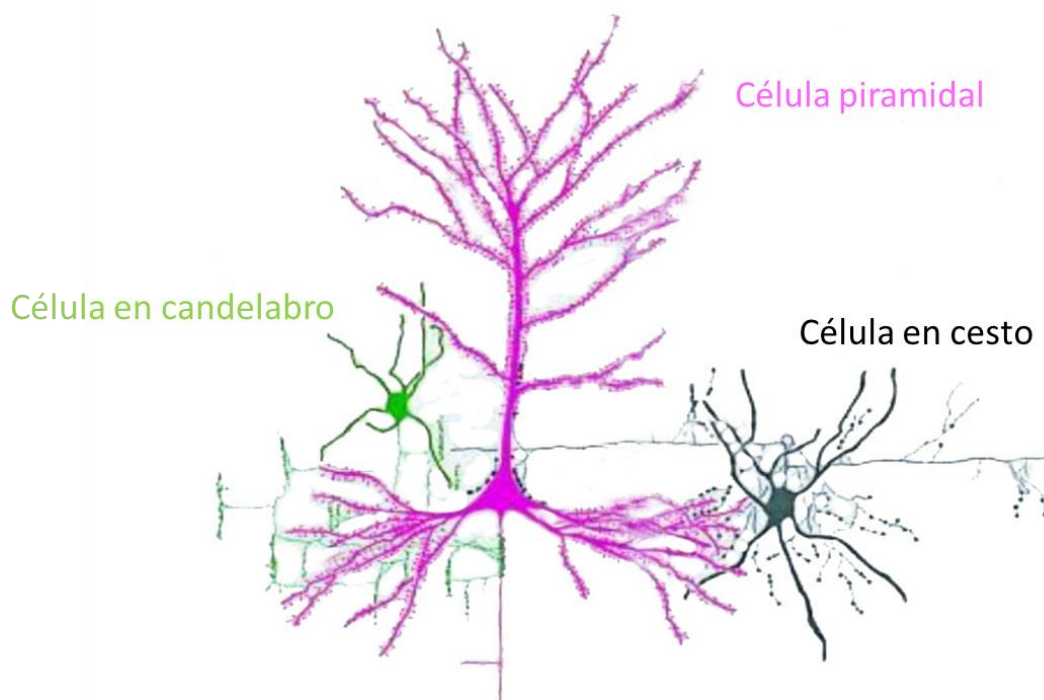


Figura 7. Dibujo esquemático que muestra las conexiones sinápticas de tres tipos principales de interneuronas (células en candelabro y células en cesto típicas o grandes) con las células piramidales en la corteza cerebral de primates. Tomado de DeFelipe y Fariñas (1992).

7. INERVACIÓN PERISOMÁTICA

El presente trabajo se ha centrado en el estudio de la inervación perisomática neuronal en todas las capas de la corteza temporal del hombre y de la corteza somatosensorial del ratón. El término “perisomático” se refiere a la inervación del soma, dendritas proximales y SIA. Como hemos comentado más arriba, prácticamente todas las sinapsis que reciben las células piramidales en su región perisomática expresan GABA, y la principal fuente de estas sinapsis son las células en cesto y las células en candelabro. Se ha propuesto que este tipo de inervación es clave para el control de la salida de información de las células piramidales (Buzsáki y Chrobak, 1995; Cobb *et al.*, 1995; Miles *et al.*, 1996). De tal manera, que la disminución de la inervación perisomática de las células piramidales supone una desinhibición de este tipo celular y está relacionada con patologías como la epilepsia, en la que se produce una activación brusca, de gran intensidad e hipersincrónica de células piramidales (DeFelipe, 1999). De este modo, el estudio de la inervación perisomática es de suma importancia.

7.1 Células en candelabro

Las células en candelabro representan un tipo de interneuronas con un cuerpo celular oval o multipolar que se caracteriza principalmente por las porciones terminales del axón, que forman cortas hileras de botones dispuestos verticalmente (terminales Ch; **Figura 7**) que recuerdan los clásicos candelabros, de ahí su nombre (*chandelier cells*), dado por János Szentágothai, quien las descubrió en 1974 (Szentágothai y Arbid, 1974). Las células en candelabro representan virtualmente la única fuente de sinapsis con el SIA de las células piramidales. Cada célula en candelabro da lugar a varios cientos de terminales Ch, y cada uno de estos terminales inerva únicamente el SIA de una sola célula piramidal. A su vez, como se ha descrito anteriormente, el SIA de las células piramidales está innervado por 1 o pocas (entre 2 y 5) células en candelabro (DeFelipe, 1999).

La naturaleza GABAérgica de estas neuronas se conocía por la morfología de las sinapsis que establece (sinapsis simétricas) (Somogyi, 1977; Fairén y Valverde, 1980; Somogyi *et al.*, 1982) y por estudios inmunocitoquímicos, utilizando anticuerpos dirigidos contra la GAD que mostraban que los terminales axónicos que forman sinapsis con los SIAs de las células piramidales eran GAD-positivos (Peters *et al.*, 1982; Somogyi *et al.*, 1983b; Freund *et al.*, 1983; DeFelipe *et al.*, 1985). Sin embargo, hasta 1989 la única forma de visualizar estas interneuronas era con el método de Golgi o con inyecciones intracelulares, pero como el método de Golgi es inconsistente y además las células en candelabro son difíciles de teñir en el cerebro adulto o de ser inyectadas intracelularmente, no se conocía con certeza su distribución ni sus características neuroquímicas, salvo la de ser GABAérgicas. Fue entonces cuando se observó que las células en candelabro se teñían inmunocitoquímicamente con anticuerpos dirigidos contra la proteína fijadora de calcio paravaloalbúmina (PV) (DeFelipe *et al.*, 1989). Esto permitió la caracterización neuroquímica de estas neuronas (mediante técnicas inmunocitoquímicas de doble marcaje o colocalización), estudiar su distribución cortical y conexiones sinápticas con poblaciones identificadas de células piramidales (revisado en DeFelipe, 1999).

Dado que el SIA de las células piramidales es una región postsináptica de gran importancia en el control de la excitabilidad de la célula piramidal, las células en candelabro son consideradas como las células inhibitoras más potentes de la corteza cerebral (Douglas y Martin, 1990; Stuart y Sakmann, 1994; revisado en DeFelipe, 1999). Entre los estudios neurofisiológicos de las células en candelabro destaca el trabajo de Zhu *et al.* (2004). Estos autores estudiaron la respuesta in

vivo de las células en candelabro en la capa 2/3 de la corteza somatosensorial (barriles) de la rata, tras la actividad evocada por la estimulación de las vibrisas contralaterales. Los resultados fueron comparados con las respuestas de las células piramidales y otras interneuronas en la misma capa y región cortical. Estos autores descubrieron que todas las neuronas registradas (piramidales e interneuronas) respondían a la estimulación de las vibrisas, pero no indujeron la producción de potenciales de acción en las células en candelabro, a diferencia de las células piramidales y las otras interneuronas registradas, que sí emitieron potenciales de acción. Pero lo más sorprendente fue que observaron que las células en candelabro, las cuales rara vez disparaban potenciales de acción de forma espontánea, originaban potenciales de acción mucho más robustamente que los otros tipos de neuronas cuando se incrementaba la excitación cortical en conjunto. Así, Zhu *et al.* (2004) sugirieron que las células en candelabro probablemente no procesan información sensorial ascendente rápida, sino que estarían reservadas para prevenir la excesiva actividad excitadora de los circuitos neuronales. Por último, las células en candelabro parecen tener una función clave en procesos complejos de sincronización de patrones de disparo de grandes poblaciones de células piramidales en distintos estados de conciencia (e.j., Cobb *et al.*, 1995; Miles *et al.*, 1996; Klausberger *et al.*, 2004; Howard *et al.*, 2005).

7.2 Células en cesto

Cajal fue el primero en describir con el método de Golgi unas células particularmente grandes y multipolares que se encontraban en las capas medias de la corteza visual (Cajal, 1899a) y en la corteza motora humana (Cajal, 1899b). Estas neuronas eran similares a las células que formaban cestos pericelulares en el cerebelo y el hipocampo (Cajal, 1888, 1893). De este modo Cajal propuso que este tipo de neurona multipolar grande se encontraba ampliamente distribuida en la corteza cerebral y cerebelosa. La terminología de células en cesto se introdujo años más tarde (Marin-Padilla, 1969), ya que Cajal las solía denominar células formadoras de nidos pericelulares. Cajal incluyó esta célula en su categoría de células de cilindro-eje corto. Este tipo celular poseía dendritas extremadamente largas y divergentes con pocas o ninguna espina dendrítica. El axón inicialmente asciende, pero posteriormente se arquea hacia abajo y da lugar a muchas ramas horizontales u oblicuas, que se arborizan y establecen pequeñas terminaciones en forma de cesto alrededor del soma y procesos proximales de las células piramidales. Cajal propuso que estos nidos pericelulares recibían ramas de muchos axones horizontales y que un único axón podría participar en la formación de muchos nidos. Observó nidos pericelulares muy complejos

formados por numerosas ramificaciones varicosas cortas, situados en aposición directa con la membrana del soma de las células piramidales en la corteza visual y motora y también en el hipocampo propio (Cajal, 1893, 1899a, 1899b). Sin embargo, Cajal no observó de forma directa la inervación de los somas neuronales por estas neuronas, sino que interpretó que las células grandes con axones horizontales de la neocorteza eran las mismas que las células en cesto que se encontraban en el hipocampo y el cerebelo. Además, en algunos dibujos, trazó algunos axones aferentes que probablemente tenían un origen subcortical y que también podrían colaborar en la formación de los nidos pericelulares.

Marin-Padilla (Marin-Padilla, 1969, 1972; Marin-Padilla y Stibitz, 1974) fue quien hizo la primera descripción moderna de este tipo celular, el reconocimiento de las conexiones de sus axones con los nidos pericelulares de Cajal, y la denominación de célula en cesto para estas neuronas. Marin-Padilla desarrolló sus estudios con el método de Golgi en la corteza visual y motora de cerebros humanos fetales y postnatales. Su descripción más completa fue en el área motora, donde observó cestos pericelulares complejos rodeando el soma de las células piramidales en las capas III y V. Observó que las células que él denominó “multipolares de tamaño medio” cuyo soma se situaba en las capas III y V, eran el origen de los axones horizontales largos que daban lugar a los cestos pericelulares. La descripción morfológica que realizó de las células fue similar a la de Cajal. También sugirió que algunos de los axones que contribuyen a la formación de los cestos pericelulares podrían tener un origen subcortical, fue capaz de trazar axones ascendentes desde la capa VI hasta los cestos de las células piramidales de la capa V. Estos primeros estudios morfológicos se basaban casi exclusivamente en técnicas de impregnación de Golgi, método que resulta inespecífico e inconstante. Por ello el uso de técnicas de marcaje intracelular con la peroxidasa de rábano (HRP) y la aplicación de métodos inmunocitoquímicos, electrofisiológicos y de microscopía electrónica han permitido dar descripciones más detalladas de estas células (Somogyi *et al.*, 1983; DeFelipe *et al.*, 1986; Somogyi y Soltesz, 1986; Kisvarday *et al.*, 1987; Fairén y Smith-Fernández, 1992; Kisvarday, 1992; Kisvarday *et al.*, 1993; Freund y Buzsaki, 1996).

Actualmente, el término “células en cesto” engloba distintos tipos de neuronas GABAérgicas, de morfología multipolar, de tamaño variable y con árboles axónicos muy diversos, que están especializadas en inervar el soma y las dendritas proximales de las neuronas piramidales y las interneuronas. En general, su característica común es que una gran proporción de sus botones terminales realizan sinapsis en la región perisomática de las células piramidales, pero incluso

este valor es muy variable, alrededor del 25-30 % en la neocorteza y hasta el 70-80 % en el caso del hipocampo (Freund y Katona, 2007). De hecho, a pesar de este patrón sináptico común, la función de los distintos subtipos de células en cesto puede ser diferente. Por otra parte, la célula en cesto es un tipo de interneurona muy abundante en la corteza cerebral, por ejemplo, en la corteza somatosensorial de la rata se ha estimado que constituyen alrededor del 50% de todas las interneuronas inhibitoras (Markram *et al.*, 2004).

Se han establecido distintas subclases de células en cesto atendiendo a su morfología, características bioquímicas y fisiológicas, y al área cortical y especie en las que están presentes, pero no existe un consenso en su clasificación, de hecho prácticamente cada laboratorio establece una nomenclatura propia, algunos de los nombres que se les han asignado son: células en cesto grandes, medianas y pequeñas (según el tamaño de su soma), células orientadas verticalmente, células con árboles axónicos lineales, células con árboles axónicos curvos, células con arcadas axónicas, células con árboles locales pericelulares, células tipo *clutch*, células en cesto de disparo rápido, células en cesto grandes y pequeñas que no son de disparo rápido, etc. (Peters y Fairén, 1978; Peters y Proskauer, 1980; DeFelipe y Fairén, 1982, 1988; Mates y Lund, 1983; Kisvarday *et al.*, 1985, 1986, 1987; Freund *et al.*, 1986; Kawaguchi y Kubota, 1997; Markram *et al.*, 2004; Kawaguchi *et al.* 2006; Zaitsev *et al.*, 2009). Por ello, resulta muy complicado estudiar las distintas subpoblaciones de células en cesto. Uno de los tipos mejor estudiados son las células en cesto grandes o típicas por poseer características muy distintivas.

Por último, las células en cesto grandes además de ser GABAérgicas, expresan fundamentalmente PV, pero también se ha descrito que pueden expresar CB, NPY, CCK, y ocasionalmente SOM y CR, pero no suelen colocalizar con VIP (DeFelipe, 1993, 1997; Markram *et al.*, 2004). La expresión de PV correlaciona con sus características fisiológicas. Las neuronas PV-ir son, salvo algunas excepciones, células de disparo rápido (Kawaguchi y Kubota, 1993; Markram *et al.*, 2004). Esta actividad está mediada por la excitación de receptores NMDA, y consiste en trenes de descargas rítmicas de alta frecuencia. Este comportamiento fisiológico de las células en cesto está unido con incrementos en su contenido de iones calcio. La proteína PV sirve como un tampón de iones calcio, por un lado, protegiendo a las células en cesto de una sobreexcitación, y por otro lado, bloqueando la frecuencia de adaptación de las espigas y manteniendo la alta frecuencia de descargas (Okhotin y Kalinichenko, 2002).

OBJETIVOS

El objetivo principal de la presente tesis doctoral ha consistido en la caracterización cuantitativa de los circuitos inhibidores que establecen contacto con el soma y el segmento inicial del axón de las neuronas piramidales en todas las capas de la corteza temporal humana (área 21 de Brodmann) y en la corteza somatosensorial primaria de ratón.

Para ello se han planteado los siguientes objetivos concretos:

1. Estimación de la densidad de terminales axónicos inhibidores, inmunorreactivos (-ir) para el transportador vesicular de GABA (vGAT), en el neuropilo de las distintas capas corticales de ambas especies.
2. Estudio de parámetros morfométricos del soma (superficie) y del segmento inicial del axón (diámetro, longitud y superficie) de las neuronas de las distintas capas de la corteza cerebral de ambas especies.
3. Cuantificación del número y la densidad de botones terminales GABAérgicos en aposición al soma y al segmento inicial del axón en las distintas capas corticales, de ambas especies.
4. Estudio de la correlación entre las distintas variables estudiadas (densidad de terminales GABAérgicos en el neuropilo, superficie del soma neuronal, parámetros morfológicos del segmento inicial del axón y número y densidad de terminales GABAérgicos perisomáticos).
5. Estudio de la innervación GABAérgica perisomática de las neuronas corticotálámicas, presentes en la capa VI de la corteza somatosensorial primaria de ratón.

MATERIAL Y MÉTODOS

1. OBTENCIÓN Y PROCESAMIENTO DEL TEJIDO

1.1 Corteza temporal humana

Para el estudio de la corteza temporal humana, hemos utilizado biopsias de la corteza temporal antero-lateral del giro temporal medio (área 21 de Brodmann). Todos los procedimientos empleados en las biopsias de tejido cerebral humano fueron aprobados por el comité ético del Hospital de la Princesa (Madrid) y bajo consentimiento informado de los pacientes.

Utilizamos tejido cerebral procedente de 6 pacientes (4 hombres y 2 mujeres; rango de edad: 20-41 años), diagnosticados con epilepsia del lóbulo temporal (ELT) farmacorresistente de origen mesial. Además, utilizamos tejido cerebral de un séptimo paciente no epiléptico, hombre de 36 años (H60) con tumor en la base del lóbulo temporal (**Tabla 1**). Parte de este tejido se ha utilizado en trabajos previos de nuestro laboratorio (Kastanauskaite *et al.*, 2009; Arellano *et al.*, 2004; Inda *et al.*, 2007; Armañanzas *et al.*, 2013).

Las intervenciones quirúrgicas, realizadas por el grupo del Dr. García de Sola (Hospital de la Princesa, Madrid), consistieron en la identificación de las zonas epileptogénicas mediante el registro electrofisiológico con una manta subdural de 20 electrodos (en la neocorteza lateral) y una tira de 4 electrodos localizada en la cara mesial del lóbulo temporal (**Figura 8**). Todos los casos seleccionados (excepto el H60) presentaron actividad epileptogénica de origen mesial (formación hipocampal), aunque en algunos casos los electrodos corticales registraron actividad epileptogénica. La cirugía consistió en la resección del tejido epileptogénico, necesitando reseca una amplia zona de la neocorteza temporal para poder acceder al hipocampo. Esto permitió seleccionar como tejido control aquellas zonas de la neocorteza con actividad normal (no epileptogénica). Las muestras se fijaron por inmersión en paraformaldehído al 4% en tampón fosfato (PB) 0.1M (pH 7.4) durante 12 horas a 4°C y se seccionaron con un vibratomo (Leica VT 1200S, Alemania) para obtener secciones coronales de 100 µm de espesor.

Paciente	Edad, género, lado	Edad de inicio, duración (años)	Posible causa desencadenante	Estado epiléptico (edad, duración)	Tipo de crisis	Frecuencia de crisis	Escala de Engel desde la cirugía (Tiempo después de la cirugía en meses)
H21	26, M, I	16,10	Lesión atrófica temp.izd.	No	Sin pérdida de consciencia con sensación de miedo. Otras con pérdida de consciencia y autismo gestuales y de referencia	1/ semana	-
H47	41, H, I	15,26	Ganglioma de bajo grado localizado en la base del lóbulo temporal	No	PC	1.5/semanas	NA
H48	41, H, I	18,23	Ninguno	No	PC, gen	1/semana	I (79)
H60	36, H, I	-	Ganglioma de bajo grado localizado en la base del lóbulo temporal	-	-	-	-
H94	27, H, I	20, 7	Dificultades durante el nacimiento. Traumatismo craneal 3 semanas antes de epilepsia	No	PC, gen	3-5/ semanas	I (43)
H104	32, H, I	12, 20	Convulsiones febriles, 10 meses	No	PC	1-3/ semanas	I (15)

Tabla 1. Tabla resumen de los datos clínicos y quirúrgicos. H = hombre; M = mujer; D =derecha; I =Izquierda; PC = parcial compleja; PC, gen = Parcial compleja, a veces generalizada secundariamente; NA = no disponible; Escala de Engel (Engel, 1987) clase I = libre de convulsiones.

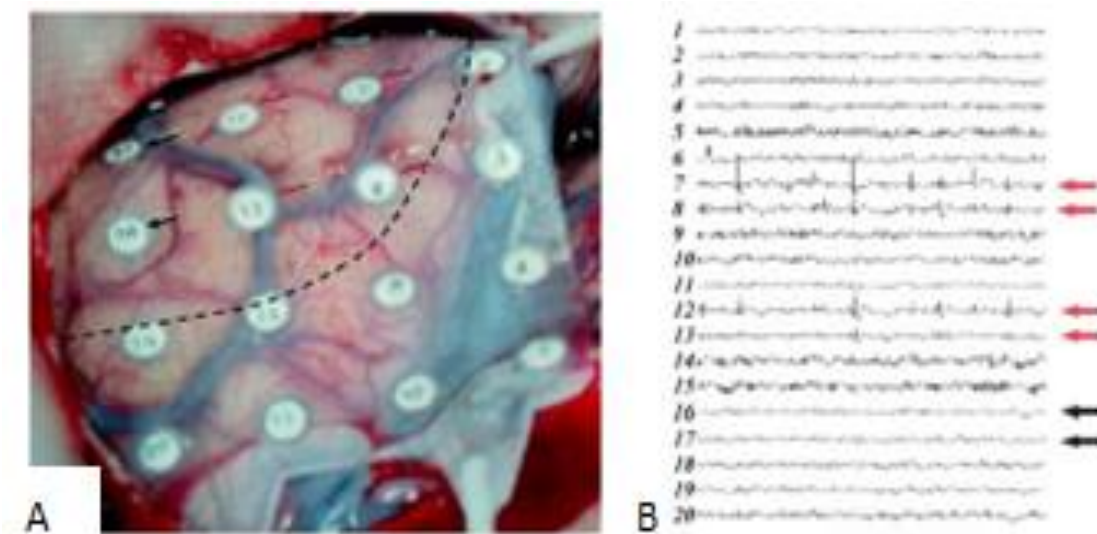


Figura 8. Se muestra uno de los procedimientos realizados durante la cirugía de la epilepsia. En la imagen A se observa una fotografía de la manta de electrodos localizada directamente sobre la superficie cortical del lóbulo temporal durante la operación. Las flechas indican los electrodos de registro situados en la zona de resección (ver B), y la línea discontinua indica el límite de la resección quirúrgica. La imagen B corresponde al registro electrocorticográfico obtenido mediante la manta de electrodos mostrada en A. Las flechas rojas indican los electrodos con una mayor actividad epileptiforme (7, 8, 12,13) mientras que las flechas oscuras señalan los electrodos 16 y 17, que presentaron una actividad normal. Fotos obtenidas de Kastanauskaite, A (2009) *Alteraciones del hipocampo esclerótico y de la corteza temporal adyacente en pacientes con epilepsia del lóbulo temporal* (tesis doctoral). Universidad Autónoma de Madrid

1.2 Corteza somatosensorial del ratón

En el presente trabajo se han usado 6 ratones macho C57 de 8 semanas de edad postnatal, obtenidos del animalario del Instituto Cajal (CSIC). Los experimentos realizados fueron aprobados por el comité de ética del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC) y se han llevado a cabo siguiendo las directrices establecidas por la Unión Europea con respecto al uso y al cuidado de los animales de laboratorio (Directiva 2010/63/EU).

Los animales se sacrificaron mediante la administración de una inyección intraperitoneal letal de pentobarbital sódico (40mg/kg), siendo inmediatamente perfundidos intracardialmente con suero salino seguido de paraformaldehído al 4% en tampón fosfato (PB) 0.1M (pH 7.4). Los cerebros se extrajeron y se post-fijaron por inmersión en la misma solución durante 7 horas a 4°C. Posteriormente, se crioprotegieron mediante inmersión en una solución de sacarosa al 30% en PB hasta su hundimiento. Los cerebros se congelaron en hielo seco y se cortaron utilizando un criomicrotomo de deslizamiento (Microm HM 450, Microm Internacional, Alemania) para obtener secciones seriadas de 50 µm de espesor en el plano coronal. Se seleccionaron los cortes comprendidos entre los niveles antero-posteriores de la comisura anterior y el límite rostral de la formación hipocampal con objeto de estudiar el área de representación de la extremidad posterior de la corteza somatosensorial primaria (HLS1).

1.3 Procesamiento del tejido. Técnicas de inmunofluorescencia

Para el estudio de los terminales GABAérgicos en aposición al soma neuronal se seleccionaron varias secciones tanto del material humano como de ratón. Las secciones se lavaron en PB se pre-incubaron una hora a temperatura ambiente en una solución con 0.25% de Tritón X-100 para permeabilizar el tejido, y con suero normal de cabra (3%, secciones de ratón) o albúmina de suero bobino (BSA, 3%, secciones humanas) con el fin de bloquear los posibles sitios de unión inespecífica de los anticuerpos. A continuación, las secciones se incubaron durante 48-72 horas a 4°C en la misma solución de pre-incubación junto con los anticuerpos primarios monoclonales anti-NeuN desarrollados en ratón para marcar los somas neuronales (1:2000, Chemicon,) y anticuerpos policlonales anti-vGAT, hechos en conejo como marcador de los terminales axonales GABAérgicos (1:2000, Synaptic Systems, Alemania). Posteriormente, los cortes se lavaron en PB y se incubaron durante 2 horas a 4°C en oscuridad, con anticuerpos secundarios

anti-ratón conjugados con el fluorocromo Alexa 594 y anticuerpos anti-conejo conjugados con Alexa 647 (Molecular Probes/Invitrogen, 1:1000), ambos obtenidos en cabra.

Para el estudio de los terminales GABAérgicos en aposición al segmento inicial de axón (SIA), los cortes se pre-incubaban durante una hora a temperatura ambiente en PB con Tritón X-100 (0.25%) y BSA (3%). Posteriormente, las secciones se incubaron durante 48-72 horas a 4°C en la solución anterior junto con los anticuerpos primarios. En las secciones de ratón utilizamos la siguiente combinación de anticuerpos primarios: 1) anticuerpos anti-vGAT desarrollados en conejo para marcar los terminales GABAérgicos (1:2000, Synaptic Systems, Alemania); 2) anticuerpos anti-NeuN desarrollados en ratón para marcar los somas neuronales (1:2000, Chemicon); 3) anticuerpos c-20 desarrollados en cabra (1:500; Santa Cruz, CA, EEUU) frente a un péptido de la proteína humana del aparato de Golgi Grasp65, pero que en roedores se unen preferentemente a la proteína Ankirina G, componente esencial de los SIA (León-Espinosa *et al.*, 2018). Las secciones de corteza temporal humana se incubaron durante 48-72 horas a 4°C con los anticuerpos primarios 1) anti-vGAT desarrollado en cobaya para marcar los terminales GABAérgicos (1:500, Synaptic Systems, Alemania); 2) anti-NeuN desarrollado en ratón para marcar los somas neuronales (1:2000, Chemicon) y 3) anticuerpos anti-espectrina β IV desarrollados en conejo, específicos para marcar los SIAs (1:1000; cedidos por el Dr. Matthew Rasband, *Baylor School of Medicine, Texas, USA*).

Después de lavar en PB, las secciones de ratón se incubaron con anticuerpos anti-ratón conjugados con biotina, desarrollados en caballo (1:200, Vector Laboratories) y posteriormente se incubaron durante 2 horas a 4°C con el complejo estreptoavidina-Alexa 647 (1:1000, Molecular Probes/ Invitrogen), y anticuerpos secundarios contra inmunoglobulinas de cabra y conejo conjugados respectivamente con los fluorocromos Alexa 488 y Alexa 594 (1:1000 Molecular Probes/ Invitrogen). En el caso de las secciones humanas, después de lavar en PB, se incubaron en anticuerpos biotinados anti-cobaya desarrollados en cabra (1:200, Vector Laboratories) y posteriormente se incubaron durante 2 horas a 4°C con el complejo estreptavidina-Alexa 647 (1:1000, Molecular Probes/ Invitrogen) y anticuerpos secundarios contra inmunoglobulinas de conejo y ratón, conjugados respectivamente con los fluorocromos Alexa 488 y 594 (1:1000, Molecular Probes/ Invitrogen).

Se incluyeron controles en todos los procedimientos inmunocitoquímicos, reemplazando en algunas secciones los anticuerpos primarios con suero de cabra pre-inmune, o bien omitiendo los anticuerpos primarios o reemplazando los anticuerpos secundarios por anticuerpos secundarios inapropiados. En estas condiciones no detectamos inmunomarcaje significativo en las secciones. En todos los casos, después de lavar las secciones en PB, se incubaron durante 1 minuto con 4, 6-diamidino-2-fenilindol (DAPI; Sigma, St Louis, MO) para marcar los núcleos celulares y permitir de esta forma la posterior distinción de las capas corticales y la visualización de los límites entre áreas citoarquitectónicas. Las secciones se lavaron en PB y se montaron sobre portaobjetos gelatinizados y se cubrieron con cubreobjetos y el medio de montaje ProLong Gold (Life technologies).

2. ADQUISICIÓN DE IMÁGENES

Las secciones se estudiaron mediante microscopia confocal (microscopio AxioObserver Z1 de Zeiss, equipado con un módulo LSM710) que permite escanear cada plano óptico de la muestra punto por punto. Cada punto es iluminado con luz láser con la longitud de onda adecuada a los fluorocromos presentes en las muestras y la luz emitida por la muestra se separa en bandas espectrales, de modo que se puede recoger el rango o los rangos de longitud de onda de interés. Se pueden escanear planos ópticos sucesivos, de grosor y separación seleccionables y, a partir de ellos se pueden crear imágenes de proyección combinando las imágenes obtenidas en planos consecutivos del tejido analizado. Para el presente estudio, obtuvimos un mínimo de 15 series de imágenes por capa cortical y caso, utilizando un objetivo de 63 aumentos (1.4 de apertura numérica) con un zoom de 2,3. Cada serie consistió en un número variable de imágenes, dependiendo del tamaño y la orientación de los somas y los SIAs, con una separación de 0.14 μm en el eje Z. Para cada plano óptico se registró secuencialmente la fluorescencia de las diferentes longitudes de onda. Posteriormente se construyeron imágenes de proyección en el plano Z, mediante el uso del software ZEN 2012 (Zeiss).

3. ANÁLISIS DE IMAGEN

Para analizar las series de imágenes utilizamos diferentes programas informáticos que permiten la obtención de datos cuantitativos y cualitativos. A continuación, se describen los programas utilizados para los distintos objetivos de nuestro estudio.

3.1 Estudio de la densidad laminar de los terminales GABAérgicos

Para estudiar la densidad general de los terminales GABAérgicos en las distintas capas corticales se utilizó el programa Image J o Fiji (Schindelin *et al.*, 2012, [https:// imagej.nih.gov/ij/](https://imagej.nih.gov/ij/)). Utilizamos la herramienta de recuento de objetos en 3D para segmentar tridimensionalmente en base a un umbral de fluorescencia seleccionable, y contar los elementos inmunoreactivos (-ir) para vGAT en el volumen de tejido correspondiente a cada serie de imágenes. Además, este procedimiento permite conocer diferentes características morfológicas de cada elemento segmentado como el volumen, la superficie, los diámetros, el centroide o la intensidad de fluorescencia.

3.2 Estudio del tamaño de los somas neuronales y de la densidad de terminales GABAérgicos en aposición al soma neuronal

Con objeto de estimar la densidad de botones GABAérgicos en aposición a los somas neuronales en las distintas capas corticales, utilizamos la aplicación informática Imaris (7.6.4, Bitplane, AG, Zurich, Suiza) que permite crear superficies en 3D (mallas tridimensionales) correspondiente a la superficie de cualquier objeto, en este caso, los somas neuronales, identificados en base a su inmunoreactividad para el marcador NeuN (**Figura 9**). El usuario elige el umbral de intensidad para adaptar la superficie al contorno del objeto a analizar. En nuestro caso, para conocer el área de la superficie neuronal, creamos primero una superficie con la herramienta *Surface* que genera una malla compuesta por elementos triangulares que se ajustó a la morfología de cada soma neuronal a analizar. El programa proporciona los datos del área de la superficie generada, valor que hemos considerado como el tamaño de la superficie del soma. Sobre la primera superficie, creamos otra nueva, paralela y un poco mayor, separada de la anterior por un espacio aproximado de 1 μm . Una vez que tuvimos las dos superficies, creamos una máscara para desechar las estructuras marcadas dentro de la superficie interna y fuera de la superficie

externa. Así, cuantificamos sólo los elementos inmunoreactivos para vGAT comprendidos entre las dos superficies, considerando por tanto, que estos elementos son los que están en contacto con nuestra neurona. La densidad de contactos GABAérgicos en aposición al soma se calculó dividiendo el número de contactos entre el área del soma.

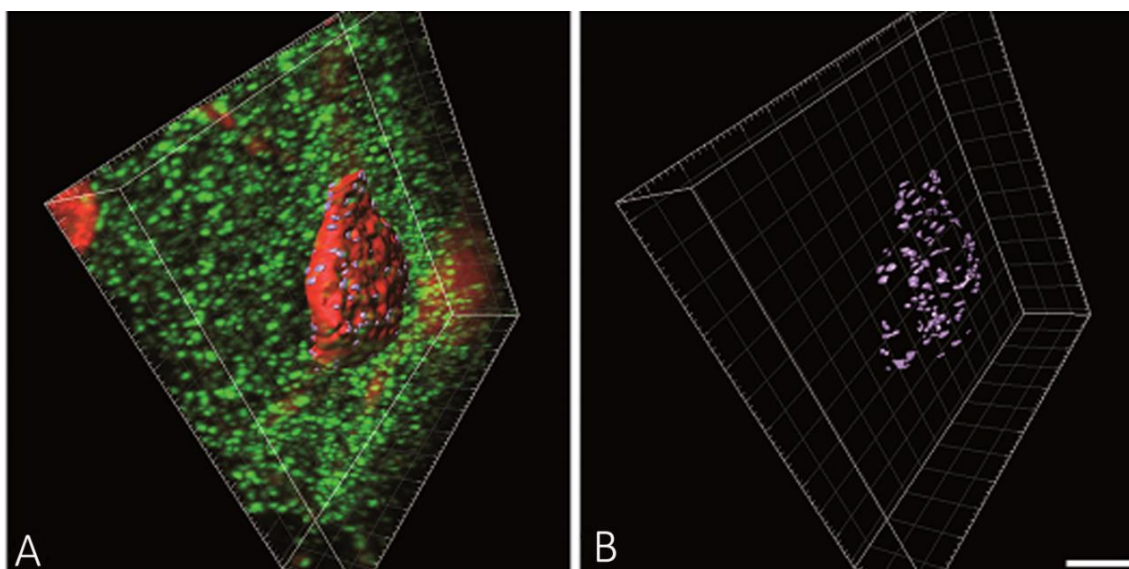


Figura 9. Imágenes obtenidas a partir de la proyección de una serie de planos ópticos captados mediante microscopía confocal en la capa III de la neocorteza temporal humana. En la imagen A, se puede observar el marcaje de botones terminales GABAérgicos vGAT-ir (verde), y las superficies creadas adaptadas al soma (rojo) y de los botones en aposición al mismo (gris). En la imagen B, se observan las superficies de los botones que están en contacto con el soma. Barra de escala: 8 μ m.

3.3 Estudio de las características morfológicas del segmento inicial del axón y de la densidad de terminales GABAérgicos en aposición al segmento inicial del axón

Para estudiar los botones GABAérgicos en aposición al SIA, utilizamos también el programa Imaris. En este caso, creamos una superficie 3D en base al marcaje de AnkG (León-Espinosa *et al.*, 2018) para el SIA de neuronas murinas y en base al marcaje de β /IV espectrina para el SIA de las muestras humanas. El programa proporciona el dato del área de la superficie generada, que hemos considerado como área del SIA. Realizamos la segmentación y el recuento de los elementos vGAT-ir en contacto con la superficie del SIA, sin necesidad de hacer máscara ya que su visualización es más sencilla que en las imágenes del soma. De nuevo, estudiamos el SIA de al menos 15 neuronas por capa cortical y por individuo (tanto en el ratón como en el hombre).

Para calcular la densidad de innervación GABAérgica del SIA de cada neurona, dividimos el número de elementos vGAT-ir peri-SIA entre la superficie del SIA.

Para analizar los valores de longitud y diámetro medio del SIA utilizamos la herramienta *Filament Tracer* del programa Imaris que permite crear filamentos, formados por fragmentos de conos truncados que adoptan las dimensiones del objeto de estudio (**Figura 10**). El algoritmo que utiliza el programa genera así una malla limitada por círculos cuyo centro coincide con el eje longitudinal del filamento, por lo que no se ajusta tanto al contorno de los objetos como ocurre con la herramienta *Surface* (**Figura 11**). El programa proporciona los datos de longitud y diámetro medio del SIA en base al filamento generado. Para calcular la variación de diámetro del SIA a lo largo de su longitud, calculamos la media de los diámetros de los conos truncados que forman el filamento en intervalos de una micra a lo largo de toda la extensión próximo-distal del SIA (es decir, entre 0.00 y 0.99 μm , entre 1.00 y 1.99 μm , etc.).

Para conocer la distribución de los elementos GABA-ir a lo largo del SIA, marcamos los puntos positivos para vGAT, a lo largo del filamento utilizando la herramienta del "marcador de espina". El programa Imaris proporciona la distancia de cada punto marcado respecto al origen, lo que permite estimar el número de botones que se encuentran a diferentes distancias a lo largo del SIA. A partir de estos valores podemos calcular la densidad de botones a lo largo del SIA. Para ello, calculamos inicialmente la superficie de cada cono truncado que forma el filamento, multiplicando el diámetro medio en cada micra por el valor de π (3.141) y por su longitud (una micra). Una vez calculado este valor, la densidad se obtiene del cociente entre el número de botones y la superficie de cada intervalo de una micra.

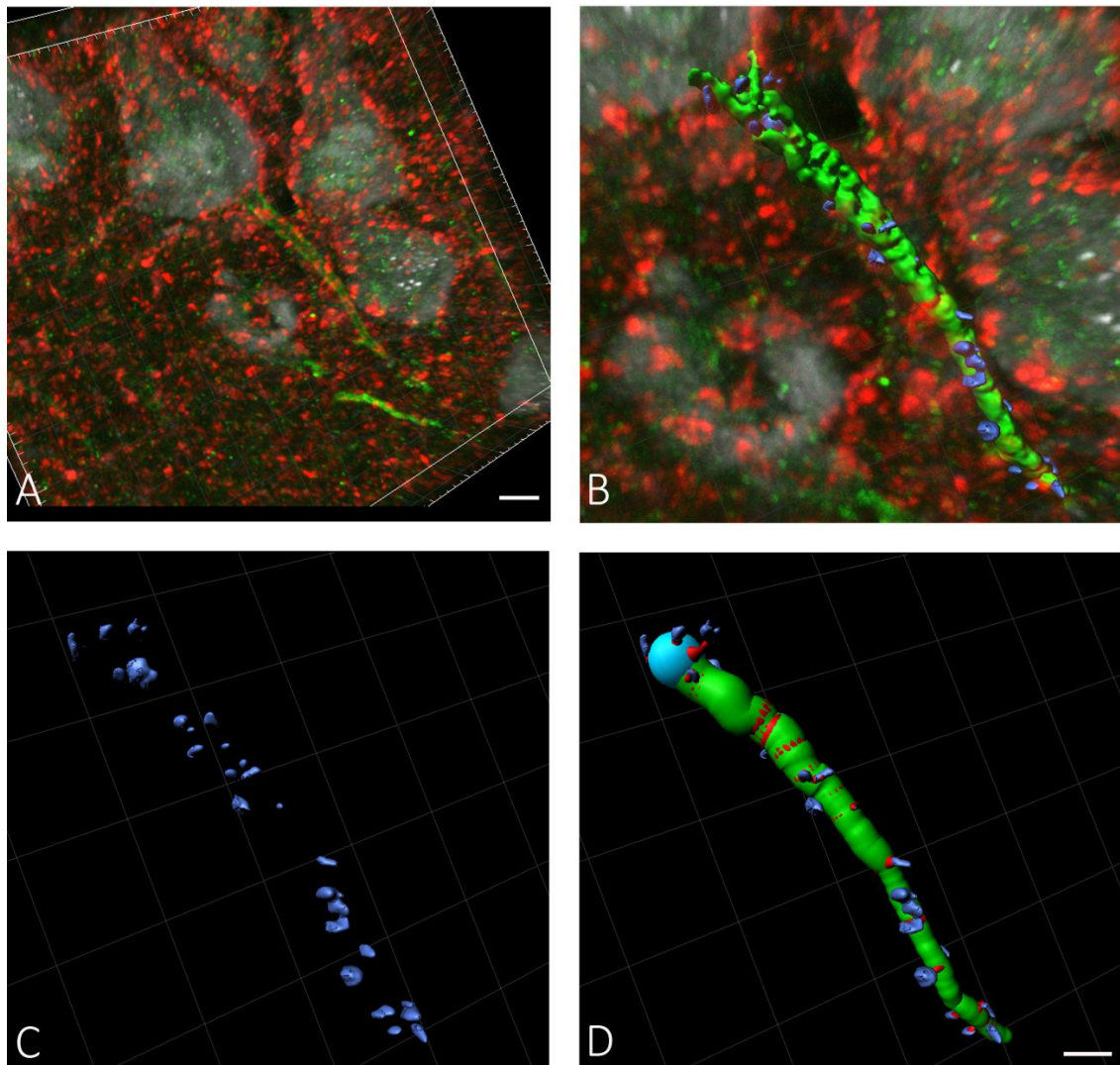


Figura 10. En la imagen A, se observa el SIA de una neurona capa V de la corteza somatosensorial de ratón (verde), el soma (blanco) y el marcaje de los botones vGAT-ir (rojo). B: imagen aumentada que muestra la superficie creada sobre el SIA (verde) y los botones que están en contacto sobre dicha superficie (azul) (B). En la imagen C se observan la superficie de los terminales GABAérgicos (azul) y en la imagen D observamos el filamento (verde) y los marcadores (rojo) utilizados para localizar los botones GABAérgicos (azules). Barra de escala A: 5 μm , B-D: 2 μm .

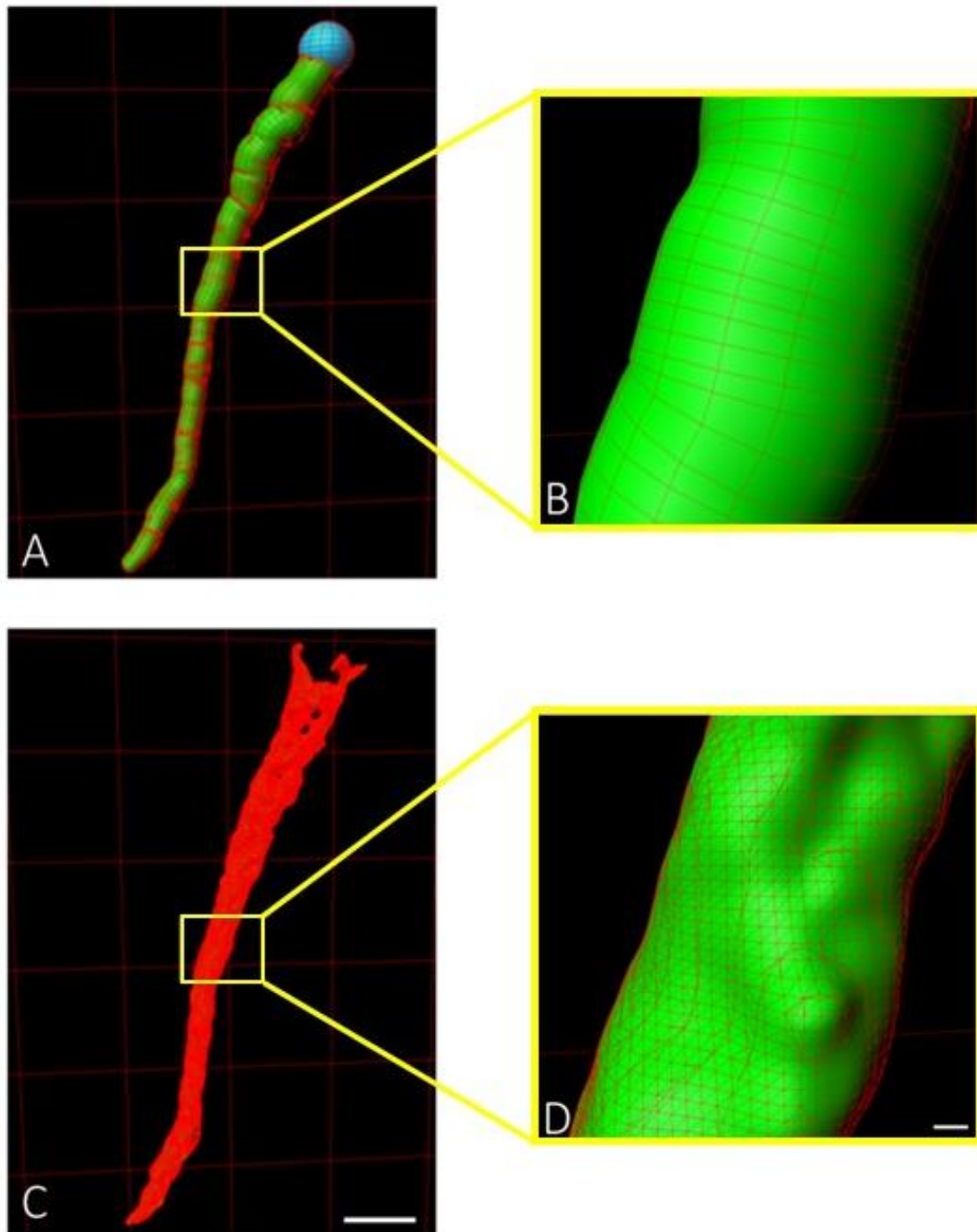


Figura 11. En estas imágenes se muestra las diferencias existentes entre la malla que se crea con la herramienta *Filament* (A) a partir de conos truncados (B) y la generada con la herramienta *Surface* (C), a partir de triángulos que se adaptan a la forma de los objetos (D). Barra de escala mostrada en C: 3 μm , en A y C; Barra de escala mostrada en D: 0,3 μm en B y D.

En el tejido humano, es frecuente encontrar en aposición a la parte más distal del SIA, una elevada cantidad de botones GABAérgicos que se encuentran muy juntos y no se pueden separar correctamente con los límites de resolución de la microscopia confocal, por lo que no es posible

cuantificar directamente su número. A este tipo de botones agregados los hemos denominado "Estructuras Inhibidoras Complejas" o EIC (**Figura 12**).

Sin embargo, sí es posible crear un único objeto, en base al marcaje de vGAT, que englobe todos estos botones GABA-ir positivos, del cual se puede obtener su volumen. A partir de este volumen hemos estimado el número de botones de cada EIC, dividiendo su volumen entre el volumen medio de los botones GABAérgicos (estimado en cada capa y caso al menos en 40 botones). Como conocemos la posición de la EIC a lo largo del SIA, la estimación del número de botones dentro de cada EIC se utiliza también para calcular la posición de dichos botones a lo largo de la longitud del SIA. Para ello, dividimos el número de botones estimado entre los intervalos de una micra que ocupa la EIC teniendo en cuenta su posición.

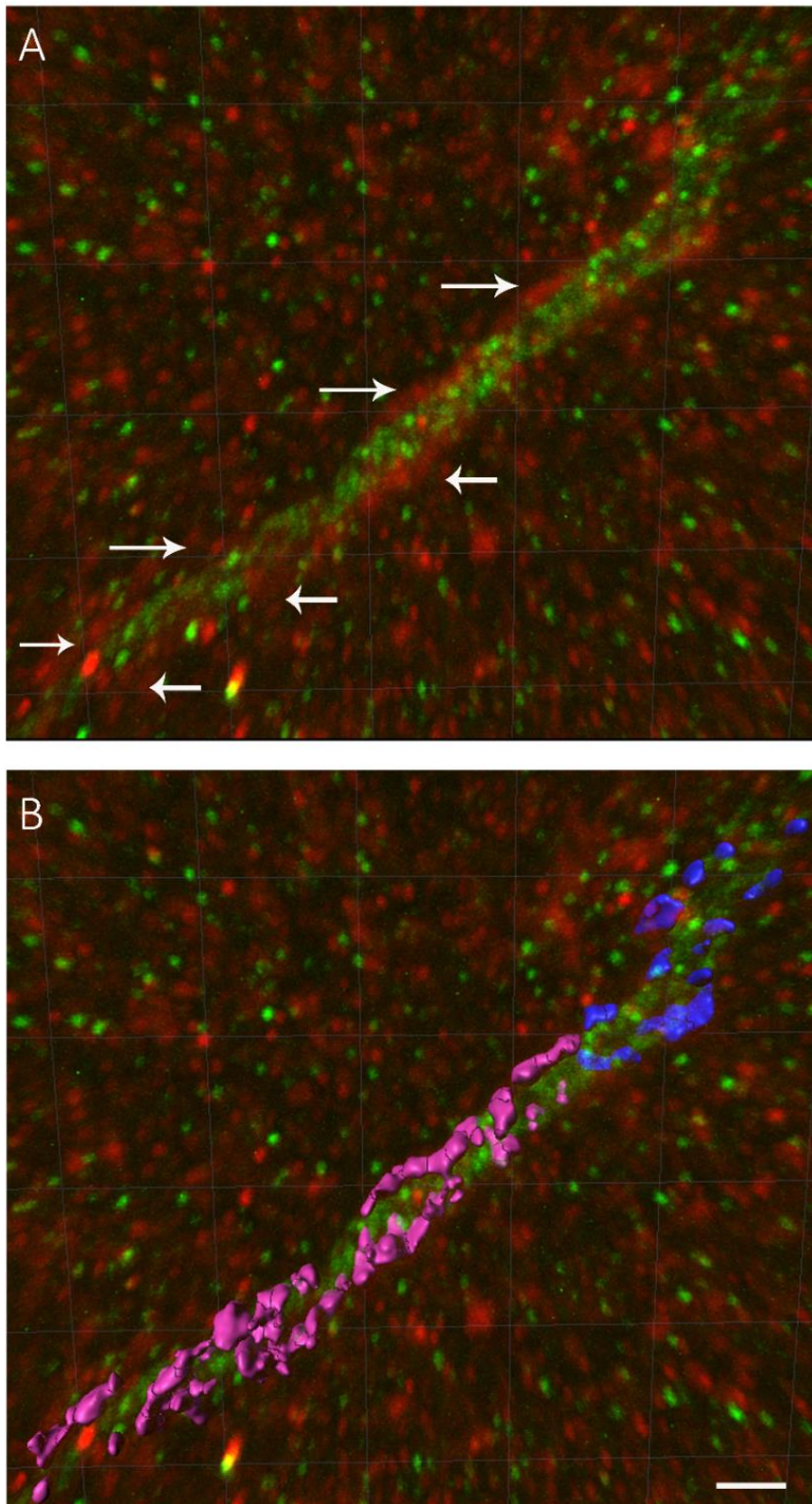


Figura 12. En la imagen A se muestra el SIA de una neurona de la capa III de la corteza temporal humana. Alrededor del SIA (verde) se puede identificar una elevada densidad de terminales vGAT-ir (rojo) que no se pueden diferenciar y hemos denominado EIC. En la imagen B se muestra en azul aquellos botones que se pueden segmentar individualmente y en rosa los que hemos considerado EIC. Barra de escala: 2 μm .

4. MARCADO RETRÓGRADO DE NEURONAS CORTICOTALÁMICAS PARA EL ESTUDIO DE SU INERVACIÓN PERISOMÁTICA

4.1 Inyecciones del trazador retrógrado *Fast Blue*

El estudio de la inhibición perisomática de las neuronas corticotalámicas de capa VI se realizó en colaboración con el grupo del profesor Francisco Clascá de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Madrid. Dicho grupo nos proporcionó tres ratones C57 macho de 8 semanas de edad postnatal a los que se les había realizado una inyección del trazador retrógrado *Fast Blue* en el núcleo ventral posterolateral del tálamo, para marcar el soma de las neuronas corticotalámicas en la capa VI de la corteza somatosensorial.

Los ratones fueron anestesiados con isoflurano y se colocaron en un aparato estereotáxico, que permite posicionar al animal y poder realizar inyecciones de trazadores en las coordenadas (Paxinos y Franklin, 2019, 5ed) del núcleo de interés núcleo ventral posterolateral (VPL). Se emplearon pipetas de borosilicato (tubo capilar. FHC, Bowdoin, Maine, EEUU) rellenas de una solución (0.05-0.10% en tampón cacodilato 0,1 M a pH 7,4) del trazador *Fast Blue* (diamidino compound 253/50; Polysciences Inc., Warrington, Pensilvania, EEUU). Las inyecciones se realizaron mediante presión utilizando un generador (Picospritzer II, General Valve Corporation Fairfield, Nueva Jersey, EEUU) de pulsos de aire a presión repetibles (a 0,5 bares, cada 10-20 ms), que permite inyectar pequeños volúmenes del trazador, entre 0,01-0,1 μ l. Cuando se terminaron las aplicaciones, la pipeta se mantuvo en la misma posición alrededor de 10 minutos antes de su lenta extracción para evitar el reflujo del trazador. Para que el transporte retrógrado del trazador desde los terminales axonales hasta los somas de origen de las neuronas corticotalámicas fuese eficaz, se dejó un periodo de supervivencia de los ratones de 7 días. Después de este periodo los animales fueron anestesiados y perfundidos y los cerebros fueron extraídos, postfijados y seccionados de acuerdo con lo descrito anteriormente.

4.2 Inmunofluorescencia y análisis de imagen

De acuerdo a los procedimientos descritos anteriormente, las secciones se pre-incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente en una solución de pre-incubación y posteriormente

durante 48-72 horas a 4°C en la misma solución junto con los siguientes anticuerpos primarios: 1) anti-Grasp65 (c-20) desarrollados en cabra (1:500; Santa Cruz, CA, EEUU), 2) anti-vGAT desarrollados en conejo (1:2000, Synaptic Systems, Alemania) y 3) anti-NeuN desarrollados en ratón (1:2000, Chemicon) para marcar respectivamente los SIAs, los terminales GABAérgicos y los somas neuronales. Una vez lavados con PB, las secciones se incubaron en una solución de anticuerpos anti-conejo conjugados con biotina desarrollados en burro (1:200, Vector Laboratories) y a continuación en una solución que contenía el complejo estreptoavidina-Alexa 647 (1:1000, Molecular Probes/ Invitrogen) y anticuerpos secundarios desarrollados en burro contra inmunoglobulinas de cabra y ratón conjugados respectivamente con los fluorocromos Alexa 488 y Alexa 594 (1:1000 Molecular Probes/ Invitrogen).

Las secciones se estudiaron mediante los procedimientos de microscopía confocal y análisis de imagen descritos anteriormente. La única salvedad fue que, además de las longitudes de onda comentadas anteriormente, se utilizó adicionalmente un láser que permitía captar fluorescencia de 405 nm para identificar las neuronas corticotalámicas marcadas con *Fast Blue*.

5. CONSIDERACIONES TÉCNICAS

Al realizar las técnicas del procesamiento histológico se debe tener en cuenta que se produce una retracción del tejido que conlleva una disminución del tamaño de las secciones. Esta disminución afecta a las mediciones del volumen de tejido analizado, del área de los somas neuronales y de los SIAs, así como la longitud y el diámetro medio del SIA. Las mediciones de volumen y área, a su vez, afectan respectivamente a las estimaciones de la densidad general de elementos vGAT-ir o del tamaño del soma neuronal o del SIA. Por lo tanto, hemos calculado índices de retracción para las medidas de superficie o P^2 , con la ayuda de Adobe Photoshop, midiendo en imágenes panorámicas el área de cada sección antes y el después de las tinciones inmunocitoquímicas. Una vez obtenido estos datos dividimos el valor del área post-procesamiento entre el valor pre-procesamiento para cada sección. Al promediar los valores de cada una de las secciones de cada especie obtuvimos el índice P^2 (**Tabla 2**). Estos índices se emplearon para corregir las medidas del área del soma neuronal y del SIA, dividiendo los datos obtenidos en cada especie por el índice de retracción P^2 apropiado. El índice de retracción en el eje Z (P^z), se calculó con la ayuda del programa Stereo Investigator (versión 10, MBF Bioscience, EEUU) en un microscopio de campo claro con una platina motorizada. Medimos el grosor real

de las secciones en múltiples puntos de cada sección, restando las coordenadas en el eje Z al enfocar con una lente de 100X las superficies (superficial y profunda) del tejido. Promediamos los distintos valores obtenidos para cada sección antes y después su procesamiento histológico y dividimos el valor medio del grosor del tejido post-procesamiento entre el valor pre-procesamiento para cada sección. Al promediar los valores de cada una de las secciones de cada especie obtuvimos los índices P^2 de cada especie (**Tabla 2**). Por último, calculamos para cada especie un índice volumétrico para la corrección de los valores de volumen de tejido de acuerdo con la fórmula $P^3 = P^2 \times P^2$ (**Tabla 2**). Los valores medidos de volumen de tejido se corrigieron dividiéndolos por el índice P^3 .

Los datos de longitud y diámetro de cada especie se corrigieron dividiendo los valores medidos por el valor de la raíz cúbica de P^3 correspondiente (para obtener una corrección lineal homogénea en todas las direcciones del espacio). Esta corrección se tuvo en cuenta a la hora de determinar la densidad y la posición de los botones en aposición al SIA a lo largo de la longitud del mismo, y así como el diámetro del SIA.

	Índice de retracción (ratón)	Índice de retracción (humano)
Volumen (P^3)	0,7227	0,5164
Superficie (P^2)	0,8066	0,7538
Eje Z (P^2)	0,8960	0,6851

Tabla 2. Se muestran los índices de retracción de volumen (P^3), superficie (P^2) y de retracción en el eje Z (P^2) medidos tanto en secciones de ratón como humanas.

6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO Y REPRESENTACIÓN DE LOS RESULTADOS

Los procedimientos estadísticos realizados en la presente tesis se han llevado a cabo en el programa estadístico SPSS (IBM SPSS Statistics versión 25). Los datos obtenidos mediante los diversos procedimientos de análisis de imagen han sido analizados con la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis y el test de Dunn Bonferroni para las comparaciones *posthoc* entre casos y capas. En el caso de las correlaciones se ha usado una regresión lineal. Para la representación gráfica de los datos se utilizaron los programas GraphPadPrism (GraphPad Software, San Diego, CA, EEUU) y Microsoft Office Excel 2007. Asimismo, utilizamos los programas Adobe Photoshop (CS4) e Imaris para la composición de las figuras.

RESULTADOS

En el presente trabajo, hemos estudiado la densidad general de botones axonales GABAérgicos en el neuropilo de las distintas capas corticales en la corteza somatosensorial primaria del ratón (**Figura 13**) y en la neocorteza temporal humana (**Figura 14**) utilizando técnicas de inmunofluorescencia, microscopía confocal y análisis de imagen. Asimismo, hemos medido la superficie de los somas y de los SIAs de las neuronas de las distintas capas corticales, así como el número y la densidad de terminales GABAérgicos en aposición al soma neuronal y los SIAs. En todas las capas, excepto en la capa I en la que la mayor parte de las neuronas son interneuronas GABAérgicas (Schuman *et al.*, 2019), las neuronas marcadas con anticuerpos frente a NeuN fueron examinadas en 3D e identificadas como neuronas piramidales en base a la presencia de una dendrita apical prominente. De esta forma, a no ser que se indique lo contrario, nos referiremos a neuronas piramidales. Los resultados cuantitativos obtenidos a partir del análisis de imagen en las seis capas de la corteza somatosensorial de ratón y la corteza temporal humana muestran importantes diferencias entre las distintas capas corticales de ambas especies.

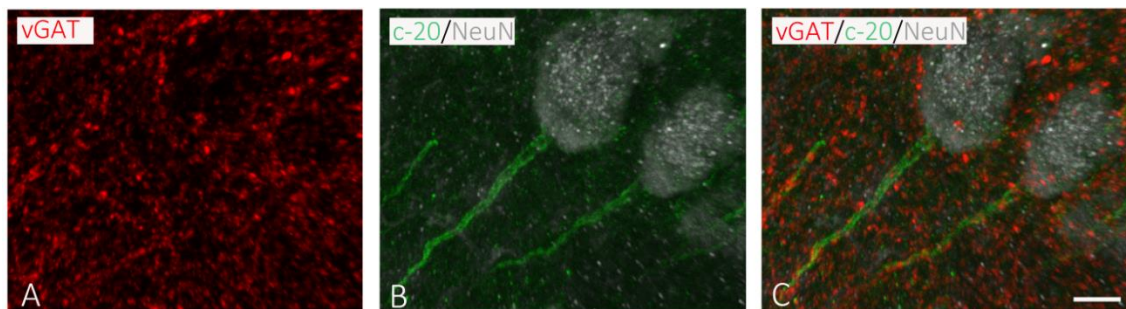


Figura 13. Imágenes obtenidas a partir de la proyección de una serie de planos ópticos captados con el microscopio confocal en la capa III de la corteza somatosensorial de ratón. Las imágenes muestran el marcaje de terminales GABAérgicos (rojo) en relación con los segmentos iniciales de axón (verde) y los somas neuronales (blanco) marcados respectivamente con anticuerpos frente a vGAT, ankirina G (C-20) y NeuN. Barra de escala: 5 μ m.

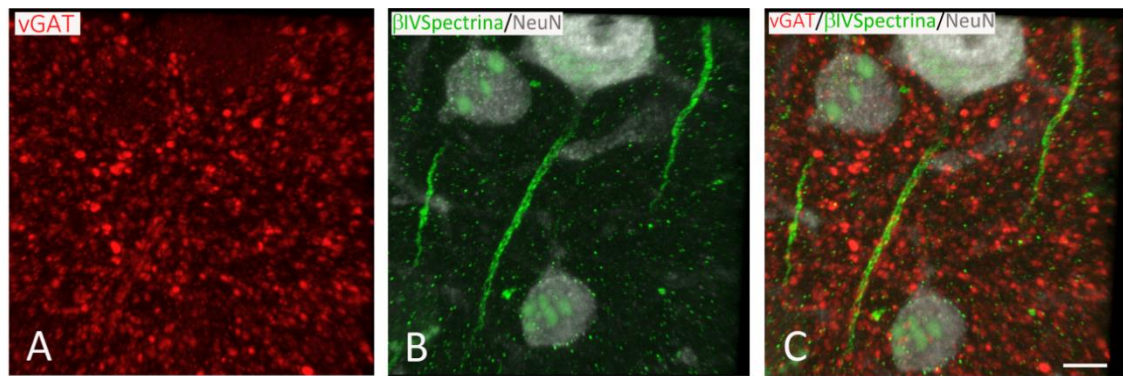


Figura 14. Imágenes obtenidas a partir de la proyección de una serie de planos ópticos captados con el microscopio confocal en la capa III de la neocorteza temporal humana. Las imágenes muestran el marcaje de terminales GABAérgicos (rojo) en relación con los segmentos iniciales de axón (verde) y los somas neuronales (blanco) marcados respectivamente con anticuerpos frente a vGAT, β IV espectrina y NeuN. Barra de escala: 5 μ m.

1. DENSIDAD GENERAL DE LOS TERMINALES GABAÉRGICOS EN EL NEUROPILO

En un primer grupo de secciones con marcajes para vGAT y NeuN (**Figuras 15 y 16**) estimamos la densidad de terminales GABAérgicos en las distintas capas corticales. Para cuantificar la densidad general de botones vGAT-ir usamos el programa Fiji con el que analizamos al menos 15 series de imágenes por capa y caso. El volumen total de tejido analizado en los ratones C57 (n=5) fue de $1.7 \times 10^7 \mu\text{m}^3$ (valor mínimo y máximo: 1.5×10^4 - $6.7 \times 10^4 \mu\text{m}^3$) mientras que en los 6 casos humanos fue de $3.7 \times 10^7 \mu\text{m}^3$ (valor mínimo y máximo: 2.7×10^4 - $1.6 \times 10^5 \mu\text{m}^3$).

Cuando tomamos los valores de densidad de todas las capas conjuntamente encontramos que las diferencias interindividuales no son significativas en el caso del ratón, a excepción del ratón C57 3 que presenta una densidad general significativamente mayor al resto (**Figura 17A**). Sin embargo, en la corteza temporal humana, se observan diferencias interindividuales en los casos H48 y H136, que presentan una densidad general significativamente más baja que en el resto de los casos (**Figura 17B**).

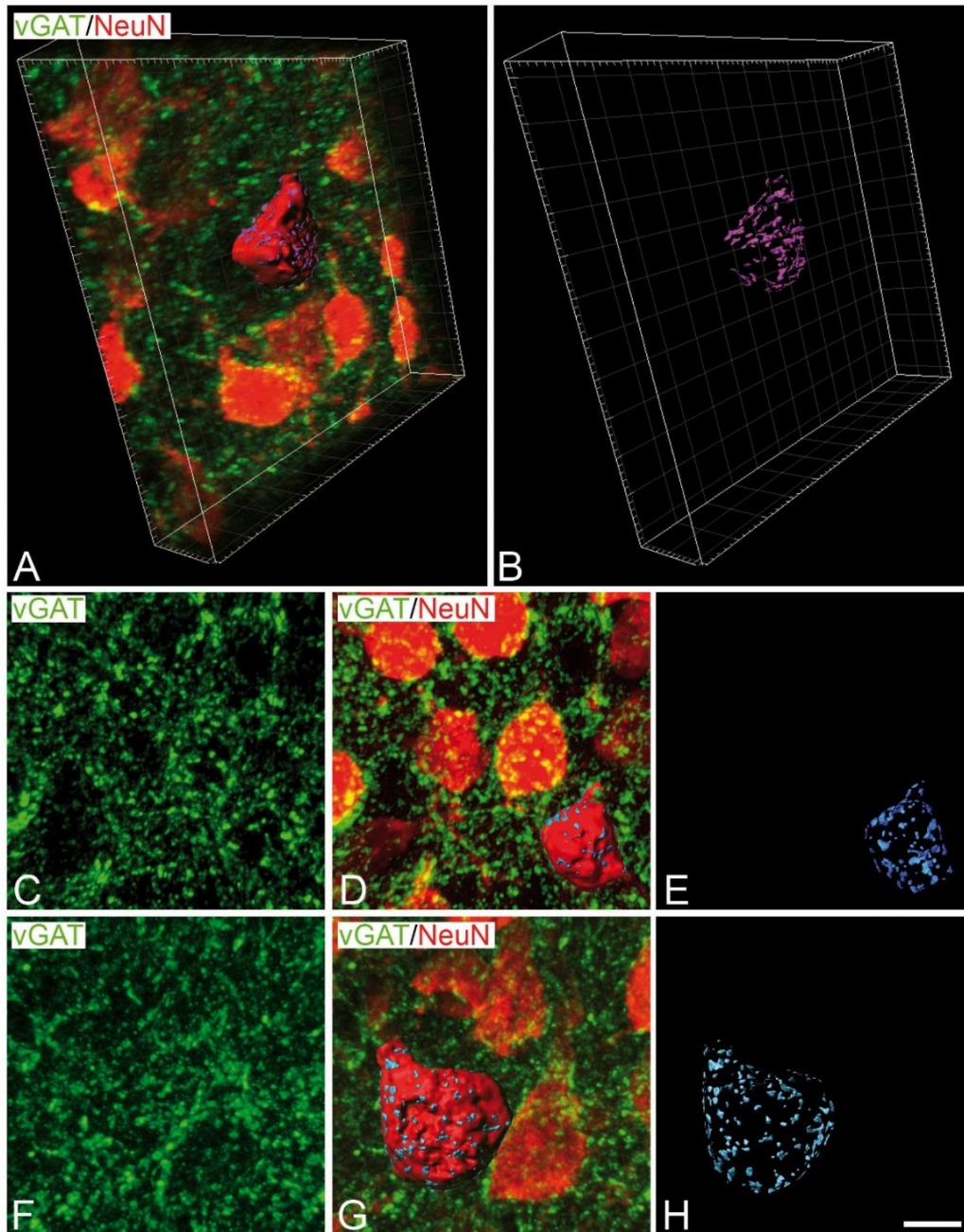


Figura 15. Serie rotada de imágenes de microscopia confocal (A) o pares de imágenes de proyección (C-D; F-G) procedentes de las capas III (A), IV (C-D) y V (F-G) de la neocorteza HLS1 de ratón, que muestra la relación entre los terminales axonales GABAérgicos y los somas de neuronas piramidales marcados para vGAT (verde) y NeuN (rojo), respectivamente. Se crearon superficies digitales (rojo intenso), ajustadas al soma de algunas neuronas seleccionadas (Imaris) con objeto de medir la superficie de los somas y para segmentar y cuantificar los terminales GABAérgicos perisomáticos mostrados en gris en B, D-E y G-H. Barra de escala en H: 8 μ m.

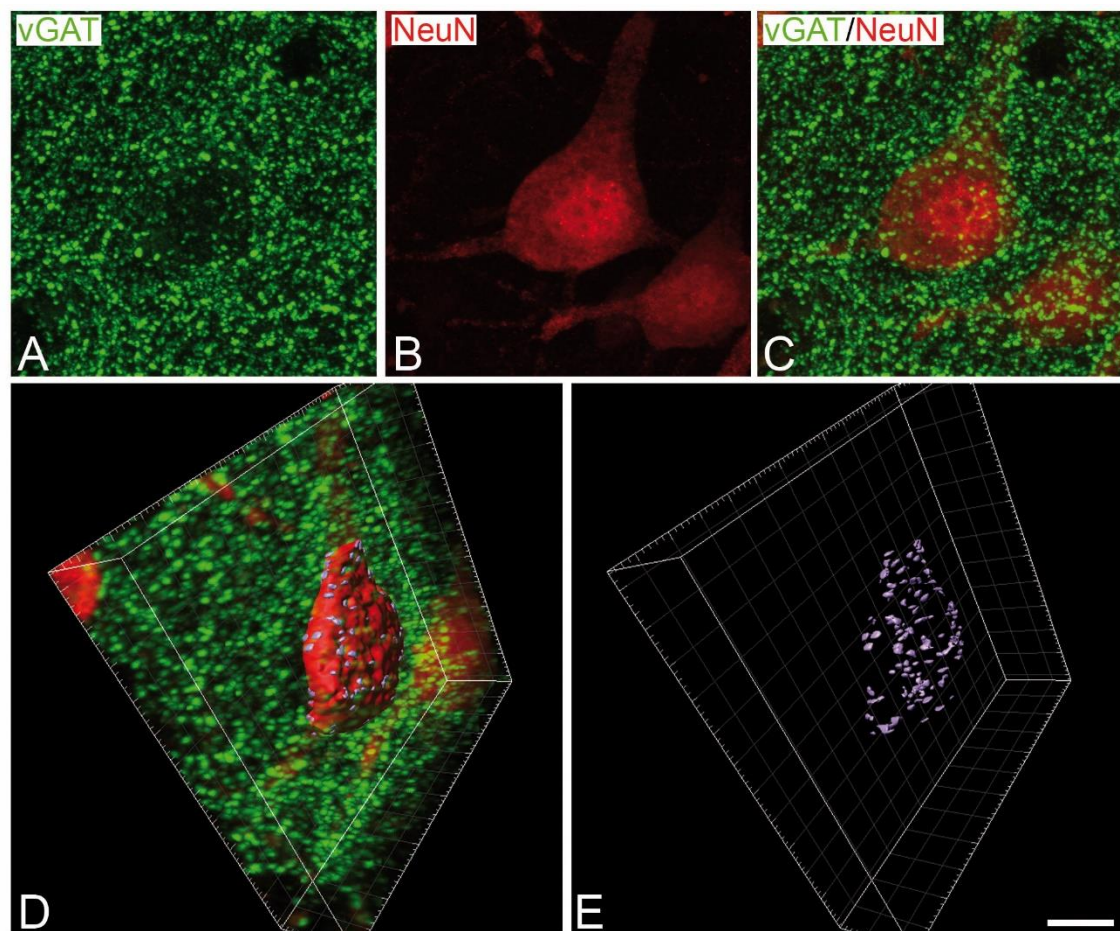


Figura 16. A–C Imágenes de proyección de la capa III de la neocorteza temporal humana que muestran la relación entre los terminales GABAérgicos y los somas neuronales marcados con anticuerpos frente a vGAT y NeuN, respectivamente. D y E muestran la rotación de la misma serie de imágenes de microscopía confocal en la que se creó una superficie digital (Imaris), ajustada al soma de una neurona (rojo) para medir la superficie del soma y para segmentar y cuantificar los terminales GABAérgicos perisomáticos, que se muestran en gris en D y E. La barra de escala en E indica 8 μm en todas las imágenes.

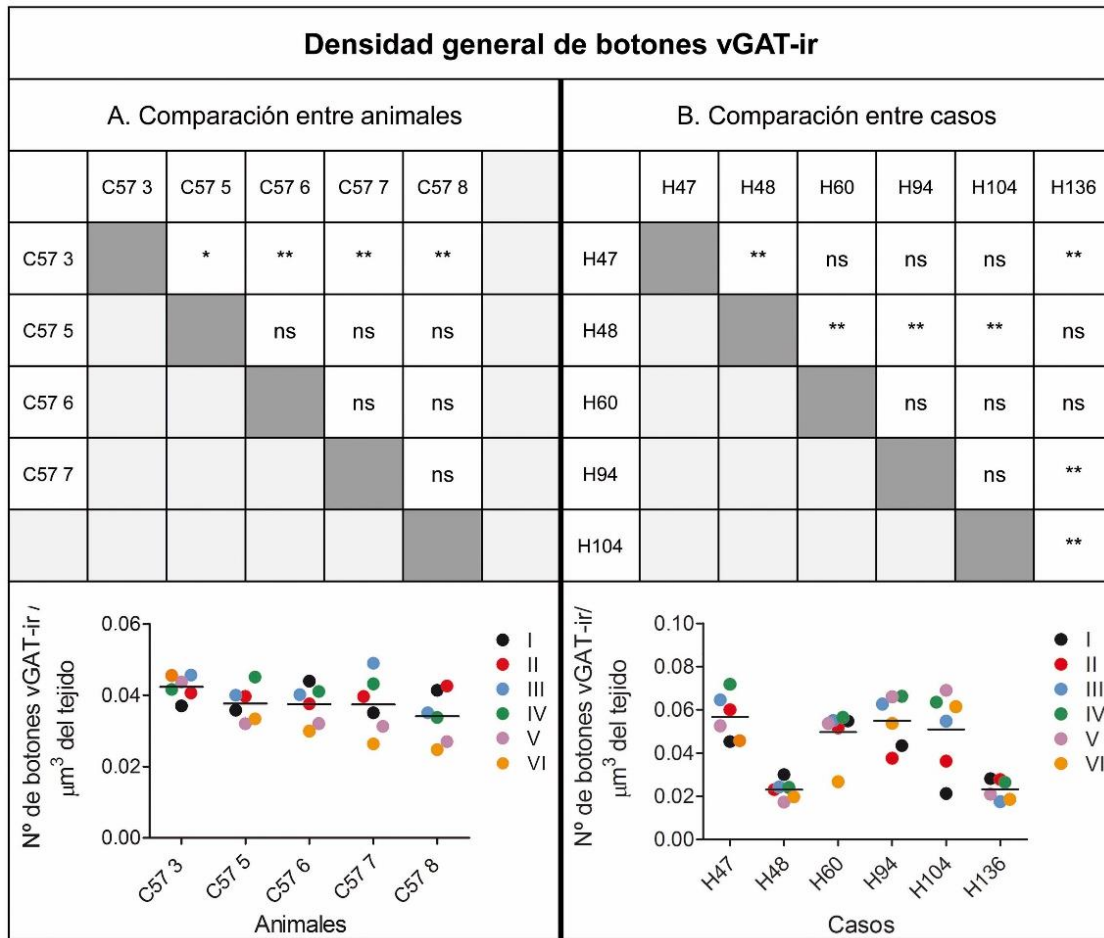


Figura 17. Tablas y representación gráfica de la densidad general de botones vGAT-ir. En ambas tablas se ha aplicado la prueba no paramétrica Kruskal-Wallis (ns= no significativo, * ≤ 0.05 ; ** ≤ 0.001). Los gráficos representan la media por animal (A) y por caso (B).

A pesar de estas diferencias interindividuales, promediamos los valores de los distintos casos para estudiar los patrones laminares de la densidad de terminales vGAT-ir en el neuropilo en cada una de las especies. En relación con este parámetro, observamos homogeneidad en las capas I-IV (**Figura 18A, Tabla 3**) en la corteza HLS1 de ratón; mientras que los valores de las capas V y VI son significativamente más bajos. En la corteza temporal humana observamos que la capa IV presenta la mayor densidad de botones vGAT-ir en el neuropilo seguido por las capas III y V, mientras que los valores son algo menores en la II, y los valores más bajos se encuentran en las capas I y VI (**Figura 18B, Tabla 4**).

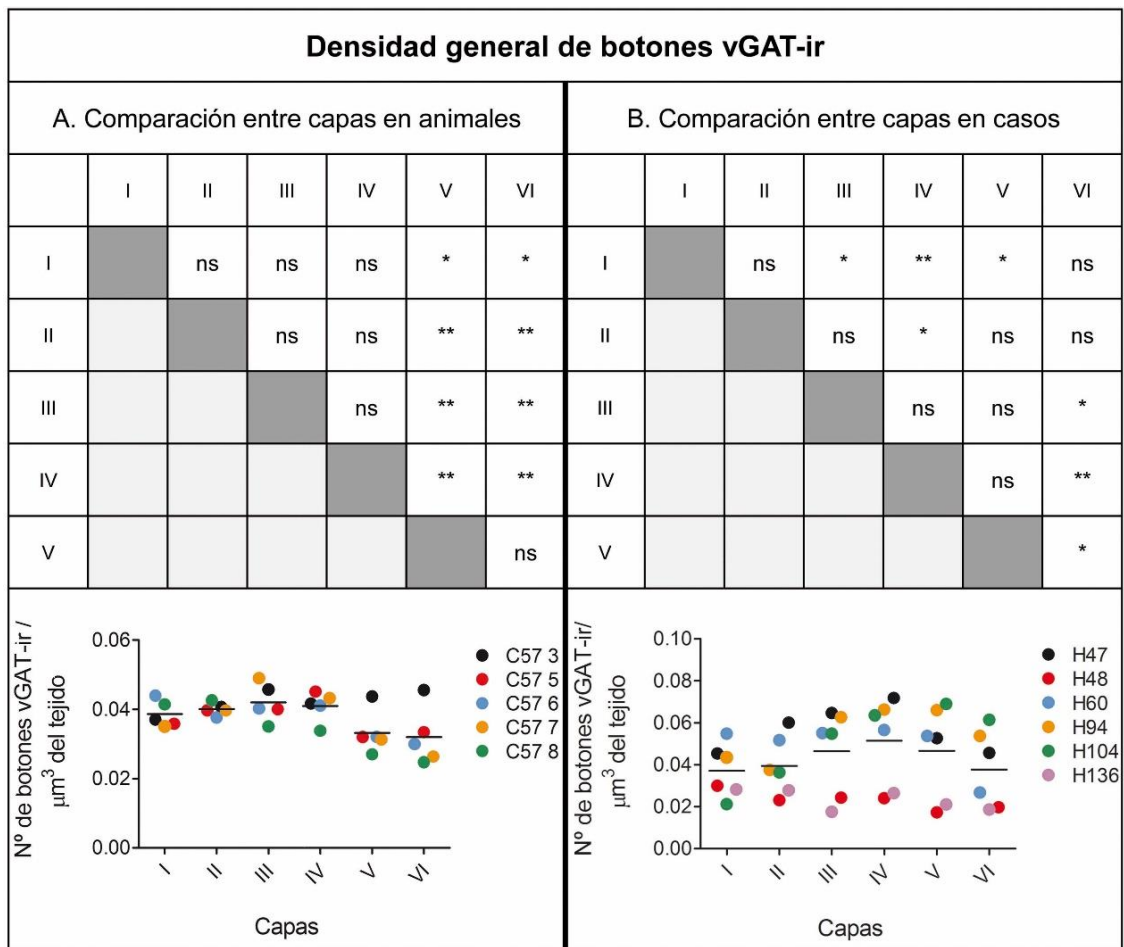


Figura 18. Tablas y representación gráfica de la densidad general de botones GABAérgicos. En ambas tablas se ha aplicado la prueba no paramétrica Kruskal-Wallis (ns= no significativo, * ≤ 0.05 ; ** ≤ 0.001). Los gráficos representan la media por capa en animales (A) y en casos (B).

CAPAS	Densidad de botones vGAT-ir en el neuropilo (Número de botones vGAT-ir/ μm^3 del tejido)	Superficie del área del soma neuronal (μm^2 , 15 neuronas por ratón y por capa cortical)	Número de botones perisomáticos vGAT-ir/neurona	Densidad de botones perisomáticos vGAT-ir (Número de botones/ μm^2 del área del soma neuronal)
I	0.03857 $\pm$ 0.01076	437.1 $\pm$ 104.0	71.55 $\pm$ 26.26	0.1690 $\pm$ 0.07136
II	0.04004 $\pm$ 0.006617	637.6 $\pm$ 115.7	116.3 $\pm$ 27.77	0.1850 $\pm$ 0.04347
III	0.04205 $\pm$ 0.01073	673.9 $\pm$ 139.3	134.5 $\pm$ 33.60	0.2030 $\pm$ 0.04615
IV	0.04091 $\pm$ 0.009749	429.6 $\pm$ 107.1	88.16 $\pm$ 23.47	0.2027 $\pm$ 0.05547
V	0.03318 $\pm$ 0.009414	908.9 $\pm$ 300.4	145.3 $\pm$ 45.72	0.1633 $\pm$ 0.03087
VI	0.03196 $\pm$ 0.009329	568.9 $\pm$ 147.8	90.83 $\pm$ 31.57	0.1620 $\pm$ 0.04616

Tabla 3. Valores promedio $\pm$ desviación estándar de la densidad de terminales vGAT-ir en el neuropilo, superficie del soma neuronal, número por neurona y la densidad de terminales perisomáticos vGAT-ir en las diferentes capas de la corteza HLS1 del ratón.

CAPAS	Densidad de botones vGAT-ir en el neuropilo (Número de botones vGAT-ir/ μm^3 del tejido)	Superficie del área del soma neuronal (μm^2 , 15 neuronas por ratón y por capa cortical)	Número de botones perisomáticos vGAT-ir/neurona	Densidad de botones perisomáticos vGAT-ir (Número de botones/ μm^2 del área del soma neuronal)
I	0.03708 $\pm$ 0.01433	465.8 $\pm$ 88.27	45.59 $\pm$ 23.57	0.09877 $\pm$ 0.05266
II	0.03919 $\pm$ 0.01543	679.3 $\pm$ 209.8	122.9 $\pm$ 45.88	0.1862 $\pm$ 0.06164
III	0.04753 $\pm$ 0.02034	1260 $\pm$ 321.3	199.7 $\pm$ 101.3	0.1571 $\pm$ 0.06459
IV	0.05164 $\pm$ 0.02260	537.3 $\pm$ 99.43	122.1 $\pm$ 40.91	0.2299 $\pm$ 0.07340
V	0.04786 $\pm$ 0.02275	1230 $\pm$ 354.9	262.6 $\pm$ 132.6	0.2129 $\pm$ 0.08930
VI	0.03799 $\pm$ 0.01928	1184 $\pm$ 377.8	214.4 $\pm$ 104.6	0.1796 $\pm$ 0.05871

Tabla 4. Valores promedio $\pm$ desviación estándar de la densidad de terminales vGAT-ir en el neuropilo, superficie del soma neuronal, número por neurona y densidad de terminales perisomáticos vGAT-ir en las diferentes capas de la neocorteza temporal humana.

2. DENSIDAD DE TERMINALES GABAÉRGICOS EN APOSICIÓN A LOS SOMAS NEURONALES

2.1 Superficie de los somas neuronales

A continuación, analizamos en 3D la superficie de los somas neuronales cuantificando la superficie creada con el programa Imaris en base al marcaje con NeuN. Analizamos, en ambas especies, al menos 15 somas por capa y animal/caso (total, n = 450 somas en ratón y 540 neuronas humanas).

Cuando promediamos los datos de todas las capas corticales observamos diferencias interindividuales en el tamaño de los somas neuronales en ambas especies (**Figura 19**) que fueron estadísticamente significativas entre algunos casos.

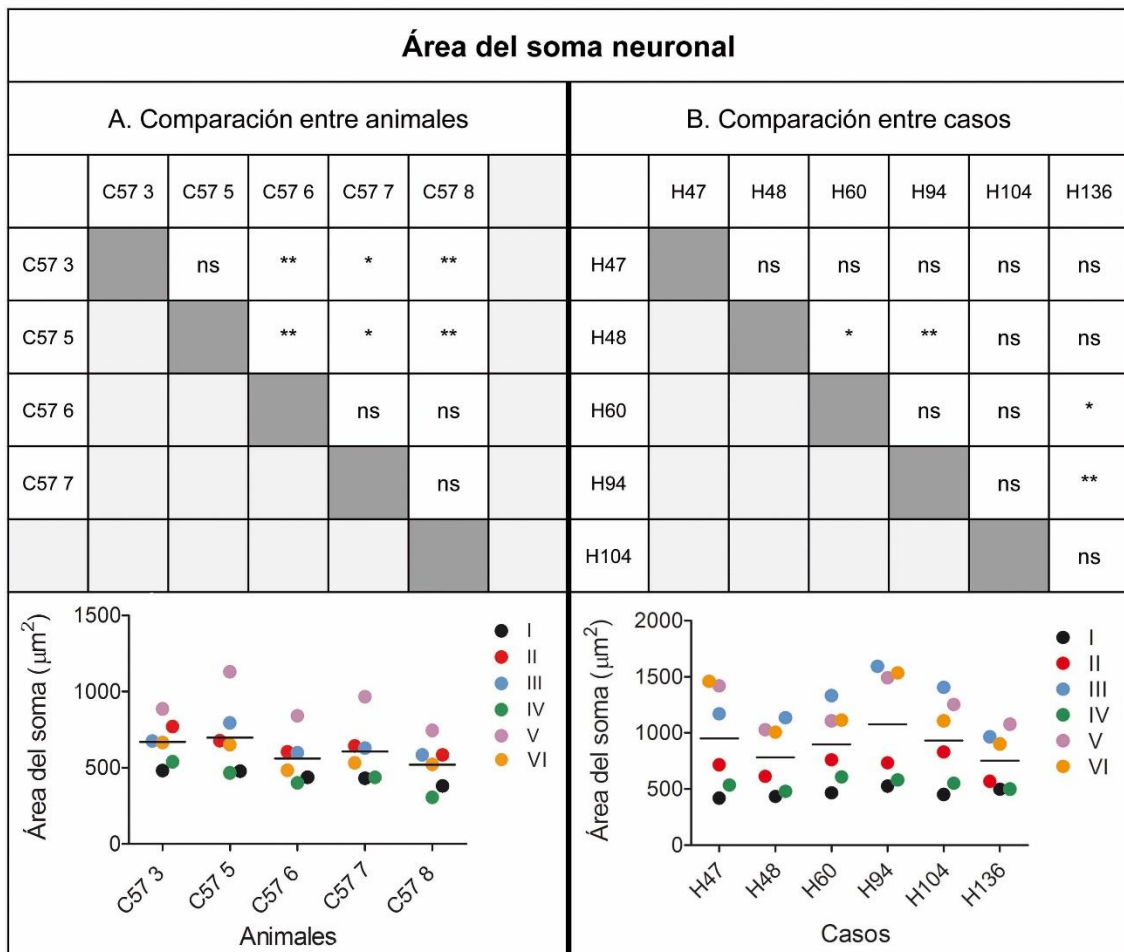


Figura 19. Tabla y representación gráfica del área del soma neuronal. En ambas tablas se ha aplicado la prueba no paramétrica Kruskal- Wallis (ns: no significativo, * ≤ 0.05 , ** ≤ 0.001). Los gráficos representan la media por animal (A) y por casos (B).

A pesar de estas diferencias, en cada una de las especies agrupamos los valores de todos los casos para comparar el tamaño de las neuronas de las distintas capas corticales.

En la corteza HLS1 del ratón (**Figura 20A, Tabla 3**) observamos que los somas significativamente más pequeños se encuentran en las capas I y IV, seguidos en orden creciente de las capas VI, II, y III; mientras que las neuronas piramidales que presentan los somas más grandes se encuentran en la capa V. En la neocorteza temporal humana los somas significativamente más pequeños se encuentran en las capas I, IV y II, frente a los somas de mayor tamaño presentes en las capas VI, V y III. (**Figura 20B, Tabla 4**). Estas variaciones laminares en el tamaño neuronal se observaron en todos los casos, a pesar de las diferencias interindividuales. También observamos que el tamaño neuronal en la neocorteza temporal humana es, en todas las capas, estadísticamente mayor que en la corteza HLS1 del ratón (comparación no mostrada).

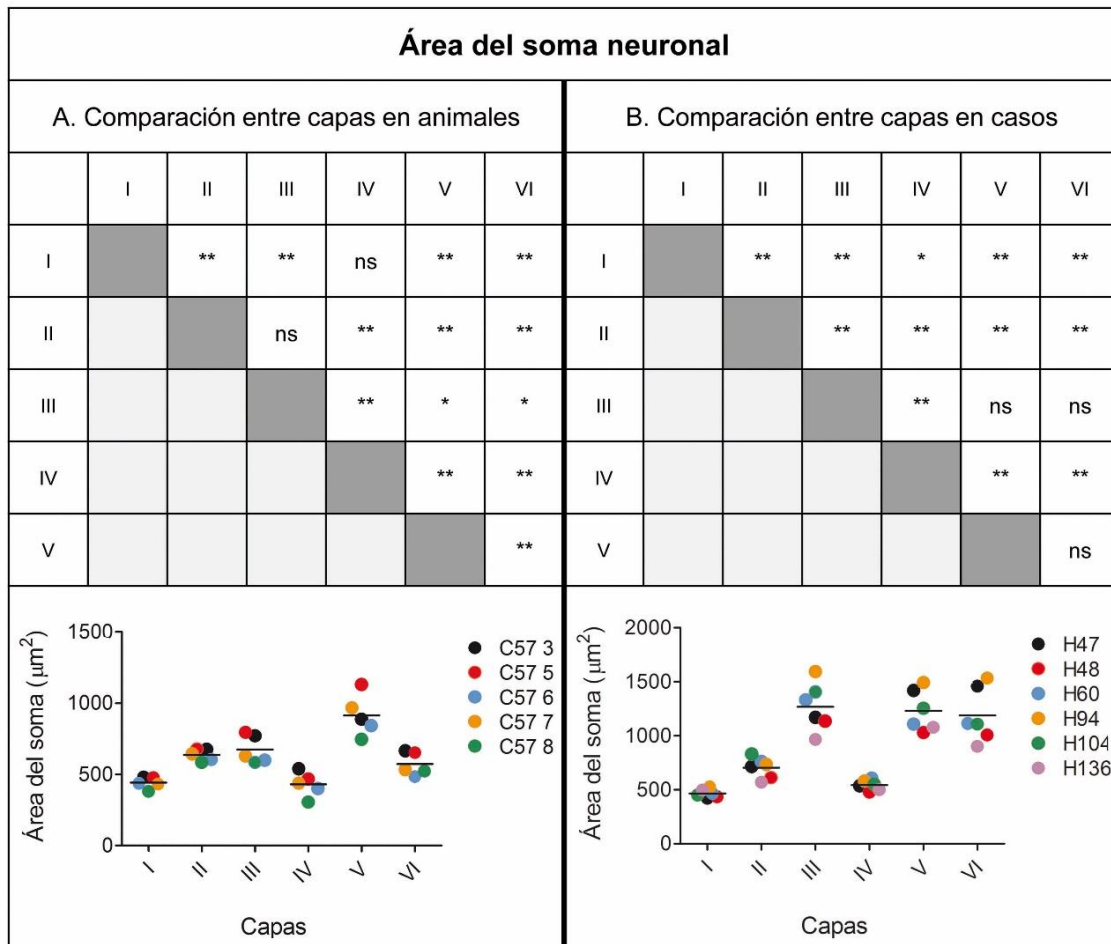


Figura 20. Tablas y representación gráfica del área de los somas neuronales en las distintas capas corticales. En ambas tablas se ha aplicado la prueba no paramétrica Kruskal-Wallis (ns= no significativo, * ≤ 0.05 ; ** ≤ 0.001). Los gráficos representan la media por capas en los ratones (A) y los casos humanos (B) analizados.

2.2 Número de terminales GABAérgicos perisomáticos

A continuación, estudiamos el número de terminales GABAérgicos en aposición a los somas cuya superficie se había medido en la corteza HLS1 del ratón y la neocorteza temporal humana. Contamos en 3D el número de botones vGAT-ir contenidos entre las superficies interna y externa generadas con el programa Imaris a partir de cada soma neuronal. Las **figuras 21 y 22** muestran, en la corteza HLS1 del ratón y la neocorteza temporal, respectivamente, algunos ejemplos de la reconstrucción de somas de neuronas de las distintas capas corticales, junto con los botones GABAérgicos en aposición a los mismos.

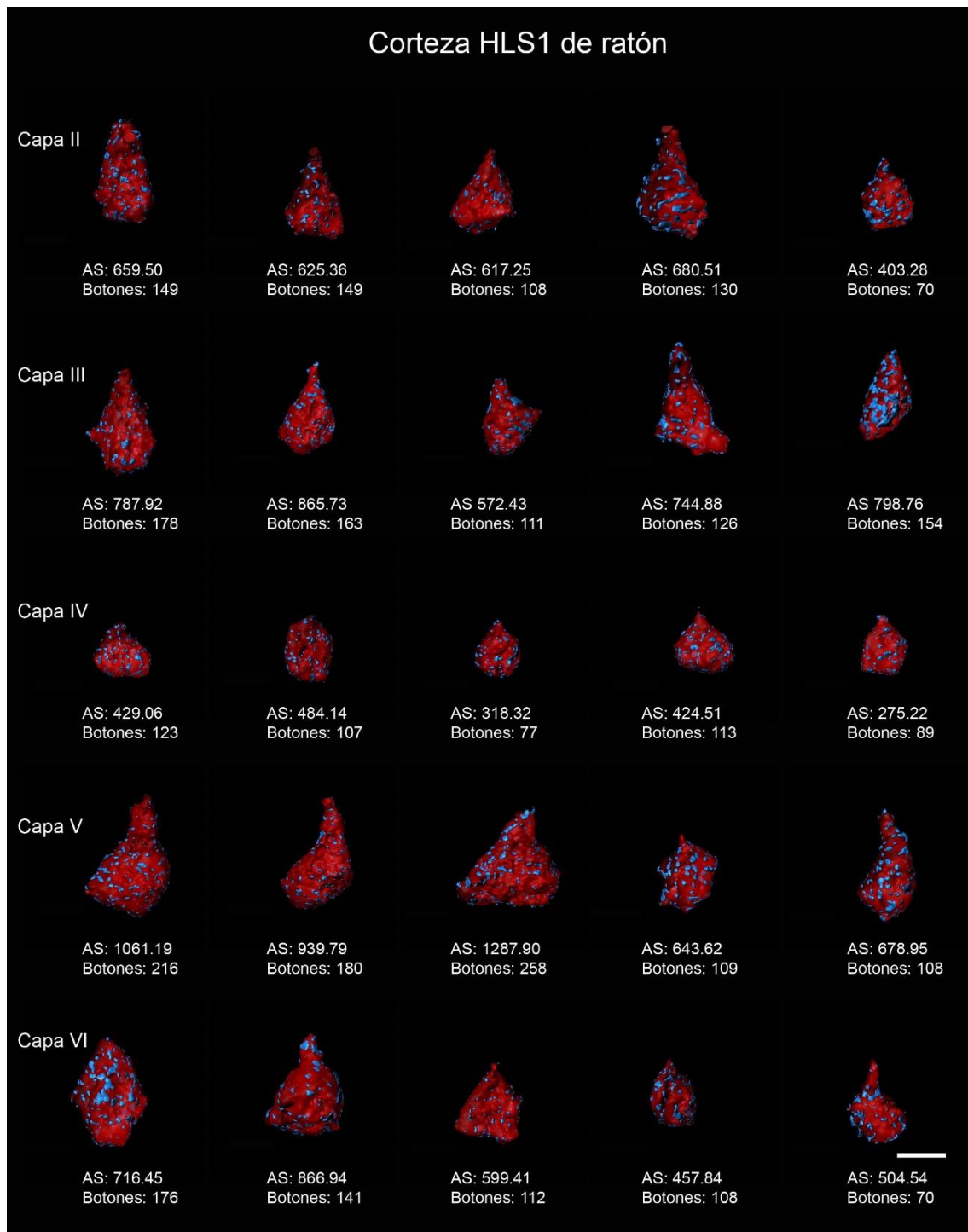


Figura 21. Diagramas que muestran ejemplos de reconstrucciones del soma de neuronas piramidales (rojo) de las capas II–VI de la corteza HLS1 del ratón junto con los terminales vGAT-ir (azules) en aposición a las mismas. AS: Área de la Superficie (μm^2). Barra de escala: 4 μm .

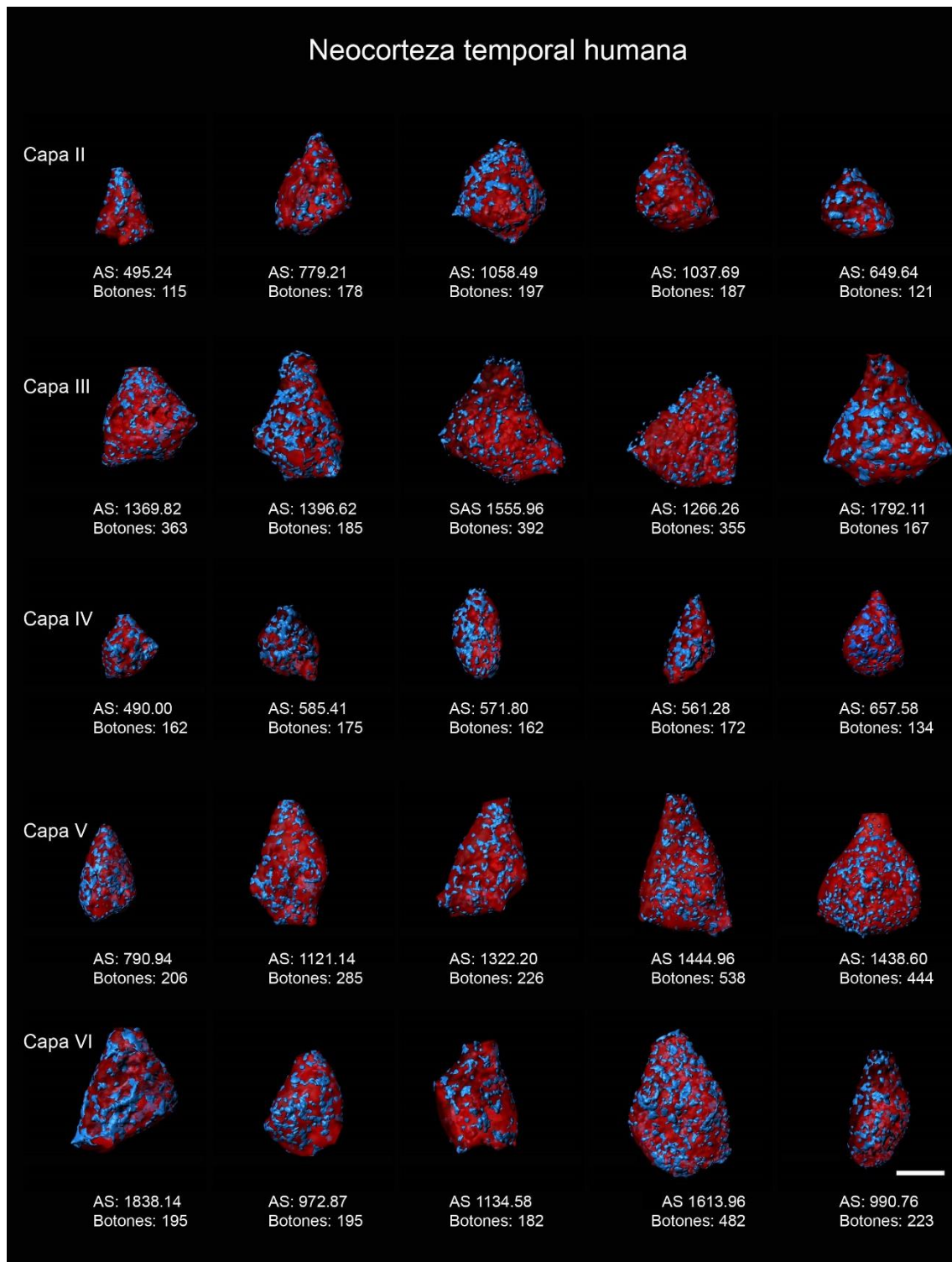


Figura 22. Diagramas que muestran ejemplos de reconstrucciones del soma de neuronas piramidales (rojo) de las capas II–VI de la neocorteza temporal humana junto con los terminales vGAT-ir (azules) en aposición a las mismas.
 AS: Área de la Superficie (μm²). Barra de escala: 4 μm.

En ambas especies, al promediar los datos de todas las capas corticales, observamos diferencias interindividuales en el número de terminales perisomáticos por neurona (**Figura 23**). A pesar de

estas diferencias, promediamos los datos de los diferentes casos para estudiar en cada especie el número de terminales perisomáticos en las neuronas de las distintas capas corticales.

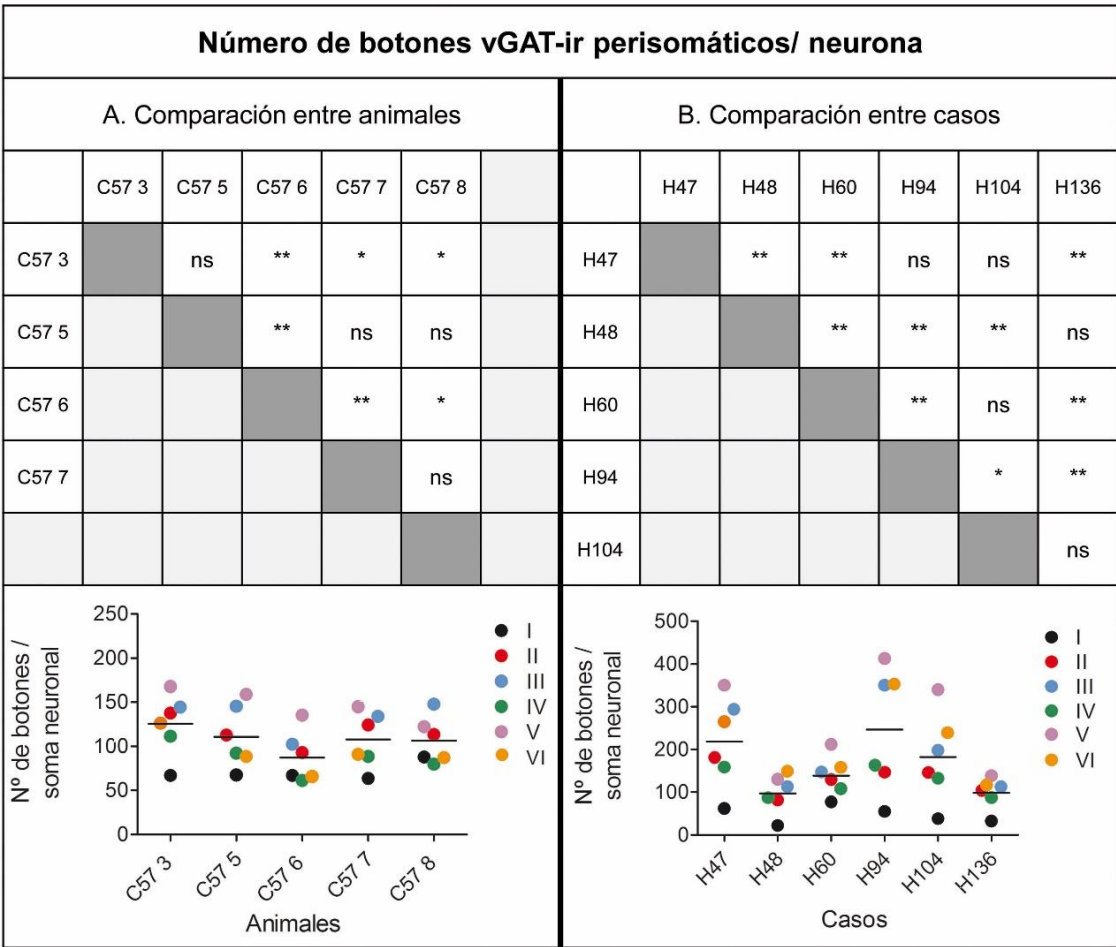


Figura 23. Tabla y representación gráfica del número de botones GABAérgicos perisomáticos por neurona. En ambas tablas se ha aplicado la prueba no paramétrica Kruskal- Wallis (ns: no significativo, * ≤ 0.05 , ** ≤ 0.001). Los gráficos representan la media por animal (A) y por caso (B).

En ambas especies, el número más alto de terminales perisomáticos se observó en aposición a las neuronas de capa V (media $\pm$ SD: 145.3 ± 54.72 y 262.6 ± 132.6 en la corteza de ratón y humana respectivamente) seguido por neuronas de las capas III, VI y II, luego por neuronas de capa IV y los números más bajos se encontraron en neuronas de capa I (**Figura 24, Tablas 3 y 4**). Estos patrones laminares, en ambas especies, son similares a los observados para el área del soma en ambas especies (**Figura 19**). Por último, el número de terminales GABAérgicos perisomáticos que contactan con las neuronas humanas fue significativamente más alto que en el ratón en todas las capas corticales excepto en la capa I, con más terminales perisomáticos en

el ratón, y en capa II en la que no se observaron diferencias significativas (comparación no mostrada).

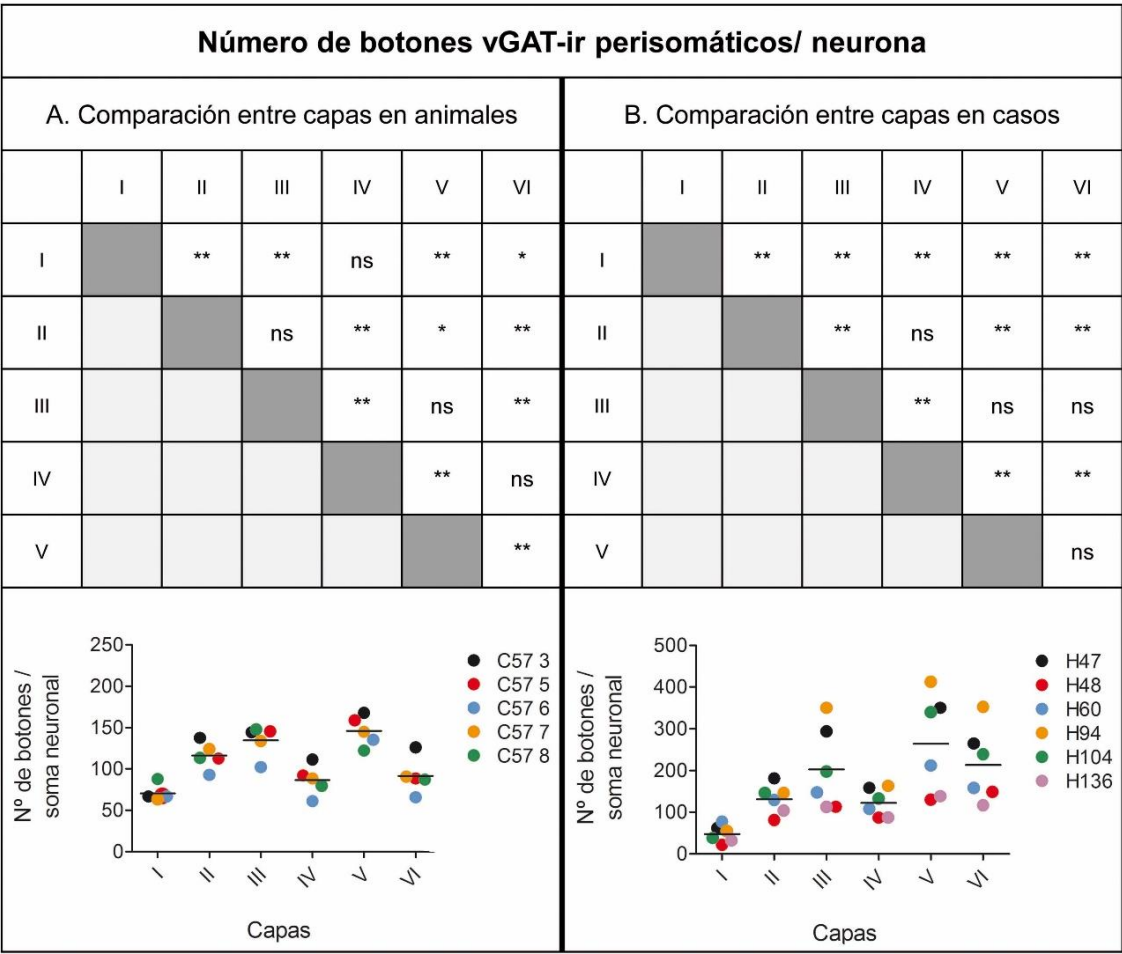


Figura 24. Tablas y representación gráfica del número de botones GABAérgicos en aposición al soma. En ambas tablas se ha aplicado la prueba no paramétrica Kruskal-Wallis (ns= no significativo, * ≤ 0.05 ; ** ≤ 0.001). Los gráficos representan la media por animal (A) y por capa (B).

2.3 Densidad de terminales GABAérgicos perisomáticos

A continuación obtuvimos, en ambas especies, los valores de la densidad de invervación perisomática en los diferentes casos y capas corticales, al dividir el número de botones perisomáticos que recibe cada neurona entre el valor del área del soma. De nuevo, aunque observamos diferencias interindividuales en los valores de densidad de los terminales perisomáticos por neurona en ambas especies (**Figura 25**), promediamos los datos de los diferentes casos para estudiar los valores de densidad en las neuronas de las distintas capas corticales.

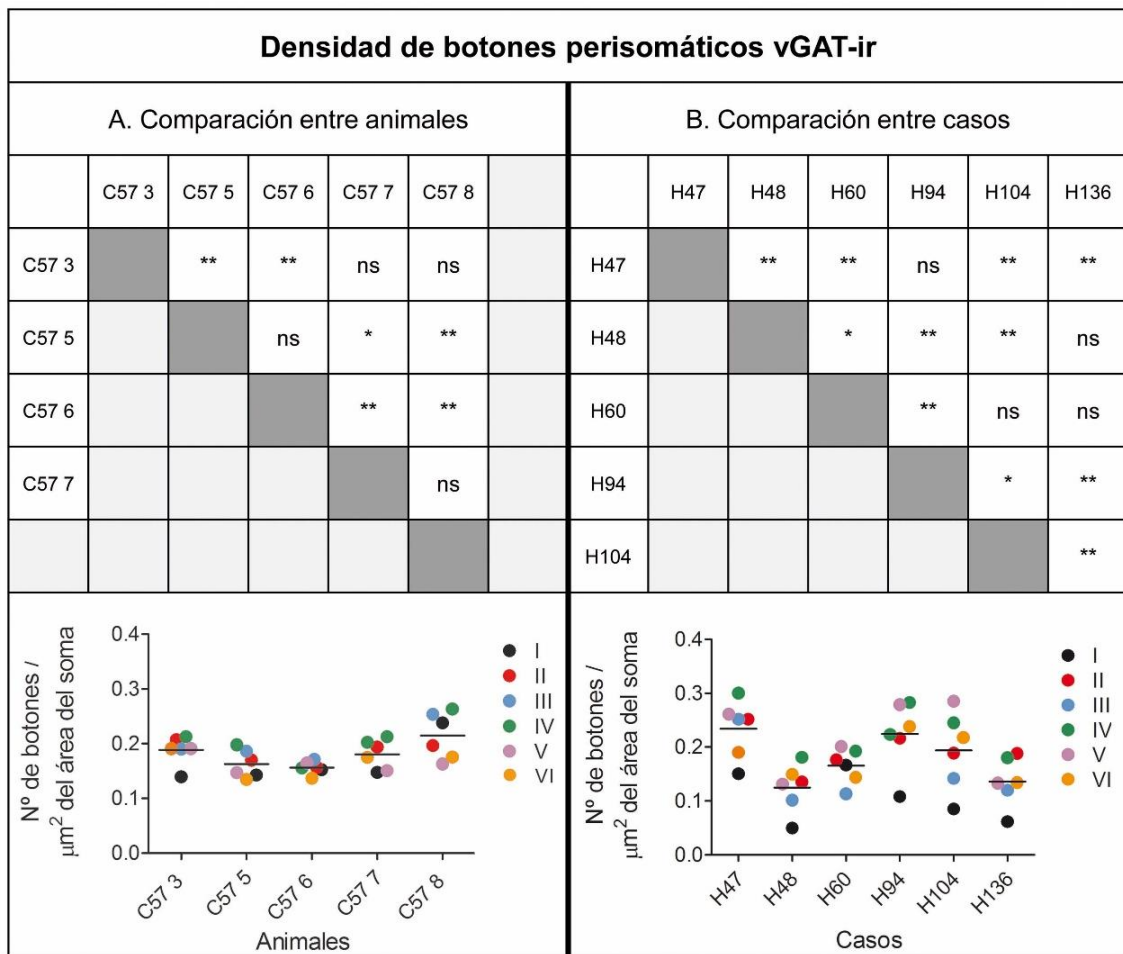


Figura 25. Tablas y representación gráfica de la densidad de botones GABAérgicos en aposición al soma. En ambas tablas se ha aplicado la prueba no paramétrica Kruskal- Wallis (ns: no significativo, * ≤ 0.05 , ** ≤ 0.001). Los gráficos representan la media por animal (A) y por caso (B).

En ambas especies observamos diferencias significativas en la densidad de terminales GABAérgicos perisomáticos entre las neuronas de distintas capas corticales (**Figura 26, Tablas 3 y 4**)

En general, la densidad de botones perisomáticos fue máxima en neuronas de capa IV, pese a su pequeño tamaño y al número relativamente bajo de botones perisomáticos que reciben, seguida por las neuronas de las capas II, III, V y VI. Los niveles más bajos se observaron en las neuronas de capa I.

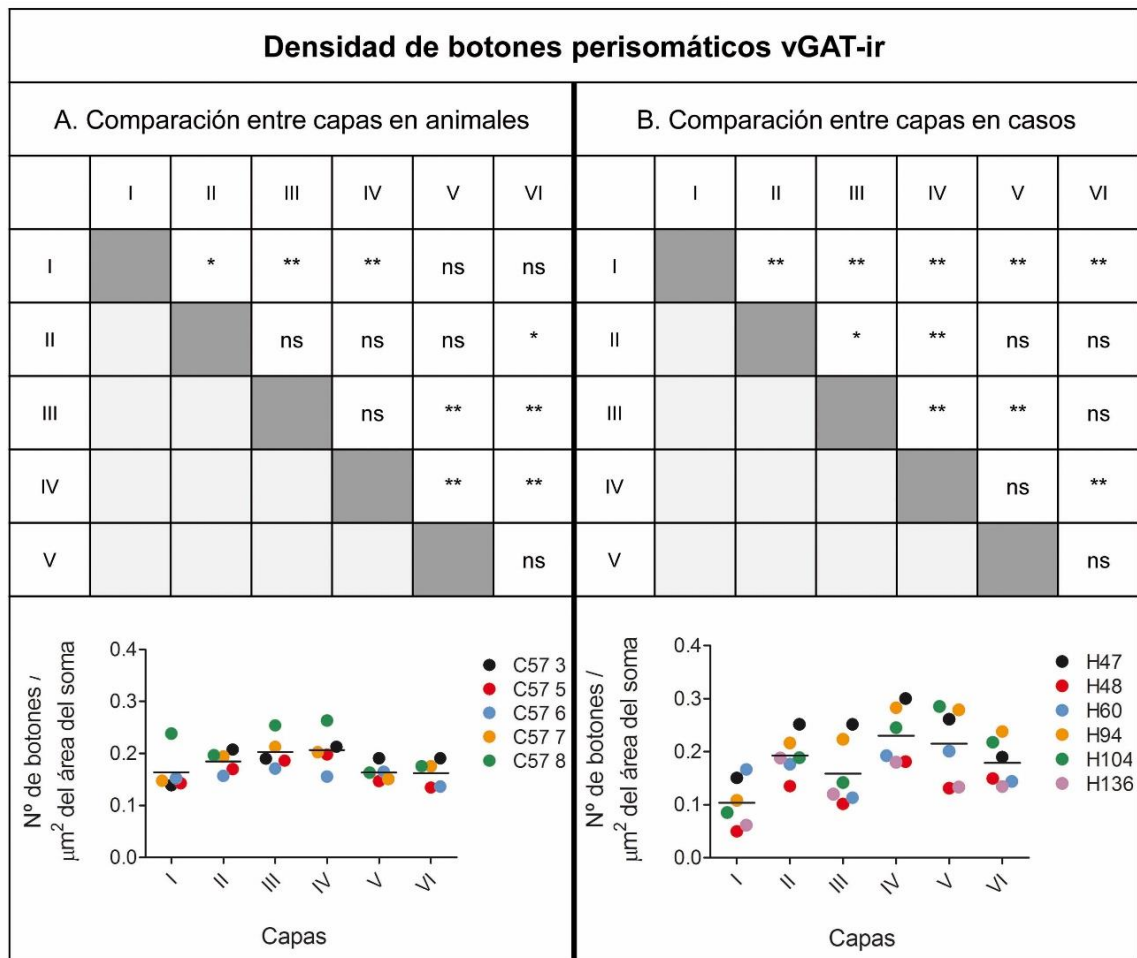


Figura 26. Tablas y representación gráfica de la densidad de botones GABAérgicos en aposición al soma. En ambas tablas se ha aplicado la prueba no paramétrica Kruskal-Wallis (ns= no significativo, * ≤ 0.05 ; ** ≤ 0.001). Los gráficos representan la media por capas en animales (A) y en casos (B).

2.4 Análisis de la correlación entre las variables relacionadas con la inhibición del soma

Para concluir el estudio de la inervación de los somas neuronales, llevamos a cabo un análisis de correlación entre las distintas variables estudiadas (densidad de terminales GABAérgicos en el neuropilo, superficie del soma neuronal, y número y densidad de terminales GABAérgicos perisomáticos). Para las comparaciones en los ratones empleamos los valores promedio de las distintas variables, ya que la densidad de terminales en el neuropilo se estimó en series de imágenes de confocal diferentes que el resto de las variables.

En la corteza somatosensorial del ratón, tomando conjuntamente los datos de todos los animales observamos que existe una fuerte correlación positiva ($R^2 = 0,559$) entre el área del

soma y el número de botones perisomáticos vGAT-ir (**Figura 27**). Igualmente observamos la misma correlación ($R^2 = 0,559$) en la corteza temporal humana (**Figura 28**). Asimismo, en ambas especies, cuando estudiamos los datos de los distintos casos por separado observamos la misma correlación en cuatro de los cinco ratones analizados y en cuatro de los seis casos humanos (**Figuras 27 y 28**). Estos resultados indican que el tamaño del soma es un buen indicador predictivo del número de terminales GABAérgicos que reciben los somas neuronales. Es importante señalar que también observamos que la densidad de los terminales GABAérgicos perisomáticos no está correlacionada con el tamaño del soma neuronal en ninguna de las especies (**Figuras 27 y 28**). Asimismo, únicamente encontramos en dos de los cinco ratones y en dos de los seis casos humanos que la densidad de los terminales GABAérgicos perisomáticos correlaciona con la abundancia relativa de los terminales GABAérgicos del neuropilo de las distintas capas corticales (**Figuras 27 y 28**).

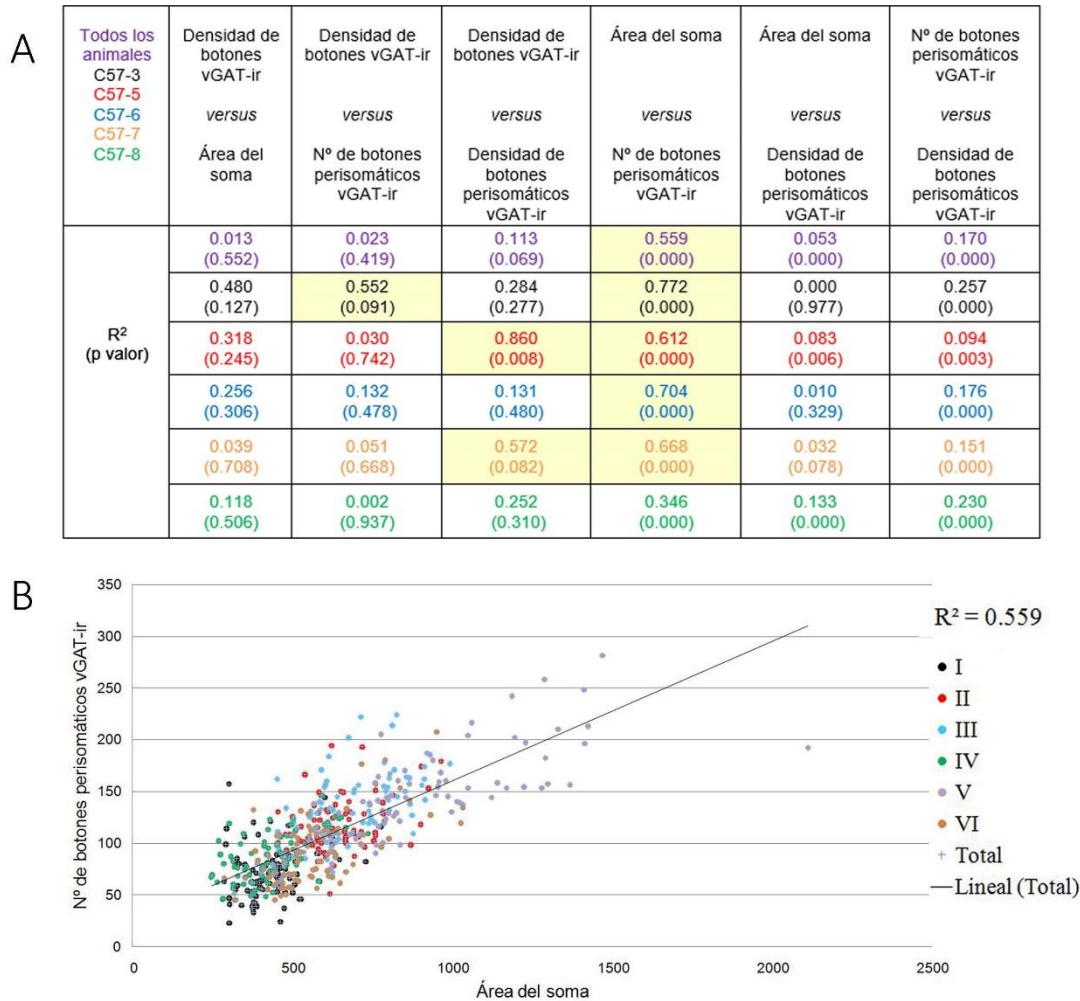


Figura 27. A) Tabla en la que se muestran los valores de R^2 y p del análisis de correlaciones entre las diferentes variables en relación con el estudio de la innervación GABAérgica perisomática en la corteza HLS1 del ratón. En

amarillo se muestran las correlaciones positivas. B) Diagrama de dispersión puntos, que muestra la línea de tendencia y el valor de R^2 , correspondiente a los datos de área del soma frente al número de botones perisomáticos procedentes de todos los animales.

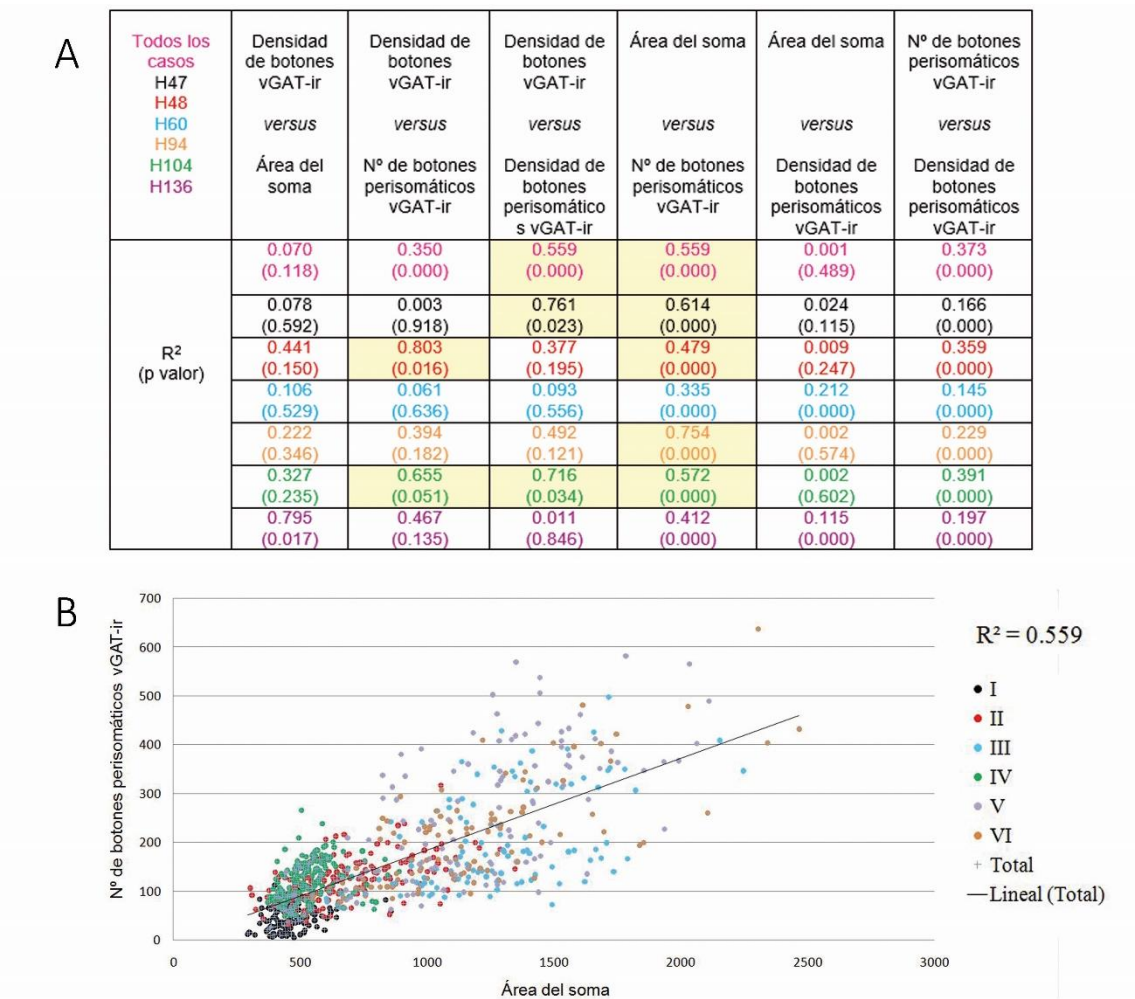


Figura 28. A) Tabla en la que se muestran los valores de R^2 y p del análisis de correlaciones entre las diferentes variables en relación con el estudio de la innervación GABAérgica perisomática en la neocorteza temporal humana. En amarillo se muestran las correlaciones positivas. B) Diagrama de dispersión puntos, que muestra la línea de tendencia y el valor de R^2 , correspondiente a los datos de área del soma frente al número de botones perisomáticos procedentes de todos los casos.

3. DENSIDAD DE TERMINALES GABAÉRGICOS EN APOSICIÓN A LOS SEGMENTOS INICIALES DEL AXÓN

Para estudiar la densidad de innervación GABAérgica sobre los SIAs utilizamos secciones con triples marcajes para los somas, los SIAs y los terminales GABAérgicos (**Figuras 29 y 30**) en las que medimos las características morfológicas de los SIA y el número de terminales GABAérgicos

en aposición a los mismos en las diferentes capas de la corteza somatosensorial del ratón y en la corteza temporal humana.

3.1 Longitud, diámetro medio y superficie de los segmentos iniciales del axón

En primer lugar, estudiamos en 3D los parámetros morfológicos (longitud, diámetro medio y superficie) de los SIAs, en base al marcaje inmunocitoquímico de Ankirina G o β /IV-Espectrina en las secciones de ratón y humanas, respectivamente.

Las medidas de longitud y diámetro medio se obtuvieron usando la herramienta *Filament tracer* del programa Imaris que crea un filamento, formado por una sucesión de conos truncados de dimensiones conocidas, que se ajusta al marcaje de los SIAs. El valor de longitud de los SIAs es la suma de la altura de cada uno de los conos truncados, mientras que el diámetro medio se calculó promediando en diámetro de cada uno de ellos. A continuación creamos una superficie en 3D ajustada al marcaje de cada SIA que nos indica el valor su área (**Figuras 29 y 30**).

Estudiamos un total de 15 SIAs en cada capa cortical y caso (450 SIAs en cada una de las especies). En la capa I, las neuronas analizadas fueron muy probablemente interneuronas, mientras que en el resto de capas corticales se identificaron como neuronas piramidales en base a la forma triangular de sus somas y a la presencia de la dendrita apical. Si bien tanto para la longitud como para el diámetro medio de los SIAs observamos algunas diferencias interindividuales, más pronunciadas entre los casos humanos que entre los ratones (**Figuras 31, 33, 35**). Para estudiar las posibles diferencias entre las capas corticales (**Figuras 32, 34, 36; Tablas 5 y 6**) promediamos los datos procedentes de los distintos individuos de cada especie.

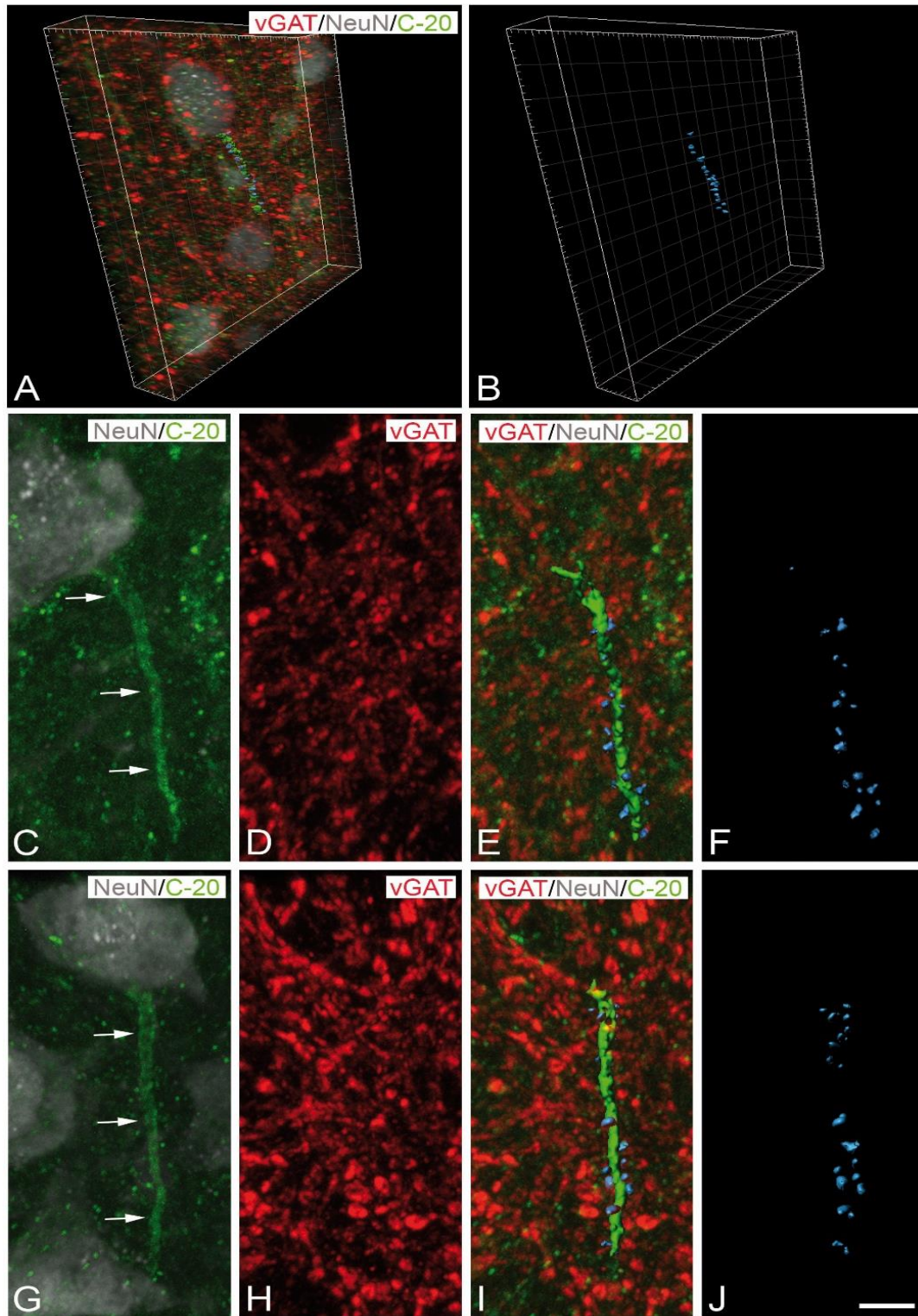


Figura 29. Serie de imágenes de confocal rotada (A) y tríos de imágenes de proyección (C-E; G-I) adquiridas en las capas III (A), IV (C-E) y V (G-I) de la corteza HLS1 del ratón, que muestran la relación entre los terminales GABAérgicos, los somas neuronales y los SIAs (flechas), marcados para vGAT (rojo), NeuN (gris) y Ankirina G (c-20, verde), respectivamente. Se crearon superficies digitales (verde intenso), ajustadas a los SIAs de las neuronas seleccionadas, para segmentar y cuantificar los terminales GABAérgicos en contacto con los SIAs, mostrados en azul en B, E-F e I-J. La barra de escala mostrada en J, indica 8 μ m en A-B y 4 μ m en C-J.

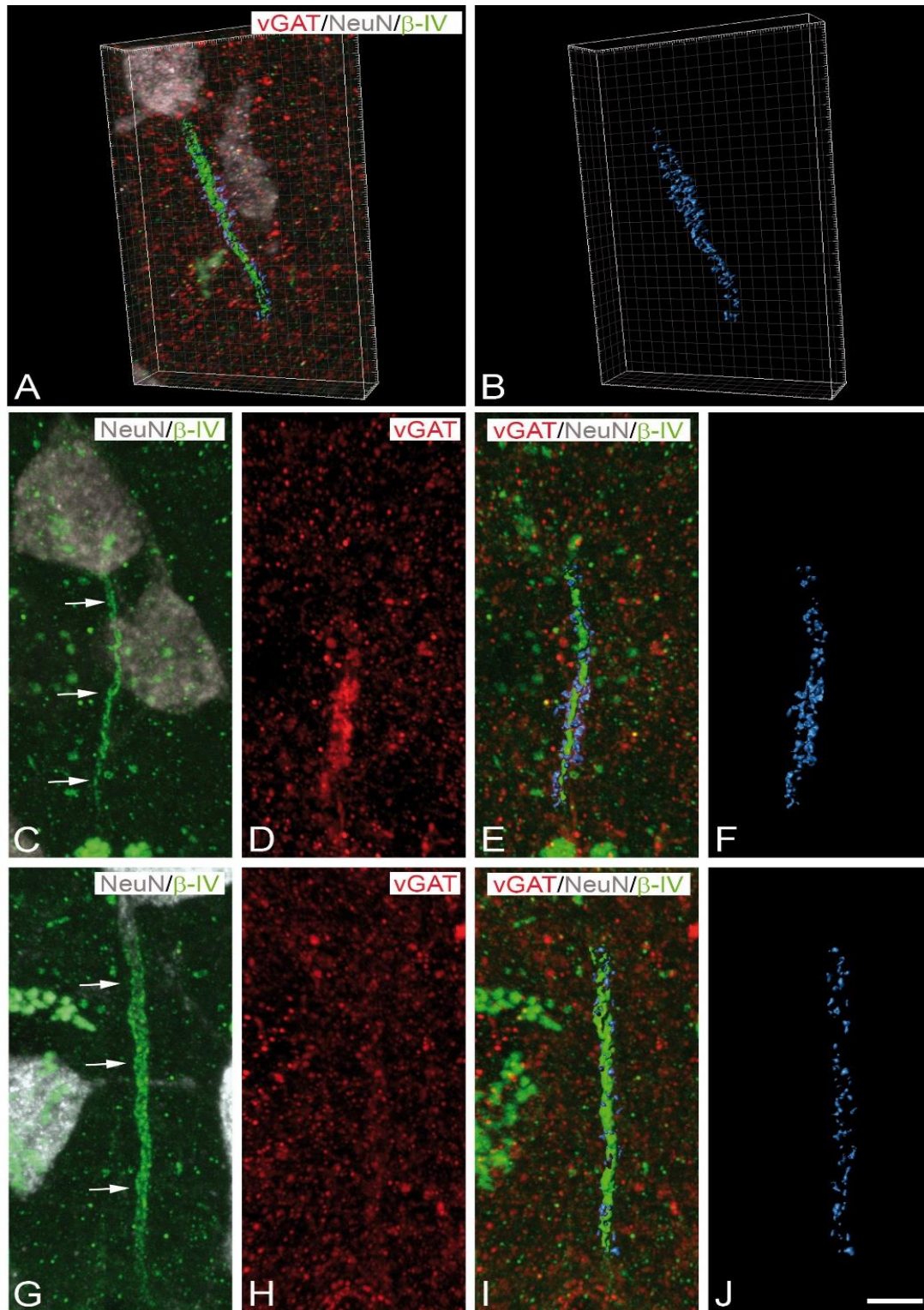


Figura 30. Serie de imágenes de confocal rotada (A) y tríos de imágenes de proyección (C–E; G–I) adquiridas en las capas III (A), IV (C–E) y V (G–I) de la neocorteza temporal humana, que muestran la relación entre los terminales GABAérgicos, los somas neuronales y los SIAs (flechas), marcados para vGAT (rojo), NeuN (gris) y β /IV-Espectrina (verde), respectivamente. Se crearon superficies digitales (verde intenso), ajustadas a los SIAs de las neuronas seleccionadas, para segmentar y cuantificar los terminales GABAérgicos en contacto con los SIAs, mostrados en azul en B, E–F e I–J. La barra de escala mostrada en J, indica 8 μ m en A–B y 5 μ m en C–J.

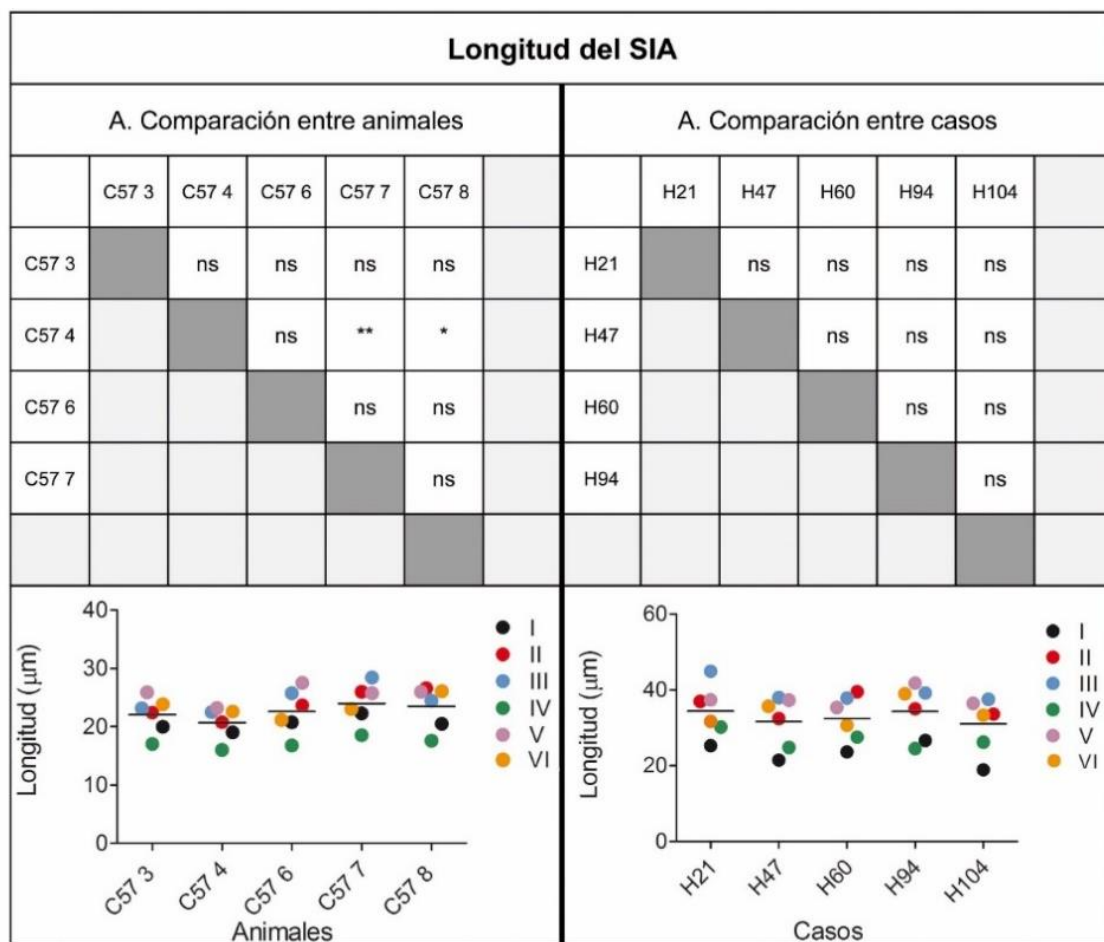


Figura 31. Tabla y representación gráfica de la comparación de los valores promedio de la longitud del SIA entre los distintos ratones (A) y casos humanos (B) estudiados. En ambas tablas se ha aplicado la prueba no paramétrica Kruskal-Wallis (ns= no significativo, * ≤ 0.05 ; ** ≤ 0.001).

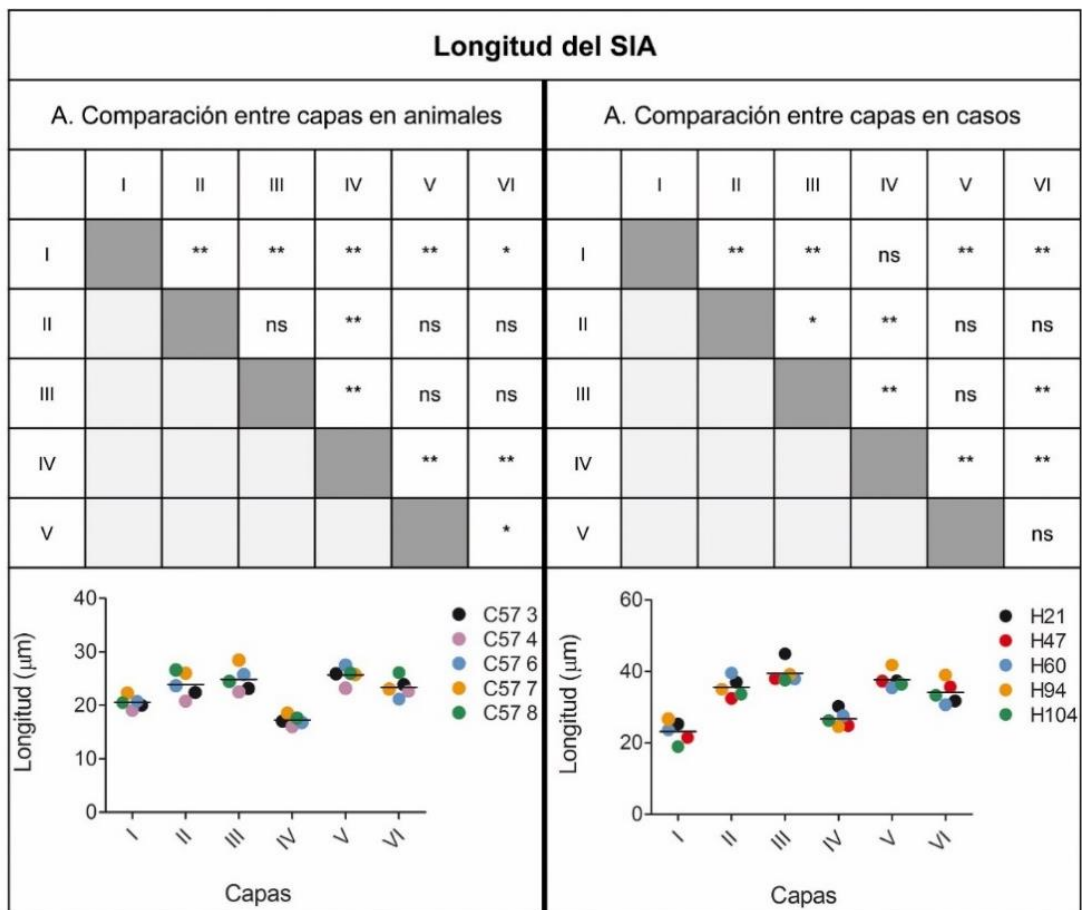


Figura 32. Tabla y representación gráfica de la comparación de los valores promedio de la longitud del SIA entre las distintas capas corticales de la corteza HLSI de ratón (A) y la neocorteza temporal humana (B). En ambas tablas se ha aplicado la prueba no paramétrica Kruskal-Wallis (ns= no significativo, * ≤ 0.05 ; ** ≤ 0.001).

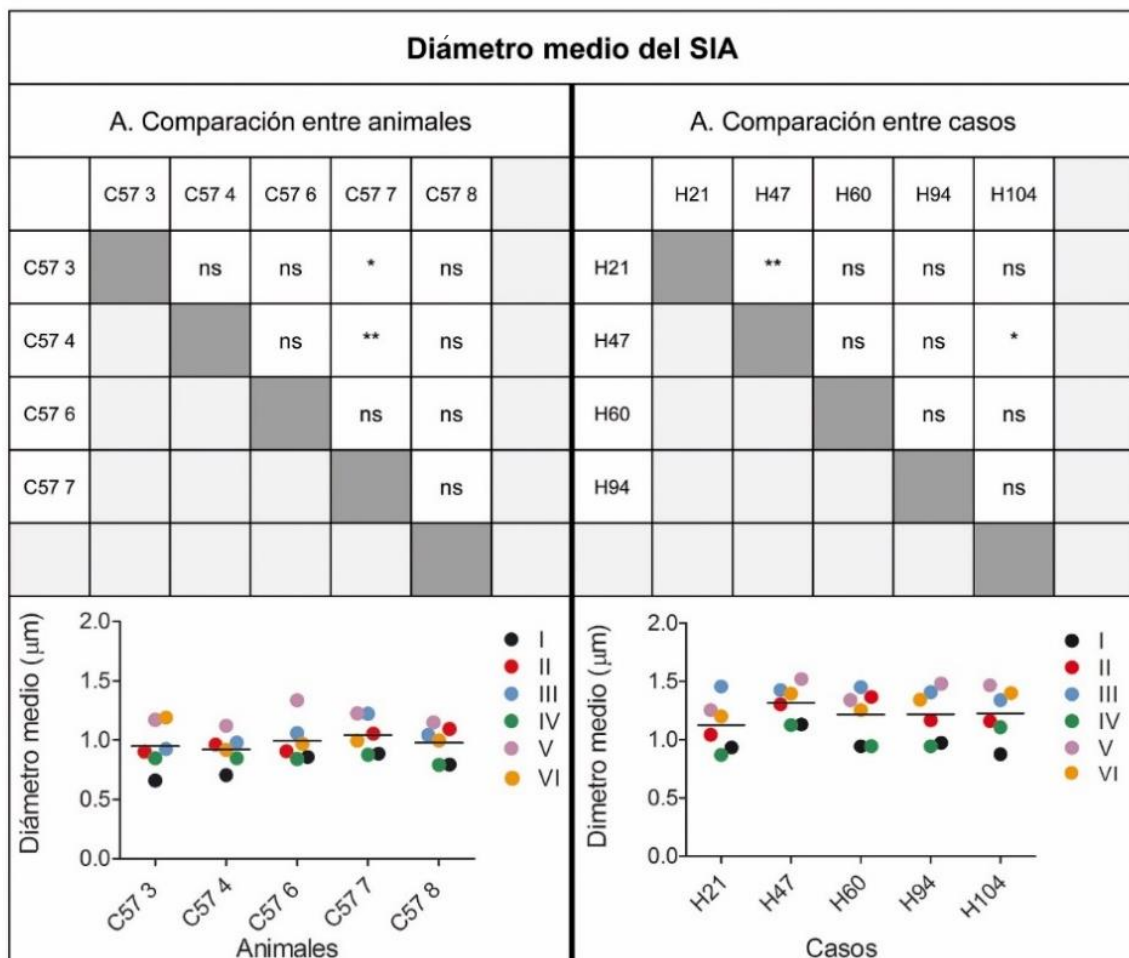


Figura 33. Tabla y representación gráfica de la comparación de los valores promedio del diámetro medio del SIA entre los distintos ratones (A) y casos humanos (B) estudiados. En ambas tablas se ha aplicado la prueba no paramétrica Kruskal-Wallis (ns= no significativo, * ≤ 0.05 ; ** ≤ 0.001).

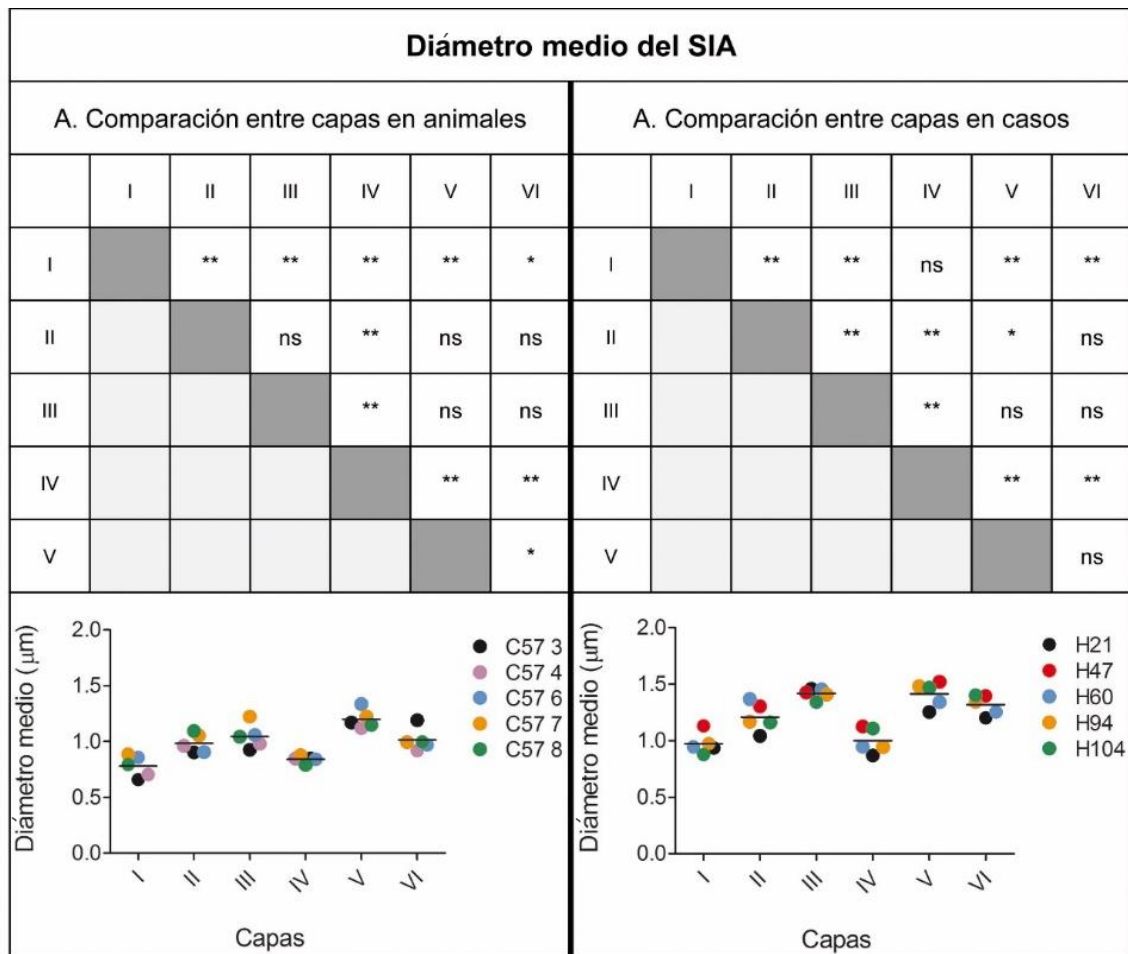


Figura 34. Tabla y representación gráfica de la comparación de los valores promedio del diámetro medio del SIA entre las distintas capas corticales de la corteza HSLI de ratón (A) y la neocorteza temporal humana (B). En ambas tablas se ha aplicado la prueba no paramétrica Kruskal-Wallis (ns= no significativo, * ≤ 0.05 ; ** ≤ 0.001).

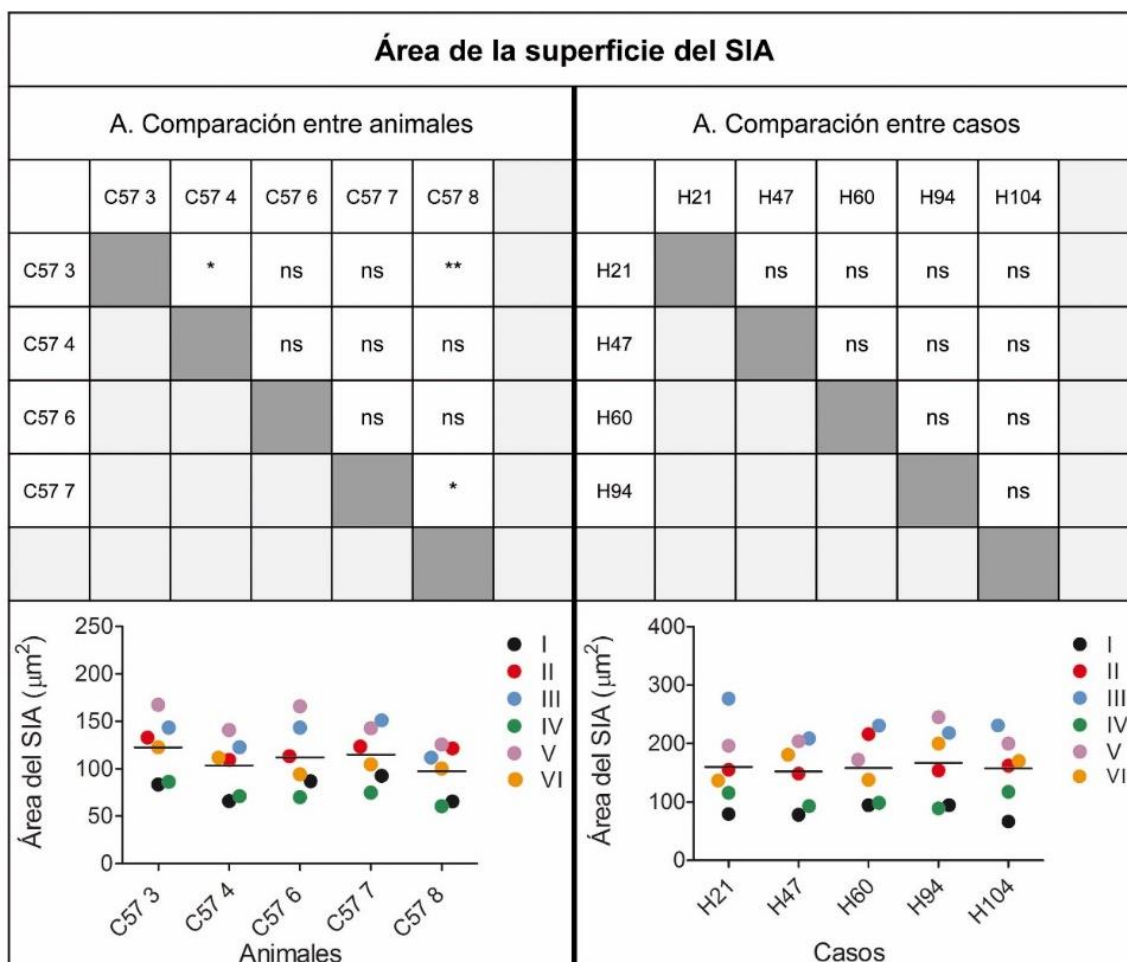


Figura 35. Tabla y representación gráfica de la comparación de los valores promedio del área del SIA entre los distintos ratones (A) y casos humanos (B) estudiados. En ambas tablas se ha aplicado la prueba no paramétrica Kruskal-Wallis (ns= no significativo, * ≤ 0.05 ; ** ≤ 0.001).

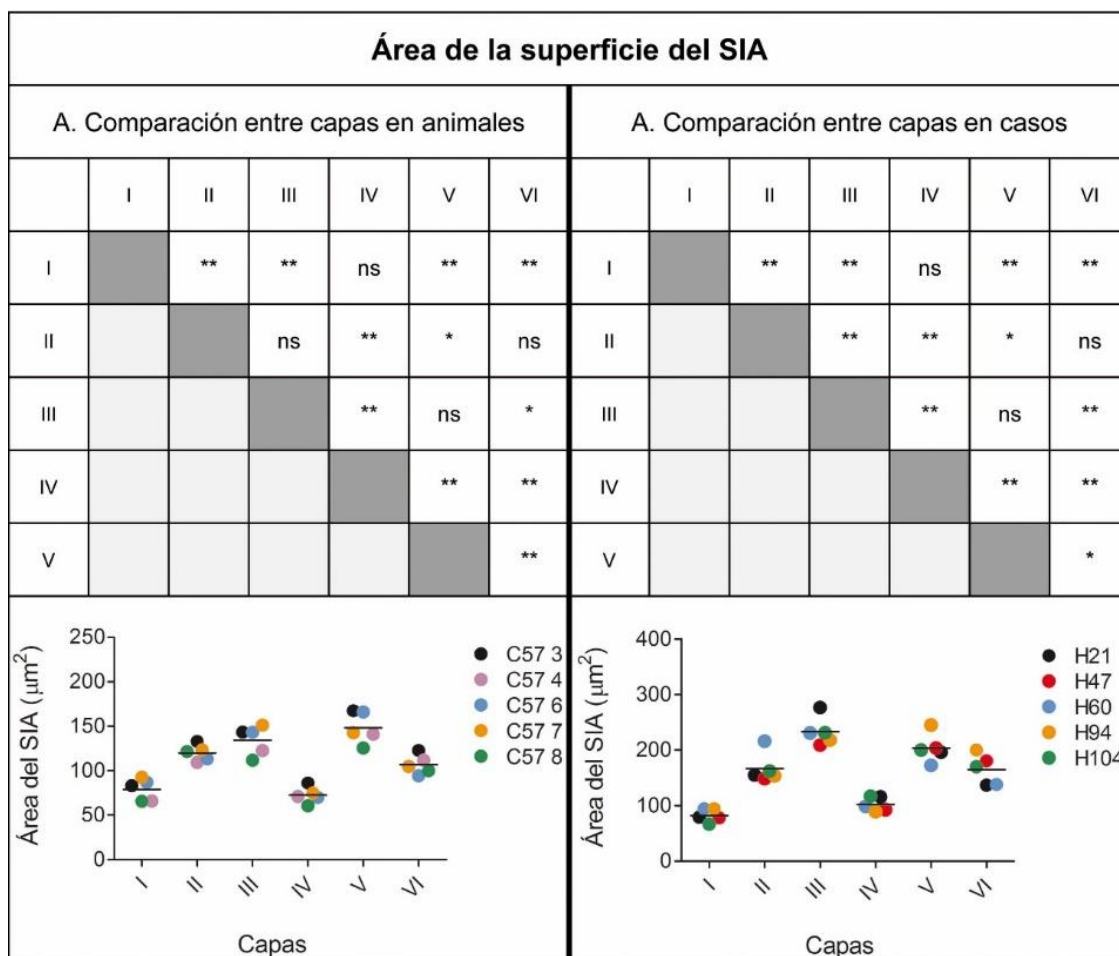


Figura 36. Tabla y representación gráfica de la comparación de los valores promedio del área del SIA entre las distintas capas corticales de la corteza HSLI de ratón (A) y la neocorteza temporal humana (B). En ambas tablas se ha aplicado la prueba no paramétrica Kruskal-Wallis (ns= no significativo, * ≤ 0.05 ; ** ≤ 0.001).

En cuanto a su tamaño, observamos que los SIAs son mayores en la neocorteza temporal humana que en la corteza somatosensorial del ratón. La longitud media de los SIAs en las distintas capas en la corteza HSLI del ratón osciló entre las 17µm y 25 µm mientras que en la neocorteza temporal humana osciló entre 23 y 39 µm. Lo mismo sucede con el diámetro medio (0.78-1.2 µm en el ratón y 0.97- 1.40 µm en el hombre) y el área (72-148 µm² en el ratón y 82-233 µm² en el hombre) de los SIAs (**Figuras 32, 34 y 36, Tablas 5 y 6**). En cuanto a la distribución laminar, en general encontramos diferencias similares entre capas en los valores promedio de las tres variables analizadas. Tanto, en la corteza somatosensorial del ratón como en la neocorteza temporal humana observamos que los SIAs más pequeños, a juzgar por su longitud, diámetro medio y superficie, se encuentran en las capas I y IV seguidos por aquellos de las neuronas de las capas II y VI, mientras que los más grandes se encuentran en las capas III, en la

corteza temporal humana, y V en la corteza somatosensorial del ratón (**Figuras 32, 34 y 36, Tablas 5 y 6**).

A continuación, realizamos un análisis de correlación entre los parámetros morfológicos de los SIAs y observamos, tanto en la neocorteza del ratón como en la humana, que la longitud y el diámetro medio de los SIAs no están correlacionadas (**Figuras 37A y 38A**). Sin embargo, observamos una fuerte correlación entre el área del SIA y su longitud, y en menor medida con su diámetro medio (**Figuras 37A, C y 38A, C**). Esto indica que los SIAs más largos, y en menor medida, aquellos con un mayor diámetro medio, presentan una mayor superficie.

CAPAS	Longitud SIA (μm)	Diámetro medio SIA (μm)	Área SIA (μm ²)	Número de botones vGAT-ir peri-SIA/SIA	Densidad de botones vGAT-ir peri- SIA (Número de botones/μm ² del área del SIA)
I	20.53±4.91	0.78±0.16	79.01±28.54	13.07±6.42	0.17±0.07
II	23.89±3.96	0.98±0.13	120.1±25.66	25.3±8.86	0.21±0.07
III	24.87±4.41	1.05±0.16	134.4±40.43	26.45±8.80	0.20±0.06
IV	17.21±2.76	0.84±0.12	72.53±22.08	16.13±5.55	0.23±0.09
V	25.67±3.87	1.20±0.21	148.5±40.27	28.29±7.04	0.20±0.06
VI	23.38±3.38	1.01±0.24	106.7±22.06	20.61±5.83	0.20±0.07

Tabla 5. Valores promedio ± SD de longitud, diámetro medio y superficie de los SIAs y del número y la densidad de botones peri-SIA vGAT-ir en las diferentes capas de I corteza HLSI del ratón.

CAPAS	Longitud SIA (μm)	Diámetro medio SIA (μm)	Área SIA (μm ²)	Número de botones vGAT-ir peri-SIA/SIA	Densidad de botones vGAT-ir peri- SIA (Número de botones/μm ² del área del SIA)
I	23.24±5.71	0.97±0.17	82.81±23.68	13.88±6.28	0.17±0.06
II	35.51±6.92	1.21±0.21	167.2±56.64	48.01±36.02	0.27±0.14
III	39.50±6.10	1.42±0.20	233.1±56.49	64.75±37.35	0.27±0.13
IV	26.71±4.19	1.00±0.31	102.8±23.09	39.38±28.48	0.38±0.36
V	37.66±6.43	1.41±0.38	203.5±58.59	47.89±27.88	0.23±0.11
VI	33.93±6.61	1.32±0.20	164.2±51.40	32.75±21.67	0.20±0.10

Tabla 6. Valores promedio ± SD de longitud, diámetro medio y superficie de los SIAs y del número y la densidad de botones peri-SIA vGAT-ir en las diferentes capas de la neocorteza temporal humana.

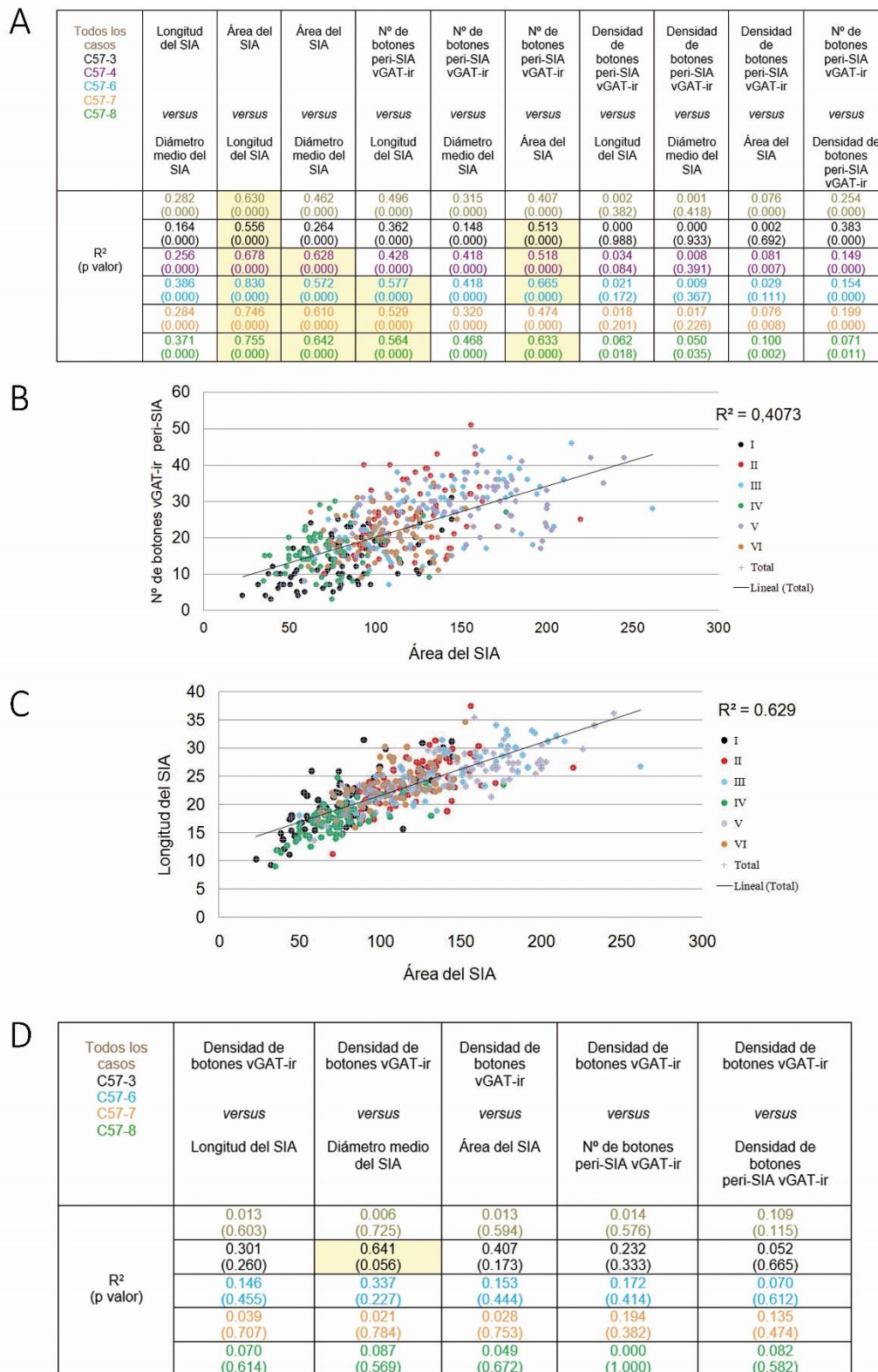
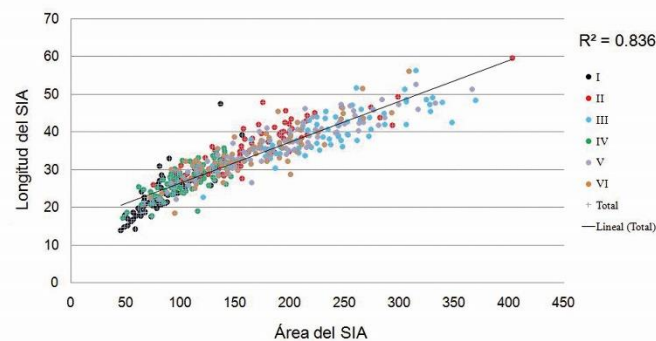


Figura 37. Tablas y representaciones obtenidas a partir del análisis de las correlaciones entre las variables morfológicas y de la innervación GABAérgica de los SIAs de la corteza HLS1 del ratón. Las tablas (A y D) muestran los valores de R² y p del análisis de las distintas correlaciones. En amarillo se señalan las correlaciones positivas. B) Diagrama de puntos del área de los SIAs frente al número de botones en aposición a los mismos. C) Diagrama de puntos del área de los SIAs frente a su longitud.

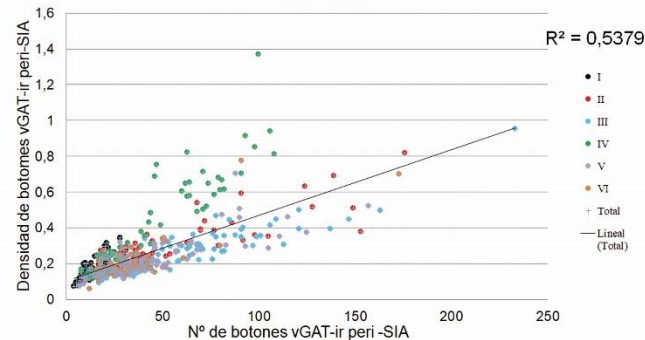
A

Todos los casos H21 H47 H60 H94 H104	Longitud del SIA	Área del SIA	Área del SIA	Nº de botones peri-SIA vGAT-ir	Nº de botones peri-SIA vGAT-ir	Nº de botones peri-SIA vGAT-ir	Densidad de botones peri-SIA vGAT-ir	Densidad de botones peri-SIA vGAT-ir	Densidad de botones peri-SIA vGAT-ir	Nº de botones peri-SIA vGAT-ir
	<i>versus</i>	<i>versus</i>	<i>versus</i>	<i>versus</i>	<i>versus</i>	<i>versus</i>	<i>versus</i>	<i>versus</i>	<i>versus</i>	<i>versus</i>
	Diámetro medio del SIA	Longitud del SIA	Diámetro medio del SIA	Longitud del SIA	Diámetro medio del SIA	Área del SIA	Longitud del SIA	Diámetro medio del SIA	Área del SIA	Densidad de los botones peri-SIA vGAT-ir
R ² (p valor)	0.255 (0.000)	0.837 (0.000)	0.378 (0.000)	0.402 (0.000)	0.098 (0.000)	0.417 (0.000)	0.022 (0.002)	0.007 (0.079)	0.005 (0.156)	0.538 (0.000)
	0.214 (0.000)	0.775 (0.000)	0.486 (0.000)	0.343 (0.000)	0.107 (0.002)	0.417 (0.000)	0.002 (0.692)	0.057 (0.024)	0.008 (0.392)	0.425 (0.000)
	0.392 (0.000)	0.908 (0.000)	0.544 (0.000)	0.556 (0.000)	0.246 (0.000)	0.607 (0.000)	0.097 (0.003)	0.028 (0.115)	0.103 (0.002)	0.633 (0.000)
	0.491 (0.000)	0.858 (0.000)	0.625 (0.000)	0.473 (0.000)	0.223 (0.000)	0.457 (0.000)	0.022 (0.165)	0.001 (0.780)	0.002 (0.651)	0.486 (0.000)
	0.561 (0.000)	0.876 (0.000)	0.696 (0.000)	0.370 (0.000)	0.227 (0.000)	0.411 (0.000)	0.013 (0.287)	0.000 (0.892)	0.007 (0.431)	0.577 (0.000)
	0.164 (0.000)	0.852 (0.000)	0.167 (0.000)	0.490 (0.000)	0.082 (0.007)	0.597 (0.000)	0.027 (0.128)	0.000 (0.857)	0.022 (0.165)	0.461 (0.000)

B



C



D

Todos los casos H47 H60 H94 H104	Densidad de botones vGAT-ir	Densidad de botones vGAT-ir	Densidad de botones vGAT-ir	Densidad de botones vGAT-ir	Densidad de botones vGAT-ir
	<i>versus</i>	<i>versus</i>	<i>versus</i>	<i>versus</i>	<i>versus</i>
	Longitud del SIA	Diámetro medio del SIA	Área del SIA	Nº de botones peri-SIA vGAT-ir	Densidad de botones peri-SIA vGAT-ir
R ² (p valor)	0.072 (0.204)	0.109 (0.114)	0.084 (0.169)	0.061 (0.246)	0.036 (0.372)
	0.000 (0.992)	0.037 (0.715)	0.002 (0.926)	0.087 (0.570)	0.625 (0.061)
	0.002 (0.927)	0.027 (0.757)	0.008 (0.868)	0.037 (0.716)	0.092 (0.559)
	0.033 (0.731)	0.122 (0.498)	0.125 (0.492)	0.129 (0.484)	0.070 (0.613)
	0.384 (0.189)	0.657 (0.050)	0.370 (0.200)	0.354 (0.213)	0.104 (0.533)

Figura 38. Tablas y representaciones obtenidas a partir del análisis de las correlaciones entre las variables morfológicas y de la innervación GABAérgica de los SIAs de la neocorteza temporal humana. Las tablas (A y D) muestran los valores de R² y p del análisis de las distintas correlaciones. En amarillo se señalan las correlaciones positivas. B) Diagrama de puntos del área de los SIA frente al número de botones en aposición a los mismos. C) Diagrama de puntos del área de los SIA frente a su longitud.

3.2 Disminución del diámetro a lo largo del segmento inicial del axón

A continuación, cuantificamos la variación del diámetro del SIA (estrechamiento) a lo largo de su extensión próximo-distal, como un parámetro adicional que ayuda a describir la morfología de estos elementos, ya que observamos en la neocorteza de ambas especies que el diámetro de los SIAs es mayor en su región proximal y se va estrechando distalmente (**Figura 39 y Figura 40**).

Al promediar, en cada una de las especies, los datos de todas las neuronas de cada capa (n=60), observamos diferencias entre las distintas capas en relación con la disminución del diámetro de los SIAs a lo largo de su longitud. En ambas especies, las neuronas de las capas I y IV tienen SIAs con un menor diámetro (en torno a 1 μm) y que fluctúa poco a lo largo de la longitud del SIA, aunque su región distal es ligeramente más estrecha. El estrechamiento distal del SIA es más pronunciado en neuronas de las capas II, VI y III y aún mayor en el SIA de las neuronas de capa V, especialmente en el ratón, y en las neuronas humanas de capa III (**Figura 39 y Figura 40**).

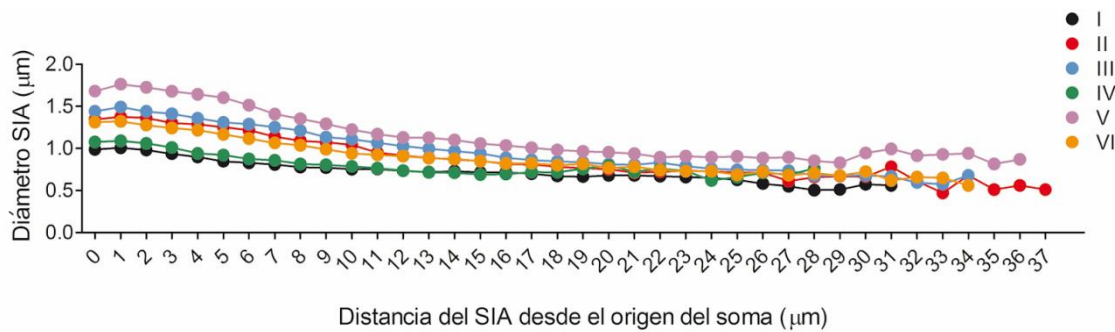


Figura 39. Representación de la variación del diámetro del SIA a lo largo de su longitud en las neuronas de las distintas capas de la corteza HSLI del ratón.

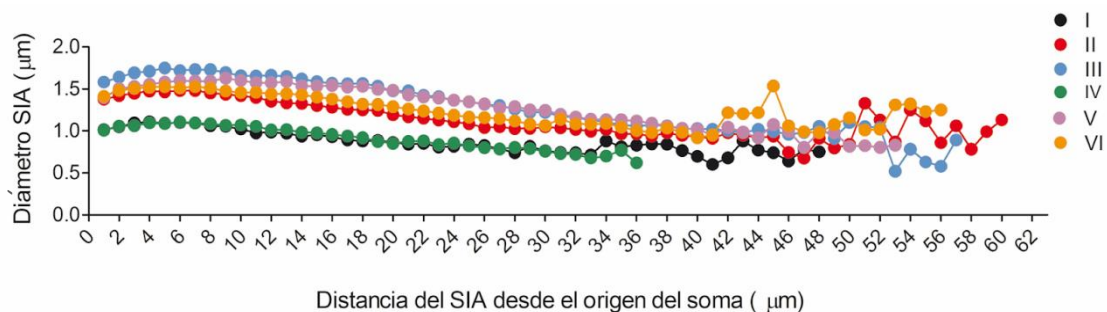


Figura 40. Representación de la variación del diámetro del SIA a lo largo de su longitud en las neuronas de las distintas capas de la neocorteza temporal humana.

3.3 Número de botones vGAT-ir en aposición al segmento inicial del axón

A continuación, estudiamos el número de elementos vGAT-ir en aposición al SIA de cada neurona de la que previamente habíamos estimado el área del SIA (**Figuras 41, 42, 35 y 36, 44 y 45**). Las **figuras 41 y 42** muestran, en la neocorteza del ratón y humana respectivamente, algunos ejemplos de las reconstrucciones de los SIAs junto con los contactos vGAT-ir que reciben.

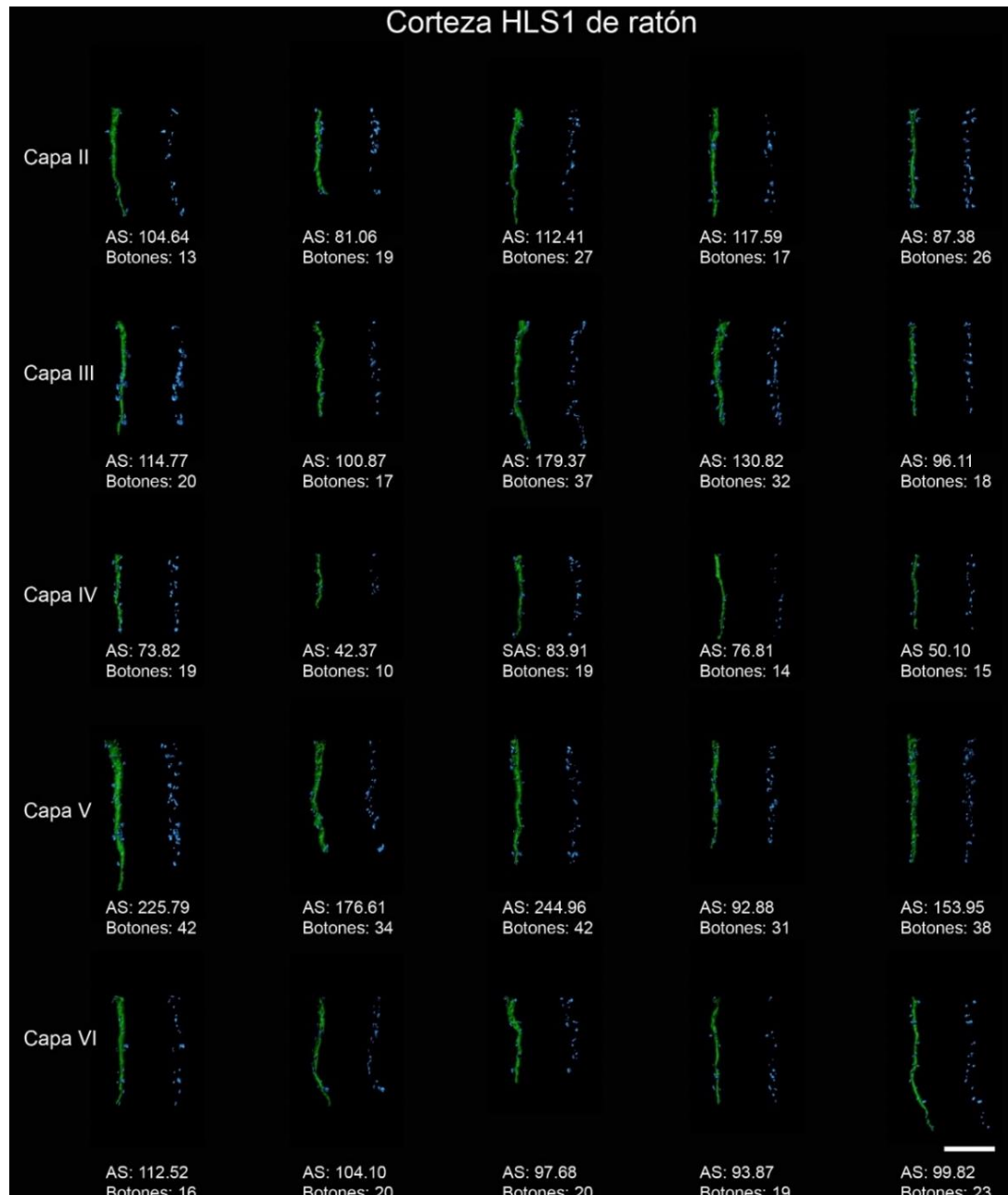


Figura 41. Diagramas que muestran algunos ejemplos de las reconstrucciones de los SIAs (verde) de neuronas de las capas II–VI de la corteza HLS1 del ratón junto con los elementos vGAT-ir que están en aposición con ellos (azul). SA: Área de la Superficie (μm^2). La barra de escala indica 4 μm .

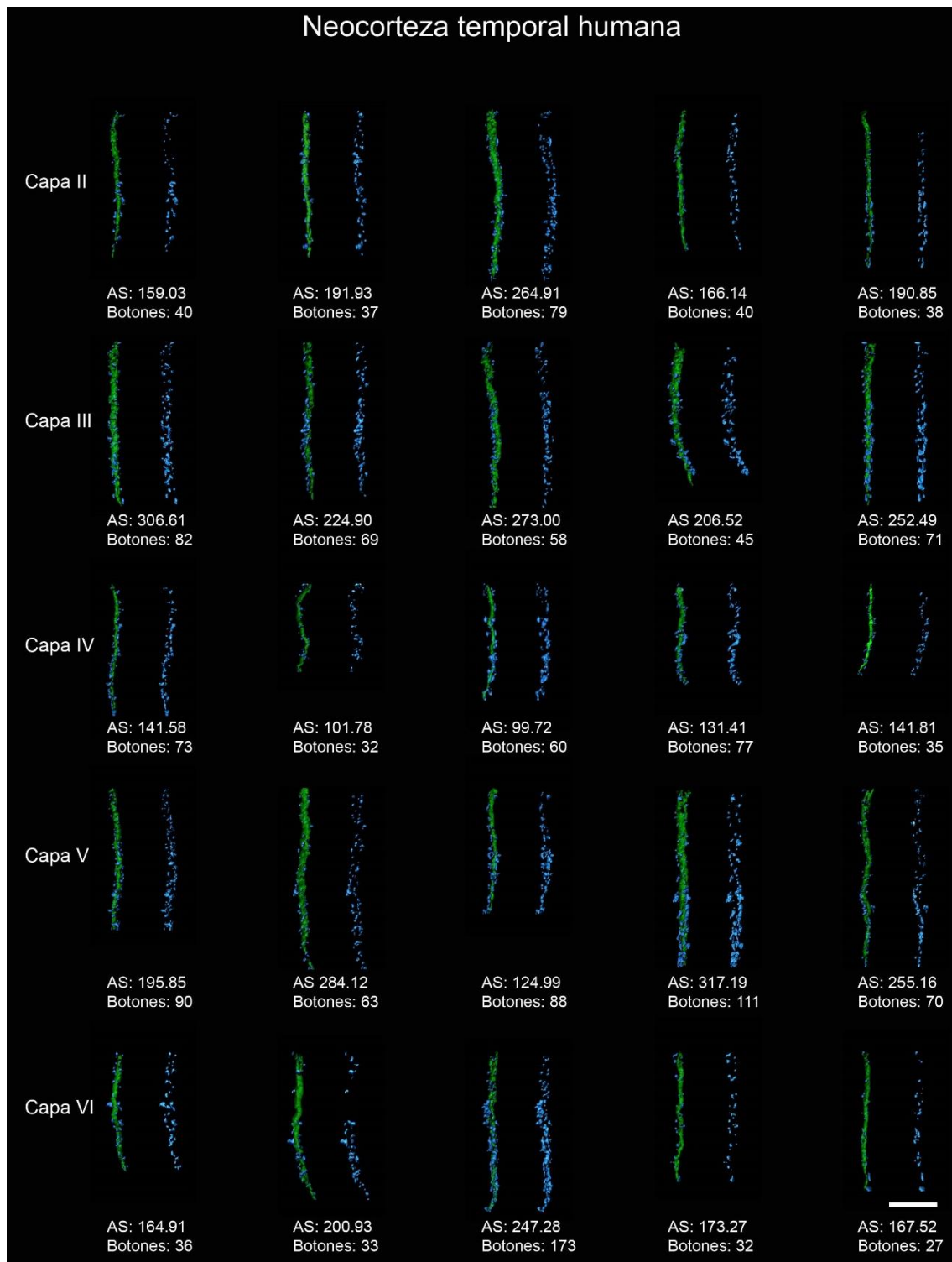


Figura 42. Diagramas que muestran algunos ejemplos de las reconstrucciones de los SIAs (verde) de neuronas de las capas II–VI de la neocorteza temporal humana junto con los elementos vGAT-ir que están en aposición con ellos (azul). SA: Superficie (en μm^2). La barra de escala indica 4 μm .

Para cuantificar el número de botones en aposición al SIA, utilizamos de nuevo el programa Imaris para crear superficies de SIAs y los terminales GABAérgicos que contactan. Contamos en

3D todos los botones en contacto con la superficie del SIA. Es conocido que en la neocorteza humana, los botones terminales de los axones de las células en candelabro se agregan para formar “Estructuras Inhibidoras Complejas” (EIC), terminales en candelabro o *cartidges* que rodean preferentemente las regiones distales de los SIAs de algunas neuronas piramidales. Sin embargo, en algunas neuronas piramidales, las EICs se encuentran a lo largo del todo el SIA o en otros están ausentes. En las neuronas humanas estudiadas, observamos EICs en todas las capas (a excepción de capa I), pero principalmente en las capas IV y III (**Figura 43**). Como se muestra en la **Figura 43B**, el número de EICs en los diferentes casos es bastante heterogéneo especialmente en las capas II-IV.

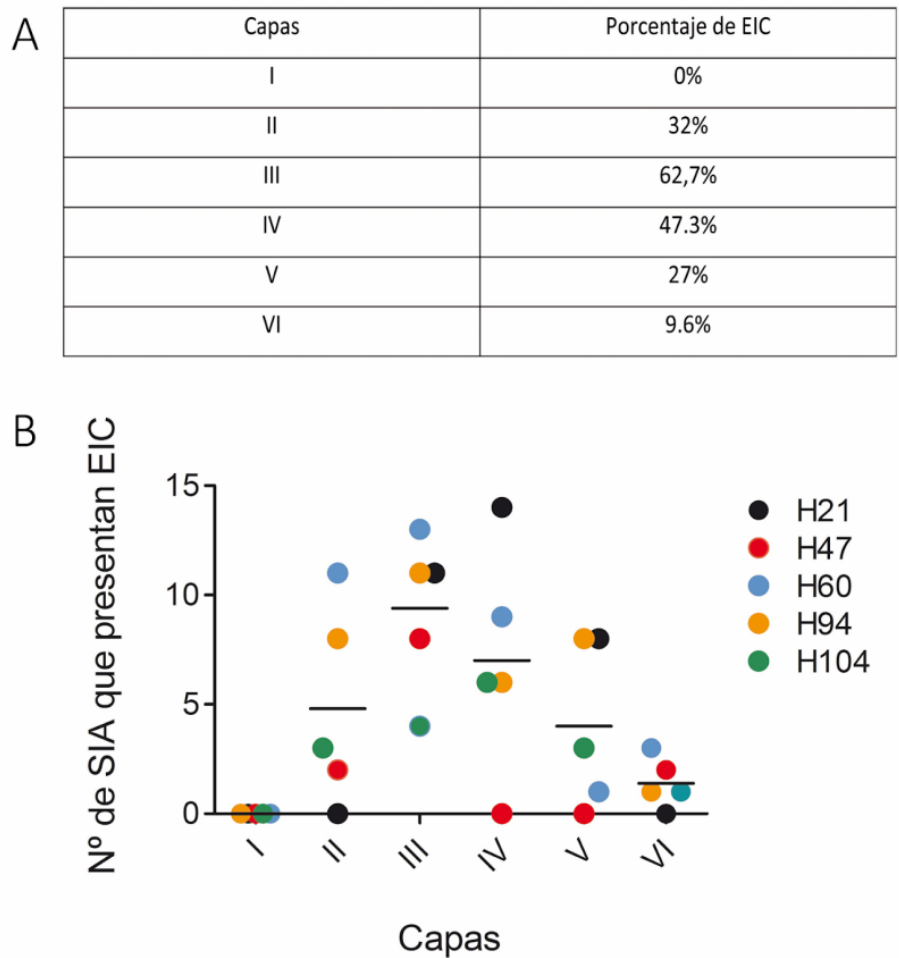


Figura 43. A) Tabla que muestra el porcentaje de SIAs en los que se observaron EICs en las distintas capas de la neocorteza temporal humana. B) Representación de la media de SIA asociados a una EIC en las neuronas de las distintas capas corticales de cada caso.

El agrupamiento y el pequeño tamaño de los botones terminales en las EICs dificultan la diferenciación mediante microscopia confocal de los botones individuales que las forman. Por ello, para poder estimar el número de botones en las EICs creamos con IMARIS una única superficie que engloba a toda su estructura, de la cual obtuvimos su volumen. A partir de este volumen, estimamos el número de botones dividiendo el volumen de las EIC entre el volumen medio de los botones GABAérgicos peri-SIA individuales calculado después de promediar todos los botones peri-SIA medidos en cada caso y capa cortical). El volumen medio ($\pm$ desviación estándar) estimado de los botones vGAT-ir fue de $0.17 \pm 0.06 \mu\text{m}^3$ ($n = 7208$ botones).

Al realizar la comparación entre casos, de nuevo observamos en ambas especies algunas diferencias interindividuales significativas en el número de botones GABAérgicos en aposición a los SIA cuando agrupamos los datos de las distintas capas corticales (**Figura 44**).

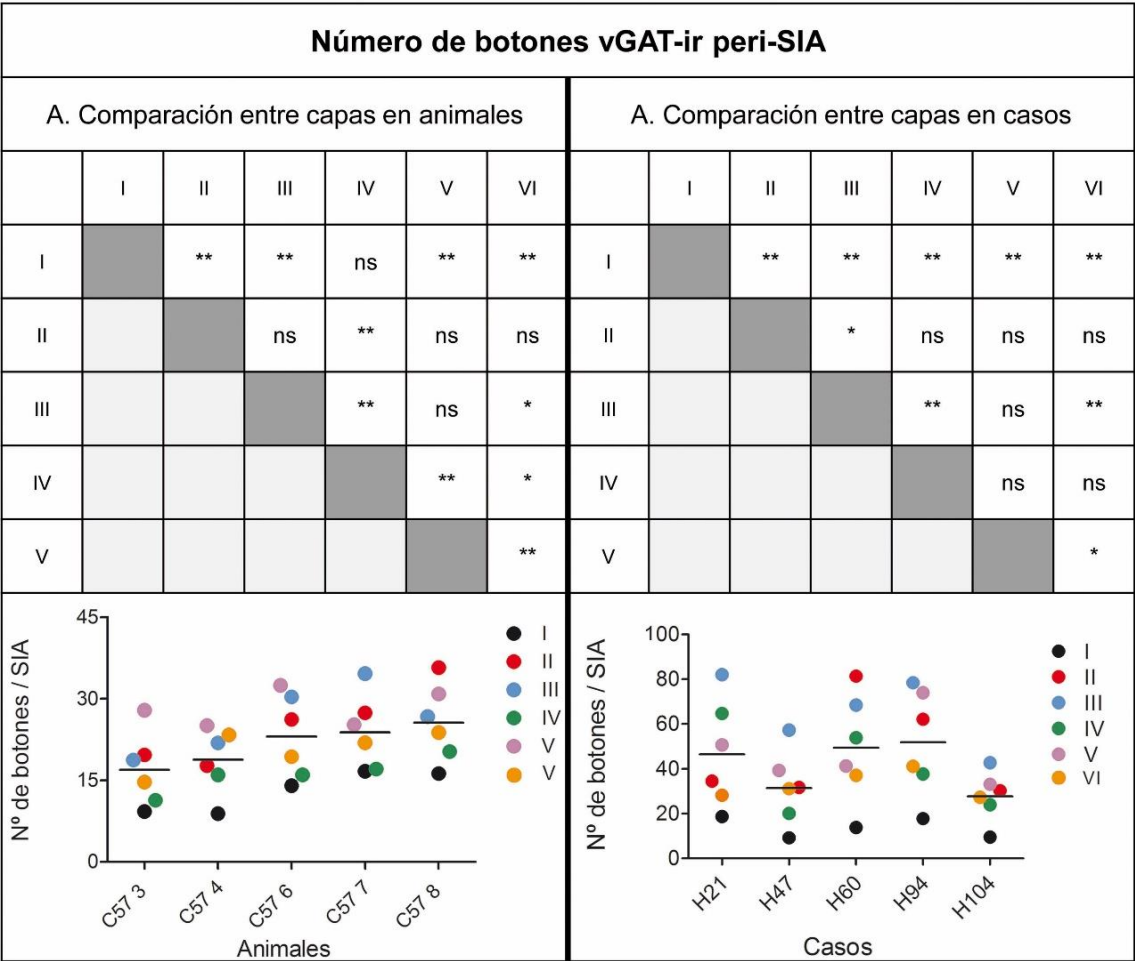


Figura 44. Tabla y representación gráfica de la comparación de los valores promedio del número de botones GABAérgicos en aposición al SIA entre los distintos ratones (A) y casos humanos (B) estudiados. En ambas tablas se ha aplicado la prueba no paramétrica Kruskal-Wallis (ns= no significativo, * ≤ 0.05 ; ** ≤ 0.001).

A pesar de esas diferencias, agrupamos los datos de los distintos casos para estudiar el número de los botones peri-SIA de neuronas de las distintas capas corticales (**Figura 45A; Tablas 5 y 6**). Observamos que las neuronas de capa I de ambas especies y las neuronas de capa IV del ratón muestran menor número de botones GABAérgicos en aposición al SIA que en el resto de las capas corticales. Encontramos niveles intermedios en contacto con el SIA de las neuronas piramidales de capa VI de ambas especies y en las neuronas de capa IV humanas. Los números más altos de botones peri-SIA se observaron en aposición al SIA de las neuronas piramidales de capas II, III y V, en ambas especies (**Figura 45; Tablas 5 y 6**).

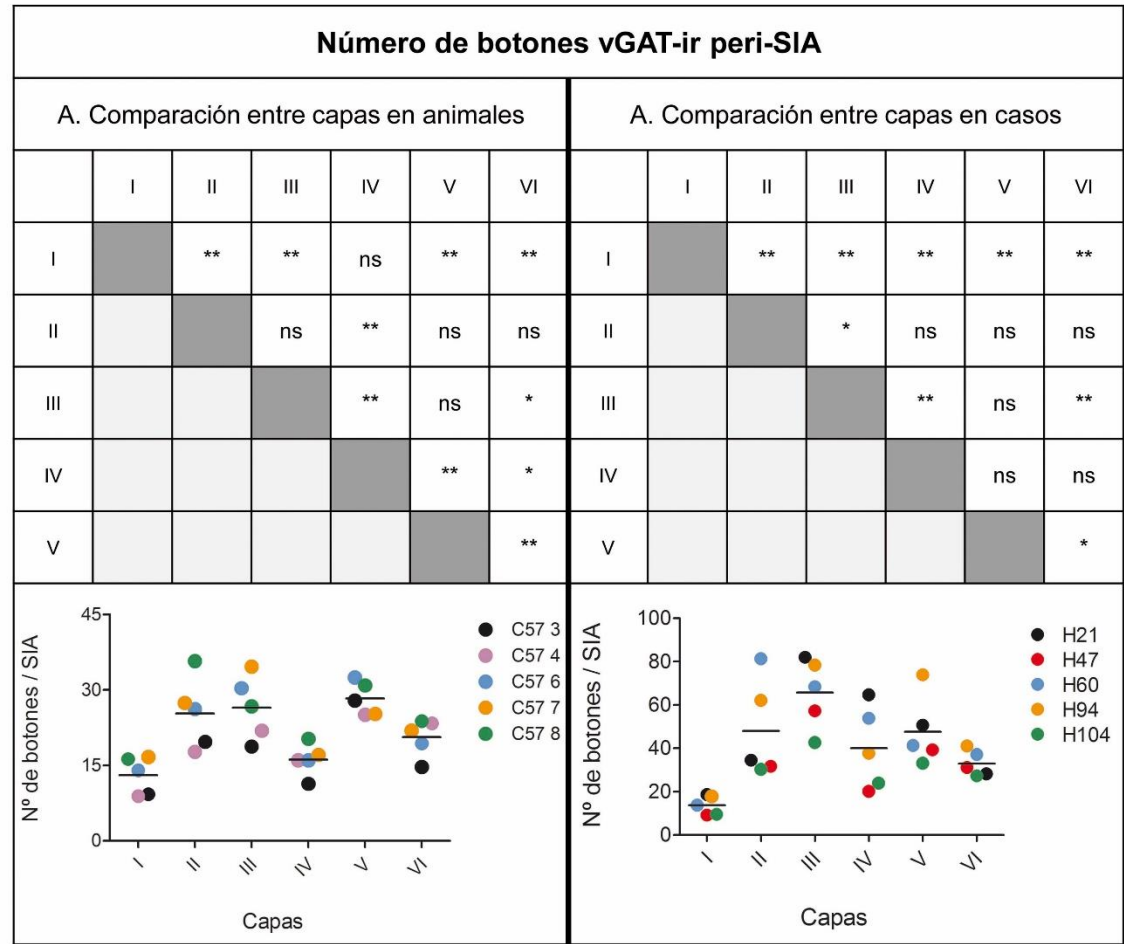


Figura 45. Tabla y representación gráfica de la comparación de los valores promedio del número de botones GABAérgicos en aposición al SIA entre las distintas capas corticales de la corteza HLSI de ratón (A) y la neocorteza temporal humana (B). En ambas tablas se ha aplicado la prueba no paramétrica Kruskal-Wallis (ns= no significativo, * ≤ 0.05 ; ** ≤ 0.001).

3.4 Densidad de botones vGAT-ir en aposición al segmento inicial del axón

A continuación, analizamos la densidad de la innervación GABAérgica del SIA de las neuronas piramidales dividiendo el número de botones vGAT-ir peri-SIA que cada neurona recibe entre la superficie del SIA (**Figuras 46 y 47, Tablas 5 y 6**). De nuevo, cuando promediamos los valores de todas las capas corticales observamos diferencias interindividuales en la densidad de la innervación GABAérgica tanto en la neocorteza del ratón (entre 0.14-0.20 botones/ μm^2 del área del SIA) como humana (entre 0.18-0.30 botones/ μm^2 del área del SIA) (**Figura 46**).

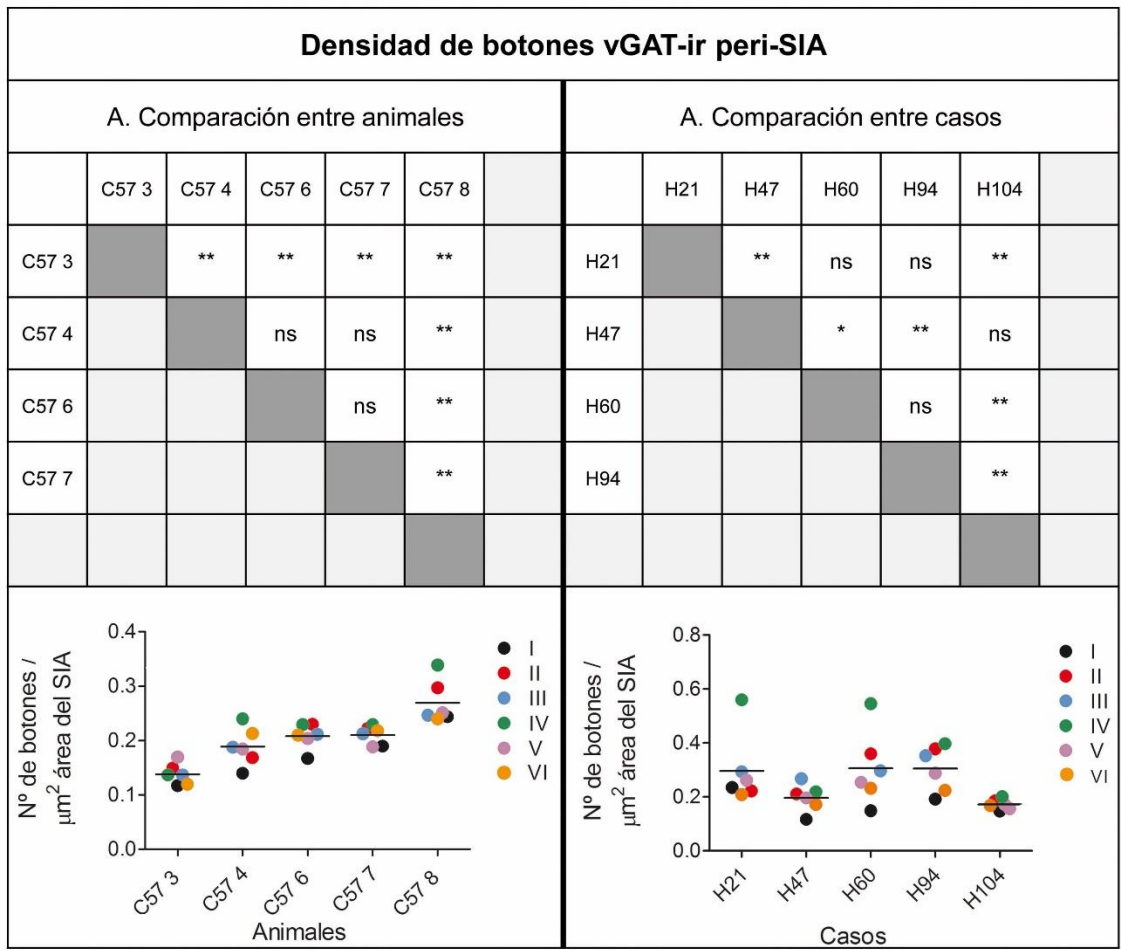


Figura 46. Tabla y representación gráfica de la comparación de los valores promedio densidad de botones GABAérgicos en aposición al SIA entre los distintos ratones (A) y casos humanos (B) estudiados. En ambas tablas se ha aplicado la prueba no paramétrica Kruskal-Wallis (ns= no significativo, * ≤ 0.05 ; ** ≤ 0.001).

A pesar de estas diferencias, promediamos los valores obtenidos en los distintos casos para analizar las diferencias laminares en la densidad de la innervación GABAérgica de los SIAs (**Figura**

47, Tablas 5 y 6). En la corteza HLS1 del ratón la mayor densidad de terminales vGAT-ir peri-SIA se observó en neuronas piramidales de capa IV (0.24 botones/ μm^2) aunque con diferencias significativas únicamente con las neuronas de capa I. La densidad más baja (0.17 botones/ μm^2) se observó en neuronas de capa I que mostró diferencias significativas con las neuronas de las capas II, III y IV (**Figura 47A**). En la corteza temporal humana, las neuronas de capa IV, a pesar de tener el tamaño del SIA y el número de botones peri-SIA más bajo, presentó la mayor densidad de innervación GABAérgica peri-SIA (0.38 botones/ μm^2), mostrando diferencias significativas con las neuronas de las capas I, V y VI. En la capa III ocurre lo contrario, ya que sus neuronas presentan los valores más altos en cuanto al área del SIA y número de botones peri-SIA, pero presenta un valor bajo de densidad similar al de la capa II (0.27 botones/ μm^2). Por último, la densidad más baja se observó en neuronas de capa I (0.17 botones/ μm^2) con diferencias significativas respecto a las neuronas de las capas II, III, IV y V (**Figura 47B**).

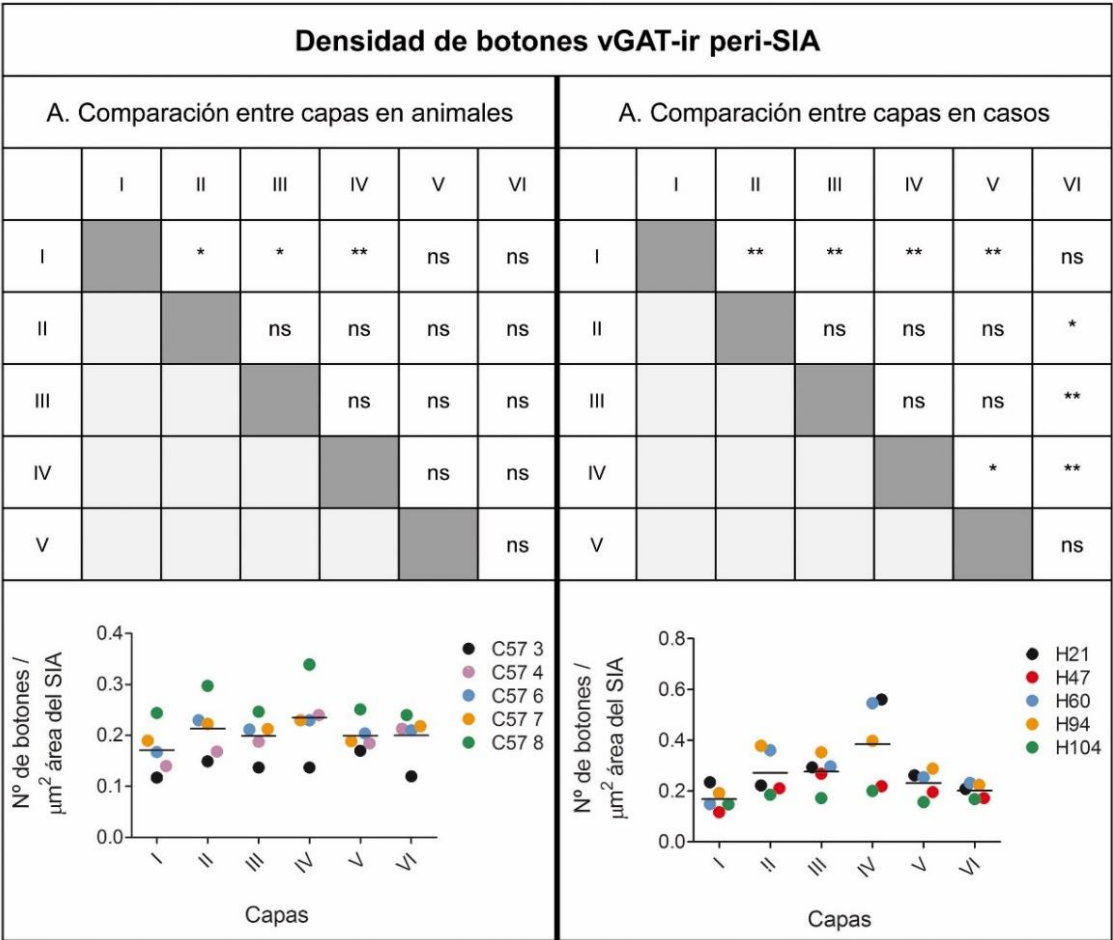


Figura 47. Tabla y representación gráfica de la comparación de los valores promedio de la densidad de botones vGAT-ir peri-SIA entre las distintas capas corticales de la corteza HLSI de ratón (A) y la neocorteza temporal humana

(B). En ambas tablas se ha aplicado la prueba no paramétrica Kruskal-Wallis (ns= no significativo, * ≤ 0.05 ; ** ≤ 0.001).

3.5 Distribución de botones vGAT-ir a la largo del segmento inicial del axón

Dado que el SIA es una estructura con una polaridad clara, analizamos los datos obtenidos de la segmentación de los botones peri-SIA para estudiar su distribución próximo-distal en neuronas de las distintas capas corticales en ambas especies. Para ello, promediamos los datos de los distintos casos (SIAs de 60 neuronas por capa y especie).

En la **Figura 48** podemos observar como en la corteza HLS1 del ratón, a excepción de las pequeñas variaciones puntuales (picos de sierra en los intervalos sucesivos de 1 μm de longitud), los trazos correspondientes a neuronas de las distintas capas corticales son en general horizontales, lo que indica que no existen diferencias importantes en el número de botones que contactan el SIA a lo largo de la extensión próximo-distal de los SIAs. En las últimas micras se observan picos de mayor tamaño en los trazados de las distintas capas debido probablemente a que no todos los SIAs tienen la misma longitud y, por lo tanto, el tamaño muestral en los distintos intervalos de la región distal es más reducido habiendo más variabilidad en las medias de los datos.

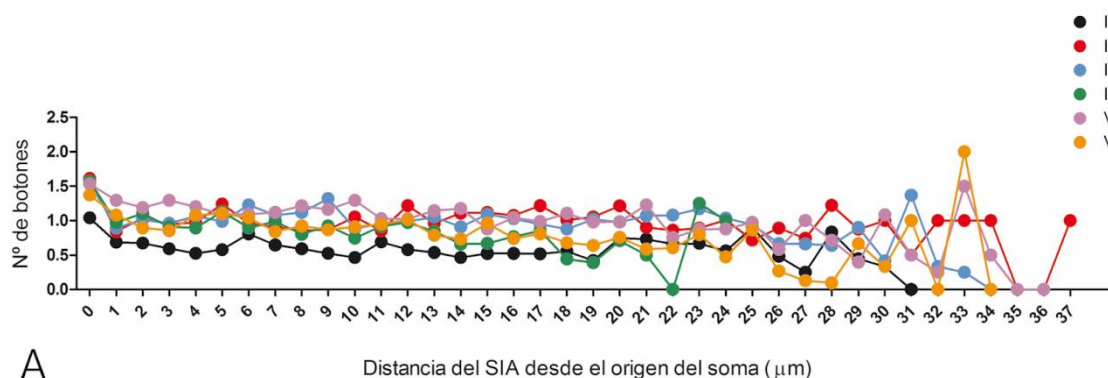


Figura 48. Representación gráfica del número de botones vGAT-ir que contactan con intervalos sucesivos de 1 μm a lo largo de la extensión próximo-distal el SIA de neuronas de las distintas capas de la corteza HLS1 del ratón.

En la corteza temporal humana observamos que, a excepción de la capa I en la que el número de botones a lo largo del SIA se mantiene relativamente estable, existe un incremento progresivo en el número de botones GABAérgicos que contactan los SIAs a medida que aumenta

la distancia al soma (ver la pendiente de las líneas correspondientes a las distintas capas corticales en la **Figura 49**). Este incremento en el número de botones GABAérgicos en aposición a las regiones distales de los SIAs coincide con la presencia de las estructuras inhibitoras complejas descritas anteriormente.

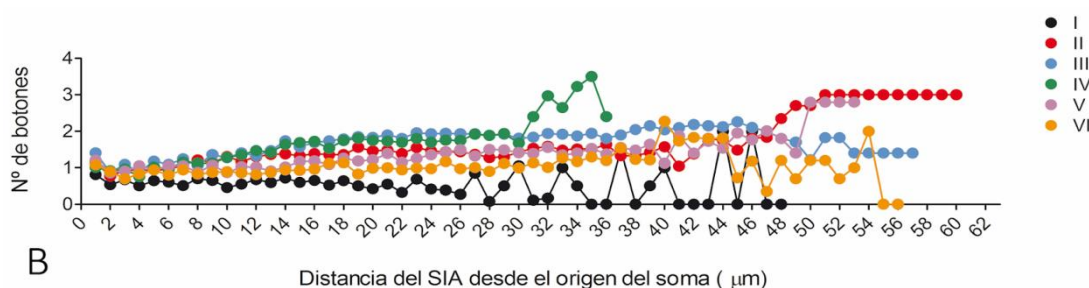


Figura 49. Representación gráfica del número de botones vGAT-ir que contactan con intervalos sucesivos de 1 μm a lo largo de la extensión próximo-distal el SIA de neuronas de las distintas capas de la neocorteza temporal humana.

A continuación, tuvimos en cuenta la disminución progresiva del diámetro, y por lo tanto de superficie, de los SIAs a lo largo de su extensión próximo-distal para representar la densidad de inhibición GABAérgica (número de botones vGAT-ir peri-SIA/superficie) a lo largo de la longitud de los SIAs en las distintas capas corticales. Utilizamos los datos de superficie micra a micra obtenidos mediante la herramienta *Filament*. Por tanto, fue necesario aplicar un factor de corrección para crear una equivalencia entre el área del SIA que se obtiene con esta herramienta y el que tomamos como real a partir de la herramienta *Surface*. Calculamos este factor de corrección dividiendo ambos valores de superficie para cada SIA y aplicamos el valor promedio obtenido (por capa y animal/caso) a la densidad calculada micra a micra.

Observamos, en ambas especies, que la densidad de innervación GABAérgica del SIA de las neuronas piramidales de las capas II-VI se incrementa en las regiones distales del SIA respecto a las proximales (ver las pendientes de los trazos en las **Figuras 50 y 51**). Esta tendencia es más robusta en la neocorteza temporal humana que en la neocorteza HLS1 del ratón. De nuevo, en las regiones más distales de los SIAs los trazos son más inestables y se observan picos debidos a la disminución progresiva del tamaño muestral ya que no todos los SIAs de la muestra alcanzan la misma longitud (**Figuras 50 y 51**).

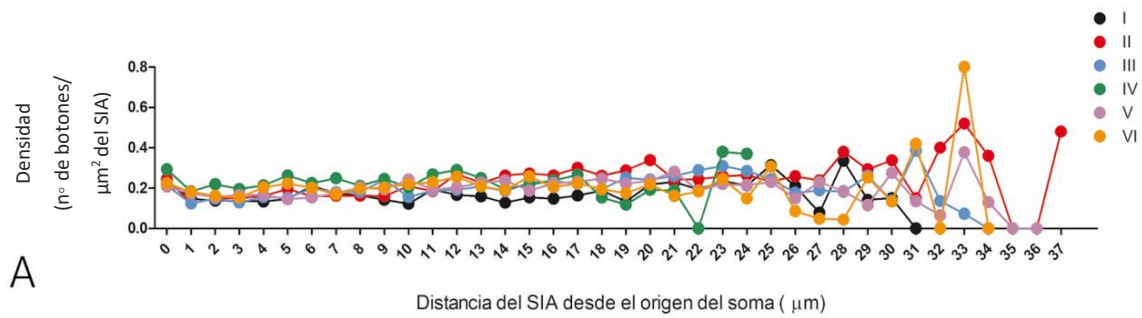


Figura 50. Representación gráfica de la densidad de botones vGAT-ir que contactan con intervalos sucesivos de 1 μm a lo largo de la extensión próximo-distal el SIA de neuronas de las distintas capas de la corteza HLS1 del ratón.

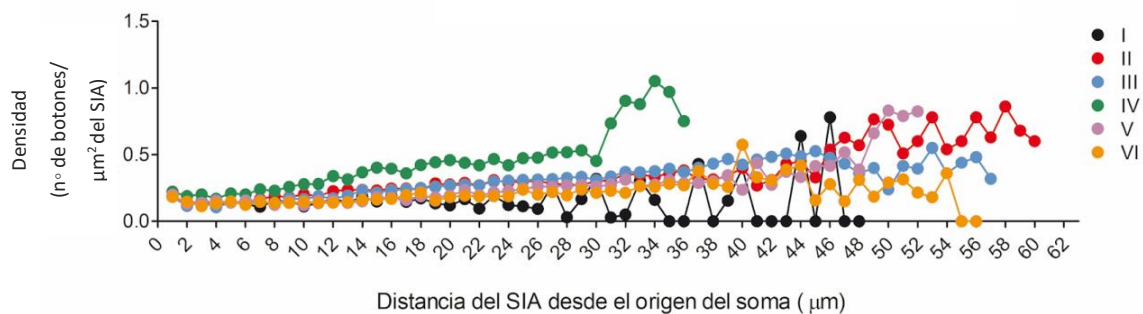


Figura 51. Representación gráfica de la densidad de botones vGAT-ir que contactan con intervalos sucesivos de 1 μm a lo largo de la extensión próximo-distal el SIA de neuronas de las distintas capas de la neocorteza temporal humana.

3.6 Análisis de la correlación entre las variables relacionadas con la inhibición del segmento inicial del axón

A continuación, llevamos a cabo un análisis de correlación entre las distintas variables relacionadas con el tamaño y la inervación GABAérgica de los SIAs en la corteza somatosensorial murina y en la corteza temporal humana (densidad de terminales GABAérgicos en el neuropilo, longitud, diámetro y superficie de los SIA, así como número y densidad de terminales GABAérgicos peri-SIA) (**Figura 37A y Figura 38A**).

Promediando los datos de los cinco ratones observamos que, entre las posibles combinaciones entre las distintas variables, el número de botones GABAérgicos en aposición al SIA presenta una correlación positiva con la superficie y la longitud (pero no el diámetro) de los SIAs (**Figura 37A**). Esto indica que la superficie y la longitud de los SIAs son valores predictivos del número

de botones GABAérgicos que reciben. Esta correlación es menos clara en el caso de la neocorteza temporal humana (**Figura 38A**). También observamos, en las distintas capas corticales de ambas especies que la densidad de botones GABAérgicos en aposición al SIA no está correlacionada con las características morfológicas de los SIAs ni con la densidad de botones GABAérgicos en el neuropilo. Por último, observamos que la densidad de botones GABAérgicos en aposición al SIA no está correlacionada con el número de botones GABAérgicos en aposición al SIA en ninguna de las dos especies (**Figura 37A y Figura 38A**).

4. COMPARACIÓN ENTRE EL TAMAÑO Y LA INERVACIÓN GABAÉRGICA DEL SOMA Y EL SEGMENTO INICIAL DEL AXÓN.

Para finalizar, comparamos los datos de tamaño e inervación GABAérgica de los somas y los SIAs en las diferentes capas corticales. En ambas especies observamos una intensa correlación positiva entre los valores promedio por capa y caso del área del soma neuronal con la longitud, el diámetro y el área de los SIAs, lo que indica que las neuronas con mayor tamaño tienden a tener un SIA de mayor tamaño (**Figura 52A y 53A**). Además, observamos una correlación positiva, aunque relativamente débil (únicamente en dos de los cuatro casos humanos y en tres de los cuatro ratones), entre el número de terminales GABAérgicos que contactan con el soma y con el SIA. Sin embargo, la densidad de inervación GABAérgica de estos dos dominios neuronales no está correlacionada (**Figura 52A y 53A**).

En las neuronas analizadas, la densidad de inervación GABAérgica de los SIAs fue mayor que la de los somas con diferencias estadísticamente significativas en las capas II y IV-VI en la corteza HLS1 del ratón y en las capas I, II, III y IV de la neocorteza temporal humana (**Figuras 52B y 53B**).

A

Todos los casos C57-3 C57-6 C57-7 C57-8	Área del soma versus Longitud del SIA	Área del soma versus Diámetro medio del SIA	Área del soma versus Área del SIA	Área del soma versus Nº de botones peri-SIA vGAT-ir	Nº de botones perisomáticos vGAT-ir versus Área del SIA	Nº de botones perisomáticos vGAT-ir versus Nº de botones peri-SIA vGAT-ir	Densidad de botones perisomáticos vGAT-ir versus Densidad de botones peri-SIA vGAT-ir
R ² (p valor)	0.472 (0.000)	0.582 (0.000)	0.806 (0.000)	0.252 (0.012)	0.656 (0.000)	0.273 (0.009)	0.147 (0.065)
	0.731 (0.30)	0.563 (0.086)	0.970 (0.000)	0.912 (0.003)	0.852 (0.009)	0.835 (0.011)	0.237 (0.327)
	0.827 (0.012)	0.860 (0.008)	0.895 (0.004)	0.818 (0.013)	0.939 (0.001)	0.862 (0.008)	0.010 (0.850)
	0.369 (0.201)	0.707 (0.036)	0.592 (0.072)	0.256 (0.306)	0.769 (0.024)	0.661 (0.049)	0.691 (0.040)
	0.755 (0.025)	0.932 (0.002)	0.911 (0.003)	0.610 (0.067)	0.550 (0.092)	0.353 (0.214)	0.168 (0.420)

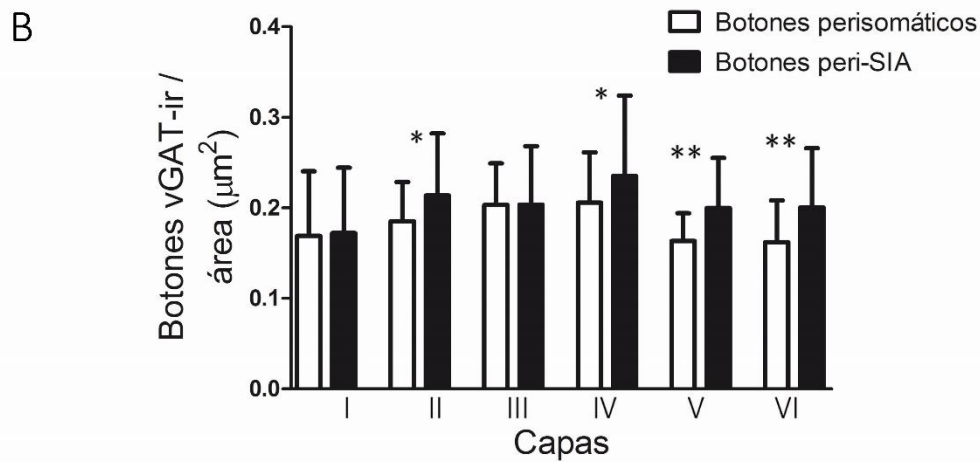


Figura 52. Tabla obtenida a partir del análisis de correlación de las variables de tamaño e innervación GABAérgica del soma y el SIA de las neuronas de la corteza HLS1 del ratón. A) Tabla en la que se muestran los valores de R² y p del análisis de correlaciones entre los diferentes parámetros. En amarillo las correlaciones positivas. B) Histograma de barras que muestra los valores promedio $\pm$ desviación estándar de la densidad de innervación GABAérgica del soma y el SIA (* ≤ 0.05 ; ** ≤ 0.001).

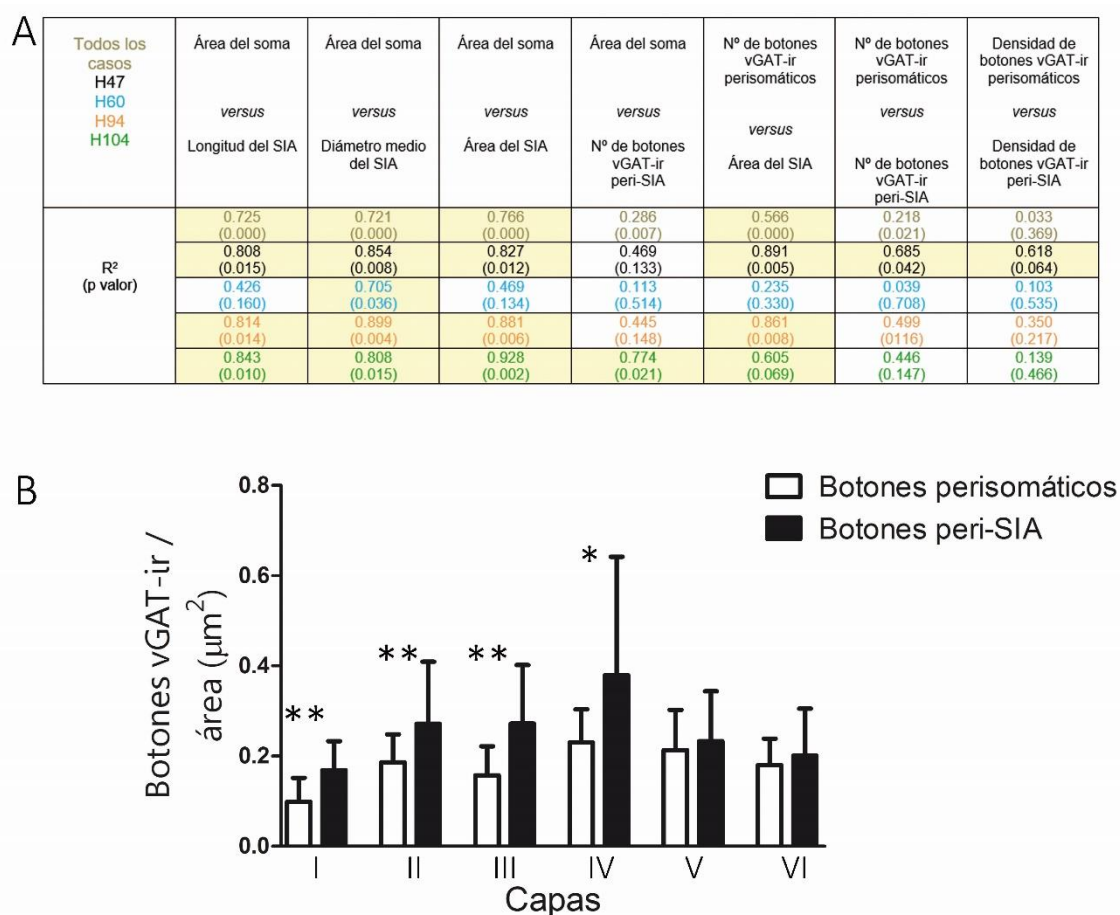


Figura 53. Tabla obtenida a partir del análisis de correlación de las variables de tamaño e innervación GABAérgica del soma y el SIA de las neuronas de la neocorteza temporal humana. A) Tabla en la que se muestran los valores de R² y p del análisis de correlaciones entre los diferentes parámetros. En amarillo las correlaciones positivas. B) Histograma de barras que muestra los valores promedio $\pm$ desviación estándar de la densidad de innervación GABAérgica del soma y el SIA (* ≤ 0.05 ; ** ≤ 0.001).

5. INERVACIÓN GABAÉRGICA DE LAS NEURONAS CORTICOTALÁMICAS DE LA CORTEZA HLS1 DEL RATÓN

Por último, hemos estudiado el tamaño del soma y el SIA, así como el número y la densidad de botones GABAérgicos en aposición a dichos dominios en la población de neuronas corticotalámicas presentes en la capa VI de la corteza HLS1 del ratón. Para ello realizamos experimentos con inyecciones del trazador *Fast Blue* en el núcleo ventral posterolateral talámico (VPL) de tres ratones (**Figura 54A**). Las secciones de la corteza somatosensorial primaria de dichos ratones fueron teñidas mediante inmunofluorescencia utilizando simultáneamente anticuerpos frente a Ankirina G (c20), NeuN y vGAT, con objeto de marcar los SIAs, los cuerpos

neuronales y los terminales GABAérgicos, respectivamente. En estas secciones, observamos la presencia de neuronas marcadas retrógradamente con FB que se distribuyen preferentemente en la capa VI (**Figura 54B**).

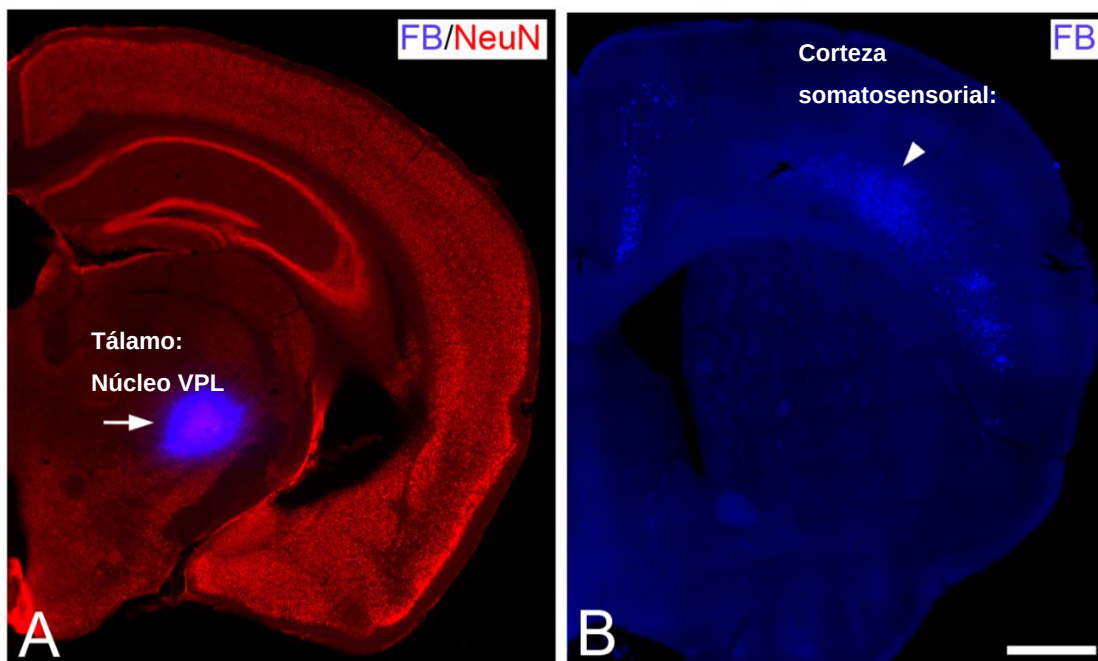


Figura 54. A: Imagen panorámica de una sección teñida con anticuerpos frente a NeuN (rojo) que muestra una inyección de *Fast Blue* (azul) en el núcleo ventral posterolateral talámico (flecha). B muestra la presencia de neuronas (punta de flecha) marcadas retrógradamente con *Fast Blue* en la capa VI de la corteza somatosensorial. Barra de escala: 815 μm en A e 860 μm en B

Obtuvimos series de imágenes de microscopía confocal de un total de 24 neuronas corticotálámicas, marcadas para FB, que incluyeron sus somas y SIAs completos. En dichas series, escaneamos la fluorescencia correspondiente al trazador, así como al marcaje de los SIAs, los cuerpos neuronales y los terminales GABAérgicos para su posterior cuantificación (**Figura 55**). Como controles, obtuvimos series de imágenes de la capa VI del hemisferio contralateral a la inyección del trazador, en el que no se observaron neuronas marcadas retrógradamente con FB. Las series control incluyeron un total de 81 somas y 75 SIAs completos que se emplearon como una muestra de la población neuronal total de la capa VI, en las que realizamos mediciones para compararlas con las de las neuronas corticotálámicas. A continuación, se describen los resultados obtenidos para cada una de las variables analizadas.

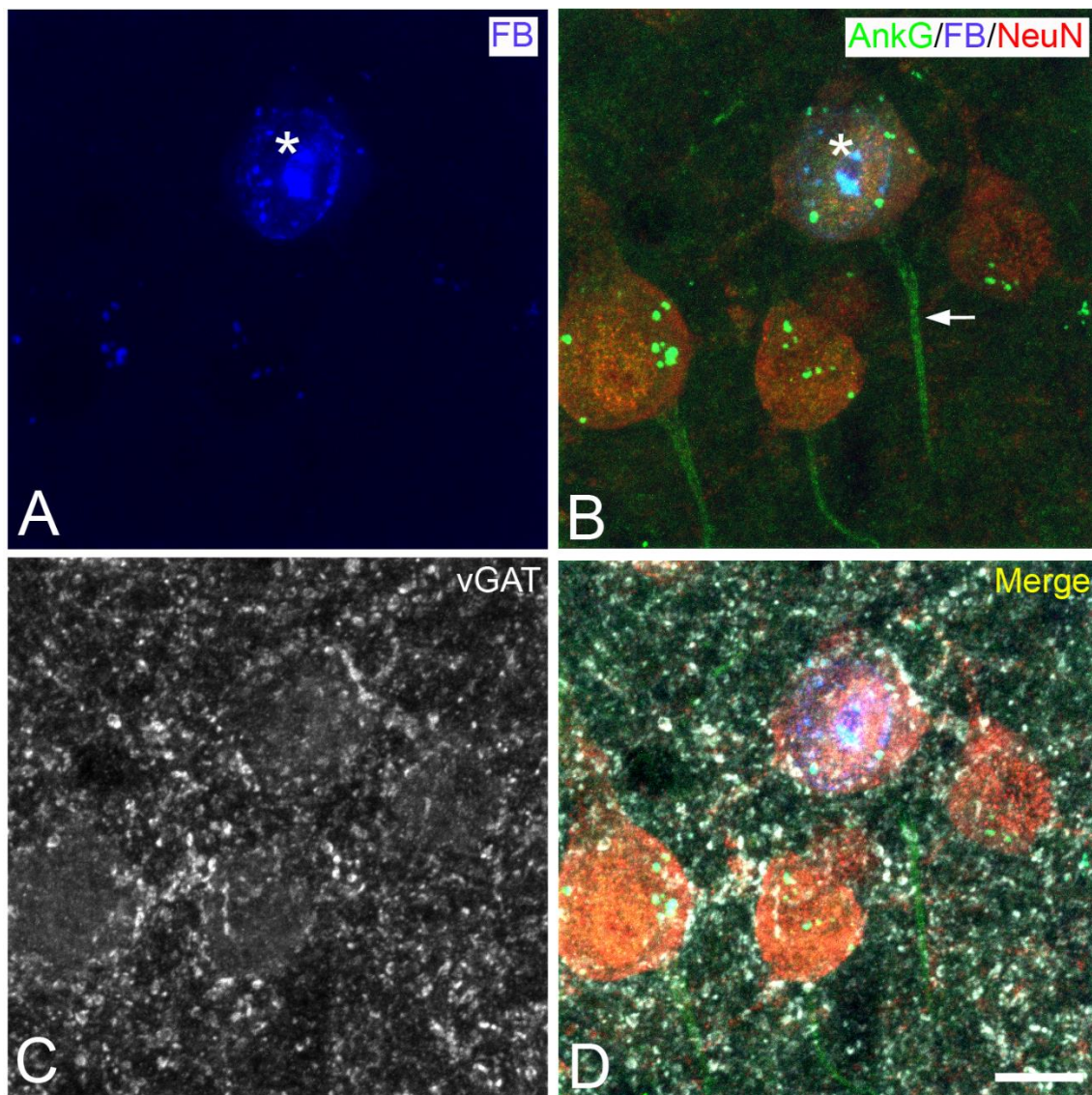


Figura 55. Trío de imágenes de proyección (A-C) e imagen combinada (D) procedentes de la corteza somatosensorial de un ratón con una inyección en el núcleo VPL del tálamo ipsilateral. A muestra el marcaje con FB de una neurona corticotalámica (asterisco) de capa VI. En la imagen B se muestra el marcaje de los somas neuronales (rojo) y de los SIAs (verde) de varias neuronas incluyendo la neurona corticotalámica. En C se muestra el marcaje de los botones GABAérgicos. En la imagen D se puede observar la relación de los botones GABAérgicos con el soma y el SIA de la neurona corticotalámica. La barra de escala indica 9,5 μm .

5.1 Densidad de terminales GABAérgicos en aposición a los somas de neuronas corticotalámicas

5.1.1 Superficie de los somas de neuronas corticotalámicas.

Cuando comparamos la superficie media $\pm$ SD de los somas neuronales observamos que el tamaño de las neuronas corticotalámicas de capa VI fue significativamente menor (T test, $p = 0,0282$) que de la población total de las neuronas de dicha capa (**Figura 56**). Al analizar la distribución de frecuencias del tamaño del soma neuronal de ambas poblaciones, observamos que si bien parece haber mayores porcentajes de neuronas con somas más pequeños en la población de neuronas corticotalámicas respecto a la población general de neuronas de capa VI, las diferencias entre ambas curvas de distribución no alcanzaron significación estadística (Kolmogorov-Smirnov, $p = 0,0946$, $D = 0,870$) (**Figura 56**).

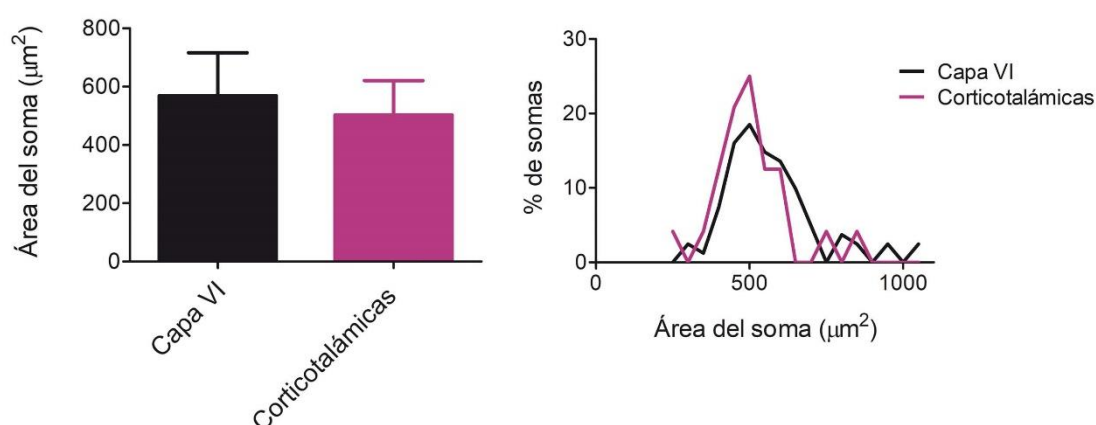


Figura 56. Izquierda: Histograma que muestra los valores promedio $\pm$ desviación estándar del área del soma neuronal en la población general de células de la capa VI y en las neuronas corticotalámicas. A la derecha se muestra la distribución de frecuencias del tamaño del soma neuronal en ambas poblaciones.

5.1.2 Número y densidad de terminales GABAérgicos en aposición al soma de neuronas corticotalámicas

A continuación, comparamos el número medio de terminales GABAérgicos en aposición a los somas de las neuronas corticotalámicas y aquellos en aposición a los somas de la población neuronal general de la capa VI (**Figura 57**); así como los valores de densidad obtenidos al dividir el número de terminales en aposición a cada soma neuronal entre el valor de su superficie (**Figura 58**).

No observamos diferencias significativas ni en el número (T test, $p = 0,3248$; **Figura 57**) ni en la densidad (T test, $p = 0,3520$; **Figura 58**) de terminales GABAérgicos en aposición a los somas de ambas poblaciones neuronales. Asimismo, observamos un alto grado de solapamiento de las curvas de distribución de frecuencias de cada una de las dos variables entre ambas poblaciones neuronales que no mostraron diferencias significativas ni en el número (Kolmogorov-Smirnov, $p = 0,4455$, $D = 0,2006$, **Figura 57**) ni en la densidad (Kolmogorov-Smirnov, $p = 0,5172$, $D = 0,1898$, **Figura 58**) de botones GABAérgicos perisomáticos.

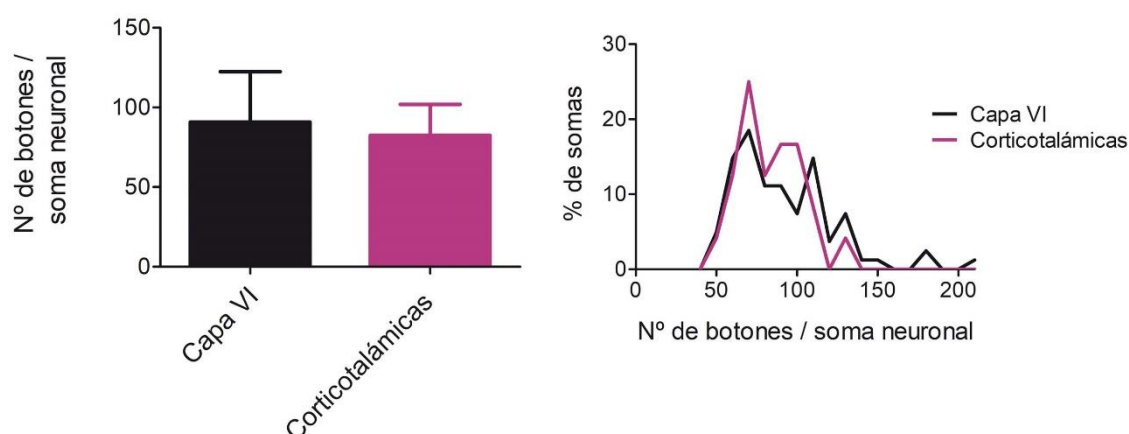


Figura 57. Izquierda: Histograma que muestra los valores promedio $\pm$ desviación estándar del número de terminales GABAérgicos perisomáticos en la población general de células de la capa VI y en las neuronas corticotalámicas. A la derecha se muestra la distribución de frecuencias del número de terminales perisomáticos en ambas poblaciones.

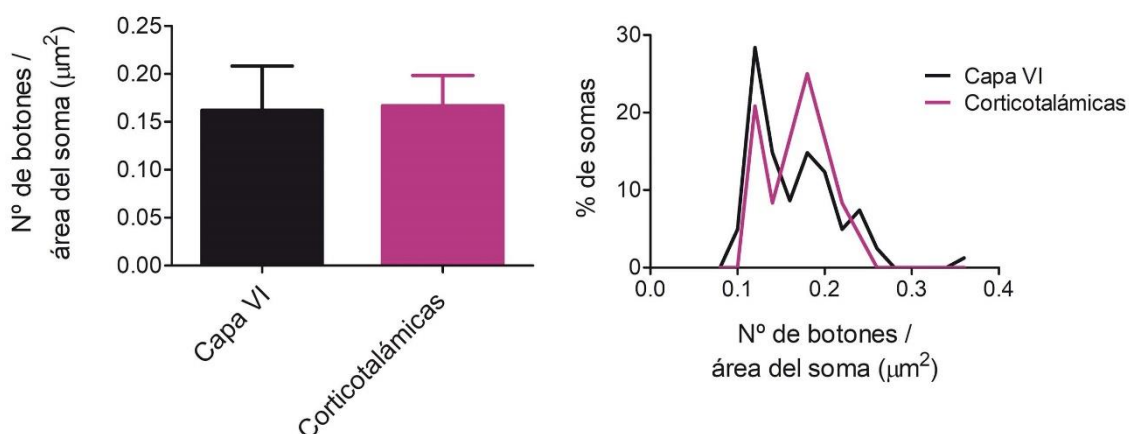


Figura 58. Izquierda: Histograma que muestra los valores promedio $\pm$ desviación estándar de la densidad de terminales GABAérgicos perisomáticos (número de botones perisomáticos/ área del soma) en la población general de células de la capa VI y en las neuronas corticotalámicas. A la derecha se muestra la distribución de frecuencias de la densidad de terminales perisomáticos en ambas poblaciones.

5.2 Densidad de terminales GABAérgicos en aposición a los segmentos iniciales del axón de neuronas corticotalámicas

5.2.1 Longitud, diámetro medio y superficie de los segmentos iniciales del axón de neuronas corticotalámicas

Cuando estudiamos las principales variables morfológicas de los SIAs no observamos diferencias significativas (T test, $p = 0,4964$) en los valores medios de longitud entre las neuronas corticotalámicas y la población general de las neuronas de capa VI. Del mismo modo, observamos un alto grado de solapamiento en las curvas de distribución de frecuencias de la longitud del SIA entre ambas poblaciones neuronales, que no mostraron diferencias significativas (Kolmogorov-Smirnov, $p = 0,0939$, $D = 0,2900$, **Figura 59**).

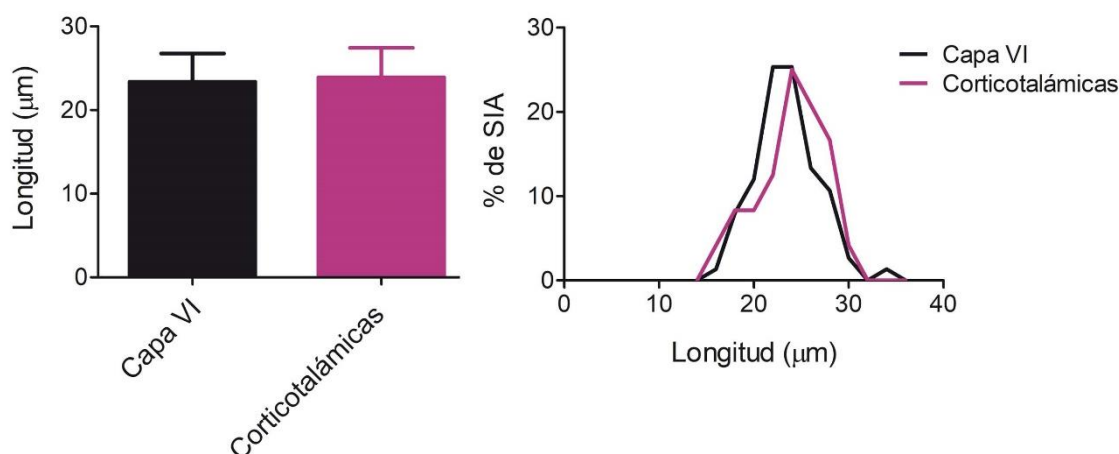


Figura 59. Izquierda: Histograma que muestra los valores promedio $\pm$ desviación estándar de la longitud del SIA en la población general de células de la capa VI y en las neuronas corticotalámicas. A la derecha se muestra la distribución de frecuencias de la longitud del SIA en ambas poblaciones.

Sin embargo, el diámetro medio (**Figura 60**) y sobre todo el área de los SIAs (**Figura 61**) de las neuronas corticotalámicas fueron significativamente menores (T test, $p = 0,0210$ y $p < 0,0001$) que los valores correspondientes a la población general de neuronas de capa VI.

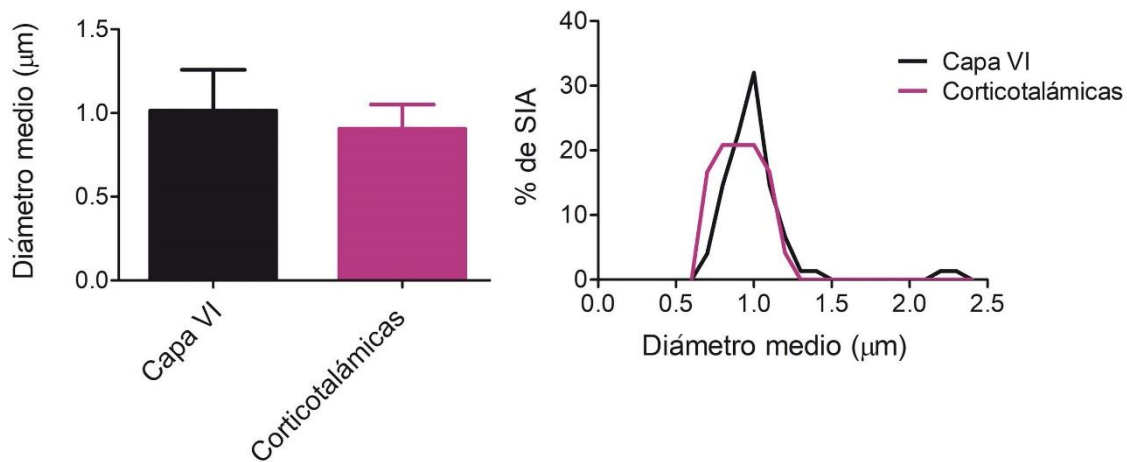


Figura 60. Izquierda: Histograma que muestra los valores promedio $\pm$ desviación estándar del diámetro medio del SIA en la población general de células de la capa VI y en las neuronas corticotálámicas. A la derecha se muestra la distribución de frecuencias del diámetro medio del SIA en ambas poblaciones.

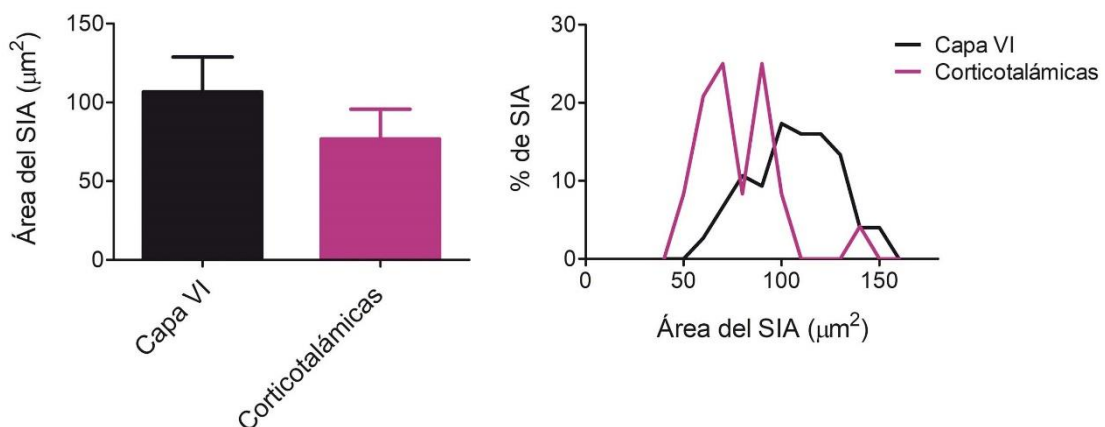


Figura 61. Izquierda: Histograma que muestra los valores promedio $\pm$ desviación estándar de la superficie del SIA en la población general de células de la capa VI y en las neuronas corticotálámicas. A la derecha se muestra la distribución de frecuencias de la superficie del SIA en ambas poblaciones.

Asimismo, observamos un desplazamiento hacia la izquierda en la curva de la distribución de frecuencias de las neuronas corticotálámicas respecto a la población general de neuronas de capa VI, para el diámetro medio del SIA y, especialmente, para la superficie de los SIAs (**Figuras 60 y 61**). Las diferencias entre las curvas de distribución alcanzaron significación estadística en el caso del área de los SIAs (Kolmogorov-Smirnov, $p \leq 0,0001$, $D = 0,6217$, **Figura 61**) pero no en el caso del diámetro medio de los SIAs (Kolmogorov-Smirnov, $p = 0,0542$, $D = 0,3150$, **Figura 60**). Estos resultados indican que las neuronas corticotálámicas tienen SIAs con menor superficie que otras poblaciones neuronales de capa VI.

5.2.2 Número y densidad de terminales GABAérgicos en aposición al segmento inicial del axón de neuronas corticotalámicas

Al cuantificar el número de botones GABAérgicos en aposición al SIA, observamos que la media de botones que inervan los SIAs de las neuronas corticotalámicas es significativamente inferior a la media del total de células presentes en la capa VI (T test, $p \leq 0,0001$; **Figura 62**). Asimismo, observamos que los porcentajes de neuronas con un menor número de botones GABAérgicos en aposición al SIA fueron mayores en la población de neuronas corticotalámicas (véase el desplazamiento significativo (Kolmogorov-Smirnov, $p = 0,0001$, $D = 0,5200$) hacia la izquierda en la curva de la distribución de frecuencias de las neuronas corticotalámicas) (**Figura 62**).

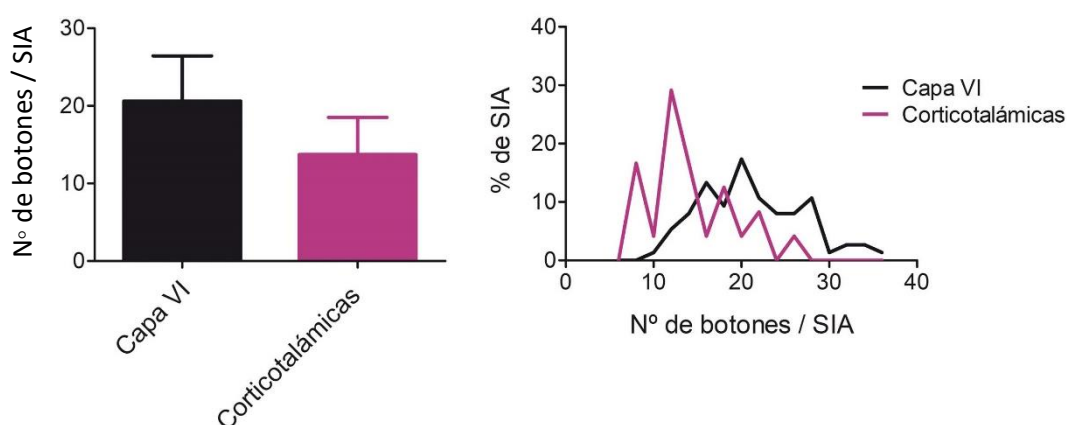


Figura 62. Izquierda: Histograma que muestra los valores promedio $\pm$ desviación estándar del número de terminales GABAérgicos en aposición al SIA en la población general de células de la capa VI y en las neuronas corticotalámicas. A la derecha se muestra la distribución de frecuencias del número de terminales en aposición al SIA en ambas poblaciones.

Por último, comparamos los valores de densidad de terminales GABAérgicos en aposición a los SIAs obtenidos dividiendo el número de terminales en aposición al SIA de cada neurona entre el valor de su superficie. Si bien observamos que la media de la densidad de innervación GABAérgica de los SIAs fue menor en las neuronas corticotalámicas que en la población general de neuronas de capa VI, las diferencias no alcanzaron significación (T test, $p = 0,1513$; **Figura 63**). De igual manera observamos un alto grado de solapamiento de las curvas de distribución de frecuencias de los valores de densidad entre ambas poblaciones neuronales, que no mostraron diferencias significativas (Kolmogorov-Smirnov, $p = 0,3606$, $D = 0,2167$, **Figura 63**).

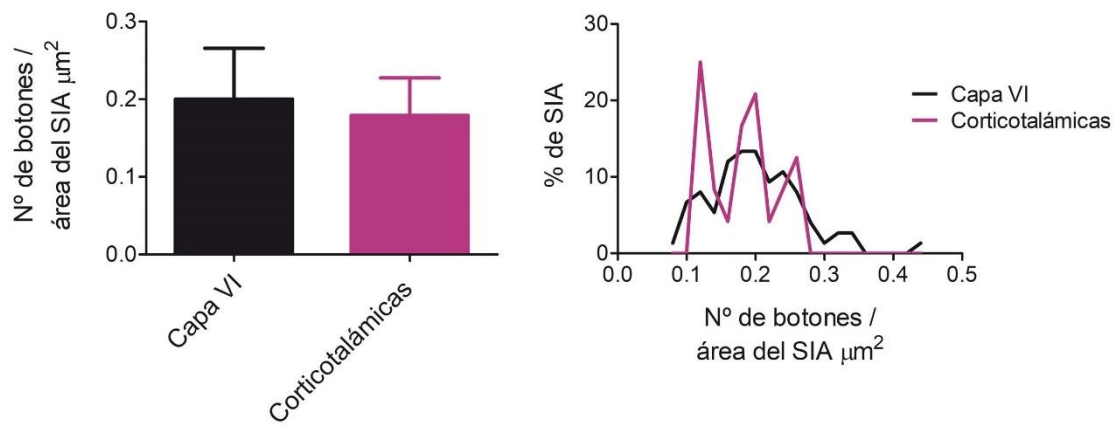


Figura 63. Izquierda: Histograma que muestra los valores promedio $\pm$ desviación estándar de la densidad de terminales GABAérgicos en aposición al SIA en la población general de células de la capa VI y en las neuronas corticotalámicas. A la derecha se muestra la distribución de frecuencias de la densidad de terminales en aposición al SIA en ambas poblaciones.

DISCUSIÓN

La presente tesis se ha centrado en el estudio morfométrico del soma y el segmento inicial del axón (SIA) de las neuronas piramidales de la corteza somatosensorial primaria del ratón y en la corteza temporal humana, así como en la innervación GABAérgica que dichas neuronas reciben por parte de las interneuronas en cesto y en candelabro. Los resultados de este trabajo demuestran la existencia de variaciones entre las diferentes capas corticales respecto al tamaño del soma y el SIA de las neuronas piramidales de ambas regiones corticales, así como en la densidad y al número de botones GABAérgicos en dichos dominios neuronales. Asimismo, observamos una correlación positiva en el área del soma o del SIA, y el número de botones GABAérgicos en aposición a estos dos dominios neuronales. Tanto los valores de densidad como del número de botones vGAT-ir en aposición al soma y al SIA son mayores en la neocorteza humana que en la de ratón.

1. CARACTERÍSTICAS MORFOMÉTRICAS DEL SOMA Y DEL SEGMENTO INICIAL DEL AXÓN

El soma neuronal representa una región esencial para la integración de la información recibida y procesada en las diferentes ramas dendríticas. Por otra parte, el SIA es necesario para el mantenimiento de la polaridad neuronal y es el dominio neuronal en el que, gracias a la concentración de canales de Na^+ y K^+ dependientes de voltaje, se inician los potenciales de acción que posteriormente se propagan a lo largo del axón y determinan la liberación del transmisor, y que se retropropagan hacia el soma y las dendritas, afectando a la integración sináptica (Kole *et al.*, 2008; Rasband, 2010; Kole y Stuart, 2012; Bender y Trusell, 2012; Leterrier, 2016).

La compartimentalización y la capacidad de computación neuronal se basa en propiedades de membrana de los distintos dominios neuronales, como la densidad de receptores y canales iónicos, y no se pueden predecir únicamente por las características morfológicas de dichos dominios (Stuart y Spruston 1998; Atkinson y Williams 2009). Sin embargo, diversos estudios han mostrado que, además del procesamiento de información a nivel dendrítico, el tamaño del

soma neuronal y del SIA confieren características funcionales importantes (Xu *et al.*, 2012; Harnett *et al.*, 2013; Smith *et al.*, 2013; Cichon y Gan 2015; Takahashi *et al.*, 2016; Schmidt-Hieber *et al.*, 2017). Es bien sabido, a partir de los estudios pioneros de la corteza cerebral basados en técnicas citoarquitectónicas y tinciones de plata que existen diferencias en el tamaño del soma y de los árboles dendríticos de las neuronas localizadas en las distintas capas corticales. Además, se ha demostrado —en diversas regiones del cerebro— que existe una gran heterogeneidad entre diferentes poblaciones neuronales respecto a las propiedades morfológicas del SIA, la posición axial del mismo a lo largo del axón, el sitio de emergencia de SIA y la expresión y distribución de diferentes combinaciones de canales iónicos (Boiko *et al.*, 2003; Van Wart *et al.*, 2007, Lorincz y Nusser, 2008; Hu *et al.*, 2009; Leterrier, 2016). Se considera que estas diferencias, tienen un impacto sustancial en las propiedades biofísicas de las neuronas y que afectan al procesamiento de información en diferentes circuitos neuronales (Kuba, 2007; Hamada *et al.*, 2016; Kole y Brette, 2018). De acuerdo con estudios teóricos y de modelización, el tamaño del SIA en las neuronas piramidales podría afectar al umbral y a la frecuencia de disparo de los potenciales de acción (Mainen *et al.*, 1995). Así, cabe esperar que las neuronas con un SIA más estrecho o localizado más distalmente sean más excitables o requieran una menor densidad de canales de Na⁺ para alcanzar un determinado nivel de excitabilidad (Kole y Brette, 2018).

En la corteza cerebral (González-Cabrera *et al.*, 2017; Höfflin *et al.*, 2017; Kole y Brette 2018) y en las neuronas ganglionares de la retina (Raghuram *et al.*, 2019), la distancia entre el soma y el SIA y el estrechamiento del segmento axonal localizado entre ambos, varía entre distintos tipos neuronales lo que repercute en la capacidad de retropropagación hacia el soma de los potenciales de acción generados en el SIA. Esto afecta a la eficacia para generar potenciales de acción somáticos y, por lo tanto, a la computación a nivel dendrítico. Por otro lado, el tamaño y la morfología dendrítica afecta a la forma, la localización y a las propiedades eléctricas del SIA y determina la regulación de la excitabilidad neuronal a través de la plasticidad del SIA (Gulledge y Bravo 2016).

El SIA puede emerger tanto del soma como de las dendritas. Las neuronas piramidales con axones “dendríticos” (que emergen de una dendrita) son más frecuentes en el hipocampo que en la neocorteza. Se han observado en el hipocampo del ratón y del hombre que el 20% o 40% respectivamente de las neuronas hipocámpales tienen axones dendríticos (Benavides-Piccione

et al., 2020). En la corteza somatosensorial de la rata se ha estimado que un 30% de las neuronas *thick-tufted* de capa V tienen axones dendríticos y además presentan una morfología dendrítica característica, lo que refleja que son un tipo subtipo neuronal específico (Thome *et al.*, 2014; Hamada *et al.*, 2016; Höfflin *et al.*, 2017). En el presente trabajo, los SIAs de todas las neuronas analizadas, tanto en la corteza HLS1 del ratón como en la neocorteza temporal humana emergieron de la base de los cuerpos celulares. Además, el punto de salida del SIA, identificado en base a la inmunoreactividad para espectrina β IV o para ankirina G, se observó en contacto con el cuerpo celular en la gran mayoría de las neuronas analizadas. Por lo tanto, nuestros resultados revelan la existencia de diferencias en el tamaño del soma y en la geometría del SIA en neuronas de las distintas capas corticales con axones somáticos cuyos SIAs emergen directamente del soma.

Nuestros resultados indican que, tanto en la corteza HLS1 del ratón como en la neocorteza temporal humana, el tamaño del SIA no es uniforme entre las neuronas piramidales de las distintas capas corticales y que además está relacionado con el tamaño del soma. De acuerdo con observaciones anteriores que demostraron que el diámetro axonal de las neuronas piramidales varía de acuerdo con el tamaño del soma (Peters *et al.*, 1968; Sloper y Powell 1979), en el presente trabajo hemos encontrado una correlación positiva entre la superficie del soma neuronal y la longitud, el diámetro medio y la superficie del SIA. Esto indica que cuanto mayor es el soma neuronal, mayor será el SIA. En neuronas ganglionares de la retina se han realizado observaciones similares, indicando que el tamaño del SIA y su distancia al soma está correlacionado con el tamaño de los somas y de los árboles dendríticos (Raghuram *et al.*, 2019). En neuronas *thick-tufted* de capa V de la corteza somatosensorial de la rata se describió que, si bien el tamaño del SIA no varía sistemáticamente, la distancia del SIA al soma presenta una correlación inversa con el tamaño de la dendrita apical (Hamada *et al.*, 2016).

Respecto a la morfología de los SIAs de las neuronas piramidales, nuestras observaciones indican que, aunque la longitud y el diámetro del SIA no están correlacionados, existe una correlación positiva entre estas variables y la superficie del SIA. Estos resultados concuerdan con observaciones previas que demostraron una correlación positiva entre la longitud y la superficie del SIA en neuronas dopaminérgicas de la sustancia negra (González-Cabrera *et al.*, 2017), en las que también se ha descrito una correlación negativa entre la distancia soma-SIA y la longitud del SIA (Meza *et al.*, 2018).

El último parámetro que estudiamos en relación con la morfología del SIA, es la variación de su diámetro a lo largo de su longitud. Nuestro estudio demuestra que las neuronas de las distintas capas corticales muestran una tasa diferente de estrechamiento, o disminución de diámetro, del SIA a lo largo de su longitud. Los SIAs más cortos y con menor diámetro medio son también los más estrechos a lo largo de toda su longitud, que corresponden a las neuronas de las capas I y IV. Por el contrario, los SIAs más largos y con mayor diámetro medio, que se encuentran en las capas V (corteza murina) y III (corteza humana), son más anchos en su parte más proximal. En las neuronas de todas las capas corticales se produce un estrechamiento del SIA hacia sus regiones más distales, pero en las capas III y V este estrechamiento es más pronunciado. En las primeras 8 μm , el diámetro del SIA disminuye hasta un tercio de su valor inicial, pasando de 1,5 a 1 μm , valor similar al del resto de las capas. De acuerdo con estudios previos, los potenciales de acción en las neuronas piramidales de capa V se inician en el SIA a unas 35 μm del soma (Baranauskas *et al.*, 2013; Palmer y Stuart, 2006) en regiones distales y estrechas.

Cabe destacar que las observaciones cuantitativas y las correlaciones que hemos encontrado respecto al tamaño del soma y la geometría de los SIAs de las neuronas de las diversas capas corticales fueron semejantes en la corteza HLS1 del ratón y en la neocorteza humana. Sin embargo, para saber si estas observaciones constituyen una regla general, deben ser estudiadas otras áreas corticales y especies. Además, para comprender mejor la contribución de las neuronas piramidales de las diferentes capas al funcionamiento de los circuitos corticales, las observaciones morfológicas del soma y del SIA de nuestro estudio deben complementarse con 1) datos morfológicos de los árboles dendríticos 2) información molecular como, por ejemplo, datos sobre la expresión de receptores y canales iónicos que determinan las conductancias en los diferentes dominios neuronales y 3) datos sobre la conectividad incluyendo la innervación GABAérgica de los diferentes dominios neuronales (ver a continuación).

2. INERVACIÓN GABAÉRGICA DEL SOMA Y DEL SEGMENTO INICIAL DEL AXÓN EN LAS NEURONAS PIRAMIDALES.

2.1 Heterogeneidad en la innervación GABAérgica de los somas de neuronas piramidales por las interneuronas en cesto

Los resultados del presente trabajo reafirman la idea de que la innervación GABAérgica del soma neuronal es heterogénea y específica para poblaciones particulares de neuronas piramidales de la corteza cerebral. Las células en cesto incluyen diferentes tipos celulares diferentes que presentan diferencias de tamaño, proyecciones dendríticas y axonales, propiedades de disparo de potenciales de acción y patrones de expresión molecular (Kawaguchi y Kubota, 1998; Wang *et al.*, 2002; Markram *et al.*, 2004; Uematsu *et al.*, 2008; Helmstaedter *et al.*, 2009). Aunque los somas neuronales son la diana principal de los terminales axonales de las células en cesto, éstas también pueden innervar los tallos y las espinas dendríticas de forma diferencial (Halasy *et al.*, 1996; Thomson *et al.*, 1996; Kawaguchi y Kubota, 1998; Somogyi *et al.*, 1998; Takacs *et al.*, 2015; Kubota *et al.*, 2015). Así, se ha descrito que existe una relación entre la diana sináptica de los terminales de las neuronas en cesto y el tamaño de los contactos sinápticos y la intensidad de los efectos inhibidores que producen (Kubota *et al.*, 2015). Las sinapsis somáticas tienen superficies sinápticas más grandes que las dendríticas, y las sinapsis sobre los tallos dendríticos tienen superficies sinápticas más grandes que las que se establecen con las espinas dendríticas (Kubota *et al.*, 2015). Los axones de diversas neuronas en cesto convergen sobre el soma de las neuronas piramidales para formar los característicos agregados de terminales en forma de cesto (DeFelipe *et al.*, 1986; Lund y Lewis 1993; Krimer y Goldman-Rakic 2001; DeFelipe *et al.*, 2013).

En estudios previos, llevados a cabo en el hipocampo de roedores, se describió que las neuronas en cesto, cuyos terminales convergen en la región perisomática, incluyen diversos tipos en base a diferencias neuroquímicas, electrofisiológicas y morfológicas, como diferencias en el tamaño neuronal, los patrones de ramificación axonal y en las propiedades ultraestructurales de los terminales (Wang *et al.*, 2002; Freund y Katona 2007; Klausberger *et al.*, 2005; Klausberger y Somogyi 2008; Ascoli *et al.*, 2008; Buzsaki y Wang 2012; Takacs *et al.*, 2015; Tremblay *et al.*, 2016). A pesar de esta potencial variabilidad y selectividad en la innervación de diferentes dianas por las neuronas en cesto, algunos estudios electrofisiológicos propusieron que los axones de las interneuronas inhibitorias, incluyendo los de las neuronas en cesto positivas para

parvalbúmina, forman una matriz inespecífica y homogénea que contacta indiscriminadamente con las neuronas piramidales adyacentes (Fino y Yuste 2011; Packer y Yuste 2011; Packer *et al.*, 2013). Por el contrario, en nuestro estudio hemos observado, tanto en la corteza temporal humana como en la corteza HLS1 del ratón, una variación laminar importante en el número de terminales vGAT-ir en aposición a los somas de las neuronas piramidales y que forman la típica innervación GABAérgica perisomática.

El número medio de botones que constituyen la inhibición perisomática varía entre 88 (sobre las neuronas de la capa IV) y 145 (neuronas de la capa V) en la corteza HLS1 del ratón y entre 122 (neuronas de las capas II y IV) y 262 (neuronas de la capa V) en la neocorteza temporal humana. Asimismo, observamos una correlación positiva entre la superficie del soma neuronal y el número de botones GABAérgicos con los que contacta, de forma que se puede utilizar la superficie del soma como un índice predictivo del número de botones. Sin embargo, teniendo en cuenta los valores de la superficie de los somas de las neuronas piramidales, hemos observado que la densidad de la innervación GABAérgica perisomática, obtenida mediante el cociente del número de botones entre el área del soma, es diferente en neuronas de las distintas capas corticales.

Las neuronas piramidales de capa IV, pese a ser la capa que presenta los valores más bajos de área superficial y el menor número de botones, tienen el valor más alto de densidad de innervación (~ 0.2 botones/ μm^2 en ambas especies). Por el contrario, las capas V (corteza somatosensorial de ratón) y III (corteza temporal humana), pese a tener neuronas piramidales con somas de mayor tamaño que reciben el número más alto de botones, presentan una densidad de innervación similar a las neuronas de las capas II y VI, respectivamente.

Estos resultados, junto con evidencias de estudios previos, demuestran la existencia de una importante heterogeneidad y selectividad en la innervación perisomática de las neuronas piramidales, que probablemente afecta a la intensidad de los efectos inhibidores sobre distintas subpoblaciones de neuronas piramidales en distintas áreas y capas corticales, e incluso entre distintos dominios neuronales. Por ejemplo, se han descrito diferencias importantes en la densidad de las formaciones en cesto complejas, aquellas formadas por una gran densidad de terminales, entre áreas de la neocorteza humana siendo más alta en áreas motoras primarias y en áreas sensoriales que en áreas asociativas (Blázquez-Llorca *et al.*, 2010). Además, en la

corteza visual del gato se observó que las neuronas corticocorticales reciben un mayor número de contactos inhibidores en el soma que las neuronas corticotalámicas (Fariñas y DeFelipe 1991a, 1991b). También se ha descrito en la corteza prefrontal del ratón, que las neuronas en cesto positivas para parvalbúmina inhiben preferentemente a las neuronas piramidales *thick-tufted* de capa V con proyecciones subcorticales (Lee *et al.*, 2014). En la corteza entorrinal medial del ratón, las neuronas en cesto positivas para colecistoquinina inervan a las neuronas piramidales de capa II que proyectan fuera del hipocampo y evitan otras neuronas piramidales vecinas que proyectan al giro dentado (Varga *et al.*, 2010). También en el hipocampo del ratón, se ha descrito que las neuronas en cesto positivas para parvalbúmina, pero negativas para colecistoquinina, inducen corrientes más intensas en las neuronas piramidales de CA1 localizadas en la región profunda del estrato piramidal, y en particular en las que proyectan a la amígdala, que en neuronas piramidales más superficiales (Lee *et al.*, 2014).

Además de lo anterior, los botones GABAérgicos que contactan con el soma de las neuronas piramidales hipocampales pueden ser heterogéneos (Takacs *et al.*, 2015) y se pueden originar a partir de la convergencia de múltiples tipos de neuronas en cesto (Buhl *et al.*, 1994) y, en menor medida, de otros tipos de interneuronas (Ferraguti *et al.*, 2005; Fuentealba *et al.*, 2008; Takacs *et al.*, 2013). Se ha descrito que las neuronas piramidales de CA1 y CA3 reciben alrededor de 60 y 140 botones perisomáticos respectivamente, de los cuales, un 60% son positivos para parvalbúmina y el 40% restante son positivos para colecistoquinina (Takacs *et al.*, 2015). Además, también se ha descrito que los terminales en cesto tienen frecuentemente múltiples sitios de liberación de neurotransmisor (el 90% establecen más de una sinapsis y a veces hasta 5, que pueden terminar únicamente en un soma o en dos somas y en dendritas adyacentes) y la cobertura sináptica positiva para parvalbúmina o para colecistoquinina varía entre las neuronas piramidales de CA1 y CA3 (Takacs *et al.*, 2015).

2.2 Heterogeneidad en la innervación GABAérgica de los segmentos iniciales del axón de neuronas piramidales por las interneuronas en candelabro

La gran mayoría de las sinapsis que se establecen con los SIAs de las neuronas piramidales se origina en las neuronas en candelabro o axo-axónicas. La característica morfológica distintiva de este tipo celular es la organización de sus terminales axonales que forman filas verticales de botones que se asemejan a candelabros (terminales Ch), y establecen sinapsis simétricas (GABAérgicas) con los SIA de las neuronas piramidales (Szentágothai y Arbib, 1974; Jones, 1975; Somogyi, 1977; Fairén y Valverde, 1980; Peters *et al.*, 1982; Somogyi *et al.*, 1982; Freund *et al.*, 1983; DeFelipe *et al.*, 1985).

Se considera que la innervación por los terminales Ch tiene una enorme importancia en la regulación de la salida de información de las neuronas piramidales ya que el SIA representa la ubicación final para la integración sináptica y el lugar de iniciación de los potenciales de acción (Kole y Stuart, 2012). A pesar de que tradicionalmente se ha considerado de forma generalizada que la innervación GABAérgica de los SIAs por parte de las neuronas Ch tienen efectos inhibidores, existe un debate en cuanto a sí, en determinadas circunstancias, estos efectos pueden ser excitadores (ver Shang *et al.*, 2022).

El SIA de una neurona piramidal puede estar innervado por uno o varios (hasta cinco) “cartuchos” que pueden originarse a partir de la misma, o de diferentes, neuronas Ch (Fairén y Valverde, 1980; Peters *et al.*, 1982, Freund *et al.*, 1983; Somogyi *et al.*, 1982, 1983; De Carlos *et al.*, 1987; DeFelipe y Fariñas, 1992; Tamas y Szabadics, 2004; Larriva-Sahd, 2010; Inan *et al.*, 2013; Blázquez-Llorca *et al.*, 2015). Una única neurona Ch puede llegar a innervar varios cientos de células piramidales (Freund *et al.*, 1983; DeFelipe *et al.*, 1985; Somogyi *et al.*, 1985; Li *et al.*, 1992; Tai *et al.*, 2014; Blázquez-Llorca *et al.*, 2015) y así controlar las respuestas de conjuntos de neuronas piramidales.

Se ha demostrado previamente que la innervación de las neuronas piramidales de diferentes regiones y/o capas corticales por las células Ch no es homogénea. Hay múltiples ejemplos de esto, entre ellos las variaciones regionales, neuroquímicas y fenotípicas, de las neuronas Ch entre el hipocampo y la neocorteza, incluyendo el hecho de que las células Ch innervan el doble

de neuronas piramidales en el hipocampo que en la neocorteza (Ishino *et al.*, 2017). También se ha descrito en la corteza frontal que las células Ch de capas supragranulares e infragranulares tienen una expresión génica diferencial (Paul *et al.*, 2017) y se han encontrado diferentes variantes morfológicas de células Ch en diferentes regiones (Szabo *et al.*, 2017; Varga *et al.*, 2014) y capas corticales (Somogyi *et al.*, 1982; DeFelipe *et al.*, 1985; De Carlos *et al.*, 1985; Lewis y Lund, 1990; Taniguchi *et al.*, 2013).

Estudios realizados en distintas especies han descrito también una importante heterogeneidad en la densidad de terminales Ch. El número total de botones GABAérgicos que contactan con el SIA difiere entre especies, áreas y capas corticales e incluso entre diferentes poblaciones neuronales. Por ejemplo, los terminales Ch complejos, formados por multitud de botones Ch, son abundantes en la neocorteza humana, pero su densidad es mayor en las áreas asociativas que en las sensoriales, y es mayor en las capas supragranulares que en las infragranulares (Inda *et al.*, 2007). En el ratón, los terminales Ch complejos son relativamente abundantes en varias regiones de la amígdala (Inda *et al.*, 2009; Veres *et al.*, 2014; Vereczki *et al.*, 2016; Andrási *et al.*, 2017) y en la corteza entorrinal y la corteza piriforme (Inda *et al.*, 2009); de hecho, en la corteza piriforme, son particularmente abundantes en la capa II, donde prácticamente todas las neuronas piramidales parecen estar inervadas por estos terminales (Wang y Sun, 2012; Wang *et al.*, 2014). Por el contrario, en la neocorteza del ratón los terminales Ch consisten en estructuras más simples formadas por un número discreto de botones GABAérgicos (Inda *et al.*, 2009). En la corteza prefrontal del mono adulto, el número de botones que contactan con el SIA de distintas neuronas piramidales en las capas II-IV puede variar desde 0 hasta 40 (media: 10,5) (Cruz *et al.*, 2003; Fish *et al.*, 2013). Se ha descrito en la corteza visual y auditiva que los terminales Ch inervan preferentemente el SIA de poblaciones neuronales concretas, como las que establecen proyecciones intracorticales (Sloper y Powell, 1979; Fairén y Valverde, 1980; De Carlos *et al.*, 1985; DeFelipe *et al.*, 1985; Fariñas y DeFelipe, 1991b), y evitan el SIA de otras poblaciones neuronales. Por ejemplo, en la corteza visual del gato se observó que el SIA de neuronas corticocorticales, callosas o ipsilaterales, reciben un mayor número de contactos inhibitorios (16-23 y 22-28, respectivamente) que el de las neuronas corticotalámicas (1-5) (Fariñas y DeFelipe, 1991a, b).

Los terminales Ch sencillos de la neocorteza de los roedores están formados por relativamente pocos botones. Estudios previos basados en observaciones ultraestructurales en la corteza

sensoriomotora de rata describieron que el SIA de las neuronas piramidales recibe un promedio de 17.6 (rango: 15-22) contactos sinápticos axo-axónicos (Mendizabal-Zubiaga *et al.*, 2007). De la misma forma, en trabajos realizados en la capa II de la corteza somatosensorial primaria de ratones transgénicos que expresan GFP en las neuronas Ch, se estimó que el SIA de cada neurona piramidal está innervado por 4 células Ch, cada una de las cuales aporta de 3 a 5 botones (hasta un total de 20) (Inan *et al.*, 2013; Blázquez-Llorca *et al.*, 2014). Además, estos estudios mostraron un alto grado de selectividad en la innervación del SIA de las neuronas piramidales, ya que cada célula Ch contacta con 35-50 neuronas piramidales dentro de los contornos de su árbol axonal (alrededor del 20% del total) y lo hace de manera heterogénea, existiendo zonas de alta densidad de innervación, mientras que el SIA de las neuronas piramidales de otras zonas reciben poca o ninguna innervación. Asimismo, en la capa II de la corteza prefrontal del ratón, existen subpoblaciones específicas de células Ch que innervan conjuntos de neuronas piramidales que proyectan hacia la amígdala basolateral, mientras que evitan aquellas que tienen proyecciones a la corteza contralateral (Lu *et al.*, 2017).

Estudios recientes en la corteza motora, prefrontal y somatosensorial del ratón han descrito que las neuronas Ch incluyen distintos subtipos en relación con su conectividad aferente y eferente, derivada de su posición laminar. Se ha descrito que las neuronas Ch con una posición específica del soma y de su árbol dendrítico (especialmente de las dendritas basales) y axonal permiten el reclutamiento, en base al tipo de entrada presináptica de información subcortical y cortical, de conjuntos de neuronas piramidales que proyectan a dianas específicas (Wang *et al.*, 2019). De acuerdo con estos estudios, en el presente trabajo hemos observado una importante variabilidad respecto al número de terminales GABAérgicos en aposición con el SIA de las neuronas piramidales de distintas capas, con un rango entre 16 (neuronas de capa IV) y 28 (neuronas de capa V) en la corteza HLS1 del ratón y entre 35 (neuronas de capa VI) y 65 (neuronas de capa III) en la neocorteza temporal humana.

También hemos observado que los botones GABAérgicos en la corteza temporal humana se concentran en las regiones distales de los SIAs de las neuronas piramidales. Esto contrasta con observaciones previas en neuronas hipocámpales de la rata, en las que los terminales Ch se concentran en regiones medias del SIA (Wefelmeyer *et al.*, 2015); y con observaciones en neuronas piramidales de la corteza piriforme (Wang *et al.*, 2014) y en neuronas principales de la amígdala basolateral (Veres *et al.*, 2014) del ratón en las que describieron que los terminales

GABAérgicos inervan respectivamente toda la extensión o la región proximal del SIA. En nuestro estudio hemos observado que los terminales Ch se distribuyen homogéneamente por toda la extensión del SIA de las neuronas piramidales del ratón. Sin embargo, cuando consideramos la disminución en la superficie del SIA derivada de la progresiva disminución de diámetro lo largo de su extensión próximo-distal, observamos que la densidad de innervación GABAérgica es mayor en las regiones distales del SIA, donde se inician los potenciales de acción (Palmer y Stuart 2006; Palmer *et al.*, 2010; Baranauskas *et al.*, 2013; Eyal *et al.*, 2014).

De acuerdo con estudios previos realizados en otras áreas corticales y especies (DeFelipe *et al.*, 1985; Fariñas y DeFelipe, 1991; Cruz *et al.*, 2003; Fish *et al.*, 2013; Inan y Anderson, 2014), hemos observado en la neocorteza temporal humana y en la corteza somatosensorial de ratón, que el número de terminales vGAT-ir en aposición al SIA está correlacionado positivamente con el tamaño de este. En cuanto a los patrones laminares de densidad de innervación GABAérgica del SIA, utilizando el área de la superficie del SIA como un indicador de su tamaño, encontramos de nuevo, como ocurría en el caso del soma neuronal, que las neuronas de capa IV tienen la mayor densidad de la innervación GABAérgica en ambas especies (aproximadamente 0,25 botones/ μm^2). Además, esta densidad no está correlacionada con el tamaño del SIA ni con la abundancia relativa de terminales GABAérgicos en el neuropilo de las diferentes capas corticales. Esto indica que existen factores adicionales que determinan la densidad de la innervación GABAérgica del SIA de las neuronas piramidales.

Finalmente, nuestros resultados revelan que, tanto en las neuronas piramidales de la neocorteza temporal humana como de la corteza somatosensorial de ratón, la densidad de terminales Ch en aposición al SIA es mayor (o igual en algunas capas) que la de los terminales de las neuronas en cesto en aposición a los somas neuronales. Además, las variaciones laminares en la densidad de la innervación GABAérgica de los somas neuronales no se correlacionaron con la de los SIAs ni en ratones ni en los humanos. Es probable que la heterogeneidad observada en la innervación GABAérgica de los somas y los SIAs module diferencialmente la actividad de las células piramidales de las distintas capas corticales, que participan en los microcircuitos que procesan diferentes tipos de información (Harris y Shepherd, 2015). Esto se suma a estudios previos que proponen que las diferencias laminares en la posición del soma de las células Ch y su morfología dendrítica se relacionan con la especificidad de sus conexiones de entrada y salida (Wang *et al.*, 2019), asociando la llegada de patrones laminares específicos de aferencias corticales y

subcorticales con el reclutamiento de conjuntos de células neuronas piramidales que proyectan a dianas específicas.

2.3 Limitaciones técnicas del presente estudio

En el presente trabajo hemos cuantificado el número y la densidad de los botones vGAT-ir en aposición a los somas y los SIAs de las neuronas piramidales para estimar el número y la densidad de los contactos sinápticos inhibidores en dichos dominios neuronales. Sin embargo, nuestras observaciones se ven afectadas por dos limitaciones principales: 1) se ha descrito que vGAT está presente en la mayoría de las sinapsis GABAérgicas, pero no en todas (Chaudhry *et al.*, 1998; ver Wang y Sun 2012). Por lo tanto, podemos haber subestimado el número de botones en nuestro análisis; y 2) es importante considerar que la identificación inequívoca de los contactos sinápticos requiere el uso de la microscopía electrónica. Por ejemplo, no todos los botones vGAT-ir en aposición a los somas neuronales o los SIAs implican necesariamente la existencia de sinapsis en estas regiones. De hecho, es frecuente que estos botones establezcan sinapsis con otros elementos adyacentes del neuropilo (DeFelipe *et al.*, 1986; Fariñas y DeFelipe 1991a, 1991b; Alonso-Nanclares *et al.*, 2004; Karube *et al.*, 2004; Merchán-Pérez *et al.*, 2009). En relación con esto, por ejemplo, es importante mencionar que la innervación sináptica del SIA parece ser una característica típica de las neuronas piramidales. Sin embargo, en el presente estudio hemos observado que el SIA de las neuronas de capa I, la mayor parte de las cuales son GABAérgicas (Schuman *et al.*, 2019) están rodeados por $\sim 13 \pm 6$ botones vGAT-ir, tanto en la neocorteza humana como en la de ratón. Este es un número elevado teniendo en cuenta que los SIAs de las interneuronas GABAérgicas reciben 1 o 2 sinapsis, y ocasionalmente, en el caso de las neuronas en cesto grandes hasta 6 u 8 contactos sinápticos (DeFelipe *et al.*, 1986). Por otro lado, los botones vGAT-ir podrían establecer más de una sinapsis como se ha descrito en los terminales de las neuronas en cesto del hipocampo (Takacs *et al.*, 2015). Por lo tanto, los valores obtenidos en el presente trabajo respecto al número y a la densidad de terminales GABAérgicos no reflejan necesariamente el número absoluto de sinapsis GABAérgicas en el soma o en el SIA, para lo que habría que realizar estudios de microscopía electrónica. Sin embargo, los estudios mediante microscopía electrónica seriada son extremadamente difíciles de realizar (ver por ejemplo Fariñas y DeFelipe 1991a, 1991b) y la realización de una estimación precisa del número de sinapsis que reciben los somas y los SIAs de las neuronas de las distintas capas corticales llevarían una gran cantidad de tiempo y de recursos. Esto supondría un desafío

aún mayor considerando la posible variabilidad interindividual en el número de terminales GABAérgicos.

Por lo tanto, consideramos que los resultados de nuestro estudio, basados en la reconstrucción tridimensional completa de los somas y los SIAs de al menos 15 neuronas por capa (en total 540 somas y 450 SIAs en la neocorteza humana y 450 somas y 450 SIAs en la neocorteza del ratón), procedentes de cinco individuos de cada especie, representa una buena estimación de las diferencias en el número y la densidad de la innervación GABAérgica del soma y el SIA de las neuronas de las distintas capas corticales.

3. INERVACIÓN PERISOMÁTICA DE LAS NEURONAS CORTICOTALÁMICAS

Por último, en el presente trabajo hemos observado en la corteza somatosensorial del ratón que las neuronas corticotalámicas de la capa VI, identificadas mediante técnicas de trazado retrógrado en experimentos con inyecciones del trazador *Fast Blue* en el núcleo ventral posterolateral talámico (VPL), se distinguen de la población neuronal general de la capa VI por la especificidad en algunas de las variables estudiadas respecto al tamaño del soma y el SIA, y respecto al número y la densidad de botones GABAérgicos en aposición a ambas estructuras. La capa VI de la neocorteza sensorial incluye diferentes subpoblaciones neuronales, entre las que se encuentran las neuronas corticotalámicas que representan del 30-50% de la población total (Thomson, 2010). Las neuronas corticotalámicas incluyen a su vez dos subpoblaciones neuronales: 1) aquellas que proyectan al núcleo reticular talámico y/o a los núcleos talámicos sensoriales primarios, o específicos, como el VPL. Estas células piramidales se caracterizan por tener una dendrita apical bien desarrollada y ramificaciones axonales que establecen también conexiones con la capa IV, y ocasionalmente se extiende hasta la capa III. 2) Por otro lado, en la región más profunda de la capa VI de la corteza somatosensorial primaria se localizan las neuronas corticotalámicas pequeñas que proyectan a VPL y a los núcleos talámicos no específicos como el núcleo posterior talámico, pero no al núcleo reticular, y su dendrita apical y axones conectan con la región superior de la capa V (Kim *et al.*, 2014; Thomson y Lamy, 2007).

El material analizado en el presente trabajo nos ha permitido reconstruir el soma y el SIA completos de 24 neuronas corticotalámicas marcadas con el trazador, que se compararon con

81 somas y 75 SIAs de la población total de células de la capa VI obtenidas del hemisferio contralateral. Sin embargo, este material no nos ha permitido diferenciar entre las dos subpoblaciones de neuronas corticotalámicas mencionadas anteriormente, ya que ambas proyectan al núcleo VPL donde se localizó la inyección del trazador.

En un estudio previo realizado en la corteza visual del gato se describió que el soma de las neuronas corticotalámicas recibe un menor número de contactos GABAérgicos que el de las neuronas corticocorticales (Fariñas y DeFelipe 1991a, 1991b). Los resultados de nuestro estudio indican que el tamaño del soma y el número y densidad de terminales en aposición al mismo tienen una tendencia a ser menor en las neuronas corticotalámicas, aunque sin significación estadística respecto a la población total. Es decir, el tamaño y la densidad de la inhibición GABAérgica del soma no permite distinguir a las neuronas corticotalámicas de la corteza somatosensorial del ratón respecto a la población general de neuronas de la capa VI.

Respecto al SIA, nuestros resultados indican que, aunque los SIAs de las neuronas corticotalámicas tienen una longitud media similar a la población total de neuronas de capa VI, tienen un diámetro y especialmente una superficie significativamente menor. Además, observamos que el número de botones GABAérgicos en aposición al SIA es menor en las neuronas corticotalámicas. Estos resultados están de acuerdo con observaciones en la corteza visual del gato, que describieron que las neuronas corticotalámicas reciben un menor número (entre 1-5) de contactos inhibidores que el SIA de neuronas corticocorticales, tanto callosas como ipsilaterales (entre 16-23 y 22-28, respectivamente) (Fariñas y DeFelipe, 1991a, b). Sin embargo, al tener en cuenta en nuestro estudio los valores de superficie del SIA y calcular los valores de densidad dividiendo el número de botones en aposición al SIA entre la superficie del SIA, hemos observado que aunque la densidad de inervación GABAérgica tienden a ser más baja en las neuronas corticotalámicas que en la población total de neuronas de la capa VI, las diferencias no alcanzan significación estadística.

CONCLUSIONES

1. La neocorteza temporal humana y la neocorteza somatosensorial de ratón presentan diferencias y patrones laminares específicos, en la densidad de terminales GABAérgicos en el neuropilo, en el tamaño de los somas neuronales y de los segmentos iniciales del axón, así como en el número y la densidad de botones GABAérgicos en aposición a estos dos dominios neuronales.
2. En las dos regiones corticales existe una correlación positiva entre la superficie del soma neuronal y la del segmento inicial del axón, por lo que las neuronas piramidales con somas de mayor tamaño tienen un segmento inicial del axón con mayor superficie, longitud y diámetro medio.
3. La longitud y el diámetro medio de los segmentos iniciales del axón no están correlacionadas entre sí, pero ambas variables determinan el área del segmento inicial del axón. El diámetro del segmento inicial del axón de las neuronas corticales disminuye progresivamente a lo largo de su longitud, pero de manera variable en neuronas de las distintas capas corticales.
4. En ambos tipos de corteza existe una correlación positiva entre la superficie de los somas, o de los segmentos iniciales del axón, y el número de terminales GABAérgicos en aposición a cada uno de estos dominios neuronales.
5. En ambos tipos de corteza, la densidad de terminales GABAérgicos en aposición a los somas, o a los segmentos iniciales del axón, no está correlacionada con el tamaño de dichos dominios neuronales, ni con la densidad general de terminales GABAérgicos en el neuropilo de las distintas capas corticales.

6. En ambas especies, la densidad de botones GABAérgicos es mayor en el segmento inicial del axón que en el soma y ambas variables no están correlacionadas.
7. Los segmentos iniciales del axón de las neuronas corticotalámicas tienen menor diámetro y superficie, y reciben un menor número de terminales GABAérgicos que los de la población general de neuronas de capa VI, si bien ambas poblaciones no se diferencian en los valores de densidad de innervación GABAérgica de sus segmentos iniciales del axón.

BIBLIOGRAFÍA

- Alonso-Nanclares L, Minelli A, Melone M, Edwards RH, Defelipe J, Conti F. Perisomatic glutamatergic axon terminals: a novel feature of cortical synaptology revealed by vesicular glutamate transporter 1 immunostaining. *Neuroscience*. 2004; 123(2):547-56.
- Amaral DG, Insausti R. Hippocampal formation. In *The human nervous system*, Paxinos G, ed. (San Diego: Academic Press). 1990; pp. 711- 755.
- Andrási T, Veres JM, Rovira-Esteban L, Kozma R, Vikór A, Gregori E, Hájos N. Differential excitatory control of 2 parallel basket cell networks in amygdala microcircuits. *PLoS Biol*. 2017; 15(5):e2001421.
- Andressen C, Blümcke I, Celio MR. Calcium-binding proteins: selective markers of nerve cells. *Cell Tissue Res*. 1993; 271(2):181-208.
- Arellano JI, Muñoz A, Ballesteros-Yáñez I, Sola RG, DeFelipe J. Histopathology and reorganization of chandelier cells in the human epileptic sclerotic hippocampus. *Brain*. 2004; 127:45-64.
- Armañanzas R, Alonso-Nanclares L, Defelipe-Oroquieta J, Kastanauskaite A, de Sola RG, Defelipe J, Bielza C, Larranaga P. Machine learning approach for the outcome prediction of temporal lobe epilepsy surgery. *PLoS One*. 2013; 8:e62819
- Ascoli GA, Alonso-Nanclares L, Anderson SA, Barrionuevo G, Benavides-Piccione R, Burkhalter A, Buzsaki G, Cauli B, Defelipe J, Fairen A *et al*. Petilla terminology: nomenclature of features of GABAergic interneurons of the cerebral cortex. *Nat Rev Neurosci*. 2008; 9:557–568.
- Atapour N, Rosa MGP. Age-related plasticity of the axon initial segment of cortical pyramidal cells in marmoset monkeys. *Neurobiol Aging*. 2017; 57:95-103.
- Atkinson SE, Williams SR. Postnatal development of dendritic synaptic integration in rat neocortical pyramidal neurons. *J Neurophysiol*. 2009; 102:735–751.
- Bacci A, Huguenard JR, Prince DA. Functional autaptic neurotransmission in fast-spiking interneurons: a novel form of feedback inhibition in the neocortex. *J Neurosci*. 2003; 23(3):859-66.
- Baranauskas G, David Y, Fleidervish IA. Spatial mismatch between the Na⁺ flux and spike initiation in axon initial segment. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013; 110:4051–4056.
- Beaulieu C, Somogyi P. Enrichment of cholinergic synaptic terminals on GABAergic neurons and coexistence of immunoreactive GABA and choline acetyltransferase in the same synaptic terminals in the striate cortex of the cat. *J Comp Neurol*. 1991; 304(4):666-80.
- Benavides-Piccione R, Regalado-Reyes M, Fernaud-Espinosa I, Kastanauskaite A, Tapia-Gonzalez S, Leon-Espinosa G, Rojo C, Insausti R, Segev I, Defelipe J. Differential structure of hippocampal CA1 pyramidal neurons in the human and mouse. *Cereb Cortex*. 2020; 30:730–752.
- Bender KJ, Trussell O. The physiology of the axon initial segment. *Annu Rev Neurosci*. 2012; 35:249–265.
- Blazquez-Llorca L, Garcia-Marin V, Defelipe J. Pericellular innervation of neurons expressing abnormally hyperphosphorylated tau in the hippocampal formation of Alzheimer's disease patients. *Front Neuro anat*. 2010; 4:20.
- Blazquez-Llorca L, Woodruff A, Inan M, Anderson SA, Yuste R, Defelipe J, Merchán-Pérez A. Spatial distribution of neurons innervated by chandelier cells. *Brain Struct Funct*. 2015; 220:2817–2834.
- Boiko T, Van Wart A, Caldwell JH, Levinson SR, Trimmer JS, Matthews G. Functional specialization of the axon initial segment by isoform-specific sodium channel targeting. *J Neurosci*. 2003; 23:2306–2313.

- Braitenberg V, Schüz A. *Anatomy of the cortex: Statistics and geometry*. 1991. Springer-Verlag Publishing.
- Buhl EH, Han ZS, Lorinczi Z, Stezhka VV, Karnup SV, Somogyi P. Physiological properties of anatomically identified axo-axonic cells in the rat hippocampus. *J Neurophysiol*. 1994; 71:1289–1307.
- Buzsáki G, Chrobak JJ. Temporal structure in spatially organized neuronal ensembles: a role for interneuronal networks. *Curr Opin Neurobiol*. 1995; 5(4):504-10.
- Buzsáki G, Geisler C, Henze DA, Wang XJ. Interneuron Diversity series: Circuit complexity and axon wiring economy of cortical interneurons. *Trends Neurosci*. 2004; 27(4):186-93.
- Buzsáki G, Wang XJ. Mechanisms of GABA Oscillations. *Annu Rev Neurosci*. 2012; 35: 203–225.
- Cajal SR. Estructura de los centros nerviosos de las aves. *Rev Trim Histol Norm Patol*. 1888; 1: 1-10.
- Cajal SR. Estructura del asta de Ammon. *Anales de la Sociedad Española de Historia Natural*. 1893; 22:53-114.
- Cajal SR. Estudios sobre la corteza cerebral humana I: Corteza visual. *Revista Trimestral Micrográfica*. 1899a; 4:1-63.
- Cajal SR. Estudios sobre la corteza cerebral humana II: Estructura de la corteza motriz del hombre y mamíferos superiores. *Revista Trimestral Micrográfica*. 1899b; 4:117-200.
- Cajal SR. *Histologie du système nerveux de l'homme et des vertébrés*. 1911; (Paris: Maloine).
- Caviness VS Jr. Architectonic map of neocortex of the normal mouse. *J Comp Neurol*. 1975 Nov 15; 164(2):247-63.
- Celio MR. Parvalbumin in most gamma-aminobutyric acid-containing neurons of the rat cerebral cortex. *Science*. 1986; 231(4741):995-7.
- Celio MR. Calbindin D-28k and parvalbumin in the rat nervous system. *Neuroscience*. 1990; 35(2):375-475.
- Chaudhry FA, Reimer RJ, Bellocchio EE, Danbolt NC, Osen KK, Edwards RH, Storm-Mathisen J. The vesicular GABA transporter, VGAT, localizes to synaptic vesicles in sets of glycinergic as well as GABAergic neurons. *J Neurosci*. 1998; 18:9733–9750.
- Cichon J, Gan WB. Branch-specific dendritic Ca²⁺ spikes cause persistent synaptic plasticity. *Nature*. 2015; 520:180–185.
- Cipolloni PB, Peters A. The termination of callosal fibres in the auditory cortex of the rat. A combined Golgi electron microscope and degeneration study. *J Neurocytol*. 1983; 12(5):713-26.
- Cobb SR, Buhl EH, Halasy K, Paulsen O, Somogyi P. Synchronization of neuronal activity in hippocampus by individual GABAergic interneurons. *Nature*. 1995; 378:75–78.
- Czeiger D, White EL. Synapses of extrinsic and intrinsic origin made by callosal projection neurons in mouse visual cortex. *J Comp Neurol*. 1993; 330(4):502-13.
- Cruz DA, Eggan SM, Lewis DA. Postnatal development of pre-and postsynaptic GABA markers at chandelier cell connections with pyramidal neurons in monkey prefrontal cortex. *J Comp Neurol*. 2003; 465:385–400.
- De Carlos JA, Lopez-Mascaraque L, Valverde F. Development, morphology and topography of chandelier cells in the auditory cortex of the cat. *Brain Res*. 1985; 354:293–300.
- De Carlos JA, Lopez-Mascaraque L, Ramon Y Cajal-Agueras S, Valverde F. Chandelier cells in the auditory cortex of monkey and man: a Golgi study. *Exp Brain Res*. 1987; 66:295–302.
- DeFelipe J. Neocortical neuronal diversity: chemical heterogeneity revealed by colocalization studies of classic neurotransmitters, neuropeptides, calcium-binding proteins, and cell surface molecules. *Cereb Cortex*. 1993; 3(4):273-89.

- DeFelipe J. Types of neurons, synaptic connections and chemical characteristics of cells immunoreactive for calbindin-D28K, parvalbumin and calretinin in the neocortex. *J Chem Neuroanat.* 1997a; 14(1):1-19.
- DeFelipe J. Chandelier cells and epilepsy. *Brain.* 1999; 122 (Pt 10):1807-22.
- DeFelipe J. Cortical interneurons: from Cajal to 2001. *Prog Brain Res.* 2002; 136:215-38.
- DeFelipe J. Sesquicentenary of the birthday of Santiago Ramón y Cajal, the father of modern neuroscience. *Trends Neurosci.* 2002; 25(9):481-4.
- DeFelipe J. The dendritic spine story: an intriguing process of discovery. *Front Neuroanat.* 2015; 9:14.
- DeFelipe J, Alonso-Nanclares L, Arellano J, Ballesteros-Yáñez I, Benavides-Piccione R, Muñoz A. Specializations of cortical microstructure of humans. In *The Evolution of Primate Nervous Systems*, Vol. 5. From: Evolution of the Nervous System (ed. JH Kaas). 2007. pp. 167– 190. Oxford: Elsevier.
- DeFelipe J, Alonso-Nanclares L, Blatow M, Caputi A, Monyer H. Anatomical and molecular heterogeneity of cortical GABAergic interneurons. In *Microcircuits: the Interface Between Neurons and Global Brain Function*. Dahlem Workshop Report 93 (ed. S Grillner). 2005; pp. 295– 325. Cambridge, MA: MIT Press.
- DeFelipe J, Fairén A. A type of basket cell in superficial layers of the cat visual cortex. A Golgi-electron microscope study. *Brain Res.* 1982; 244(1):9-16.
- DeFelipe J, Fairén A. Synaptic connections of an interneuron with axonal arcades in the cat visual cortex. *J Neurocytol.* 1988; 17(3):313-23.
- DeFelipe J, Fariñas I. The pyramidal neuron of the cerebral cortex: morphological and chemical characteristics of the synaptic inputs. *Prog Neurobiol.* 1992; 39:563–607.
- DeFelipe J, Fernández-Gil MA, Kastanauskaite A, Bote RP, Presmanes YG, Ruiz MT. Macroanatomy and microanatomy of the temporal lobe. *Semin Ultrasound CT MR.* 2007 Dec; 28(6):404-15
- DeFelipe J, Hendry SH, Hashikawa T, Jones EG. Synaptic relationships of serotonin-immunoreactive terminal baskets on GABA neurons in the cat auditory cortex. *Cereb Cortex.* 1991; 1(2):117-33.
- DeFelipe J, Hendry SH, Jones EG, Schmechel D. 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.* 1985; 231:364–384.
- De Felipe J, Hendry SH, Jones EG. A correlative electron microscopic study of basket cells and large GABAergic neurons in the monkey sensory-motor cortex. *Neuroscience.* 1986; 17:991–1009.
- DeFelipe J, Hendry SH, Jones EG. Visualization of chandelier cell axons by parvalbumin immunoreactivity in monkey cerebral cortex. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1989; 86(6):2093-7.
- DeFelipe J, Jones EG. A light and electron microscopic study of serotonin-immunoreactive fibers and terminals in the monkey sensory-motor cortex. *Exp Brain Res.* 1988; 71(1):171-82.
- DeFelipe J, Jones EG. *Cajal on the Cerebral Cortex*. Oxford University Press, Nueva York. 1988.
- DeFelipe J, Lopez-Cruz PL, Benavides-Piccione R, Bielza C, Larranaga P, Anderson S, Burkhalter A, Cauli B, Fairén A, Feldmeyer D *et al.* Newinsights in to the classification and nomenclature of cortical GABAergic interneurons. *Nat Rev Neurosci.* 2013; 14:202–216.
- DeFelipe J, Rudy B. Neocortical Microcircuits. In *Handbook of Brain Circuits*, second edition (GM Shepherd, S Grillner, eds). Oxford University Press, New York. 2018; pp. 3-22.
- Douglas R, Martin, K. Neocortex. In: Shepherd GM, editor. *The Synaptic Organization of the Brain*. 1990. New York: Oxford University Press. pp. 401-435.
- Eyal G, Mansvelder HD, de Kock CP, Segev I. Dendrites impact the encoding capabilities of the axon. *J Neurosci.* 2014; 34:8063–8071.

- Fairén A, DeFelipe J, Regidor J. Nonpyramidal neurons. General account. In *Cerebral Cortex*, Vol 1. Cellular components of the cerebral cortex. Peters A, Jones EG (eds.). 1984. Plenum. pp. 201-253.
- Fairén A, Smith-Fernández A. Electron microscopy of Golgi-impregnated interneurons: notes on the intrinsic connectivity of the cerebral cortex. *Microsc Res Tech*. 1992; 23(4):289-305.
- Fairén A, Valverde F. A specialized type of neuron in the visual cortex of cat: a Golgi and electron microscope study of chandelier cells. *J Comp Neurol*. 1980; 194(4):761-79.
- Fariñas I, De Felipe J. Patterns of synaptic input on corticocortical and corticothalamic cells in the cat visual cortex. I. The cell body. *J Comp Neurol*. 1991a:304:53–69.
- Fariñas I, De Felipe J. Patterns of synaptic input on corticocortical and corticothalamic cells in the cat visual cortex. II. The axon initial segment. *J Comp Neurol*. 1991b:304:70–77.
- Ferraguti F, Klausberger T, Cobden P, Baude A, Roberts JD, Szucs P, Kinoshita A, Shigemoto R, Somogyi P, Dalezios Y. Metabotropic glutamate receptor 8- expressing nerve terminal target sub-sets of GABAergic neurons in the hippocampus. *J Neurosci*. 2005; 25:10520–10536.
- Fino E, Yuste R. Dense inhibitory connectivity in neocortex. *Neuron*. 2011; 69:1188–1203.
- Fish KN, Hoftman GD, Sheikh W, Kitchens M, Lewis DA. Parvalbumin containing chandelier and basket cell buttons have distinctive modes of maturation in monkey prefrontal cortex. *J Neurosci*. 2013; 33:8352–8358.
- Freund TF, Buzsáki G. Interneurons of the hippocampus. *Hippocampus*. 1996; 6(4):347-470.
- Freund TF, Katona I. Perisomatic inhibition. *Neuron*. 2007; 56:33–42.
- Freund TF, Maglóczy Z, Soltész I, Somogyi P. Synaptic connections, axonal and dendritic patterns of neurons immunoreactive for cholecystokinin in the visual cortex of the cat. *Neuroscience*. 1986; 19(4):1133-59.
- Freund TF, Martin KA, Smith AD, Somogyi P. 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*. 1983; 221(3):263-78.
- Fuentealba P, Tomioka R, Dalezios Y, Marton LF, Studer M, Rockland K, Klausberger T, Somogyi P. Rhythmically active enkephalin expressing GABAergic cells in the CA1 area of the hippocampus project to the subiculum and preferentially innervate interneurons. *J Neurosci*. 2008; 28:10017–10022.
- Goldman-Rakic PS. Regional and cellular fractionation of working memory. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996; 93(24):13473-80.
- Goldman-Rakic PS, Leranth C, Williams SM, Mons N, Geffard M. Dopamine synaptic complex with pyramidal neurons in primate cerebral cortex. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1989; 86(22):9015-9.
- Gonchar Y, Turney S, Price JL, Burkhalter A. Axo-axonic synapses formed by somatostatin-expressing GABAergic neurons in rat and monkey visual cortex. *J Comp Neurol*. 2002; 443(1):1-14.
- González-Cabrera C, Meza R, Ulloa L, Merino-Sepulveda P, Luco V, Sanhueza A, Onate-Ponce A, Bolam JP, Henny P. Characterization of the axon initial segment of mice substantia nigra dopaminergic neurons. *J Comp Neurol*. 2017; 525:3529–3542.
- Gulledge AT, Bravo JJ. Neuron Morphology Influences Axon Initial Segment Plasticity. *eNeuro*. 2016; 3(1):ENEURO.0085-15.2016.
- Gupta A, Wang Y, Markram H. Organizing principles for a diversity of GABAergic interneurons and synapses in the neocortex. *Science*. 2000; 287(5451):273-8.
- Halasy K, Cobb SR, Buhl EH, Nyiri G, Somogyi P. Sites of synaptic junctions established by a GABAergic basket cell on an interneuron in the CA1 area of the rat hippocampus. *Neurobiology (Bp)*. 1996; 4:269–270.

- Hamada MS, Goethals S, de Vries SI, Brette R, Kole MH. Covariation of axon initial segment location and dendritic normalizes the somatic action potential. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2016; 113:14841–14846.
- Harnett MT, Xu NL, Magee JC, Williams SR. Potassium channels control the interaction between active dendritic integration compartments in layer 5 cortical pyramidal neurons. *Neuron*. 2013; 79:516–529.
- Harris KD, Shepherd GM. The neocortical circuit: themes and variations. *Nat Neurosci*. 2015; 18:170–181.
- Helmstaedter M, Sakmann B, Feldmeyer D. Neuronal correlates of local, lateral, and translaminar inhibition with reference to cortical columns. *Cereb Cortex*. 2009; 19:926–937.
- Höflin F, Jack A, Riedel C, Mack-Bucher J, Roos J, Corcelli C, Schultz C, Wahle P, Engelhardt M. Heterogeneity of the axon initial segment in interneurons and pyramidal cells of rodent visual cortex. *Front Cell Neurosci*. 2017; 11:332.
- Houser CR, Crawford GD, Salvaterra PM, Vaughn JE. Immunocytochemical localization of choline acetyltransferase in rat cerebral cortex: a study of cholinergic neurons and synapses. *J Comp Neurol*. 1985; 234(1):17–34.
- Howard A, Tamas G, Soltesz I. Lighting the chandelier: new vistas for axo-axonic cells. *Trends Neurosci*. 2005; 28(6):310–6.
- Hu W, Tian C, Li T, Yang M, Hou H, Shu Y. Distinct contributions of Na_v1.6 and Na_v1.2 in action potential initiation and backpropagation. *Nat Neurosci*. 2009; 12(8):996–1002.
- Hubel DH, Wiesel TN. Functional architecture of macaque monkey visual cortex. *Proceedings of the Royal Society of London*. 1977 Jul 28; 198 (1130):1–59.
- Inan M, Anderson SA. The chandelier cell, form and function. *Curr Opin Neurobiol*. 2014; 26:142–148.
- Inan M, Petros TJ, Anderson SA. Losing your inhibition: linking cortical GABAergic interneurons to schizophrenia. *Neurobiol Dis*. 2013; 53:36–48.
- Inda MC, De Felipe J, Muñoz A. The distribution of chandelier cell axon terminals that express the GABA plasma membrane transporter GAT-1 in the human neocortex. *Cereb Cortex*. 2007; 17:2060–2071.
- Inda MC, De Felipe J, Muñoz A. Morphology and distribution of chandelier cell axon terminals in the mouse cerebral cortex and claustrum/amygdaloid complex. *Cereb Cortex*. 2009; 19:41–54.
- Innocenti GM. Postnatal development of corticocortical connections. *Ital. J Neurol Sci*. 1986; Suppl 5:25–8.
- Ishino Y, Yetman MJ, Sossi SM, Steinecke A, Hayano Y, Taniguchi H. Regional cellular environments shape phenotypic variations of hippocampal and neocortical chandelier cells. *J Neurosci*. 2017; 37:9901–9916.
- Jenkins TW, Truex RC. Dissection of the human brain as a method for its fractionation by weight. *Anat Rec*. 1963 Nov; 147:359–66.
- Jones EG. 1984. Laminar distributions of cortical efferent cells. In: Peters A, Jones EG, editor. *Cerebral Cortex: Cellular components of the cerebral cortex*. 1984. New York: Plenum Press. pp. 521–55.
- Jones EG. Varieties and distribution of non-pyramidal cells in the somatic sensory cortex of the squirrel monkey. *J Comp Neurol*. 1975; 160:205–267.
- Jones EG. Anatomy of cerebral cortex: columnar input-output organization. In: Schmitt FO, F.G. Worden, G. Adelman, and Dennis M, eds. *The cerebral cortex* Cambridge, MA: MIT Press. 1981; pp. 199–235.
- Jones EG. The columnar basis of cortical circuitry. In: Willis WD, editor. *The Clinical Neuroscience* New York: Churchill Livingstone. 1983; pp. 357–383.
- Jones EG, Hendry SHC. Co-localization of GABA and neuropeptides in neocortical neurons. *Trends Neurosci*. 1986; 10, 71–76.

- Jones LS, Svitkina MT. Axonal Initial Segment Cytoskeleton: Architecture, development, and role in neuron polarity. *Neural Plast.* 2016; 2016:6808293.
- Karube F, Kubota Y, Kawaguchi Y. Axon branching and synaptic bouton phenotypes in GABAergic nonpyramidal cell subtypes. *J Neurosci.* 2004; 24:2853–2865.
- Kastanauskaite A, Alonso-Nanclares L, Blazquez-Llorca L, Pastor J, Sola RG, DeFelipe J. Alterations of the microvascular network in sclerotic hippocampi from patients with epilepsy. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2009; 68(8):939-50.
- Kawaguchi Y, Karube F, Kubota Y. Dendritic branch typing and spine expression patterns in cortical nonpyramidal cells. *Cereb Cortex.* 2006; 16(5):696-711.
- Kawaguchi Y, Kubota Y. Correlation of physiological subgroupings of nonpyramidal cells with parvalbumin- and calbindinD28k-immunoreactive neurons in layer V of rat frontal cortex. *J Neurophysiol.* 1993; 70(1):387-96.
- Kawaguchi Y, Kubota Y. GABAergic cell subtypes and their synaptic connections in rat frontal cortex. *Cereb Cortex.* 1997; 7(6):476-86.
- Kawaguchi Y, Kubota Y. Neurochemical features and synaptic connections of large physiologically-identified GABAergic cells in the rat frontal cortex. *Neuroscience.* 1998; 85(3):677-701.
- Kim J, Matney CJ, Blankenship A, Hestrin S, Brown SP. Layer 6 corticothalamic neurons activate a cortical output layer, layer 5a. *J Neurosci.* 2014; 34(29):9656-64.
- Kisvarday ZF. GABAergic networks of basket cells in the visual cortex. *Prog Brain Res.* 1992; 90:385-405.
- Kisvarday ZF, Cowey A, Somogyi P. Synaptic relationships of a type of GABA-immunoreactive neuron (clutch cell), spiny stellate cells and lateral geniculate nucleus afferents in layer IVC of the monkey striate cortex. *Neuroscience.* 1986; 19(3):741-61.
- Kisvarday ZF, Beaulieu C, Eysel UT. Network of GABAergic large basket cells in cat visual cortex (area 18): implication for lateral disinhibition. *J Comp Neurol.* 1993; 327(3):398-415.
- Kisvarday ZF, Martin KA, Friedlander MJ, Somogyi P. Evidence for interlaminar inhibitory circuits in the striate cortex of the cat. *J Comp Neurol.* 1987; 260(1):1-19.
- Kisvarday ZF, Martin KA, Whitteridge D, Somogyi P. Synaptic connections of intracellularly filled clutch cells: a type of small basket cell in the visual cortex of the cat. *J Comp Neurol.* 1985; 241 (2):111-37.
- Klausberger T, Márton LF, Baude A, Roberts JD, Magill PJ, Somogyi P. Spike timing of dendrite-targeting bistratified cells during hippocampal network oscillations in vivo. *Nat Neurosci.* 2004; 7(1):41-7.
- Klausberger T, Marton LF, O'Neill J, Huck JH, Dalezios Y, Fuentealba P, Suen WY, Papp E, Kaneko T, Watanabe M *et al.* Complementary roles of cholecystokinin- and parvalbumin-expressing GABAergic neurons in hippocampal network oscillations. *J Neurosci.* 2005; 25:9782–9793.
- Klausberger T, Somogyi P. Neuronal diversity and temporal dynamics: the unity of hippocampal circuit operations. *Science.* 2008; 321:53–57.
- Kole MH, Brette R. The electrical significance of axon location diversity. *Curr Opin Neurobiol.* 2018; 51:52–59.
- Kole MH, Stuart GJ. Signal processing in the axon initial segment. *Neuron.* 2012; 73:235–247.
- Kole MH, Ilshner SU, Kampa BM, Williams SR, Ruben PC, Stuart GJ. Action potential generation requires a high sodium channel density in the axon initial segment. *Nat Neurosci.* 2008; 11:178–186.
- Krimer LS, Goldman-Rakic PS. Prefrontal microcircuits: membrane properties and excitatory input of local, medium, and wide arbor interneurons. *J Neurosci.* 2001; 21:3788–3796.
- Krubitzer L, Campi KL, Cooke DF. All rodents are not the same: a modern synthesis of cortical organization. *Brain Behav Evol.* 2011; 78(1):51-93.

- Kuba H. Cellular and molecular mechanisms of avian auditory coincidence detection. *Neurosci Res.* 2007; 59(4):370-6.
- Kubota Y, Kondo S, Nomura M, Hatada S, Yamaguchi N, Mohamed AA, Karube F, Lubke J, Kawaguchi Y. Functional effects of distinct innervation styles of pyramidal cells by fast spiking cortical interneurons. *Elife.* 2015; 4.
- Larriva-Sahd JA. Chandelier and interfascicular neurons in the adult mouse piriform cortex. *Front Neuroanat.* 2010; 4:148.
- Lee SH, Marchionni I, Bezaire M, Varga C, Danielson N, Lovett-Barron M, Losonczy A, Soltesz I. Parvalbumin-positive basket cells differentiate among hippocampal pyramidal cells. *Neuron.* 2014; 82:1129–1144.
- León-Espinoza G, Antón-Fernández A, Tapia-González S, DeFelipe J, Muñoz A. Modifications of the axon initial segment during the hibernation of the Syrian hamster. *Brain Struct Funct.* 2018; 223(9):4307-4321.
- Leterrier C. The axon initial segment, 50 Years later: a nexus for neuronal organization and function. *Curr Top Membr.* 2016; 77:185–233.
- Lewis DA, Lund JS. Heterogeneity of chandelier neurons in monkey neocortex: corticotropin-releasing factor –and parvalbumin-immunoreactive populations. *J Comp Neurol.* 1990; 293:599–615.
- Li XG, Somogyi P, Tepper JM, Buzsáki G. Axonal and dendritic arborization of an intracellularly labeled chandelier cell in the CA1 region of rat hippocampus. *Exp Brain Res.* 1992; 90(3):519-25.
- Lorente de Nó R. La corteza cerebral del ratón (Primera contribución- La corteza acústica). *Trabajos del Laboratorio de Investigaciones Biológicas de la Universidad de Madrid.* 1922; 20, 41-78.
- Lorente de Nó R. Studies on the structure of the cerebral cortex. *J Psychol Neurol.* 1933; 45, 381-442.
- Lorente de Nó R. Studies on the structure of the cerebral cortex. II Continuation of the study of the ammonic system. *J Psychol Neurol.* 1934; 46, 113-177.
- Lorincz A, Nusser Z. Cell-type-dependent molecular composition of the axon initial segment. *J Neurosci.* 2008; 28(53):14329-40.
- Lu J, Tucciarone J, Padilla-Coreano N, He M, Gordon JA, Huang ZJ. Selective inhibitory control of pyramidal neuron ensembles and cortical subnetworks by chandelier cells. *Nat Neurosci.* 2017; 20(10):1377-1383.
- Lund JS, Lewis DA. Local circuit neurons of developing and mature macaque prefrontal cortex: Golgi and immunocytochemical characteristics. *J Comp Neurol.* 1993; 328:282–312.
- Lund JS, Lund RD, Hendrickson AE, Bunt AH, Fuchs AF. The origin of efferent pathways from the primary visual cortex, area 17, of the macaque monkey as shown by retrograde transport of horseradish peroxidase. *J Comp Neurol.* 1975; 164(3):287-303.
- Mainen ZF, Joerges J, Huguenard JR, Sejnowski TJ. A model of spike initiation in neocortical pyramidal neurons. *Neuron.* 1995; 15:1427–1439.
- Marin-Padilla M. Origin of the pericellular baskets of the pyramidal cells of the human motor cortex: a Golgi study. *Brain Res.* 1969; 14(3):633-46.
- Marin-Padilla M. Double origin of the pericellular baskets of the pyramidal cells of the human motor cortex: a Golgi study. *Brain Res.* 1972; 38(1):1-12.
- Marin-Padilla M, Stibitz GR. Three-dimensional reconstruction of the basket cell of the human motor cortex. *Brain Res.* 1974; 70(3):511-4.
- Markram H, Toledo-Rodriguez M, Wang Y, Gupta A, Silberberg G, Wu C. Interneurons of the neocortical inhibitory system. *Nat Rev Neurosci.* 2004; 5:793–807.

- Mates SL, Lund JS. Neuronal composition and development in lamina 4C of monkey striate cortex. *J Comp Neurol.* 1983; 221(1):60-90.
- Mendizábal-Zubiaga JL, Reblet C, Bueno-López JL. The underside of the cerebral cortex: layer V/VI spiny inverted neurons. *J Anat.* 2007; 211:223–236.
- Merchán-Pérez A, Rodríguez JR, Ribak CE, De Felipe J. Proximity of excitatory and inhibitory axon terminals adjacent to pyramidal cell bodies provides a putative basis for non-synaptic interactions. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009; 106:9878–9883.
- Meza RC, Lopez-Jury L, Canavier CC, Henny P. Role of the axon initial segment in the control of spontaneous frequency of nigral dopaminergic neurons in vivo. *J Neurosci.* 2018; 38:733–744.
- Miles R, Toth K, Gulyas AI, Hajos N, Freund TF. Differences between somatic and dendritic inhibition in the hippocampus. *Neuron.* 1996; 16:815–823.
- Mountcastle VB. An organization principle for cerebral function: the unit module and the distributed system. In: Mountcastle VB, Edelman, G.M., editor. *The Mindful Brain.* Cambridge. 1978. MA: MIT Press: 7-50
- Mountcastle VB. The columnar organization of the neocortex. *Brain.* 1997 Apr; 120 (Pt 4):701-22.
- Nozari M, Suzuki T, Rosa MG, Yamakawa K, Atapour N. The impact of early environmental interventions on structural plasticity of the axon initial segment in neocortex. *Dev Psychobiol.* 2017; 59(1):39-47.
- Okhotin VE, Kalinichenko SG. The histophysiology of neocortical basket cells. *Neurosci Behav Physiol.* 2002; 32(5):455-70.
- Packer AM, Yuste R. Dense, unspecific connectivity of neocortical parvalbumin-positive interneurons: a canonical microcircuit for inhibition? *J Neurosci.* 2011; 31:13260–13271.
- Packer AM, McConnell DJ, Fino E, Yuste R. Axo-dendritic overlap and laminar projection can explain interneuron connectivity to pyramidal cells. *Cereb Cortex.* 2013; 23:2790–2802.
- Palmer LM, Stuart GJ. Site of action potential initiation in layer 5 pyramidal neurons. *J Neurosci.* 2006; 26:1854–1863.
- Palmer LM, Clark BA, Grundemann J, Roth A, Stuart GJ, Hausser M. Initiation of simple and complex spikes in cerebellar Purkinje cells. *J Physiol.* 2010; 588:1709–1717.
- Paul A, Crow M, Raudales R, He M, Gillis J, Huang ZJ. Transcriptional architecture of synaptic communication delineates GABAergic neuron identity. *Cell.* 2017; 171:522, e520–539.
- Paxinos G, Franklin K. Paxinos and Franklin's the Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates. 2019. Elsevier, 5ed.
- Peters A, Fairén A. 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.* 1978; 181(1):129-71.
- Peters A, Jones EG. eds. Cellular components of the cerebral cortex. Vol 1. *Cerebral Cortex* (New York: Plenum Press). 1984.
- Peters A, Proskauer CC. Synaptic relationships between a multipolar stellate cell and a pyramidal neuron in the rat visual cortex. A combined Golgi-electron microscope study. *J Neurocytol.* 1980; 9(2):163-83.
- Peters A, Proskauer CC, Kaiserman-Abramof IR. The small pyramidal neuron of the rat cerebral cortex. The axon hillock and initial segment. *J Cell Biol.* 1968; 39:604–619.
- Peters A, Proskauer CC, Ribak CE. Chandelier cells in rat visual cortex. *J Comp Neurol.* 1982; 206(4):397-416.
- Raghuram V, Werginz P, Fried SI. Scaling of the AIS and soma-to dendritic compartments in alpha SRGCs. *Front Cell Neurosci.* 2019; 13:436.
- Papadopoulos GC, Parnavelas JG, Buijs RM. Light and electron microscopic immunocytochemical analysis of the dopamine innervation of the rat visual cortex. *J Neurocytol.* 1989; 18(3):303-10.

- Porter LL, White EL. Synaptic connections of callosal projection neurons in the vibrissal region of mouse primary motor cortex: an electron microscopic/horseradish peroxidase study. *J Comp Neurol.* 1986; 248(4):573-87.
- Rasband MN. The axon initial segment and the maintenance of neuronal polarity. *Nat Rev Neurosci.* 2010; 11:552–562.
- Schmidt-Hieber C, Toleikyte G, Aitchison L, Roth A, Clark BA, Branco T, Hausser M. Active dendritic integration as a mechanism for robust and precise grid cell firing. *Nat Neurosci.* 2017; 20:1114–1121.
- Schuman B, Machold RP, Hashikawa Y, Fuzik J, Fishell GJ, Rudy B. Four unique interneuron populations reside in neocortical layer1. *J Neurosci.* 2019; 39:125–139.
- Schindelin J, Arganda-Carreras I, Frise E, Kaynig V, Longair M, Pietzsch T, Preibisch S, Rueden C, Saalfeld S, Schmid B, Tinevez JY, White DJ, Hartenstein V, Eliceiri K, Tomancak P, Cardona A. Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat Methods.* 2012; 9(7):676-82.
- Schatz C. Abnormal interhemispheric connections in the visual system of Boston Siamese cats: a physiological study. *J Comp Neurol.* 1977; 171(2):229-45.
- Sloper JJ, Powell TP. 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 Ser B Biol Sci.* 1979; 285:173–197.
- Smith SL, Smith IT, Branco T, Hausser M. Dendritic spikes enhance stimulus selectivity in cortical neurons in vivo. *Nature.* 2013; 503:115–120.
- Somogyi P. Aspecific 'axo-axonal' interneuron in the visual cortex of the rat. *Brain Res.* 1977; 136:345–350.
- Somogyi P, Freund TF, Cowey A. The axo-axonic interneuron in the cerebral cortex of the rat, cat and monkey. *Neuroscience.* 1982; 7:2577–2607.
- Somogyi P, Freund TF, Hodgson AJ, Somogyi J, Beroukas D, Chubb IW. Identified axo-axonic cells are immunoreactive for GABA in the hippocampus and visual cortex of the cat. *Brain Res.* 1985; 332:143–149.
- Somogyi P, Kisvárdy ZF, Martin KA, Whitteridge D. Synaptic connections of morphologically identified and physiologically characterized large basket cells in the striate cortex of cat. *Neuroscience.* 1983; 10(2):261-94.
- Somogyi P, Smith AD, Nunzi MG, Gorio A, Takagi H, Wu JY. Glutamate decarboxylase immunoreactivity in the hippocampus of the cat: distribution of immunoreactive synaptic terminals with special reference to the axon initial segment of pyramidal neurons. *J Neurosci.* 1983b; 3:1450–1468.
- Somogyi P, Soltész I. Immunogold demonstration of GABA in synaptic terminals of intracellularly recorded, horseradish peroxidase-filled basket cells and clutch cells in the cat's visual cortex. *Neuroscience.* 1986; 19(4):1051-65.
- Somogyi P, Tamas G, Lujan R, Buhl EH. Salient features of synaptic organisation in the cerebral cortex. *Brain Res Brain Res Rev.* 1998; 26:113–135.
- Spruston N. Pyramidal neurons: dendritic structure and synaptic integration. *Nat Rev Neurosci.* 2008; 9(3):206-21.
- Stuart GJ, Sakmann B. Active propagation of somatic action potentials into neocortical pyramidal cell dendrites. *Nature.* 1994; 367(6458):69-72.
- Stuart G, Schiller J, Sakmann B. Action potential initiation and propagation in rat neocortical pyramidal neurons. *J Physiol.* 1997; 505 (Pt 3) (Pt 3):617-32.
- Stuart G, Spruston N. Determinants of voltage attenuation in neocortical pyramidal neuron dendrites. *J Neurosci.* 1998; 18:3501–3510.
- Shang Z, Huang J, Liu N, Zhang X. Bi-directional Control of Synaptic Input Summation and Spike Generation by GABAergic Inputs at the Axon Initial Segment. *Neurosci Bull.* 2022.

- Szabo GG, Du X, Oijala M, Varga C, Parent JM, Soltesz I. Extended interneuronal network of the dentate gyrus. *Cell Rep.* 2017; 20:1262–1268.
- Szentágothai J, Arbib MA. Conceptual models of neural organization. *Neurosci Res Program Bull.* 1974; 12(3):305-510.
- Tai Y, Janas JA, Wang CL, Van Aelst L. Regulation of chandelier cell cartridge and bouton development via DOCK7-mediated ErbB4 activation. *Cell Rep.* 2014; 6:254–263.
- Takacs VT, Freund TF, Nyiri G. Neuroligin 2 is expressed in synapses established by cholinergic cells in the mouse brain. *P Lo S One.* 2013; 8:e72450.
- Takacs VT, Szonyi A, Freund TF, Nyiri G, Gulyas AI. Quantitative ultrastructural analysis of basket and axo-axonic cell terminals in the mouse hippocampus. *Brain Struct Funct.* 2015; 220:919–940.
- Takahashi N, Oertner TG, Hegemann P, Larkum ME. Active cortical dendrites modulate perception. *Science.* 2016; 354:1587–1590.
- Tamás G, Buhl EH, Somogyi P. Fast IPSPs elicited via multiple synaptic release sites by different types of GABAergic neurone in the cat visual cortex. *J Physiol.* 1997a; 500 (Pt 3) (Pt 3):715-38.
- Tamás G, Somogyi P, Buhl EH. Differentially interconnected networks of GABAergic interneurons in the visual cortex of the cat. *J Neurosci.* 1998; 18(11):4255-70.
- Tamás G, Szabadics J. Summation of unitary IPSPs elicited by identified axo-axonic interneurons. *Cereb Cortex.* 2004; 14:823–826.
- Taniguchi H, Lu J, Huang ZJ. The spatial and temporal origin of chandelier cells in mouse neocortex. *Science.* 2013; 339:70–74.
- Thome C, Kelly T, Yanez A, Schultz C, Engelhardt M, Cambridge SB, Both M, Draguhn A, Beck H, Egorov AV. Axon-carrying dendrites convey privileged synaptic input in hippocampal neurons. *Neuron.* 2014; 83:1418–1430.
- Thomson AM. Neocortical layer 6, a review. *Front Neuroanat.* 2010; 4:13.
- Thomson AM, Deuchars J. Synaptic interactions in neocortical local circuits: dual intracellular recordings in vitro. *Cereb Cortex.* 1997; 7(6):510-22.
- Thomson AM, Lamy C. Functional maps of neocortical local circuitry. *Front Neurosci.* 2007; 1(1):19-42.
- Thomson AM, West DC, Hahn J, Deuchars J. Single axon IPSPs elicited in pyramidal cells by three classes of interneurons in slices of rat neocortex. *J Physiol.* 1996; 496 (Pt 1) (Pt 1):81-102.
- Tremblay R, Lee S, Rudy B. GABAergic interneurons in the neocortex: from cellular properties to circuits. *Neuron.* 2016; 91:260–292.
- Uematsu M, Hirai Y, Karube F, Ebihara S, Kato M, Abe K, Obata K, Yoshida S, Hirabayashi M, Yanagawa Y *et al.* Quantitative chemical composition of cortical GABAergic neurons revealed in transgenic venus-expressing rats. *Cereb Cortex.* 2008; 18:315–330.
- Urrutia-Piñones J, Morales-Moraga C, Sanguinetti-González N, Escobar AP, Chiu CQ. Long-Range GABAergic Projections of Cortical Origin in Brain Function. *Front Syst Neurosci.* 2022; 16:841869.
- Van Wart A, Trimmer JS, Matthews G. Polarized distribution of ion channels within microdomains of the axon initial segment. *J Comp Neurol.* 2007; 500:339–352.
- Varga C, Lee SY, Soltesz I. Target-selective GABAergic control of entorhinal cortex output. *Nat Neurosci.* 2010; 13:822–824.
- Varga C, Oijala M, Lish J, Szabo GG, Bezaire M, Marchionni I, Golshani P, Soltesz I. Functional fission of parvalbumin in interneuron classes during fast network events. *Elife.* 2014; 3.

- Vereczki VK, Veres JM, Muller K, Nagy GA, Racz B, Barsy B, Hajos N. Synaptic organization of perisomatic GABAergic inputs on to the principal cells of the mouse basolateral amygdala. *Front Neuroanat.* 2016; 10:20.
- Veres JM, Nagy GA, Vereczki VK, Andrasi T, Hajos N. Strategically positioned inhibitory synapses of axo-axonic cells potentially control principal neuron spiking in the basolateral amygdala. *J Neurosci.* 2014; 34:16194–16206.
- Wang X, Sun QQ. Characterization of axo-axonic synapses in the piriform cortex of *Mus musculus*. *J Comp Neurol.* 2012; 520:832–847.
- Wang X, Hooks BM, Sun QQ. Thorough GABAergic innervation of the entire axon initial segment revealed by an optogenetic 'laser-spritzer'. *J Physiol.* 2014; 592:4257–4276.
- Wang X, Tucciarone J, Jiang S, Yin F, Wang BS, Wang D, Jia Y, Jia X, Li Y, Yang T et al. Genetic single neuron anatomy reveals fine granularity of cortical axo-axonic cells. *Cell Rep.* 2019; 26:3145, e3145–3159.
- Wang Y, Gupta A, Toledo-Rodriguez M, Wu CZ, Markram H. Anatomical, physiological, molecular and circuit properties of nest basket cells in the developing somatosensory cortex. *Cereb Cortex.* 2002; 12:395–410.
- Wefelmeyer W, Cattaert D, Burrone J. Activity-dependent mis-match between axo-axonic synapses and the axon initial segment controls neuronal output. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2015; 112:9757–9762.
- White EL. Cortical circuits: synaptic organization of the cerebral cortex (Boston: Birkhäuser Boston). 1989.
- White EL, Czeiger D. Synapses made by axons of callosal projection neurons in mouse somatosensory cortex: emphasis on intrinsic connections. *J Comp Neurol.* 1991; 303(2):233–44.
- Xu NL, Harnett MT, Williams SR, Huber D, O'Connor DH, Svoboda K, Magee JC. Nonlinear dendritic integration of sensory and motor input during an active sensing task. *Nature.* 2012; 492:247–251.
- Yamada R, Kuba H. Structural and Functional Plasticity at the Axon Initial Segment. *Front Cell Neurosci.* 2016; 10:250.
- Yuste R, Hawrylycz M, Aalling N, et al. A community-based transcriptomics classification and nomenclature of neocortical cell types. *Nat Neurosci.* 2020; 23(12):1456–1468.
- Zaitsev AV, Povysheva NV, Gonzalez-Burgos G, Rotaru D, Fish KN, Krimer LS, Lewis DA. Interneuron diversity in layers 2–3 of monkey prefrontal cortex. *Cereb Cortex.* 2009; 19(7):1597–615.
- Zhu Y, Stornetta RL, Zhu JJ. Chandelier cells control excessive cortical excitation: characteristics of whisker-evoked synaptic responses of layer 2/3 nonpyramidal and pyramidal neurons. *J Neurosci.* 2004; 24(22):5101–8.

Quantitative analysis of the GABAergic innervation of the soma and axon initial segment of pyramidal cells in the human and mouse neocortex

Sandra Ostos^{1,2}, Guillermo Aparicio^{1,2}, Isabel Fernaund-Espinosa^{1,2}, Javier DeFelipe^{1,2,3}, Alberto Muñoz^{1,2,4,*}

¹Departamento de Neurobiología Funcional y de Sistemas, Instituto Cajal (CSIC), Avenida Doctor Arce 37, 28002, Madrid, Spain,

²Laboratorio Cajal de Circuitos Corticales (CTB), Universidad Politécnica de Madrid, Campus de Montegancedo, 28223, Pozuelo de Alarcón, Madrid, Spain,

³CIBERNED, Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Neurodegenerativas, Avenida Monforte de Lemos, 3-5, 28029 Madrid, Spain,

⁴Departamento de Biología Celular, Universidad Complutense, José Antonio Novais 12, 28040 Madrid, Spain

*Corresponding author: Laboratorio Cajal de Circuitos Corticales, Centro de Tecnología Biomédica, Universidad Politécnica, Madrid, Pozuelo de Alarcón, Madrid 28223, Spain. Email: amunozc@bio.ucm.es

Perisomatic GABAergic innervation in the cerebral cortex is carried out mostly by basket and chandelier cells, which differentially participate in the control of pyramidal cell action potential output and synchronization. These cells establish multiple synapses with the cell body (and proximal dendrites) and the axon initial segment (AIS) of pyramidal neurons, respectively. Using multiple immunofluorescence, confocal microscopy and 3D quantification techniques, we have estimated the number and density of GABAergic boutons on the cell body and AIS of pyramidal neurons located through cortical layers of the human and mouse neocortex. The results revealed, in both species, that there is clear variability across layers regarding the density and number of perisomatic GABAergic boutons. We found a positive linear correlation between the surface area of the soma, or the AIS, and the number of GABAergic terminals in apposition to these 2 neuronal domains. Furthermore, the density of perisomatic GABAergic boutons was higher in the human cortex than in the mouse. These results suggest a selectivity for the GABAergic innervation of the cell body and AIS that might be related to the different functional attributes of the microcircuits in which neurons from different layers are involved in both human and mouse.

Key words: axon initial segment; basket cells; chandelier cells; perisomatic inhibition; vesicular GABA transporter.

The mammalian cerebral cortex contains, in general, 2 major neuronal cell types: (i) pyramidal cells, which represent the majority of projection neurons, are the most abundant cortical neurons, are excitatory and use glutamate as a neurotransmitter, and (ii) nonpyramidal inhibitory GABAergic neurons, the majority of which are local circuit neurons that control the activity of both pyramidal neurons and GABAergic cells (Ribak 1978; Houser et al. 1983; DeFelipe and Farinas, 1992; Kubota et al. 2011; Lee et al. 2012; Kubota 2014; Tremblay et al. 2016). There is considerable diversity with regard to interneuron types, considering their developmental origin; the morphology of their somata, dendrites, and axonal arborizations; their electrophysiological and molecular characteristics; and their synaptic relationship with pyramidal neurons (for review, see Ascoli et al. 2008; Rudy et al. 2011; Inan et al. 2012; Taniguchi 2014; Staiger et al. 2015; Feldmeyer et al. 2018; Yuste et al. 2020; Gouwens et al. 2020). In particular, perisomatic GABAergic interneurons include basket and chandelier cells that, respectively, establish multiple connections with the cell body (and proximal dendrites) and axon initial segment (AIS) of pyramidal cells. These interneurons participate in the control of pyramidal cell action

potential output and synchronization and in network activity, directly and/or indirectly via interneuron–interneuron connections (Cobb et al. 1995; Miles et al. 1996; Klausberger et al. 2003, 2005; Freund and Katona 2007; Ellender and Paulsen 2010; Armstrong and Soltesz 2012; Bartos and Elgueta 2012; Tremblay et al. 2016; DeFelipe and Rudy 2018).

Basket cell activity has been shown to affect learning and memory processes, sensory processing, and critical-period plasticity and defects in the functioning of these cells have been linked to neurological and psychiatric disorders such as epilepsy, autism, Alzheimer's disease, and schizophrenia (Rubenstein and Merzenich 2003; Poullie and Scanziani, 2004; Lewis et al. 2005; Ogiwara et al. 2007; Gibson et al. 2009; Gonzalez-Burgos et al. 2010; Armstrong and Soltesz 2012; Lee et al. 2012; Verret et al. 2012; Trouche et al. 2013; Kuhlman et al. 2013). Similarly, alterations in chandelier cells in humans have been associated with several neurological diseases, in particular epilepsy, schizophrenia, and autism (for reviews, see DeFelipe 1999; Lewis et al. 2012; Marin 2012; Inan et al. 2013; Gallo et al. 2020).

In the primate neocortex, both in the monkey (e.g. DeFelipe et al. 1999; Povysheva et al. 2008;

Zaitsev et al. 2009) and in humans (Yanez et al. 2005; Benavides-Piccione and DeFelipe 2007; Inda et al. 2007; Blazquez-Llorca et al. 2010), it has become increasingly evident that the physiological properties, distribution, and connections of interneurons are not homogeneous across cortical regions or layers. Regarding perisomatic innervation by basket cells, previous studies from our laboratory described the existence—in the human neocortex—of a subset of pyramidal neurons densely innervated by complex basket formations, showing differences in density and distribution patterns between different cytoarchitectonic areas and cortical layers (Blazquez-Llorca et al. 2010). Similarly, it is clear that there is heterogeneity in the density and laminar distribution of pyramidal neurons innervated by chandelier terminals in the mouse and human neocortex (Inda et al. 2007, 2009). Since pyramidal neurons from different cortical layers project to different cortical and subcortical targets, and different morphological, physiological, and transcriptomic phenotypes are present in different layers (DeFelipe 2011; Berg et al. 2021), it is important to determine the number and density of the perisomatic and peri-AIS inhibitory boutons that they receive, in order to gain insight into how basket and chandelier cells might modulate the different cortical microcircuits. However, the densities of perisomatic and peri-AIS boutons have not yet been quantified in all layers of the cerebral cortex. In the present study, we used immunofluorescence techniques with antibodies to vGAT, NeuN, β IV-spectrin, and ankyrin G (c20) and quantitative confocal microscopy to estimate, in 3D, the density of perisomatic GABAergic inhibition of neurons in each cortical layer of the human temporal neocortex—in biopsy material from non-epileptogenic regions obtained during the surgical treatment of patients suffering temporal lobe epilepsy. In addition, similar studies were performed in the hind limb representation in the mouse primary somatosensory (HLS1) cortex, a region that is frequently used to model cortical circuitry. In both species, we have quantified the number and density of perisomatic punctate elements positive for the vesicular GABA transporter vGAT, known to correspond to GABAergic inhibitory axon terminals (Chaudhry et al. 1998; Minelli et al. 2003), in apposition to the neuronal somata or the AIS of pyramidal neurons in cortical layers II–VI and layer I neurons. The results reveal that there are significant differences in the density of GABAergic innervation of the soma and the AIS between neurons in different cortical layers with similar patterns of innervation humans and mice.

Materials and methods

Tissue processing and image acquisition

The human brain tissue used in the present study was also used in previous studies (Arellano et al. 2004; Inda et al. 2006; Antón-Fernández et al. 2015; Cano-Astorga et al. 2021). Briefly, human neocortical tissue from the anterolateral temporal cortex was obtained by surgical

resection from 3 male and 2 female patients diagnosed with intractable temporal lobe epilepsy with a mesial origin (age range: 20–41 years; see Table 1 for medical history). In addition, brain tissue from one non-epileptic, 36-year-old-male patient (H60) with a tumor at the base of the temporal lobe was used. All epileptic 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 the ethical committee of the “Hospital de la Princesa” (Madrid). During surgery, electrocorticography was performed with a grid of 4 X 5 electrodes embedded in Sylastic. The electrodes were placed directly over the exposed lateral temporal cortex, and were 1.2 mm in diameter with a 1-cm center-to-center interelectrode distance (Add-Tech, Racine, WI). Recordings were sampled at 400 Hz with a bandwidth of 1–70 Hz over a minimum period of 20 min, 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 were observed. Photographs of the placement of the electrodes were taken before grid removal, and the anatomical locations of the spiking and nonspiking areas were defined before tissue excision. In all cases, tailored temporal lobectomy and amygdalohippocampectomy were performed under electrocorticographical 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 12 h at 4°C. Vibratome sections (100- μ m thick) were processed for multiple immunostaining.

In addition, we used brain tissue from six 8-week-old male C57BL/6J mice obtained from the animal facility of the Instituto Cajal (CSIC). All experiments were performed in accordance with the guidelines established by the European Union regarding the use and care of laboratory animals (86/609/EEC). Animals were sacrificed by a lethal intraperitoneal injection of sodium pentobarbital (200 mg/kg b.w.) and were then perfused intracardially with a saline solution followed by 4% paraformaldehyde in 0.1-M phosphate buffer (pH 7.4; PB). The brain of each animal was removed, postfixed by immersion in the same fixative for 24 h at 4°C, cryoprotected in a 30% sucrose solution in PB until they sunk, and frozen in dry ice. Serial coronal sections (50- μ m thick) were

Table 1. Summary of clinical and surgical data.

Patient	Age (years), sex, side	Age of onset, duration (years)	Possible precipitating event	Status epilepticus (age, duration)	Seizure type	Seizure frequency	Engel scale for surgical outcome (time after surgery in months)
H47	41, F, L	15, 26	Low grade ganglioglioma located at the base of the temporal lobe	No	PC	1.5/week	NA
H48	41, M, L	18, 23	None	No	PC, gen	1/week	I (79)
H60	36, M, L	NA	Low grade ganglioglioma located at the base of the temporal lobe	NA	NA	NA	NA
H94	27, M, L	20, 7	Birth problems, head trauma 3 weeks before seizures	No	PC, gen	3–5/week	I (43)
H104	32, M, L	12, 20	Febrile seizures, 10 months	No	PC	1–3/week	I (15)
H136	20, F, R	0.7, 19	Febrile seizures, 8 months	16 years old, 2.5 h	PC, gen	0.5/week	I (28)

M = male; F = female; R = right; L = left; PC = partial complex; PC, gen = partial complex, sometimes secondarily generalized; Engel scale (Engel et al. 1993) = class I, seizure-free. NA = not available.

obtained with a freezing sliding microtome (Microm HM 450, Microm International, Germany). For immunostaining, both mouse and human brain sections were rinsed in PB and, to block nonspecific antibody binding, they were then preincubated for 1 h at room temperature in a stock solution containing 3% normal goat serum (Vector Laboratories, Burlingame, CA) in PB with Triton X-100 (0.25%). To study GABAergic axon terminals in apposition to neuronal cell bodies of both species, one series of sections was incubated for 72 h in the same stock solution with rabbit anti-vGAT (1:2,000, Synaptic Systems, Germany) and mouse anti-NeuN (1:2,000, Chemicon) antibodies. After rinsing in PB, the sections were incubated for 2 h at room temperature in Alexa 647-coupled goat anti-rabbit and Alexa 594-coupled goat anti-mouse antibodies (1:1,000; Molecular Probes).

To study the GABAergic axon terminals in apposition to AISs in human neocortex, a second set of sections was incubated in stock solution with guinea pig anti-vGAT (1:200, Vector Laboratories), rabbit β IV spectrin (1:1,000, Gift from Matthew Rasband, Baylor College of Medicine, United States), and mouse anti-NeuN (1:2,000, Chemicon) antibodies. After rinsing in PB, the sections were incubated with biotinylated horse anti-guinea pig antibody (1:200) for 2 h, followed by Alexa 647 streptavidin (Molecular Probes/Invitrogen 1:1,000), Alexa 488-coupled donkey anti-rabbit (Molecular Probes/Invitrogen 1:1,000), and Alexa 594-coupled donkey anti-mouse (Molecular Probes/Invitrogen 1:500) antibodies. To study the GABAergic axon terminals in apposition to AISs in mouse neocortex, a second set of sections was incubated in stock solution with c-20 goat anti-Grasp65 (1:500;

Santa Cruz, CA, United States, known to bind Ankyrin G and to label AISs, León-Espinosa et al. 2018), rabbit anti-vGAT (1:2,000, Synaptic Systems, Germany), and mouse anti-NeuN (1:2,000, Chemicon) antibodies. After rinsing in PB, the sections were incubated with biotinylated horse anti-mouse antibody (1:200) for 2 h, followed by Alexa 647 streptavidin (Molecular Probes/Invitrogen 1:1,000), Alexa 488-coupled donkey anti-goat (Molecular Probes/Invitrogen 1:1,000), and Alexa 555-coupled donkey anti-rabbit (Molecular Probes/Invitrogen 1:500) antibodies.

In all cases, the sections were rinsed and stained with 4,6 diamino-2-phenylindole (DAPI; Sigma, St Louis, MO) to reveal cellular nuclei allowing the visualization of borders between layers and cytoarchitectonical areas.

The sections were then washed in PB, mounted in antifade mounting medium (ProlongGold, Molecular Probes/Invitrogen, Eugene, OR) and studied by confocal microscopy (Zeiss, LSM710). At least 15 microscopic fields were selected from each case and cortical layer of the human temporal neocortex and mouse HLS1 following the Paxinos and Franklin (2001) atlas. From each microscopic field, a confocal stack of images was taken including at least the complete cell body or AIS from 1 neuron. Z sections were recorded at 0.14- μ m intervals through separate channels using a 63 $\times$ lens (NA = 1.4; zoom = 2.3). ZEN 2012 software (Zeiss) was used to construct composite images from each optical series by combining the images recorded through the different channels and Adobe Photoshop CS4 or Imaris software was used to generate the figures (Adobe Systems Inc., San Jose, CA). Controls were included in all of the immunocytochemical procedures, either by

replacing the primary antibodies with preimmune goat serum in some sections, by omitting the secondary antibodies, or by replacing the secondary antibodies with inappropriate secondary antibodies. No significant immunolabeling was detected under these control conditions.

Density of neuropil GABAergic terminals

To estimate the total density of vGAT immunoreactive (–ir) GABAergic terminals in the neuropil in each cortical layer of both species, confocal stacks from each case were visualized, threshold segmented, counted, and reconstructed in 3D using Fiji software (3D object counter tool), which provides the volume of the counting frame and the number of immunoreactive elements inside the frame.

Density of GABAergic terminals in apposition to neuronal cell bodies

GABAergic terminals were segmented in confocal stack images with Imaris software (7.6.4, Bitplane, Switzerland) by creating threshold-based surface objects in the channel where the vGAT immunoreactivity was acquired. Out of this set of objects, we individually selected those GABAergic terminals in contact with the surface of the soma of particular neurons that were completely included within the tissue thickness in which both NeuN and GABAergic antibodies penetrated ([Supplementary Fig. S1](#) and [Supplementary Video S1](#)). For this purpose, in each of the confocal image stacks, we created a 3D surface based on an intensity threshold of NeuN immunostaining corresponding to the neuronal cell body. The surface area of this object was quantified (using Imaris software) and considered as the neuronal cell body surface area. Subsequently, a second enlarged surface was created taking a different threshold so that the radius of the resulting object was $\sim 0.3\text{-}\mu\text{m}$ larger than the first one. This second surface was employed to mask the channel containing the vGAT-ir elements outside the outer surface, whereas the inner surface was used to mask the possible immunostained background inside the cell body. The only vGAT-ir elements kept were those located in the tissue volume contained between the 2 masks, which represent the vGAT-ir puncta in apposition to the neuronal surface. These elements were counted for every neuron analyzed. To estimate the density of perisomatic inhibition on each neuron, we divided the number of perisomatic vGAT-ir elements by the neuronal cell body surface area.

Density of GABAergic terminals in apposition to AISs

To estimate the density of GABAergic terminals in apposition to each AIS, Imaris software was used to create 3D surfaces based on intensity thresholds for (i) AIS immunostaining and (ii) vGAT-ir puncta. The area of the 3D object in the AIS immunostaining channel was extracted and subsequently used to calculate density values. vGAT-ir puncta surface objects in contact with

this AIS-based surface were identified and counted in at least 15 neurons per cortical layer and case. To estimate the density of AIS inhibition on each neuron, we divided the number of peri-AIS vGAT-ir puncta by the AIS surface area.

To analyze the length and mean diameter of AISs, we used the Filament Tracer tool from Imaris software creating filament objects corresponding to the AIS of the neurons. Filament objects created with this software tool provide the appropriate morphological data while maintaining the length and diameter AISs as visualized in the confocal stacks. In addition, we marked the position of each vGAT-ir terminal in contact with the AIS-filament using a “spine” marker tool in order to analyze the distribution of these terminals along the AIS.

Tissue shrinkage correction and statistics

Values obtained during the measurements of tissue volume and surface area of neuronal somata and AISs were corrected for shrinkage, as brain tissue shrinks during processing. To estimate the shrinkage in our samples, we measured the surface area and thickness of sections in photographs taken from sections before and after tissue processing for immunofluorescence. In each section used, the section surface area after processing, measured with the aid of Adobe Photoshop, was divided by the values obtained before processing. The resulting numbers were averaged to obtain an area shrinkage factor (p_2) of 0.8066 and 0.7538 for mouse and human tissue, respectively. Similarly, we measured the total section thickness at multiple points (>10) of each section, before and after tissue processing, with a Nikon microscope equipped with a motorized stage and with the aid of Stereo Investigator software. After averaging the mean values from all sections, we obtained linear shrinkage factors in the z-axis (p_Z) of 0.8960 and 0.6851 for mouse and human tissue, respectively. For correction of tissue volume, we used volume shrinkage factors ($p_3 = p_2 \times p_Z$) of 0.7227 and 0.5164 for mouse and human tissue, respectively.

Finally, the values obtained for the different variables analyzed were compared with the aid of SPSS package software to explore possible differences between cases and cortical layers, and to explore the possible correlations between variables. Kruskal–Wallis nonparametric test was used to detect differences between values obtained from different cases and between layers.

Results

In the present study, we estimated the density of neuropil GABAergic axon terminals and the surface area of neuronal cell bodies and AISs, as well as the number and density of GABAergic terminals in apposition to neuronal cell bodies and AISs in all layers of the human temporal neocortex and the mouse HLS1 cortex. In all layers, except in layer I (in which most neurons are GABAergic; e.g. [Schuman et al. 2019](#)), the NeuN-ir neurons examined

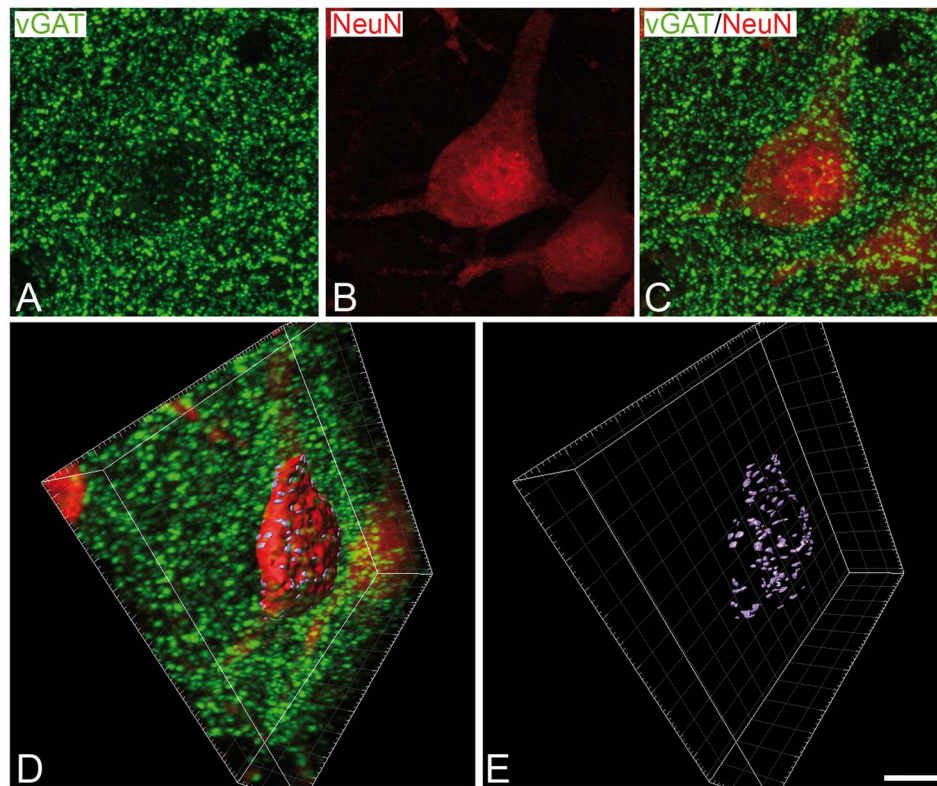


Fig. 1. A–C) Confocal projection images from layer III of the human temporal neocortex showing the relationship between GABAergic axon terminals and neuronal cell bodies, immunostained for vGAT and NeuN, respectively. D, E) Shows the rotation of the same image series in which a digital surface (red), adjusted to the soma of a neuronal cell body, was created (Imaris software) in order to measure neuronal surface area and to segment and quantify GABAergic perisomatic terminals, shown in gray in (D) and (E). Scale bar in (E) indicates 8 μm in all panels.

in 3D were identified as pyramidal cells because they showed a prominent, thick apical dendrite. Thus, unless otherwise specified, we will refer to pyramidal cells in the present text.

Density of neuropil GABAergic terminals across layers

In a first set of sections, double immunostained for NeuN and vGAT (Figs. 1 and 2), we estimated the density of GABAergic terminals. The densities of vGAT-ir punctate elements were quantified in the neuropil of the different cortical layers of the human temporal neocortex from 6 subjects (Fig. 3A) and HLS1 neocortex from 5 mice (Fig. 4A). For each cortical layer and case, at least 15 confocal image stacks were used. These stacks were cropped in the z-axis to ensure that the vGAT immunostaining was homogeneous throughout the different sections of the stacks. The total volumes analyzed in the different cortical layers of human and mouse neocortex were $3.7 \times 10^7 \mu\text{m}^3$ (range: 2.7×10^4 – $1.6 \times 10^5 \mu\text{m}^3$) and $1.7 \times 10^7 \mu\text{m}^3$ (range: 1.5×10^4 – $6.7 \times 10^4 \mu\text{m}^3$), respectively.

We analyzed the laminar distribution of vGAT-ir puncta in both species by grouping data from all cases (Figs. 3A and 4A, Tables 2 and 3). In the human temporal neocortex, we found that the density of neuropil vGAT-ir punctate elements was highest in layer IV followed

by layers III and V, lower still in layer II, and lowest in layers I and VI (Fig. 3A, see Table 4 for P-values of statistical comparisons). This laminar pattern of distribution was relatively constant between cases. By contrast, in the mouse somatosensory cortex, the density of neuropil vGAT-ir punctate elements was homogeneous in layers I–IV, with significantly lower values in layers V and VI (Fig. 4A, see Table 5 for P-values of statistical comparisons).

Density of GABAergic terminals in apposition to neuronal cell bodies

Neuronal cell body surface area

We then analyzed in 3D the surface area of the cell body of NeuN-ir neurons in the different cortical layers by measuring the surfaces created based on NeuN immunostaining (Figs. 1 and 2). In both species, at least 15 neurons were analyzed in each cortical layer and case (total $n = 540$ in humans and $n = 450$ in mice). We averaged data obtained from the different cases to study the surface area of neurons from different layers in each species (Tables 2 and 3). In general, the smallest neurons were found in layers I and IV, followed by layers II and VI, whereas the neurons in layers III and V were the largest (Figs. 3B and 4B, Tables 2 and 3). Some of these differences were statistically significant (Tables 4 and 5). These variations in cell size across layers were found in all cases from both species despite individual differences

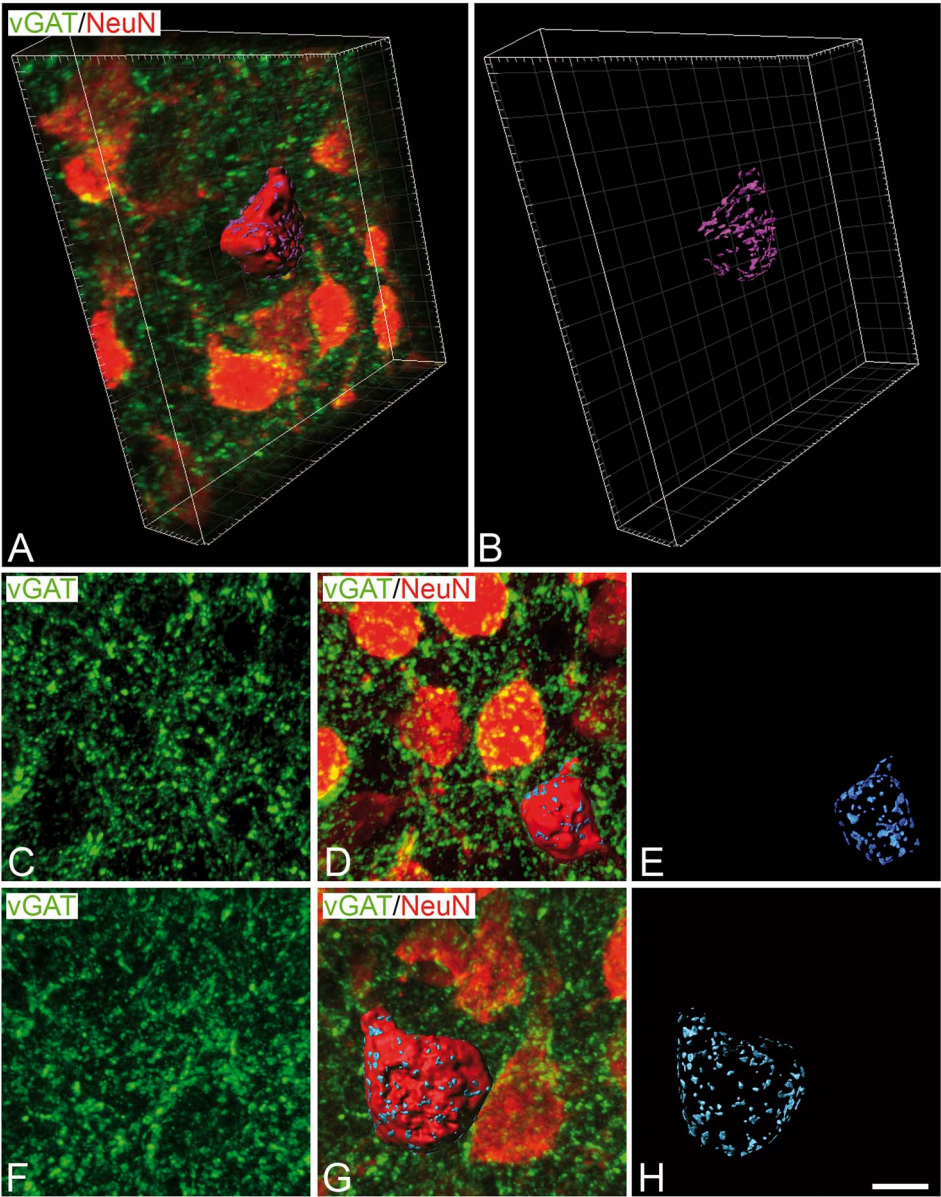


Fig. 2. Rotated confocal image series A) or pairs of projection images C–D) and F–G) taken from layers III (A), IV (C–D), and V (F–G) of a section of the mouse HLSI neocortex, showing the relationship between GABAergic axon terminals and the pyramidal cell bodies, immunostained for vGAT (green), and NeuN (red), respectively. Digital surfaces (intense red), adjusted to the somata of selected pyramidal cell bodies, were created (Imaris software) in order to measure neuronal surface area and to segment and quantify GABAergic perisomatic terminals, shown in gray in (B), (D–E), and (G–H). Scale bar in (H) indicates 8 μm in all panels.

Table 2. Mean $\pm$ standard deviation values of neuropil density vGAT-ir punctate elements, neuronal soma surface area, and number per neuron and density of vGAT-ir perisomatic puncta in the different layers of the human temporal neocortex.

Layers	Neuropil density of vGAT-ir puncta (number of vGAT-ir puncta/ μm^3 of tissue)	Neuronal soma surface area (μm^2 , 15 neurons per case and cortical layer)	Number of vGAT-ir perisomatic puncta/neuron	Density of vGAT-ir perisomatic puncta (number of contacts/ μm^2 of soma area)
I	0.03708 ± 0.01433	465.8 ± 88.27	45.59 ± 23.57	0.09877 ± 0.05266
II	0.03919 ± 0.01543	679.3 ± 209.8	122.9 ± 45.88	0.1862 ± 0.06164
III	0.04753 ± 0.02034	1260 ± 321.3	199.7 ± 101.3	0.1571 ± 0.06459
IV	0.05164 ± 0.02260	537.3 ± 99.43	122.1 ± 40.91	0.2299 ± 0.07340
V	0.04786 ± 0.02275	1230 ± 354.9	262.6 ± 132.6	0.2129 ± 0.08930
VI	0.03799 ± 0.01928	1184 ± 377.8	214.4 ± 104.6	0.1796 ± 0.05871

Human temporal neocortex

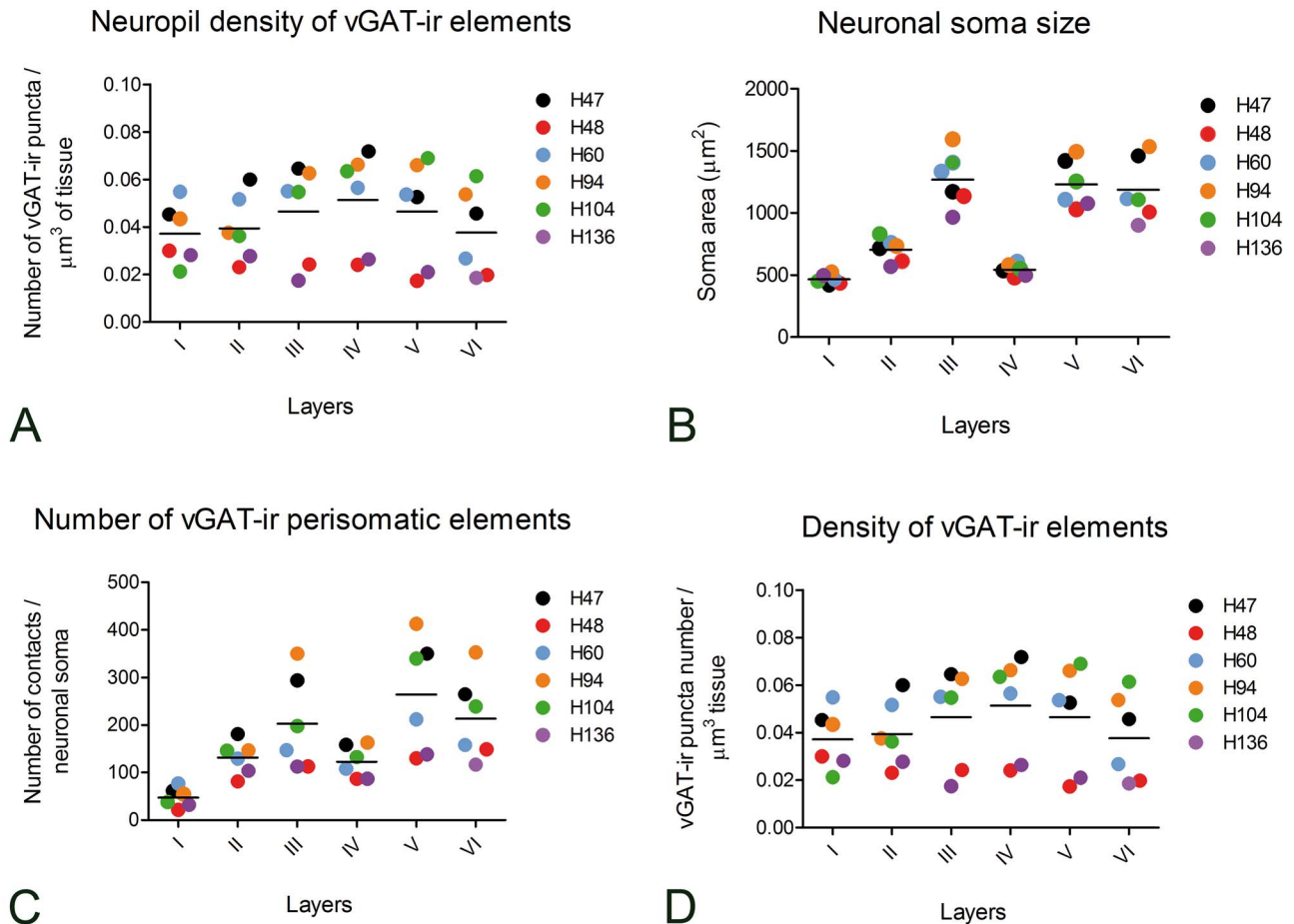


Fig. 3. Graphs showing mean values of neuropil density vGAT-ir puncta A), neuronal surface area B), number per neuron C), and density D) of vGAT-ir perisomatic puncta in the different layers of the human temporal neocortex. See Tables 2 and 4 for values and statistical comparisons.

Table 3. Mean $\pm$ standard deviation values of neuropil density of vGAT-ir punctate elements, neuronal soma surface area, and number per neuron and density of vGAT-ir perisomatic puncta in the different layers of the mouse HLS1 neocortex.

Layers	Neuropil density of vGAT-ir puncta (number of vGAT-ir puncta/ μm^3 of tissue)	Neuronal soma surface area (μm^2 , 15 neurons per mouse and cortical layer)	Number of vGAT-ir perisomatic puncta/neuron	Density of vGAT-ir perisomatic puncta (number of contacts/ μm^2 of soma area)
I	0.03857 ± 0.01076	437.1 ± 104.0	71.55 ± 26.26	0.1690 ± 0.07136
II	0.04004 ± 0.006617	637.6 ± 115.7	116.3 ± 27.77	0.1850 ± 0.04347
III	0.04205 ± 0.01073	673.9 ± 139.3	134.5 ± 33.60	0.2030 ± 0.04615
IV	0.04091 ± 0.009749	429.6 ± 107.1	88.16 ± 23.47	0.2027 ± 0.05547
V	0.03318 ± 0.009414	908.9 ± 300.4	145.3 ± 45.72	0.1633 ± 0.03087
VI	0.03196 ± 0.009329	568.9 ± 147.8	90.83 ± 31.57	0.1620 ± 0.04616

(Figs. 3B and 4B). We also found that neuronal size in the human temporal neocortex was larger than in the mouse HLS1 (Tables 2 and 3) with statistically significant differences in all cortical layers (not shown).

Number of perisomatic GABAergic terminals

We then studied—in the human temporal neocortex and the mouse HLS1—the number of vGAT-ir puncta in

apposition to the cell body of each neuron in which neuronal surface area was measured. We counted in 3D all vGAT-ir puncta contained between the inner and the expanded surfaces corresponding to each neuronal somata (Figs. 1–4). Figures 5 and 6, respectively show—in human and mouse neocortex—examples of some reconstructed neuronal somata along with vGAT-ir elements in apposition to them.

Mouse HLS1 cortex

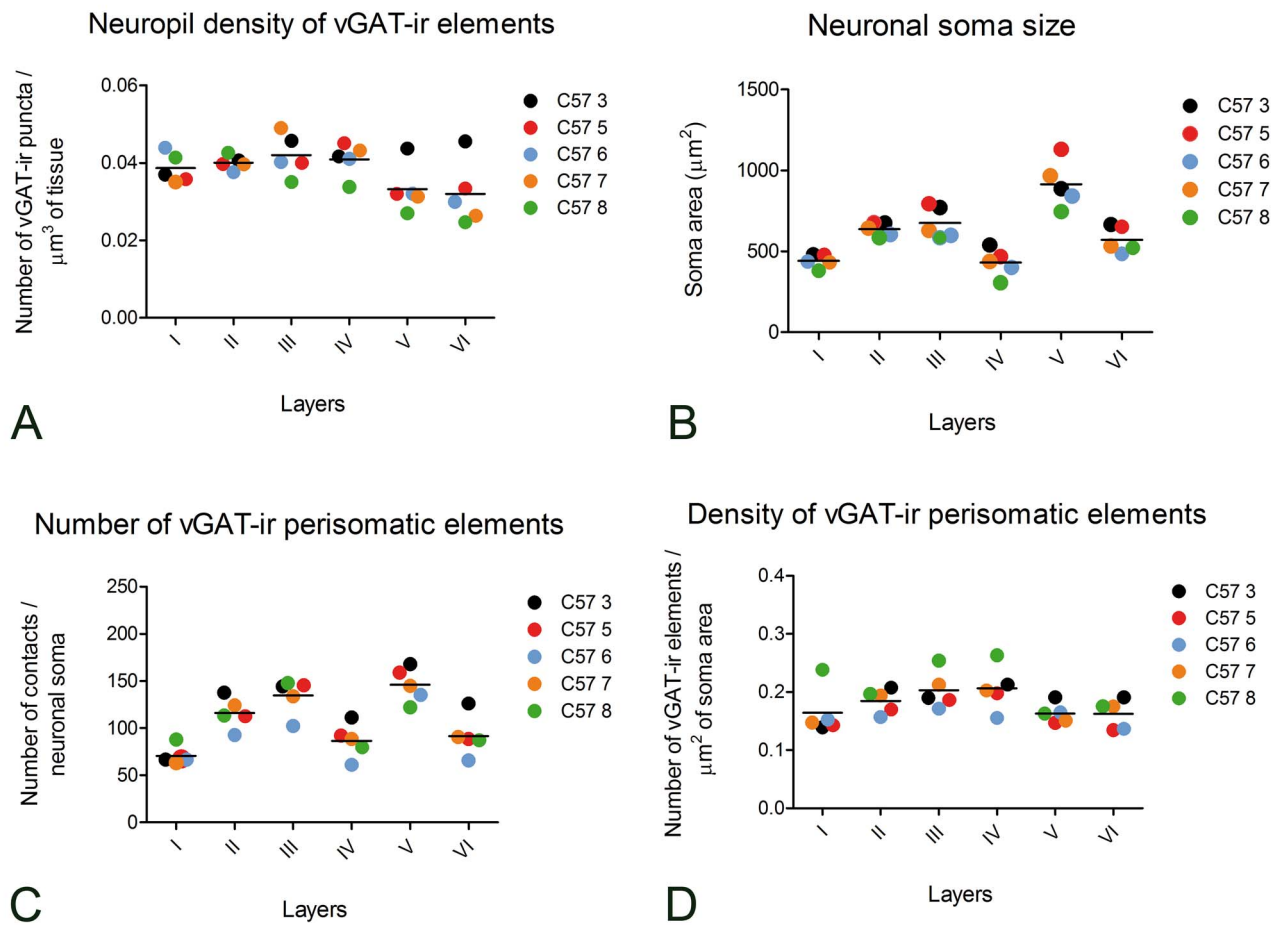


Fig. 4. Graphs showing mean values of neuropil density vGAT-ir puncta A), neuronal surface area B), number per neuron C), and density D) of vGAT-ir perisomatic puncta in the different layers of the mouse HLS1 neocortex. See Tables 3 and 5 for values and statistical comparisons.

Table 4. P-values corresponding to the statistical comparisons (Kruskal–Wallis test with Dunn–Bonferroni posthoc) between cortical layers of the different variables analyzed in the human temporal neocortex: Neuropil density of vGAT-ir punctate elements, neuronal soma surface area, number of vGAT-ir perisomatic puncta per neuron, and density of vGAT-ir perisomatic puncta (ns = non-significant; * ≤ 0.05; ** ≤ 0.001).

Layers	Neuropil density of vGAT-ir puncta	Neuronal soma surface area	Number of vGAT-ir perisomatic puncta/neuron	Density of vGAT-ir perisomatic puncta
I–II	Ns	**	**	**
I–III	*	**	**	**
I–IV	**	*	**	**
I–V	*	**	**	**
I–VI	Ns	**	**	**
II–III	Ns	**	**	*
II–IV	*	**	Ns	**
II–V	Ns	**	**	Ns
II–VI	Ns	**	**	Ns
III–IV	Ns	**	**	**
III–V	Ns	Ns	Ns	**
III–VI	*	Ns	Ns	Ns
IV–V	Ns	**	**	Ns
IV–VI	**	**	**	**
V–VI	*	Ns	Ns	Ns

Table 5. P-values corresponding to the statistical comparisons (Kruskal–Wallis test with Dunn–Bonferroni posthoc) between cortical layers of the different variables analyzed in the mouse HLS1: neuropil density of vGAT-ir punctate elements, neuronal soma surface area, number of vGAT-ir perisomatic puncta per neuron, and density of vGAT-ir perisomatic puncta (ns = non-significant; * ≤ 0.05 ; and ** ≤ 0.001).

Layers	Neuropil density of vGAT-ir puncta	Neuronal soma surface area	Number of vGAT-ir perisomatic puncta/neuron	Density of vGAT-ir perisomatic puncta
I–II	Ns	**	**	*
I–III	Ns	**	**	**
I–IV	Ns	Ns	Ns	**
I–V	*	**	**	Ns
I–VI	*	**	*	Ns
II–III	Ns	Ns	Ns	Ns
II–IV	Ns	**	**	Ns
II–V	**	**	*	Ns
II–VI	**	Ns	**	*
III–IV	Ns	**	**	Ns
III–V	**	*	Ns	**
III–VI	**	*	**	**
IV–V	**	**	**	**
IV–VI	**	**	Ns	**
V–VI	Ns	**	**	Ns

In each species, we averaged data from the different cases to study the number of perisomatic boutons in neurons from different cortical layers (Figs. 3C and 4C, Tables 2 and 3). Both in human and mouse neocortex, the highest numbers of vGAT-ir perisomatic puncta were found in apposition to layer V neurons (mean $\pm$ SD: 262.6 ± 132.6 and 145.3 ± 45.72 in human and mouse cortex, respectively), followed by the neurons in layers III, VI, and II, then by layer IV neurons, with the lowest numbers found in layer I neurons (see Tables 4 and 5 for statistical comparisons). Finally, the number of perisomatic boutons that contact human neurons was significantly higher than that of mouse neurons in all cortical layers except in layer I, with more perisomatic boutons in the mouse, and layer II, with no significant differences between species (not shown).

Density of perisomatic GABAergic terminals

In both species, we then obtained values of the density of perisomatic innervation of neurons in the different cases and cortical layers, by dividing the number of vGAT-ir perisomatic boutons that each neuron receives by the neuronal cell body surface area. We averaged values obtained in the different cases of each species to analyze the laminar patterns of perisomatic innervation (Figs. 3D and 4D). In both species, we noted significant differences in the density of vGAT-ir perisomatic puncta between neurons in different cortical layers (Tables 4 and 5). In general, the density of perisomatic puncta was highest in layer IV neurons, followed by layers II, III, V, and VI, whereas the lowest density level was found in layer I (Figs. 3D and 4D). See Tables 2 and 3 for further details and Tables 4 and 5 for the statistical significance of the comparisons between layers.

Finally, in each of the 2 species, we explored the possible correlations between the 4 variables studied (neuropil

density of GABAergic puncta, neuronal cell body surface area, number of perisomatic GABAergic terminals, and density of perisomatic puncta). In the mouse, for comparisons between the neuropil density of GABAergic puncta and the other variables, mean values were used since the neuropil density of GABAergic puncta was estimated in a set of confocal stacks other than that corresponding to the other variables.

In the human temporal neocortex, taking together data from the 6 cases, out of the different combinations between the 4 variables, we found a strong positive linear correlation ($R^2 = 0.559$) between the area of the neuronal soma and the number of perisomatic terminals (Supplementary Fig. S2). A similar finding was found in the mouse somatosensory cortex ($R^2 = 0.559$; Supplementary Fig. S3). When we analyzed data from the different cases separately, this correlation was present in 4 out of the 6 human brains analyzed and in 4 out of the 5 mice analyzed (Supplementary Figs. S2 and S3). This indicates that the soma size is a predictive indicator of the number of GABAergic contacts that the neuronal cell body receives. Importantly, it was found that the density of GABAergic terminals that are in apposition to neuronal cell bodies was not correlated with soma size in human or in rodent neocortex. In addition, in only 2 out of 6 human brains and 2 out of 5 mouse brains, we found that the density of vGAT-ir perisomatic puncta was strongly correlated with the relative abundance of GABAergic terminals in the neuropil of the different cortical layers (Supplementary Figs. S2 and S3).

Density of GABAergic terminals in apposition to the AIS

In sections of the human temporal neocortex and mouse HLS1, triple immunostained to label the AISs, GABAergic

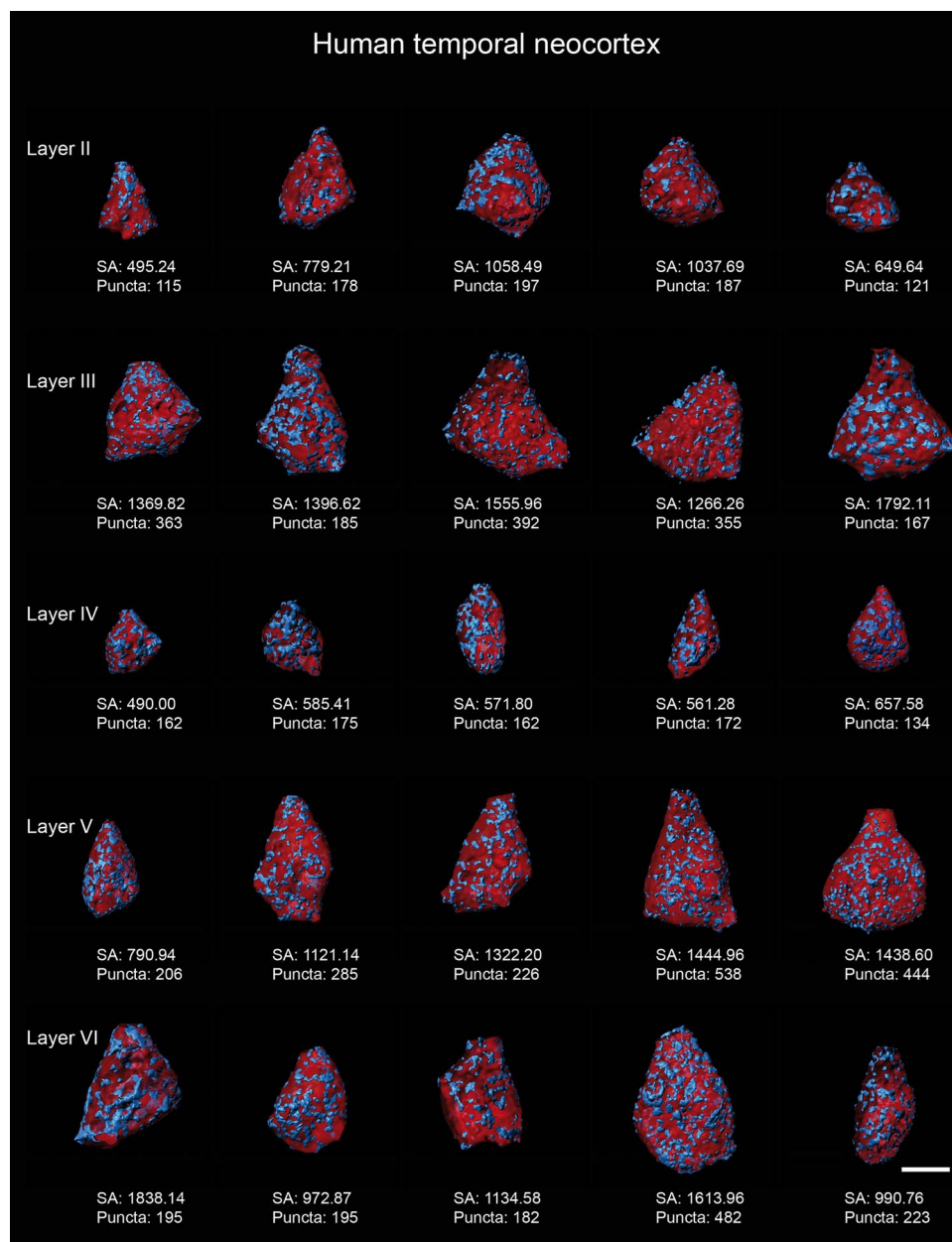


Fig. 5. Diagrams showing examples of some reconstructed pyramidal cell somata (red) from layers II to VI of the human temporal neocortex along with vGAT-ir elements in apposition to them (blue). SA: surface area (μm^2). Scale bar indicates 4 μm .

axon terminals and neuronal cell bodies, we measured—in the different cortical layers—the morphological features of the AISs and the number of GABAergic terminals in apposition to them (Figs. 7 and 8).

AIS morphological parameters

In order to analyze in 3D the morphological features of the AIS of neurons in the different cortical layers, we used the Imaris software “Filament Tracer” tool to create a filament that fitted the AIS immunostaining, which was then used to measure AIS length and AIS mean diameter. We then created a 3D surface adjusted to the immunostaining of each AIS in order to measure the AIS surface area (Figs. 7E, I, and 8E and I). At least 15 AISs were analyzed in each cortical layer and case (total

number = 450 in humans and 450 in mice). For each species, we then averaged data obtained from the different cases (Figs. 9 and 10, Tables 6 and 7) to study the surface area of the AISs of neurons from different cortical layers. In layer I, these neurons were most likely to be interneurons, whereas in other cortical layers, they were identified as pyramidal neurons, based on the triangular shape of the cell body and the presence of an apical dendrite. In general, we found similar differences in mean values of the 3 variables analyzed between layers. Both in human temporal neocortex and mouse HLS1, the smallest AISs, as judged by AIS length, AIS mean diameter and AIS surface area, were found in neurons from layers I and IV, followed by neurons in layers II and VI, whereas the largest AISs were found in

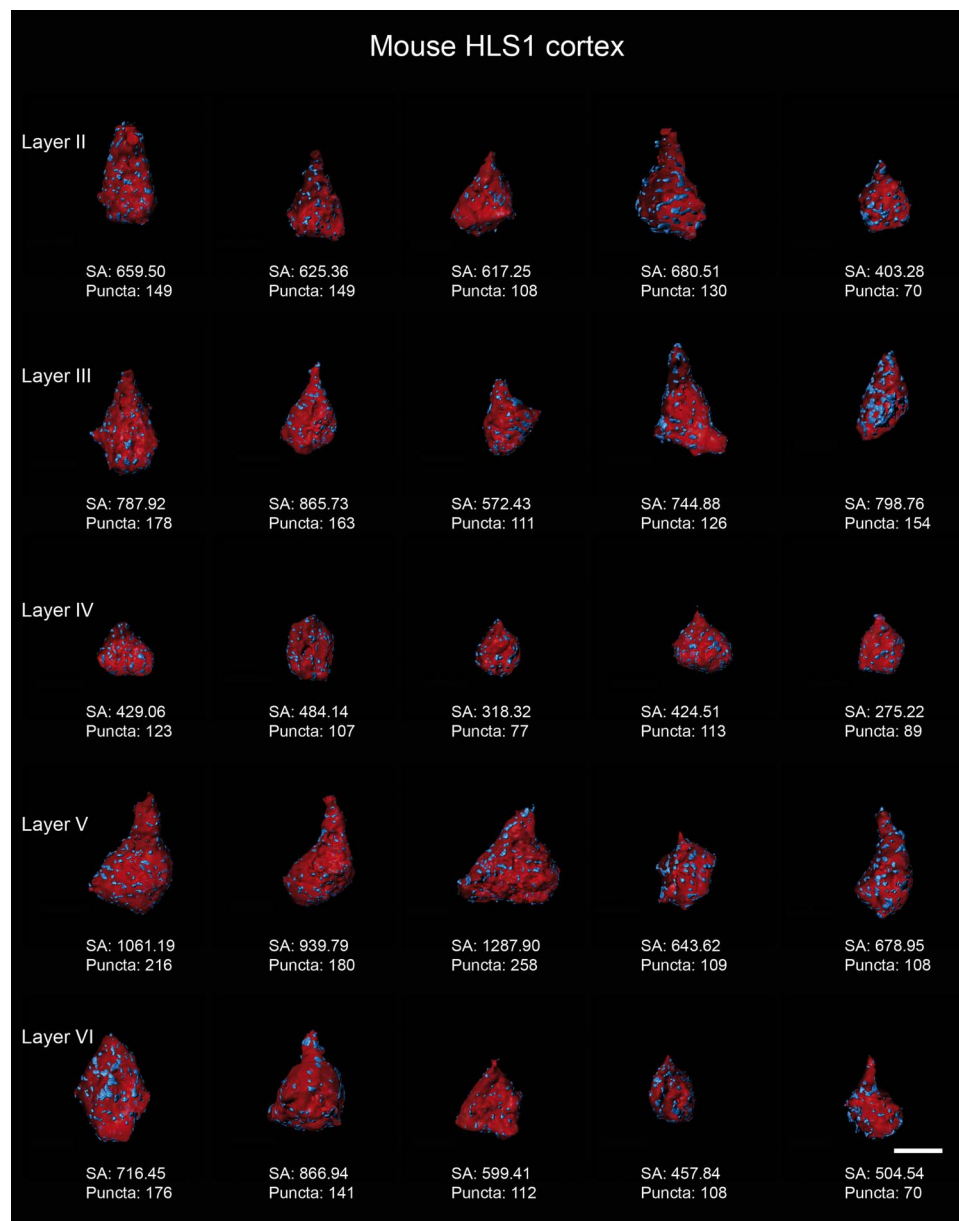


Fig. 6. Diagrams showing examples of some reconstructed pyramidal cell somata (red) from layers II–VI of the mouse HLS1 cortex along with vGAT-ir elements in apposition to them (blue). SA: surface area (μm^2). Scale bar indicates 4 μm .

pyramidal neurons from layers III (in human temporal neocortex) or V (mouse HLS1; *Figs. 9* and *10*, *Tables 6* and *7*; see *Tables 8* and *9* for statistical comparisons). These variations in AIS size across layers were found in all cases despite small interindividual differences. Correlation analysis indicated that although there was no strong correlation between “AIS length” and “AIS mean diameter”—two variables that are strongly positively correlated with “AIS surface area” (particularly AIS length). This was the case both in human and mouse neocortex (*Supplementary Figs. S4* and *S5*).

We next analyzed the rate of AIS diameter decrease (tapering diameter) along the AIS length (*Figs. 9D* and *10D*) as we noted that AISs in human and rodent neurons from all cortical layers had a larger diameter in proximal regions than in distal ones. In each species, averaging

data from all cases (total of 60 neurons per layer), we found differences in this AIS diameter decrease along the length of the AIS between neurons in different cortical layers. The AIS diameter of neurons in layers I and IV fluctuated less along AIS length than it did in neurons from layers II, III, and VI, with the most pronounced tapering of AIS diameter in layer V neurons, especially in the mouse neocortex (see different slopes in *Figs. 9D* and *10D* profiles).

Number of GABAergic terminals in apposition to AISs

We then studied the number of vGAT-ir punctate elements in apposition to the AIS of each pyramidal neuron in which neuronal AIS surface area was measured (*Figs. 7*, *8*, *11A* and *B*, and *12A* and *B*). *Figures 13* and *14*

Table 6. Mean $\pm$ standard deviation values of AIS length, AIS mean diameter and AIS surface area and of the number per AIS, and density of vGAT-ir peri-AIS puncta in the different layers of the human temporal neocortex.

Layers	AIS length (μm)	AIS mean diameter (μm)	AIS surface area (μm^2)	Number of vGAT-ir peri-AIS puncta/AIS	Density of vGAT-ir peri-AIS puncta (number of contacts/ μm^2 of AIS surface area)
I	23.24 $\pm$ 5.71	0.97 $\pm$ 0.17	82.81 $\pm$ 23.68	13.88 $\pm$ 6.28	0.17 $\pm$ 0.06
II	35.51 $\pm$ 6.92	1.21 $\pm$ 0.21	167.20 $\pm$ 56.64	48.01 $\pm$ 36.02	0.27 $\pm$ 0.14
III	39.50 $\pm$ 6.10	1.42 $\pm$ 0.20	233.10 $\pm$ 56.49	64.75 $\pm$ 37.35	0.27 $\pm$ 0.13
IV	26.71 $\pm$ 4.19	1.00 $\pm$ 0.31	102.80 $\pm$ 23.09	39.38 $\pm$ 28.48	0.38 $\pm$ 0.26
V	37.66 $\pm$ 6.43	1.41 $\pm$ 0.38	203.5 $\pm$ 58.69	47.89 $\pm$ 27.88	0.23 $\pm$ 0.11
VI	33.93 $\pm$ 6.61	1.32 $\pm$ 0.20	164.20 $\pm$ 51.40	32.75 $\pm$ 21.67	0.20 $\pm$ 0.10

Table 7. Mean $\pm$ standard deviation values of AIS length, AIS mean diameter and AIS surface area and of the number per AIS, and density of vGAT-ir peri-AIS puncta in the different layers of the mouse HLS1 neocortex.

Layers	AIS length (μm)	AIS mean diameter (μm)	AIS surface area (μm^2)	Number of vGAT-ir peri-AIS puncta/AIS	Density of vGAT-ir peri-AIS puncta (number of contacts/ μm^2 of AIS surface area)
I	20.53 $\pm$ 4.91	0.78 $\pm$ 0.16	79.01 $\pm$ 28.54	13.07 $\pm$ 6.42	0.17 $\pm$ 0.072
II	23.89 $\pm$ 3.96	0.98 $\pm$ 0.13	120.1 $\pm$ 25.66	25.33 $\pm$ 8.86	0.21 $\pm$ 0.069
III	24.87 $\pm$ 4.41	1.05 $\pm$ 0.16	134.4 $\pm$ 40.43	26.45 $\pm$ 8.90	0.20 $\pm$ 0.064
IV	17.21 $\pm$ 2.76	0.84 $\pm$ 0.12	72.53 $\pm$ 22.08	16.13 $\pm$ 5.55	0.23 $\pm$ 0.089
V	25.67 $\pm$ 3.87	1.20 $\pm$ 0.21	148.5 $\pm$ 40.27	28.29 $\pm$ 7.04	0.20 $\pm$ 0.055
VI	23.38 $\pm$ 3.38	1.01 $\pm$ 0.24	106.7 $\pm$ 22.06	20.61 $\pm$ 5.83	0.20 $\pm$ 0.066

Table 8. P-values corresponding to the statistical comparisons (Kruskal–Wallis test with Dunn–Bonferroni posthoc) between cortical layers in the human temporal neocortex with regard to the following variables: AIS length, AIS mean diameter, AIS surface area, number of vGAT-ir terminals per AIS, and density of vGAT-ir peri-AIS puncta (ns = non-significant; * $\leq$ 0.05; ** $\leq$ 0.001).

Layers	AIS length	AIS mean diameter	AIS surface area	Number of vGAT-ir peri-AIS puncta	Density of vGAT-ir peri-AIS puncta
I–II	**	**	**	**	**
I–III	**	**	**	**	**
I–IV	Ns	Ns	Ns	**	**
I–V	**	**	**	**	**
I–VI	**	**	**	**	Ns
II–III	*	**	**	*	Ns
II–IV	**	**	**	Ns	Ns
II–V	Ns	*	*	Ns	Ns
II–VI	Ns	Ns	Ns	Ns	*
III–IV	**	**	**	**	Ns
III–V	Ns	Ns	Ns	Ns	Ns
III–VI	**	Ns	**	**	**
IV–V	**	**	**	Ns	*
IV–VI	**	**	**	Ns	**
V–VI	Ns	Ns	*	*	Ns

show—in human and mouse neocortex, respectively—examples of some reconstructed neuronal AISs along with vGAT-ir elements in apposition to them. We counted in 3D all vGAT-ir puncta in contact with the surface object corresponding to each AIS. It is known that, in human neocortex, axon terminal boutons from chandelier cells frequently aggregate surrounding especially the distal regions of the pyramidal cell AISs to form chandelier cell cartridges. Since distinguishing individual GABAergic boutons within chandelier cell cartridges was not always possible with confocal microscopy, we estimated the number of boutons within each chandelier cell

cartridge by dividing the measured volume of chandelier cartridges by the mean volume of individual GABAergic boutons along the AIS (averaging all measured peri-AIS boutons per layer and case). The estimated average volume ($\pm$ standard deviation) of vGAT-ir puncta was $0.17 \pm 0.06 \mu\text{m}^3$ ($n = 7,208$ puncta).

We grouped data from the different cases to study the number of perisomatic boutons in neurons from different cortical layers (Figs. 11A and 12A, Tables 6 and 7). Human and HLS1 mouse layer I and mouse layer IV neurons showed AISs with a lower number of apposing GABAergic puncta than in the other cortical

Table 9. P-values corresponding to the statistical comparisons (Kruskal–Wallis test with Dunn–Bonferroni posthoc) between cortical layers in HLS1 mouse neocortex with regard to the following variables: AIS length, AIS mean diameter, AIS surface area, number of vGAT-ir terminals per AIS, and density of vGAT-ir peri-AIS puncta (ns = non-significant; * ≤ 0.05 ; ** ≤ 0.001).

Layers	AIS length	AIS mean diameter	AIS surface area	Number of vGAT-ir peri-AIS puncta	Density of vGAT-ir peri-AIS puncta
I–II	**	**	**	**	*
I–III	**	**	**	**	*
I–IV	**	Ns	Ns	Ns	**
I–V	**	**	**	**	Ns
I–VI	*	**	**	**	Ns
II–III	Ns	Ns	Ns	Ns	Ns
II–IV	**	**	**	**	Ns
II–V	Ns	**	*	Ns	Ns
II–VI	Ns	Ns	Ns	Ns	Ns
III–IV	**	**	**	**	Ns
III–V	Ns	*	Ns	Ns	Ns
III–VI	Ns	Ns	*	*	Ns
IV–V	**	**	**	**	Ns
IV–VI	**	**	**	*	Ns
V–VI	*	**	**	**	Ns

layers. Intermediate levels were found in contact with the AISs of layer VI pyramidal neurons (also the case for layer IV pyramidal neurons in human neocortex). The highest numbers of GABAergic boutons contacting AIS were found in pyramidal neurons from layers II, III, and V (see [Tables 6–9](#) for mean values and statistical comparisons).

Density of GABAergic terminals in apposition to AISs

We next analyzed the density of GABAergic innervation of the AIS of pyramidal neurons in different cortical layers by dividing the number of vGAT-ir AIS-contacting boutons that each neuron receives by its AIS surface area value ([Figs. 11B and 12B](#)). We averaged values obtained in the different animals to analyze the laminar patterns of AIS GABAergic innervation ([Figs. 11B and 12B](#), [Tables 6–9](#)).

In human temporal neocortex, the density of vGAT-ir puncta in apposition to the AIS neurons in different cortical layers was highest in layer IV with significant differences between it and layers I, V, and VI. In addition, the lowest density was found in layer I with significant differences between it and layers II, III, IV, and V ([Fig. 11B](#), [Tables 6 and 8](#)). In mouse HLS1, vGAT-ir peri-AIS puncta tended to be higher also in layer IV neurons, although significant differences were only found between it and layer I. As in human neocortex, the lowest density of vGAT-ir peri-AIS puncta was found in layer I with significant differences between it and layers II, III, and IV ([Fig. 12B](#), [Tables 7 and 9](#)).

In addition, we studied the distribution of vGAT-ir AIS-contacting boutons along the length of the AIS in neurons from different cortical layers of both human and mouse neocortex averaging data from all cases (total of 60 neurons per layer and species). In the human temporal neocortex, we found that in all layers, except in layer I, there was a tendency for an increase in the number

of GABAergic boutons that contact the AIS at increasing distances from the cell somata (determined at 1- μ m long intervals; [Fig. 11C](#)). In contrast, in mouse HLS1, we found no apparent differences ([Fig. 12C](#)).

Taking into consideration the progressive decrease in mean AIS diameter—and therefore AIS surface area—along AIS length, we then plotted the density of AIS GABAergic innervation (number of peri-AIS vGAT-ir puncta/AIS surface area) along the AIS length. In both species we found, in pyramidal neurons from layers II to VI, a tendency for denser GABAergic innervation of distal AIS regions as compared with more proximal regions (see the slopes of traces in [Figs. 11D and 12D](#)). This tendency was more robust in human temporal neocortex than in mouse HLS1 neocortex.

Following our analysis of the density of GABAergic terminals in apposition to AISs, we then explored—in both species—the possible correlations between different variables related to AIS size and its GABAergic innervation. Taking together data from the 5 mice, out of the different combinations between the 4 variables, we found that the number of GABAergic terminals in apposition to the AIS displayed a positive linear correlation with both the AIS surface area and AIS length (but not AIS diameter; [Supplementary Fig. S5A and C](#)). This indicates that the AIS length and surface area are predictive indicators of the number of GABAergic contacts that the AIS receives. This correlation was less clear in the case of human temporal neocortex ([Supplementary Fig. S4A](#)). We also found that, in the different cortical layers of both human and mouse, the density of GABAergic puncta in apposition to the AIS was not correlated with the morphological features of the AIS or the density of GABAergic puncta in the neuropil of the different cortical layers ([Supplementary Figs. S4D and S5D](#)). Finally, the density of GABAergic puncta in apposition to the AIS was correlated with the number of GABAergic puncta contacting the AIS

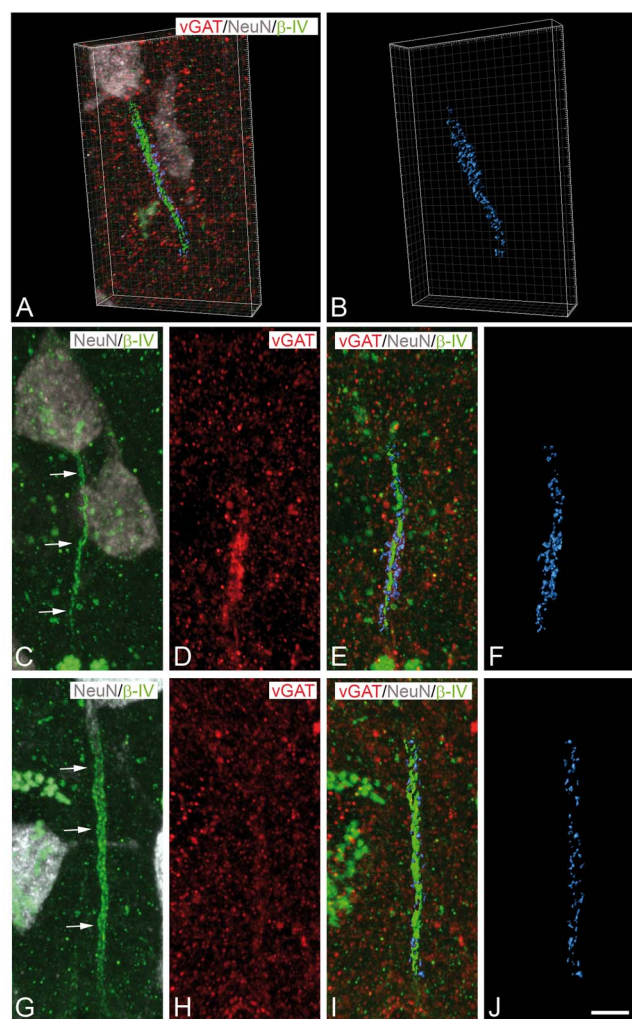


Fig. 7. Rotated confocal image series A) and trios of projection images C–E and G–I) taken from layers III (A), IV (C–E), and V (G–I) of the human temporal neocortex, showing the relationship between GABAergic axon terminals and the neuronal cell bodies and AISs (arrows), immunostained for vGAT (red), NeuN (gray), and β IV Spectrin (green), respectively. Digital surfaces (intense green), adjusted to the AISs of selected neurons, were created (Imaris software) in order to segment and quantify AIS-contacting GABAergic terminals, shown in blue in (B), (E–F), and (I–J). Scale bar, shown in (J), indicates 8 μ m in (A–B) and 5 μ m in (C–J).

in human but not in mouse neocortex (Supplementary Figs. S4A and S5A).

Comparison of the size and GABAergic innervation of neuronal somata versus AIS

Finally, we compared the data regarding the size of neuronal cell bodies and AISs in the different layers of the neocortex. Both in human and mouse neocortex, a positive correlation was found between the soma surface area and the AIS length, AIS mean diameter and AIS surface area (Supplementary Fig. S6), indicating that pyramidal neurons with a larger cell body have a larger AIS. In addition, we found a relatively weak correlation (only in 2 out of 4 human cases and in 3 out of 4 mice) between the number of GABAergic terminals contacting the soma and the AIS. However, the densities of GABAergic innervation of these 2 neuronal domains were not correlated (Supplementary Fig. S6). We observed that the density of

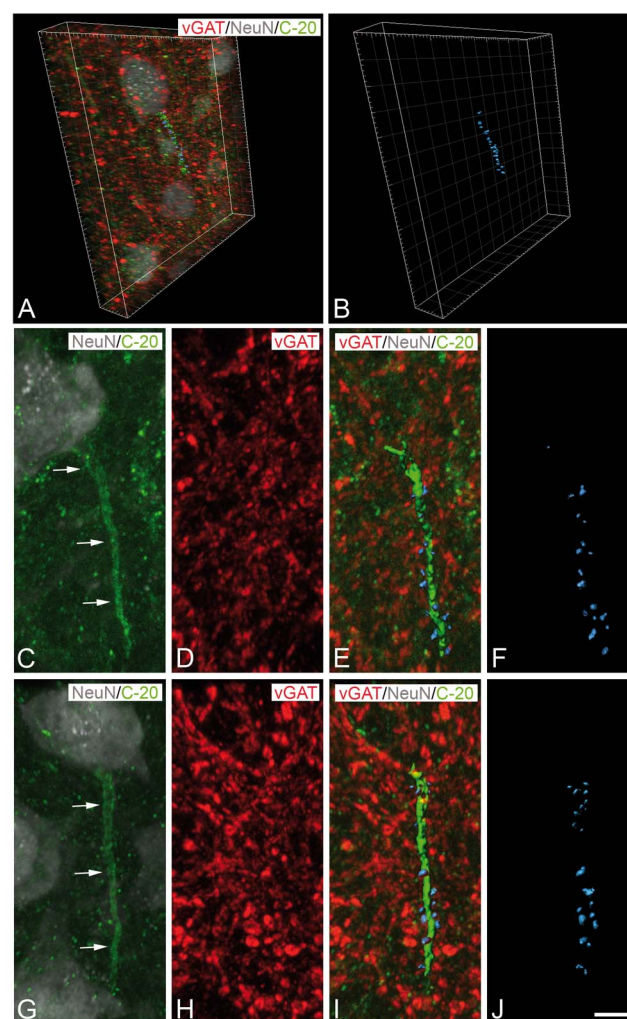


Fig. 8. Rotated confocal image series A) and trios of projection images C–E and G–I) taken from layers III (A), IV (C–E), and V (G–I) of the mouse HLS1 neocortex, showing the relationship between GABAergic axon terminals and the neuronal cell bodies and AISs (arrows), immunostained for vGAT (red), NeuN (gray), and Ankyrin G (c-20, green), respectively. Digital surfaces (intense green), adjusted to the AISs of selected neurons, were created (Imaris software) in order to segment and quantify AIS-contacting GABAergic terminals, shown in blue in (B), (E–F), and (I–J). Scale bar, shown in (J), indicates 8 μ m in (A–B), and 4 μ m in (C–J).

GABAergic terminals in apposition to the AIS tended to be higher than that of terminals in apposition to the cell body, with statistically significant differences in layers I, II, III, and IV of the human temporal neocortex (Fig. 15A) and in layers II and IV–VI of the mouse HLS1 (Fig. 15B).

Discussion

The results of the present study revealed that in human temporal cortex and mouse primary somatosensory cortex, there are clear variations among the different cortical layers with regard to the density and number of GABAergic axon terminals in apposition to the soma and the AIS of pyramidal neurons. We found a positive linear correlation between the surface area of the soma, or the AIS, and the number of GABAergic terminals in apposition to these 2 neuronal domains. The density and number of vGAT-ir puncta in apposition to the soma

Human temporal neocortex

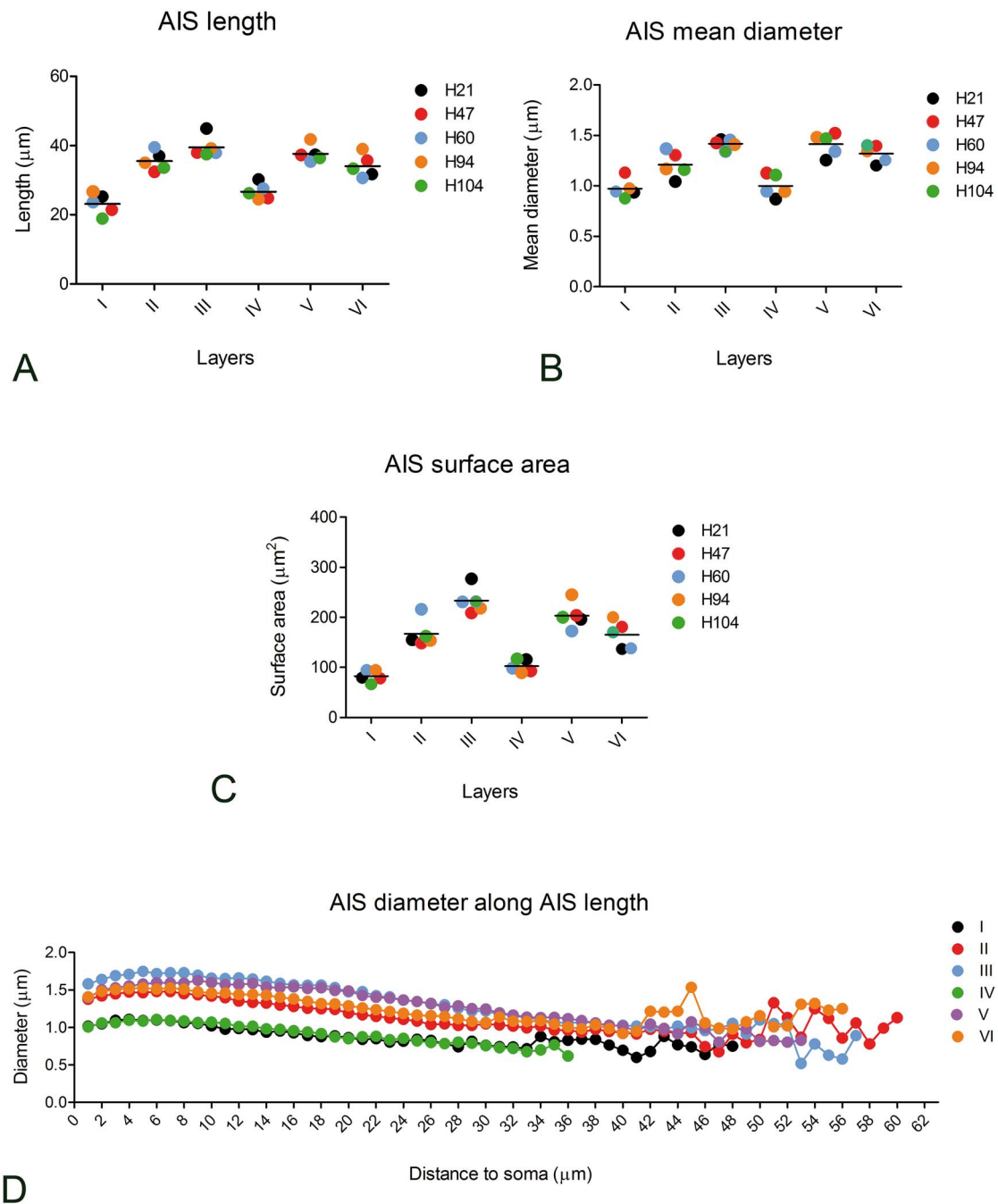


Fig. 9. Graphs showing mean values of AIS length A), AIS mean diameter B), and AIS surface area C) in neurons of different layers of the human temporal neocortex. See Tables 6 and 8 for values and statistical comparisons, respectively. D) Shows values of the decrease in mean AIS diameter along its length. Note that the rate of diameter reduction along the AIS length (tapering diameter) was faster in layers III and V neurons than in neurons in layers I or IV.

and AIS were higher in the human cortex than in the mouse. Furthermore, we observed a more pronounced intersubject variability in the various variables examined between humans cases than between mouse cases. Variability is a well-known feature of human brain structure. For example, there are variations in the density of cortical synapses (e.g. Alonso-Nanclares et al. 2008; Montero-Crespo et al. 2020; Cano-Astorga et al. 2021;

Dominguez-Alvaro et al. 2021), some of which have been related to differences in age, sex, or education.

Cell body and AIS size

The neuronal cell body represents a major site of integration for the information processed in the different dendritic branches. The AIS is essential in the maintenance of neuronal polarity and is the site from which action

Mouse HLS1 cortex

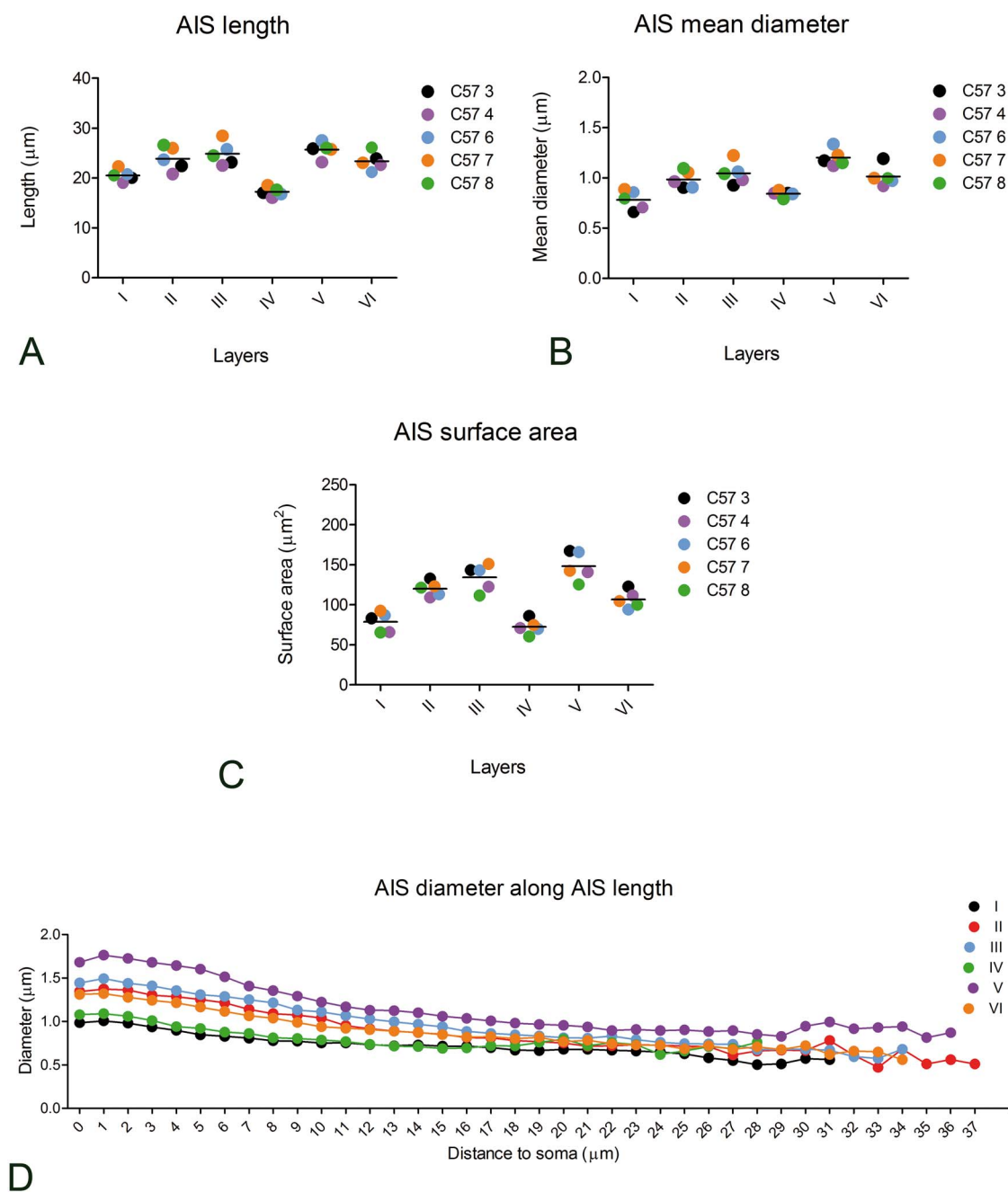


Fig. 10. Graphs showing mean values of AIS length A), AIS mean diameter B), and AIS surface area C) in neurons of different layers of the mouse HLS1 neocortex. See Tables 7 and 9 for values and statistical comparisons, respectively. D) Shows values of the decrease in mean AIS diameter along its AIS. Note that the rate of diameter reduction along the AIS length (tapering diameter) was faster in layers V and VI neurons than in neurons in layers I or IV.

potentials are initiated—thanks to the clustering of voltage-gated Na^+ and K^+ channels—and then propagated both down the axon, affecting transmitter release—and back-propagated, affecting synaptic integration at the soma and dendrites (Kole et al. 2008; Rasband 2010; Bender and Trussell 2012; Kole and Stuart 2012; Leterrier 2016).

Although neuronal compartmentalization and computational capacity relies upon membrane features that determine active conductances, such as density of receptor and ion channels, and cannot be predicted by anatomical features alone (Stuart and Spruston 1998; Atkinson and Williams 2009), the size of the cell soma and the AIS, in addition to dendritic processing

Human temporal neocortex

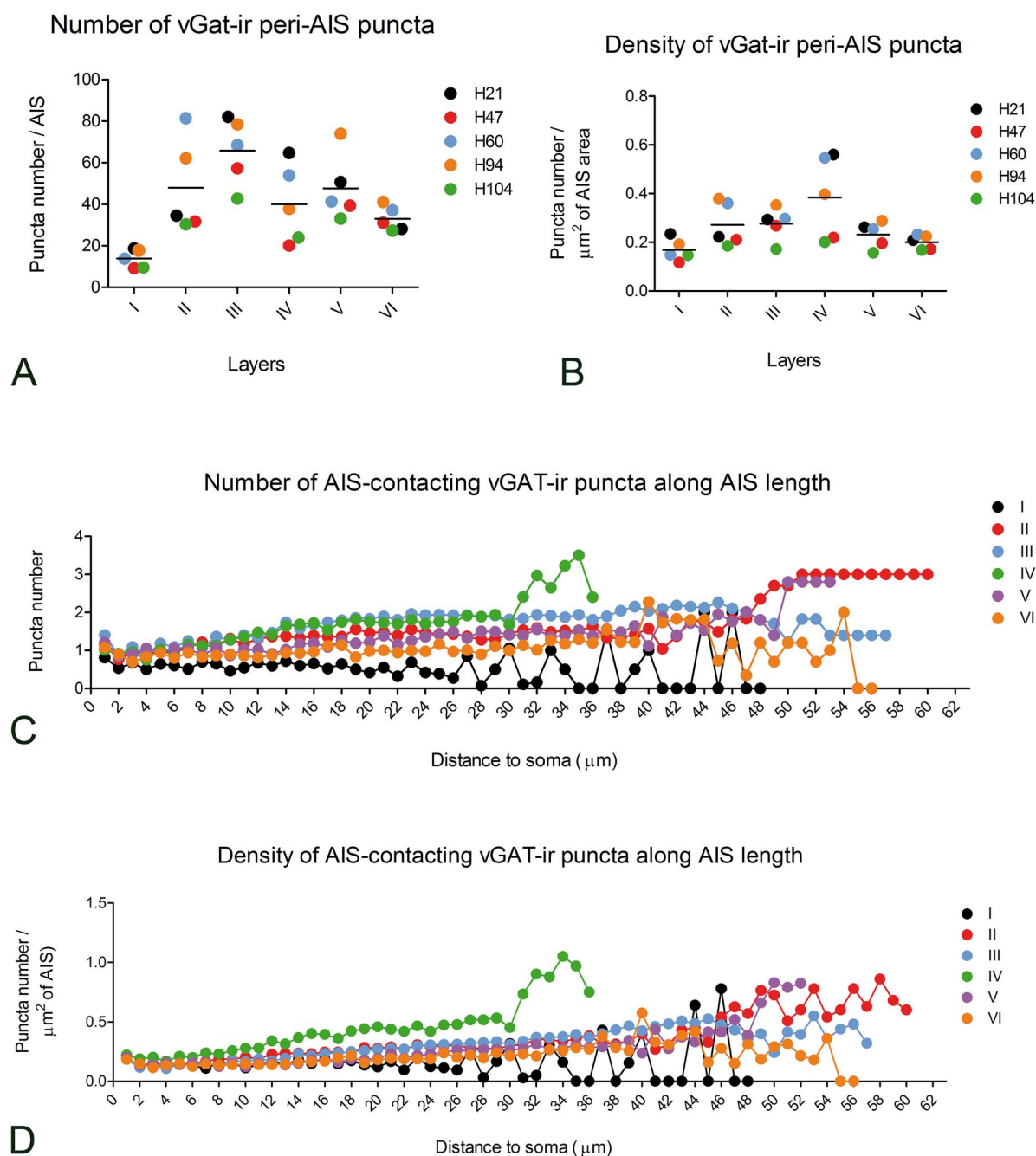


Fig. 11. Graphs showing mean values of the number A) and density B) of vGAT-ir AIS puncta in neurons from different cortical layers of the human temporal neocortex. See Tables 6 and 8 for values and statistical comparisons, respectively. C) and D) show the mean number and the density of GABAergic contacts along AIS length. Note, in all cortical layers, the tendency for a higher density of GABAergic innervation of the distal AIS as compared with proximal AIS regions.

(Xu et al. 2012; Harnett et al. 2013; Smith et al. 2013; Cichon and Gan 2015; Takahashi et al. 2016; Schmidt-Hieber et al. 2017), are thought to have important functional consequences. Thus, single pyramidal neurons might play critical roles in cortical computation.

It is well known from early studies of the cerebral cortex, based on cytoarchitectonic and silver staining techniques, that there are differences in the size of

the soma and the dendritic arbors of neurons located in the different cortical layers. In addition, it has been shown—in several brain regions—that there is great heterogeneity between different neuronal populations with regard to the morphological properties of the AIS, the AIS axial position along the axon, the site of AIS emergence, and AIS expression and distribution of different combinations of ion channels (Boiko et al. 2003;

Mouse HLS1 cortex

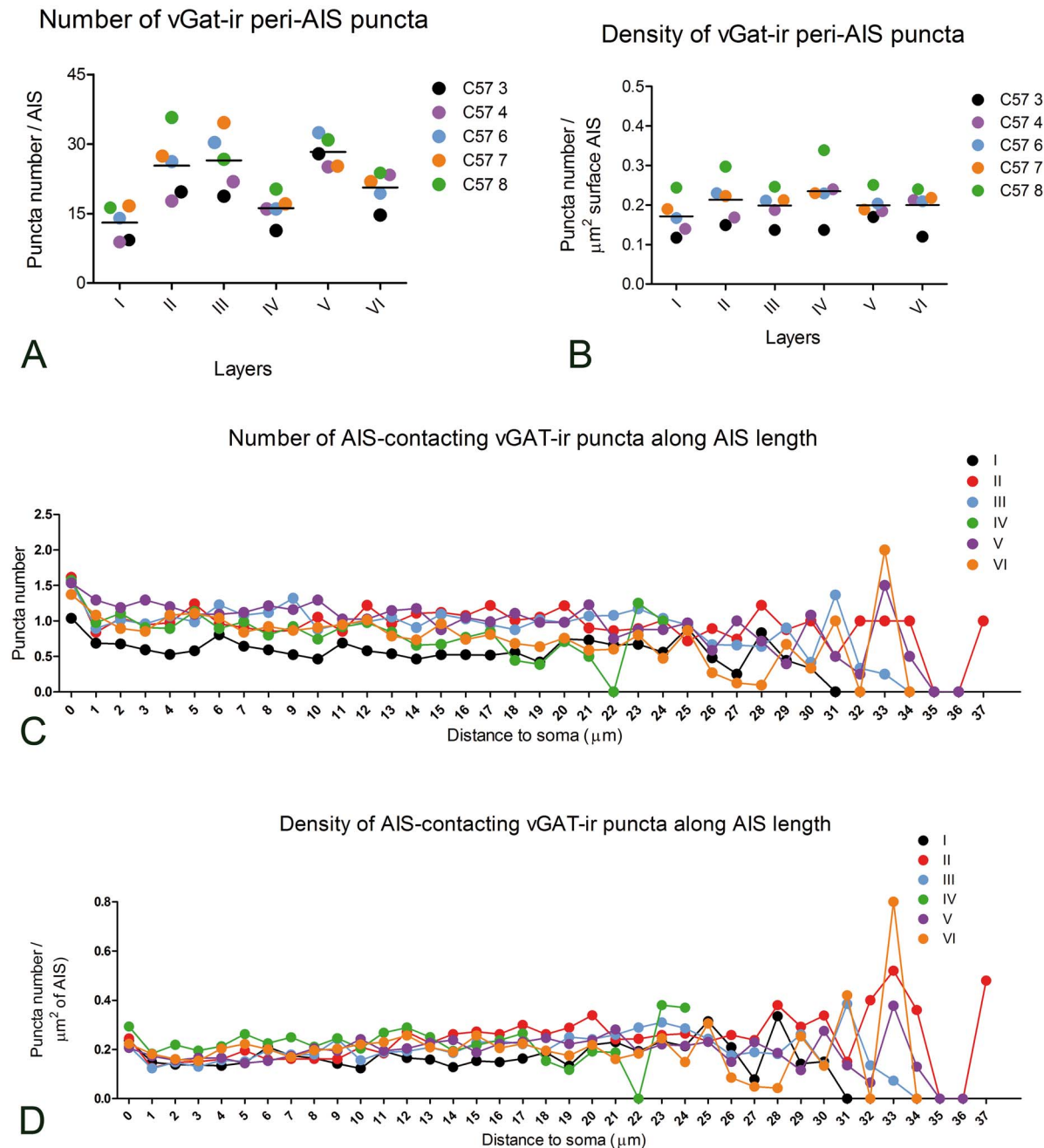


Fig. 12. Graphs showing mean values of the number A) and density B) of vGAT-ir AIS puncta in neurons from different cortical layers of the mouse HLS1 neocortex. See Tables 7 and 9 for values and statistical comparisons, respectively. C) and D) show the mean number and the density of GABAergic contacts along AIS length, respectively. Note, in all cortical layers, the tendency for a higher density of GABAergic innervation of the distal AIS as compared with proximal AIS regions.

Van Wart et al. 2007; Lorincz and Nusser 2008; Hu et al. 2009; Leterrier 2016). Differences in these parameters are thought to have a substantial impact on neuronal biophysical properties and to affect information processing in different neural circuits (Kuba 2007; Hamada et al. 2016; Kole and Brette 2018). According to previous theoretical and modeling studies, the size of the AIS in pyramidal neurons might affect action potential

threshold and firing frequency (Mainen et al. 1995). Neurons with a more distal or thinner AIS would be expected to be either more excitable or require a lower Na^+ channel density for a given level of excitability (Kole and Brette 2018).

In the cerebral cortex (Gonzalez-Cabrera et al. 2017; Hofflin et al. 2017; Kole and Brette 2018) and in retinal ganglion cells (Raghuram et al. 2019), the distance

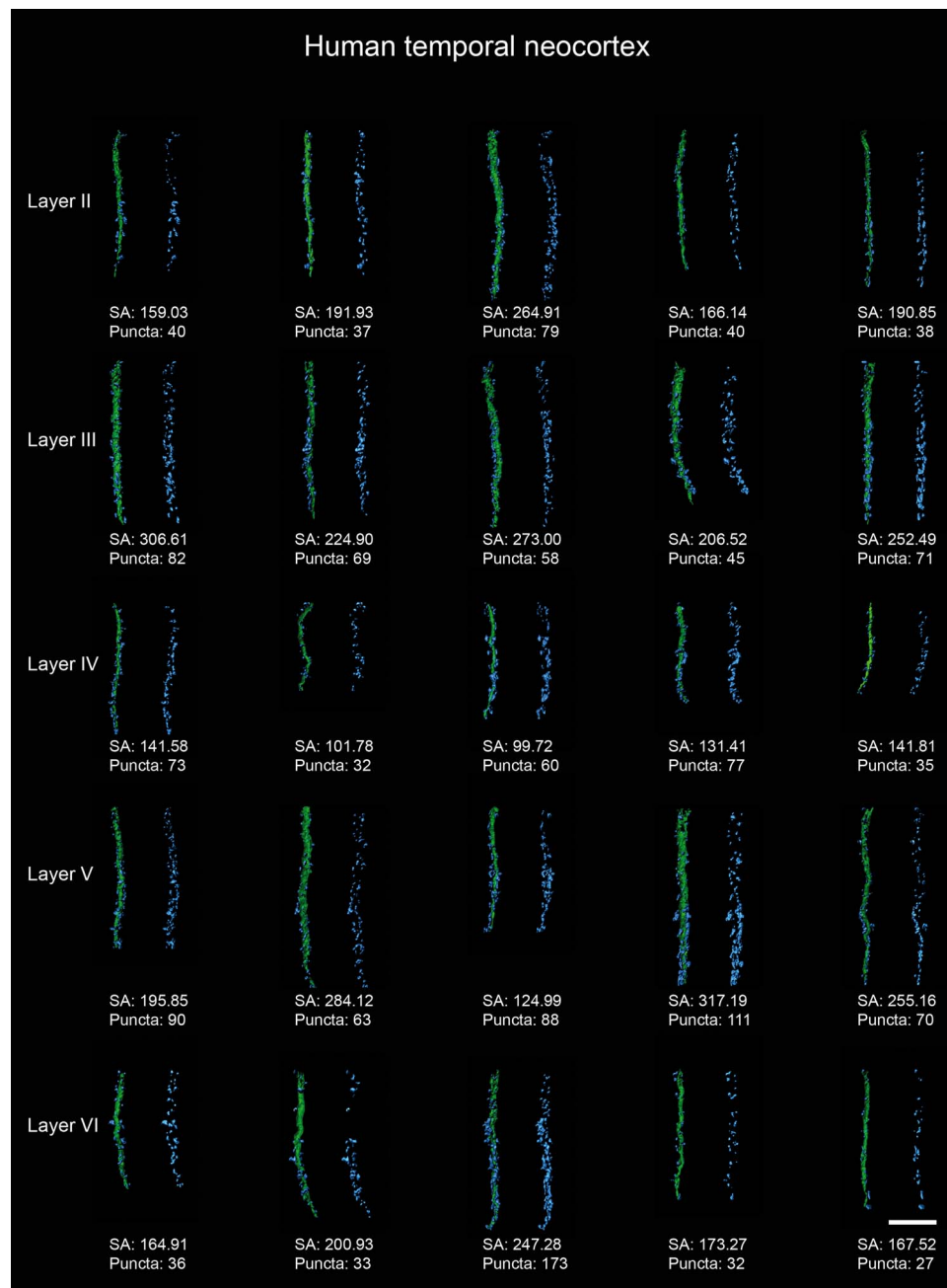


Fig. 13. Diagrams showing examples of some reconstructed pyramidal cell AISs (green) from layers II–VI of the human temporal neocortex along with vGAT-ir elements in apposition to them (blue). SA: surface area (μm^2). Scale bar indicates 4 μm .

between soma and AIS—and the tapering diameter of the segment between both structures—varies among cell types and impacts the backpropagation of AIS-initiated spikes to the soma likely affecting their efficacy to trigger somatic spikes that affect dendritic computation. In addition, somatodendritic size and morphology affect AIS morphology, location, and electrical properties, and determine AIS plasticity-induced regulation of neuronal excitability (Gulledge and Bravo 2016).

AIS can emerge either from the soma or dendrites. In pyramidal cells, dendritic axons are more frequent in hippocampal than in neocortical neurons. Axons arising from dendrites have been observed in 40 and 20% of human and mouse hippocampal pyramidal neurons

(Benavides-Piccione et al. 2020), respectively; this figure is 30% in thick-tufted rat somatosensory layer V pyramidal neurons with distinct dendritic morphology likely reflecting a morphology subtype (Thome et al. 2014; Hamada et al. 2016; Hofflin et al. 2017). All neurons analyzed in the present study, both from mouse HLS1 and human temporal neocortex, had AISs arising from the cell bodies. In addition, the point of AIS initiation, as evaluated by βIV spectrin or ankyrin G immunostaining, was found in contact with the cell somata in the vast majority of the cells. Therefore, our results reveal differences in the cell soma size and geometry of AIS of neurons in different cortical layers with somatic axons with AISs, which are not separated from the soma.

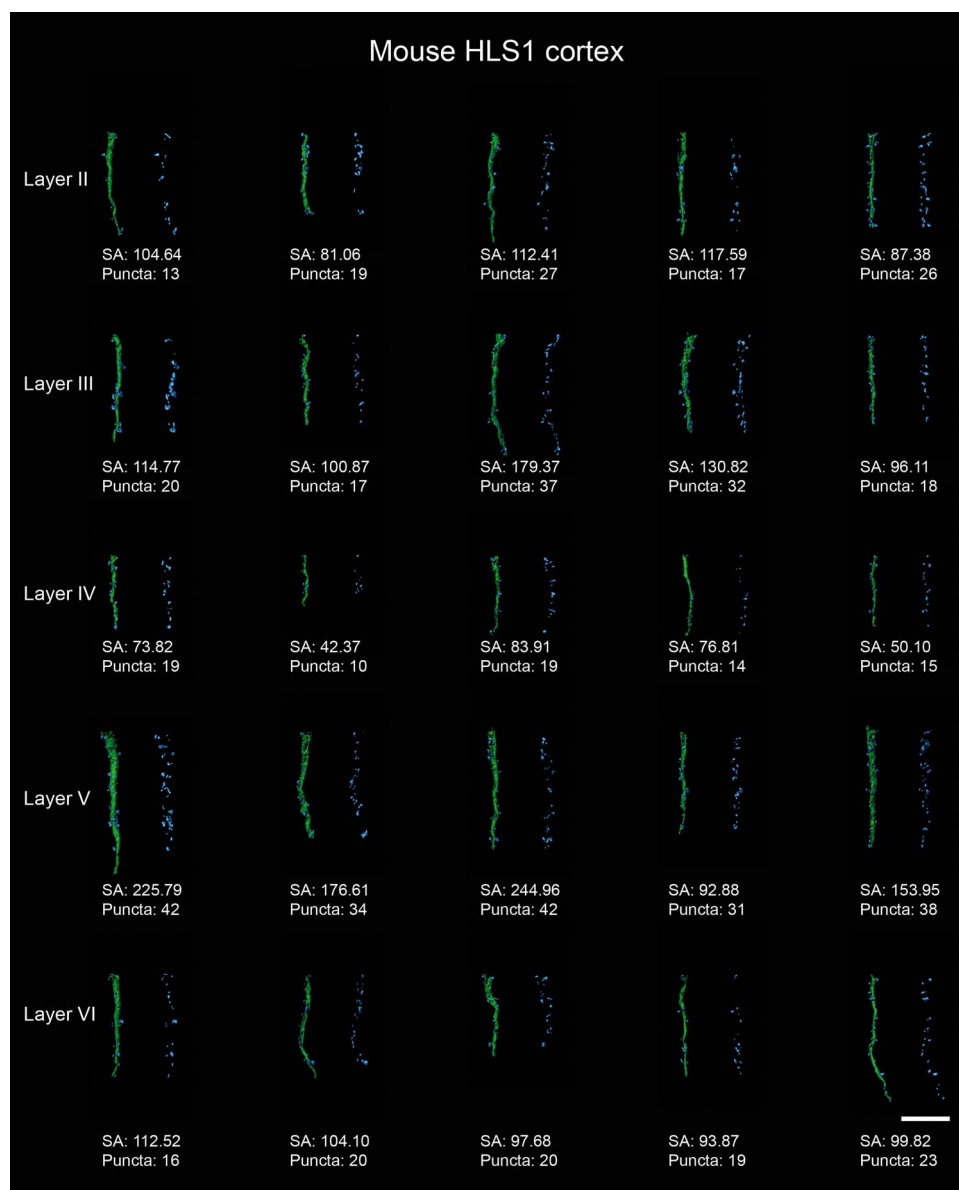


Fig. 14. Diagrams showing examples of some reconstructed pyramidal cell AISs (green) from layers II–VI of the mouse HLS1 cortex along with vGAT-ir elements in apposition to them (blue). SA: surface area (μm^2). Scale bar indicates 4 μm .

In the present study, we found that, both in mouse HLS1 and human temporal neocortex, the size of AIS is not uniform across layers and is related to the size of the soma. In line with previous observations showing that in cortical pyramidal neurons axon diameter scales with soma size (Peters et al. 1968; Sloper and Powell 1979), we found a positive correlation between the soma surface area and the length, mean diameter and surface area of the AIS, indicating that the larger the soma of the neuron is, the larger the AIS would be. Similar observations were reported in retinal ganglion cells, indicating that the variable size of the AIS and the distance from soma were correlated with the size of the somas and dendritic tree (Raghuram et al. 2019). In thick-tufted layer V neurons of the rat somatosensory cortex, it was reported that the size of the AIS does not vary systematically, but the distance from the AIS to the soma is inversely correlated

with the size of the apical dendrite (Hamada et al. 2016). We also found that although in cortical cells AIS length and diameter are not correlated across cortical layers, these 2 variables are correlated with AIS surface area. These results agree with previous observations showing a positive correlation between AIS length and AIS surface area in *substantia nigra* dopaminergic neurons (Gonzalez-Cabrera et al. 2017), in which a negative correlation between soma-AIS distance and AIS length has also been reported (Meza et al. 2018).

In the present study, we also found that neurons from different cortical layers showed a different rate of AIS diameter decrease along their length; this was more pronounced, for example, in layers III and V neurons than in neurons from layers I and IV.

It should be noted that although the present quantitative observations and correlations regarding the soma

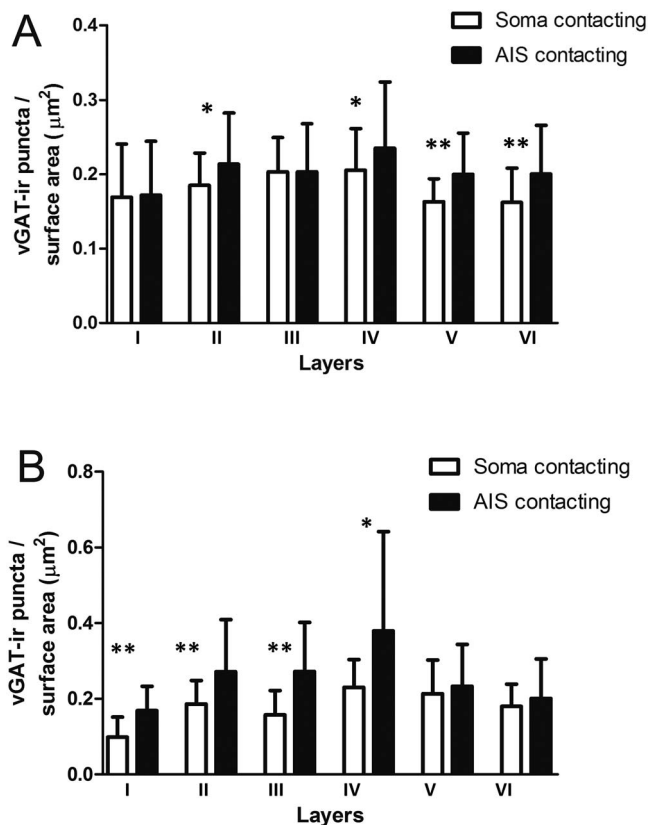


Fig. 15. Histograms showing the differences between the density of vGAT-ir puncta in apposition to the neuronal cell body and AIS of neurons in the different cortical layers of the human temporal neocortex A) and the mouse HLS1 cortex B). * ≤ 0.05 ; ** ≤ 0.01 .

size and AIS geometry of cortical neurons from different layers were similar in mouse HLS1 and human temporal neocortex, whether this is a general rule remains to be investigated in other cortical regions and species.

In addition, to better understand the contribution of pyramidal neurons from different cortical layers to the functioning of cortical circuits, the present morphological observations on the soma and AIS should be complemented with (i) dendritic tree morphological data; (ii) molecular information such as the density of expression of receptors and ion channels that determine active conductances in the different neuronal domains; and (iii) connectivity data, including the GABAergic innervation of different neuronal domains (see below).

Density of GABAergic perisomatic innervation of pyramidal cells

Heterogeneity in the GABAergic innervation of cortical pyramidal neuronal somata by basket terminals

The results of the present work are in line with the idea that the perisomatic GABAergic innervation is heterogeneous and specific for particular populations of cortical pyramidal neurons. Basket cells include small, large, and nest basket cells with differences in size, dendritic and axonal projections, firing properties, and molecular expression patterns (Kawaguchi and Kubota 1998; Wang et al. 2002; Markram et al. 2004; Uematsu et al. 2008;

Helmstaedter et al. 2009). Although the main targets of basket cell axon terminals are neuronal somata, different types of basket cells may also differentially innervate dendritic shafts and dendritic spines (Halasy et al. 1996; Thomson et al. 1996; Tamas et al. 1997; Kawaguchi and Kubota 1998; Somogyi et al. 1998; Kubota et al. 2015; Takacs et al. 2015). The synaptic site of basket terminals has been found to match both the junctional size and the strength of the inhibitory effects (Kubota et al. 2015). Somatic junctions have larger synaptic areas than dendritic sites and synapses made with dendritic shafts have larger synaptic areas than those made with dendritic spines (Kubota et al. 2015).

The axons of several basket cells converge on the soma of pyramidal neurons forming a basket-like collateral arrangement (DeFelipe et al. 1986; Lund and Lewis 1993; Krimer and Goldman-Rakic 2001; DeFelipe et al. 2013). Previous work mainly carried out in the rodent hippocampus showed that basket cells, whose synapses converge in the same perisomatic region, include several classes based on neurochemical, electrophysiological, and morphological differences including cell size, axon branching, and ultrastructural features of their axon terminals (Wang et al. 2002; Freund and Katona 2007; Klausberger et al. 2005; Klausberger and Somogyi 2008; Ascoli et al. 2008; Buzsaki and Wang 2012; Takacs et al. 2015; Tremblay et al. 2016).

Despite the potential variability and selectivity in the innervation of different targets by basket cells, physiological studies proposed that the axons of inhibitory neurons, including those from PV+ basket neurons, form an unspecific and homogenous matrix indiscriminately contacting most neighboring pyramidal cells (Fino and Yuste 2011; Packer and Yuste 2011; Packer et al. 2013). In contrast, in the present work we found, both in the human temporal neocortex and the mouse HLS1, large variation across cortical layers in the number of vGAT-ir terminals in apposition to the cell body of most pyramidal neurons that form the typical pericellular GABAergic innervation. The number of boutons for this innervation ranged from 88 (layer IV neurons) to 145 (layer V neurons) in the mouse HLS1 and from 122 (layers II and IV neurons) to 262 (layer V neurons) in the human temporal neocortex. Taking into account the cell body surface area, the density of perisomatic GABAergic innervation was different across cortical layers and was found to be highest (~ 0.2 boutons/ μm^2) in layer IV pyramidal neurons in both species. These results add to previous evidence for the existence of great heterogeneity and selectivity in the perisomatic innervation of pyramidal cells, which is likely to affect the strength of the inhibitory effects, in different cortical areas and layers, in different neuronal populations within cortical layers—and even in different membrane domains. For example, significant differences were reported in the density of complex basket formations in the human neocortex, with greater density in primary motor and sensory than in associative areas (Blazquez-Llorca et al. 2010). In addition, in the cat visual

cortex, it was found that corticocortical neurons receive more inhibitory contacts in the soma than corticothalamic neurons (Farinas and DeFelipe 1991a, 1991b). In the mouse prefrontal cortex, fast-spiking PV+ basket neurons preferentially inhibit thick-tufted, subcortically-projecting neurons in layer V (Lee et al. 2014). In the medial entorhinal cortex of the mouse, CCK+ basket cells innervate layer II pyramidal cells projecting outside the hippocampus avoiding neighboring cells that project to the dentate gyrus (Varga et al. 2010). In the mouse hippocampus, PV+ basket cells—but not CCK+ basket cells—induce greater currents in CA1 pyramidal neurons located in the deep aspect of the stratum pyramidale than in the superficial aspect, particularly in those neurons projecting to the amygdala (Lee et al. 2014).

In addition, the GABAergic synaptic boutons that hippocampal pyramidal cell somata receive may arise from the convergence of terminals from multiple types of basket cells (Buhl et al. 1994) and, to a lesser extent, from other types of interneurons (Ferraguti et al. 2005; Fuentealba et al. 2008; Takacs et al. 2013) and these boutons might be heterogeneous (Takacs et al. 2015). It has been shown that CA1 and CA3 rat hippocampal pyramidal neurons receive respectively around 60 and 140 perisomatic boutons, of which 60% are PV+ and 40% are CCK+ (Takacs et al. 2015). Basket axonal boutons frequently form multiple release sites (90% of basket terminals established >1 synapse, sometimes up to 5, that might terminate in only 1 soma, or 2 somas and adjacent dendrites) and the resulting PV+ and CCK+ synaptic coverage varies between CA1 and CA3 neurons (Takacs et al. 2015).

Heterogeneity in the GABAergic innervation of cortical pyramidal neuronal AIS by Ch-terminals

The vast majority of synapses established with the AIS of pyramidal cells originate from chandelier cells (or axo-axonic cells). The unique feature of chandelier cell axonal morphology is the terminal portions of its axon that form vertical rows of boutons resembling candlesticks (Ch-terminals), which establish symmetrical synapses (GABAergic) with the AISs of pyramidal cells (Szentagothai and Arbib 1974; Jones 1975; Somogyi 1977; Fairen and Valverde 1980; Peters et al. 1982; Somogyi et al. 1982; Freund and Somogyi 1983; DeFelipe et al. 1985). As the AIS represents the final location for synaptic integration and the site of action potential initiation, AIS innervation by Ch-terminals is thought to strongly regulate pyramidal cell output (Kole and Stuart 2012).

The AIS of single pyramidal neurons may be innervated by one or several (up to 5) cartridges that may originate from the same or different Ch cells (Fairen and Valverde 1980; Peters et al. 1982; Freund and Somogyi 1983; Somogyi et al. 1982, 1983; De Carlos et al. 1987; DeFelipe and Farinas 1992; Tamas and Szabadics 2004; Larriva-Sahd 2010; Inan et al. 2013; Blazquez-Llorca et al. 2015). A single Ch cell innervates up to several 100 pyramidal cells (Freund and Somogyi 1983;

DeFelipe et al. 1985; Somogyi et al. 1985; Li et al. 1992; Tai et al. 2014; Blazquez-Llorca et al. 2015) and may exert control over the spiking of pyramidal neuron ensembles.

It has previously been shown that the innervation of pyramidal cells by Ch cells is not homogeneous across different cortical regions and/or layers. There are many examples of this including the neurochemical and phenotypic regional variations of Ch cells that have been reported between the hippocampus and the neocortex, with hippocampal Ch cells innervating twice as many pyramidal neurons than neocortical Ch cells (Ishino et al. 2017).

Differential gene expression in supragranular and infragranular Ch cells has been shown in the frontal cortex (Paul et al. 2017) and different morphological variants of Ch cells have been found in different cortical regions (Varga et al. 2014; Szabo et al. 2017) and layers (Somogyi et al. 1982; De Carlos et al. 1985; DeFelipe et al. 1985; Lewis and Lund 1990; Taniguchi et al. 2013).

Studies carried out in different species have reported great heterogeneity in the density of Ch cell axon terminals. The total number of GABAergic boutons that contact the AIS has been shown to differ between species, cortical areas, cortical layers, and even between different neuronal populations. For example, complex Ch-terminals, made up of a multitude of Ch-boutons, are abundant in the human neocortex, but their density is higher in associative than in sensory areas, and in supragranular layers than in infragranular cortical layers (Inda et al. 2007). In the mouse, complex Ch-terminals are relatively abundant in various regions of the amygdala (Inda et al. 2009; Veres et al. 2014; Vereczki et al. 2016; Andrasi et al. 2017) and in the entorhinal and piriform cortices (Inda et al. 2009); indeed, in the piriform cortex, they are particularly abundant in layer II where virtually every pyramidal neuron seems to be innervated by Ch cells (Wang and Sun 2012; Wang et al. 2014). In contrast, Ch-terminals in the mouse neocortex form simple strings made up of a discrete number of GABAergic boutons (Inda et al. 2009).

In the monkey prefrontal cortex, the number of boutons that contact AIS in layers II–IV of the adult monkey can vary between different pyramidal cells from 0 to up to 40 (mean: 10.5; Cruz et al. 2003; Fish et al. 2013). It was shown that Ch-terminals preferentially target certain neuronal populations, such as those with intracortical projections in the visual and auditory visual cortex (Sloper and Powell 1979; Fairen and Valverde 1980; De Carlos et al. 1985; DeFelipe et al. 1985; Fariñas and DeFelipe 1991b), and specifically avoid the AISs of certain cells. For example, in the cat visual cortex, it was found that callosal or ipsilateral corticocortical neurons receive more inhibitory contacts (16–23 and 22–28, respectively) in the AIS than corticothalamic neurons (1–5; Farinas and DeFelipe 1991a, 1991b).

Simple Ch-terminals in the rodent neocortex are made up of a relatively few boutons. Ultrastructural observations of pyramidal cell AISs in the rat sensory-motor

cortex revealed an average of 17.6 (range: 15–22) axo-axonic synaptic contacts on AISs (Mendizabal-Zubiaga et al. 2007). Similarly, studies in layer II of the primary somatosensory cortex of transgenic mouse expressing GFP have estimated that the AIS of each pyramidal neuron is innervated by 4 Ch cells, each of which contribute 3–5 boutons (up to a total of 20; Inan et al. 2013; Blazquez-Llorca et al. 2015). In addition, these studies showed a high degree of selectivity in the pyramidal cell innervation by Ch cells, as each Ch cell contacts 35–50 pyramidal neurons (~20% of the total) within its axonal arbor in a heterogeneous manner, with pockets of high innervation density and regions that receive scarce or no innervation. Similarly, in the mouse prelimbic cortex, specific subsets of layer II Ch cells innervate ensembles of pyramidal cells projecting to the basolateral amygdala while avoiding those projecting to the contralateral cortex (Lu et al. 2017).

Recent studies in the mouse prefrontal, motor, and somatosensory cortices have shown that Ch cells include different subtypes related to differences in input–output connectivity derived from their laminar position. It has been shown that Ch cells with a lamina-specific position of the soma and of the dendritic (especially basal dendritic) and axonal arborization patterns allow the differential recruitment by presynaptic cortical and subcortical input streams of pyramidal cell ensembles known to project to specific targets (Wang et al. 2019). In line with these studies, in the present work we found, both in the human temporal neocortex and the mouse HLS1, great variation across cortical layers with regard to the number of vGAT-ir terminals in apposition to the AIS of pyramidal neurons. The number of boutons ranged from 16 (layer IV neurons) to 28 (layer V neurons) in the mouse HLS1 and from 35 (layer VI neurons) to 65 (layer III neurons) in the human temporal neocortex. We observed that GABAergic boutons in human neocortex were biased toward the distal end of the AIS. This contrasts with (i) observations in rat hippocampal pyramidal cells, where the GABAergic terminals were concentrated in the mid-AIS region (Wefelmeyer et al. 2015) and (ii) observations in mouse pyramidal cells of the piriform cortex (Wang et al. 2014) and principal cells of the basolateral amygdala (Veres et al. 2014) in which Ch-terminals innervate the entire length or the proximal region of the AIS, respectively. In mouse neocortical cells, we observed that Ch-terminals homogeneously distribute along the length of the AIS. Interestingly, when we considered the decrease in surface area along the length of the AIS, in parallel with the decrease in AIS diameter, we observed that both in mouse and human neocortical pyramidal cells, the density of GABAergic innervation was highest in the distal AIS, where action potentials are initiated (Palmer and Stuart 2006; Palmer et al. 2010; Baranauskas et al. 2013; Eyal et al. 2014).

In line with previous reports in other cortical areas and species (DeFelipe et al. 1985; Fariñas and DeFelipe 1991; Cruz et al. 2003; Fish et al. 2013; Inan and Anderson 2014),

we found—both in the human temporal neocortex and the mouse HLS1—that the number of vGAT-ir terminals in apposition to the AIS positively correlated with AIS size. Using the AIS surface area as a measure of AIS size, we found that the density of AIS GABAergic innervation was highest (~0.25 boutons/ μm^2) in the AIS of layer IV pyramidal neurons in both species. In addition, this density was not correlated with AIS size or with the relative abundance of GABAergic terminals in the neuropil of the different layers. This indicates that additional factors determine the density of the GABAergic innervation of the pyramidal cell AIS.

Finally, our results revealed that the density of GABAergic Ch-terminals in apposition to the pyramidal AIS from both human temporal neocortex and mouse HLS1 was higher (or equal in some layers) than that of basket terminals in apposition to pyramidal cell bodies. In addition, the laminar variations in the density of GABAergic innervation of the neuronal somatas were not correlated with that of the AISs in either mice or humans. The heterogeneity found for these GABAergic innervations across cortical layers is likely to differentially modulate the activity of pyramidal cells in different cortical layers, which participate in cortical microcircuits processing different types of information (Harris and Shepherd 2015). This adds to previous studies proposing that laminar differences in Ch cell soma position and dendritic morphology relate to differences in input–output connectivity (Wang et al. 2019), associating the arrival of lamina-specific cortical and subcortical afferents with the recruitment of ensembles of pyramidal cells projecting to specific targets.

Caveats

In the present study, we have quantified the number and density of vGAT-ir puncta in apposition to the pyramidal cell somata and AISs to estimate the number and density of inhibitory synaptic contacts in these cellular domains. Two main limitations affect the present observations: (i) vGAT was reported to be present in most but not all GABAergic synapses (Chaudhry et al. 1998; but see Wang and Sun 2012). Therefore, we might have underestimated the number of boutons in our analysis, and (ii) It is important to consider that unequivocal identification of synaptic contacts requires electron microscopy. For instance, not all vGAT-ir boutons in apposition to the cell somata or AIS necessarily indicate the existence of synapses in these regions, indeed synapses with other adjacent elements of the neuropil are also commonly found (e.g. see DeFelipe et al. 1986; Farinas and DeFelipe 1991a, 1991b; Alonso-Nanclares et al. 2004; Karube et al. 2004; Merchan-Perez et al. 2009). In this regard, it should be noted that synaptic innervation of the AIS appears to be a typical characteristic of pyramidal cells. However, in the present study, we found that the AISs of layer I neurons (most of which are GABAergic; e.g. Schuman et al. 2019) were observed to be surrounded by $\sim 13 \pm 6$ vGAT-ir puncta in both humans and mice. This is a high

number considering that the AISs of GABAergic interneurons receive only 1 or 2 synapses in some cases—occasionally >3. This is the case of the large basket cells, which have been found to receive as many as 6 or 8 initial segment synapses (DeFelipe et al. 1986). On the other hand, vGAT-ir axonal boutons might establish more than 1 synapse, as has been shown in the hippocampus for basket terminals (Takacs et al. 2015). Therefore, the values obtained in the present study regarding the numbers and density of GABAergic terminals do not necessarily reflect the absolute numbers of GABAergic synapses on the soma and AIS, for which further quantitative electron microscopy studies would need to be performed. Nevertheless, serial electron microscope studies are extremely difficult and time-consuming (e.g. see Farinas and DeFelipe 1991a, 1991b), if the aim is to obtain a good estimation of the number of synapses that the cell body and the AIS receive in all cortical layers. This is even more challenging considering the possible interindividual variability in the number of GABAergic terminals. Therefore, we consider that the present results—based on the full 3D reconstruction of the soma and the AIS of at least 15 neurons per cortical layer (a total of 540 neurons and 450 AIS in the human and 450 and 450, respectively, in the mouse), in 5 individuals of each species (human and mouse)—represent a good estimation of the differences in the density and number of putative GABAergic innervations of the cell body and AIS of neurons located in different cortical layers.

Supplementary material

Supplementary material is available at *Cerebral Cortex* online.

Acknowledgments

We would like to thank Nick Guthrie for his helpful comments and excellent editorial assistance.

Conflict of interest statement: The authors declare no conflict of interest.

Funding

This work was supported by the following entities: grants SAF 2010-18218 and PID2021-127924NB-I00 funded by MCIN/AEI/10.13039/501100011033; Centro de Investigación en Red sobre Enfermedades Neurodegenerativas (CIBERNED, CB06/05/0066); and CSIC Interdisciplinary Thematic Platform (PTI) Cajal Blue Brain (PTI-BLUEBRAIN; Spain).

References

- Alonso-Nanclares L, Minelli A, Melone M, Edwards RH, Defelipe J, Conti F. Perisomatic glutamatergic axon terminals: a novel feature of cortical synaptology revealed by vesicular glutamate transporter 1 immunostaining. *Neuroscience*. 2004;123:547–556.
- Alonso-Nanclares L, Gonzalez-Soriano J, Rodriguez JR, Defelipe J. Gender differences in human cortical synaptic density. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008;105:14615–14619.
- Andrasi T, Veres JM, Rovira-Esteban L, Kozma R, Vikor A, Gregori E, Hajos N. Differential excitatory control of 2 parallel basket cell networks in amygdala microcircuits. *PLoS Biol*. 2017;15:e2001421.
- Armstrong C, Soltesz I. Basket cell dichotomy in microcircuit function. *J Physiol*. 2012;590:683–694.
- Arellano J.I., Munoz A., Ballesteros-Yanez I., Sola R.G., and Defelipe J. Histopathology and reorganization of chandelier cells in the human epileptic sclerotic hippocampus. *Brain* 2004;127:45–64.
- Ascoli GA, Alonso-Nanclares L, Anderson SA, Barrionuevo G, Benavides-Piccione R, Burkhalter A, Buzsaki G, Cauli B, Defelipe J, Fairen A et al. Petilla terminology: nomenclature of features of GABAergic interneurons of the cerebral cortex. *Nat Rev Neurosci*. 2008;9:557–568.
- Atkinson SE, Williams SR. Postnatal development of dendritic synaptic integration in rat neocortical pyramidal neurons. *J Neurophysiol*. 2009;102:735–751.
- Baranauskas G, David Y, Fleidervish IA. Spatial mismatch between the Na⁺ flux and spike initiation in axon initial segment. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013;110:4051–4056.
- Bartos M, Elgueta C. Functional characteristics of parvalbumin- and cholecystokinin-expressing basket cells. *J Physiol*. 2012;590:669–681.
- Benavides-Piccione R, DeFelipe J. Distribution of neurons expressing tyrosine hydroxylase in the human cerebral cortex. *J Anat*. 2007;211:212–222.
- Benavides-Piccione R, Regalado-Reyes M, Fernaud-Espinosa I, Kastanauskaite A, Tapia-Gonzalez S, Leon-Espinosa G, Rojo C, Insausti R, Segev I, DeFelipe J. Differential structure of hippocampal CA1 pyramidal neurons in the human and mouse. *Cereb Cortex*. 2020;30:730–752.
- Bender KJ, Trussell LO. The physiology of the axon initial segment. *Annu Rev Neurosci*. 2012;35:249–265.
- Berg J, Sorensen SA, Ting JT, Miller JA, Chartrand T, Buchin A, Bakken TE, Budzillo A, Dee N, Ding SL et al. Human neocortical expansion involves glutamatergic neuron diversification. *Nature*. 2021;598:151–158.
- Blazquez-Llorca L, Garcia-Marin V, Defelipe J. Pericellular innervation of neurons expressing abnormally hyperphosphorylated tau in the hippocampal formation of Alzheimer's disease patients. *Front Neuroanat*. 2010;4:20.
- Blazquez-Llorca L, Woodruff A, Inan M, Anderson SA, Yuste R, DeFelipe J, Merchán-Pérez A. Spatial distribution of neurons innervated by chandelier cells. *Brain Struct Funct*. 2015;220:2817–2834.
- Boiko T, Van Wart A, Caldwell JH, Levinson SR, Trimmer JS, Matthews G. Functional specialization of the axon initial segment by isoform-specific sodium channel targeting. *J Neurosci*. 2003;23:2306–2313.
- Buhl EH, Han ZS, Lorinczi Z, Stezhka VV, Karnup SV, Somogyi P. Physiological properties of anatomically identified axo-axonic cells in the rat hippocampus. *J Neurophysiol*. 1994;71:1289–1307.
- Buzsaki G, Wang XJ. Mechanisms of gamma oscillations. *Annu Rev Neurosci*. 2012;35:203–225.
- Cano-Astorga N, Defelipe J, Alonso-Nanclares L. Three-dimensional synaptic organization of layer III of the human temporal neocortex. *Cereb Cortex*. 2021;31:4742–4764.
- Chaudhry FA, Reimer RJ, Bellocchio EE, Danbolt NC, Osen KK, Edwards RH, Storm-Mathisen J. The vesicular GABA transporter, VGAT, localizes to synaptic vesicles in sets of glycinergic as well as GABAergic neurons. *J Neurosci*. 1998;18:9733–9750.

- Cichon J, Gan WB. Branch-specific dendritic Ca(2+) spikes cause persistent synaptic plasticity. *Nature*. 2015;520:180–185.
- Cobb SR, Buhl EH, Halasy K, Paulsen O, Somogyi P. Synchronization of neuronal activity in hippocampus by individual GABAergic interneurons. *Nature*. 1995;378:75–78.
- Cruz DA, Eggan SM, Lewis DA. Postnatal development of pre- and postsynaptic GABA markers at chandelier cell connections with pyramidal neurons in monkey prefrontal cortex. *J Comp Neurol*. 2003;465:385–400.
- De Carlos JA, Lopez-Mascaraque L, Valverde F. Development, morphology and topography of chandelier cells in the auditory cortex of the cat. *Brain Res*. 1985;354:293–300.
- De Carlos J.A., Lopez-Mascaraque L., Ramon Y Cajal-Agueras S., and Valverde F. Chandelier cells in the auditory cortex of monkey and man: a Golgi study. *Exp Brain Res* 1987;66:295–302.
- DeFelipe J. Chandelier cells and epilepsy. *Brain*. 1999;122(Pt 10):1807–1822.
- DeFelipe J. The evolution of the brain, the human nature of cortical circuits, and intellectual creativity. *Front Neuroanat*. 2011;5:29.
- DeFelipe J, Farinas I. The pyramidal neuron of the cerebral cortex: morphological and chemical characteristics of the synaptic inputs. *Prog Neurobiol*. 1992;39:563–607.
- DeFelipe J, Rudy B. Neocortical microcircuits. In: GM Shepherd, S Grillner, editors. *Handbook of brain circuits*. Second ed. New York: Oxford University Press; 2018. pp. 3–22.
- DeFelipe J, Hendry SH, Jones EG, Schmechel D. 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*. 1985;231:364–384.
- DeFelipe J, Hendry SH, Jones EG. A correlative electron microscopic study of basket cells and large GABAergic neurons in the monkey sensory-motor cortex. *Neuroscience*. 1986;17:991–1009.
- DeFelipe J, Gonzalez-Albo MC, Del Rio MR, Elston GN. Distribution and patterns of connectivity of interneurons containing calbindin, calretinin, and parvalbumin in visual areas of the occipital and temporal lobes of the macaque monkey. *J Comp Neurol*. 1999;412:515–526.
- DeFelipe J, Lopez-Cruz PL, Benavides-Piccione R, Bielza C, Larranaga P, Anderson S, Burkhalter A, Cauli B, Fairen A, Feldmeyer D et al. New insights into the classification and nomenclature of cortical GABAergic interneurons. *Nat Rev Neurosci*. 2013;14:202–216.
- Dominguez-Alvaro M, Montero-Crespo M, Blazquez-Llorca L, Defelipe J, Alonso-Nanclares L. 3D Ultrastructural study of synapses in the human entorhinal cortex. *Cereb Cortex*. 2021;31:410–425.
- Ellender TJ, Paulsen O. The many tunes of perisomatic targeting interneurons in the hippocampal network. *Front Cell Neurosci*. 2010;4.
- Engel J Jr, Van Ness PC, Rasmussen TB, Ojemann LM. Outcome with respect to epileptic seizures. In: Engel J Jr, editor. *Surgical treatment of the epilepsies*. New York: Raven Press; 1993. pp. 609–621.
- Eyal G, Mansvelder HD, de Kock CP, Segev I. Dendrites impact the encoding capabilities of the axon. *J Neurosci*. 2014;34:8063–8071.
- Fairen A, Valverde F. A specialized type of neuron in the visual cortex of cat: a Golgi and electron microscope study of chandelier cells. *J Comp Neurol*. 1980;194:761–779.
- Farinas I, DeFelipe J. Patterns of synaptic input on corticocortical and corticothalamic cells in the cat visual cortex. I. The cell body. *J Comp Neurol*. 1991a;304:53–69.
- Farinas I, DeFelipe J. Patterns of synaptic input on corticocortical and corticothalamic cells in the cat visual cortex. II. The axon initial segment. *J Comp Neurol*. 1991b;304:70–77.
- Feldmeyer D, Qi G, Emmenegger V, Staiger JF. Inhibitory interneurons and their circuit motifs in the many layers of the barrel cortex. *Neuroscience*. 2018;368:132–151.
- Ferraguti F, Klausberger T, Cobden P, Baude A, Roberts JD, Szucs P, Kinoshita A, Shigemoto R, Somogyi P, Dalezios Y. Metabotropic glutamate receptor 8-expressing nerve terminals target subsets of GABAergic neurons in the hippocampus. *J Neurosci*. 2005;25:10520–10536.
- Fino E, Yuste R. Dense inhibitory connectivity in neocortex. *Neuron*. 2011;69:1188–1203.
- Fish KN, Hoftman GD, Sheikh W, Kitchens M, Lewis DA. Parvalbumin-containing chandelier and basket cell boutons have distinctive modes of maturation in monkey prefrontal cortex. *J Neurosci*. 2013;33:8352–8358.
- Freund TF, Katona I. Perisomatic inhibition. *Neuron*. 2007;56:33–42.
- Freund TF, Somogyi P. The section-Golgi impregnation procedure. 1. Description of the method and its combination with histochemistry after intracellular iontophoresis or retrograde transport of horseradish peroxidase. *Neuroscience*. 1983;9:463–474.
- Fuentealba P, Tomioka R, Dalezios Y, Marton LF, Studer M, Rockland K, Klausberger T, Somogyi P. Rhythmically active enkephalin-expressing GABAergic cells in the CA1 area of the hippocampus project to the subiculum and preferentially innervate interneurons. *J Neurosci*. 2008;28:10017–10022.
- Gallo NB, Paul A, Van Aelst L. Shedding light on chandelier cell development, connectivity, and contribution to neural disorders. *Trends Neurosci*. 2020;43:565–580.
- Gibson JR, Huber KM, Sudhof TC. Neuroligin-2 deletion selectively decreases inhibitory synaptic transmission originating from fast-spiking but not from somatostatin-positive interneurons. *J Neurosci*. 2009;29:13883–13897.
- Gonzalez-Burgos G, Hashimoto T, Lewis DA. Alterations of cortical GABA neurons and network oscillations in schizophrenia. *Curr Psychiatry Rep*. 2010;12:335–344.
- Gonzalez-Cabrera C, Meza R, Ulloa L, Merino-Sepulveda P, Luco V, Sanhueza A, Onate-Ponce A, Bolam JP, Henny P. Characterization of the axon initial segment of mice substantia nigra dopaminergic neurons. *J Comp Neurol*. 2017;525:3529–3542.
- Gouwens NW, Sorensen SA, Baftizadeh F, Budzillo A, Lee BR, Jarsky T, Alfiler L, Baker K, Barkan E, Berry K et al. Integrated morphoelectric and transcriptomic classification of cortical GABAergic cells. *Cell*. 2020;183:935, e919–953.
- Gulledge AT, Bravo JJ. Gulledge AT, Bravo JJ. Neuron Morphology Influences Axon Initial Segment Plasticity. *eNeuro*. 2016;3:ENEURO.0085-15.2016.
- Halasy K, Cobb SR, Buhl EH, Nyiri G, Somogyi P. Sites of synaptic junctions established by a GABAergic basket cell on an interneuron in the CA1 area of the rat hippocampus. *Neurobiology (Bp)*. 1996;4:269–270.
- Hamada MS, Goethals S, de Vries SI, Brette R, Kole MH. Covariation of axon initial segment location and dendritic tree normalizes the somatic action potential. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2016;113:14841–14846.
- Harnett MT, Xu NL, Magee JC, Williams SR. Potassium channels control the interaction between active dendritic integration compartments in layer 5 cortical pyramidal neurons. *Neuron*. 2013;79:516–529.
- Harris KD, Shepherd GM. The neocortical circuit: themes and variations. *Nat Neurosci*. 2015;18:170–181.
- Helmstaedter M, Sakmann B, Feldmeyer D. Neuronal correlates of local, lateral, and translaminar inhibition with reference to cortical columns. *Cereb Cortex*. 2009;19:926–937.

- Hofflin F, Jack A, Riedel C, Mack-Bucher J, Roos J, Corcelli C, Schultz C, Wahle P, Engelhardt M. Heterogeneity of the axon initial segment in interneurons and pyramidal cells of rodent visual cortex. *Front Cell Neurosci.* 2017;11:332.
- Houser CR, Hendry SH, Jones EG, Vaughn JE. Morphological diversity of immunocytochemically identified GABA neurons in the monkey sensory-motor cortex. *J Neurocytol.* 1983;12:617–638.
- Hu W, Tian C, Li T, Yang M, Hou H, Shu Y. Distinct contributions of Na(v)1.6 and Na(v)1.2 in action potential initiation and backpropagation. *Nat Neurosci.* 2009;12:996–1002.
- Inan M, Anderson SA. The chandelier cell, form and function. *Curr Opin Neurobiol.* 2014;26:142–148.
- Inan M, Welagen J, Anderson SA. Spatial and temporal bias in the mitotic origins of somatostatin- and parvalbumin-expressing interneuron subgroups and the chandelier subtype in the medial ganglionic eminence. *Cereb Cortex.* 2012;22:820–827.
- Inan M, Petros TJ, Anderson SA. Losing your inhibition: linking cortical GABAergic interneurons to schizophrenia. *Neurobiol Dis.* 2013;53:36–48.
- Inda MC, DeFelipe J, Munoz A. 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.* 2006;103:2920–2925.
- Inda MC, Defelipe J, Munoz A. The distribution of chandelier cell axon terminals that express the GABA plasma membrane transporter GAT-1 in the human neocortex. *Cereb Cortex.* 2007;17:2060–2071.
- Inda MC, DeFelipe J, Munoz A. Morphology and distribution of chandelier cell axon terminals in the mouse cerebral cortex and claustroramygdaloid complex. *Cereb Cortex.* 2009;19:41–54.
- Ishino Y, Yetman MJ, Sossi SM, Steinecke A, Hayano Y, Taniguchi H. Regional cellular environment shapes phenotypic variations of hippocampal and neocortical chandelier cells. *J Neurosci.* 2017;37:9901–9916.
- Jones EG. Varieties and distribution of non-pyramidal cells in the somatic sensory cortex of the squirrel monkey. *J Comp Neurol.* 1975;160:205–267.
- Karube F, Kubota Y, Kawaguchi Y. Axon branching and synaptic bouton phenotypes in GABAergic nonpyramidal cell subtypes. *J Neurosci.* 2004;24:2853–2865.
- Kawaguchi Y, Kubota Y. Neurochemical features and synaptic connections of large physiologically-identified GABAergic cells in the rat frontal cortex. *Neuroscience.* 1998;85:677–701.
- Klausberger T, Somogyi P. Neuronal diversity and temporal dynamics: the unity of hippocampal circuit operations. *Science.* 2008;321:53–57.
- Klausberger T, Magill PJ, Marton LF, Roberts JD, Cobden PM, Buzsaki G, Somogyi P. Brain-state- and cell-type-specific firing of hippocampal interneurons in vivo. *Nature.* 2003;421:844–848.
- Klausberger T, Marton LF, O'Neill J, Huck JH, Dalezios Y, Fuentealba P, Suen WY, Papp E, Kaneko T, Watanabe M et al. Complementary roles of cholecystokinin- and parvalbumin-expressing GABAergic neurons in hippocampal network oscillations. *J Neurosci.* 2005;25:9782–9793.
- Kole MH, Brette R. The electrical significance of axon location diversity. *Curr Opin Neurobiol.* 2018;51:52–59.
- Kole MH, Stuart GJ. Signal processing in the axon initial segment. *Neuron.* 2012;73:235–247.
- Kole MH, Ilschner SU, Kampa BM, Williams SR, Ruben PC, Stuart GJ. Action potential generation requires a high sodium channel density in the axon initial segment. *Nat Neurosci.* 2008;11:178–186.
- Krimer LS, Goldman-Rakic PS. Prefrontal microcircuits: membrane properties and excitatory input of local, medium, and wide arbor interneurons. *J Neurosci.* 2001;21:3788–3796.
- Kuba H. Cellular and molecular mechanisms of avian auditory coincidence detection. *Neurosci Res.* 2007;59:370–376.
- Kubota Y. Untangling GABAergic wiring in the cortical microcircuit. *Curr Opin Neurobiol.* 2014;26:7–14.
- Kubota Y, Shigematsu N, Karube F, Sekigawa A, Kato S, Yamaguchi N, Hirai Y, Morishima M, Kawaguchi Y. Selective coexpression of multiple chemical markers defines discrete populations of neocortical GABAergic neurons. *Cereb Cortex.* 2011;21:1803–1817.
- Kubota Y, Kondo S, Nomura M, Hatada S, Yamaguchi N, Mohamed AA, Karube F, Lubke J, Kawaguchi Y. Functional effects of distinct innervation styles of pyramidal cells by fast spiking cortical interneurons. *Elife.* 2015;4.
- Kuhlman SJ, Olivas ND, Tring E, Ikrar T, Xu X, Trachtenberg JT. A disinhibitory microcircuit initiates critical-period plasticity in the visual cortex. *Nature.* 2013;501:543–546.
- Larriva-Sahd JA. Chandelier and interfascicular neurons in the adult mouse piriform cortex. *Front Neuroanat.* 2010;4:148.
- Lee H, Lee D, Park CH, Ho WK, Lee SH. GABA mediates the network activity-dependent facilitation of axonal outgrowth from the newborn granule cells in the early postnatal rat hippocampus. *Eur J Neurosci.* 2012;36:2743–2752.
- Lee SH, Marchionni I, Bezaire M, Varga C, Danielson N, Lovett-Barron M, Losonczy A, Soltesz I. Parvalbumin-positive basket cells differentiate among hippocampal pyramidal cells. *Neuron.* 2014;82:1129–1144.
- Leterrier C. The axon initial segment, 50Years later: a nexus for neuronal organization and function. *Curr Top Membr.* 2016;77:185–233.
- Lewis DA, Lund JS. Heterogeneity of chandelier neurons in monkey neocortex: corticotropin-releasing factor- and parvalbumin-immunoreactive populations. *J Comp Neurol.* 1990;293:599–615.
- Lewis DA, Hashimoto T, Volk DW. Cortical inhibitory neurons and schizophrenia. *Nat Rev Neurosci.* 2005;6:312–324.
- Lewis DA, Curley AA, Glausier JR, Volk DW. Cortical parvalbumin interneurons and cognitive dysfunction in schizophrenia. *Trends Neurosci.* 2012;35:57–67.
- Li XG, Somogyi P, Tepper JM, Buzsaki G. Axonal and dendritic arborization of an intracellularly labeled chandelier cell in the CA1 region of rat hippocampus. *Exp Brain Res.* 1992;90:519–525.
- Lorincz A, Nusser Z. Cell-type-dependent molecular composition of the axon initial segment. *J Neurosci.* 2008;28:14329–14340.
- Lu J, Tucciarone J, Padilla-Coreano N, He M, Gordon JA, Huang ZJ. Selective inhibitory control of pyramidal neuron ensembles and cortical subnetworks by chandelier cells. *Nat Neurosci.* 2017;20:1377–1383.
- Lund JS, Lewis DA. Local circuit neurons of developing and mature macaque prefrontal cortex: Golgi and immunocytochemical characteristics. *J Comp Neurol.* 1993;328:282–312.
- Mainen ZF, Joerges J, Huguenard JR, Sejnowski TJ. A model of spike initiation in neocortical pyramidal neurons. *Neuron.* 1995;15:1427–1439.
- Marin O. Interneuron dysfunction in psychiatric disorders. *Nat Rev Neurosci.* 2012;13:107–120.
- Markram H, Toledo-Rodriguez M, Wang Y, Gupta A, Silberberg G, Wu C. Interneurons of the neocortical inhibitory system. *Nat Rev Neurosci.* 2004;5:793–807.
- Mendizabal-Zubiaga JL, Reblet C, Bueno-Lopez JL. The underside of the cerebral cortex: layer V/VI spiny inverted neurons. *J Anat.* 2007;211:223–236.
- Merchan-Perez A, Rodriguez JR, Ribak CE, DeFelipe J. Proximity of excitatory and inhibitory axon terminals adjacent to pyramidal

- cell bodies provides a putative basis for nonsynaptic interactions. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009;106:9878–9883.
- Meza RC, Lopez-Jury L, Canavier CC, Henny P. Role of the axon initial segment in the control of spontaneous frequency of nigral dopaminergic neurons in vivo. *J Neurosci*. 2018;38:733–744.
- Miles R, Toth K, Gulyas AI, Hajos N, Freund TF. Differences between somatic and dendritic inhibition in the hippocampus. *Neuron*. 1996;16:815–823.
- Minelli A, Alonso-Nanclares L, Edwards RH, DeFelipe J, Conti F. Postnatal development of the vesicular GABA transporter in rat cerebral cortex. *Neuroscience*. 2003;117:337–346.
- Montero-Crespo M, Dominguez-Alvaro M, Rondon-Carrillo P, Alonso-Nanclares L, Defelipe J, Blazquez-Llorca L. Three-dimensional synaptic organization of the human hippocampal CA1 field. *Elife*. 2020;9.
- Ogiwara I, Miyamoto H, Morita N, Atapour N, Mazaki E, Inoue I, Takeuchi T, Itohara S, Yanagawa Y, Obata K et al. Nav1.1 localizes to axons of parvalbumin-positive inhibitory interneurons: a circuit basis for epileptic seizures in mice carrying an Scn1a gene mutation. *J Neurosci*. 2007;27:5903–5914.
- Packer AM, Yuste R. Dense, unspecific connectivity of neocortical parvalbumin-positive interneurons: a canonical microcircuit for inhibition? *J Neurosci*. 2011;31:13260–13271.
- Packer AM, McConnell DJ, Fino E, Yuste R. Axo-dendritic overlap and laminar projection can explain interneuron connectivity to pyramidal cells. *Cereb Cortex*. 2013;23:2790–2802.
- Palmer LM, Stuart GJ. Site of action potential initiation in layer 5 pyramidal neurons. *J Neurosci*. 2006;26:1854–1863.
- Palmer LM, Clark BA, Grundemann J, Roth A, Stuart GJ, Hausser M. Initiation of simple and complex spikes in cerebellar Purkinje cells. *J Physiol*. 2010;588:1709–1717.
- Paul A, Crow M, Raudales R, He M, Gillis J, Huang ZJ. Transcriptional architecture of synaptic communication delineates GABAergic neuron identity. *Cell*. 2017;171:522, e520–539.
- Paxinos G, Franklin K. *The mouse brain in stereotaxic coordinates*. Amsterdam (The Netherlands): Elsevier, 1987.
- Peters A, Proskauer CC, Kaiserman-Abramof IR. The small pyramidal neuron of the rat cerebral cortex. The axon hillock and initial segment. *J Cell Biol*. 1968;39:604–619.
- Peters A, Proskauer CC, Ribak CE. Chandelier cells in rat visual cortex. *J Comp Neurol*. 1982;206:397–416.
- Povysheva NV, Zaitsev AV, Rotaru DC, Gonzalez-Burgos G, Lewis DA, Krimer LS. Parvalbumin-positive basket interneurons in monkey and rat prefrontal cortex. *J Neurophysiol*. 2008;100:2348–2360.
- Raghuram V, Werginz P, Fried SI. Scaling of the AIS and somatodendritic compartments in alpha S RGCs. *Front Cell Neurosci*. 2019;13:436.
- Rasband MN. The axon initial segment and the maintenance of neuronal polarity. *Nat Rev Neurosci*. 2010;11:552–562.
- Ribak CE. Aspinous and sparsely-spinous stellate neurons in the visual cortex of rats contain glutamic acid decarboxylase. *J Neurocytol*. 1978;7:461–478.
- Rubenstein JL, Merzenich MM. Model of autism: increased ratio of excitation/inhibition in key neural systems. *Genes Brain Behav*. 2003;2:255–267.
- Rudy B, Fishell G, Lee S, Hjerling-Leffler J. Three groups of interneurons account for nearly 100% of neocortical GABAergic neurons. *Dev Neurobiol*. 2011;71:45–61.
- Schmidt-Hieber C, Toleikyte G, Aitchison L, Roth A, Clark BA, Branco T, Hausser M. Active dendritic integration as a mechanism for robust and precise grid cell firing. *Nat Neurosci*. 2017;20:1114–1121.
- Schuman B, Machold RP, Hashikawa Y, Fuzik J, Fishell GJ, Rudy B. Four Unique Interneuron Populations Reside in Neocortical Layer 1. *J Neurosci*. 2019;39:125–139.
- Sloper JJ, Powell TP. 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 Ser B Biol Sci*. 1979;285:173–197.
- Smith SL, Smith IT, Branco T, Hausser M. Dendritic spikes enhance stimulus selectivity in cortical neurons in vivo. *Nature*. 2013;503:115–120.
- Somogyi P. A specific 'axo-axonal' interneuron in the visual cortex of the rat. *Brain Res*. 1977;136:345–350.
- Somogyi P, Freund TF, Cowey A. The axo-axonic interneuron in the cerebral cortex of the rat, cat and monkey. *Neuroscience*. 1982;7:2577–2607.
- Somogyi P, Smith AD, Nunzi MG, Gorio A, Takagi H, Wu JY. Glutamate decarboxylase immunoreactivity in the hippocampus of the cat: distribution of immunoreactive synaptic terminals with special reference to the axon initial segment of pyramidal neurons. *J Neurosci*. 1983;3:1450–1468.
- Somogyi P, Freund TF, Hodgson AJ, Somogyi J, Beroukas D, Chubb IW. Identified axo-axonic cells are immunoreactive for GABA in the hippocampus and visual cortex of the cat. *Brain Res*. 1985;332:143–149.
- Somogyi P, Tamas G, Lujan R, Buhl EH. Salient features of synaptic organisation in the cerebral cortex. *Brain Res Brain Res Rev*. 1998;26:113–135.
- Staiger JF, Bojak I, Miceli S, Schubert D. A gradual depth-dependent change in connectivity features of supragranular pyramidal cells in rat barrel cortex. *Brain Struct Funct*. 2015;220:1317–1337.
- Stuart G, Spruston N. Determinants of voltage attenuation in neocortical pyramidal neuron dendrites. *J Neurosci*. 1998;18:3501–3510.
- Szabo GG, Du X, Oijala M, Varga C, Parent JM, Soltesz I. Extended interneuronal network of the dentate gyrus. *Cell Rep*. 2017;20:1262–1268.
- Szentagothai J, Arbib MA. Conceptual models of neural organization. *Neurosci Res Program Bull*. 1974;12:305–510.
- Tai Y, Janas JA, Wang CL, Van Aelst L. Regulation of chandelier cell cartridge and bouton development via DOCK7-mediated ErbB4 activation. *Cell Rep*. 2014;6:254–263.
- Takacs VT, Freund TF, Nyiri G. Neurologin 2 is expressed in synapses established by cholinergic cells in the mouse brain. *PLoS One*. 2013;8:e72450.
- Takacs VT, Szonyi A, Freund TF, Nyiri G, Gulyas AI. Quantitative ultrastructural analysis of basket and axo-axonic cell terminals in the mouse hippocampus. *Brain Struct Funct*. 2015;220:919–940.
- Takahashi N, Oertner TG, Hegemann P, Larkum ME. Active cortical dendrites modulate perception. *Science*. 2016;354:1587–1590.
- Tamas G, Szabadics J. Summation of unitary IPSPs elicited by identified axo-axonic interneurons. *Cereb Cortex*. 2004;14:823–826.
- Tamas G, Lorincz A, Simon A, Szabadics J. Identified sources and targets of slow inhibition in the neocortex. *Science*. 2003;299:1902–1905.
- Taniguchi H. Genetic dissection of GABAergic neural circuits in mouse neocortex. *Front Cell Neurosci*. 2014;8:8.
- Taniguchi H, Lu J, Huang ZJ. The spatial and temporal origin of chandelier cells in mouse neocortex. *Science*. 2013;339:70–74.
- Thome C, Kelly T, Yanez A, Schultz C, Engelhardt M, Cambridge SB, Both M, Draguhn A, Beck H, Egorov AV. Axon-carrying dendrites convey privileged synaptic input in hippocampal neurons. *Neuron*. 2014;83:1418–1430.

- Thomson AM, West DC, Hahn J, Deuchars J. Single axon IPSPs elicited in pyramidal cells by three classes of interneurons in slices of rat neocortex. *J Physiol*. 1996;496(Pt 1):81–102.
- Tremblay R, Lee S, Rudy B. GABAergic interneurons in the neocortex: from cellular properties to circuits. *Neuron*. 2016;91:260–292.
- Trouche S, Sasaki JM, Tu T, Reijmers LG. Fear extinction causes target-specific remodeling of perisomatic inhibitory synapses. *Neuron*. 2013;80:1054–1065.
- Uematsu M, Hirai Y, Karube F, Ebihara S, Kato M, Abe K, Obata K, Yoshida S, Hirabayashi M, Yanagawa Y et al. Quantitative chemical composition of cortical GABAergic neurons revealed in transgenic venus-expressing rats. *Cereb Cortex*. 2008;18:315–330.
- Van Wart A, Trimmer JS, Matthews G. Polarized distribution of ion channels within microdomains of the axon initial segment. *J Comp Neurol*. 2007;500:339–352.
- Varga C, Lee SY, Soltesz I. Target-selective GABAergic control of entorhinal cortex output. *Nat Neurosci*. 2010;13:822–824.
- Varga C, Oijala M, Lish J, Szabo GG, Bezaire M, Marchionni I, Golshani P, Soltesz I. Functional fission of parvalbumin interneuron classes during fast network events. *Elife*. 2014;3.
- Vereczki VK, Veres JM, Muller K, Nagy GA, Racz B, Barsy B, Hajos N. Synaptic organization of perisomatic GABAergic inputs onto the principal cells of the mouse basolateral amygdala. *Front Neuroanat*. 2016;10:20.
- Veres JM, Nagy GA, Vereczki VK, Andrasi T, Hajos N. Strategically positioned inhibitory synapses of axo-axonic cells potently control principal neuron spiking in the basolateral amygdala. *J Neurosci*. 2014;34:16194–16206.
- Verret L, Mann EO, Hang GB, Barth AM, Cobos I, Ho K, Devidze N, Masliah E, Kreitzer AC, Mody I et al. Inhibitory interneuron deficit links altered network activity and cognitive dysfunction in Alzheimer model. *Cell*. 2012;149:708–721.
- Wang X, Sun QQ. Characterization of axo-axonic synapses in the piriform cortex of *Mus musculus*. *J Comp Neurol*. 2012;520:832–847.
- Wang Y, Gupta A, Toledo-Rodriguez M, Wu CZ, Markram H. Anatomical, physiological, molecular and circuit properties of nest basket cells in the developing somatosensory cortex. *Cereb Cortex*. 2002;12:395–410.
- Wang X, Hooks BM, Sun QQ. Thorough GABAergic innervation of the entire axon initial segment revealed by an optogenetic 'laser-spritzer'. *J Physiol*. 2014;592:4257–4276.
- Wang X, Tucciarone J, Jiang S, Yin F, Wang BS, Wang D, Jia Y, Jia X, Li Y, Yang T et al. Genetic single neuron anatomy reveals fine granularity of cortical axo-axonic cells. *Cell Rep*. 2019;26:3145, e3145–3159.
- Wefelmeyer W, Cattaert D, Burrone J. Activity-dependent mismatch between axo-axonic synapses and the axon initial segment controls neuronal output. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2015;112:9757–9762.
- Xu NL, Harnett MT, Williams SR, Huber D, O'Connor DH, Svoboda K, Magee JC. Nonlinear dendritic integration of sensory and motor input during an active sensing task. *Nature*. 2012;492:247–251.
- Yanez IB, Munoz A, Contreras J, Gonzalez J, Rodriguez-Veiga E, DeFelipe J. Double bouquet cell in the human cerebral cortex and a comparison with other mammals. *J Comp Neurol*. 2005;486:344–360.
- Yuste R, Hawrylycz M, Aalling N, Aguilar-Valles A, Arendt D, Armananzas R, Ascoli GA, Bielza C, Bokharaie V, Bergmann TB et al. A community-based transcriptomics classification and nomenclature of neocortical cell types. *Nat Neurosci*. 2020;23:1456–1468.
- Zaitsev AV, Povysheva NV, Gonzalez-Burgos G, Rotaru D, Fish KN, Krimer LS, Lewis DA. Interneuron diversity in layers 2–3 of monkey prefrontal cortex. *Cereb Cortex*. 2009;19:1597–1615.