

Estudio inmunohistoquímico de la corteza cerebral humana utilizando un anticuerpo monoclonal contra la proteína asociada con microtúbulos PAM-2

Hernán Pimienta J., Biol. M.Sc.¹
 Martha Isabel Escobar B., Biol. M.Sc.²
 Jorge Cruz B., M.D.¹

RESUMEN

En el presente trabajo se estabilizó la técnica de inmunoperoxidasa mediante el anticuerpo monoclonal 5F9, en estudios de la corteza cerebral humana. Dada la selectividad de este método se pudo hacer el análisis morfológico de la arquitectura neural y dendrítica de la corteza cerebral en diferentes áreas. Los procedimientos utilizados facilitan la correlación morfofuncional y ofrecen una nueva perspectiva sobre la organización de la corteza cerebral humana. Además, el método podría ser útil para identificar en la estructura cortical ciertos desórdenes asociados con diversas entidades clínicas.

La inmunohistoquímica aplicada al sistema nervioso ha constituido en los últimos años, una herramienta fundamental para demostrar las variaciones regionales en la distribución de proteínas estructurales o específicas, en las células nerviosas de animales de laboratorio¹⁻⁴.

Una característica de las neuronas desde el punto de vista estructural, es su variada morfología en las diferentes regiones del sistema nervioso, de tal manera que hay neuronas con soma esférico y escasas prolongaciones como en las de los ganglios sensitivos, hasta células con complejas arborizaciones dendríticas como las de Purkinje en el cerebelo o las pirámides en la corteza cerebral. La morfología de una neurona en gran parte está determinada por su citoesqueleto. Hay 3 tipos de elementos fibrilares que constituyen el citoesqueleto neuronal: neurotúbulos, mi-

crofibras y microfilamentos⁵. Aunque estas estructuras están presentes tanto en el soma como en las prolongaciones de las neuronas, su distribución no es idéntica en las diferentes partes de la célula nerviosa y aún más entre neuronas de distintos tipos¹. Estos elementos además de determinar la configuración neuronal, están comprometidos en el transporte de sustancias entre diversos sitios de la neurona. Los microtúbulos están constituidos por unidades de tubulina que se organizan de manera helicoidal⁶.

Con procedimientos bioquímicos e histoquímicos⁷, se ha demostrado que los microtúbulos poseen subunidades proteicas, que se proyectan lateralmente como espinas del tallo central de tubulina. Estas proteínas se denominan PAM (en inglés MAP's) (proteínas asociadas con los microtúbulos)^{2,3}.

En el sistema nervioso se han identificado varias de ellas^{2,3,8} así: PAM-1 se encuentra en las neuronas tanto en el axón como en el soma y en los procesos dendríticos, pero no se ha reconocido por procedimientos bioquímicos ni inmunohistoquímicos en células gliales; de otro lado, PAM-2 está presente sólo en el soma neuronal y en las dendritas^{3,4,7}.

Se han desarrollado anticuerpos poli y monoclonales contra las PAM² lo cual permite establecer su presencia por procedimientos inmunohistoquímicos. Dada la localización selectiva de PAM-2 en los somas y las dendritas de las neuronas, se puede practicar una "dissección" de la corteza cerebral y dejar de lado los componentes gliales y axonales. Escobar *et al*⁹ utilizaron el anticuerpo monoclonal 5F9 contra PAM-2, para el estudio de la organización dendrítica de la neocorteza en ratones⁹. En el presente trabajo se usó este anticuerpo para determinar su comportamiento en la corteza cerebral humana en diferentes áreas corticales y para tal fin se empleó material

1. Profesor Asociado, Departamento de Morfología, Facultad de Salud, Universidad del Valle, Cali, Colombia.
 2. Profesora Asistente, Departamento de Morfología, Facultad de Salud, Universidad del Valle, Cali, Colombia.

post-mortem.

MATERIALES Y METODOS

Se utilizaron 8 cerebros humanos frescos (menos de 4 horas post-mortem), a los cuales se les extrajeron bloques de 1 cm² de corteza cerebral. Se seleccionaron porciones de la corteza occipital, motora-somatosensorial y prefrontal.

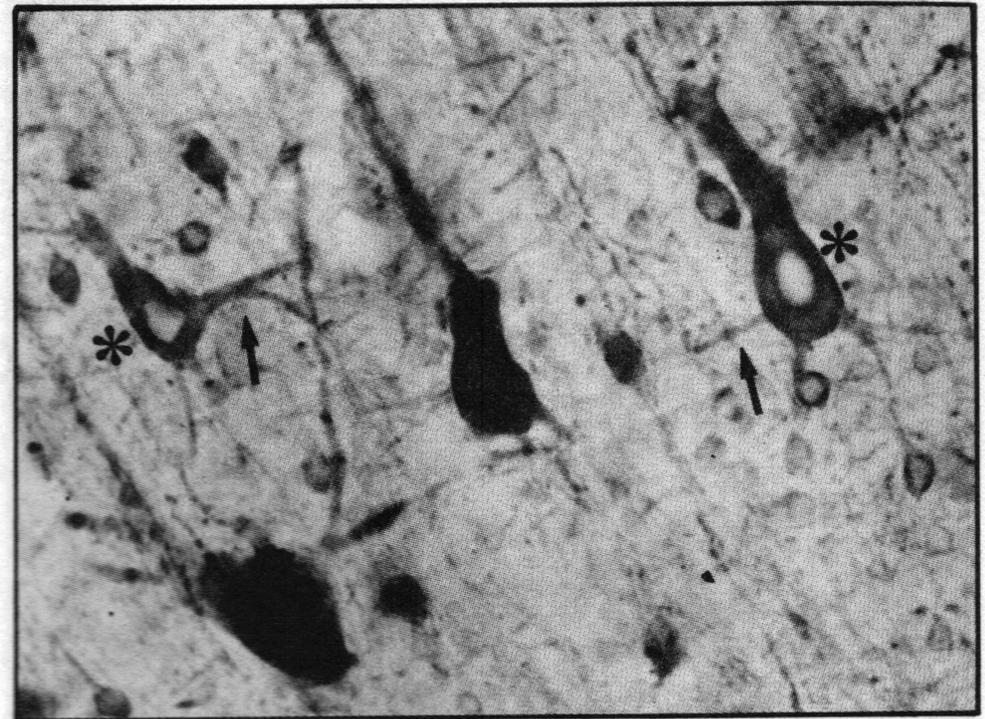
Los bloques se sumergieron por 24 horas en fijador PLP (paraformaldehído, lisina-peryodato), pH 7.4, que es un fijador de elección, pues preserva bien la antigenicidad¹⁰. Cada bloque se cortó a 30 µm en sentido coronal con la ayuda de un vibrátomo, utilizando como medio líquido TBS (trizma buffer saline), pH 7.2.

Las secciones se trataron con metanol (20%) para descartar la presencia de peroxidasa endógena, propia de los vasos sanguíneos en el material no perfundido; en seguida se incubaron durante 24 horas con el anticuerpo monoclonal 5F9³, en una dilución al 1:20 en TBS con 1% suero normal de cabra y 0.3% de tritón X-100. Después del período de incubación se reveló la presencia del anticuerpo por medio de la técnica del anticuerpo biotinilado (ABC Complex) (Vector Labs), utilizando como cromógeno DAB¹¹ (3,3'-diaminobencidina, Sigma). Para todos los casos se emplearon secciones controles que se incubaron directamente en el anticuerpo secundario. Las secciones reveladas se deshidrataron y se montaron para observarlas con el microscopio de luz (Nikon).

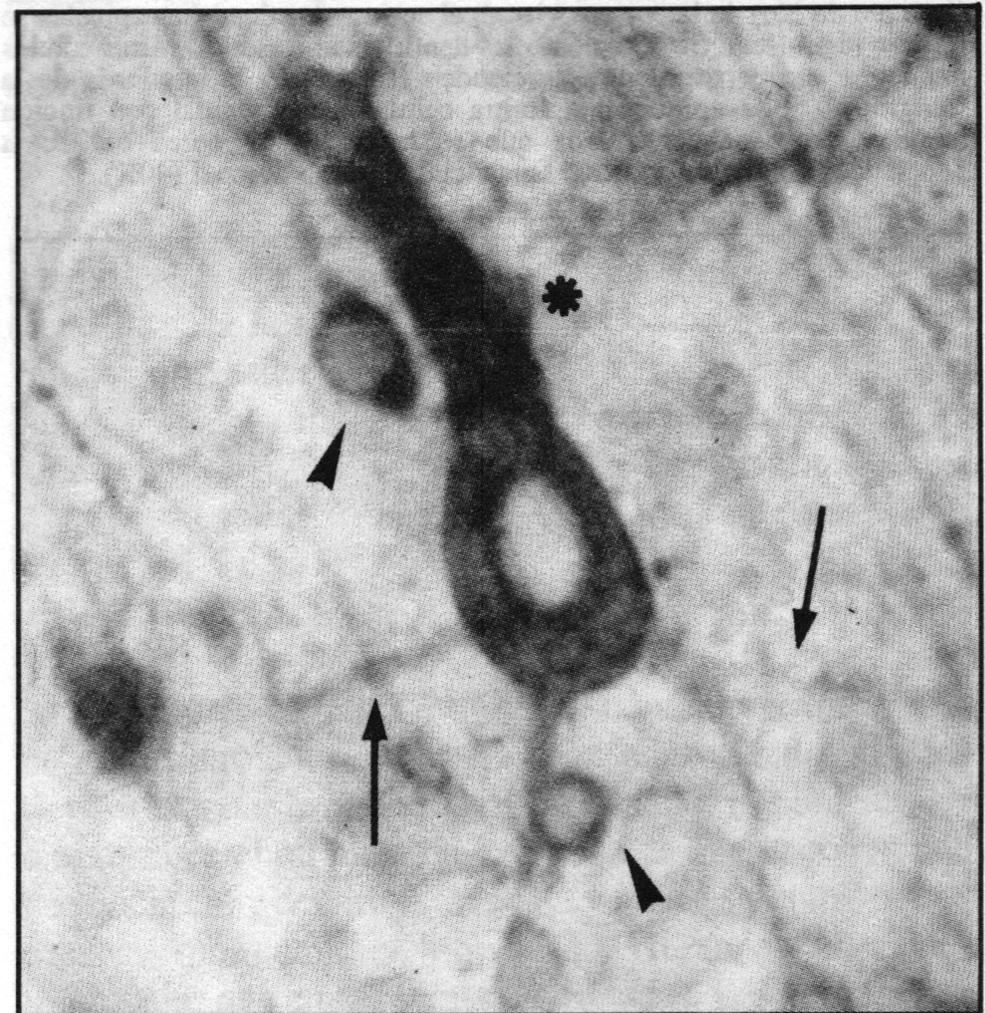
RESULTADOS

En el análisis de los resultados el producto de reacción se restringió a los cuerpos neuronales y a las dendritas de toda clase de neuronas. En todos los casos, el producto de reacción se observó más fuerte en las dendritas apicales, y en los cuerpos celulares y más débil en las dendritas basales (Fotografías 1, 2 y 2A). Por otro lado, se observó una relación clara entre la morfología celular y la intensidad de la coloración y se notó una mayor intensidad en las células piramidales (mayores de 50 µm). En los cortes coronales cuyo plano de sección fue ideal, se pudieron apreciar en toda su longitud las dendritas apicales. Allí el producto de reacción se distribuyó de manera uniforme en el tallo dendrítico principal, las ramas secundarias se pudieron reconocer sólo ocasionalmente en medio de la trama dendrítica. En los cuerpos celulares la reacción reveló en forma nítida la morfología del soma (Fotografías 1 y 3).

A continuación se hace una breve descripción del patrón de coloración en las diferentes láminas de la corteza cerebral observada bajo una perspectiva coronal (Fotografías



Fotografía 1. Corresponde a una sección coronal de la corteza occipital humana (capa V, área 17) donde se observan neuronas con reacción positiva al anticuerpo 5F9, revelado con el método del anticuerpo biotinilado (ABC-Kit). Se aprecian varias células piramidales (*), en las cuales el citoplasma está intensamente teñido al igual que su dendrita apical, algunas dendritas basales aunque tenuemente teñidas se pueden seguir por el corto trayecto (flechas) (40X).



Fotografía 2. Corresponde a una mayor ampliación de la fotografía anterior, se aprecian las dendritas basales (flechas) y dendritas apicales (*). Se nota que algunas pequeñas células muestran una reacción tenue en su citoplasma comparada con las células piramidales (cabezas de flechas)

4, 5, 6 y 7). Aunque el análisis comprometía 4 diferentes áreas corticales, se hace énfasis en la corteza primaria visual y somatosensorial, pues ellas representan ejemplos típicos de corteza y se obtuvieron los mejores datos experimentales.

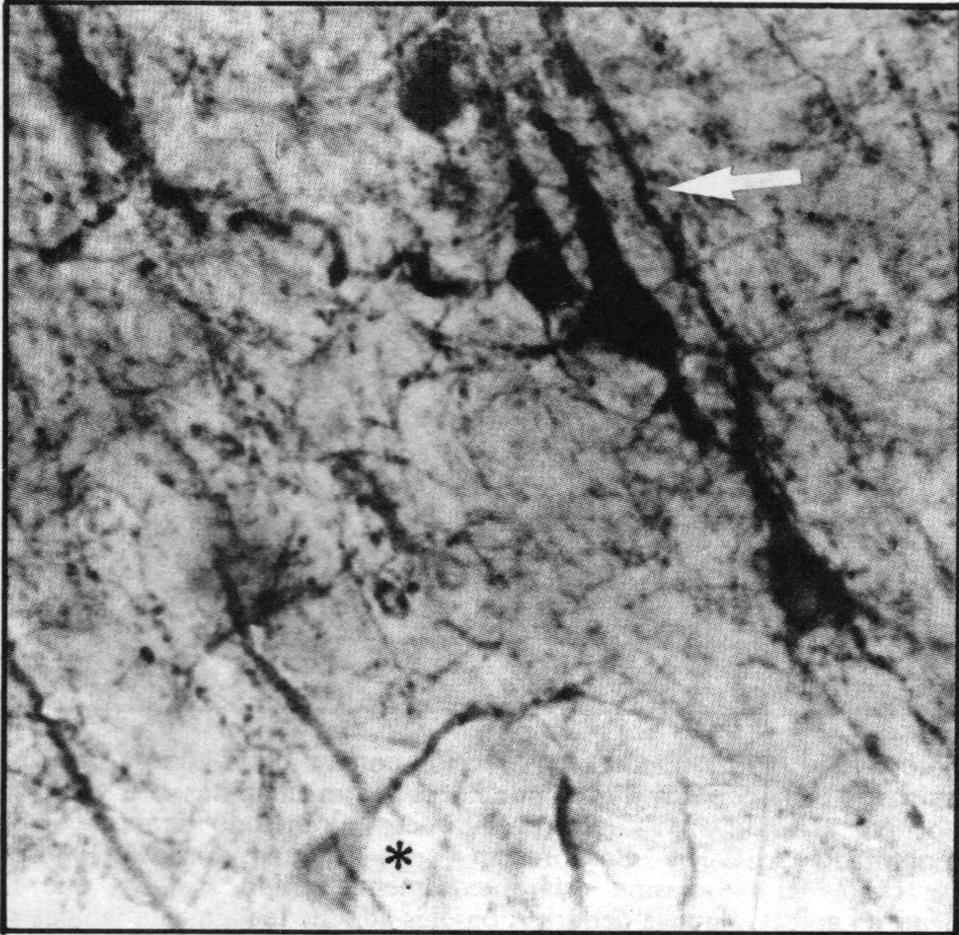
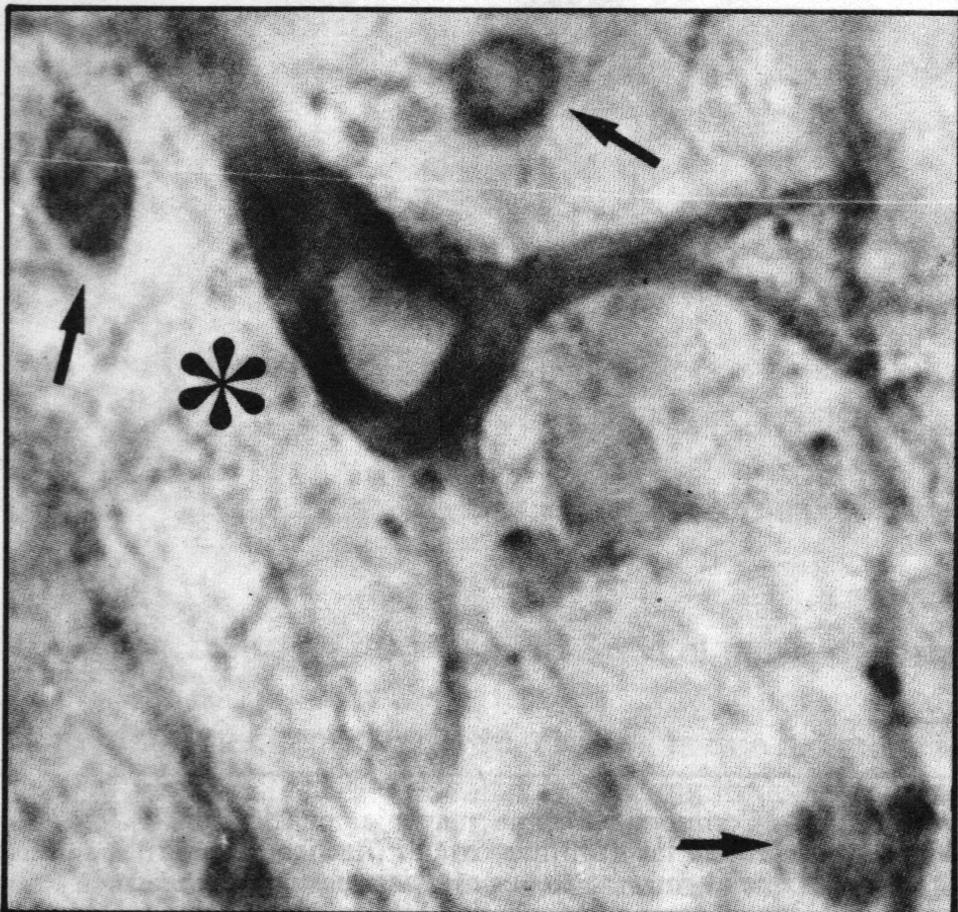


Figura 2A. Se aprecian algunas células triangulares de la capa VI (Lorente de No) de la corteza visual, el soma y las dendritas apicales se pueden identificar. Se nota cómo las dendritas apicales de varias células tienden a agruparse mientras ascienden (flecha). A la izquierda de la fotografía (*) se aprecia una forma celular no piramidal con tinción tenue y procesos dendríticos que se bifurca muy cerca del soma adoptando una trayectoria casi tangencial al plano coronal (40X).



Fotografía 3. Se muestra una ampliación de una célula piramidal (*) rodeada por interneuronas (flechas) con reacción tenue y procesos dendríticos pobremente marcados (40X).

Lámina I. La lámina I o molecular, mostró poca uniformidad en su patrón de coloración en las diferentes áreas analizadas, en contra de lo que sucede en el material per-

fundido en estudios similares hechos en animales^{1,4,9}. Las pocas células que se localizan en esta capa mostraron escasa o ninguna reacción.

Láminas II-III. El producto de reacción se aprecia claramente en las células de formas piramidales que se destacan entre otros elementos menos teñidos.

Lámina IV. Las células a este nivel se caracterizan por presentar patrones de coloración menos intensos, hecho evidente en el análisis de las regiones corticales que poseen una lámina IV bien diferenciada, como la corteza somatosensorial (Fotografía 5) y la corteza visual primaria (área 17) (Fotografía 4). En estas zonas, la lámina IV aparece de aspecto claro y se localiza entre dos láminas más oscuras, la lámina III por encima y la V por debajo.

Lámina V. A este nivel las células piramidales muestran una reacción somática intensa, pues se aprecian claramente sus gruesas dendritas apicales mientras ascienden hacia la lámina I. Las dendritas basales al igual que los procesos oblicuos de las dendritas apicales se observan débilmente marcadas.

Lámina VI. Con este método la lámina VI se distingue fácilmente en la neocorteza, entra la lámina V por encima y la sustancia blanca subyacente que carece del producto de la reacción. Tanto los cuerpos celulares como las dendritas de esta lámina reaccionan de una manera más débil al marcador, si se comparan con los componentes de la lámina V. Sin embargo, las dendritas apicales se pueden observar con claridad en su ascenso hacia las capas corticales suprayacentes V y IV (Fotografías 6 y 7).

ORGANIZACION DE LAS DENDRITAS APICALES

Se aprecian 2 estratos de alta densidad dendrítica. Uno supragranular que incluye las láminas III, II y I y el infra-granular conformado por los segmentos proximales de las dendritas apicales y basales de la lámina V y las dendritas de las células de la VI.

El patrón selectivo de coloración permite observar en el ser humano, un modelo de organización dendrítica similar al descrito por otros autores con anterioridad en diferentes modelos animales¹¹⁻¹⁴. Las dendritas apicales se organizan mientras ascienden en conjuntos o "fascículos" de distribución uniforme a lo largo de la corteza (Fotografías 4, 5, 6 y 7).

En las secciones analizadas se identifican 2 sistemas de fascículos dendríticos, uno prominente formado por con-

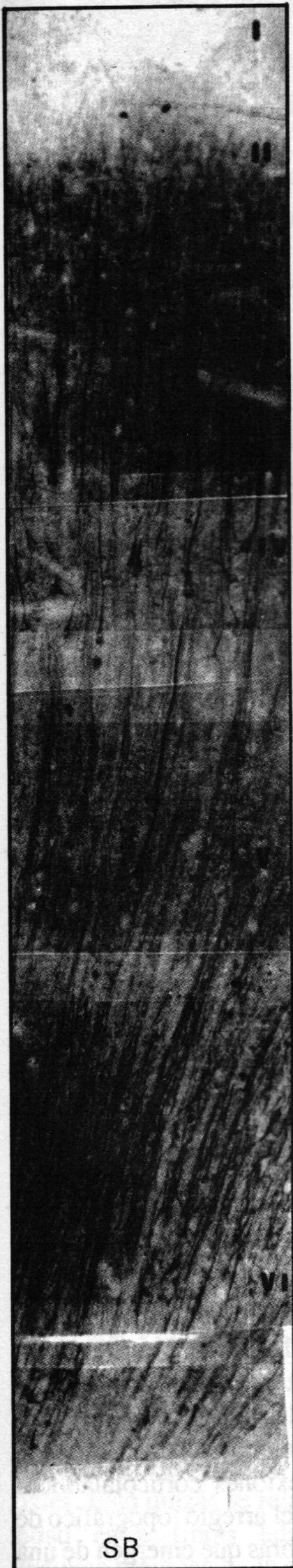


Figura 4



Figura 5

juntos de dendritas apicales pertenecientes a células piramidales de la lámina V, que en su ascenso atraviesan la lámi-

Fotografía 4. Corresponde a un montaje de la corteza visual (área 17) humana, en la cual se aprecian las diferentes láminas corticales, señaladas con números romanos. Se observan dos estratos dendríticos separados por la lámina IV en el centro; se nota que la densidad dendrítica es mayor por encima y por debajo de esta lámina; se aprecia además la organización en fascículos dendríticos provenientes de la lámina VI. Adicionalmente se observa el conjunto de fascículos que se origina en la lámina V, cruzando la lámina IV en su ascenso hacia la capa molecular (más detalles se indican en el texto) (10X).

Figura 5. La fotografía corresponde a la corteza cerebral somatosensorial humana (área 3). En esta preparación las células aparecen nítidamente marcadas destacándose en medio de los sistemas fasciculares descritos en el texto. A nivel de la lámina III, se observa cómo dendritas de esta lámina se integran a fascículos que ascienden procedentes de niveles inferiores (flechas) (10X).

na IV (cuando está presente); entre los fascículos se observan distancias regulares de aproximadamente 60 μm . En la zona intermedia de la corteza, donde la mayoría de las dendritas apicales no se ha ramificado, se aprecian claramente. Al alcanzar la lámina III, la mayoría se divide y disminuye su diámetro, pero preserva en todos los casos la asociación en fascículos. De esta manera aumenta su número y se reduce la distancia entre ellos, alrededor de 40 μm . En este nivel las dendritas apicales de las láminas III y II se integran a los diversos fascículos. Finalmente, el conjunto de las dendritas apicales remata en la capa molecular.

El otro sistema de fascículos dendríticos está constituido por procesos apicales de células de la lámina VI, que ascienden hasta la lámina IV sin que se aprecie correspondencia entre este sistema y el anterior; es decir, no existe continuidad aparente entre los dos sistemas, pues sólo en forma ocasional se observan dendritas de la lámina VI que se suman al sistema fascicular originado en la capa V.

DISCUSION

En el presente trabajo se utilizó un anticuerpo monoclonal contra proteínas asociadas con microtúbulos (PAM-2), para estudiar la distribución de las dendritas apicales de la corteza cerebral humana, con base en que la coloración diferencia entre dendritas delgadas y gruesas y entre los distintos cuerpos celulares, y que es más fuerte en las células piramidales que en las células estrelladas. Por el momento no es posible establecer la razón de las diferencias en el patrón de tinción observado en los diversos tipos celulares. En este sentido De Camili *et al*¹ sugirieron en su análisis del sistema nervioso en roedores, que entre las neuronas existen particularidades en la distribución de microtúbulos y proteínas asociadas (PAM).

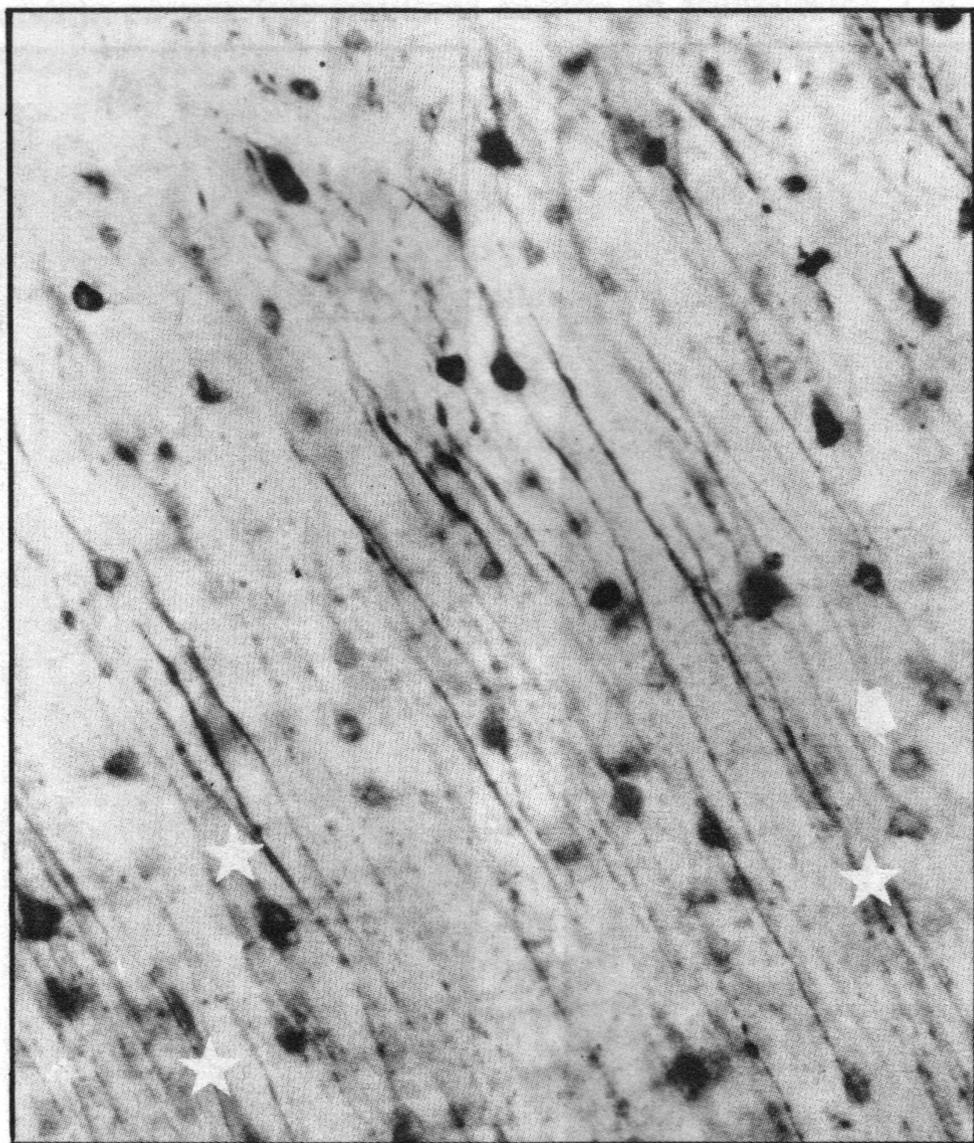
Los resultados del presente trabajo muestran que el producto de reacción se restringió a los cuerpos celulares y a los procesos dendríticos, pero no a las prolongaciones axóni-

cas ni a los elementos gliales. Estos resultados coinciden con los de otros autores que utilizaron diferentes técnicas y animales de laboratorio como el ratón⁴.

La organización dendrítica en fascículos se ha descrito como un hecho general en el sistema nervioso. Este tipo de organización se observa en la médula espinal, en el tallo y en la corteza cerebrales^{15,16}. En la corteza cerebral de la rata Peter y Walsh¹³, lo demostraron como agrupamientos de dendritas apicales pertenecientes a células de la capa V, localizadas a diferentes niveles y sugirieron que los cuerpos celulares donde se originan también se encontrarían agrupados. Posteriormente Feldman y Peters¹⁶ demostraron el agrupamiento dendrítico que forma fascículos en varias áreas del cerebro de ratas, gatos, macacos y en la neocorteza humana.

Fleischauer *et al*¹² describieron la formación de fascículos por las dendritas que se extienden desde la lámina V hasta la III, observaciones que coinciden con las de Peters & Walsh¹³. Estos autores concretan su análisis al nivel medio cortical, donde los fascículos aparecen constituidos por dendritas de mediano y gran calibre y como consecuencia más fácilmente diferenciables entre los elementos corticales teñidos que aparecen a su alrededor. Sin embargo, no pudieron seguir los fascículos dendríticos en toda su extensión una vez se ramifican y disminuyen de diámetro a nivel de la lámina III. De otra parte la falta de selectividad de las técnicas utilizadas por ellos no permitió en todos los casos definir, si los procesos más delgados observados correspondían a dendritas o axones¹². Por el contrario, el patrón de coloración específico en el presente trabajo, excluye los procesos axónicos, las células gliales y marca nítidamente la población dendrítica apical, en tal forma que se pueden seguir desde su origen en los somas hasta la capa molecular y ofrecer un cuadro completo de la organización dendrítica. Más aún, ciertos arreglos citoarquitectónicos no frecuentemente observables con tinciones clásicas^{17,18} se pueden reconocer a través de este método cuando se analizan coronales como organización columnar de los somas, procesos dendríticos y los densos estratos dendríticos supragranular e infragranular, que se ilustran en el presente trabajo.

En la neocorteza se pudo reconocer un segundo sistema de fascículos no descrito antes en seres humanos. Se origina en el estrato intermedio y superficial de las células de la lámina VI. Las dendritas constituyentes se caracterizan por su diámetro uniforme, que permite sugerir que pertenecen a células con características morfofisiológicas homogéneas. Estas dendritas se agotan principalmente a nivel medio cortical, observación que coincide con las de Lorente de No¹⁸ quien utilizó el método de Golgi, y las más recién-

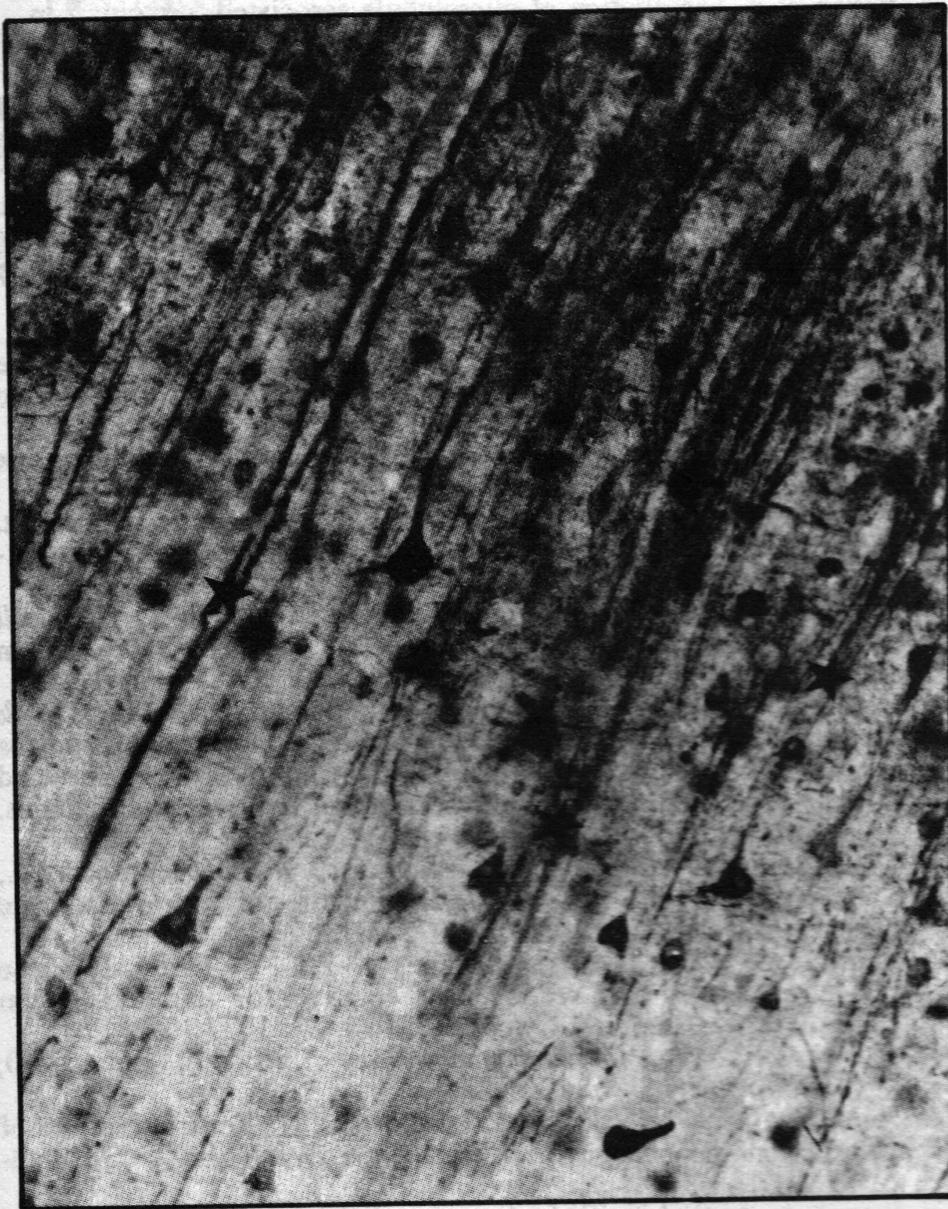


Fotografía 6. Corresponde a una ampliación de la lámina III. Se muestran varios fascículos dendríticos ascendiendo (*); una célula piramidal mediana orienta su proceso dendrítico apical hacia un conjunto dendrítico que asciende y se integra a él (flecha) en dirección a la capa molecular (20X).

tes de White quien combina las técnicas de degeneración retrógrada y el uso de peroxidasa de rábano como trazador¹⁹.

Los hallazgos anteriores junto con el hecho que los fascículos dendríticos originados en la lámina VI, en la mayoría de los casos no coinciden en su disposición topográfica con los fascículos suprayacentes que nacen en la lámina V, permiten sugerir que este sistema es independiente en el hombre como demostraron Escobar *et al*^{4,9} en el ratón.

El arreglo en fascículos de la lámina VI puede tener implicaciones funcionales importantes pues como lo indican White¹⁹ y Jones²⁰, las dendritas apicales de la lámina VI están conectadas recíproca y monosinápticamente con el tálamo. Se sabe que las conexiones corticotálamicas están organizadas de acuerdo con el arreglo topográfico de los núcleos de relevo, donde las fibras que emergen de una parte de la corteza se proyectan sólo hacia la zona respectiva del núcleo correspondiente²¹. No se sabe si hay correspondencia entre la formación de los fascículos dendríticos de la capa VI y la manera como estas neuronas envían sus axones al tálamo, a través de las fibras corticota-



Fotografía 7. Detalle de fascículos dendríticos de la capa VI. Se nota que los elementos constituyentes de cada fascículo son delgados (20X).

lámicas. La tinción selectiva de los fascículos dendríticos en la capa VI, simultánea con la de sus axones de proyección al tálamo podría aclarar el punto. Es importante anotar que las fibras aferentes talamocorticales realizan sinapsis con neuronas de proyecciones corticotálamicas²⁴, lo que indica la existencia de un circuito de retroalimentación talamocortical-corticotálamico. La función de esta vía puede exagerar diferencias en los niveles de excitación entre conjuntos de neuronas corticales pertenecientes a grupos distintos, como lo propone Jones²⁰.

La existencia de fascículos dendríticos organizados a partir de la capa VI en todas las regiones corticales, sugiere que este circuito de retroalimentación no estaría restringido a las áreas sensoriales de la corteza. Sin embargo, es notorio en el ratón⁹, que la población dendrítica perteneciente a este sistema es más alta en las áreas sensoriales. Esto quizás se relaciona con las diferencias en densidad entre fibras talamocorticales presentes en las distintas regiones de la corteza, que son menos densas en las áreas motoras y más abundantes en las sensoriales²³. A este respecto, en el material analizado, no hay datos cuantitativos, que permitan establecer si esta característica es válida en el ser humano.

Como se mostró en los resultados, las dendritas apicales de la capa V dan lugar a fascículos de curso radial hacia la capa molecular. A nivel de la capa IV estos fascículos aparecen como estructuras discretas separadas unas de otras. El número dendrítico es variable en cada fascículo y depende del área cortical y de la profundidad. Estas observaciones coinciden con las realizadas por Peters & Walsh¹³ y discrepan de las más recientes de Schmolke & Fleishauer²⁴, quienes consideraron como axones a los procesos más delgados que acompañan a los fascículos dendríticos, algunos de los cuales de acuerdo con las observaciones de este trabajo corresponden a dendritas apicales de la lámina VI.

DENSIDAD DENDRITICA

Los resultados que aquí se discuten muestran 3 zonas con diferentes densidad dendrítica en áreas de la corteza con una lámina IV bien definida. En todos los casos la zona menos densa se localiza a nivel medio cortical. Esto tendría relación con la alta población de interneuronas y axones presentes en la lámina IV que ocupan la mayor parte del espacio. Además Lorente de No¹⁸ señaló, que las dendritas apicales que parten de las células de la lámina V, poseen pocas ramificaciones y espinas a nivel de la lámina IV; esto sugiere que la mayor parte de la activación de los segmentos apicales de estas células, ocurre a nivel de las láminas V y III donde las dendritas apicales poseen abundantes espinas.

ARREGLO COLUMNAR

La primera mención acerca de la organización columnar en la corteza fue hecha por Lorente de No²⁵. Mountcastle²⁶, fisiológicamente demostró que las neuronas localizadas en la corteza somatosensorial en la misma dimensión radial, se activan por la misma clase de estímulos (columnas de modalidad).

Hubel & Wiesel²⁷, observaron un fenómeno similar en la corteza visual de los primates. Sin embargo, estas unidades funcionales carecían de una correlación morfológica.

En búsqueda de esta correlación Hubel y colaboradores²⁸ mostraron en el primate a nivel de la lámina IV, una distribución particular de terminales axónicas procedentes del núcleo geniculado lateral, las cuales aparecen en bandas alternantes de 500 μm de ancho que conducen información de un ojo o del otro. En este caso el límite morfológico da la distribución de las aferentes talámicas. Aunque las columnas de dominancia ocular sólo están presentes en primates, con esta base, se han realizado modelos generales de organización cortical.

Otros autores^{29,30} han definido estas columnas de acuerdo con la distribución de conexiones corticocorticales (callosas), de tal manera que los elementos extrínsecos a la columna celular determinarían los límites morfológicos. Todos los estudios coinciden en definir el diámetro columnar entre 300 y 500 μm .

Cuando Peters & Walsh¹³ y Feldman & Peters¹⁶ hicieron en roedores las primeras descripciones sobre los fascículos dendríticos, se indicó que por ser la distancia entre fascículos más pequeña que las columnas, varios fascículos podrían estar incluidos en una columna. En un modelo reciente presentado por Szentagothai³¹ se sugiere que cada columna podría estar dividida en subcomponentes, determinados por la distribución de procesos axónicos de células asociativas orientados verticalmente, que actuarían sobre las dendritas apicales. El patrón de distribución dendrítico demostrado en este trabajo podría constituir un arreglo arquitectónico ideal para facilitar la acción del restringido patrón de arborización en los axones de las células asociativas de la capa IV, los cuales se ha demostrado adoptan cursos ascendentes o descendentes y conectan las dendritas apicales a nivel de las láminas III y II³¹. La reunión de varias dendritas en fascículos, facilita la acción sináptica axodendrítica. Finalmente, la aplicación del método estabilizado en la presente comunicación sin duda alguna, es muy útil para el análisis de la corteza cerebral tanto en condiciones normales como patológicas.

AGRADECIMIENTOS

Los autores desean expresar sus agradecimientos al doctor Sócrates Herrera V., Departamento de Microbiología, Facultad de Salud, Universidad del Valle, por las facilidades que brindó en su laboratorio y a las licenciadas Martha Lucía Ceballos y Nhora Holguín por su colaboración técnica.

SUMMARY

The immunoperoxidase technique in the cerebral cortex of the human brain, using a monoclonal antibody (5F9) against the microtubule associated protein-2 present in neuronal bodies and dendrites was stabilized. Taking advantage of the selectivity of the staining pattern the neuronal and dendritic architecture of different areas of the cerebral cortex were analyzed. The method could be useful to assess cortical disorders associated with several clinical entities.

REFERENCIAS

- De Camili, P., Miller, P.E., Navone, F., Theurkauf, W.E. & Vallee, R.B. Distribution of microtubule associated protein 2 in the nervous system of the rat studied by immunofluorescence. *Neuroscience*, 1984, 11: 819-849.
- Huber, G. & Matus, A. Differences in the cellular distributions of two microtubule associated proteins, MAP 1 and MAP 2 in rat brain. *J Neurosci*, 1984, 4: 151-160.
- Kosik, K.S., Duffy, L.K., Dowling, M.M., Abraham, C., McCluskey, A. & Selkoe, D.J. Monoclonal antibody to microtubule associated protein 2 (MAP 2) labels Alzheimer neurofibrillary tangles. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1984, 81: 7941-7945.
- Escobar, M.I., Pimienta, H., Jacobson, M., Kosik, K.S., Crandall, J. & Caviness, V.S. Dendritic bundles in the murine barrel field. An analysis based upon a monoclonal antibody to MAP 2. *Soc Neurosci*, 1984, 10: 428.
- Bray, D. & Gilbert, D. Cytoskeletal elements in neurons. *Ann Rev Neurosci*, 1981, 4: 505-523.
- Fernández, H.L. & Samson, F.E. Axoplasmic transport. Differential inhibition by cytochalasin. *J Neurobiol*, 1974, 4: 201-206.
- Valle, R.B. MAP 2 (microtubule associated protein 2) from cell and muscle motility Vol 5. Shay (ed), pp. 289-311. Plenum Publishing Co.
- Cáceres, A., Binder, L.I., Payne, M.R., Bender, P., Rebhun, L. & Steward, O. Differential subcellular localization of tubulin and the microtubule associated protein MAP 2 in brain tissue as revealed by immunocytochemistry with monoclonal hybridoma antibodies. *J Neurosci*, 1984, 4: 394-410.
- Escobar, M.I., Pimienta, H., Caviness, V.S., Jacobson, M., Crandall, J.E. & Kosik, K.S. Architecture of apical dendritic systems. *Neuroscience*, 1986, 17: 975-989.
- McLean, I.W. & Nakane, P.K. Periodate-lysine paraformaldehyde fixative. A new fixative for immunoelectron microscopy. *J Histochem Cytochem*, 1974, 22: 1077-1083.
- Sternberger, L.A. *Immunocytochemistry* (3rd ed), pp. 67-70, John Wiley & Sons, New York.
- Fleischauer, K., Petsche, H. & Wittkowski, N. Vertical bundles of dendrites in the neocortex. *Z Anat Entw Gesch*, 1972, 136: 213-223.
- Peters, A. & Walsh, T.M. A study of the organization of apical dendrites in the somatic sensory cortex of the rat. *J Comp Neurol*, 1972, 144: 253-268.
- Detzer, K. Course and distribution of apical dendrites of layer V pyramids in the barrel field and area parietalis of the mouse. *Ant Embryol*, 1976, 149: 251-258.
- Roney, K. J., Scheibel, A.B. & Shaw, G.L. Dendritic bundles: survey of anatomical experiments and physiological theories. *Brain Res Rev*, 1979, 1: 225-271.
- Feldman, M. & Peters, A. A study of barrels and pyramidal dendritic clusters in the cerebral cortex. *Brain Res*, 1974, 77: 55-76.
- Ramón y Cajal, S. *Histologie du système nerveux de l'homme et des vertébrés*. Vol II, Maloine, Paris (reeditado por el Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Madrid, 1955), 1911.
- Lorente de No, R. La corteza cerebral del ratón. *Trab Lab Invest Biol Univ Madr*, 1922, 20: 41-78.
- White, E.L. Thalamocortical synaptic relations a review with emphasis on the projections of specific thalamic nuclei to the primary sensory areas of the neocortex. *Brain Res Rev*, 1979, 1: 275-311.
- Jones, E.G. Anatomy of cerebral cortex: columnar input-output organization. Pp 199-235, in *The organization of cerebral cortex*. Schmitt, F.O., Worden, F.G., Dennis, S.G. & Edelman, G. (eds). MIT Press, Cambridge.
- Jones, E.G. Laminar distribution of cortical efferent cells. Pp. 521-553, in *Cerebral cortex*. Vol 1, A. Peters & E.G. Jones (eds). Plenum Press, New York.
- White, E.L. & Hersch, S.M. A quantitative study of thalamocortical and other synapses involving the apical dendrites of corticothalamic projection cells in mouse Sm^I cortex. *J Neurocytol*, 1982, 11: 137-157.
- Jones, E.G. & Wise, S.P. Size, laminar and columnar distribution of efferent cells in the sensory-motor cortex of monkeys. *J Comp Neurol*, 1977, 175: 311-438.
- Schmolke, C. & Fleischauer, K. Morphological characteristics of neocortical laminae when studied in tangential semithin sections through the visual cortex of the rabbit. *Anat Embryol*, 1984, 169: 125-132.
- Lorente de No, R. Cerebral cortex. Architecture, intracortical connections, motor projections. Pp. 228-330, in *Physiology of the nervous system* (3rd ed). Fulton, F. (ed), Oxford University

- Press, London.
26. Mountcastle, V.B. An organizing principle for cerebral function. The unit module and the distributed system. Pp. 21-42, in *The neuroscience. Fourth study program*. F.O. Schmitt and F.G. Worden (eds), MIT Press, Cambridge.
 27. Hubel, D.H. & Wiesel, T.N. Functional architecture of the macaque monkey visual cortex. *Proc R Soc Lond (Biol)*, 1977, 196: 1-59.
 28. Hubel, D.H., Wiesel, T.N. & Stryker, M.P. Anatomical demonstration of orientation columns in macaque monkey. *J Comp Neurol*, 1978, 177: 361-380.
 29. Goldman, P.S. & Nauta, W.J. Columnar distribution of cortico-cortical fibers in the frontal association, limbic and motor cortex of the developing rhesus monkey. *Brain Res*, 1977, 122: 393-414.
 30. Szentagothai, J. The neuron network of the cerebral cortex: a functional interpretation. *Proc R Soc Lond (Biol)*, 1978, 201: 219-248.
 31. Szentagothai, J. The modular architectonic principle of neural centers. *Rev Physiol Biochem Pharmacol*, 1983, 98: 11-61.

HAGA MAS VENTAS POR CORREO, UTILIZANDO EL "SERVICIO DE REEMBOLSO C.O.D." DE ADPOSTAL

• Es un servicio que le permite estar en varias ciudades a un mismo tiempo entregando y cobrando a la vez su mercancía! Parece increíble, verdad? Usted hace el envío de sus productos, y en el momento mismo en que su cliente los retira de nuestras oficinas, le giramos su dinero! Además es rápido y seguro!







CORREO DE COLOMBIA
llega seguro y a tiempo!
MAYOR INFORMACION: TELS. 2415531 Y 2826842