

03086

4

2ij

Universidad Nacional Autónoma de México

**Colegio de Ciencias y Humanidades
Unidad Académica de los Ciclos Profesional y de Posgrado**

**Sede
Centro de Neurobiología**

Efectos del Factor de Crecimiento tipo Insulina-1 (IGF-I) sobre el crecimiento cerebral y el desarrollo del sistema somático sensorial: Estudios anatómicos en la corteza somatosensorial primaria (S1) de ratones transgénicos

Tesis

que para optar al grado de :

DOCTOR EN CIENCIAS FISIOLÓGICAS

presenta

GABRIEL GUTIÉRREZ OSPINA

México, D.F.

1997

1997 JUN 25 10:11 AM
BIBLIOTECA DE LA UNAM

1

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

CREDITOS

Este trabajo se realizó en las instalaciones del Laboratorio de Neurobiología del Desarrollo del Centro de Neurobiología, UNAM y en el Laboratorio de Endocrinología Pediátrica del Departamento de Endocrinología, UNC-Chapel Hill.

El presente trabajo se elaboró bajo la asesoría de la Dra. Sofía Díaz Miranda y del Dr. A. Joseph D'Ercole, y la co-asesoría de los Doctores Marcia Hiriart (Instituto de Fisiología Celular, UNAM) y Manuel Salas (Centro de Neurobiología, UNAM)

El apoyo económico para la elaboración de la presente tesis se obtuvo de los Proyectos DGAPA IN204093 e IN209195, NIH HD08299, PADEP 030351, y de la beca de posgrado de CONACyT No. de Registro 90413.

**ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA**

FE DE ERRATAS

Texto.

En la página 9 en donde dice: (Figura 7), debe decir: (Figura 6).

En la página 9 en donde dice: (Figura 8), debe decir: (Figura 7).

En la página 12 en donde dice: (Figura 6), debe decir: (Figura 8).

Pies de Figuras.

En donde dice: Figura 7, debe decir: Figura 6.

En donde dice: Figura 8, debe decir: Figura 7.

En donde dice: Figura 6, debe decir: Figura 8

PREFACIO

Este proyecto representa la culminación de cuatro años de trabajo ininterrumpido, de una lista, que alguna vez pense interminable, de frustraciones, vejaciones, privaciones, menosprecios, depresiones profundas, orgullos heridos, y amores perdidos. Afortunadamente también representa cambios, re-encuentros, retos, búsquedas, logros, ilusiones y amores renovados. Este trabajo es un reflejo de la vida misma, de sus contrastes, quizás sea por esto que me alegra y entusiasma tanto el que haya terminado. Quizás así también sea la muerte cuando se ha hecho y vivido lo suficiente para estar satisfecho consigo mismo

"Convergamos en que el intelectual [científico] es por definición un susceptible"

Mario Benedetti

"Las utopías sucederán cuando a nosotros
nos aparezcan alas.

y toda la gente sea convertida en ángeles"

Fiodor Dostoyevski.

México 1996.

DEDICATORIAS

A Elizabeth Hernández Echeagaray

Dedico esta modesta contribución a la mujer que ha dado sentido, dirección y un nuevo porvenir a mi vida. A la mujer que, con su estilo muy particular de amar y hacer las cosas, ha abierto mi corazón retornándole no solamente la jovialidad de antaño, sino además la confianza en si mismo.

Eli, te dedico esta modesta contribución no solamente porque en ella se refleja mi esfuerzo sino el tuyo, porque ella existe gracias a tu apoyo constante y comprensión casi paciente, casi sabia. Esta tesis refleja tu compromiso porque seamos y por el futuro que planeamos compartir, aunque para ti el futuro sea ilusorio y parezca indefinido. Finalmente, te dedico este escrito, además y simplemente, porque te amo entrañablemente, te amo como a nadie he amado antes. Te amo con el delirio de una obsesión, con la naturalidad de un niño, con la madurez de un viejo, con la pasión de un amante, con la locura de un poeta, con la cordura de un loco, es decir, con el amor del enamorado.

Secreto a voces

Alguna vez
preguntando al viento
sobre el destino del sentimiento
me dijo sigue
y después de esto
te encontré en el camino abierto
dirigiendo tus pasos
al horizonte
que ahora
es nuestro

México, 1996

A mis padres Lina y Crispín

con admiración, profundo respeto, y eterno agradecimiento

Quizas esta sea la última oportunidad formal que tengo de expresar mis sentimientos hacia mis amados "viejos", a mi madre y mi padre. Por años mis sentimientos han estado enclaustrados en el abrigo opresor de mi extremo raciocinio. Afortunadamente, estos cinco años de palos y lluvia me han hecho entender que somos mas que ideas y conceptos. De mi madre he aprendido a luchar vehementemente por lo que creo valioso. He aprendido la pasión de vivir, de preguntar, de cuestionar, de buscar, de actuar, y de sentir. He aprendido a saberme ignorante y a curiosear cuando lo siento preciso. De ella he aprendido a sentir el mundo que nos rodea y a darle valor a la naturaleza.

De mi padre, con su ejemplo, he aprendido a ser paciente, aunque en ocasiones reconozco que la neurosis me vence. He aprendido del respeto, la honestidad, la congruencia y la coherencia. De mi padre he aprendido el romanticismo, el compromiso, y la perseverancia, siempre valiosos y necesarios para lograr nuestros objetivos. De mi padre he aprendido el valor del vivir con sencillas, esa sencillas resguardo de nuestro sentir en un mundo tan dominado por las codicias y las ambiciones. Finalmente de el he aprendido el reformismo, el único medio por el cual se pueden hacer cambios "desde adentro"

Así, esta tesis es también un tributo a mis padres de quienes he recibido además de su amor, apoyo y educación, la vida misma.

México, 1996

A mis hermanos Zoraida, Omar e Iván

con la intención de incentivarlos a seguir adelante sin importar las dificultades que sobrevengan. Quizás ustedes nunca sepan toda mi historia, afortunadamente yo también la desconozco. Les brindo esta tesis por el amor fraterno que nos une.

A Alicia Echeagaray, a Rubén Hernández, a Haydee y Ruben Hernández Echeagaray para quienes mis palabras insuficientes son para agradecer su apoyo, aprecio, y su honesto y abierto cariño. Disculpen que no pueda darles algo más valioso que estas escuetas líneas. De mí, sin embargo, tienen el mayor de los respetos, la admiración más profunda, y el cariño sincero por siempre.

A la Dra. Sofía Díaz Miranda

quien ha sido un pilar para mí no sólo en el ámbito académico, sino en momentos de flaqueza emocional. Sofía, agradezco todo lo que has hecho por mí en estos años de incertidumbre, de lucha y de cambio.

A Muge y Ali Calkeglu

quienes me han obsequiado y honrado con su amistad. Hecho de menos esas largas y educativas veladas en las que no solamente compartimos los éxitos y frustraciones del trabajo, sino que intercambiamos ideas excitantes mientras recibía lecciones de filosofía e historia. Realmente extraño su agudeza y lucidez, pero sobre todo su presencia. Con ustedes he aprendido que los seres humanos tenemos más cosas que compartir y que nos unen, de aquellas que nos separan y violentan. Dedico esta tesis a la amistad verdadera y absolutamente desinteresada.

A la memoria del Dr. Alejandro Bayón Caso

quien como científico fue excepcional, como maestro incomparable, pero como ser humano insuperable.

México, 1996

Agradecimientos

A Karen Skjei por su compañía, ayuda, cariño, respeto y honestidad. Por el tiempo que compartimos.

A Claudia Berea, Tatiana Cabrera y Yolanda Cervantes porque su amistad es de siempre.

Al Dr. Joseph A. D'Ercole por haberme abierto sin reservas su laboratorio, siempre confiando en mis obsesiones y juicios.

Al Dr. Dale Purves por haberme mostrado el inicio del camino que ahora recorro.

A Leonard White, David Riddle, Tim Andrews y Dake Zheng por su tiempo, su amistad y las largas pero siempre creativas discusiones.

A Adriana, Azucena, Agustín, Pilar, Leticia, y Norma por hacer de mi regreso una transición sencilla, un regreso entre amigos.

A los doctores Marcia Hiriart, Horacio Merchant, Verónica Guamer, Carlos Valverde, Magdalena Giordano, y Manuel Salas por sus valiosos comentarios, consejos y críticas al presente manuscrito.

México, 1996

ÍNDICE

Tema	Página
Créditos	I
Prefacio	II
Dedicatorias	III-V
Agradecimientos	VI
Índice	VII-IX
Resumen	I
Summary	2
Introducción	3
Antecedentes	
El crecimiento del cerebro: Generalidades	5
Modelos de crecimiento cerebral	5
Mecanismos del crecimiento cerebral	7
El sistema somatosensorial en los roedores: un modelo para evaluar el crecimiento neural y cerebral	8
Factores neuróficos y el crecimiento cerebral	10
Generalidades de IGF-I	
Estructura del IGF-I	12
El gene para IGF-I	12
Fuentes de producción y factores de regulación del IGF-I	13
Funciones del IGF-I	13
Receptores para el IGF-I	14

Tema	Página
Mecanismos de transducción asociados al IGF-I.....	14
Regulación de los efectos del IGF-I.....	15
Planteamiento del Problema	15
Hipótesis	16
Objetivos Generales	16
Justificación del Modelo Anatómico	16
Material y Métodos	
Animales.....	17
Mediciones del área de la corteza somatosensorial, y del área y el volumen de los barriles del PMBSF.....	18
Estimaciones del tamaño, el número, y densidad de las neuronas en los barriles del PMBSF.....	20
Estimación del número de axones en el nervio infraorbitario, y medición del área de los folículos de los bigotes y de los cojinetes faciales.....	21
Validación de los métodos.....	21
Análisis de los datos.....	22
Resultados	
Observaciones Generales.....	22
Peso cerebral y relación cerebro:cuerpo.....	22
Área cortical, área total de los barriles del PMBSF, y relación área de los barriles:área de la corteza.....	23
Área de sección del PMBSF y de sus barriles.....	25
Altura y volumen de los barriles en el PMBSF.....	26

Tema	Página
Área de sección, número, y densidad neuronal en los barriles del PMBSF	26
Área de sección de los glomérulos olfatorios.....	27
Áreas de los cojinetes faciales y de los folículos de los bigotes, y número de axones mielínicos en el nervio infraorbitario.....	28
Discusión	
Efectos del IGF-I sobre el desarrollo y la estructura del cerebro.....	28
Efectos del IGF-I sobre el desarrollo neuronal: Evaluación en S1.....	29
IGF-I y la relación cuerpo:cerebro.....	34
Eliminación v.s. elaboración de conexiones en S1.....	36
Modificaciones en la disponibilidad de IGF-I: implicaciones para la evolución del cerebro.....	38
Conclusiones.....	39
Referencias	40

Resumen

El cerebro en los mamíferos aumenta su tamaño cuatro veces desde el nacimiento hasta la edad adulta. No obstante la aparente importancia que el crecimiento cerebral tiene para la adquisición de las habilidades cognitivas durante el desarrollo postnatal, los mecanismos celulares que lo subyacen aún son inciertos. Así, el presente trabajo evaluó si 1) el crecimiento cerebral postnatal resulta del crecimiento progresivo de las neuronas y la elaboración de conexiones, y 2) si el crecimiento neuronal puede ser regulado por factores neurotróficos producidos de manera local.

Se realizaron estudios anatómicos en los cerebros de ratones control y transgénicos con expresión cerebral aumentada del factor de crecimiento tipo insulina-I (IGF-I), o bien con expresión ectópica cerebral de la proteína fijadora de IGF's-1 (IGFBP-1).

Nuestras observaciones sugieren que IGF-I promueve el crecimiento neuronal y del neuropilo durante el desarrollo postnatal cerebral. La expresión elevada de IGF-I produjo incrementos en el tamaño cerebral, en el tamaño de la corteza cerebral como un todo, y en el área relativa de la corteza somatosensorial primaria (S1), en particular. En contraste, la producción ectópica cerebral de IGFBP-1 tuvo los efectos opuestos. Estudios anatómicos más detallados realizados en los ratones transgénicos mostraron que los cambios en las dimensiones de S1 correspondieron a cambios en el número y tamaño de las neuronas y en el volumen ocupado por el neuropilo (i.e., conexiones neuronales). Así, nuestras observaciones apoyan que el IGF-I es un factor neurotrófico que modula el crecimiento del cerebro promoviendo la supervivencia y el crecimiento neuronales, y la elaboración diferencial de neuropilo.

Summary

In the rodent brain, IGF-I mRNA is transiently expressed in sensory projection neurons during periods of synaptogenesis and neuronal growth. Transgenic (Tg) mice with brain IGF-I overexpression and ectopic brain expression of IGF-binding protein-1 (IGFBP-1), an inhibitor of IGF-I actions, show changes in brain size and myelination. We took advantage of these mouse models to evaluate *in vivo* IGF-I effects on sensory pathways development by conducting anatomic studies in the S1 barrel field. Brain size, cortical area and barrel field dimensions were respectively increased and reduced in IGF-I and IGFBP-1 Tg mice, as compared with wild type (wt) mice. The brain and cerebral cortex of Tg mice with the highest transgene expression were the most altered in size. Cortex and barrel field size changes were not precisely proportional because in some Tg mice barrels were relatively more affected than the cortex, while in others the opposite was true. Brain IGF-I overexpression increased the estimated average number of neurons per barrel, neuronal cross-sectional area, and barrel neuropil volume, while brain expression of IGFBP-1 reduced each measure. Neuronal density was greatly reduced in IGF-I Tg mice and increased in IGFBP-1 Tg mice. No differences in body weight, whisker pad and follicle areas, and whisker pad innervation density were found among Tg and wt mice. These observations indicate that IGF-I enhances neuronal growth and survival in developing sensory pathways, and support the concept that modifications in the availability of neurotrophic factors can lead to changes in brain, neocortical, and S1 relative dimensions by altering neuronal survival and neuropil elaboration.

Introducción

Uno de los hechos característicos del desarrollo postnatal en los mamíferos es el incremento progresivo en la talla del cerebro. El cerebro humano, por ejemplo, cuadruplica su peso desde el nacimiento (350 g) hasta la edad adulta (1400 gr) (Figura 1; Purves, 1994). Este incremento postnatal en el tamaño coincide, por un lado, con el aumento progresivo de la capacidad individual para recibir, procesar y almacenar información, y por otro, con la emergencia paulatina de patrones conductuales complejos (Figura 2; Purves, 1994). Esta coincidencia ha conducido a pensar que el crecimiento progresivo del cerebro provee del sustrato anatómico necesario para incrementar la capacidad de procesamiento, integración, almacenaje, y generación de información en el sistema nervioso (Fisher y Rose, 1994).

El aumento en la talla cerebral no es un fenómeno que se observe únicamente durante el desarrollo postnatal, sino también durante el proceso evolutivo de los mamíferos (Figura 3; Jerison, 1973; Kaas, 1987; Purves 1988; Rakic, 1995a,b; Northcutt y Kaas, 1995). Este fenómeno, de manera análoga a lo observado durante el desarrollo, se asocia al mejoramiento de las habilidades cognitivas de distintas especies como resultado de la emergencia de nuevas áreas cerebrales, y el incremento consecuente en el grado de especialización funcional (Kaas, 1987).

La importancia del crecimiento del cerebro para el desarrollo normal de los patrones conductuales se ha puesto de manifiesto más directamente en estudios clínicos. Los padecimientos que alteran el crecimiento del cerebro (e.g., hipotiroidismo congénito), comúnmente se acompañan de deficiencias cognitivas importantes. En algunos de estos casos, la severidad de las alteraciones disminuye notablemente si el tratamiento médico se instaure a tiempo (i.e., durante el periodo crítico del desarrollo neuronal) y se restablece el crecimiento cerebral.

El crecimiento del cerebro parece así estar íntimamente ligado al desarrollo de las habilidades conductuales durante la maduración postnatal y la evolución de

las distintas especies de mamíferos. No obstante la importancia biológica aparente que tiene el crecimiento del cerebro, los mecanismos celulares que lo subyacen aún se desconocen. En el presente trabajo se exploraron las posibilidades de que 1) el crecimiento del cerebro pudiera reflejar el crecimiento neuronal y la elaboración progresiva de conexiones, y 2) el crecimiento del cerebro sea en parte regulado por factores neurotróficos producidos localmente.

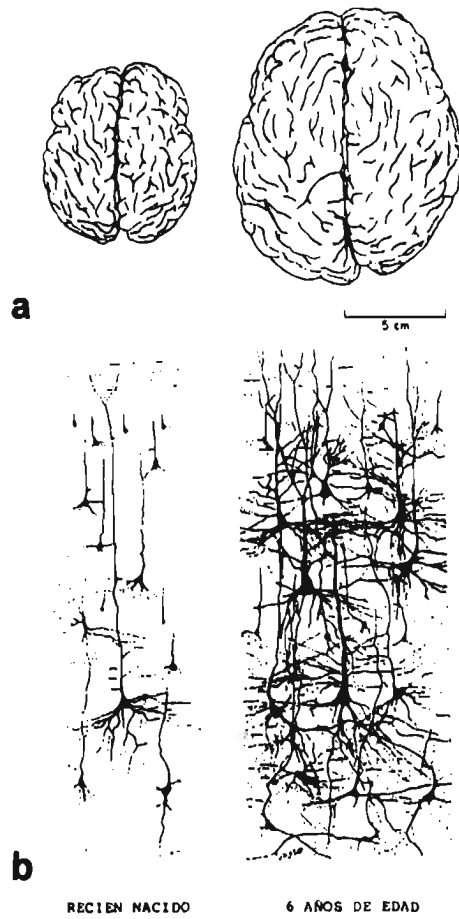


Figura 1. (a) Diferencia en el tamaño absoluto del cerebro humano entre un neonato y un infante de seis años de edad. El incremento en el tamaño cerebral se debe a distintas causas, entre ellas, a la hipertrofia neuronal y posiblemente a la elaboración de conexiones como se muestra en (b) (Modificada de Purves D, 1994).

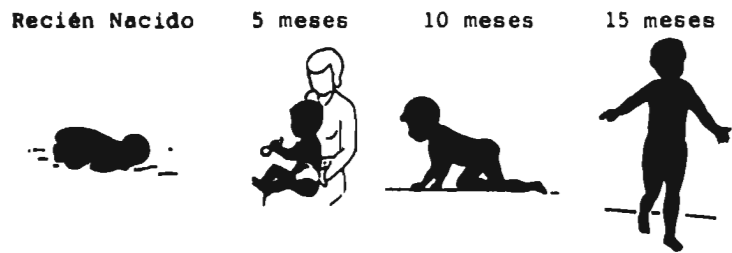


Figura 2. El crecimiento del cerebro coincide con un periodo del desarrollo de los niños que se caracteriza por una mejora progresiva de las capacidades cognitivas y neurológicas, y con la emergencia de patrones conductuales más complejos. Esta coincidencia ha llevado a pensar que el crecimiento cerebral, y especialmente la formación de nuevas conexiones, proveen del sustrato anatómico necesario para incrementar progresivamente la capacidad para manejar y generar información cada vez mas compleja durante el desarrollo postnatal de los individuos (Modificada de Gutiérrez-Ospina, 1996).

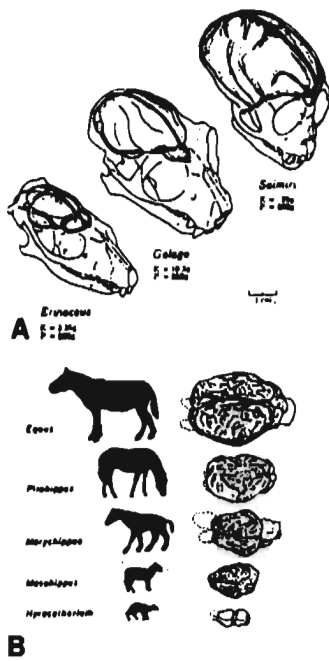


Figura 3. Cambios en el tamaño cerebral durante la evolución de distintos linajes de mamíferos (A; Tomada de Kaas, 1987) (B; Tomada de Jerison, 1973). Es importante destacar que el incremento en la talla cerebral durante el proceso evolutivo se debe, en parte, al incremento en el número y tamaño neuronal, pero sobre todo a un incremento en el volumen cerebral ocupado por el neuropilo.

Antecedentes

El crecimiento del cerebro.

Generalidades.

El cerebro de los mamíferos incrementa su tamaño de tres a cuatro veces desde el nacimiento hasta la edad adulta. En los roedores, el crecimiento cerebral se ha dividido en tres fases (Uylings et al., 1990). La fase de crecimiento rápido se extiende desde el nacimiento hasta los ocho días de vida, y se caracteriza por un incremento rápido de la talla cerebral que coincide con el crecimiento neuronal y la generación de células gliales y vasos sanguíneos. La fase de transición se extiende desde el día ocho hasta el día 17 postnatales, y coincide con la consolidación de conexiones neuronales (i.e., sinaptogénesis) y el inicio de la producción de mielina. Finalmente, la fase de crecimiento asintótico que ocurre entre los días 17 a 180 postnatales, y se caracteriza por la continua elaboración y adición de mielina.

Si bien, a primera vista, el crecimiento del cerebro parece ser un proceso continuo, el análisis detallado de la dinámica del crecimiento cerebral ha demostrado que este órgano crece de manera discontinua; "microperiodos" de crecimiento rápido alternan con "microperiodos" de estasis (Fischer y Rose, 1994). Ambos tipos de microperiodos se alternan a lo largo del desarrollo del cerebro, y son componentes de las tres fases descritas arriba. El significado de estas irregularidades en el patrón de crecimiento cerebral se desconoce. Sin embargo, se ha documentado que los periodos de crecimiento rápido coinciden con cambios significativos en la expresión del repertorio conductual. Fischer and Rose (1994), por otro lado, sugirieron que los periodos de estasis permiten consolidar las conexiones neuronales y la información obtenida en el microperiodo previo de crecimiento rápido.

Modelos de crecimiento cerebral.

Como se mencionó anteriormente, el crecimiento postnatal del cerebro parece resultar de la combinación del crecimiento neuronal, de la generación de células gliales y vasos sanguíneos, y de la adición de mielina (Uylings et al.,

1990; Purves, 1994). Un porcentaje elevado del volumen cerebral es ocupado, sin embargo, por conexiones neuronales. La participación de las conexiones neuronales como elemento histológico que pudiera contribuir al crecimiento del cerebro dista de ser clara.

Existen al menos tres modelos que pretenden explicar los cambios que sufren las conexiones neuronales durante el desarrollo postnatal del cerebro (Figura 4; Purves, 1994). El primer modelo denominado estático, propone que el número de conexiones neuronales está especificado al nacimiento, por lo que no habrían cambios netos en su número a lo largo del desarrollo cerebral. En este modelo, las conexiones neuronales juegan pues un papel pasivo, y el crecimiento cerebral refleja el crecimiento celular y la adición de otros elementos histológicos. No es claro, sin embargo, como un cerebro en desarrollo puede aumentar su complejidad funcional manteniendo el mismo número de conexiones que posee al nacimiento.

El segundo modelo o regresivo, propone que el número de conexiones neuronales al nacimiento es excesivo y redundante. Este modelo propone que las conexiones se eliminan progresivamente a lo largo del desarrollo cerebral hasta alcanzar un número "óptimo" para cada región cerebral. La eliminación de conexiones ocurre a través de un fenómeno en el cual las conexiones neuronales aferentes compiten por factores neurotróficos cuya disponibilidad es restringida. Se ha propuesto que la eliminación de conexiones neuronales tendría por objetivos el refinar los circuitos neuronales que inicialmente son redundantes, ajustar el número de neuronas al número de órganos blanco disponibles, y reducir el número de conexiones aberrantes (Purves y Lichtman, 1985). No obstante, parece paradójico que un cerebro que crece e incrementa su complejidad funcional y estructural elimine las conexiones neuronales que son el sustrato anatómico necesario para el adecuado manejo de la información.

Finalmente, el tercer modelo o constructorista supone que, al nacimiento, en el cerebro existen un número limitado de conexiones neuronales. Este número de conexiones se supone que incrementa progresivamente conforme el desarrollo

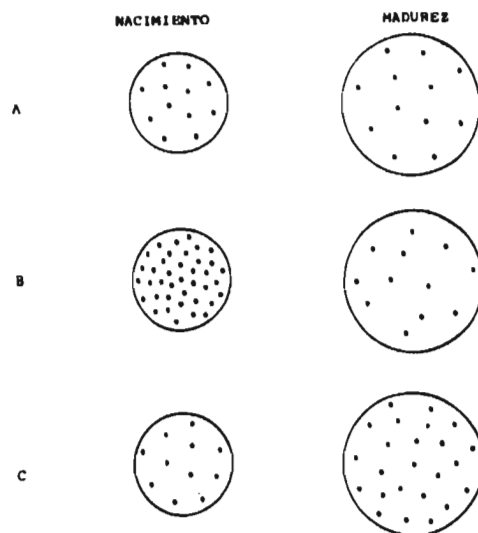


Figura 4. Esquemas que ilustran los tres modelos que han sido propuestos para explicar el desarrollo de la conexiones neuronales en el cerebro. El modelo estático (A), propone que el número conexiones no cambia a lo largo del desarrollo. El modelo de selección (B), sugiere que durante el desarrollo postnatal las conexiones neuronales se eliminan, es decir que su número se reduce, a partir de un repertorio de conexiones inicialmente redundante. Finalmente, el modelo constructorista (C) postula que el número de conexiones incrementa de manera progresiva conforme el desarrollo avanza. (Modificada de Purves, 1994).

del cerebro avanza. Así, el modelo constructorista propone que la elaboración progresiva de conexiones neuronales fomenta el crecimiento cerebral, al tiempo que provee del sustrato anatómico requerido para el manejo adecuado de la información.

La evidencia acumulada a lo largo de varias décadas de investigación sugiere que el sistema nervioso hace uso de una estrategia regresiva para establecer el patrón adulto de conexiones durante el desarrollo postnatal de las vías visual, motora, y somatosensorial, de las conexiones interhemisféricas, y de la inervación periférica hacia la musculatura estriada (revisado en Purves y Lichtman, 1985; Jacobson, 1991). Por otro lado, observaciones más recientes sugieren que una estrategia constructorista también pudiera ser empleada en el establecimiento de conexiones neuronales en la vía somatosensorial y en el bulbo olfatorio en algunos roedores (Purves, 1994; Riddle et al., 1992, 1993). Es muy probable, por lo tanto, que el sistema nervioso en desarrollo haga uso de ambas estrategias para establecer el patrón adulto de conexiones en las distintas regiones que lo constituyen. Nosotros pensamos, sin embargo, que un modelo constructorista explica mejor el posible papel de las conexiones neuronales como elementos promotores del crecimiento neuronal. De hecho, esta idea fue evaluada en el presente trabajo.

Mecanismos de crecimiento cerebral.

A la fecha, existen pocos trabajos que propongan mecanismos celulares que expliquen el crecimiento postnatal del cerebro en desarrollo. Purves (1989, 1994) y Purves y colaboradores (1994) han desarrollado, sin embargo, una tesis que propone que el crecimiento cerebral depende en parte de la elaboración progresiva de conexiones neuronales fomentada por incrementos tanto en los niveles de la actividad neuronal evocada, como en los niveles de producción de factores neurotróficos locales, durante el desarrollo postnatal de las distintas vías nerviosas. De acuerdo con esta propuesta, los incrementos en los niveles de actividad neuronal provocada conducen a incrementos en la producción local de factores neurotróficos (Castrén et al., 1992), los que a su vez, estimulan el

crecimiento del neuropilo, y consecuentemente del cerebro (Riddle et al., 1992, 1993; Purves, 1994; Purves et al., 1994).

En apoyo a esta idea, Riddle et al (1992) demostraron que las distintas subregiones del mapa corporal localizado en la capa IV de la corteza somatosensorial primaria (S1) de la rata crecen heterogéneamente durante el desarrollo postnatal (Figura 5). Este crecimiento heterogéneo coincide con las diferencias en los niveles de actividad neuronal en las distintas subregiones de mapa corporal en S1 (Riddle et al., 1993). En otras palabras, aquellas subregiones del mapa corporal que crecieron más durante el desarrollo postnatal, mostraron también los niveles más altos de actividad neuronal espontánea y evocada.

El sistema somatosensorial en roedores: un modelo para evaluar el crecimiento neuronal y cerebral.

En los mamíferos, la experiencia somatosensorial se conduce a lo largo de vías nerviosas ascendentes que transmiten la información originada en los receptores localizados en la superficie corporal. Las sensaciones táctiles de la cabeza y la cara se transmiten primordialmente a través del nervio trigémino hacia el complejo del trigémino en el tallo cerebral. Una vez establecido el primer relevo sináptico de la vía, las fibras aferentes de núcleo del trigémino alcanzan las neuronas del núcleo ventroposteromedial del tálamo en donde forman un segundo relevo sináptico. El tercer y último relevo sináptico de esta vía se establece entre las fibras aferentes provenientes del tálamo y las dendritas de las neuronas localizadas en la capa IV de S1 (Killackey et al., 1990, Woolsey, 1990).

Por otro lado, la información táctil generada en los receptores localizados en las extremidades y el tronco se conduce por los nervios sensoriales de la raíz dorsal hacia las astas posteriores de la médula espinal. Esta información se transmite entonces hacia los núcleos gracilis y cuneatus en el tallo cerebral, desde donde se envía al núcleo ventroposterolateral del tálamo y finalmente a S1 (Killackey et al., 1990; Woolsey, 1990).

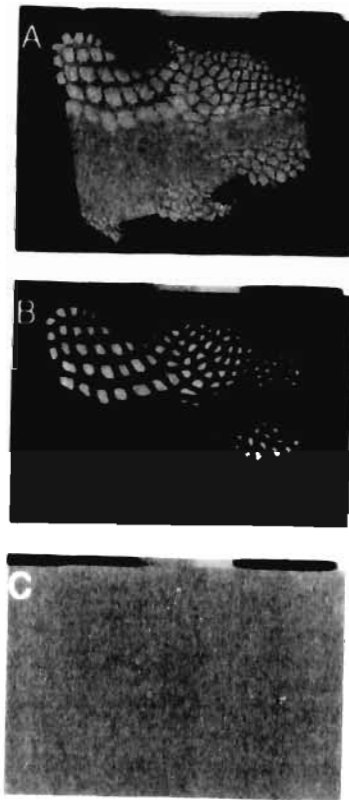


Figura 5. La corteza somatosensorial primaria (S1) en los roedores contiene una representación del cuerpo formada por unidades celulares denominadas barriles que constituyen las subrepresentaciones de la cabeza, las patas, y el tronco (A-C, respectivamente). El porcentaje de crecimiento de cada una de estas subrepresentaciones difiere de tal manera que los barriles que corresponden a la cabeza crecen más que aquellos que representan las patas, durante el desarrollo postnatal (B). De hecho, la corteza somatosensorial primaria en su conjunto crece más que la corteza cerebral (C). Estos hallazgos sugieren que el cerebro y sus regiones crecen de manera diferencial durante el desarrollo postnatal. Los colores claros identifican a las áreas que presentan un mayor crecimiento (Modificada de Riddle et al., 1993).

Como en otros sistemas sensoriales, la vía somatosensorial está organizada topográficamente. Así, cada uno de los relevos sinápticos a lo largo de la vía contiene un mapa corporal organizado en correspondencia topográfica con la distribución de los receptores sensoriales periféricos en la superficie del cuerpo (Killackey et.al., 1990; Woolsey, 1990). En los roedores, los mapas somatosensoriales están formados por unidades citoarquitectónicas denominadas barriles en la corteza, barreloides en el tálamo y barreletas en el tallo cerebral (Figura 7) (Woolsey y Van der Loos, 1970; Killackey et.al., 1990; Woolsey, 1990). Cada uno de estos módulos representa, por tanto, colecciones discretas de receptores ubicados en los órganos sensoriales periféricos (e.g. vibrissas faciales) (Figura 8).

El arreglo modular de la vía somatosensorial en los roedores brinda así varias ventajas que facilitan la evaluación del crecimiento cerebral. Primero, la facilidad relativa con que las unidades citoarquitectónicas se visualizan por medio de técnicas histológicas e histoquímicas, permite hacer mediciones más precisas del crecimiento global neuronal (Riddle et.al., 1992). Segundo, debido a que los circuitos neuronales constituyen una parte importante de dichas unidades citoarquitectónicas, cambios en el área o volumen de ellas hablan en favor de modificaciones del crecimiento de los circuitos neuronales (Woolsey, 1990). Tercero, tanto la anatomía fina de las unidades citoarquitectónicas, como sus conexiones aferentes y eferentes están razonablemente establecidas (Killackey et.al., 1990; Woolsey, 1990). Esto permite evaluar el crecimiento cerebral tomando en consideración cada uno de los distintos elementos celulares involucrados (e.g. distintos tipos de axones, dendritas, vasos sanguíneos y células gliales). Cuarto, existe información vasta acerca de las propiedades electrofisiológicas de las neuronas que constituyen esta vía nerviosa en sus distintos relevos (Rhoades et.al., 1990). Esta información es valiosa si se tratan de evaluar las repercusiones que tienen las modificaciones de la estructura neuronal sobre la fisiología y el comportamiento. Y, quinto, se conoce con

precisión la dinámica del crecimiento de algunos de los relevos de esta vía (Riddle et al., 1992)

Factores neurotróficos y el crecimiento cerebral.

Para su adecuado desarrollo, el sistema nervioso requiere de distintos factores que actúan sobre la proliferación, migración, supervivencia, diferenciación, y maduración de los distintos elementos citológicos neurales. La acción de estos factores denominados neurotróficos sobre las distintas poblaciones neuronales define, en parte, sus características estructurales y funcionales (Loughlin y Fallon, 1993). A la fecha, se han identificado una lista creciente de factores neurotróficos entre los que se incluyen tanto aquellos producidos localmente en el sistema nervioso (e.g., las neurotrofinas), como aquellos producidos por tejidos endocrinos localizados fuera del sistema nervioso (e.g., las tironinas) (Loughlin y Fallon, 1993).

En general, los factores neurotróficos producidos localmente ejercen acciones selectivas sobre poblaciones neuronales con fenotipos específicos, mientras que aquellos producidos por fuentes endocrinas afectan el desarrollo del cerebro de manera más global. Así, es posible imaginar que efectos sinérgicos de ambos tipos de factores pudiere determinar, por ejemplo, las características estructurales macroscópicas del cerebro (en el caso de los factores neurotróficos de origen endocrino), así como sus características citológicas finas (en el caso de los factores neurotróficos de producción local). Existen, sin embargo, factores neurotróficos que son producidos localmente, y que tienen efectos sobre el desarrollo de una gran diversidad de grupos neuronales localizados a lo largo del sistema nervioso (Bondy, 1991). Estos factores pudieran también jugar un papel central en el establecimiento de las características globales de la estructura del cerebro, y en específico en la regulación del crecimiento del cerebro y de la circuitería neuronal.

El factor de crecimiento tipo Insulina-I (IGF-I) es un péptido que se expresa de manera abundante durante las etapas de crecimiento rápido y sinaptogénesis en una gran variedad de poblaciones neuronales durante el desarrollo postnatal

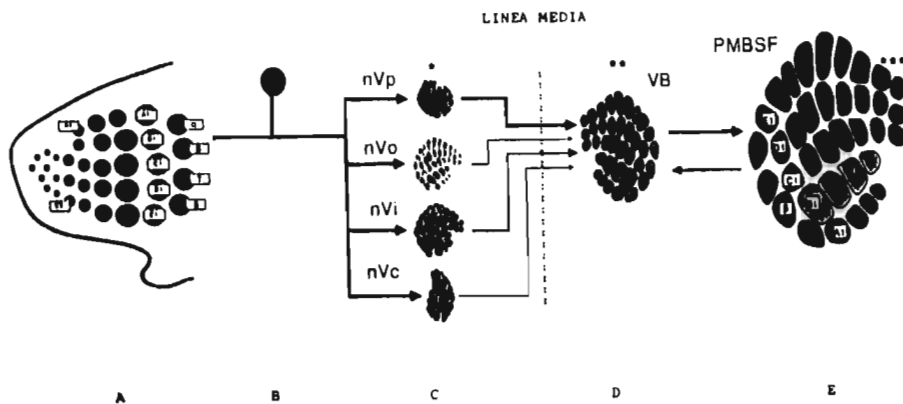


Figura 7. La vía somatosensorial que transmite la información sensorial de la cara (A) en los roedores a través del nervio del trigémino (B) está constituida por tres relevos sinápticos. El primero de ellos es el núcleo del trigémino en el tallo cerebral (C; nV). El segundo lo constituye el núcleo posteroventromedial del tálamo contralateral (D; VB). Y el tercero ocurre en la corteza somatosensorial primaria (PMBSF). Esta vía nerviosa tiene la particularidad de estar organizada en unidades citoarquitectónicas denominadas barreletas en nV, barreloides en VB, y barriles en el PMBSF. Cada una de las unidades en los distintos relevos son la representación de colecciones discretas de mecanoreceptores localizados en la superficie corporal (Modificada de Woolsey, 1990).

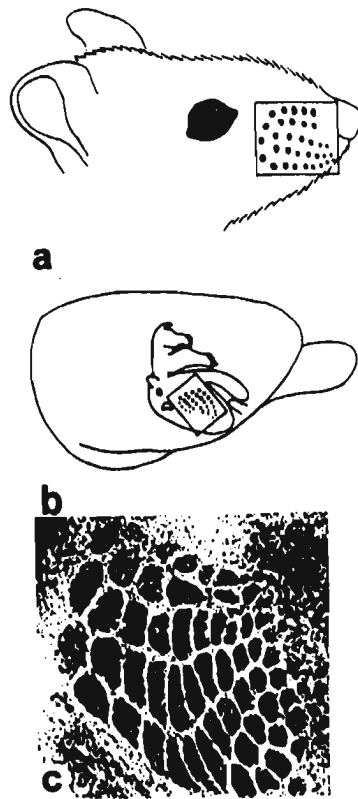


Figura 8. Los bigotes faciales (a) son órganos sensoriales de suma importancia para los roedores pues a través de ellos detectan diversos atributos físicos de los objetos que les circundan, establecen relaciones espaciales y localizan su alimento. Así, la información sensorial originada en estos órganos define parte de la expresión de algunos patrones de comportamiento en los roedores. Los bigotes están representados en S1 (b) por un conjunto de barriles localizados en la denominada subzona de barriles posteromedial (PMBSF). Cada barril en esta región representa cada uno de los bigotes faciales de manera correspondiente. Así, los barriles del PMBSF (c) tienen una organización topológica que refleja aquella de los bigotes en los cojinetes faciales (Tomada de Gutiérrez-Ospina, 1996).

del cerebro (Bondy, 1991). Se ha documentado la expresión de IGF-I en células de la pared ventricular, del giro dentado y de la retina durante el periodo de neurogénesis (DiCicco-Bloom y Black, 1989; Drago et.al., 1991; Bartlett et.al., 1991, 1992; Lee et.al., 1992; Ishii, 1993; De la Rosa et.al., 1994; De Pablo y De la Rosa, 1995; D'Ercole et.al., 1996b). El IGF-I se produce también por neuronas de proyección a lo largo de las vías sensoriales, en el cerebelo, y en el hipocampo durante el crecimiento neuronal y la sinaptogénesis (Aizeman y Vellis, 1987; Bartlett et.al., 1991; Lee et.al., 1992; D'Mello et.al., 1993; Calissano et.al., 1993; Bondy y Lee, 1993; D'Ercole et.al., 1996b). La expresión de IGF-I es abundante en estructuras que permanecen plásticas durante toda la vida como son el bulbo olfatorio y el hipotálamo (Rotwein et.al., 1988; Bartlett et.al., 1991; Bondy, 1991; D'Ercole et.al., 1996b).

En el sistema nervioso periférico, los IGFs se producen en las fibras musculares estriadas durante el desarrollo temprano de su patrón de inervación (Caroni, 1993; Ishii, 1993). Las fibras musculares expresan de manera abundante a los IGFs cuando reciben inervación múltiple. Durante la transición de polinervación a inervación única, la producción de IGFs en las fibras musculares decrece paulatinamente (Caroni y Becker, 1992; Ishii, 1993). La aplicación exógena de IGFs a músculos adultos induce una reinervación múltiple similar a la observada en los músculos en desarrollo (Caroni y Grandes, 1990). Los IGFs también modulan la respuesta de regeneración de los nervios periféricos (Ishii et.al., 1994; Ishii y Lupien, 1995). Finalmente, la aplicación de tetrodotoxina y la inactividad funcional conducen a un incremento en la producción de IGFs por parte de la fibra muscular, sugiriendo que la producción de IGF en el músculo estriado esta regulada por los niveles de la actividad eléctrica (Ishii, 1993; Caroni et.al., 1994; Caroni y Schneider, 1994). Con base en estas observaciones, se ha propuesto que IGF-I participa en el refinamiento y sinaptogénesis dependiente de actividad en la musculatura estriada (Caroni, 1993; Ishii, 1993).

Recientemente, se ha mostrado que alteraciones en la expresión de IGF-I durante el desarrollo cerebral se acompañan de cambios importantes en el

tamaño de este órgano. El aumento de la expresión de IGF-I durante el desarrollo postnatal en ratones transgénicos resulta en un incremento del 55% en la talla del cerebro (Carson et al., 1993; Ye et al., 1995; D'Ercole et al., 1996a). En contraste, los ratones transgénicos en los que la disponibilidad de IGF-I es limitada debido a la expresión ectópica de IGFBP1 (D'Ercole et al., 1994; D'Ercole et al., 1996a), o bien ausente debido a la inactivación del gene que codifica para IGF-I por técnicas de recombinación homóloga (Beck, 1995), muestran una talla cerebral reducida (25-35%). Se ha documentado también que IGF-I promueve el crecimiento de neuritas en neuronas cultivadas (Ishii, 1993 y D'Ercole et al., 1996b), así como la producción de mielina *in vivo* (Carson, 1993; Ye et al., 1995).

En resumen, el IGF-I parece promover el crecimiento global del cerebro fomentando el proceso de mielinización y multiplicación glial, y posiblemente, el crecimiento de los elementos neuronales. Este último factor fue evaluado directamente en el presente trabajo.

Generalidades sobre IGF-I.

Estructura del IGF-I.

El IGF-I pertenece a una familia de proteínas cuyos miembros son el IGF-II y la insulina. El IGF-I es un péptido constituido por 70 aminoácidos organizados en cuatro dominios conocidos como A, B, C, y D (Figura 6). Estudios de mutagénesis dirigida han mostrado que la secuencia de aminoácidos correspondiente al dominio B participa en la unión de IGF-I a las IGFBPs. El dominio A, por otro lado, es indispensable para que IGF-I promueva la proliferación celular y el crecimiento tisular. Finalmente, la substitución de los residuos tirosina en las posiciones 24, 31, y 60 de la secuencia primaria de IGF-I elimina la unión de éste a su receptor (Daughaday y Rotwein, 1999; Pimentel, 1994 y D'Ercole et al., 1996b).

El gene para IGF-I.

En el humano, el IGF-I es el producto de un gene localizado en el brazo largo del cromosoma 12. El gene para IGF-I tiene una longitud de 95 kilobases y está constituido por 5 exones y cuatro intrones. La transcripción de este gene, y el

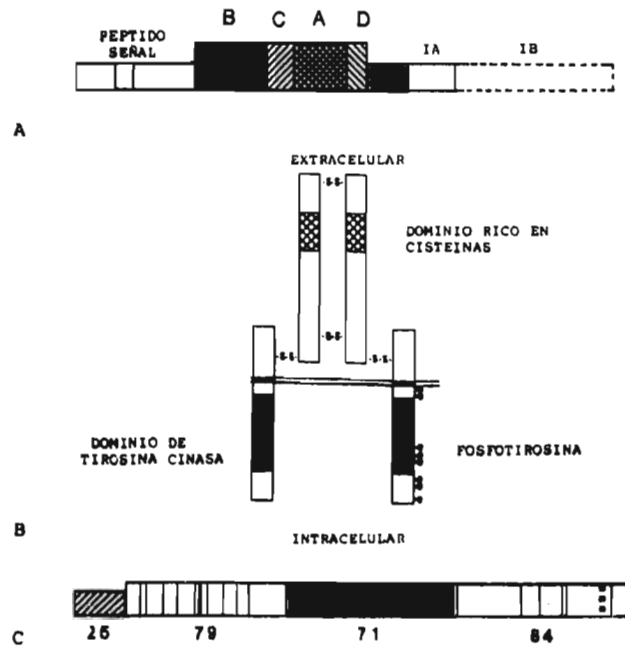


Figura 6. En (A) se esquematiza la estructura del IGF-I. Este péptido está constituido por 70 aminoácidos y muestra una alta homología estructural con la insulina y el IGF-II. El IGF-I maduro esta formado por cuatro dominios estructurales denominados A, B, C, y D. Existen dos variantes del IGF-I que difieren en la longitud de su segmento carboxilo terminal. La variante corta se conoce como IGF-IA y la larga como IGF-IB. (B) El receptor tipo 1 para IGFs es responsable de mediar los efectos de IGF-I sobre sus órganos blanco. Este receptor esta constituido por 2 subunidades alfa extracelulares responsables de unir al IGF-I, y dos subunidades beta con un dominio extracelular, uno intramembranal, y otro intracelular que posee actividad de tirosina cinasa. La estructura terciaria del receptor tipo 1 para IGFs es estabilizada por 4 enlaces disulfuro (s-s). (C) Las acciones de los IGFs son moduladas por una familia de proteínas fijadoras de IGFs (BPs). Estas proteínas son estructuralmente homólogas y funcionan como transportadoras y presentadoras de los IGFs. En la figura se ilustra la secuencia primaria de la IGFBP-1 (Modificada de D'Ercole et al., 1996).

subsecuente procesamiento alternativo del RNA mensajero (RNAm) correspondiente, puede originar dos pre-pro péptidos. El primero de ellos (IGF-IA), con una longitud de 153 aminoácidos, codificado por los exones 1 al 4. El segundo (IGF-IB), cuya longitud es de 195 aminoácidos, codificado por los exones 1 al 3 y el 5. El gene para IGF-I contiene dos promotores en el extremo 5' que son regulados de manera diferencial en distintos tipos celulares (Pimentel, 1994, D'Ercole et.al., 1996b).

Fuentes de producción y factores de regulación del IGF-I.

El hígado es la fuente primaria de producción del IGF-I circulante. Estudios recientes, sin embargo, han demostrado la presencia de RNAm para IGF-I en distintos tejidos, incluyendo el cerebro, lo que sugiere su producción y acción local. En general, tanto la producción local como la hepática de IGF-I se encuentra bajo la regulación de la hormona del crecimiento. La producción gonadal de IGF-I, que ocurre específicamente en las células de Sertoli inmaduras, también es regulada por las hormonas tiroideas. Se ha demostrado que factores tales como la insulina, el factor de crecimiento epidérmico, la prolactina, la ACTH, la hormona paratiroidea, la progesterona, los estrógenos, y el factor transformante de crecimiento beta regulan la producción local de IGF-I a nivel de la transcripción, en los distintos órganos blanco de estas hormonas (Pimentel, 1994). No existe aún evidencia experimental directa de la participación de estos factores en la regulación de la producción cerebral de IGF-I durante el desarrollo.

Funciones del IGF-I.

El IGF-I es un péptido anabólico que modula el desarrollo embrionario y fetal, así como el crecimiento y el metabolismo corporal y local en distintos tejidos durante el desarrollo postnatal. Además, IGF-I media algunos de los efectos de la hormona del crecimiento sobre el crecimiento somático, participa en las funciones reproductivas promoviendo la maduración de algunos linajes celulares gonadales, estimula la reabsorción del hueso regulando la actividad osteoclástica, funge como factor quimiotáctico de las células endoteliales promoviendo así la

neovascularización, y fomenta la proliferación de los precursores hematopoyéticos de la línea eritroide (Pimentel, 1994).

Receptores para el IGF-I.

Los efectos de IGF-I se median a través de un receptor específico asociado a la membrana celular conocido como el receptor de IGFs tipo 1 (IGF-Ir1; Figura 6). Este receptor es un heterotetrámero glucosilado constituido por dos dímeros que se estabilizan entre sí por dos enlaces disulfuro. Cada uno de los dímeros está constituido a su vez por una subunidad alfa (125 kDa), localizada en el dominio extracelular del receptor, la cual contiene la secuencia de aminoácidos que interacciona con el ligando, y una subunidad beta (90 kDa) cuya secuencia intracelular posee actividad tipo tirosina cinasa.

El IGF-Ir1 es el producto de un gene localizado en el cromosoma 15 en el humano, y tiene una homología estructural alta con el gene que codifica el receptor de la insulina. De hecho, IGF-Ir1 y el receptor de la insulina pueden formar receptores híbridos cuyo significado funcional aún se desconoce. Finalmente, estudios inmunoquímicos y de biología molecular han mostrado la existencia de al menos dos isoformas del IGF-Ir1, así como de algunas formas truncadas del mismo. Las isoformas se han denominado como los receptores tipo IA y IB, y se han localizado de manera independiente o coexistiendo en células de la placenta, del tejido linfoide, del cerebro, y de los tumores hepáticos (Pimentel, 1994; D'Ercole et al., 1998b).

Mecanismos de transducción asociados al IGF-I.

La unión de IGF-I a la subunidad alfa de su receptor induce un cambio en su conformación que resulta en la autofosforilación de la subunidad beta. Esta autofosforilación dispara una cascada de señales que involucra la fosforilación, mediada por tirosina cinasa de la subunidad beta, de los substratos 1 y 2 del receptor de la insulina (IRS-1/IRS-2). Una vez fosforilados, los IRSs se unen al complejo de proteínas Grb2 y Sos. Este complejo de proteínas es entonces translocado a la membrana plasmática para activar a Ras, una proteína G. La activación de Ras conduce a la fosforilación de Raf y así a la activación de la

casca de la proteina cinasa activada por mitógenos (Pimentel, 1994; D'Ercole et.al., 1996b).

Así, a través de estos mecanismos intracelulares de transducción IGF-I regula la expresión genética de diversas proteínas asociadas al control del ciclo y la diferenciación celulares como son los proto-oncogenes y sus productos (i.e., c-Fos, c-Jun, C-Myc, GAP-43) (Pimentel, 1994; D'Ercole et.al., 1996b).

Regulación de los efectos de IGF-I: Proteínas Fijadoras de IGFs (IGFBPs).

La actividad biológica de los IGFs se modula por una familia de proteínas estructuralmente homólogas conocidas como IGFBPs (25-30 kDa) (Figura 6). Todas estas proteínas fijan a los IGFs fungiendo así como acarreadores, reservorios y presentadores de ellos. Las IGFBPs se han identificado tanto en la circulación como en los distintos tejidos blanco de IGF-I. Todas ellas se producen en el hígado, pero también se producen de manera local por tipos celulares específicos presentes en los distintos tejidos. La modulación de los efectos de IGF-I por estas proteínas difiere en los distintos órganos. Por ejemplo, mientras IGFBP-2 potencia los efectos mitogénicos de IGF-I sobre condrocitos, la misma proteína producida por astrocitos bloquea la proliferación celular (Pimentel, 1994; Jones y Clemmons, 1995; D'Ercole et.al., 1996b). Finalmente, es interesante que los mismos tejidos que expresan IGF-I, producen en paralelo su receptor y algunas de las IGFBPs (Lee et.al., 1992., Bondy et.al., 1991). Esto sugiere: 1) la existencia de un mecanismo paracrino y/o autocrino por medio del cual IGF-I ejerce sus acciones sobre sus órganos blanco, y 2) que las IGFBPs modulan los efectos de IGF-I directamente en el sitio en donde éste se expresa.

Planteamiento del Problema.

El crecimiento del cerebro en los mamíferos es una de las características más notables de su desarrollo postnatal. No existen modelos biológicos para estudiar los procesos celulares neuronales que lo subyacen.

Un gran porcentaje del volumen cerebral está ocupado por conexiones neuronales. Así, la elaboración selectiva de las conexiones neuronales puede ser uno de los procesos que fomente el crecimiento cerebral (Purves, 1994). En el

presente trabajo se evaluó si la elaboración selectiva de conexiones neuronales, y por tanto el crecimiento cerebral, depende al menos en parte de la disponibilidad de factores neurotróficos del tipo de IGF-I.

Hipótesis.

La hipótesis evaluada en este trabajo supone que el IGF-I promueve el crecimiento de las neuronas y la elaboración progresiva y selectiva de circuitos neuronales *in vivo* durante el desarrollo postnatal. Si el crecimiento neuronal y de sus circuitos depende de la disponibilidad de factores neurotróficos del tipo de IGF-I, es posible que éste proceso contribuya de manera significativa a sustentar el crecimiento cerebral.

Objetivos

Evaluar si las variaciones locales de IGF-I conducen a cambios en el crecimiento neuronal en S1.

Evaluar si la elaboración selectiva de neuropilo depende de la cantidad de IGF-I disponible en S1.

Justificación del modelo anatómico.

En la presente propuesta, se decidió restringir el estudio de los efectos de IGF-I sobre el crecimiento neuronal de la vía tálamo-cortical somatosensorial. Las razones fueron fundamentalmente técnicas. Primero, los barriles corticales se pueden distinguir con gran claridad en los cortes histológicos de cerebros adultos teñidos mediante distintas técnicas histológicas e histoquímicas. Segundo, los elementos celulares asociados a esta vía expresan tanto IGF-I, como sus receptores y varias de las IGF-BPs, durante la etapa de crecimiento rápido del cerebro (Bondy, 1991). Y, tercero, la vía tálamo-cortical somatosensorial se establece durante los primeros días de vida postnatal (Woolsey, 1990). Esto permite evaluar directamente los efectos de las alteraciones en la disponibilidad de IGF-I sobre la formación y el desarrollo de esta vía debido a que la expresión de los transgenes en los ratones estudiados se inicia al nacimiento (D'Ercole, 1994; Ye et al., 1995).

Material y Métodos

Animales

Para evaluar los efectos de la sobre expresión de IGF-I y de la producción ectópica cerebral de IGFBP-1 sobre el desarrollo postnatal del cerebro y de S1, el presente estudio se realizó utilizando únicamente ratones C56 adultos (~90 días) control y transgénicos heterocigóticos para los genes humanos de IGF-I (Behringer et.al., 1990; Mathews et.al., 1990; Ye et.al., 1995) y de IGFBP-1 (D'Ercole et.al., 1994). Todos los animales fueron mantenidos en cuartos con luz y temperatura controladas, alimentados *ad libitum*, y con libre acceso a agua adicionada con $ZnSO_4$, el cual activa al promotor (metalotioneína-I) de ambos transgenes. La expresión cerebral de IGF-I and IGFBP-1 en estos animales transgénicos se ha caracterizado previamente (D'Ercole et.al., 1994; Ye et.al., 1995), y los efectos de la expresión de ambos transgenes sobre el tamaño y el peso cerebrales, y sobre el proceso de mielinización han sido discutidos y documentados extensamente (Behringer et.al., 1990; Mathews et.al., 1990; Carson et.al., 1993; D'Ercole et.al., 1994; Ye et.al., 1995). Aunque ambos transgenes se expresan ampliamente en el cerebro, existen variaciones del peso regional cerebral que resultan de diferencias en la cantidad del transgene expresado en las distintas áreas, y en las diferentes líneas de animales transgénicos (Ye et.al., 1995). Además, la expresión de estos transgenes empieza al nacimiento y alcanza el pico de expresión alrededor de los días 21 a 30 postnatales, siguiendo el patrón de expresión endógena de la metalotioneína-I (D'Ercole, 1994; Ye et.al., 1995).

Para descartar que los efectos asociados con la expresión de los transgenes sobre la estructura cerebral fueran simplemente el resultado de mutaciones de inserción, los estudios iniciales se realizaron en múltiples líneas (L) de ratones transgénicos: ratones de las líneas 26, 32, 43, 50 y 52 para IGF-I, y ratones de las líneas B y C para IGFBP-1. Debido a que las diferencias más importantes en las áreas del subcampo de barniles postero-medial (PMBSF) y de los barniles se encontraron en los ratones transgénicos de las líneas 26 para IGF-I y B para IGFBP-1

(Cuadro 1), los estudios más detallados se realizaron únicamente en los animales transgénicos de estas dos líneas y en los animales control respectivos.

Si bien arreglos citoarquitectónicos semejantes a los barriles también se observan en el tálamo (i.e., barreloides) y en el tallo cerebral (i.e., barreletas), nuestro estudio se restringió al análisis de los barriles corticales correspondientes al PMBSF porque ellos se observan fácilmente en animales adultos con técnicas histoquímicas y de tinción con violeta de creilo. Este no es el caso para los barreloides y las barreletas cuyos bordes, incluso en cortes de orientación óptima, tienden a observarse difusos conforme el desarrollo postnatal avanza (Killeckey et al., 1990).

Para evaluar de manera más directa si los cambios observados en la estructura cerebral en los ratones transgénicos de las distintas líneas para IGF-I e IGFBP-1 se inducen por cambios en la disponibilidad de IGF-I, los ratones transgénicos de la línea 52 para IGF-I se cruzaron con aquellos de la línea BL para IGFBP-1 (ratones IGF-I/IGFBP-1). Todas las mediciones anatómicas se hicieron a doble ciego. Los protocolos aplicados para el sacrificio de los animales fueron aprobados por los comités locales de protección de los derechos de los animales en la Universidad de Carolina del Norte en Chapel Hill.

Mediciones del área de la corteza cerebral, y del área y volumen de los barriles del PMBSF.

Para determinar el área de sección de la corteza, PMBSF y de sus barriles, así como el volumen de los barriles, los animales control y transgénicos fueron anestesiados con pentobarbital (50mg/kg), y perfundidos con una solución salina seguida de una solución de glicerol al 10%. Los cerebros se removieron del cráneo, se pesaron, y sus cortezas cerebrales se disecaron -incluyendo el bulbo olfatorio-, se aplanaron entre dos portaobjetos separados por 2mm, y se congelaron en 2-metil-butano siguiendo el protocolo descrito por Riddle et al. (1992). Se obtuvieron cortes tangenciales de 30 μ m a través de la corteza en un criostato, se montaron en laminillas cubiertas con poli-L-lisina, y se tificaron con la técnica histoquímica para revelar la actividad de la enzima oxidativa deshidrogenasa succínica (SDH). Esta técnica predice la distribución espacial de las aferentes talámicas en S1. Se trazaron

mapas bidimensionales de la corteza, y del PMBSF y sus barriles con ayuda de una cámara lúcida a un aumento final de 3X y 40X, respectivamente. Los mapas completos se digitalizaron, y las áreas de sección de la corteza, del PMBSF y sus barriles se midieron con ayuda del programa ImagePro, de acuerdo con los lineamientos establecidos por Riddle et. al. (1992). El área total de S1 ocupada por los barriles del PMBSF se calculó sumando las áreas de cada uno de los barriles.

La SDH es una enzima que participa en el metabolismo oxidativo de la glucosa. Por otro lado, IGF-1 regula el metabolismo celular en distintos tejidos, incluyendo el cerebro. Es posible, por tanto, que los cambios en el tamaño de los barriles identificados con la técnica histoquímica para SDH en los ratones transgénicos pudieran deberse a modificaciones del metabolismo oxidativo asociadas a la expresión de los transgenes, y no a cambios estructurales reales. Para descartar esta posibilidad, cortes tangenciales, secuenciales de la corteza cerebral se obtuvieron y tñeron de manera alternada con violeta de creilo y con la reacción histoquímica para SDH. Los bordes de los barriles definidos por ambas técnicas correspondieron de manera precisa (ver también Riddle et. al., 1992 para observaciones semejantes en la rata). Así, los cambios en las dimensiones de los barriles revelados mediante la técnica de SDH en los ratones transgénicos responden a cambios estructurales, y no reflejan simplemente un estado metabólico alterado de la vía tálamo-cortical.

Las series de cortes teñidos para SDH obtenidas de los ratones transgénicos IGF-1 26L e IGFBP-1 BL, así como de sus respectivos controles, se usaron para estimar la altura promedio de los barriles del PMBSF (i.e., grosor de la capa IV cortical) y su volumen. La altura de cada uno de los 34 barriles que constituyen el PMBSF se calculó en seis animales por grupo al multiplicar el número de cortes en los cuales un determinado barril aparecía, por el grosor de dichos cortes. El volumen promedio de los barriles se obtuvo multiplicando el área de sección de cada barril por el grosor del corte, y finalmente sumando el volumen de cada corte.

También se evaluaron los posibles efectos de la disponibilidad alterada de IGF-1 sobre los glomérulos olfatorios localizados en los bulbos olfatorios. Así, el área

de sección promedio de los glomérulos olfatorios ($n=1000/\text{grupo}$) se determinó en mapas bidimensionales obtenidos con ayuda de una cámara lúcida. Es importante mencionar que estos mapas se obtuvieron de los mismos cortes utilizados para reconstruir los mapas del PMBSF y de sus barriles.

Estimaciones del tamaño, número y densidad de neuronas en los barriles del PMBSF.

El área de sección neuronal y el número de neuronas en los barriles del PMBSF se estimaron en cortes tangenciales ($50\ \mu\text{m}$) de la corteza cerebral teñidos con violeta de cresilo, y obtenidos en un criostato después de su fijación con 4% de paraformaldehído en amortiguador de fosfatos. El área neuronal promedio se obtuvo en muestras de 50 a 95 neuronas que fueron tomadas al azar del centro de cada uno de los 34 barriles del PMBSF en seis animales por grupo, usando un solo corte en el que los bordes de los barriles fueran claramente visibles (Pasternak y Woolsey, 1975; Curcio y Coleman, 1982). Este método de muestreo tiene una probabilidad baja de introducir tendencias debido a que se ha mostrado que el área neuronal promedio tiene poca variación en función de la profundidad de la capa IV cortical, y tampoco se han reportado variaciones regionales intrabarril (e.g., pared versus centro) en el tamaño neuronal (Pasternak y Woolsey, 1975). Para cada grupo de animales, se trazaron un total de 9000 perfiles neuronales con núcleo, nucléolo, y citoplasma claramente visibles con la ayuda de la cámara lúcida a un aumento final de 1500X. Los dibujos de las células se digitalizaron y sus áreas se determinaron usando el programa Image-Pro.

Para estimar el número y densidad neuronales, se contaron las neuronas en cada uno de los 34 barriles del PMBSF en los mismos cortes utilizados previamente para determinar el área neuronal promedio (Pasternak y Woolsey, 1975; Curcio y Coleman, 1982). Se trazaron los bordes de los barriles y se contaron todos los perfiles neuronales usando una cámara lúcida a un aumento final de 450X. El número promedio de neuronas en los barriles del PMBSF se estimó con la fórmula: Número de neuronas por barril = número de neuronas en el corte \times la altura del barril / $50\ \mu\text{m}$ (el grosor del corte). La densidad neuronal promedio en los barriles del PMBSF se

estimó mediante la fórmula siguiente: Densidad neuronal / mm^3 = número de neuronas por barril / el volumen del barril.

Estimación de número de axones en el nervio infraorbitario, y medición del área de los folículos de los bigotes y de los cojinetes faciales.

Los cojinetes faciales de los mismos animales controles y transgénicos IGF-I 26L e IGFBP-1 BL usados para determinar las áreas del PMBSF y de sus barriles se disectaron cuidadosamente y posfijaron en formalina al 10% por 7 días, y transferidos a sacarosa al 20% en amortiguador de fosfatos por una semana. Los cojinetes se aplanaron entre dos laminillas separadas por 2 mm, se congelaron en 2-metil-butano, y se cortaron de un modo tangencial ($50 \mu\text{m}$) en un criostat. Se dibujaron mapas bidimensionales de los cojinetes faciales con ayuda de una cámara lúcida a un aumento final de 14X. Se determinaron las áreas de los cojinetes faciales y de los folículos pilosos de los bigotes representados en el PMBSF siguiendo un protocolo similar al empleado para medir las áreas del PMBSF y de sus barriles.

Para contar el número de axones en el nervio infraorbitario, se perfundieron animales control y transgénicos IGF-I 26L e IGFBP-1 BL con paraformaldehído al 3% y glutaraldehído al 2.5% en amortiguador de fosfatos. El cerebro y la piel, con excepción de los cojinetes faciales, fueron cuidadosamente removidos, y los restos de la cabeza, incluyendo el nervio infraorbitario, posfijados en el mismo fijador por 7 días. Las muestras se transfirieron a una solución de descalcificación (0.25 M EDTA, pH 7.4) por 3 días a 37°C . Los nervios infraorbitarios se lavaron en amortiguador de fosfatos, y se incluyeron en glicol-metacrilato de acuerdo a las instrucciones de proveedor (Energy Beam Science, Agawam, MA). Se obtuvieron cortes transversales ($5 \mu\text{m}$) de los nervios infraorbitarios en un ultramicrotomo, se montaron en laminillas cubiertas con gelatina, y se tiñeron con Azul de Richardson. Estos cortes se utilizaron para contar el número de axones mielinizados en el nervio infraorbitario siguiendo los lineamientos descritos por Sikich et al. (1988).

Validación de los Métodos.

El porcentaje de cambio del tamaño cerebral como resultado de los procedimientos de perfusión se evaluó de acuerdo al método descrito por Riddle et

al. (1992). Debido a que se encontró que las perfusiones con paraformaldehído y glicerol alteran la talla cerebral en la misma proporción tanto en ratones control como en los transgénicos, no se incluyeron factores de corrección en los datos morfométricos. La validación de los métodos usados, sin embargo, proviene del hecho de que todos los valores morfológicos obtenidos en nuestros ratones control son comparables a los reportados en la misma especie por otros autores (Pasternak y Woolsey, 1975; Curcio y Coleman, 1982; Vongdokmai, 1980; Shuz y Palm, 1989).

Análisis de los Datos.

Los promedios en cada grupo se obtuvieron para cada uno de los parámetros morfológicos medidos. La significancia estadística de las diferencias encontradas entre el grupo control y los ratones transgénicos se evaluó empleando Análisis de Varianza (ANOVA) y Student t-tests (StatView-II). La aplicación del ANOVA también permitió demostrar que la condición transgénica fue responsable directa de las variaciones en el tamaño del cerebro, de la corteza cerebral, y del PMBSF y sus barriles en los ratones transgénicos.

Resultados

Observaciones Generales

El tamaño del cerebro, la corteza cerebral, y del PMBSF y sus barriles difirieron significativamente entre los animales control y los transgénicos, así como entre las distintas líneas de ratones transgénicos. El número, la forma y la definición anatómica de los barriles, sin embargo, fue comparable entre los ratones control y los transgénicos (Figura 9) indicando que IGF-I no está involucrado directamente en la formación de los barriles. No se observaron diferencias significativas en el peso corporal entre los ratones control y los transgénicos (Cuadro 1). Esto es consistente con el hecho de que la expresión periférica de los transgenes para IGF-I e IGFBP-1 en estos ratones transgénicos es muy baja (D'Ercole et al., 1994; Ye et al., 1995).

Peso cerebral y relación cerebro:cuerpo (Cuadro 1).

En consonancia con observaciones previas (Behringer et al., 1990; Mathews et al., 1990; D'Ercole, 1994; Ye et al., 1995), todas las líneas de ratones transgénicos IGF-I mostraron un incremento significativo en la talla del cerebro evidenciado por un

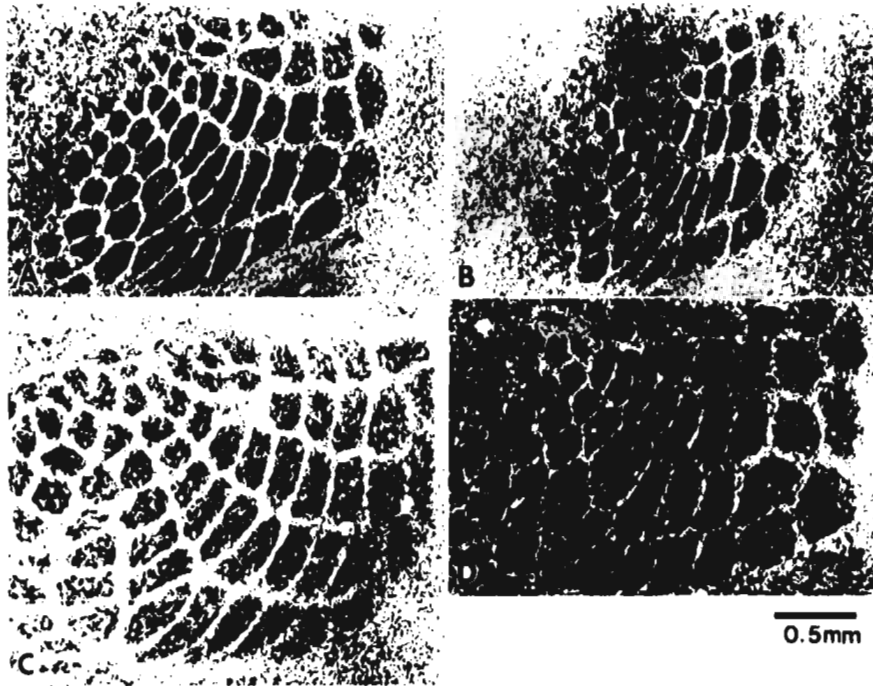


Figura 9. Fotomicrografías que muestran el PMBSF en la capa IV de SI en ratones control (A) y transgénicos para el gene de IGFBP-1 (B), de IGF-1 (C), y para ambos transgenes (D). Nótese la disminución y el incremento en el tamaño de la representación cortical de los bigotes en los ratones Tg/IGFBP-1 (B) e IGF-1 (C), respectivamente. El tamaño intermedio del PMBSF y sus barriles en los ratones con expresión de ambos transgenes sugiere que la expresión ectópica de IGFBP-1 disminuye los efectos de la sobre expresión del transgene para IGF-1 (D). (Aumento 40X).

Cuadro 1. Peso corporal y cerebral y relación cuerpo / cerebro en ratones control y transgénicos IGF-I, IGFBP-1, e IGF-I/IGFBP-1 (S2L/BL Cruza) (promedio \pm SEM).

Línea	Peso Corporal (g)	Peso Cerebral (g)	Relación cerebro cuerpo
control n=6	33.18 \pm 4.09	0.46 \pm 0.01	0.013 \pm 0.002
L26 IGF-I n=6	32.71 \pm 2.34	0.88 \pm 0.01* (91% \uparrow)	0.026 \pm 0.004
L50 IGF-I n=6	35.60 \pm 6.04	0.63 \pm 0.02* (37% \uparrow)	0.017 \pm 0.003
L52 IGF-I n=7	36.92 \pm 3.37	0.68 \pm 0.01* (48% \uparrow)	0.018 \pm 0.003
L32 IGF-I n=7	36.14 \pm 2.05	0.72 \pm 0.01* (56% \uparrow)	0.019 \pm 0.005
L43 IGF-I n=8	38.59 \pm 6.46	0.56 \pm 0.002* (22% \uparrow)	0.014 \pm 0.0003
IGF-I/IGFBP1 n=6	32.32 \pm 3.74	0.53 \pm 0.02* (13% \uparrow)	0.016 \pm 0.005
LC IGFBP-1 n=5	36.25 \pm 3.28	0.36 \pm 0.003* (22% \downarrow)	0.009 \pm 0.0009
LB IGFBP-1 n=6	32.43 \pm 1.50	0.35 \pm 0.01* (24% \downarrow)	0.010 \pm 0.006

Student's t-test versus ratones control *p < 0.0001

aumento en el peso cerebral total. En contraste, los ratones transgénicos IGFBP-1 mostraron cerebros de peso y talla reducidos al ser comparados con los animales control. En los ratones transgénicos IGF-I, los incrementos en peso cerebral se encontraron entre un 22% en los animales de la línea 43 hasta un 91% en aquellos de la línea 26. En los ratones transgénicos IGFBP-1, los decrementos en el peso cerebral fueron de 22% y 24% en las líneas C y B, respectivamente. El cruzamiento de ratones transgénicos IGF-I 52L con ratones transgénicos IGFBP-1 BL (ratones IGF-I/IGFBP-1) dio origen a animales con cerebros 13 % más pesados que los de los animales control. Los ratones IGF-I/IGFBP-1 mostraron, sin embargo, cerebros 28% (t-student, $p < 0.0001$) más ligeros que los cerebros de los ratones transgénicos IGF 52L nativos, pero 34% más pesados (t-student, $p < 0.0001$) que los de los ratones transgénicos IGFBP-1 BL. Así, estos resultados indican que los cambios en el tamaño cerebral observados en los ratones transgénicos dependen de la cantidad de IGF-I disponible, y sugieren que limitaciones en la disponibilidad de éste imponen restricciones al desarrollo y crecimiento cerebral y cortical (ver adelante).

La relación peso cerebral : peso corporal se observó incrementada en la mayoría de los ratones transgénicos IGF-I y en los IGF-I/IGFBP-1, y reducida en los ratones transgénicos IGFBP-1, al compararse con los animales control. Estas diferencias resultan de cambios en el peso cerebral sin alteraciones en el peso corporal. Los cambios en el tamaño cerebral en los ratones transgénicos, por tanto, no pueden ser atribuidos a modificaciones del peso o de las dimensiones corporales.

Área cortical, área total de los barriles del PMBSF, y relación área del los barriles : área de la corteza (Cuadro 2).

El área cortical incrementó en todas la líneas de ratones transgénicos IGF-I, y decreció en las dos líneas de ratones transgénicos IGFBP-1. El incremento en el área cortical en los ratones transgénicos IGF-I varió entre un 29% a un 81% en los animales de las líneas 43 y 26, con respecto a los ratones control. En contraste, el área cortical en los ratones transgénicos IGFBP-1 se redujo entre un 10% a un 19% en animales de las líneas C y B. En los ratones IGF-I/IGFBP-1, el área cortical se encontró incrementada 30% (t-student, $p < 0.0001$) y 37% (t-student, $p < 0.0001$) al

compararla con los valores obtenidos en los ratones control y transgénicos IGFBP-1 BL nativos, pero reducida 13% (t-student, $p < 0.0001$) al compararse con los valores obtenidos para los ratones transgénicos IGF-I 52L nativos.

Comparaciones de los cambios porcentuales en el peso cerebral y en el área cortical en los ratones transgénicos indican que los cambios en el área cortical no son precisamente proporcionales a los cambios en el peso cerebral (Cuadros 1 y 2). Por ejemplo, en los ratones transgénicos IGF-I 26L, el peso cerebral incrementó 91% mientras que el área cortical lo hizo en un 81%. En comparación, en los ratones transgénicos IGF-I 32L, el área cortical incremento en un 64% mientras que el peso cerebral lo hizo en un 56%. La desproporción entre los cambios observados en el área cortical y en el peso cerebral no solamente se observaron en los ratones transgénicos IGF-I, sino también en los transgénicos IGFBP-1 y en los IGF-I/IGFBP-1. Estos datos sugieren que las dimensiones cerebrales y corticales pueden cambiar, hasta cierto punto de manera independiente, como consecuencia de modificaciones en la disponibilidad local de factores neurotróficos del tipo del IGF-I. Así, es posible que la heterogeneidad de estos cambios se deba a variaciones regionales en la disponibilidad de IGF-I previamente documentada en estos ratones transgénicos (D'Ercole et.al., 1994; Ye et.al., 1995).

El área total de los bamiles del PMBSF incrementó para los ratones transgénicos IGF-I y los IGF-I/IGFBP-1, pero decreció en los ratones transgénicos IGFBP-1. Los incrementos para los ratones transgénicos IGF-I variaron desde un 33% en animales de la línea 43 hasta un 68% en aquellos de la línea 26, al ser comparados con los ratones control. Los decrementos para los ratones transgénicos IGFBP-1 variaron de un 12% en los animales de la línea C a un 24% en los de la línea B. En los animales IGF-I/IGFBP-1, el área total de los bamiles del PMBSF decreció 16% (t-student, $p < 0.0001$) en relación con los ratones transgénicos IGF-I 52L nativos, pero incrementó 27% (t-student, $p < 0.0001$) y 40% (t-student, $p < 0.0001$) sobre los valores observados para los ratones control y los transgénicos IGFBP-1 BL nativos, respectivamente (Cuadro 2).

Cuadro 2. Áreas cortical y total de los barriles y relación Área de los barriles / Área cortical en ratones control y transgénicos IGF-1, IGFBP-1, e IGF-1/IGFBP-1 (52L/BLCross) (promedio±SEM).

Línea	Área de los barriles (mm ²)	Área Cortical (cm ²)	Relación Barril:Corteza
control n=6	1.44 ± 0.047	0.507 ± 0.008	0.028 ± 0.06
L26 IGF-1 n=6	2.42 ± 0.098* (68%↑)	0.917 ± 0.04* (81%↑)	0.026 ± 0.02
L50 IGF-1 n=6	2.19 ± 0.085* (52%↑)	0.726 ± 0.02* (43%↑)	0.030 ± 0.04
L52 IGF-1 n=7	2.18 ± 0.010* (51%↑)	0.745 ± 0.01* (47%↑)	0.029 ± 0.01
L32 IGF-1 n=7	2.03 ± 0.093* (41%↑)	0.831 ± 0.02* (64%↑)	0.024 ± 0.04
L43 IGF-1 n=8	1.91 ± 0.068* (33%↑)	0.654 ± 0.01* (29%↑)	0.029 ± 0.06
IGF/IGFBP1 n=6	1.83 ± 0.065* (27%↑)	0.659 ± 0.01* (30%↑)	0.028 ± 0.06
LC IGFBP-1 n=5	1.26 ± 0.022‡ (12%↓)	0.454 ± 0.01‡ (10%↓)	0.027 ± 0.02
LB IGFBP-1 n=6	1.09 ± 0.032* (24%↓)	0.412 ± 0.009* (19%↓)	0.026 ± 0.035

Student's t-test versus ratones control *p<0.0001, † p<0.005, ‡ p<0.007, § p<0.05

Las comparaciones de los porcentajes de cambio de las áreas de la corteza y de los barriles entre las distintas líneas de ratones transgénicos indican nuevamente que dichos cambios tampoco son proporcionales. Así, en los ratones transgénicos IGF-I de líneas 50, 52, 43 y en ambas líneas de ratones transgénicos IGFBP-1 los barriles fueron relativamente más afectados que la corteza, mientras que en los ratones transgénicos IGF-I de las líneas 26 y 32 y en los animales IGF-I/IGFBP-1 se observó lo opuesto (Cuadro 2)

El efecto diferencial de la expresión de los transgenes sobre el área cortical y el área total de los barriles condujo a variaciones pequeñas pero significativas de la relación área de los barriles : área de la corteza entre los animales transgénicos (Cuadro 2). Estas relaciones indican que los cerebros de mayor tamaño no siempre tienen los barriles relativamente más grandes (compare por ejemplo a los ratones transgénicos/IGF-I de las líneas 50, 52, y 32 en el Cuadro 1). Así, los cambios en el área de S1 ocupada por los barriles del PMBSF en los ratones transgénicos no resultan simplemente de cambios en las dimensiones corticales. Estas observaciones sugieren, por lo tanto, que las dimensiones relativas de la corteza cerebral y de S1 pueden cambiar, hasta cierto punto, de manera independiente después de variaciones en la disponibilidad local de IGF-I.

Área de sección del PMBSF y de sus barriles (Cuadro 3).

El área de sección del PMBSF y sus barriles se encontró incrementada en todas las líneas de ratones transgénicos IGF-I y en los IGF-I/IGFBP-1, y reducida en los ratones transgénicos IGFBP-1, al ser comparados con los animales control. El porcentaje de cambio para el PMBSF en los ratones transgénicos IGF-I varió desde un 25% en los animales de la línea 43 hasta un 60% en aquellos de la línea 26. Asimismo, el porcentaje de incremento en el área promedio de los barriles del PMBSF varió desde 27% hasta 67% en animales de las líneas 43 y 26, respectivamente. El área de sección de los barriles, por lo tanto, aumentó de entre un 2 a un 12% más que el área del PMBSF en los ratones transgénicos IGF-I, indicando que los barriles fueron relativamente más afectados que el PMBSF por la sobre expresión de IGF-I.

Las áreas de sección del PMBSF y de sus barriles se afectaron de manera similar por la expresión de IGFBP-1 en ambas líneas de ratones transgénicos. En el caso de la línea C ambas áreas disminuyeron 13%, mientras que para los animales de la línea B la reducción fue de un 25%. En los ratones IGF-I/IGFBP-1 el área de sección de los barriles se encontró incrementada en un 14% (t-student, $p < 0.0001$) y en un 51% (t-student, $p < 0.0001$), respectivamente, al compararse con los ratones control y transgénicos IGFBP-1 BL nativos. Al ser comparados con los ratones transgénicos IGF-I 52L nativos, sin embargo, las áreas de sección del PMBSF y sus barriles en los animales IGF-I/IGFBP-1 se observaron reducidas (Cuadro 3).

En resumen, los cambios en las dimensiones de los barriles en los ratones transgénicos no resultan de la expansión o reducción uniforme y proporcional de la corteza cerebral debido a que los cerebros más pesados con las cortezas más grandes no siempre presentaron los barriles de mayor tamaño. Estas observaciones, por otro lado, indican que los cambios en el área del PMBSF y de sus barriles observados en los ratones transgénicos sean simplemente el resultado del aplanado diferencial durante el procesamiento histológico o de diferencias en el ángulo de corte.

Altura y volumen de los barriles en el PMBSF (Cuadro 4).

Debido a que las diferencias mayores en las dimensiones absolutas del PMBSF y sus barriles fueron observadas en los ratones transgénicos IGF-I 26L e IGFBP-1 BL, los estudios morfométricos subsecuentes se realizaron únicamente en estas dos líneas. La altura y el volumen de los barriles se incrementaron 18% y 96% en los ratones transgénicos IGF-I 26L, y disminuyeron 20% y 39% en los ratones transgénicos IGFBP-1 BL, respectivamente, al ser comparados con los animales control (Cuadro 4).

Área de sección, número, y densidad neuronal en los barriles del PMBSF (cuadro 5).

El área de sección neuronal promedio en los barriles del PMBSF se encontró incrementada en un 33% en los ratones transgénicos IGF-I 26L, y reducida en un 10% en los ratones transgénicos IGFBP-1 BL, al compararse con los animales

Cuadro 3. Área de sección del PMBSF y sus barriles en SI de ratones control y transgénicos IGF-I, IGFBP-1, e IGF-I/IGFBP-1 (S1L/BL Cruz) (promedio \pm SEM).

Línea	Área promedio de los barriles (mm ²)	Área del PMBSF (mm ²)
control n=6	0.049 \pm 0.0035	1.80 \pm 0.067
L26 IGF-I n=6	0.082 \pm 0.0066* (67% \uparrow)	2.89 \pm 0.012* (60% \uparrow)
L50 IGF-I n=6	0.077 \pm 0.0076* (56% \uparrow)	2.61 \pm 0.093* (45% \uparrow)
L52 IGF-I n=7	0.074 \pm 0.0063* (50% \uparrow)	2.50 \pm 0.063* (38% \uparrow)
L32 IGF-I n=7	0.067 \pm 0.0038* (36% \uparrow)	2.41 \pm 0.048* (34% \uparrow)
43L IGF-I n=8	0.063 \pm 0.0039* (27% \uparrow)	2.26 \pm 0.046* (25% \uparrow)
IGFI/IGFBP1 n=6	0.056 \pm 0.0036* (14% \uparrow)	2.26 \pm 0.011* (25% \uparrow)
LC IGFBP-1 n=5	0.043 \pm 0.0035‡ (13% \downarrow)	1.56 \pm 0.029* (13% \downarrow)
LB IGFBP-1 n=6	0.037 \pm 0.0035* (25% \downarrow)	1.32 \pm 0.038* (26% \downarrow)

Student's t-test versus ratones control *p<0.0001, †p<0.007, ‡p<0.05

Cuadro 4. Área de sección, altura, y volumen de los barriles del PMBSF en ratones control y transgénicos IGF-1 26L e IGFBP-1 BL. (promedio \pm SEM).

Barriles del PMBSF			
Línea	Área de sección (mm ²)	Altura(μm)	Volumen (mm ³)
Control n=6	0.049 \pm 0.0035	179 \pm 1.1	0.0087 \pm 0.004
L26 IGF-1 n=6	0.082 \pm 0.0066* (67% \uparrow)	211 \pm 2.0* (18% \uparrow)	0.017 \pm 0.013* (98% \uparrow)
LB IGFBP-1 n=6	0.037 \pm 0.0035* (25% \downarrow)	143 \pm 1.3* (20% \downarrow)	0.0052 \pm 0.004* (39% \downarrow)

*Student's t-test versus ratones control p<0.001

control. Por otro lado, el número promedio de neuronas contadas en los barriles del PMBSF en secciones únicas no varió significativamente entre los animales control y los transgénicos. Los estimados del número total promedio de neuronas por barril del PMBSF, sin embargo, sugieren que los ratones transgénicos IGF-I 26L poseen 24% más neuronas que los animales control, mientras que los ratones transgénicos IGFBP-1 BL tienen 15% menos neuronas que los ratones control (Cuadro 5). Estos cambios en el número de las neuronas en los barriles de los ratones transgénicos concuerdan con: 1) los cambios en altura de los barriles (i.e., grosor de la capa IV cortical) ya que ambos guardan una relación directa (Windrem and Finlay, 1991), y 2) los cambios en el contenido de DNA total observados previamente en los cerebros de los ratones transgénicos IGF-I 26L e IGFBP-1 BL (Carson et.al., 1993; D'Eroole et.al., 1994; Ye et.al., 1995).

No obstante el incremento en el número de neuronas por barril en los ratones transgénicos IGF-I 26, la densidad neuronal se encontró reducida en un 39%. Lo opuesto se observó en los ratones transgénicos IGFBP-1 en los que la densidad neuronal incrementó en un 39 % no obstante la reducción del número de neuronas por barril en estos animales (Cuadro 5). De manera similar, se han documentado incrementos en la densidad neuronal cortical en ratones con el gene de IGF-I inactivado por recombinación homóloga en los que presumiblemente existe una disponibilidad reducida de IGF-I (Beck et.al., 1995). Las modificaciones en la disponibilidad de IGF-I, por tanto, conducen a cambios en el tamaño, número y densidad neuronales en los barriles del PMBSF.

Área de sección de los glomérulos olfatorios.

El área de los glomérulos olfatorios se observó incrementada solamente en un 10% en los ratones transgénicos IGF-I 26L ($0.00700 \pm 0.0011 \text{ mm}^2$) al compararse con los animales control ($0.00638 \pm 0.0017 \text{ mm}^2$, promedio \pm SEM, t-student, $p < 0.05$). El área de estos módulos en los ratones transgénicos IGFBP-1 ($0.00635 \pm 0.0010 \text{ mm}^2$), sin embargo, fue comparable a la de los animales control. Debido a que las áreas de los barriles y de los glomérulos olfatorios fueron determinadas en los mismos cortes, estos resultados apoyan nuevamente que las diferencias encontradas

en las dimensiones de los barriles entre los ratones controles y transgénicos no son simplemente el resultado de artefactos asociados al aplanamiento y corte del tejido, ni el producto de alteraciones de la talla cerebral asociados a la perfusión. Por otro lado, debido a que el tamaño de los barriles resulta ser más afectado que el de los glomérulos olfatorios, es posible que las acciones de IGF-I muestren un cierto grado de especificidad regional. En apoyo a esta idea, se ha documentado que implantes de la corteza somatosensorial en la cámara anterior de ojo crecen más que aquellos del bulbo olfatorio después de ser tratados con IGF-I (Giacobini et al., 1990, 1995).

Áreas de los cojinetes faciales y de los folículos de los bigotes, y número de axones mielínicos en el nervio infraorbitario (Cuadro 6).

El área de los cojinetes faciales, el área de sección de los folículos de los bigotes, y el número de axones mielínicos en el nervio infraorbitario no difirieron entre los ratones control y transgénicos. Estos datos indican que los cambios en el tamaño relativo del PMBSF y sus barriles en los ratones transgénicos ocurren independientemente de posibles influencias de la periferia sensorial.

Discusión

Efectos de IGF-I sobre el desarrollo y la estructura del cerebro.

El IGF-I es una hormona protéica involucrada en la regulación endocrina del crecimiento corporal. Recientemente se ha documentado que el IGF-I también participa en la regulación local del crecimiento de diversos tejidos, incluido el sistema nervioso central, a través de mecanismos autocrinos y paracrinos.

En el sistema nervioso central, estudios *in vitro* así como de hibridación *in situ* sugieren que IGF-I pudiera promover: 1) la división de precursores neuronales en la pared ventricular, en el hipocampo y en la retina, 2) el crecimiento y la supervivencia de neuronas GABAérgicas y sensoriales, y 3) los cambios plásticos que ocurren en el bulbo olfatorio y en algunos núcleos hipotalámicos bajo ciertos estados funcionales (D'Ercole et al., 1996b). En el sistema nervioso periférico, por otro lado, IGF-I juega un papel importante en la transición de la inervación polineuronal hacia la inervación mononeuronal que

Cuadro 5. Área de sección, número, y densidad neuronal en los barriles del PMBSF de ratones control y transgénicos IGF-1 36L e IGFBP-1 BL (promedio±SEM).

Neuronas de los barriles del PMBSF				
Línea	Área de sección (μm^2)	Número / sección de 50 μm	Número Total (estimado)	Densidad ($10^3/\text{mm}^3$)
Control n=6	68.13±12.28	444 ± 29	1589±101	1.8±0.41
L26 IGF-1 n=6	90.42±13.41† (33%↑)	466 ± 20	1966±84* (24%↑)	1.1±0.08* (39%↓)
LB IGFBP-1 n=6	61.41±10.58† (10%↓)	470 ± 30	1344±86* (15%↓)	2.5±0.43* (39%↑)

* Student's t-test versus ratones control p<0.0001, † p<0.05

Cuadro 6. Área de los cojinetes faciales y de los folículos, y el número de axones mielínicos en el nervio trigémino en ratones control y Tg/IGF-1 26L e IGFBP-1 BL (promedio \pm SEM).

Línea	Área de los cojinetes faciales (mm ²)	Área de los folículos (mm ²)	Número de axones
control n=6	19.02 \pm 1.03	0.24631 \pm 0.008841	12820 \pm 1800
L26 IGF-1 n=6	18.91 \pm 0.67	0.23898 \pm 0.007963	12240 \pm 2100
LB IGFBP-1 n=6	19.91 \pm 0.69	0.26147 \pm 0.001030	13125 \pm 1975

ocurre durante el desarrollo del patrón de inervación de las fibras musculares estriadas, así como en la regeneración nerviosa (Caroni 1993, Ishii, 1993).

Si bien diversos estudios *in vitro* sugieren la participación de IGF-I como regulador de distintos aspectos del desarrollo neuronal en el sistema nervioso central, su papel *in vivo* es aún poco conocido. Así, para evaluar el papel de IGF-I como regulador del crecimiento cerebral y neuronal, y como factor promotor de la elaboración de circuitos neuronales *in vivo*, decidimos analizar los cambios en la estructura cerebral que siguen a las modificaciones en la disponibilidad de IGF-I. Para ello, aprovechamos la ventaja de la existencia de distintas líneas de ratones transgénicos que sobre expresan IGF-I en el cerebro, y aquellas con producción ectópica cerebral de IGFBP-1, una proteína que bloquea los efectos de IGF-I.

Nuestros resultados muestran que IGF-I juega un papel central en la regulación del crecimiento global del cerebro. Los ratones transgénicos IGF-I mostraron cerebros más pesados y de mayor tamaño que aquellos de los animales control. Exactamente lo opuesto se observó en los ratones transgénicos IGFBP-1 cuyos cerebros fueron menos pesados y más pequeños que en los animales control.

Las alteraciones del crecimiento cerebral observadas en nuestros ratones transgénicos se deben, en parte, al incremento en número de los oligodendrocitos y en la producción de mielina (Carson et al., 1993; Ye et al., 1995). Estos resultados son consistentes con los obtenidos en animales con el gene de IGF-I inactivo por recombinación homóloga los cuales poseen cerebros de tamaño reducido e hipomielinización (Beck, 1995).

Efectos de IGF-I sobre el desarrollo neuronal: Evaluación en S1.

Nuestros datos indican que la sobre expresión de IGF-I incrementa no sólo las dimensiones del cerebro, sino también las dimensiones corticales y las de S1. En contraste, la expresión ectópica de IGFBP-1 en el cerebro tiene exactamente el efecto opuesto, es decir, reduce tanto las dimensiones corticales como las de S1. Las líneas de ratones con los niveles de expresión de los transgenes más altos tuvieron también los cambios más significativos en la talla cerebral

(Gutierrez-Ospina, Ye, D'Ercole., resultados no publicados). Esto sugiere que los cambios estructurales en el cerebro de los ratones transgénicos se correlacionan con el grado de expresión de los transgenes. En apoyo a esto último, los ratones transgénicos que expresan ambos transgenes mostraron cerebros, mantos corticales, y S1 de tamaño intermedio al de los ratones transgénicos IGF-I 52L e IGFBP-1 BL nativos, sugiriendo que IGFBP-1 atenúa los efectos de la sobre expresión de IGF-I.

Estos resultados muestran que si la disponibilidad de IGF-I se altera durante el desarrollo, el cerebro modifica las proporciones absolutas y relativas de las regiones que los componen. Estos cambios confirman la importancia de IGF-I en la regulación de crecimiento del cerebro. Además, nuestras observaciones en S1 son consistentes con hallazgos previos que muestran que la neuronas sensoriales de proyección del sistema somatosensorial exhiben expresión de IGF-I durante periodos de crecimiento neuronal y sinaptogénesis (Bondy, 1993). En su conjunto, estos resultados sugieren que IGF-I modula el crecimiento neuronal en la vía somatosensorial en desarrollo, y que las limitaciones en la disponibilidad de IGF-I imponen restricciones al crecimiento de las neuronas sensoriales.

Los cambios en las dimensiones corticales y de S1 no fueron proporcionales; en algunas líneas de ratones transgénicos la corteza se afectó más que S1, mientras que lo opuesto se observó en otras líneas. Una posible explicación para estos hallazgos es que las variaciones regionales en la disponibilidad de IGF-I como resultado de la expresión diferencial de ambos transgenes pudiera conducir a variaciones de las dimensiones corticales y de S1 de manera independiente. En apoyo a esta idea, en estos ratones transgénicos se ha documentado que la expresión de ambos transgenes varía en las distintas regiones del cerebro siendo las más afectadas aquellas áreas que muestran mayor expresión de los transgenes (Ye et al, 1995). Así, es posible pensar que las variaciones regionales de la disponibilidad de IGF-I influyen las dimensiones relativas de la corteza y de S1 de manera independiente.

Por otro lado, factores tales como la distribución espacio-temporal de los receptores para IGF-I y de sus IGFBPs, y las diferencias regionales en el tiempo en el que los transgenes se empiezan a expresar podrían contribuir también a determinar las variaciones regionales del crecimiento cortical y de sus áreas. A este respecto, sería interesante investigar si el crecimiento heterogéneo de S1 reportado recientemente en la rata (Riddia et.al., 1992) resulta, al menos en parte, de la expresión diferencial de IGF-I, de sus receptores, y/o de sus proteínas fijadoras.

A diferencia de las dimensiones de los barriles, la forma y el número de ellos parece no estar afectada por las variaciones en la disponibilidad de IGF-I. Estas observaciones indican que IGF-I no está involucrado en la formación de los barriles. Esta conclusión se apoya en el hecho de que en ratas en desarrollo, la expresión de IGF-I mRNA se detecta por vez primera en la vía tálamo-cortical hacia el día cinco postnatal (Bondy, 1991), periodo en el cual el mapa somatosensorial ya se ha especificado completamente (Killackey et al., 1990). Nuestro estudio, sin embargo, no descarta la posibilidad de que IGF-I pueda influenciar el tiempo de llegada de las aferentes talámicas a la placa cortical. De cualquier manera, nuestros resultados sugieren que la formación de los barriles y su crecimiento son eventos independientes y posiblemente regulados por diferentes factores.

Los procesos celulares que subyacen a las modificaciones del tamaño cerebral inducidas por IGF-I aún se desconocen. Se ha documentado, sin embargo, que la sobre expresión de IGF-I en nuestros animales transgénicos aumenta la producción de mielina así como el número de oligodendrocitos funcionales (Carson et.al., 1993; Ye et.al., 1995). Lo opuesto se observa en los ratones transgénicos IGFBP-1 y en aquellos cuyos genes de IGF-I han sido inactivados por recombinación homóloga (Beck et.al., 1995). Así, las alteraciones del crecimiento cerebral en estos ratones transgénicos se deben, en parte, a los cambios en la producción y contenido de mielina.

Nuestras observaciones en S1 indican que las diferencias en el tamaño cerebral en los ratones transgénicos IGF-I e IGFBP-1 también resultan de cambios en el número y tamaño neuronal, y en el volumen ocupado por neuropilo. Así, los barriles de los ratones transgénicos IGF-I 26L mostraron un incremento en el número y en el tamaño de las neuronas, al compararse con los animales control. No obstante esto, la densidad neuronal en los barriles de estos ratones se encontró disminuida sugiriendo así un aumento en el volumen ocupado por neuropilo (la densidad neuronal tiene una relación inversa con el volumen ocupado por neuropilo; Tower, 1954; Jerison, 1973). En contraste, los barriles de los ratones transgénicos IGFBP-1 BL mostraron una reducción en el número y en el tamaño de las neuronas, al ser comparados con los animales control. La densidad neuronal, sin embargo, se encontró aumentada sugiriendo una reducción del volumen del barril ocupado por neuropilo. Estas observaciones, además de corroborar que las modificaciones en el tamaño cerebral responden a cambios en el número y tamaño de las neuronas y en el volumen ocupado por neuropilo, sugieren que IGF-I promueve el crecimiento neuronal y del neuropilo en la vía somatosensorial del cerebro en desarrollo.

Los mecanismos involucrados en la alteración del número de neuronas corticales debida a las modificaciones de la disponibilidad de IGF-I aún se desconocen. Sin embargo, las modificaciones en el número de células precursoras, los cambios en su velocidad de proliferación y/o en el tiempo que toman en la fase de división antes de su migración durante el periodo de neurogénesis, y las alteraciones en la supervivencia neuronal postnatal pudieran, cada una o en conjunto, explicar el cambio en el número de neuronas corticales observado en los ratones transgénicos (Finlay y Slattery, 1983; Dehay et al., 1991, 1993; Kennedy y Dehay, 1993; Caviness et al., 1995; Finlay y Darlington, 1995; Rakic 1988, 1995a,b).

Por otro lado, estudios *in vitro* e *in vivo* han mostrado que IGF-I promueve la proliferación de precursores neuronales (DiCicco-Bloom y Black, 1989; Drago et al., 1991; Ishii, 1993; Zackenfels et al., 1995) y la supervivencia neuronal de

distintos tipos neuronales (Recio-Pinto et al., 1986; Aizeman y Vellis, 1987; Calissano et al., 1993; D'Mello et al., 1993; Ishii, 1993). Nuestros datos no distinguen entre estas posibilidades. Pensamos, sin embargo, que las modificaciones de la disponibilidad de IGF-I afectan la supervivencia de las neuronas corticales directamente, o bien indirectamente a través de alterar la supervivencia de las neuronas talámicas de proyección. Las siguientes observaciones apoyan esta idea:

1) Las neuronas de la capa IV de la corteza cerebral se generan prenatalmente hacia el final de la gestación (Hicks y D'Amato, 1966). En el ratón, la muerte neuronal en el tálamo y la corteza somatosensorial ocurre durante los primeros diez días postnatales, alcanzando el pico alrededor de los días postnatales 5 y 8 en el tálamo y la corteza, respectivamente (Heumann y Leuba, 1983; Pearlman, 1985). Así, debido a que la expresión de ambos transgenes inicia al nacimiento (D'Ercole et al., 1994; Ye et al., 1995), es poco probable que su expresión afecte a la generación, aunque sí a la supervivencia de las neuronas talámicas y corticales.

2) Los pesos de los cerebros de los animales transgénicos no difieren de los de los animales control al nacimiento (D'Ercole et al., 1994; Ye et al., 1995). Si existieran efectos de ambos transgenes sobre la generación de neuronas se esperarían cambios en los pesos cerebrales de los ratones transgénicos en la etapa neonatal.

3) Se sabe que las dimensiones tangenciales de las áreas corticales reflejan en buena medida el número de axones talámicos que alcanzan la corteza. (Killackey y Belford, 1979; Catalano et al., 1991, 1995; Agmon et al., 1993, 1995; ver también Rakic, 1988; O'Leary, 1989; Kennedy y Dehay, 1993). Así, el incremento en la áreas tangenciales del PMBSF y de sus barriles refleja un aumento en el número de axones en la vía talamo-cortical, y por tanto un incremento en el número de neuronas talámicas que inervan la corteza.

4) El número de neuronas corticales se relaciona directamente con el número de neuronas talámicas que las inervan (Windrem y Finlay, 1991). Los cambios en el

número de neuronas corticales observados en los ratones transgénicos, por consiguiente, indican cambios en el número de neuronas talámicas. Los cambios en la citoarquitectura de los barriles en los ratones transgénicos posiblemente resultan de un incremento en la supervivencia neuronal a nivel talámico y cortical.

4) Finalmente, estudios preliminares conducidos en el laboratorio han mostrado que la aplicación local de IGF-I previene la muerte neuronal en el ganglio del trigémino, consecutiva a la transección del nervio infraorbitario (Figura 10). Estos resultados indican de manera directa que IGF-I promueve la supervivencia neuronal en la vía somatosensorial *in vivo*.

IGF-I y la relación Cuerpo-Cerebro.

Influencias originadas en la periferia sensorial se han implicado en la determinación de distintos aspectos de la estructura y la función de S1 (Van der Loos y Dorfl, 1978; Welker y Van der Loos, 1986 a, b; Dawson y Killackey 1985; Killackey et al., 1994; White et al., 1994; Killackey et al., 1995). El tamaño de los barriles, así como el número de células que los constituyen parecen ser proporcionales a la densidad de la inervación de los órganos sensoriales periféricos (e.g., los bigotes) (Lee y Woolsey, 1975; Welker y Van der Loos, 1986a), la cual a su vez parece depender del tamaño relativo de los órganos sensoriales (Welker y Van der Loos, 1986a). Nosotros investigamos si los cambios estructurales observados en el PMBSF y sus barriles en los ratones transgénicos ocurrían en respuesta a cambios en el tamaño o inervación de las vibrisas faciales. No observamos diferencias en el tamaño de los folículos de las vibrisas, ni en la inervación de ellos al ser comparados los animales control con los ratones transgénicos.

Estas observaciones indican que los cambios estructurales en los cerebros de nuestros ratones transgénicos ocurren independientes de cambios en la periferia sensorial, a través de cambios en las interacciones tróficas locales. Es decir, nuestros resultados muestran que cambios importantes en la talla cerebral y en las proporciones relativas de sus áreas pueden ocurrir de manera

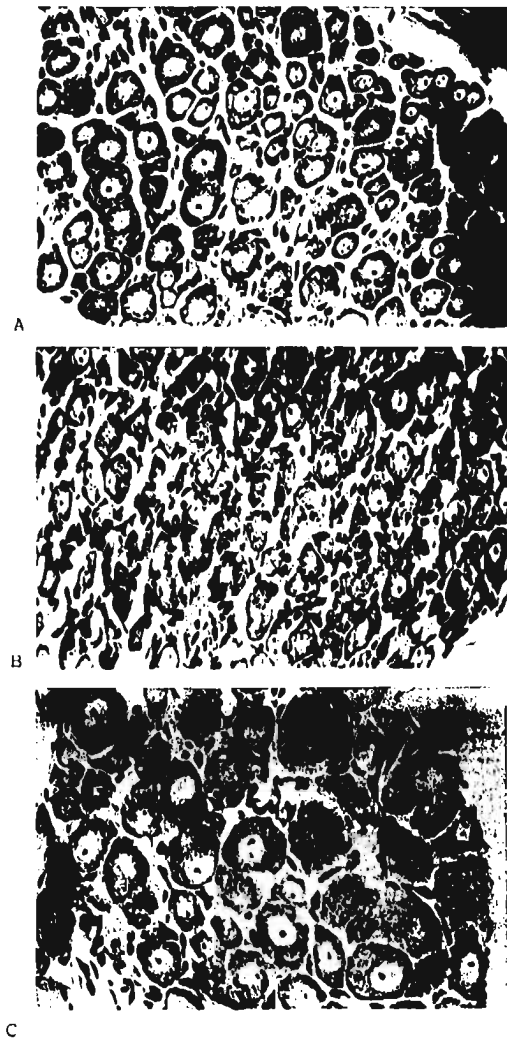


Figura 10. Fotomicrografías que muestran los resultados preliminares de los efectos de IGF-I sobre las neuronas de ganglio del nervio trigémino después de haber sido transectado (Aumento 200X) (A) Apariencia de las neuronas en un ganglio intacto (B) Neuronas en degeneración después de la transección del nervio infraorbitario. (C) Respuesta de las neuronas ganglionares a la aplicación local de IGF-I disuelto en gelfoam, y colocado en el extremo distal del nervio seccionado.

independiente de las dimensiones corporales y de la densidad de la inervación periférica, modificando la disponibilidad de factores neurotróficos como el IGF-I.

Esta conclusión se refuerza por observaciones recientes hechas en ratones mutantes (Welker et al. 1996) y transgénicos cuyo gene para la enzima monoamino oxidasa ha sido inactivado por recombinación homóloga (Cases et al., 1996). En ambos casos los ratones carecen de barriles corticales no obstante que la periferia sensorial está intacta. Además, la desproporción entre la densidad de inervación periférica y el tamaño de los barriles ha sido reportada después de la destrucción selectiva de bigotes en ratones (Welker y Van der Loos, 1986b), en cepas de ratones con bigotes supernumerarios (Welker y Van der Loos, 1986a), y en cuyos tratados con anticuerpos anti-NGF *in utero* (Sikich et al., 1986). También se ha documentado que el establecimiento de la topografía tálamo-cortical puede ocurrir sin la intervención de la periferia (Kaiserman-Abramof, 1980; Dawson y Killackey, 1985; Agmon et al., 1995), y que la eliminación permanente de los bigotes no interfiere con el crecimiento postnatal de los barriles (Woolsey y Wann, 1976; Gutiérrez-Ospina et al., en preparación). Nuevamente, estas observaciones apuntan a que la formación y crecimiento de los barriles puede suceder de manera independiente de la periferia sensorial, posiblemente a través de interacciones tróficas subcorticales-corticales

Ahora bien, que el tamaño del cerebro y las proporciones relativas de sus partes no reflejan simplemente el tamaño y la densidad de inervación del cuerpo y de sus distintos segmentos es apoyado por una serie de observaciones:

- 1) Existen mamíferos con una talla corporal semejante cuyos cerebros varían dramáticamente en su tamaño (Fox y Wilczynski, 1986; Kaas, 1987; Northcutt y Kaas, 1995).
- 2) En varios mamíferos, incluyendo el hombre, la talla cerebral adulta se alcanza mucho tiempo antes que la talla corporal (Jolicoeur et al., 1988; Jolicoeur y Pirlot, 1988; Cabana et al., 1990).
- 3) Los incrementos progresivos en el peso y superficie corporal no modifican el número de neuronas sensoriales ni la densidad de inervación periférica en la rata

(Pover et al., 1994). Así mismo, no se han encontrado variaciones sistemáticas de la superficie corporal y su densidad de inervación en diversos mamíferos (Fox y Wilczynski, 1986).

4) En algunas especies de mamíferos, como el hurón y la marta, se han encontrado reducciones del tamaño cerebral sin modificaciones equivalentes de las dimensiones corporales en animales juveniles (Kruska, 1993).

Eliminación versus elaboración de conexiones en S1.

Con base en observaciones hechas en el sistema visual de carnívoros y monos se ha propuesto que la eliminación de conexiones redundantes, a través de mecanismos competitivos mediados por interacciones tróficas, juega un papel central en el establecimiento de los circuitos neuronales durante el desarrollo cerebral (Cowen et al., 1984; Cabelli et al., 1995). Agmon et al. (1993, 1995) han demostrado recientemente, sin embargo, que las aferentes talámicas alcanzan S1 con alta precisión topológica, y que los circuitos en los barriles son elaborados progresivamente conforme el desarrollo postnatal transcurre, en oposición a ser eliminados o refinados a partir de un repertorio de conexiones inicialmente redundante (ver también Killackey y Belford, 1979; Catalano et al., 1995). Por otro lado, Riddle et al. (1992) documentaron que el neuropilo en los barriles de S1 se elabora de modo progresivo y selectivo conforme el desarrollo postnatal avanza. Así, esta evidencia en conjunto sugiere que procesos progresivos y no regresivos participan en el establecimiento de la circuitería neuronal en S1.

Nuestras observaciones de que los barriles permanecen como unidades anatómicas discretas no obstante los cambios significativos en su tamaño, y que el volumen ocupado por neuropilo está modificado en los ratones transgénicos IGF-I e IGFBP-1, sugieren que la elaboración selectiva de neuropilo en los barriles pudiera estar regulada y ser promovida por IGF-I. Esta conclusión se apoya en los datos obtenidos en los ratones IGF-I/IGFBP-1 en los que el PMBSF y sus barriles alcanzaron una talla intermedia comparada con la observada en las líneas nativas de los progenitores, debido presumiblemente al bloqueo de los efectos del transgene de IGF-I por la IGFBP-1.

Finalmente, nuestras observaciones contrastan con hallazgos recientes hechos en la corteza visual de gatos en los que un exceso de NT4 y BDNF, pero no de NGF, interrumpe la formación de columnas de dominancia ocular (Cabelli et al., 1995). En nuestro caso, el exceso o la disminución en la disponibilidad de IGF-I no condujo alteraciones de la formación de los barriles. Estas observaciones sugieren que las reglas que gobiernan el establecimiento de conexiones tálamo-corticales son diferentes para distintas regiones corticales en distintas especies animales. Mientras que en el sistema visual de gatos y monos las conexiones son eliminadas a partir de circuitos neuronales redundantes a través de un proceso de competencia entre las neuronas por factores tróficos disponibles en cantidades restringidas, en S1 de los roedores los circuitos parecen elaborarse selectiva y progresivamente dependiendo de la disponibilidad de factores neurotróficos, como el IGF-I. Así, en este último escenario, la necesidad de invocar interacciones competitivas es innecesaria.

En relación a esto último, cabe destacar la sugerencia de que la formación de barreletas en el núcleo del trigémino depende de la eliminación de conexiones a través de interacciones competitivas (Chiaia et al., 1992). Esta observación, junto con las obtenidas en el presente trabajo, implican por lo tanto que distintas estrategias de desarrollo también pudieran ser utilizadas en diferentes relevos de la misma vía sensorial.

Ahora bien, que IGF-I está involucrado en la elaboración selectiva de neuropilo no es sorprendente pues en el sistema nervioso periférico se ha observado que los procesos de crecimiento de terminales nerviosas *in vivo* se modulan por IGFs durante el desarrollo normal, y durante el proceso de regeneración nerviosa después de una lesión (Caroni, 1993; Ishii, 1993). Además, en el sistema nervioso central la expresión de IGF-I a lo largo de las vías sensoriales coincide con el periodo de sinaptogénesis (Bondy, 1991), y se ha reportado la presencia de receptores para IGF-I en los conos de crecimiento axónico (Aigner y Caroni, 1995; Quiroga et al., 1995).

Modificaciones en la disponibilidad de IGF-I: implicaciones para la evolución del cerebro.

El incremento progresivo de la talla del cerebro, la adición de nuevas áreas citoarquitectónicas, la distribución heterogénea del espacio cortical, y el incremento en volumen cerebral ocupado por neuropilo son, entre otros, algunos de los elementos estructurales que caracterizan la evolución del cerebro de los mamíferos (Kaas, 1987; Northcutt y Kaas, 1995; Rakic, 1995a, b; Krubitzer, 1995).

Aunque algunos experimentos hechos en la corteza visual del mono han sugerido un mecanismo por el que nuevas áreas pudieran haber emergido en el curso de la evolución (Rakic, 1990, 1995a; Rakic et al., 1991), los mecanismos celulares que subyacen al incremento en el tamaño cerebral y a la distribución diferencial del espacio cortical aún son poco claros.

Se ha propuesto que el tamaño del cerebro y la dimensión de las áreas corticales pudieran cambiar al modificar la velocidad y el tiempo de proliferación de los precursores neuronales y gliales en la pared ventricular durante los periodos de generación celular (Rakic, 1988, 1995a, b; Caviness et al., 1995; Finlay y Darlington, 1995). Nuestros datos, y evidencia previa obtenida en los ratones transgénicos IGF-I e IGFBP-I y en ratones hipotiroideos sugieren, sin embargo, que las variaciones regionales en la disponibilidad de factores neurotróficos, como el IGF-I, modifican tanto el tamaño del cerebro, como las dimensiones relativas de la corteza y sus áreas de manera independiente, posiblemente alterando la supervivencia neuronal y la elaboración de neuropilo.

Así, las diferencias regionales en la producción y disponibilidad de factores neurotróficos del tipo de IGF-I podrían haber sido una fuerza importante en la formación de la estructura del cerebro durante la evolución. Sin embargo, es necesario hacer estudios comparativos sobre la producción de factores neurotróficos en distintas regiones cerebrales y en diferentes especies para evaluar esta posibilidad.

1995

Conclusiones

En conclusión, nuestras observaciones apoyan que el IGF-I es un factor neurotrófico que modula el crecimiento del cerebro promoviendo la supervivencia y el crecimiento neuronales y la elaboración diferencial de neuropilo. Además, nuestros resultados sugieren que los circuitos neuronales se ensamblan siguiendo al menos dos estrategias de desarrollo diferentes. Una de ellas, involucra la eliminación de conexiones a través de un mecanismo competitivo dependiente de factores neurotróficos producidos en cantidades limitadas. La segunda estrategia, apoyada por nuestro trabajo, involucra la elaboración y el crecimiento selectivo de conexiones dependiendo de la cantidad de factores neurotróficos disponibles y en ausencia de interacciones competitivas.

Referencias

- Aigner L, Caroni P (1995) Absence of persistent spreading, branching, and adhesion in GAP-43-depleted growth cones. *J Cell Biol* 128: 647-660.
- Agmon A, Yang LT, Jones EG, O'Dowd DT (1995) Topological precision in the thalamic projection to neonatal mouse barrel cortex. *J Neurosci* 15: 549-561.
- Agmon A, Yang LT, O'Dowd DT, Jones EG (1993) Organized growth of thalamocortical axons from the deep tier of terminations into layer IV of developing mouse barrel cortex. *J Neurosci* 13: 5365-5382.
- Aizeman Y, de Vellis J (1987) Brain neurons develop in a serum and glial free environment: effects of transferrin, insulin, insulin-like growth factor-I and thyroid hormones on neuronal survival, growth and differentiation. *Brain Res* 406: 32-42.
- Bartlett WP, Li X-Su, Williams M (1992) Expression of IGF-I mRNA in the murine subventricular zone during postnatal development. *Mol Brain Res* 12: 285-291.
- Bartlett WP, Li X-Su, Williams M, Benkovic S (1991) Localization of insulin-like growth factor-I mRNA in murine central nervous system during postnatal development. *Dev Biol* 147: 239-250.
- Beck KD, Powell-Braxton L, Widmer H-R, Valverde J, Hefti F (1995) Igf1 disruption results in reduced brain size, CNS hypomyelination, and loss of hippocampal and striatal-containing neurons. *Neuron* 14: 717-730.
- Behringer RR, Lewin TM, Quaife CJ, Palmiter RD, Brinster RL, D'Ercole AJ (1990) Expression of insulin-like growth factor I stimulates normal somatic growth in growth hormone-deficient transgenic mice. *Endocrinology* 127: 1033-1040.
- Bondy C (1991) Transient IGF-I expression during the maturation of functionally related central projection neurons. *J Neurosci* 11: 3442-3455.
- Bondy C, Lee W-H (1993) Correlation between insulin-like growth factor (IGF)-binding proteins and IGF-I gene expression during brain development. *J Neurosci* 13: 5092-5104.
- Cabana T, Jolicœur P, Baron G (1990) Brain and body growth and allometry in the mongolian gerbil (*Meriones unguiculatus*). *Growth Dev Aging* 54: 23-30.
- Cabelli RJ, Hohm A, Shatz JC (1995) Inhibition of ocular dominance column formation by infusion of NT-4/5 or BDNF. *Science* 267: 1662-1666.
- Calissano P, Ciotti MT, Battistini L, Zone C, Angelini A, Merlo D, Mercanti D (1993) Recombinant human insulin-like growth factor I exerts a trophic action and confers glutamate

sensitivity and glutamate-resistance to cerebellar granule cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 90: 8752-8756.

Caroni P (1993) Activity-sensitive signaling by muscle-derived insulin-like growth factors in the developing and regenerating neuromuscular system. *Ann NY Acad Sci* 692: 209-222.

Caroni P, Becker M (1992) The downregulation of growth-associated proteins in motor neurons at the onset of synapse elimination is controlled by muscle activity and IGF-I. *J Neurosci* 12: 3849-3861.

Caroni P, Grandes P (1990) Nerve sprouting in innervated adult skeletal muscle induced by exposure to elevated levels of insulin-like growth factors. *J Cell Biol* 110: 1307-1317.

Caroni P, Schneider C, Kiefer M, Zapf J (1994) Role of muscle insulin-like growth factors in neuron sprouting. Suppression of terminal sprouting in paralyzed muscle by IGF-binding protein 4. *J Cell Biol* 125: 893-902.

Caroni P, Schneider C (1994) Signaling by insulin-like growth factors in paralyzed skeletal muscle: rapid induction of IGF-I expression in muscle fibers and prevention of interstitial cell proliferation by IGFBP-5 and IGFBP-4. *J Neurosci* 14: 3378-3388.

Carson MJ, Behringer RR, Brinster RL, McMorris FA (1993) Insulin-like growth factor I increases brain growth and central nervous system myelination in transgenic mice. *Neuron* 10: 729-740.

Cases O, Vitalis T, Seif I, De Maeyer E, Sotelo C, Gaspar P (1996) Lack of barrels in the somatosensory cortex of monoamine oxidase A-deficient mice: Role of a serotonin excess during the critical period. *Neuron* 16: 297-307.

Castrén E, Zafra F, Thoenen H, Lindholm D (1992) Light regulates expression of brain-derived neurotrophic factor mRNA in rat visual cortex. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 9444-9448.

Catalano SM, Robertson RT, Killackey HP (1991) Early ingrowth of thalamocortical afferents to the neocortex of the prenatal rat. *Proc Natl Acad Sci USA* 88: 2999-3003.

Catalano SM, Robertson RT, Killackey HP (1995) Rapid alteration of thalamocortical axon morphology follows peripheral damage in the neonatal rat. *Proc Natl Acad Sci USA* 92: 2549-2552.

Caviness VS, Talahashi, JrT, Nowakowski RS (1995) Numbers, time and neocortical neurogenesis: a general developmental and evolutionary model. *TINS* 18: 378-382.

Chisra NL, Bennett-Clarke CA, Eck M, White FA, Crisaman RS, Rhoades RW (1992) Evidence for prenatal competition among the central arbors of trigeminal primary afferent neurons. *J Neurosci* 12: 62-76.

- Cowan WM, Fawcett JW, O'Leary DDM, Stanfield BB (1984) Regressive events in neurogenesis. *Science* 225: 1258-1265.
- Curcio CA, Coleman PD (1982) Stability of neuron number in cortical barrels of aging mice. *J Comp Neurol* 212: 158-172.
- Daughaday WH, Rotwein P (1989) Insulin-like growth factors I and II. Peptide, messenger ribonucleic acid and gene structures, serum, and tissue concentrations. *Endocr Rev* 10: 68-91.
- Dawson R, Killackey HP (1985) Distinguishing topography and somatotopy in the thalamocortical projections of the developing rat. *Dev Brain Res* 17: 309-313.
- Dehay C, Horsburgh G, Berland M, Killackey H, Kennedy H (1991) The effects of bilateral enucleation in the primate fetus on the parcellation of visual cortex. *Dev Brain Res* 62: 137-141.
- Dehay C, Giroud P, Berland M, Smart I, Kennedy H (1993) Modulation of the cell cycle contributes to the parcellation of the primate visual cortex. *Nature* 366: 464-466.
- D'Mello SR, Galli C, Citotti T, Calissano P (1993) Induction of apoptosis in cerebellar granule neurons by low potassium: Inhibition of death by insulin-like growth factor I and cAMP. *Proc Natl Acad Sci USA* 90: 10989-10993.
- De la Rosa EJ, Bondy CA, Hernandez-Sanchez C, Wu X Zhou J, Lopez-Carranza A, Scavo LM, de Pablo F (1994) Insulin and insulin-like growth factor system components gene expression in the chicken retina from neurogenesis until late development and their effect on neuroepithelial cells. *Eur J Neurosci* 6: 1801-1810.
- D'Ercole AJ, Day Z, Xing Y, Boney C, Wilkie MB, Lauder JM, Han VKM, Clemmons DR (1994) Brain growth retardation due to expression of human insulin-like growth factor binding protein-1 in transgenic mice: an in vivo model for the analysis of IGF-I function in the brain. *Dev Brain Res* 82: 213-222.
- D'Ercole AJ, Ping Y, Gutiérrez-Ospina G (1996a) Use of transgenic mice for understanding the physiology of insulin-like growth factors (IGFs). *Horm Res (Supl. 1)*: 5-7.
- D'Ercole AJ, Ye P, Calikoglu AS, Gutiérrez-Ospina G (1996b) The role of the Insulin-like growth factors in the central nervous system. *Molecular Neurobiology (en prensa)*.
- De Pablo F, de la Rosa E J (1995) The developing CNS: a scenario for the actions of pro-insulin, insulin, and insulin-like growth factors. *TINS* 18: 143-150.
- DiCicco-Bloom E, Black IB (1989) Insulin growth factors regulate the mitotic cycle in cultured rat sympathetic neuroblasts. *Brain Res* 491: 403-406.

Drago J, Murphy M, Carroll SM, Harney JJ, Hannon DJ
mediated proliferation of central nervous system progenitor cells
of insulin-like growth factor I. *Proc Natl Acad Sci USA* 94:11111-11116 (1997)

Fisher BL, Slattery M (1995) Local administration of insulin-like growth factor I
predicts adult renal specialization. *Science* 268:1111-1113

Fisher BL, Slattery M (1997) Insulin-like growth factor I and renal development
in the rat. *Development* 123:1111-1113

Fisher BL, Slattery M (1998) Systemic administration of insulin-like growth factor I
induces a transient increase in renal progenitor cell number and renal growth
in the rat. *Development* 125:1111-1113

Fisher BL, Slattery M (1999) Systemic administration of insulin-like growth factor I
induces a transient increase in renal progenitor cell number and renal growth
in the rat. *Development* 127:1111-1113

Fisher BL, Slattery M (2000) Systemic administration of insulin-like growth factor I
induces a transient increase in renal progenitor cell number and renal growth
in the rat. *Development* 128:1111-1113

Fisher BL, Slattery M (2001) Systemic administration of insulin-like growth factor I
induces a transient increase in renal progenitor cell number and renal growth
in the rat. *Development* 129:1111-1113

Fisher BL, Slattery M (2002) Systemic administration of insulin-like growth factor I
induces a transient increase in renal progenitor cell number and renal growth
in the rat. *Development* 130:1111-1113

Fisher BL, Slattery M (2003) Systemic administration of insulin-like growth factor I
induces a transient increase in renal progenitor cell number and renal growth
in the rat. *Development* 131:1111-1113

Fisher BL, Slattery M (2004) Systemic administration of insulin-like growth factor I
induces a transient increase in renal progenitor cell number and renal growth
in the rat. *Development* 132:1111-1113

Fisher BL, Slattery M (2005) Systemic administration of insulin-like growth factor I
induces a transient increase in renal progenitor cell number and renal growth
in the rat. *Development* 133:1111-1113

Fisher BL, Slattery M (2006) Systemic administration of insulin-like growth factor I
induces a transient increase in renal progenitor cell number and renal growth
in the rat. *Development* 134:1111-1113

Fisher BL, Slattery M (2007) Systemic administration of insulin-like growth factor I
induces a transient increase in renal progenitor cell number and renal growth
in the rat. *Development* 135:1111-1113

Fisher BL, Slattery M (2008) Systemic administration of insulin-like growth factor I
induces a transient increase in renal progenitor cell number and renal growth
in the rat. *Development* 136:1111-1113

- Drago J, Murphy M, Carrol SM, Harvey RP, Bartlett PF (1991) Fibroblast growth factor-mediated proliferation of central nervous system precursors depends on endogenous production of insulin-like growth factor I. *Proc Natl Acad Sci USA* 88: 2199-2203.
- Finlay BL, Slattery M (1983) Local differences in the amount of early cell death in the neocortex predict adult local specializations. *Science* 219: 1349-1351.
- Finlay BL, Darlington RB (1995) Linked regularities in the development and evolution of mammalian brains. *Science* 268: 1578-1584.
- Fischer WK, Rose SP (1994) Dynamic development of coordination of components in brain and behavior. A framework for theory and research. pp3-66. En: *Human behavior and the developing brain*. (Dawson G y Fischer KW Eds). Guilford Press: New York.
- Fox JH, Wilczynski W (1986) Allometry of major CNS divisions: towards a reevaluation of somatic brain-body scaling. *Brain Behav Evol* 28: 157-169.
- Giacobini MM, Olson L, Hoffer BJ, Sara VR (1990) Truncated IGF-I exerts trophic effects on fetal brain tissue grafts. *Exp Neurol* 108: 33-37.
- Giacobini MMJ, Zetterstrom RH, Young D, Hoffer B, Sara VR, Olson L (1995) IGF-I influences olfactory bulb maturation: evidence from an anti-IGF-I antibody treatment of developing grafts in oculo. *Dev Brain Res* 84: 62-66.
- Gutiérrez-Ospina G (1996) The morphology and functions of the brain. *Voices of México* 36: 41-47.
- Heuman D, Leuba G (1983) Neuronal death in the development and aging of the cerebral cortex of the mouse. *Neuropath. appl Neurobiol* 9: 297-311.
- Hicks SP, D'Amato CJ (1968) Cell migrations to the isocortex in the rat. *Anat Rec* 160: 619-634.
- Ishii DN (1993) Neurobiology of insulin and insulin-like growth factors. En: *Neurotrophic Factors*. (Loughlin SE, Fallon JH eds) pp 415-441. New York: Academic Press
- Ishii DN, Glazner GW, Pu S-F (1994) Role of insulin-like growth factors in peripheral nerve regeneration. *Pharmac Ther* 62: 125-144.
- Ishii DN, Lupien SB (1995) Insulin-like growth factors protect against diabetic neuropathy: Effects on sensory nerve regeneration in rats. *J Neurosci Res* 40: 138-144.
- Jacobson M (1991) *Developmental Neurobiology*. Plenum Press: New York.
- Jerison, HJ (1973) *Evolution of the brain and intelligence*. Academic Press: New York.

- Jones JI, Clemmons DR (1995) Insulin-like growth factors and their binding proteins: biological actions. *Endocr Rev* 16: 3-34.
- Jolicoeur P, Pirlot P (1988) Asymptotic growth and complex allometry of the brain and body in the white rat. *Growth Dev. Aging* 52: 3-10.
- Jolicoeur P, Baron G, Cabana T (1988) Cross-sectional growth and decline of human stature and brain weight in 19th century Germany. *Growth Dev Aging* 52: 201-206.
- Kaas JH (1987) The organization and evolution of the neocortex. En: Higher brain functions (Wise SP, ed) pp 347-78. New York : John Wiley and Sons.
- Kaiserman-Abramof IR, Graybiel AM, Nauta WJH (1980) The thalamic projection to area 17 in a congenitally anophthalmic mouse strain. *Neuroscience* 5: 41-52.
- Kennedy H, Dehay C (1993) Cortical specification of mice and men. *Cereb Cortex* 3: 171-186.
- Killackey HP, Belford GR (1979) The formation of afferent patterns in the somatosensory cortex of the neonatal rat. *J Comp Neurol* 183: 285-304.
- Killackey HP, Jacquin MF, Rhoades RW (1990) Development of somatosensory system structures. En: Development of sensory systems in mammals. pp 404-422. (Coleman, JR Ed). John Wiley & Sons: New York.
- Killackey HP, Chiaia NL, Bennet-Clarke CA, Eck M, Rhoades WR (1994) Peripheral influences on the size and organization of somatotopic representations in the fetal rat cortex. *J Neurosci* 14: 1496-1506.
- Killackey HP, Rhoades RW, Bennett-Clarke CA (1995) The formation of a cortical somatotopic map. *TINS* 18: 402-406.
- Krubitzer L (1995) The organization of neocortex in mammals: are species differences really so different?. *TINS* 18: 408-417.
- Kruska D (1993) Evidence of decrease in brain size in ranch mink *Mustela Vison f dom* during postnatal ontogenesis. *Brain Behav Evol* 41: 303-315.
- Lee KL, Woolsey TA (1975) A proportional relationship between peripheral innervation density and cortical neuron number in the somatosensory system of the mouse. *Brain Res* 99: 349-353.
- Lee W-H, Javedan S, Bondy C (1992) Coordinate expression of insulin-like growth factor system components by neurons and neuroglia during retinal and cerebellar development. *J Neurosci* 12: 4737-4744
- Loughlin SE, Fallon JH (1993) Neurotrophic Factors Academic Press: San Diego

- Mathews LS, Hammer RE, Berhinger RR, D'Ercole AJ, Bell GI, Brinster RL, Palmiter RD (1990) Growth enhancement of transgenic mice expressing human insulin-like growth factor I. *Endocrinology* 123: 2827-2833.
- Northcutt RG, Kaas, JH (1995) The emergence and evolution of the mammalian neocortex. *TINS* 18: 373-378.
- O'Leary DDM (1989) Do cortical areas emerge from a protocortex?. *TINS* 12: 400-406.
- Pasternak JF, Woolsey TA (1975) The number, size and spatial distribution of neurons in lamina IV of the mouse SmI neocortex. *J Comp Neurol* 160: 291-306.
- Pearlman AL (1985) The visual cortex of the normal mouse and reeler mutant. En: *Cerebral Cortex*. Vol.3 (Peters A and Jones EG eds) pp1-18. New York: Plenum Press.
- Pimentel E (1994) Insulin-like Growth Factors. En: *Growth Factors*. Vol II: Peptide Growth Factors. (Pimentel E eds) pp55-95. Florida: CRC.
- Pover CM, Barnes MC, Coggeshall RE (1994) Do primary afferent cell number change in relation to increasing weight and surface area in adult rats?. *Somatosensory Motor Res.* 11: 163-167.
- Purves D (1994) *Neural activity and the growth of the brain*. Cambridge University Press: Cambridge.
- Purves D (1988) *Body and brain*. Harvard University Press: Cambridge
- Purves D, Lichtman JW (1985) *Principles of neural development*. Sinauer: Sunderland.
- Purves D, White LE, Andrews TJ (1994) Manual asymmetry and handedness. *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 5030-5032.
- Purves D, Riddle DR, White LE, Gutiérrez-Ospina G (1994) Neural Activity and the development of the somatic sensory system. *Curr. Opinion Neurobiol.* 4: 120-123.
- Quiroga S, Garofalo RS, Pfenninger KH (1995) Insulin-like growth factor I receptors of fetal brain are enriched in nerve growth cones and contain a β -subunit variant. *Proc Natl Acad Sci USA* 92: 4309-4312.
- Rakic P (1988) Specification of cerebral cortical areas. *Science* 241: 170-176.
- Rakic P (1990) Experimental manipulation of cerebral cortical areas. *Phil Trans R Soc Lond B* 331: 291-294.

- Rakic P (1995a) Evolution of neocortical parcellation: the perspective from experimental neuroembryology. En: *Origins of the human brain* (Changeux J-P and Chavallon J, eds) pp 84-100 Oxford: Clarendon Press.
- Rakic P (1995b) A small step for the cell, a giant leap for mankind: a hypothesis of neocortical expansion during evolution. *TINS* 18: 383-388.
- Rakic P, Suner I, Williams RW (1991) A novel cytoarchitectonic area induced experimentally within the primate visual cortex. *Proc Natl Acad Sci USA* 88: 2083-2087.
- Recio-Pinto E, Rechler MM, Ishii DN (1986) Effects of insulin, insulin-like growth factor II, and nerve growth factor on neurite formation and survival in cultured sympathetic and sensory neurons. *J Neurosci* 6: 1211-1219.
- Riddle D, Richards A, Zsuppan F, Purves D (1992) Growth of the somatic sensory cortex and its constituent parts during postnatal development. *J Neurosci* 12: 3509-3524.
- Riddle DR, Gutierrez-Ospina G, Zheng D, White LE, Richards A, Purves D (1993) Differential metabolic and electrical activity in the somatic sensory cortex of juvenile and adult rats. *J Neurosci* 13: 4193-4213.
- Rhoades RW, Killackey HP, Chiaia NL, Jacquin MF (1990) Physiological development and plasticity of somatosensory neurons. En: *Development of sensory systems in mammals*. pp 431-454. (Coleman, JR Ed). John Wiley & Sons: New York.
- Rotwein P, Burgess SK, Milbrandt JD, Krause JE (1988) Differential expression of insulin-like growth factor genes in rat central nervous system. *Proc Natl Acad Sci USA* 85: 265-269.
- Shuz A, Palm G (1989) Density of neurons and synapses in the cerebral cortex of the mouse. *J Comp Neuro* 1286: 442-455.
- Sikich L, Woolsey TA, Johnson M (1986) Effect of a uniform partial denervation of the periphery on the peripheral and central vibrissal system in guinea pigs. *J Neurosci* 6: 1227-1240.
- Tower DB (1954) Structural and functional organization of the mammalian cerebral cortex: the correlation of neuron density with brain size. *J Comp Neurol* 101: 19-53.
- Uylings HBM, Van Eden CG, Parnavelas JG, Kalsbeek A (1990) The prenatal and postnatal development of the rat cortex. pp35-76. En: *The cerebral cortex of the rat* (Kolb B y Tees RC Eds) MIT Press: Cambridge.
- Van der Loos H, Dorfl J (1978) Does the skin tell the somatosensory cortex how to construct a map of the periphery?. *Neurosci Lett* 7: 23-30.

Vongdokmai R (1980) Effects of protein malnutrition on development of mouse cortical barrels. *J Comp Neurol* 191: 283-294.

Welker E, Armstrong-James M, Bronchti G, Ourednik W, Gheorghita-Baechler, Dubois R, Guernsey DL, Van der Loos H, Neumann PE (1996) Altered sensory processing in the somatosensory cortex of the mouse mutant barrelless. *Science* 271: 1864-1867.

Welker E, Van der Loos H (1986a) Quantitative correlation between barrel-field size and the sensory innervation of the whiskerpad: A comparative study in six strains of mice bred for different patterns of mystacial vibrissae. *J Neurosci* 6: 3355- 3373.

Welker E, Van der Loos H (1986b) Is areal extent in sensory cerebral cortex determined by peripheral innervation density? *Exp Brain Res* 63: 650-654.

White LE, Lucas G, Richards A, Purves D (1994) Cerebral asymmetry and handedness. *Nature* 368: 197-198.

Windrem MS, Finlay BL (1991) Thalamic ablations and neocortical development: alterations of cortical cytoarchitecture and cell number. *Cereb Cortex* 1: 230-240.

Woolsey TA, Van der Loos H (1970) The structural organization of layer IV in the somatosensory region (SI) of mouse cerebral cortex. *Brain Res* 17: 205-242.

Woolsey TA, Wann JR (1976) Areal changes in mouse cortical barrels following vibrissal damage at different postnatal ages. *J Comp Neurol* 170: 53-66.

Woolsey TA (1990) Peripheral alterations and somatosensory development. En: *Development of sensory systems in mammals*. pp 461-503. (Coleman, JR Ed). John Wiley & Sons: New York.

Zackenfels K, Oppenheim RW, Roher H (1995) Evidence for an important role of IGF-I and IGF-II for the early development of chick sympathetic neurons. *Neuron* 14: 731-741.

Ye P, Carson J, D'Ercole A J (1995) In vivo actions of insulin-like growth factor I (IGF-I) on brain myelination: Studies of IGF-I and IGF binding protein-1 (IGFBP-1) transgenic mice. *J Neurosci* 15: 7344-7356.

In Vivo Effects of Insulin-Like Growth Factor-I on the Development of Sensory Pathways: Analysis of the Primary Somatic Sensory Cortex (S1) of Transgenic Mice*

GABRIEL GUTIERREZ-OSPINA†, ALI SUHA CALIKOGLU, PING YE, AND A. JOSEPH D'ERCOLE

Department of Pediatrics, Division of Endocrinology, University of North Carolina, Chapel Hill, North Carolina 27599-7220

ABSTRACT

In the rodent brain, insulin-like growth factor I (IGF-I) messenger RNA is transiently expressed in sensory projection neurons during periods of synaptogenesis and neuronal growth. Transgenic (Tg) mice with brain IGF-I overexpression and ectopic brain expression of IGF-binding protein-1 (IGFBP-1), an inhibitor of IGF-I actions, show changes in brain size and myelination. We used these mouse models to evaluate *in vivo* IGF-I effects on sensory pathway development by conducting anatomical studies in the S1 barrel field. Brain size, cortical area, and barrel field dimensions were increased in IGF-I and reduced in IGFBP-1 Tg mice compared with those in wild-type (wt) mice. The brain and cerebral cortex of Tg mice with the highest transgene expression were the most altered in size. Cortex and barrel field size changes were not precisely proportional, because in some Tg mice barrels were relatively more affected than the cortex, whereas

in others the opposite was observed. Brain IGF-I overexpression increased the average number of neurons per barrel, neuronal cell body cross-sectional area, and barrel neuropil volume, whereas brain expression of IGFBP-1 reduced each. Neuronal density was greatly reduced in IGF-I Tg mice and increased in IGFBP-1 Tg mice. No differences in body weight, whisker pad and follicle areas, and whisker pad innervation density were found among Tg and wt mice. These observations indicate that IGF-I enhances neuronal growth in developing sensory pathways and support the concept that modified availability of local trophic factors, such as IGF-I, changes brain, neocortical, and S1 relative dimensions by altering neuronal survival and neuronal elaboration. Study of the S1 cortex provides an excellent model to probe the *in vivo* mechanisms of IGF actions. (*Endocrinology* 137: 5444–5452, 1995)

INCREASING evidence suggests that insulin-like growth factor I (IGF-I) plays an important role in central nervous system development (1). For example, *in situ* hybridization studies have detected IGF-I messenger RNA (mRNA) in the subventricular zone, hippocampus, retina, and cerebellum at developmental times when glial and neuronal precursors undergo cell division (2–6). Transient IGF-I mRNA expression occurs in the developing retina, hippocampus, cerebellum, cerebral cortex, and several sensory thalamic and brain stem nuclei during periods of neuronal growth and synaptogenesis (2, 4). In the olfactory bulb and hypothalamus, structures that remain plastic into adulthood, IGF-I mRNA expression persists throughout life (2, 4). Furthermore, recent studies in transgenic (Tg) mice show that IGF-I regulates brain growth. Tg mice overexpressing IGF-I have increased brain weight and size compared with their wild type (wt) littermates (7–11). Conversely, mice carrying IGF-I genes disrupted by homologous recombination (12), and those with brain ectopic expression of IGF-binding protein-1 (IGFBP-1) (10, 11, 13), an inhibitor of IGF-I actions, have

smaller brains than their wt counterparts. Changes in brain size in these Tg mouse lines are due in part to the effects of IGF-I on oligodendrocyte survival and function (9–12), but there is also evidence of alterations in neuron number (7, 12, 13).

The transient early postnatal expression of IGF-I in sensory projection neurons suggests that IGF-I may be especially important to neuronal growth and synaptogenesis in developing sensory systems (2). To directly evaluate the *in vivo* effects of IGF-I on sensory system development, we used IGF-I and IGFBP-1 Tg mice as models to determine whether altered IGF-I availability influences the growth of neurons and their circuits in the somatic sensory cortex (S1). Specifically, we focused our analysis on the posterior medial barrel subfield (PMBSF) (14), a region in cerebral cortex layer IV that is a portion of the trigeminal thalamo-cortical pathway (TThC). In rodents, the TThC is responsible for transmitting tactile information from facial whiskers to the cerebral cortex. Each of the 34 PMBSF barrels is the representation of a single whisker in the facial whisker pad. These 3-dimensional barrel structures are composed of a cell dense wall surrounding a hollow that is predominately composed of neural connections among axon terminal fields from the ventroposteromedial thalamic nucleus neurons and cortical layer IV dendrites. For this reason, barrel dimensions correlate with changes in the number of neurons and the complexity and number of their connections (14, 15).

Received June 6, 1995.
Address all correspondence and requests for reprints to Dr. A. Joseph D'Ercole, Department of Pediatrics, Division of Endocrinology, 1107220, University of North Carolina, Chapel Hill, North Carolina 27599-7220. E-mail: AJD193@aol.com or ajd@med.unc.edu.

* This work was supported by NIH Grant HD40299.
† Fellow of the National Council of Science and Technology, Mexico.

We chose the PMBSF for study because 1) IGF-1 is highly expressed by thalamic and cortical cells of the TThC, with a peak at the time of PMBSF formation (2), a finding that suggests a critical role for IGF-1 in its development; and 2) because of its sharp anatomical definition with classical histological techniques, the PMBSF permits and facilitates quantitative analysis of neuron growth and thus provides a neuro-optimal system to evaluate the effects of IGF-1 on central nervous system neuron growth. We asked whether IGF-1 availability modifies the size, structure, and composition of PMBSF barrels. Our observations indicate that IGF-1 stimulates increases in cortical and PMBSF barrel size and their relative dimensions. In the PMBSF, IGF-1 increases neuron number and the portion of barrel volume occupied by neuropil, probably by enhancing neuron survival and stimulating the growth of thalamic and cortical neuronal connections, respectively. Each of these changes proceeded with no alterations in body and sensory periphery influences.

Materials and Methods

Mice and experimental design

Studies were conducted in adult (~90 days of age) heterozygous IGF-1 (H) and IGF1P-1 (H) Tg mice carrying IGF-1 and IGF1P-1 human transgenes driven by the metallothionein-1 promoter and their wt littermates. All Tg mice studied were from the third to ninth generations and had been maintained by breeding to nontransgenic mice of the C57/B6 strain. Mice were kept in temperature- and light-controlled rooms, fed standard laboratory chow *ad libitum*, and given free access to water containing 25 mM ZnSO₄. IGF-1 and IGF1P-1 transgenic brain expression in these Tg mice has been previously characterized (11, 13), and the effects of their expression on brain size, total brain weight, and myelination have been extensively discussed and documented (7-11, 13). Although both transgenes are widely expressed in the brain, regional variations in weight result from differences in the abundance of IGF-1 and IGF1P-1 mRNA as expressed in different areas as well as differences in transgene expression among mouse lines (11). The expression of these transgenes in the brain begins after birth and peaks between postnatal days 21-30, following the developmental pattern of expression of endogenous methionine-thionein-1 (11, 13).

To rule out effects secondary to insertional mutations, initial studies were carried out in multiple transgenic mouse lines (i.e., 26, 32, 43, 50, and 92 IGF-1 Tg mice, and H and C IGF1P-1 Tg mice). Because the greatest differences in PMBSF and barrel area were found in 26L IGF-1 and BL IGF1P-1 Tg mice (see Table 1), further studies were pursued only in mice of these lines and their wt littermates. Wt littermates of these lines were used as controls for all experiments. In addition, to evaluate whether altered IGF-1 reexpression was directly related to changes in brain morphology, 52L IGF-1 Tg mice were cross-bred with BL IGF1P-1 Tg mice (IGF-1/IGF1P-1 cross Tg mice).

Although barrel-like structures have been described in the thalamus (*i.e.*, barreloids) and brain stem (*i.e.*, barrellets) (16-18), we restricted our analyses to PMBSF cortical barrels because they can be readily identified in mature animals after histochemical and cresyl violet staining. This is not true for barrellets and barreloids, even in optimal sections, whose boundaries tend to blur as postnatal development progresses. Anatomical measurements were performed blindly. All mouse protocols were approved by an institution review committee at the University of North Carolina-Chapel Hill.

Measurements of cortex, PMBSF, and barrel cross-sectional area and barrel volume

To determine the cross-sectional area of the cortex, the PMBSF and its constituent barrels, as well as barrel volume, anesthetized mice were perfused with normal saline followed by 10% glycerol. The brains were removed and weighed, and the cerebral cortex, including the olfactory bulb, was dissected, flattened, and frozen, as described by Riddle *et al.* (19). Tangential sections (30 μ m) throughout the cortex were cut in a cryostat. Sections were dried on the slides at 37°C for 30 min, fixed in 10% formalin, pH 7.6, at 4°C for 1 min, and rinsed in distilled water. They were then stained for the activity of the oxidative enzyme, succinic dehydrogenase (SDH), by reacting them with 0.05 M sodium succinate and 0.55 mM nitro blue tetrazolium in 0.05 M phosphate buffer, pH 7.6. The slides were rinsed again in distilled water and overlapped with Aqua-Mount (Luzon Laboratories, Pittsburgh, PA). Cortical and PMBSF two-dimensional maps were then traced at final magnifications of $\times 3$ and $\times 40$, respectively, using a camera lucida. Completed maps were digitized, and cortical, PMBSF, and barrel cross-sectional areas were measured using the Image-Pro imaging analysis system (Media Cybernetics, Silver Spring, MD), based upon methods described by Riddle *et al.* (19). Total barrel area was determined by adding cross-sectional areas of PMBSF barrels.

To rule out the possibility that altered or compromised oxidative metabolism, *i.e.*, altered SDH activity, accounted for the differences in barrel area between wt and Tg mice, sets of sequential tangential sections of the cortex were cut and stained alternatively with cresyl violet and SDH histochemistry. Barrel boundaries defined by both cresyl violet and SDH staining coincided precisely in both wt and Tg mice (see also Ref. 19 for a similar observation in rats); thus, changes in barrel area revealed by SDH histochemistry in Tg mice demonstrate modifications in barrel dimensions and do not simply reflect changes in metabolism.

The series of SDH-stained cortical tangential sections obtained from 26L IGF-1 and BL IGF1P-1 Tg mice and their wt type littermates also were used to estimate the average PMBSF barrel height (layer IV thickness) and volume. The height of each of the 36 PMBSF barrels was determined in each cerebral cortical hemisphere of 6 animals/group by multiplying the number of sections in which each barrel appeared by the thickness of these sections. Barrel volume was obtained by multiplying the barrel cross-sectional area by the section thickness and then totaling the volumes of each section.

Possible effects of modified IGF-1 availability on other modules of neuronal circuitry were evaluated in the olfactory bulb. The average cross-sectional area of olfactory glomeruli ($n = 1000$ /group) was mea-

TABLE 1. Body and brain weight, and brain/body ratios in IGF-1, IGF1P-1, and IGF-1/IGF1P-1 (52L/H), Cross Tg mice and their wild-type (wt) littermates

Line	HW (g)	Brain wt (g)	Brain/body ratio
Normal (n = 6)	33.18 \pm 4.09	0.46 \pm 0.010	0.013 \pm 0.002
26L IGF-1 (n = 6)	32.71 \pm 2.34	0.66 \pm 0.010* (91% \uparrow)	0.026 \pm 0.004*
50L IGF-1 (n = 6)	35.60 \pm 6.04	0.63 \pm 0.020* (37% \uparrow)	0.017 \pm 0.003
52L IGF-1 (n = 7)	36.92 \pm 3.37	0.68 \pm 0.010* (48% \uparrow)	0.018 \pm 0.003*
32L IGF-1 (n = 7)	36.14 \pm 2.06	0.72 \pm 0.010* (64% \uparrow)	0.019 \pm 0.001*
43L IGF-1 (n = 8)	36.59 \pm 6.46	0.50 \pm 0.002* (22% \uparrow)	0.014 \pm 0.003
IGF-1/IGF1P-1 (n = 6)	32.22 \pm 3.74	0.53 \pm 0.020* (13% \uparrow)	0.016 \pm 0.001
CL IGF1P-1 (n = 5)	36.25 \pm 3.28	0.38 \pm 0.003* (22% \downarrow)	0.009 \pm 0.001*
BL IGF1P-1 (n = 6)	32.43 \pm 1.50	0.35 \pm 0.010* (24% \downarrow)	0.010 \pm 0.001*

Values are the mean \pm SEM.

* $P < 0.0001$ vs. wt mice.

† $P < 0.05$ vs. wt mice.

‡ $P < 0.01$ vs. wt mice.

sured in camera lucida drawings from the same series of SDH-stained tangential sections previously used to determine PMBSF and barrel areas.

Estimation of size, number, and density of neurons in PMBSF barrels

Neuron cross-sectional area and number were estimated in PMBSF barrels using cresyl violet-stained, cryostat tangential sections (50 μ m) after paraformaldehyde brain fixation. The mean neuronal area in PMBSF barrels was estimated using previously described methods (15, 20). Single sections with clearly visualized barrel boundaries were selected from both cerebral cortical hemispheres of each of three mice per group, and about 50 neurons that had a clearly visible nucleus, nucleolus, and cytoplasm were traced from the hollow of each of the 34 barrels in a hemisphere using a camera lucida at a final magnification of $\times 1500$. A total of 9000 neuron tracings in wt and Tg mice were collected and digitized (3000/mouse). The mean cross-sectional area was determined using the image-Pro system. This sampling method is unlikely to introduce a bias because the mean neuronal area changes little as a function of layer IV depth, and no regional differences in neuronal size within barrels have been reported (15).

To estimate neuronal number in PMBSF barrels, neurons were counted in each of the 34 PMBSF barrels in single sections previously used for determining neuron area (15, 20). Barrel boundaries were traced, and neuron profiles were counted in barrel sides and hollows from each hemisphere using a camera lucida at a final magnification of $\times 450$. The average neuron number in each PMBSF barrel was then estimated with the formula: barrel neuron number = number of neurons in each barrel/single section \times barrel height (microns)/50 (microns, section thickness). The PMBSF barrel neuron density was estimated using the equation: Neuron density/ mm^2 = PMBSF barrel neuron number/barrel volume.

Measurements of whisker pads and whisker follicle areas and number of axons in the infraorbital nerve

Whisker pads from the same 26L IGF-1, BL IGFBP-1 Tg, and wt mice used to determine PMBSF and barrel areas were carefully dissected and postfixed in 10% formalin for 7 days and then transferred to the same fixative containing 20% sucrose until they sank. The pads were then flattened between two microscope slides separated by 2 mm, frozen in 4-methylbutane, and cut longitudinally (50 μ m) in a cryostat. Whisker pad two-dimensional maps were drawn from sequential sections using a camera lucida (final magnification, $\times 14$). Areas of whisker pads ($n = 12$ /group) and follicles represented in the PMBSF ($n = 400$ /group) were determined following a protocol similar to that used for measuring PMBSF and barrel areas.

To count the number of axons in the infraorbital nerve, 26L, BL, BL IGFBP-1 Tg, and wt mice ($n = 6$ /group) were perfused with 3% paraformaldehyde and 2.5% glutaraldehyde in phosphate buffer (pH 7.4; 0.1 M). The brain and skin were carefully removed (with exception of the whisker pads), and the remaining head, including the infraorbital nerve, was postfixed in the same fixative for 7 days. The samples were transferred to a 0.25 M EDTA, pH 7.4, solution for 3 days at 37°C to decalcify the skull bones and thereby facilitate infraorbital nerve dissections. Infraorbital nerves were thoroughly washed in phosphate buffer and embedded in glycol methacrylate following the supplier's protocol (Energy Beam Science, Agawam, MA). Richardson's blue-stained transverse sections (5 μ m) were used to count the number of myelinated axons in the infraorbital nerve, as described by Siskich *et al.* (21).

Validation of methods

Brain shrinkage or swelling after perfusion were evaluated according to the method described by Ruddle *et al.* (19). Because paraformaldehyde and glucose perfusion altered brain size to the same extent in wt and Tg mice, no corrections for brain shrinkage or swelling were introduced in the data. Validation of the methods used in the present study comes from the finding that values obtained for each of the morphological parameters determined in our wt mice are fully comparable to values reported previously in mice (15, 20–22).

Data analysis

Means for all groups were obtained for each morphological parameter measured, and statistical significance was assessed by ANOVA and later confirmed using Student's *t* test (StatView II). For ease of comparison, some differences among groups are reported as the percent change; statistical analyses of these comparisons, however, were performed with the measured parameters rather than with percent change calculations. For some analyses, simple regressions were used.

Results

General observations

Overall brain size and cortical and barrel field cross-sectional areas differed among wt and Tg mice and among different lines of Tg mice (Table 1). Barrel number, shape, and anatomical definition, however, were comparable in Tg and wt mice (Fig. 1). No significant differences in body weight were observed between wt and Tg mice (Table 1). This is consistent with the relatively low levels of peripheral expression of both IGF-1 and IGFBP-1 transgenes in these Tg mouse lines (11, 13).

Brain weights and brain/body ratios

Consistent with previous observations (7, 8, 10, 11, 13), IGF-1-overexpressing Tg mice showed significant increases in total brain weight, whereas IGFBP-1 Tg mice had reduced brain weights compared with wt mice (Table 1). In IGF-1 Tg mice, brain weight increases ranged from 22% to 91% in 43L and 26L Tg mice, respectively. In CL and BL IGFBP-1 Tg mice, brain weight was decreased 22% and 24%, respectively. Cross-breeding 52L IGF-1 Tg mice with BL IGFBP-1 Tg mice (IGF-1/IGFBP-1 cross) produced animals with 13% heavier adult brains than those in wt mice. IGF-1/IGFBP-1 cross Tg mice had 28% ($P < 0.0001$) smaller brains than native 52L IGF-1 Tg mice, but 34% ($P < 0.0001$) larger brains than native BL IGFBP-1 Tg mice, indicating that IGFBP-1 attenuates the effects of the IGF-1 transgene on brain growth. Furthermore, the degree of transgene expression in brain corresponded to brain size, as assessed by Northern blot analysis (data not shown). The rank order of transgene IGF-1 mRNA abundance in IGF-1 Tg mice (26L > 32L > 52L > 50L > 43L) was the same as that of brain weight (Table 1), whereas the BL IGFBP-1 Tg mice expressed more IGFBP-1 transgene and had smaller brains than CL IGFBP-1 Tg mice. Taken together, these findings indicate that the changes in brain size in IGF-1 and IGFBP-1 Tg mice depend upon the amount of IGF-1 available, and suggest that limitations in IGF-1 availability may impose a developmental constraint on brain, cortical, and barrel growth (see below).

Brain weight/body weight ratios were increased in most IGF-1 Tg mouse lines and in IGF-1/IGFBP-1 cross Tg mice, and were decreased in IGFBP-1 Tg mice compared with those in wt mice (Table 1). These differences in brain weight/body weight ratios are due to changes in brain weight with no alterations in body weight. Changes in brain size in IGF-1 and IGFBP-1 Tg mice, therefore, cannot be attributable to modifications of body weight and/or body dimensions.

Cortical area, total barrel area, and barrel/cortex ratios

Cortical area was increased from 29% in 43L to 81% in 26L IGF-1 Tg mice compared with that in wt mice (Table 2). In

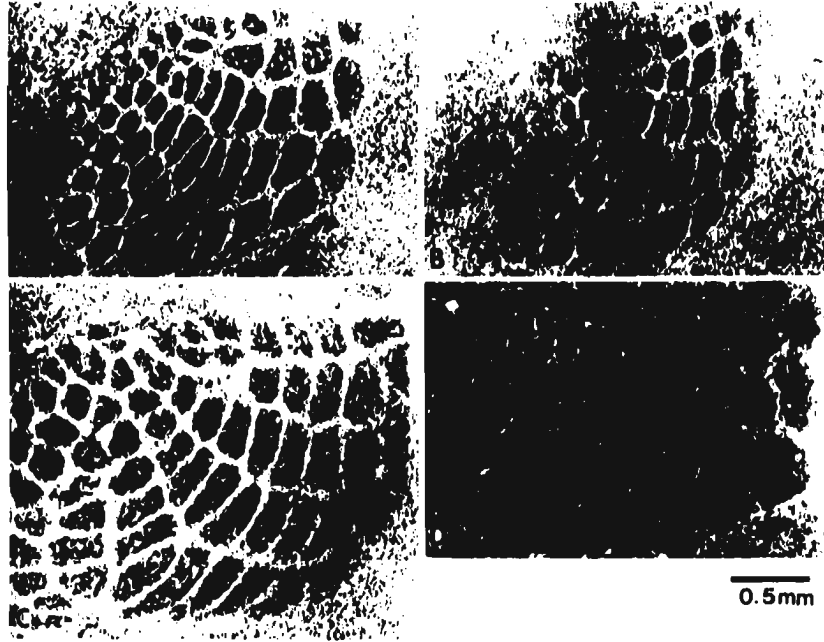


FIG. 1. The PMBSF in wt and Tg mice. Photomicrographs from SDH-stained tangential sections throughout layer IV of S1 in wt mice (a) and in BL IGF1P-1 (b), 26L IGF-1 (c), and IGF-1/IGFBP-1 cross Tg mice (d). The number and shape of PMBSF barrels are comparable in wt and Tg mice.

TABLE 2. Total barrel and cortical areas, and barrel/cortex ratios in IGF-1, IGFBP-1, and IGF-1/IGFBP-1 (52L/30L, Cross) Tg mice and their wild-type (wt) littermates

Line	Sum of barrel areas (mm ²)	Cortex area (mm ²)	Barrel/cortex ratio
Normal (n = 6)	1.44 ± 0.05	61 ± 1	0.028 ± 0.006
26L IGF-1 (n = 6)	2.42 ± 0.10* (68% ↑)	92 ± 4* (81% ↑)	0.026 ± 0.002
50L IGF-1 (n = 6)	2.19 ± 0.09* (52% ↑)	73 ± 2* (43% ↑)	0.030 ± 0.004
52L IGF-1 (n = 7)	2.18 ± 0.01* (51% ↑)	75 ± 1* (47% ↑)	0.029 ± 0.001
32L IGF-1 (n = 7)	2.03 ± 0.09* (41% ↑)	83 ± 2* (64% ↑)	0.024 ± 0.004*
43L IGF-1 (n = 8)	1.91 ± 0.07* (33% ↑)	66 ± 1* (28% ↑)	0.029 ± 0.006
IGF-1/IGFBP-1 (n = 6)	1.83 ± 0.08* (27% ↑)	66 ± 1* (30% ↑)	0.028 ± 0.006
CL IGFBP-1 (n = 5)	1.26 ± 0.02* (12% ↓)	45 ± 1* (10% ↓)	0.027 ± 0.002
BL IGFBP-1 (n = 6)	1.06 ± 0.03* (24% ↓)	41 ± 1* (29% ↓)	0.026 ± 0.003

Values are the mean ± SEM.
 *P < 0.0001 vs. wt mice.
 †P < 0.01 vs. wt mice.
 ‡P < 0.05 vs. wt mice.

contrast, cortical area was decreased in CL and BL IGFBP-1 mice by 22% and 24%, respectively. In IGF-1/IGFBP-1 cross Tg mice, cortical area was increased 13% (P < 0.0001) and 37% (P < 0.0001) above values for cortical area in wt and

native IGFBP-1 Tg mice, respectively, but was decreased 13% (P < 0.0001) compared to those in native IGF-1 52L Tg mice. Relative cortical area (for the IGF-1 Tg mice, 26L > 32L > 52L > 50L > 43L; for the IGFBP-1 Tg mice, BL < CL) corre-

sponded to the degree of transgene expression. Comparisons of percent changes in brain weight and cortical area among Tg mice, however, indicate that cortical area variations are not precisely proportional to changes in total brain weight. For instance, in 26L IGF-1 Tg mice, brain weight increased more (91%) than cortical area (81%), whereas in 32L IGF-1 Tg mice, cortical area increased more (64%) than brain weight (56%, Tables 1 and 2). Ectopic expression of IGFBP-1 also affected total brain weight and cortical area somewhat differently. In CL IGFBP-1 Tg mice, brain weight was 22% decreased, whereas cortical area was only decreased by 10%. In BL IGFBP-1 Tg mice, both dimensions were more similarly reduced (24% and 19%, respectively). The differential effects of IGF-1 and IGFBP-1 expression on brain and cortical dimensions also were seen in IGF-1/IGFBP-1 cross Tg mice. In these mice, brain weight was only increased by 13%, whereas cortical area was increased by 30% compared to those in wt mice. Brain weight and cortical relative dimensions, thus, were altered independently from each other to some extent, probably due to regional variation in IGF-1 availability (11, 13).

Total barrel area was increased from 33% in 43L to 68% in 26L IGF-1 Tg mice compared with that in wt mice (Table 2). In IGFBP-1 Tg mice, total barrel area was decreased 12% in mice from the CL and 24% in those from the BL. In IGF-1/IGFBP-1 cross Tg mice, total barrel area was increased 27% ($P < 0.0001$) and 40% ($P < 0.0001$) compared with those in normal and native BL IGFBP-1 Tg mice, respectively, and was decreased 16% ($P < 0.0001$) compared with that in native 52L IGF-1 Tg mice. Comparisons of percent changes in cortical and total barrel areas among Tg mice indicate that these changes are not proportional. Indeed, in the IGF-1 Tg mouse lines 50L, 52L, and 43L, and in both lines of IGFBP-1 Tg mice, barrels were relatively more affected than the cortex, whereas the opposite was true for 26L and 32L IGF-1 and IGF-1/IGFBP-1 cross Tg mice. This differential response by the cortex and barrels to the expression of both transgenes led to small, but significant, variations in barrel/cortex ratios among Tg mouse lines (Table 2). These ratios indicate that larger brains do not always have correspondingly larger barrels (compare, for instance, 50L, 52L, and 32L in Table 1). The changes in total barrel area in our Tg mice, thus, do not arise simply as a consequence of changes in cortical area. These observations suggest that cortical and S1 barrel field

relative dimensions may change to some extent independently after variations in the availability of neurotrophic factors, such as IGF-1.

PMBSF and barrel cross-sectional area

PMBSF and barrel cross-sectional areas were increased in all five lines of IGF-1 Tg mice compared to those in wt littermates (Table 3). The percent increase in PMBSF area, however, varied from 25% in 43L Tg mice to 60% in 26L Tg mice, and that in barrel area ranged from 27% to 67% in these same Tg mouse lines. Barrel cross-sectional area, thus, increased 2–12% more than PMBSF area in IGF-1 Tg mice, indicating that barrels are relatively more affected by IGF-1 overexpression than the PMBSF as a whole. This is consistent with the finding that barrels grow relatively more than S1 and the cortical mantle during postnatal brain development in rats (19).

PMBSF and barrel cross-sectional areas were similarly affected by IGFBP-1 expression; both were decreased by 13% in CL and by 25% in BL IGFBP-1 Tg mice compared with those in wt mice (Table 3). In IGF-1/IGFBP-1 cross Tg mice, barrel cross-sectional area was increased by 14% ($P < 0.0001$) and 51% ($P < 0.0001$) compared with those in wt and native IGFBP-1 Tg mice, respectively. IGF-1/IGFBP-1 cross Tg mice, however, had reduced PMBSF and barrel areas compared to native 52L IGF-1 Tg mice. Finally, PMBSF and barrel cross-sectional areas were highly correlated in all lines of Tg mice ($r = 0.55$, $P = 0.006$ for IGF-1 Tg mice and $r = 0.97$; $P < 0.0001$ for IGFBP-1 Tg mice). In contrast, neither PMBSF nor barrel area was correlated with cortical area in IGF-1 (26L: $r = 0.41$; $P = 0.72$; 32L: $r = 0.17$; $P = 0.68$; 43L: $r = 0.53$; $P = 0.47$; 50L: $r = 0.64$; $P = 0.35$; 52L: $r = 0.16$; $P = 0.83$) and IGFBP-1 (BL: $r = 0.86$; $P = 0.6$; CL: $r = 0.10$; $P = 0.86$). Changes in the dimensions of the barrel field in IGF-1, IGFBP-1, and IGF-1/IGFBP-1 cross Tg mice, therefore, do not result from uniform proportional expansions or reductions of the cortex, because heavier brains containing the largest cortical mantles did not always have the largest somatic representations. These observations also strongly argue against the changes in PMBSF and barrel size being simply a result of differential flattening due to histological processing or a consequence of differences in the plane of sectioning.

TABLE 3. Cross-sectional area of the PMBSF and its constituent barrels and interbarrel area in the primary somatic sensory cortex of IGF-1, IGFBP-1, and IGF-1/IGFBP-1 (52L/BL Cross) Tg mice and their wild-type (wt) littermates

Line	Average barrel area (μm^2)	PMBSF area (μm^2)	Interbarrel area (μm^2)
Normal (n = 6)	0.040 ± 0.004	1.80 ± 0.37	0.29 ± 0.02
26L IGF-1 (n = 6)	0.082 ± 0.007* (67%)	2.89 ± 0.01* (60%)	0.47 ± 0.04* (62%)
50L IGF-1 (n = 6)	0.077 ± 0.006* (56%)	2.61 ± 0.09* (45%)	0.42 ± 0.01* (45%)
52L IGF-1 (n = 7)	0.074 ± 0.006* (50%)	2.50 ± 0.08* (38%)	0.35 ± 0.02* (21%)
32L IGF-1 (n = 7)	0.067 ± 0.004* (36%)	2.41 ± 0.05* (34%)	0.38 ± 0.02* (31%)
43L IGF-1 (n = 8)	0.063 ± 0.004* (27%)	2.26 ± 0.05* (25%)	0.39 ± 0.04* (35%)
IGF-1/IGFBP-1 (n = 6)	0.086 ± 0.004* (14%)	2.26 ± 0.01* (25%)	0.28 ± 0.08 (4%)
CL IGFBP-1 (n = 5)	0.043 ± 0.004* (13%)	1.66 ± 0.03* (13%)	0.30 ± 0.01 (4%)
BL IGFBP-1 (n = 6)	0.037 ± 0.004* (25%)	1.32 ± 0.04* (26%)	0.26 ± 0.02 (14%)

Values are the mean ± SEM.

* $P < 0.0001$ vs. wt mice.

† $P < 0.01$ vs. wt mice.

‡ $P < 0.05$ vs. wt mice.

Barrel height and volume in the PMBSF

Because the greatest differences in PMBSF and barrel areas were found in 26L IGF-1 and BL IGFBP-1 Tg mice when compared with wt mice, detailed evaluation of the *in vivo* effects of IGF-1 on barrel structure and development were pursued in these Tg mouse lines. As with PMBSF and barrel cross-sectional area, barrel height and barrel volume were, respectively, increased 18% and 98% in 26L IGF-1 Tg mice and decreased 20% and 39% in BL IGFBP-1 Tg mice, compared to those in wt littermates (Fig. 2).

Cross-sectional area, number, and density of neurons in PMBSF barrels

The cross-sectional area of barrel neuron cell bodies was increased 33% in IGF-1/26L Tg mice and decreased 10% in BL IGFBP-1 Tg mice compared with those in wt animals (Table 4; photomicrographs demonstrating this difference are shown in Fig. 3). The average neuron number in each barrel (counted in single barrel sections), however, did not vary significantly among wt and Tg mice (Table 4; see also

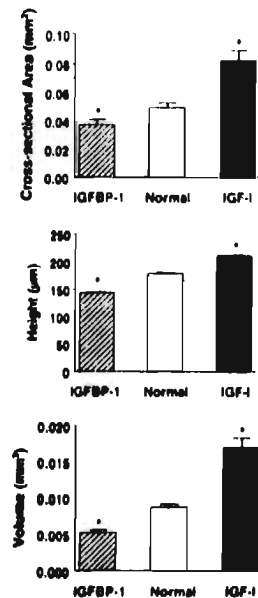


Fig. 2. Cross-sectional area (top panel), height (middle panel), and volume (bottom panel) of PMBSF barrels in 26L IGF-1 and BL IGFBP-1 Tg mice and their wt littermates. $n = 3$ for cross-sectional area and volume, and $n = 6$ for heights. Data are the mean \pm SEM. * $P < 0.001$.

Fig. 3) Because barrel volumes differed among the groups of mice, the average number of neurons in each barrel was increased 24% in 26L IGF-1 Tg mice and decreased 15% in BL IGFBP-1 Tg mice compared to that in wt mice (Table 4). The increases in neuron number in IGF-1 Tg mice and the decreases in IGFBP-1 Tg mice are consistent with changes in DNA content measured in brains of IGF-1 and IGFBP-1 Tg mice (9, 11, 13). Despite the increment in the number of neurons per barrel, neuronal density was decreased 39% in PMBSF barrels of 26L IGF-1 Tg mice (Table 4; see also Fig. 3). The opposite was true for BL IGFBP-1 Tg mice. Although barrel neuron number was decreased, barrel neuronal density was increased 39% compared with that in wt mice. Similar increases in cortical neuronal density have been reported in IGF-1 knock-out mice (12), a mouse model that, like IGFBP-1 Tg mice, reflects decreased IGF-1 availability. Modifications in IGF-1 availability, therefore, led to changes in neuron size, number, and density in Tg mice.

Area of olfactory glomeruli

The area of olfactory glomeruli was increased 10% in 26L IGF-1 Tg mice compared to that in wt littermates (mean \pm SEM, 0.0070 ± 0.0011 and 0.0064 ± 0.0017 mm², respectively, $P < 0.05$). The area of these modules in BL IGFBP-1 Tg mice (0.0064 ± 0.0010 mm²), however, did not differ from that of olfactory glomeruli in wt animals. Because 51 barrels were relatively more affected than olfactory glomeruli, it is apparent that IGF-1 exerts a degree of regional specificity. Support for this conclusion comes from the finding that IGF-1 treatment stimulates the growth of the parietal cortex, but not that of the olfactory bulb when these regions are implanted into the eye's anterior chamber in rats (23, 24). In addition, our observations for the olfactory bulb argue against the changes in PMBSF and barrel dimensions in Tg mice being the result of differential flattening or differences in the cutting angle, because barrel and olfactory glomeruli areas were both determined from the same series of flattened tangential sections.

Areas of whisker pads and follicles, and the number of infraorbital nerve myelinated axons

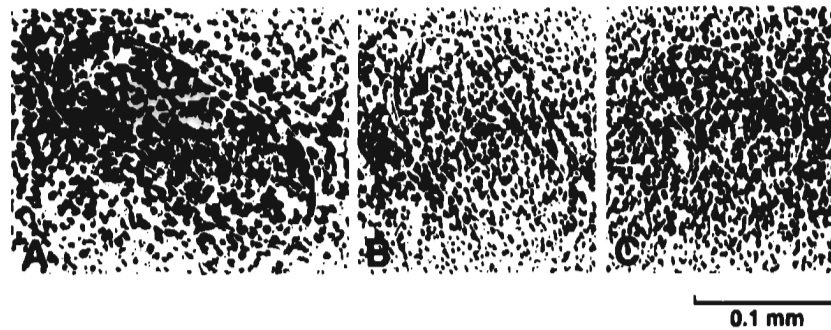
The area of the whisker pads, the cross-sectional area of whisker follicles, and the number of myelinated axons in the infraorbital nerve were not statistically different among 26L IGF-1 and BL IGFBP-1 Tg mice and their wt littermates (Table 5). Changes in the relative size of the PMBSF and its constituent barrels, thus, are independent of changes in the sensory periphery.

Discussion

Our data indicate that IGF-1 overexpression in Tg mice increases brain, cortical, and PMBSF barrel dimensions, whereas ectopic brain expression of IGFBP-1, an inhibitor of IGF-1 actions, has opposite effects. Tg mice with the highest IGF-1 or IGFBP-1 transgene expression had the most affected brains and cortical mantles. Furthermore, mice carrying both IGF-1 and IGFBP-1 transgenes had brains, cortical mantles, and barrel fields intermediate in size to those of native IGF-1

TABLE 4. Cross-sectional area, number, and density of neurons in PMBSF barrels of 26L IGF-1 and BL IGFBP-1 Tg mice and their wild-type (wt) littermates

Line	PMBSF barrel neuron			
	Cross-sectional area (μm^2)	No./single 50 μm section	Total no.	Density ($10^6/\text{mm}^2$)
Control (n = 3)	68.13 \pm 12.58	444 \pm 20	1590 \pm 101	1.8 \pm 0.41
26L IGF-1 (n = 3)	90.42 \pm 13.41* (33% ↑)	406 \pm 20	1996 \pm 84* (24% ↑)	1.1 \pm 0.08* (38% ↓)
BL IGFBP-1 (n = 3)	61.41 \pm 10.58* (10% ↓)	470 \pm 30	1344 \pm 80* (15% ↓)	2.5 \pm 0.43* (39% ↑)

Values are the mean \pm SEM.* $P < 0.0001$ vs. wt mice.† $P < 0.05$ vs. wt mice.**FIG. 3.** Photomicrographs of cresyl violet-stained sections from 26L IGF-1 (A) and BL IGFBP-1 (C) Tg mice and from a wt littermate (B). The white lines in each photomicrograph outline individual barrels. The differences in barrel cross-sectional area, neuron cell body size, and neuron density can be seen.**TABLE 5.** Whisker pad and follicle area and number of trigeminal nerve myelinated axons in 26L IGF-1 BL IGFBP-1 Tg mice and their wild-type (wt) littermates

Line	Whisker pad area (mm^2)	Whisker follicle area (mm^2)	No. of axons
Normal (n = 6)	19.172 \pm 1.03	0.246 \pm 0.009	12,890 \pm 1,800
26L IGF-1 (n = 6)	18.91 \pm 0.67	0.270 \pm 0.008	12,340 \pm 1,100
BL IGFBP-1 (n = 6)	19.91 \pm 0.60	0.261 \pm 0.001	13,125 \pm 1,975

Values are the mean \pm SEM.

and IGFBP-1 Tg mice, indicating that IGFBP-1 attenuates the effects of IGF-1 overexpression. These results demonstrate that altered IGF-1 availability is responsible for the changes in brain, cortical, and PMBSF barrel dimensions in these Tg mice and confirm the importance of IGF-1 in regulating overall brain and cortical growth. Our observations in S1 are consistent with findings showing that developing projection neurons of the somatosensory system exhibit IGF-1 expression during periods of neuronal growth and synaptogenesis (2, 6). Together, these data strongly suggest that IGF-1 modulates neuronal growth in the developing somatosensory pathway, and that limitations of its availability impose a developmental constraint to sensory neuron growth. Furthermore, our findings show that the PMBSF provides an excellent model to precisely delineate IGF-1 actions and mechanisms in the promotion of neuron growth.

Changes in cortical and barrel field dimensions were not proportional. In some Tg mice, the cortex was more affected

than the barrels, whereas the opposite occurred in other Tg mice. A likely explanation for this finding is that regional variations in IGF-1 availability, resulting from differential expression of the transgenes, lead to variations in cortical and PMBSF barrel dimensions. We have shown that the expression of these transgenes varies among brain regions, and that those regions with the greatest transgene expression exhibit the greatest alterations in growth (11). The size of the PMBSF, however, precludes direct assessment of transgene mRNA abundance. It, nonetheless, seems reasonable to assume that regional variations in the availability of IGF-1 influence the relative dimensions of the neocortex and PMBSF barrels. The differential spatio-temporal distributions of IGF-1 receptors and IGFBP-1 and regional differences in the onset of transgene expression also could contribute to variations in regional cortical growth.

Unlike barrel dimensions, barrel shape and number were not affected by modifications in IGF-1 availability, suggesting

that IGF-I is not involved in barrel formation. This is not surprising, because IGF-I mRNA expression is first detectable in the thalamo-cortical pathway on about postnatal day 5 in rats (2), after the time when most of the PMBSF has already been formed in S1 (14). Furthermore, we found the PMBSF to be normally formed, but extremely small, in IGF-I knock-out mice (unpublished data). However, it remains possible that IGF-I has an influence on the time when thalamic afferents arrive in the developing cortex. Taken together, our observations suggest that barrel formation and growth are independent processes.

Some of the cellular processes by which modifications in IGF-I availability alter brain size have been assessed. It has been shown that myelin production and content are increased in IGF-I Tg mice and decreased in IGFBP-1 Tg (9, 11) and IGF-I knock-out mice (12). The present observations in the barrel field of IGF-I and IGFBP-1 Tg mice indicate that modifications of IGF-I availability also change the number and size of neurons and the volume of cortical layer IV occupied by neuropil. Barrels in IGF-I Tg mice had larger cells and contained more neurons than those in wt mice. Barrel neuronal density, however, was reduced, and barrel volume was increased, indicating an increase in the barrel volume devoted to neuropil. In contrast, barrels in IGFBP-1 Tg mice had smaller cells and contained fewer neurons than those in wt mice. Barrel neuronal density was increased, whereas barrel volume was decreased, indicating a diminution of neuropil volume (25). Changes in neuron number and neuropil volume are concordant with the total DNA content previously described in the brains of our Tg mice (7, 13). Thus, modifications in neuron number and size and in neuropil volume account for changes in PMBSF barrel size, and probably for those in overall brain and cortical dimensions, in IGF-I and IGFBP-1 Tg mice.

The mechanisms by which modifications in IGF-I availability alter layer IV neuron number are not known. The number of neuron precursors, the rate of precursor proliferation, the length of the proliferation phase, and/or neuronal survival may influence neuron number (26–29). *In vitro* and *in vivo* studies have shown that IGF-I can enhance neuron precursor proliferation (1) and neuron survival (1, 30, 31). Our data do not directly distinguish among these possibilities. However, we believe that modifications in IGF-I availability predominantly affect the survival of cortical and thalamic neurons. A number of observations support this contention. In the mouse, cortical layer IV neurons are generated at the end of gestation (32), and cell death occurs between embryonic day 19 and postnatal day (PN) 10 in the thalamus and S1, peaking on PN0 in the thalamus and PN7 in the neocortex (33–35). The transgenes in our Tg mice are first expressed after birth (11, 13), at a time when cell death occurs but after the generation of cortical layer IV neurons. Brain weights in these Tg mice do not differ from those in their wt littermates at birth (11, 13), suggesting that the transgenes have not yet had an impact on brain development. Taken together, it appears that the changes in barrel cytoarchitecture in Tg mice result from the effects of IGF-I on neuronal survival. It has been shown that the number of cortical cells correlates with that of thalamic afferents (36) and, thus, with thalamic neuron number. Because the num-

ber of thalamic afferents correlates with area dimensions in the neocortex (27, 37–40), the promotion of neuron survival probably occurs both in the neocortex and at subcortical levels.

Peripheral influences have been implicated in determining various structural features of the barrel field (14, 41–44). Barrel size and cell number appear proportional to the whiskers' sensory innervation density (14, 45), which, in turn, depends on whisker size (14). We investigated whether S1 structural changes in Tg mice occurred in response to modifications in body dimensions or peripheral innervation density. No differences in body weight, whisker follicle and pad sizes, or the innervation density to whisker pads were found among Tg and wt mice. These observations indicate that when there are changes in local trophic interactions, structural changes in the brain, cortex, and barrel field can proceed independently from body and sensory periphery influences. This conclusion is strengthened by the recent findings that certain mutant mice lack barrels despite having an intact sensory periphery [a naturally occurring mutant mouse described by Welker *et al.* (46) and monoamine oxidase A knock-out mice (47)]. In the latter knock-out mice, barrel formation is profoundly altered by changes in serotonin availability, suggesting that this amine plays a trophic role in the developing S1 (47). Furthermore, a disproportion between the number of nerves innervating whiskers and barrel size has been noted after reducing whisker innervation density following prenatal treatment with antinerve growth factor antibodies (21), after selective whisker ablation (42), and in mice with supernumerary whiskers (14).

Elimination of redundant connections by means of neuronal competition for neurotrophic factors is thought to play a major role in establishing brain neuronal circuitry (48, 49). Agmon *et al.* (39, 40) have recently shown, however, that thalamic terminal arbors in the barrel cortex are progressively elaborated with high topological precision, as opposed to being eliminated from an initially exuberant pattern as occurs in the visual system (37, 38, 50). Riddle *et al.* (19) documented that barrel neuropil is progressively and selectively constructed as postnatal development proceeds. This evidence suggests that progressive, and not regressive, developmental processes shape neuronal connections in the barrel cortex. Our observations that barrels remain discrete anatomical units despite their striking change in size and that neuropil volume is greatly modified in IGF-I and IGFBP-1 Tg mice suggest that selective elaboration of barrel neuropil is regulated by IGF-I. Together these observations indicate that rules governing the development of thalamo-cortical connections are different in distinct cortical areas. Although redundant connections are pruned in the visual cortex by means of neuronal competition for neurotrophic factors, the barrel cortex seems to selectively elaborate neuronal connections in a fashion dependent upon the amount of trophic factors available.

Acknowledgment

The authors are grateful to Luisa E. Brighton for technical assistance.

References

- 1 Ishii DN 1993 Neurobiology of insulin and insulin-like growth factors. In *Loughlin SE, Fallon JR (eds): Neurotrophic Factors*. Academic Press, New York, pp 415-442.
- 2 Bondy CA 1991 Transient IGF-I gene expression during the maturation of functionally related central projection neurons. *J Neurosci* 11:3442-3455.
- 3 Lee W-H, Javedan S, Bondy CA 1992 Coordinate expression of insulin-like growth factor system components by neurons and neurons during retinal and cerebral development. *J Neurosci* 12:4737-4744.
- 4 Bartlett WF, Li X-S, Williams M, Benkovic S 1991 Localization of insulin-like growth factor-I mRNA in murine central nervous system during postnatal development. *Dev Biol* 147:239-250.
- 5 Bartlett WF, Li X-S, Williams M 1992 Expression of IGF-I mRNA in the murine subependymal zone during postnatal development. *Mol Brain Res* 12:285-291.
- 6 Bondy C, Lee W-H 1993 Correlation between insulin-like growth factor (IGF-I) binding protein S and IGF-I gene expression during brain development. *J Neurosci* 13:5092-5104.
- 7 Behringer RR, Lewin TM, Qualify C, Faloutier RD, Brinster RL, D'Ercule AJ 1989 Expression of insulin-like growth factor I stimulates normal somatic growth in growth hormone-deficient transgenic mice. *Endocrinology* 127:1033-1040.
- 8 Mathews LS, Hammer RE, Behringer RR, D'Ercule AJ, Bell GI, Brinster RL, Faloutier RD 1988 Growth retardation of transgenic mice expressing human insulin-like growth factor I. *Endocrinology* 123:2827-2833.
- 9 Carson M, Behringer RR, Brinster RL, McMillen FA 1993 Insulin-like growth factor I increases brain growth and central nervous system myelination in transgenic mice. *Neuron* 10:729-740.
- 10 Ye P, Carson J, D'Ercule AJ 1995 Insulin-like growth factor I influences the initiation of myelination: studies of the anterior commissure of transgenic mice. *Neurosci Lett* 201:235-238.
- 11 Ye P, Carson J, D'Ercule AJ 1995 In vivo actions of insulin-like growth factor-I (IGF-I) on brain myelination: studies of IGF-I and IGF binding protein-I (IGFBP-I) transgenic mice. *J Neurosci* 15:7344-7356.
- 12 Borch KD, Powell-Braxton L, Widmer H-R, Valverde J, Hell F 1995 Igf1 gene disruption results in reduced brain size, CNS hypomyelination, and loss of hippocampal and striatal parvalbumin-containing neurons. *Neuron* 14:717-730.
- 13 D'Ercule AJ, Dai Z, Xing Y, Boney C, Wilbur MB, Lauder JM, Han VK, Clemmons DR 1994 Brain growth retardation due to the expression of human insulin-like growth factor binding protein I (IGFBP-1) in transgenic mice: an in vivo model for analysis of IGF-I function in the brain. *Dev Brain Res* 82:213-222.
- 14 Welker E, Van der Loos H 1986 Quantitative correlation between barrel field size and the sensory innervation of the whiskerpad: a comparative study in six strains of mice bred for different patterns of mystacial vibrissae. *J Neurosci* 6:3355-3375.
- 15 Pasternak JF, Woolsey TA 1982 The number, size and spatial distribution of neurons in lamina IV of the mouse barrel cortex. *J Comp Neurol* 164:291-300.
- 16 Reiford GR, Killackey J 1979 The development of vibrissae representation in subventral cortex of the neonatal rat. *J Comp Neurol* 188:63-74.
- 17 Darband D, Woolsey TA 1984 Effects of neonatal whisker lesions on mouse central trigeminal pathways. *J Comp Neurol* 223:424-447.
- 18 Ma PM 1991 The barrel cortex: inhibition, vibrissae representations in brain stem trigeminal complex of the mouse. I. Normal structural organization. *J Comp Neurol* 309:161-190.
- 19 Biddle D, Richards A, Zappan F, Pavesi D 1992 Growth of the rat somatosensory cortex and its constituent parts during postnatal development. *J Neurosci* 12:3386-3393.
- 20 Curcio CA, Coleman PD 1982 Stability of neuron number in cortical barrels of aging mice. *J Comp Neurol* 212:158-172.
- 21 Slihek L, Woolsey TA, Johnson EM 1986 Effect of a uniform partial deafferentation of the periphery on the peripheral and central vibrissal system in guinea pigs. *J Neurosci* 6:1227-1240.
- 22 Shug A, Palm G 1986 Density of neurons and synapses in the cerebral cortex of the mouse. *J Comp Neurol* 250:442-458.
- 23 Giacobini MM, Olson L, Hoffer BJ, Sara VR 1980 Transient IGF-I exerts trophic effects on fetal brain tissue grafts. *Exp Neurol* 68:33-37.
- 24 Giacobini MM, Zetterstrom RH, Young D, Hoffer BJ, Sara V, Olson L 1995 IGF-I influences olfactory bulb maturation: evidence from an anti-IGF-I antibody treatment of developing grafts in ocula. *Dev Brain Res* 84:67-76.
- 25 Tower DB 1954 Structure and functional organization of the mammalian cerebral cortex: the correlation of neuron density with brain size. *J Comp Neurol* 101:19-53.
- 26 Dehay C, Gimad P, Bertrand M, Smart I, Kennedy H 1993 Modulation of the cell cycle contributes to the parcellation of the primate visual cortex. *Nature* 366:464-469.
- 27 Kennedy H, Dehay C 1993 Cortical specification of mice and men. *Cereb Cortex* 3:171-186.
- 28 Caviness VR, Takahashi TJ, Nowakowski BS 1995 Numbers, time, and neocortical neurogenesis: a general developmental and evolutionary model. *Trends Neurosci* 18:378-382.
- 29 Rakic P 1995 Evolution of cortical parcellation: the perspective from experimental neuroembryology. In Changizi JP, Chavkin J (eds) *Origins of the Human Brain*. Clarendon Press, Oxford, pp 84-100.
- 30 Recip-Plato E, Reicher MM, Ishii DN 1996 Effects of insulin, insulin-like growth factor-II, and nerve growth factor on neurite formation and survival in cultured sympathetic and sensory neurons. *J Neurosci* 16:1211-1219.
- 31 Aizeman Y, De Vellis J 1987 Brain neuron development in a serum and glia free environment: effects of transferin, insulin, insulin-like growth factor-I and thyroid hormone on survival, growth and differentiation. *Brain Res* 408:32-42.
- 32 Hirsch SP, D'Amato CJ 1989 Cell migration to the neocortex in the rat. *Anat Rec* 162:619-634.
- 33 Freeman D, Leuba G 1996 Neurocellular death in the development and aging of the cerebral cortex of the mouse. *Neurobiol Appl Neurobiol* 9:297-311.
- 34 Ferrer J, Tortosa A, Blanco R, Martin F, Ferraz T, Planas A, Mazaia A 1994 Naturally occurring cell death in the developing cerebral cortex of the rat: Evidence of apoptosis-associated internucleosomal DNA fragmentation. *Neurosci Lett* 182:77-79.
- 35 Waite PM, Li L, Ashwell RW 1992 Developmental and lesion induced cell death in the rat ventrolateral complex. *Neurosci Lett* 13:485-488.
- 36 Windrem MS, Finlay BL 1991 Thalamic ablation and neocortical development: alterations of cortical cytoarchitecture and cell number. *Cereb Cortex* 1:230-240.
- 37 Killackey HP, Bellard GR 1979 The formation of afferent patterns in the somatosensory cortex of the neonatal rat. *J Comp Neurol* 183:285-302.
- 38 Catalano SM, Robertson RT, Killackey HP 1995 Rapid alteration of thalamocortical axon morphology follows peripheral damage in the neonatal rat. *Proc Natl Acad Sci USA* 92:2549-2552.
- 39 Agmon A, Yang LT, O'Duval DK, Jones EG 1993 Organized growth of thalamocortical axons from the deep tier of terminations into layer IV of developing mouse barrel cortex. *J Neurosci* 13:5385-5392.
- 40 Agmon A, Yang LT, Jones EG, O'Duval DK 1995 Topographical precision in the thalamic projection to mouse barrel cortex. *J Neurosci* 15:549-561.
- 41 Van der Loos H, Dorfl J 1978 Does the skin tell the somatosensory cortex how to construct a map of the periphery? *Neurosci Lett* 7:23-30.
- 42 Welker E, Van der Loos H 1986 Is areal extent in sensory cerebral cortex determined by peripheral innervation density? *Exp Brain Res* 63:650-653.
- 43 Killackey HP, Rhodes RW, Bennett-Clarke CA 1985 The formation of a cortical somatosensory map. *French Neurosci* 18:602-606.
- 44 Killackey HP, Chiala NI, Bennett-Clarke CA, Erb M, Rhodes RW 1996 Peripheral influences on the size and organization of somatosensory representations in the fetal rat cortex. *J Neurosci* 16:1788-1806.
- 45 Lee KJ, Woolsey TA 1978 A proportional relationship between peripheral innervation density and cortical neuron number in the somatosensory system of the mouse. *Brain Res* 90:349-353.
- 46 Welker E, Armstrong-James M, Brochetti G, Ourednik W, Gheorghita-Berthier F, Dubois R, Guermey DL, Van der Loos H, Neumann PE 1996 Altered sensory processing in the somatosensory cortex of the mouse mutant barless. *Science* 271:1864-1867.
- 47 Cases O, Vitalis T, Bell I, De Maeyer E, Sotelo C, Gaspar P 1996 Lack of barrels in the somatosensory cortex of mouse mutant barless: A-deficient mice: role of a serotonergic system during the critical period. *Neuron* 16:297-307.
- 48 Carson MM, Fawcett JW, O'Leary DD, Stanfield BB 1986 Regressive events in neurogenesis. *Science* 225:1250-1265.
- 49 Cabelli RJ, Hoban A, Shatz JC 1995 Inhibition of ocular dominance column formation by induction of N-145 or BDNF. *Science* 267:1662-1666.
- 50 Jensen KF, Killackey HP 1987 Terminal arbor of axon projecting to the somatosensory cortex of the adult rat. II. The altered morphology of thalamocortical afferents following neocortical infarction. *Neurosci Lett* 7:3544-3553.

REFINING THE BRAIN'S CIRCUITRY

In the 1960s, Nobel laureates David Hubel and Torsten Wiesel carried out a series of experiments that provided important clues about how neural circuits are assembled. Based on their observations of the visual system of growing cats and monkeys, Hubel and Wiesel concluded that at birth the brain has many redundant connections that are subsequently removed as we

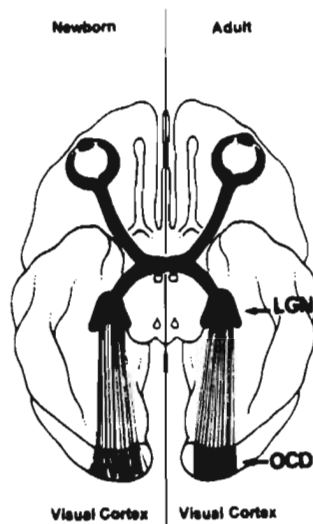


Figure 2. In the monkey brain, as in humans, visual information is transferred from the eyes to the primary visual cortex, in the back pole of the brain. Hubel and Wiesel noticed that in adult monkeys the visual cortex was divided into anatomic and functional units called ocular dominance columns (ODC). Under normal conditions, each of these columns receives information from a single eye. For instance, red columns in the sketched adult visual cortex only receive information from the left (red) eye. Furthermore, left (red) and right (black) eye-associated columns alternate throughout the adult primary visual cortex. Ocular dominance columns, however, do not exist in the primary visual cortex of newborn monkeys. At birth, neural connections associated with both eyes overlap extensively over the entire visual cortex. Ocular dominance columns in adult monkeys gradually emerge after neurons in the lateral geniculate nucleus (LGN; dark blue) remove many of their connections from the visual cortex, as the animal matures (Adapted from D. Purves & J.W. Lichtman, *Principles of Neural Development*, Sinauer, MA, 1985).

*The brain is the organ where
our humanness resides and
from which our individual
identities emerge.*

experience our surroundings during postnatal maturation (Figure 2). What could be the purpose of removing connections among neurons while the brain is still maturing? It has been suggested that this process refines the geometry and functional properties of neural circuits and decreases the number of erroneous connections between neurons and their many potential targets. Thus, apparently the final goal of reducing the number of connections is to shape neural circuits in harmony with the needs imposed by the surrounding environment, thus making the brain's functioning more efficient.

Since Hubel and Wiesel's landmark experiments in the visual system, new evidence has been gathered to suggest that elimination of connections may be a general mechanism by which neural circuits are assembled in all brain regions. However, a process like this is difficult to reconcile with at least two facts: 1) The brain and its neurons greatly increase in size from birth to adulthood (Figure 3) and 2) The elimination of neural connections seems to occur at a time in development when our brains receive, process and store increasing amounts of information, and when complex patterns of behavior progressively emerge (Figure 4). Several questions arise then from these puzzling observations, among them: How do the brain and its neurons increase their size while neural connections are removed? Why should neurons increase their size if they lose contact with their neural peers? How can the brain progressively increase its capacity to process and memorize information and generate complex patterns of behavior, while at the same time eliminating neural connections?

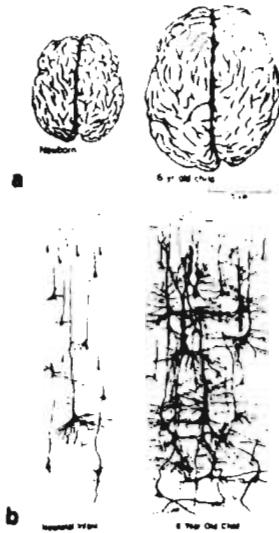


Figure 3. The human brain increases its size by about four-fold during postnatal development: a) At birth, the human brain weighs an average of 350 grams reaching approximately 1400 grams in adulthood; b) This increase in brain size not only reflects the "passive" enlargement of neurons and their connections, but the "active" elaboration of more complex circuits (Adapted from D. Purves, *Neural Activity and the Growth of the Brain*, Cambridge University Press, Cambridge, U.K., 1994).

ELABORATION OF NEW CIRCUITRY IN THE BRAIN

A mechanism whereby the brain's circuitry may be sculpted during postnatal development would be to progressively add new connections to immature neural circuits. These additions would provide the anatomic substratum necessary for the developing brain to increase its capacity to process and store novel and relevant information. Evidence supporting this possibility has been found in the peripheral nervous system, which is formed by neurons in the brain stem, the spinal cord and in small, seed-like structures called peripheral nerve ganglia (Figure 5). These neurons give rise to nerve fibers that regulate the activity of organs

such as muscles and viscera. Neurons localized in some types of ganglia are themselves targets of nerve fibers from neurons in the spinal cord. Early in development, ganglion neurons receive many fibers but only a few connections are made. As postnatal maturation proceeds, the number of fibers reaching ganglion neurons diminishes. The remaining fibers, however, grow to make many connections with ganglion neurons (Figure 6). This observation suggests, therefore, that selective growth of connections also shapes neural circuits during postnatal development.

Recently, it has been demonstrated that new connections are also made in the developing brain after birth. The somatic sensory cortex is a region of the brain that contains a map representing the body's surface (Figures 7 and 8). This map in the human brain is



Figure 4. Human motor skills improve rapidly during the first year of life. Although the sequence illustrated here emphasizes the development of motor behavior, this phase of development is also characterized by a surprising improvement of children's cognitive abilities. Indeed, rudiments of language begin to appear by this time of development.

called the "homunculus" (Figure 7), and similar body maps exist in the brains of all mammals. The brain's body map can be readily visualized in rats and mice in which it is organized in units termed barrels because of their three-dimensional appearance. Each of these barrels represents sensory organs such as the facial whiskers on the surface of the skin (Figure 8). Studying how the pattern of connections arises in the rat barrel somatic sensory cortex, Ariel Agmon and his collaborators at the University of California, Irvine, have demonstrated that neural circuits are progressively elaborated during postnatal life, and that elimination of connections does not occur in this region of the rat brain (Figure 9). Addition of new connections to immature neural circuits has been

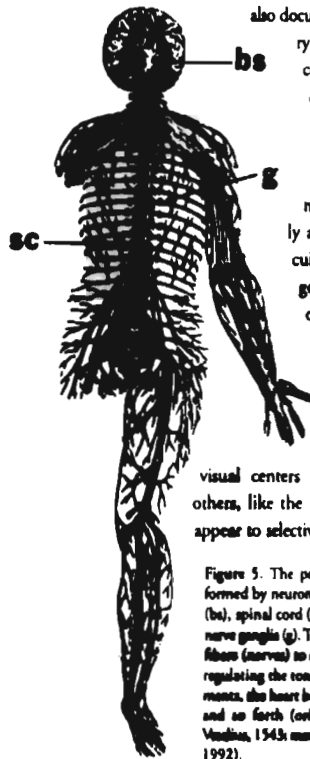


Figure 5. The peripheral nervous system is formed by neurons localized in the brain stem (bs), spinal cord (sc) and in different types of nerve ganglia (g). These neurons send their nerve fibers (nerves) to different target organs, thus regulating the tone of our muscles, gut movements, the heart beat, the pupil's reflex to light and so forth (original drawing by Andreas Vesalius, 1543; modified from P. T. Churchland, 1992).

also documented in the olfactory system, spinal cord and cerebellum during brain development. Thus, together these observations support the idea that neural connections are progressively added to immature circuits in the brain and suggest that different areas of the brain use different ways to shape their neural circuits during postnatal development. For instance, while areas such as the visual centers eliminate connections, others, like the somatic sensory cortex, appear to selectively create more.

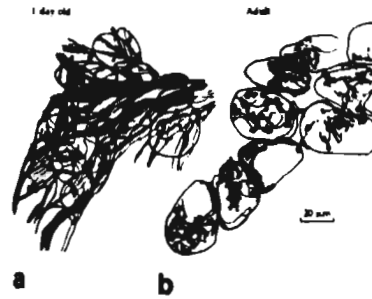


Figure 6. Some types of neurons (round outlines) in peripheral ganglia are reached by nerves from the spinal cord neurons: a) At birth, many fibers (dark lines) reach ganglion neurons but only few connections (dark dots) are made on them; b) As development continues and the adult pattern of connections is established, the number of nerve fibers diminishes while the number of contacts created upon ganglion neurons increases. This observation suggests that connections are added to immature neural circuits during postnatal maturation (from Purves and Lichtman, 1985).

SENSORY EXPERIENCE AND NEURAL CONNECTIONS

Up to this point, I have described evidence to the effect that the developing brain creates new circuitry as postnatal development proceeds. I shall turn now to an explanation as to how this might happen. I will summarize experimental data suggesting that sensory experience spurs the elaboration of neural connections in the brain.

For some time, psychologists have known that environments rich in sensory stimulation promote and improve, so to speak, the development of the brain and its functions. Experiments have demonstrated that groups of rats living in cages with "interesting objects to explore and play with" have relatively larger brains than those living in environments with poor sensory and social stimulation. Anatomic comparisons of brains from both groups of rats have shown that the number of neural connections increases in some brain regions of those animals exposed to sensory-enriched environments. Although these experi-

ments seem to support the contention that increased sensory experience promotes the elaboration of neural connections, it is important to point out that different parts of the brain respond differently to environmental enrichment. While some regions of the brain indeed increase in size, others do not change and even diminish in their dimensions. Thus, these experiments show that the effects of enriched sensory stimulation on the elaboration of neural connections are complex and that more research is needed before advancing further conclusions.

More clear evidence supporting the role of sensory stimulation in the development of neural circuits comes from studies of the brain structure following the surgical removal of sensory organs (i.e., anatomic deprivation). For instance, deprivation of visual experience after eye removal leads to a reduction in the number of neurons, their size and their connections in areas of the brain that process visual information. However, anatomic deprivation of sensory organs probably alters interactions other than those dependent on sensory experience, making the interpretation of these results difficult. This shortcoming has been solved by depriving animals of sensory stimuli without compromising



Figure 7. The human brain is divided in many distinct regions responsible for processing different types of information: a) One of these regions is called the primary somatic sensory cortex (dark area) since it receives tactile information (i.e., touch), such as vibration, temperature and pain; b) The somatic sensory cortex contains a representation of the body surface called the homunculus; c) This representation is somewhat distorted presumably reflecting anatomic differences in the sensory innervation of different parts of our bodies.

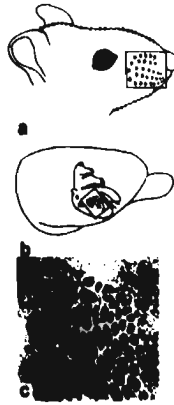


Figure 8. a) Mice whiskers provide tactile information necessary for these animals to survive in their natural environment; b) As in humans, these rodents have a body representation "imprinted" in the primary somatic sensory cortex of their brains. The head and, in particular, the whiskers occupy a large percentage of this body representation; c) The whisker representation in rats and mice can be readily seen in slices of the brain as geometric figures called barrels. Each of these barrels in the cortex represents each of the whiskers in the face. The anatomic definition of the whisker representation, among other reasons, makes it a suitable model to ask how neural connections are established during development.

anatomical links between the brain and sensory organs. An example of this kind of experiment is sewing the eyelids closed to accomplish visual deprivation while the eyes preserve their anatomic position. These sorts of manipulation have confirmed that the absence of sensory stimuli decreases neuron number, their size and the complexity of neural circuits in the brain.

The most compelling evidence supporting the hypothesis that sensory experience regulates neural size and growth and the elaboration of new connections has been furnished by natural models of increased sensory stimulation. For instance, in lactating rats some groups of neurons and their circuits increase in size and complexity as a result of suckling, the constant

Restrictions of the neurons' ability to grow and create new circuitry might also play a role in the pathogenesis of neurodegenerative disorders.

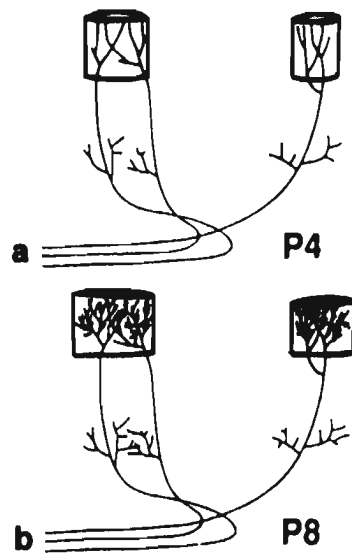


Figure 9. The development of neural circuits in the barrel cortex involves the gradual elaboration of connections: a) For instance, at day four after birth (P4), only a few branches extend from the nerve fibers in the barrel cortex; b) By postnatal day eight (P8), however, an increase in the number of branches per nerve fiber in the barrel cortex is observed. These results suggest that some regions of the brain assemble their circuits by increasing the number of connections as opposed to eliminating them.

stimulation of nipples by hungry and demanding pups (Figure 10). These changes in neural size enhance the ability of some of these neurons to secrete oxytocin, the hormone that facilitates milk secretion. These changes disappear once the suckling stimulus ends after weaning. These observations suggest, therefore, that increased sensory stimulation promotes neural growth and the elaboration of connections and that modifications in neural size and connectivity lead to striking changes in neural function.

SOME FUNCTIONAL IMPLICATIONS

Is the elaboration of connections necessary to accomplish normal brain function? Different lines of evidence document that this indeed is the case. It has been documented that neurons in different areas of the brain (including regions of the visual system!) increase their number of neural connections steadily during postnatal maturation. Conditions causing hormonal and or nutritional deficiencies, as well as some genetic syndromes that impair the formation of neural connections during brain development, lead to mental retardation in humans, and in rodents, to low performance scores in learning and memory tasks.

Restrictions of the neurons' ability to grow and create new circuitry might also play a role in the pathogenesis of neurodegenerative disorders such as Alzheimer's and Parkinson's diseases. As with humans, studies of aged animals have documented cognitive alterations associated to the degeneration of neurons and their connections in specific areas of the brain. This cognitive impairment can to some extent be reversed by treating the animals with proteins, known as neurotrophic factors, that stimulate neural growth and the elaboration of new circuits in affected areas.

The brain's capacity to modify its anatomy and function is termed plasticity, and perhaps it is best exemplified by the partial or total recovery of neural functions following severe head injuries. Although the mechanisms underlying this recovery are not fully understood, it has been shown that, in some cases, functional compensation follows the re-innervation of injured areas by their original connecting partners. This compensatory mechanism depends upon the ability of neurons to grow and make connections in a selective fashion.

While some regions of the brain indeed increase in size, others do not change and even diminish in their dimensions.

Neural connections and brain circuits are shaped by complex interactions of biological and environmental factors.

Addition of new neural connections have long been thought to underlie processes such as learning and memory. In support of this idea, it has been shown that certain patterns of electrical stimulation directly delivered to the hippocampus, a brain structure involved in learning and memory, not only strengthen neural connections and increase their ability to transmit information, but also induce the elaboration of new connections among stimulated neurons. Elaboration of new connections has also been reported in the cerebellum, a brain structure involved in learning some motor sequences.

Finally, evidence supporting the hypothesis that building up neural circuitry increases the capacity of the brain to process and store information comes from comparative anatomic studies among different animal species. These studies indicate that the progressive increase in brain size during evolution results not only from augmenting the overall number of neurons, but from increasing the brain's volume devoted to neural connections. It is likely that this increment in neural connections, and not their elimination, led to the anatomic and functional specializations of the mammalian brain.

In summary, neural connections and brain circuits are shaped by complex interactions of biological and environmental factors. Although it has been thought that the elimination of connections mediates the effects of these factors on the neural circuitry, recent evidence suggests that the developing brain elaborates new ones as postnatal development proceeds. This addition of new connections to neural circuits may explain the increased capacity of the developing brain to process and store information, its ability to generate complex patterns of behavior and its capacity to recover after different types of injuries.

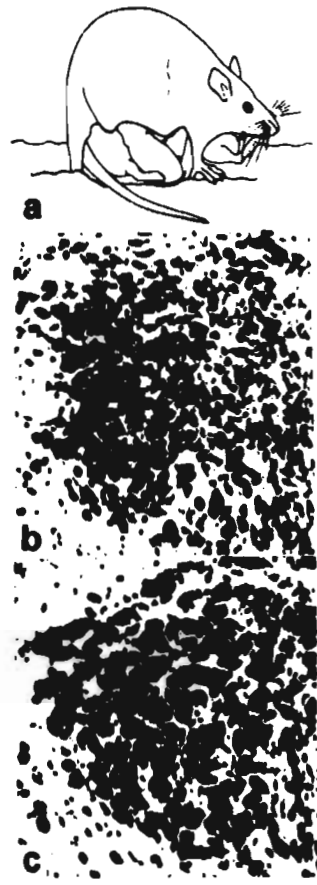


Figure 10. a) In lactating rats changes in the morphology of neurons and their circuits occur as a result of sensory stimulation. An example of these changes is illustrated by comparing the size of neurons of the paraventricular nucleus in the brain of virgin (b) and lactating (c) rats. Neurons in lactating rats are larger than in virgin rats. These differences in neural size disappear after weaning, thus suggesting that sucking stimulus (i.e., sensory stimulation) is important for the occurrence of these changes.