



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

“Constancia Sináptica de la Corteza Cerebral de los  
Mamíferos: Estudios en la corteza somatosensorial  
primaria de ratones transgénicos con distinto  
tamaño cerebral”

T E S I S

Que para obtener el Título de:

B I O L O G A

p r e s e n t a

GUADALUPE IVETT MEDINA AGUIRRE



FACULTAD DE CIENCIAS  
UNAM

DIRECTOR DE TESIS: DR. GABRIEL GUTIERREZ OSPINA

México, D.F.

DIVISION DE ESTUDIOS PROFESIONALES



2000

FACULTAD DE CIENCIAS  
SECCION ESCOLAR

201367



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

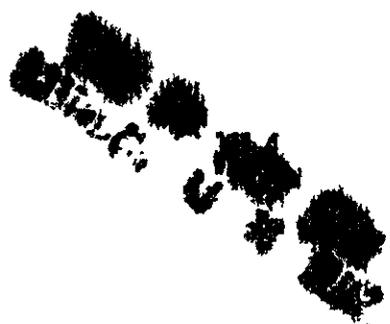
**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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.



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE  
MÉXICO



MAT. MARGARITA ELVIRA CHÁVEZ CANO  
Jefa de la División de Estudios Profesionales  
P r e s e n t e

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo de Tesis:

"Constancia sináptica de la corteza cerebral de los mamíferos: estudios en la corteza somatosensorial primaria de ratones transgénicos con distinto tamaño cerebral".

realizado por GUADLUPE IVETT MEDINA AGUIRRE

Con número de cuenta 9355016-7 , pasante de la carrera de Biología

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

- Director de tesis
- + Propietario
- ✓ Propietario
- ✓ Propietario
- ✓ Suplente
- ✓ Suplente

- Dr. Gabriel Gutiérrez Ospina
- Dr. Julio Morán Andrade
- Dr. Fernando Barrios Alvarez
- M. en C. Patricia Rivas Manzano
- M. en C. Leticia Granados Rojas

FACULTAD DE CIENCIAS  
U. N. A. M.



Consejo Departamental de Biología  
*Edna María Suárez Díaz*  
DRA. EDNA MARIA SUAREZ DIAZ

DEPARTAMENTO  
DE BIOLOGIA

## CREDITOS

Este trabajo se realizó en las instalaciones del Centro de Neurobiología, campus UNAM-UAQ Juriquilla bajo la asesoría del Dr. Gabriel Gutiérrez Ospina.

El apoyo económico para la elaboración de la presente tesis se obtuvo de los proyectos CONACyT J26697N e CONACyT J26293M.

## DEDICATORIAS

### **A mis padres**

Con todo cariño, a quienes se han empeñado y esmerado en formar mi vida, quienes siempre me han apoyado, impulsado y han sido, cada día una fuente infinita de inspiración en aquellos momentos de desgano y de incertidumbre para seguir adelante por el buen camino. Aquellos que nunca dejaron de sentirme como su niña pese al tiempo que transcurra.

Este, creo es un fruto de sus enseñanzas, tenacidad, cariño y amor profundo a la vida que forjaron, así pues, considérenlo como un tributo a su esfuerzo y trabajo que en mí han puesto.

Mi más profundo respeto y agradecimiento.

### **A mis hermanos Ricardo y Omar**

Mi más sincero agradecimiento para ellos por su cariño y su silenciosa pero siempre presente comprensión, apoyo e impulso que me han dado a lo largo del gran tiempo que nos conocemos.

Consideren como suyo este esfuerzo y junto con ello también una fuente de inspiración para el futuro de cada uno de ustedes.

Con todo cariño, mil gracias.

**A Gabriel Gutiérrez**

**Con todo mi cariño a quien ha sido mi sólido soporte académico que tuve en aquellos momentos de incertidumbre y total desgano.**

**Con todo respeto para el tutor y el mejor de los amigos, mis mas sincero agradecimiento.**

**Una dedicatoria muy especial para todos y cada uno de los que de alguna forma contribuyeron para que este trabajo sea una realidad. Muchas gracias.**

## AGRADECIMIENTOS

A Rafael Favila por su valiosísima ayuda, soporte técnico y muy atinados comentarios a este trabajo. Rafita, ¡muchas gracias!.

A Arturo por su apoyo en la realización de la parte fotográfica que tiene este trabajo. Don Artur, Gracias.

A los doctores Fernando Barrios, Julio Morán, Patricia Rivas y Leticia Granados por sus valiosos comentarios, consejos y crítica al presente manuscrito.

A Norma y Veronica por sus consejos, apoyo y principalmente por su amistad incondicional. ¡Chamucas mil gracias!

A mis compañeros y amigos Andrea, Araceli, Azucena, Diana, Eileen, Francisico, Helga, Lulú, Norma, Rosy y Sandra.

## RESUMEN 9

### INTRODUCCIÓN 11

### ANTECEDENTES 12

<b>Anatomía funcional de la neocorteza.</b>	<b>12</b>
<b>Vías aferentes y eferentes neocorticales</b>	<b>12</b>
Aferencias	12
Eferencias	13
<b>Histofisiología de la Neocorteza Cerebral: Generalidades</b>	<b>14</b>
<b>Citología neocortical</b>	<b>16</b>
<b>Neuroquímica neocortical (Fig.4)</b>	<b>20</b>
Acetil-Colina.	20
Ácido gamma-amino butírico	21
Ácido Glutámico	21
Otros aminoácidos neuroactivos	22
Catecolaminas	22
Serotonina	23
Otras aminas biogénicas	23
Cortistatina.	24
Somatostatina.	24
Polipéptido intestinal vasoactivo (VIP).	25
Colecistoquinina (CCK)	25
Otros péptidos	26
<b>Desarrollo de la neocorteza</b>	<b>26</b>
Generalidades sobre el desarrollo del sistema nervioso.	26
Corticogénesis	29
Histogénesis de la Neocorteza	30
<b>El sistema somatosensorial de la rata.</b>	<b>32</b>
<b>Generalidades estructurales del sistema somatosensorial (Fig.9)</b>	<b>33</b>
<b>Generalidades sobre el desarrollo del sistema somatosensorial.</b>	<b>34</b>
Establecimiento de la topografía.	34
<b>Aspectos sobre el factor de crecimiento tipo insulina I (IGF-I).</b>	<b>36</b>
Estructura	36
El gen para IGF-I	36
Fuentes de producción y factores de regulación de IGF-I	37
Función de IGF-I	37
Receptores para el IGF-1	37
Mecanismos de transducción asociados al IGF-I.	38

Regulación de los efectos de IGF-I: Proteínas fijadoras de IGF-s (IGFBPs)	38
---	----

## HIPÓTESIS 40

OBJETIVO GENERAL	40
------------------	----

MATERIALES Y MÉTODOS	41
----------------------	----

<b>Animales</b>	<b>41</b>
<b>Obtención y procesamiento de las muestras</b>	<b>41</b>
Histoquímica para la enzima deshidrogenasa succínica	41
Violeta de Cresilo	42
Microscopía Electrónica	42
<b>Obtención y análisis de los datos</b>	<b>43</b>
Determinación de las dimensiones de los barriles.	43
Estimación del tamaño, número y densidad celular en los barriles	43
Determinación del número de sinapsis	44
<b>Análisis de los datos</b>	<b>45</b>
<b>Validación de los métodos</b>	<b>45</b>

RESULTADOS	46
------------	----

Observaciones Generales (Figura 11 y Tabla 1)	46
Dimensiones de los barriles (Figura 12 y Tabla 2)	46
Estimación del tamaño, número y densidad neuronales (Figura 13 y Tabla 3)	46
Estimación del número de sinapsis por barril (Figura 14 y Tabla 4).	47

## DISCUSIÓN 49

CONCLUSIONES	54
--------------	----

BIBLIOGRAFÍA	55
--------------	----

## RESUMEN

La neocorteza está constituida por unidades verticales relativamente cilíndricas (30 a 50  $\mu\text{m}$  de diámetro) que se extiende desde su superficie hasta su profundidad. Dichas unidades reciben el nombre de minicolumnas y sus características anatómicas, neuroquímicas y fisiológicas son similares al comparar cerebros de distintos mamíferos. No obstante esta constancia estructural, aún se desconoce si el número de sinapsis por columna está igualmente preservado en cerebros de distinto tamaño. Así, en el presente trabajo estimamos el número de sinapsis en los barriles de la capa IV de la corteza somatosensorial en ratones normales y transgénicos que presentan diferencias significativas en su talla cerebral. La sobre expresión del factor de crecimiento insulina tipo I (IGF-I) en ratones transgénicos condujo a un incremento en el tamaño cerebral y cortical, así como en el área y el volumen de las columna en la corteza somatosensorial primaria (S1), al ser comparados con los fenotipos normales. En contraste, la expresión ectópica cerebral de la proteína fijadora 1 de los factores de crecimiento tipo insulina (IGFBP-1) en ratones transgénicos, condujo a decrementos en cada uno de los parámetros antes mencionados. No obstante las diferencias significativas en el tamaño cerebral, el número de sinapsis por unidad de área (7 sinapsis/20  $\mu\text{m}^2$ ) fue similar en los diferentes grupos de animales, sugiriendo que cada columna está constituida por unidades más pequeñas que podrían corresponder a minicolumnas (Mounccastle, 1997). Así, nuestras observaciones sugieren que el número de sinapsis por unidad de área columnar es constante en cerebros de diferente tamaño. Esto lleva a proponer que los cambios en las dimensiones del cerebro, de la neocorteza y de sus columnas resultan de incrementos en el número de minicolumnas que los constituyen. Nuestros resultados también sugieren que el aumento en el número de sinapsis reportado en cerebros de

mamíferos de mayor tamaño resulta de la adición de minicolumnas, y no de un incremento en el número neto de sinapsis por minicolumna.

## INTRODUCCIÓN

La neocorteza está organizada en minicolumnas que se extienden de manera radial desde la profundidad de la corteza hasta su superficie. Estas minicolumnas poseen una organización tal que sus dimensiones, el número y las proporciones relativas de los distintos tipos de células que las constituyen, su patrón intrínseco de conexiones, y su neuroquímica resultan similares al compararse cerebros de distintas especies de mamíferos. No obstante esta constancia, se desconoce aún si el número de sinapsis por minicolumna difiere en cerebros de distinto tamaño. Dado que el número de conexiones neuronales parece ser función del tamaño cerebral, uno podría suponer que el incremento en el número de conexiones observado en animales con cerebros de mayor tamaño podría deberse a un aumento neto en el número de sinapsis por minicolumna.

Una manera de abordar experimentalmente el estudio de este aspecto fundamental de la organización neocortical, consiste en determinar el número de sinapsis por unidad de área y/o volumen en cerebros de distinto tamaño, provenientes de diferentes especies de mamíferos. Si bien este abordaje comparativo es perfectamente factible, existen algunos problemas inherentes a él que lo hacen un tanto cuanto inoperante. Primero, es difícil obtener cerebros de una variedad importante de animales en condiciones adecuadas de fijación. Segundo, también se dificulta la obtención de un número adecuado de cerebros por especie animal que nos permita evaluar las tendencias poblacionales más que las variaciones individuales. Es por esto que, en el presente trabajo, tomamos ventaja de las diferencias en el tamaño cerebral de ratones transgénicos (Tg) con sobre expresión del factor de crecimiento insulina tipo I (IGF-I) y de aquellos con producción ectópica cerebral de la proteína fijadora 1 de IGFs (IGFBP-1) para estimar el número de sinapsis por unidad de área minicolumnar cortical en cerebros de distinto tamaño.

## **ANTECEDENTES**

### ***Anatomía funcional de la neocorteza.***

La corteza cerebral en los mamíferos, especialmente en la rata, está dividida en distintas áreas denominadas cortezas primarias y secundarias sensorio-motoras, y cortezas multimodales o asociativas (Fig.1). Las cortezas primarias y secundarias motoras son responsables de recibir y procesar información unimodal proveniente de los órganos de los sentidos por un lado ( i.e., visual, somestésica, gustativa, auditiva y olfatoria), y por otro, de generar comandos que permiten la ejecución del movimiento voluntario. Por su parte, las cortezas multimodales o asociativas integran la información proveniente de distintas regiones cerebrales, incluyendo aquella transmitida desde las cortezas sensoriales primarias y secundarias, permitiendo la percepción y la consecuente modulación de las respuestas conductuales, motoras y cognitivas (Shepherd, 1994; Waite y Trace, 1995; Beatty, 1995) .

### ***Vías aferentes y eferentes neocorticales***

#### **Aferencias**

Existen dos tipos generales de vías aferentes a la neocorteza, las denominadas cortico-corticales e intracorticales, y aquellas inter e intrahemisféricas, responsables de relacionar estructural y funcionalmente áreas homólogas y heterólogas a lo largo del mismo hemisferio y/o entre ambos hemisferios cerebrales, respectivamente (Killackey y Belford, 1979; Woolsey, 1990; Nieuwenhuys, 1994; Gutiérrez-Ospina, 1997).

Existe también aferencias corticales provenientes de los distintos núcleos del tálamo dorsal que proyectan a porciones específicas, o bien que terminan de manera difusa en la neocorteza. Los núcleos del tálamo dorsal que proyectan hacia áreas específicas de la neocorteza se dividen a su vez en tres subgrupos: a) aquéllos de relevo sensorial específico (núcleo geniculado medial, lateral y

ventrobasal), b) los núcleos relacionados con mecanismos de control eferente vinculados a funciones motoras como el núcleo reticular talámico, y c) los núcleos involucrados con funciones integradoras tales como el dorsomedial, ventromedial y posteromedial. Las regiones talámicas que proyectan de manera difusa son el núcleo medial y los núcleos intralaminares que reciben información del sistema reticular activador ubicado en el tallo cerebral (Killackey y Belford, 1979; Woolsey, 1990; Nieuwenhuys, 1994; Waite y Trace, 1995).

Otras vías aferentes corticales provienen de los núcleos del *rafe dorsal* y del *locus coeruleus*, localizados en la sustancia gris periacueductal del tallo cerebral (Nieuwenhuys, 1994; Waite y Trace, 1995; Ganon, 1998).

#### Eferencias

Las distintas regiones de la corteza cerebral envían proyecciones a una gran variedad de estructuras subcorticales. Las cortezas sensoriales primarias establecen contactos sinápticos recíprocos con cada uno de los núcleos talámicos de los que reciben aferencias (i.e., eferentes cortico-talámicas). Así mismo, existen vías eferentes corticales que alcanzan a las estructuras denominadas ganglios basales y diversos núcleos a lo largo del tallo cerebral. Finalmente, fibras nerviosas que nacen de las capas profundas de la corteza cerebral motora, alcanzan las astas anteriores de la médula espinal formando el tracto cortico-espinal, responsable de enviar información que permite la ejecución de los movimientos voluntarios (Pearlman, 1985; Price, 1995; Nieuwenhuys, 1994).

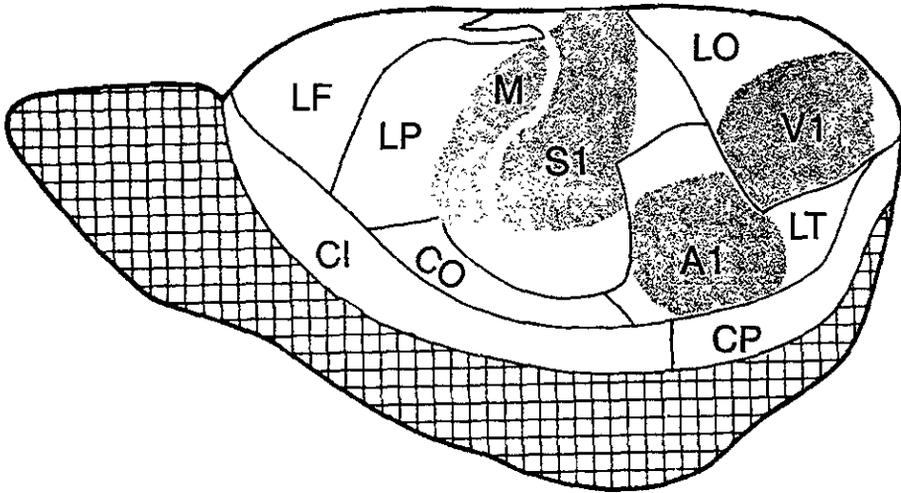
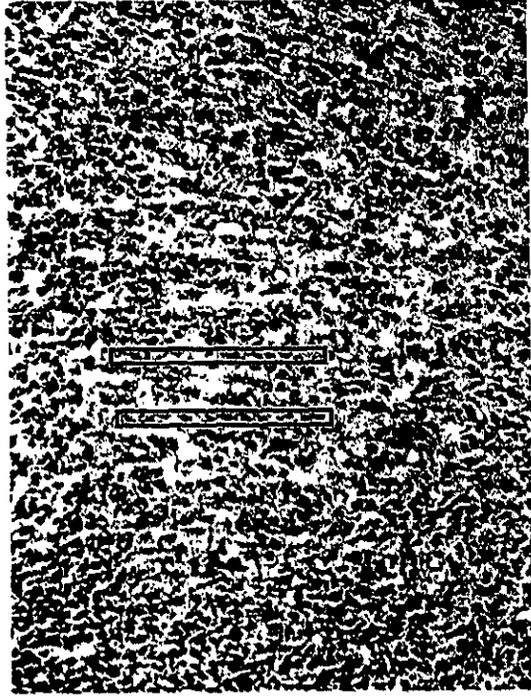


Figura 1. Vista lateral de la corteza cerebral de la ratona. Se muestran LF lóbulo frontal, LP lóbulo parietal, LT lóbulo temporal, LO lóbulo occipital, CO corteza orbital, CI corteza insular, CP corteza perirrinal, M corteza motora, S1 corteza somatosensorial primaria, A1 corteza auditiva y V1 corteza visual (Modificado de Zilles 1990 y Beatty 1995).

### ***Histofisiología de la Neocorteza Cerebral: Generalidades***

La neocorteza es una estructura organizada verticalmente en columnas y horizontalmente en láminas de células (Fig.2). La organización vertical o columnar de la neocorteza (Fig.2a) fue descubierta por Vernon Mouncastle con ayuda de técnicas electrofisiológicas en los años 50's. Desde entonces un gran número de estudios anatómicos y electrofisiológicos han demostrado que las neuronas neocorticales están organizadas en minicolumnas cuyas dimensiones se encuentran entre los 35 a 60  $\mu\text{m}$  de diámetro. Estas minicolumnas corren paralelas unas a las otras a lo largo de toda la extensión neocortical, y desde la profundidad hasta su superficie. Cada minicolumna representa una unidad básica de procesamiento de información, por lo que el número y la densidad neuronales, así como los patrones de conexión que se establecen entre las neuronas que las constituyen, son esencialmente similares al comparar minicolumnas de distintas áreas de un mismo cerebro, así como al comparar minicolumnas de cerebros provenientes de distintas especies de mamíferos (Rockell y col., 1980; Mouncastle, 1997). La estabilidad estructural de la minicolumna se traduce también en una estabilidad funcional y neuroquímica (Rakic, 1988; Swindale, 1990; Mouncastle, 1997). Las minicolumnas se agrupan en entidades anatómico-funcionales de mayor tamaño (300-500  $\mu\text{m}$  denominadas módulos (Woolsey y Van der Loos, 1970; Armstrong-James, 1975; Towe, 1975; Woolsey, 1990; Killacky, 1990; Mouncastle, 1997). Estos módulos agrupan minicolumnas que reciben, integran, procesan, y generan un mismo tipo de información, que es especificada por sus conexiones aferentes y eferentes (Woolsey, 1990; Senft y Woolsey, 1991; Favorov y Kelly, 1994; Malach, 1994; Mouncastle, 1997).

Organización columnar



Organización laminar

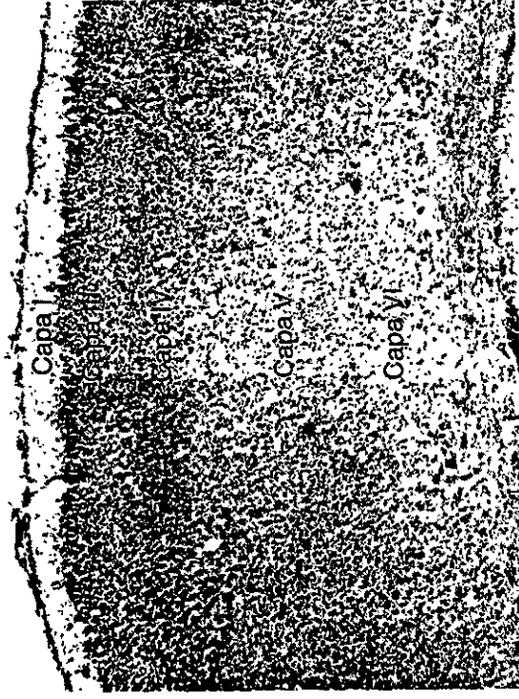


Figura 2. Fotomicrografías que muestran los dos tipos de organización de la neocorteza.

La neocorteza está también organizada en seis capas (Fig.2b). La capa I o molecular está formada por fibras nerviosas provenientes de los núcleos talámicos inespecíficos, del *locus coeruleus*, y de los núcleos del *rafe dorsal*. También está formada por las dendritas de las neuronas piramidales de las capas corticales subyacentes, además de neuronas pequeñas. La capa II o granulosa externa se caracteriza por presentar un predominio de neuronas piramidales pequeñas que envían sus procesos dendríticos a la capa I y sus axones hacia las capas más profundas. La capa III o piramidal externa está constituida por neurona piramidales de tamaño intermedio. Sus dendritas proyectan hacia la capa I, mientras que sus axones hacen sinapsis homo- y heterotópicas con fibras ascendentes y tangenciales de los hemisferios cerebrales ipsi- y contralateral. Además, las colaterales axónicas de las neuronas de la capa III establecen contactos sinápticos con neuronas de la misma capa y de las capas profundas. Las capas II/III reciben aferencias de los núcleos del *rafe dorsal* y del *locus coeruleus*. La porción profunda de la capa III también recibe escasas aferencias de los núcleos talámicos específicos. La capa IV o granulosa interna se caracteriza por presentar neuronas piramidales pequeñas que establecen conexiones intracorticales. No obstante esto, el tipo neuronal predominante en esta capa es el denominado espinosa estelar. Estas neuronas mantienen sus dendritas en la misma capa, y establecen conexiones entre sí y con las células de las capas II/III. Las neuronas espinosas estelares son el blanco principal de los núcleos talámicos específicos y de áreas homotópicas del hemisferio contralateral. La capa V o piramidal interna se caracteriza por tener neuronas piramidales grandes (i.e., Neuronas de Betz). Ésta capa recibe aferencias de las capas II/III homo- y heterotópicas, así como de los núcleos específicos talámicos, del *locus coeruleus* y de los núcleos del *rafe dorsal*. La capa V cortical constituye la aferencia motora de la corteza por lo que los axones de sus neuronas piramidales proyectan al cuerpo estriado, al tallo cerebral y constituyen el denominado tracto cortico-espinal, todos encargados de enviar los comandos necesarios para orquestar el movimiento

voluntario. Finalmente, la capa VI o de células polimórficas posee neuronas de tamaño variable predominantemente de los tipos fusiforme y piramidal. Esta capa recibe aferencias de las capas II/III homo- y heterotópicas, así como de los núcleos específicos talámicos, del *locus coeruleus*, y de los núcleos del *rafe dorsal*. La capa VI le da origen a tractos nerviosos que establecen contactos sinápticos recíprocos o no, con estructuras subcorticales (Purves y Lichman, 1985; Pearlman, 1985; Zilles, 1990; Shepherd, 1994; Sur y Coway, 1995; McConnell, 1995; Levit y col., 1997).

Todas las capas corticales poseen además un fuerte aporte de vasos sanguíneos que llega a alcanzar el 15-20% del área total. Así mismo, las capas poseen un porcentaje importante de células gliales y de interneuronas GABAérgicas (Purves y Lichman, 1985; Pearlman, 1985; Zilles, 1990; Shepherd, 1994; Sur y Coway, 1995; McConnell, 1995; Levit y col., 1997).

### ***Citología neocortical***

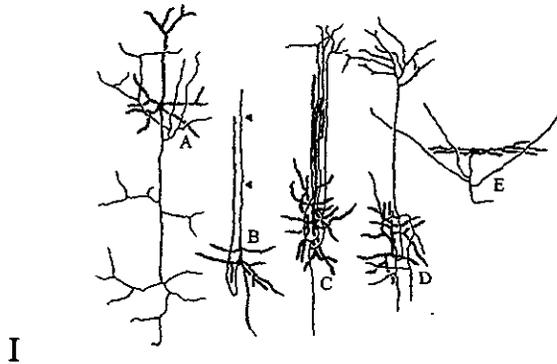
De manera general, las neuronas neocorticales pueden dividirse en dos subtipos: las neuronas piramidales y las no-piramidales (Fig.3). Las neuronas piramidales, que constituyen un 70% de la población neuronal total cortical, poseen un cuerpo celular piramidal y sus procesos dendríticos emergen de los vértices. El axón puede salir de un tronco común con una dendrita o independientemente de la base del soma celular y distribuirse en zonas corticales ipsi- y contralaterales, así como en áreas subcorticales (Nieuwenhuys, 1994; Parnavelas y McDonald, 1983; Zilles, 1990).

Las neuronas piramidales presentan contactos sinápticos asimétricos o excitatorios que se observan distribuidos principalmente sobre sus espinas dendríticas\*. Las neuronas piramidales ocupan predominantemente las capas II,

---

\* Entre las neuronas de la corteza cerebral existen dos tipos de sinapsis, las sinapsis asimétricas o tipo I y las sinapsis simétricas o tipo II. Las primeras se caracterizan por tener vesículas esféricas, y se ha sugerido que contienen neurotransmisores excitatorios (i.e. glutamato). Estas sinapsis presentan una banda de material electrodensito asociado a la membrana postsináptica. Las sinapsis simétricas o tipo II presentan material electrodensito en las membranas pre y postsinápticas. Las vesículas de este tipo de sinapsis son planas y se ha propuesto que contienen neurotransmisores de naturaleza inhibitoria (i.e. ácido gamma-aminobutírico GABA).

### Neuronas Piramidales



### Neuronas no Piramidales

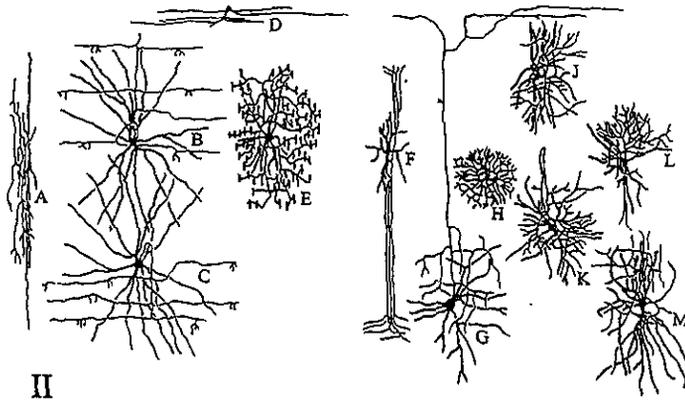


Figura 3. Dibujo en cámara lúcida de los diferentes tipos de neuronas presentes en la neocorteza de la rata. (I, A y C) Neuronas piramidales pequeñas de axón corto, típica de la corteza somatosensorial (S1), (I, B) neurona piramidal pequeña de la corteza estriada, (I, D y E) neuronas estelares espinosas de la corteza estriada. (II, A) Neurona no piramidal, bipolar de la corteza visual, (II, B y C) neuronas no piramidales en canasta, (II, D) neurona no piramidal de la primera capa de la neocorteza, (II, E) neurona no piramidal tipo candelero, (II, F) neurona no piramidal tipo doble penacho, (II, G) neuronas de Martinotti de S1, (II, H) neurona tipo glia de S1, (II, J) neurona no piramidal multipolar de S1, (II, K) neurona multipolar de S1, (II, L) neurona estelar de la corteza visual, (II, M) neurona estelar de la corteza visual primaria (Modificado de Nieuwenhuys, 1994).

III, V y VI de la corteza cerebral (Nieuwenhuys, 1994; Jacobson, 1991; Beatty, 1995).

Las neuronas no piramidales constituyen el 30% del total de las neuronas en la neocorteza. Este grupo de neuronas puede ser subdividido en interneuronas excitatorias e interneuronas inhibitorias. El tipo celular más importante de interneurona excitatoria en la corteza de los mamíferos es el denominado estelar espinoso. Este tipo celular posee un cuerpo pequeño y dendritas que radian desde él mismo, o bien que muestran una estratificación predominantemente horizontal o vertical. Su axón y colaterales establecen contactos asimétricos con neuronas estelares espinosas localizadas en la misma capa o con piramidales ubicadas en capas superficiales y profundas (Rockel y col., 1980; Parnavelas y McDonald, 1983; Handon y Zoran, 1994; Bourgeois, 1997). Las neuronas estelares espinosas se localizan exclusivamente en la capa IV, y son el blanco más importante de las aferencias talámicas provenientes de los núcleos específicos (Jones, 1983; Parnavelas y McDonald, 1983). Otro grupo de células excitatorias neocorticales está formado por interneuronas bipolares que muestran un cuerpo en forma de huso y ramas dendríticas lisas o con escasas espinas orientadas radialmente. Los axones de las interneuronas bipolares excitatorias se ramifican localmente estableciendo sinapsis asimétricas axo-dendríticas que posiblemente refuerzan a las aferentes excitatorias tálamo-corticales. Estas células están presentes en distintas capas corticales, y parecen recibir aferencias de las fibras tálamo-corticales y colaterales de las neuronas piramidales (Nieuwenhuys, 1994; Jones, 1983; Price, 1995).

La corteza cerebral posee además de las neuronas anteriormente descritas una población de interneuronas inhibitorias no piramidales que poseen dendritas libres de espinas o con un número de espinas muy reducido. Sus axones nunca dejan la corteza, y sus colaterales axónicas se distribuyen localmente estableciendo contactos sinápticos simétricos sobre sus blancos postsinápticos. Aunque existen distintos subtipos de interneuronas inhibitorias,

---

virtualmente todas ellas reciben contactos axo-somáticos simétricos y asimétricos, liberan ácido gama-aminobutírico como el neurotransmisor principal, y provienen de dos familias de precursores (revisado en Nieuwenhuys, 1994; Goldman y Luskin, 1998).

Describiremos a continuación de manera breve los subtipos de interneuronas inhibitorias:

Las neuronas en canasta son células multipolares que muestran dendritas poco ramificadas que emergen del cuerpo de forma radial. Su axón puede ascender o descender entre las capas corticales, y emite de 1 a 4 colaterales que originan ramas terminales finas formando un plexo alrededor de los cuerpos y sobre las porciones proximales de las dendritas de las neuronas piramidales y de otras células en canasta. Estas células son inmunorreactivas a GABA y a paralbúmina (una de las proteínas que participan en los procesos de amortiguamiento del calcio intracelular). Las neuronas en canasta superficiales parecen recibir aferencias córtico- y tálamo-corticales, además de fibras originadas en la neuronas piramidales, estelares espinosas, y doble penacho. Se desconoce aún el origen de las aferencias que alcanzan a las neuronas profundas en canasta (revisado en Nieuwenhuys, 1994).

Las neuronas en candelero son células multipolares presentes en las capas II y V. Su característica anatómica principal es que poseen un axón que genera un plexo profuso de ramas terminales orientadas verticalmente, sobre los segmentos iniciales de los axones de las neuronas piramidales y estelares espinosas. Estas neuronas presentan inmunoreactividad a GABA, paralbúmina y factor liberador de corticotropina. A la fecha, no se cuenta con información del origen de las aferencias que alcanzan a este tipo de células (revisado en Nieuwenhuys, 1994).

Las neuronas doble penacho se localizan en las capas II y III y presentan un árbol dendrítico bifurcado en dos bloques orientados predominantemente en el eje vertical. Su axón genera dos plexos de colaterales largas y orientadas radialmente que cruzan la mayor parte de las capas neocorticales. Las ramas

terminales de los axones de estas células establecen contactos sinápticos con las espinas y troncos principales de las dendritas basales y con las ramas oblicuas de las dendritas apicales de las neuronas piramidales. Así mismo, establecen contactos con los elementos postsinápticos de otros subtipos de neuronas no piramidales como son las neuronas en canasta. Si bien las neuronas doble penacho contienen GABA, estas células son muy heterogéneas desde el punto de vista neuroquímico. Así, estudios de inmunocitoquímica han mostrado que subpoblaciones de las neuronas doble penacho contienen takinina, colecistoquinina, y calbindina 28 (revisado en Nieuwenhuys, 1994).

Las neuronas horizontales presentan unas cuantas dendritas largas que siguen una ruta paralela a la superficie de la corteza. Sus axones largos y poco ramificados se extienden a lo largo de la superficie cortical llegando a alcanzar una longitud considerable. Estos axones establecen contactos sinápticos con las porciones distales de las dendritas apicales de las neuronas piramidales (revisado en Nieuwenhuys, 1994).

Las neuronas de Martinotti son células multipolares o en doble penacho que se observan predominantemente en las capas corticales V y VI. Su característica distintiva es que presentan un axón ascendente que da origen a colaterales horizontales a lo largo de su trayecto hacia la capa I. Así mismo, al inicio de su trayecto, los axones de las neuronas de Martinotti dan origen a ramas terminales que generan un plexo local muy profuso. Si bien se sabe muy poco sobre sus relaciones sinápticas, se ha sugerido que las neuronas de Martinotti reciben aferencias de las neuronas piramidales superficiales y que establecen contactos eferentes con las neuronas piramidales profundas y superficiales (revisado en Nieuwenhuys, 1994).

Las neuronas neurogliformes presentan un cuerpo pequeño del cual emergen numerosas dendritas cortas y sinuosas. Sus axones se ramifican profusamente alrededor del soma. Si bien este tipo celular está distribuido de manera más o menos homogénea en todas las capas corticales, es predominante de la capa IV en las cortezas sensoriales, en especial de primates.

Las neuronas neurogliformes establecen contactos recíprocos con las neuronas estelares espinosas y reciben aferencias tálamo-corticales específicas (revisado en Nieuwenhuys, 1994).

Otras interneuronas inhibitorias conocidas como elementos 11 a 14, se caracterizan por ser neuronas estelares sin o con muy pocas espinas. El elemento 11 se sitúa fundamentalmente en la capa II, recibe aferentes excitatorias de las neuronas bipolares y establece contactos inhibitorios con neuronas piramidales superficiales. El elemento 12 situado en la capa IV, recibe aferencias excitatorias tálamo-corticales y establece contactos inhibitorios sobre las neuronas piramidales y bipolares. El elemento 13 se localiza también en la capa IV, recibe aferencias tálamo-corticales y colaterales axónicas de las neuronas piramidales y en canasta. Sus axones ascendentes establecen contactos sinápticos con las neuronas piramidales superficiales. Finalmente, el elemento 14 se localiza en la región alta de la capa V, recibe aferencias de fibras tálamo-corticales y establece contacto con las neuronas piramidales profundas (revisado en Nieuwenhuys, 1994).

#### ***Neuroquímica neocortical (Fig.4)***

##### **Acetil-Colina.**

Las fibras aferentes colinérgicas provenientes del núcleo magnocelular del cerebro anterior se distribuyen ampliamente en distintas regiones y capas corticales. La densidad de terminales colinérgicas parece ser mayor en la capa V y en las capas superficiales corticales. Las respuestas excitatorias de las neuronas corticales, especialmente piramidales, para acetil-colina están mediadas predominantemente por receptores muscarínicos y son moduladas por norepinefrina, dopamina y serotonina. Se ha documentado que la liberación de acetil-colina cortical modula la liberación de distintos péptidos producidos en las neuronas corticales entre ellos destaca la somatostatina (Parnavelas y McDonald, 1983).

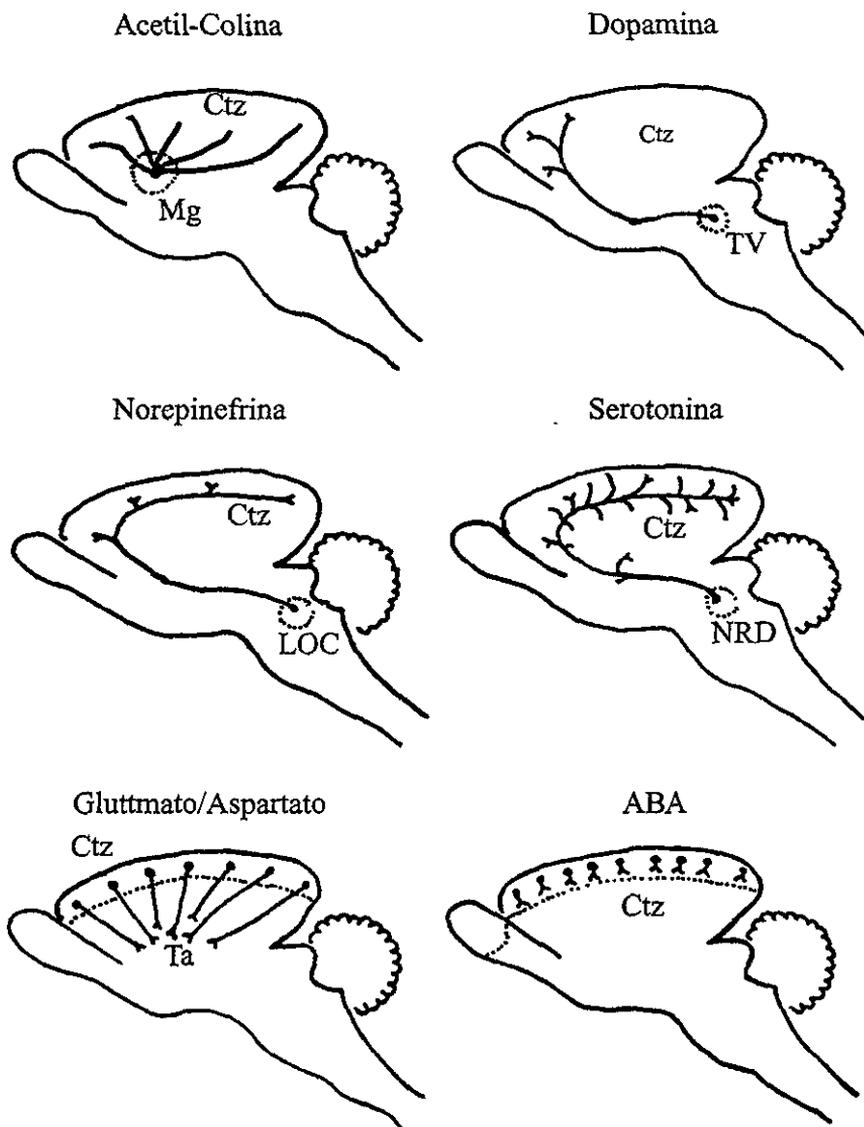


Figura 4. Vistas sagitales esquemáticas del cerebro de rata que muestran la distribución de las fibras aferentes catecolaminérgicas, dopaminérgicas, norepinérgicas, serotoninérgicas, glutamatérgicas/aspartatérgicas y GABAérgicas. (Ctz) neocorteza, (Mg) núcleos magnocelulares, (TV) área tegmental ventral, (LOC) núcleo *locus coeruleus*, (NRD) núcleo rafe dorsal, (Ta) tálamo, (Modificado de Salas y cols., 1998).

### Ácido gamma-amino butírico

El GABA es el neurotransmisor inhibitorio más importante en la neocorteza. La principal fuente de GABA en la neocorteza son las interneuronas piramidales tipo II y no-piramidales bipolares que se encuentran distribuídas homogéneamente en las distintas regiones y capas corticales. No obstante esta uniformidad general, existe un ligero predominio de terminales y neuronas inmunoreactivas a GABA en las capas superficiales de la corteza (i.e., capas I-IV) (Parnavelas y McDonald, 1983).

Hasta la fecha se han identificado tres tipos de receptores para GABA denominados GABA<sub>A</sub>, GABA<sub>C</sub> y GABA<sub>B</sub>. Los primeros dos tipos de receptores son ionotrópicos y modulan la conductancia del ion cloruro, lo que provoca la hiperpolarización de la membrana. Por otro lado, los receptores GABA<sub>B</sub> son de naturaleza metabotrópica por lo que están acoplados a una proteína G. Estos receptores interaccionan con canales de potasio o calcio (Dingledine y McBain, 1993; Lerma y cols., 1998).

Los receptores para GABA se encuentran en mayores concentraciones en el tubérculo cuadrigémino y diencefalo, y su número es menor en la neocorteza, puente y médula oblongada. (Dingledine y McBain, 1993; Lerma y cols., 1998).

### Ácido Glutámico

El ácido glutámico es el principal neurotransmisor excitador de la neocorteza. Es producido localmente por neuronas piramidales y no-piramidales distribuídas en todas las capas corticales. No obstante esta distribución general, se ha documentado un predominio de neuronas marcadas inmunocitoquímicamente para ácido glutámico en las capas IV-VI (Parnavelas y McDonald, 1983). Una fuente adicional de glutamato en la neocorteza la constituyen las aferentes talámicas provenientes de núcleos específicos.

Existen dos subtipos de receptores ionotrópicos postsinápticos para glutamato. Estos receptores se denominan AMPA (ácido  $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-

metil-4-isoxazol-propiónico) y NMDA (N-metil-D-aspartato). El tercer subtipo de receptor para glutamato es el conocido como metabotrópico (quisqualato). Este modula la liberación del ácido glutámico desde la terminal nerviosa. Por otro lado, receptores metabotrópicos para glutamato han sido identificados en la membrana postsináptica. Su función es la de regular la permeabilidad de canales iónicos y receptores ionotrópicos. En la neocorteza, los receptores AMPA y NMDA están distribuidos de forma regular en sus 6 capas. Ambos receptores actúan en conjunto para excitar la membrana postsináptica (Dingledine y McBain, 1993 y Lerma y cols., 1998).

#### Otros aminoácidos neuroactivos

Diversos estudios anatómicos y fisiológicos han mostrado la presencia, liberación y captura de ácido aspártico y taurina por neuronas y células gliales corticales. Los tipos neuronal y glial responsables de producir ambos aminoácidos no han sido aún identificados con precisión. Si bien las funciones que desempeñan ambos aminoácidos son aún motivo de controversia, se ha propuesto que la taurina pudiera jugar un papel importante en el desarrollo de la corteza cerebral pues su concentración decae con la edad (Parnavelas y McDonald, 1983).

#### Catecolaminas

Las fibras aferentes adrenérgicas corticales nacen de neuronas localizadas en el *locus coeruleus*. La densidad de inervación adrenérgica varía significativamente al comparar distintas capas y áreas neocorticales. Por ejemplo, en algunas especies de mamíferos, la corteza visual muestra una densidad de inervación mayor en las capas I-III, mientras que en la corteza somatosensorial la mayor densidad se encuentra en las capas profundas V y VI. Las aferentes adrenérgicas forman sinápsis axo-dendríticas, y sus acciones sobre las células corticales son mediadas por receptores alfa y beta

adrenérgicos. Los receptores beta tienen una distribución postsináptica mientras que los receptores alfa se han observado pre y postsinápticamente. Estudios de unión específica han mostrado que los receptores adrenérgicos se concentran en las capas superficiales de la corteza (Parnavelas y McDonald, 1983). Finalmente, estudios recientes han demostrado la participación de las fibras adrenérgicas en los procesos de plasticidad funcional cortical durante el desarrollo y en la edad adulta a través de ejercer diversas acciones neurotróficas y quizás modulando la liberación local de GABA (Hensch et al., 1998; Kolib and Sutherland 1992).

### Serotonina

Las vías serotoninérgicas se originan de neuronas localizadas en los núcleos lateral y medial del *rafe dorsal* en la formación pontina. Estas fibras ascienden a la corteza a través del tracto medial del cerebro anterior e inervan "en pasant" de manera difusa a la corteza corriendo desde regiones anteriores a posteriores. Si bien existen pequeñas variaciones en el patrón de inervación serotoninérgica al comparar distintas regiones corticales y distintas especies animales, su distribución espacial y densidad son bastante homogéneas en las distintas capas y a lo largo de la neocorteza. La serotonina modula la actividad de las neuronas corticales (e.g., decrece su actividad espontánea) a través de la activación de receptores del tipo 5HT1A y 5HT2B (Gutiérrez-Ospina y col., en preparación). Adicionalmente, se le ha atribuido un papel neurotrófico, independiente de su acción neuromoduladora, durante el desarrollo cortical (Parnavelas y McDonald, 1983).

### Otras aminas biogénicas

Diversos estudios han mostrado la presencia de histamina y dopamina, así como de algunos de sus receptores en la corteza cerebral. La distribución de ambas, sin embargo, es más restringida al compararlas con la distribución de las

catecolaminas y la serotonina. La dopamina se encuentra, principalmente, en regiones frontales y áreas límbicas, mientras que la histamina se distribuye predominantemente en regiones rostrales y temporales de la corteza (Pamavelas y McDonald, 1983).

#### Cortistatina.

La cortistatina es un neuropeptido que comparte 11 de los 14 aminoácidos estructurales con la somatostatina. No obstante su similitud estructural ambos péptidos son productos de genes separados. Se ha observado que la cortistatina presenta un efecto antagónico con respecto al de la acetilcolina. Otra característica de este neuropéptido es que las neuronas activadas por cortistatina también son estimuladas por GABA en varias parte del SNC (de Lecea y cols., 1997).

Neuronas inmunorreactivas a cortistatina han sido identificadas en los bulbos olfatorios, neocorteza, estriado, tálamo, cerebro medio y médula espinal. Las neuronas cortistatinérgicas neocorticales abundan en las capas II-III y VI, y están ausentes en la capa I. Estas células son interneuronas piramidales tipo II y no-piramidales bipolares (de Lecea y cols., 1997).

Durante el desarrollo de la neocorteza, la cortistatina se expresa después de la formación de las 6 capas, alcanzando su máxima concentración durante la segunda semana postnatal (P15-P21), periodo que coincide con la apertura de los ojos (de Lecea y cols., 1997).

#### Somatostatina.

Neuronas inmunorreactivas a somatostatina han sido observadas en las capas II-VI en distintas regiones corticales. Dos son los tipos neuronales que muestran inmunoreactividad para somatostatina. Ambos tipos son neuronas no piramidales en penacho y multipolares. Los efectos de la somatostatina sobre la actividad neuronal neocortical son diferentes en diversas poblaciones celulares.

Es claro, sin embargo, que este péptido es un neuromodulador de la actividad cortical, y su liberación es a su vez regulada por GABA, catecolaminas y acetilcolina (Parnavelas y Mc Donald, 1983).

#### Polipéptido intestinal vasoactivo (VIP).

Neuronas inmunopositivas a VIP se encuentran distribuidas entre las capas II-VI, y se concentran en las capas II y III neocorticales. Estas células constituyen dos poblaciones de neuronas, una de ellas bipolares dispuestas radialmente, y la otra, multipolares pequeñas localizadas predominantemente en las capas II y VI. El VIP posee acciones excitadoras sobre la actividad neuronal neocortical, a través de la activación de receptores ligados a la adenilato ciclasa (Parnavelas y Mc Donald, 1983).

#### Colecistoquinina (CCK)

Estudios anatómicos han documentado que cerca del 1% de la población de neuronas no piramidales en penacho y multipolares pequeñas muestran inmunoreactividad para CCK. Estas células se observan en todas las capas corticales, si bien predominan en las capas II y III. Estudios anatómicos detallados documentan que los axones derivados de estas neuronas forman plexos finos que se distribuyen localmente en las mismas capas corticales. También se ha documentado la presencia de inmunoreactividad para CCK en neuronas horizontales de la capa I. Existen diversas variantes moleculares de CCK en el cerebro. Las funciones de dichas variantes sobre la excitabilidad neuronal cortical están siendo evaluadas sin que se hayan alcanzado aún resultados consistentes. Finalmente, estudios autoradiográficos han mostrado que la mayor concentración de receptores para CCK se observa en las capas IV y VI (Parnavelas y McDonald, 1983).

## Otros péptidos

Estudios inmunocitoquímicos han mostrado la presencia de péptidos de la familia del polipéptido pancreático aviario, neurotensina, neuropéptido Y, sustancia P, motilina, metionina-encefalina, bombesina y dos de las variantes de la hormona estimulante de los melanocitos. La identificación de los tipos celulares que producen cada uno de estos péptidos y la distribución de sus receptores está en camino, así como la caracterización de sus funciones (Parnavelas y McDonald, 1983).

## ***Desarrollo de la neocorteza***

Generalidades sobre el desarrollo del sistema nervioso.

Después de la fecundación, y así de la formación del huevo o cigoto, los pronúcleos de los gametos masculino y femenino se fusionan, su ADN se duplica, y se da inicio a una serie de divisiones celulares, controladas por factores solubles citoplásmicos, que dan origen secuencialmente a entidades multicelulares denominadas, en orden cronológico, mórula, blástula y gástrula. Durante la transición de blástula a gástrula, ocurren una serie de movimientos morfogénéticos y migraciones celulares que permiten la formación, primero, de un embrión bidimensional bilaminar, y más tarde, de un embrión bidimensional trilaminar en el que se pueden identificar tres capas de tejido: el endodermo, el mesodermo y el ectodermo (Fig.5 A-E).

A lo largo del desarrollo embrionario subsecuente y a través de distintos mecanismos celulares y moleculares, el endodermo da origen a los distintos órganos que constituyen a los aparatos digestivo y respiratorio. El mesodermo, por su parte, origina a los músculos esqueléticos, los huesos, al tejido conectivo, y a los sistemas cardiovascular y urogenital. El sistema nervioso (SN) y la piel se forman a partir del ectodermo (Purves y Lichman, 1985; Jacobson, 1991; Gilbert 1991; Hatten y Heintz, 1999; Harland, 1997).

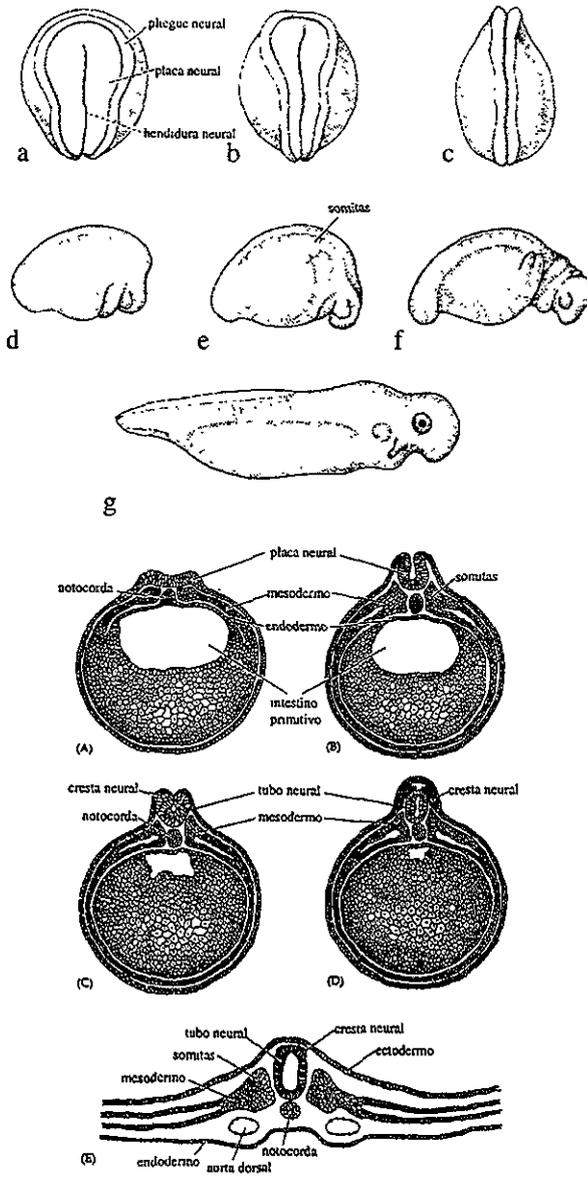


Figura 5. Vista superficial de un embrión en etapas de neurulación y estados más avanzados, en un embrión completo (a-c) y en cortes coronales del mismo. Estados de desarrollo más avanzados (d-g). Vista coronal de la formación del tubo neural (A-D). Vista coronal de un embrión que muestra la relación del tubo neural con las demás estructuras (E) (Modificado de Purves, 1985).

La evidencia que indica el inicio de la formación del SN es un engrosamiento medio-longitudinal que corre sobre la cara dorsal del endodermo (Fig.5 a-f). Este engrosamiento, conocido como la placa neural, resulta del incremento en la altura de las células del ectodermo a lo largo del eje longitudinal del embrión. Experimentos recientes han mostrado que el cambio en la altura de las células ectodérmicas se debe a un proceso inductivo en el que participan moléculas producidas en el mesodermo y el ectodermo. El ectodermo produce constitutivamente proteínas morfogenéticas del hueso (BMPs) que confieren a sus células una tendencia a transformarse en piel. Por otro lado, el mesodermo cordal parece producir, de una forma restringida en tiempo y espacio, proteínas (e.g., follistatina, noggina, y condrina) capaces de bloquear a las BMPs. Dicho bloqueo permite la progresión, en las células ectodérmicas, del programa de diferenciación neural (Harland, 1997).

Una vez formado el primordio de la placa neural, éste sufre cambios significativos en su longitud y grosor. La placa crece en sentido anteroposterior, siguiendo el crecimiento longitudinal del embrión, como resultado de la adición de nuevas células. En el eje horizontal, sin embargo, la placa neural disminuye sus dimensiones debido, por un lado, a un reajuste de las células del ahora llamado neuroectodermo, y por otro, a un incremento mayor de la altura celular acompañado de un adelgazamiento del citoplasma. En paralelo a estos cambios, el embrión, y por tanto la placa neural, se doblan ventralmente, y los bordes de la placa se elevan formando pliegues que corren longitudinalmente y que son más altos en la parte anterior del embrión. Durante este proceso, las células cilíndricas del neuroepitelio sufren una constricción apical, adquiriendo una forma semejante a una botella (Smith y Schoenwolf, 1997). Esta modificación se acompaña del engrosamiento de los bordes y la generación del surco o canal neural. En estadios subsecuentes del desarrollo, los bordes del canal neural se acercan por su extremo dorsal debido a la reducción en las dimensiones de las células neuroectodérmicas localizadas en el tercio medio de la pared del canal, y al crecimiento progresivo latero-medial del ectodermo epidérmico.

Finalmente, los bordes se unen, la piel se separa del neuroectodermo y se fusiona, y se crean dos repliegues dorsales que corren a lo largo del eje longitudinal paravertebral del embrión que se conocen como las crestas neurales. Las células de estas regiones darán origen a algunas de las estructuras que constituyen el SN periférico, a la médula adrenal y al sistema neuroendócrino difuso (Fujita y Kobayashi, 1978; Andrew, 1982; Hatten y Heintz, 1999). Una vez que el canal ha sido cerrado, se dice que el SN en desarrollo ha alcanzado la etapa de tubo neural.

Terminada la formación del tubo neural, este sufre dos flexiones y tres dilataciones como resultado de efectos hidrodinámicos y de los ciclos mitóticos asincrónicos. Dichas flexiones limitan tres grandes vesículas primarias denominadas, en sentido antero-posterior, el procencéfalo, el mesencéfalo y el rombencéfalo (Fig.6 A y B), (Martín y Jessell, 1991, Cowan, 1973; Cowan y col., 1984; Jacobson, 1991; Pansky y col., 1988; Hatten y Heintz, 1999). Como resultado de la adición de nuevas células y del consecuente incremento de la densidad celular del tubo neural, el procencéfalo y el rombencéfalo se dividen cada uno en dos vesículas secundarias. Así, el procencéfalo origina al telencéfalo y al diencefalo, mientras que el rombencéfalo da lugar al metencéfalo y al mielencéfalo. Durante este proceso, el mesencéfalo no sufre modificación alguna. De esta forma quedan definidos los segmentos básicos del SN (Fig.5 C, D y f, g). Más tarde en el desarrollo, el telencéfalo origina a la corteza cerebral, los ganglios basales, el hipocampo y los bulbos olfatorios. El diencefalo origina al tálamo, al hipotálamo, al subtálamo, a las retinas y a los nervios y tractos ópticos (Jacobson, 1978; Pansky y cols., 1988; Hatten y Heintz, 1999): El mesencéfalo se mantiene como tal, mientras que el metencéfalo da origen al puente. El mielencéfalo origina al bulbo raquídeo. El cerebelo, de origen mixto, se forma a partir de dos estructuras que nacen en la región dorsal lateral de la unión entre el bulbo y la protuberancia. Estas estructuras, conocidas como labios rómbicos, crecen en sentido latero- medial hasta fusionarse en la línea media dorsal del embrión (Pansky y cols., 1988; Gilbert, 1991; Hatten y Heintz, 1999).

Si bien los eventos descritos anteriormente determinan los segmentos y diferenciación generales del embrión en desarrollo, actualmente se sabe que cada uno de estos eventos resulta de la expresión de una familia de genes homeóticos que los especifican dentro de un marco espacio-temporal (Talbot, y cols., 1995)

### Corticogénesis

La neocorteza deriva de la región dorsolateral de las vesículas telencefálicas. La primera evidencia de su formación ocurre como una evaginación del telencéfalo, alrededor del día de gestación 14 en la rata. Hacia el día embrionario (E) 15/16, la neocorteza está básicamente formada por el neuroepitelio que se encuentra en franca actividad mitótica generando precursores y neuroblastos que más tarde migrarán para formar la placa cortical. Con base al grosor del neuroepitelio, durante esta edad se pueden distinguir dos gradientes de desarrollo neocortical. El primero de ellos es antero-posterior y el segundo sigue una dirección ventro-lateral a dorso-medial. Así mismo, a esta edad se distinguen ya el primordio de la capa plexiforme y algunas de las primeras neuronas diferenciadas que formarán la placa cortical, futura sustancia gris neocortical (Gilbert, 1991; Sur y Cowey; 1995; McConell, 1995). Para los días de gestación 17/18, las paredes de la corteza se han engrosado al aumentar el número de neuronas jóvenes en la placa cortical, e inician la formación de la capa IV cortical (Killacky y col., 1983; Killacky, 1990; Kintner y col., 1999). Paralelamente, el grosor del neuroepitelio se reduce y aparecen campos transicionales de diferenciación celular conocidos como las zonas subventricular e intermedia. Durante esta edad convergen fibras nerviosas a lo largo de la cara interna de la corteza que darán origen a la cápsula interna. Entre los días 18/19, el grosor del neuroepitelio está muy reducido en comparación con estadios previos. Para esta edad, los campos transicionales y la placa cortical han crecido considerablemente, siguiendo un gradiente en dirección

ventrolateral-dorsomedial. Por debajo de la placa cortical aparece una banda de células que corre en dirección latero-dorsal conocida como la subplaca. En la cara interior de ésta, se pueden observar las primeras fibras nerviosas que formarán el cuerpo caloso. Finalmente, entre los días embrionarios 20/21 el neuroepitelio se ha adelgazado considerablemente y su actividad mitótica aunque presente, también se ha reducido. La corteza cerebral ha ganado grosor a expensas de crecimiento continuo y rápido de los campos transicionales y de la placa cortical. El cuerpo caloso, por debajo de los hemisferios cerebrales, forma ya una estructura claramente discernible, al igual que la cápsula interna. Las primeras fibras interhemisféricas aparecen también a esta edad. Para el día 21 de desarrollo embrionario, la corteza ha adquirido su plan anatómico general, sus distintas áreas casi tienen completo su complemento de células, y empieza a diferenciarse hacia su forma adulta (Bayer y Altman, 1991; Gilbert, 1991; McConell, 1995; Kintner y col., 1999) .

#### Histogénesis de la Neocorteza

La formación de las capas celulares que constituyen a la neocorteza resulta de la migración, predominantemente radial\* de acuerdo a un patrón de organización minicolumnar, de clonas celulares que se disponen secuencialmente unas sobre otras siguiendo un gradiente de “adentro hacia afuera”. Así, si bien la capa más superficial cortical, que dará origen a la capa I, es la primera en formarse, son las capas profundas VI y V de la corteza las que se desarrollan primero, seguidas, en orden de aparición, de las capas IV, III y II (Rakic, 1988, 1990; Rakic y col., 1991; Favorov y Kelly, 1994; Malach, 1994; Mouncastle, 1997).

Las primeras células destinadas a formar la capa I aparecen alrededor del día 13 de gestación. Las células que darán origen a la capa VI empiezan a generarse al día E14, alcanzan su pico de proliferación entre los días E15 y E16, y cesan su generación casi totalmente para el día E17. Las neuronas de la capa

V inician su generación hacia el día E14, alcanzan su pico entre los días E15 y E17, y cesan su generación hacia el día E19.

Finalmente, las neuronas que ocuparán las capas IV, II y III corticales inician su generación entre los días E14 y E15 (más tardíamente para las capas más superficiales), alcanzan su pico entre los días E17 y E19, y cesan su proliferación para el día E21.

Los procesos de generación y posición celular en las distintas capas y minicolumnas corticales siguen el mismo gradiente ventrolateral-dorsomedial antes descrito. En general, el proceso de migración celular termina de 2 a 4 días después de que el pico de generación para las células de cada capa se ha alcanzado. Por esto, la corteza cerebral termina de ensamblarse después del nacimiento. Los procesos de muerte celular ocurren siguiendo el mismo gradiente ventrolateral-dorsomedial de desarrollo, y son consecutivos a la posición final celular y a la entrada de las vías aferentes provenientes de la corteza cerebral contralateral y de otras regiones cerebrales (Bayer y Altman, 1991; Jacobson, 1991).

Para terminar, cabe mencionar que las aferencias colinérgicas corticales que se originan en el telencéfalo basal alcanzan a la placa cortical durante los días E14/15, si bien no la penetran hasta el nacimiento. Estas aferencias expresan acetilcolina después de la segunda semana de vida postnatal. Las vías aferentes tálamo-corticales penetran la corteza hacia el día E19, y expresan transitoriamente acetilcolina durante la primera semana de vida postnatal (Schlaggar y O'Leary, 1994). Después de este periodo, las fibras tálamo-corticales adquieren un fenotipo glutamatérgico. Las aferentes dopaminérgicas mesencefálicas alcanzan la placa cortical hacia el día E15, aunque la penetran, al igual que las colinérgicas telencefálicas, solamente hasta el nacimiento. Las

---

\* Recientemente se ha mostrado que los neuroblastos migratorios también se desplazan tangencialmente una vez alcanzada la placa cortical en desarrollo (Goldman y Luskin, 1998). Esta forma de migración, sin embargo, no es el tipo predominante en la neocortiza de los mamíferos (para revisión ver Rakic, 1998). Así mismo, se ha documentado que las células precursoras pueden desplazarse tangencialmente en la pared ventricular permitiendo la dispersión de clones celulares lejos de su lugar de origen. También se ha documentado que algunas células neocorticales derivan, no de la porción del tubo neural correspondiente a los hemisferios cerebrales, sino a partir de los primordios de otras regiones telencefálicas (Hatten, y Heintz, 1999).

fibras noradrenérgicas originadas en el *locus coeruleus* alcanzan y penetran el primordio cortical hacia el día E17. El crecimiento longitudinal ulterior de estas fibras sigue el gradiente de neurogénesis antero-posterior y ventrolateral-dorsomedial, de tal manera que las regiones, capas y columnas formadas primero son también las primeras en recibir a la inervación adrenérgica. Por último, algunas fibras serotoninérgicas provenientes de los núcleos del *rafe dorsal* alcanzan el primordio cortical alrededor del día E17. La mayoría de la fibras serotoninérgicas arriban a la corteza hacia el día E19. Como es el caso para las fibras adrenérgicas, el desarrollo de las fibras serotoninérgicas también sigue los gradientes globales de desarrollo cortical. Así, nuevamente, las áreas, capas y columnas formadas más tempranamente son las primeras en recibir inervación serotoninérgica. La inervación serotoninérgica penetra la corteza cerebral entre los días 5 y 7 de vida postnatal, alcanzando su patrón adulto alrededor del día 12 (Bayer y Altman, 1991; Jacobson, 1991).

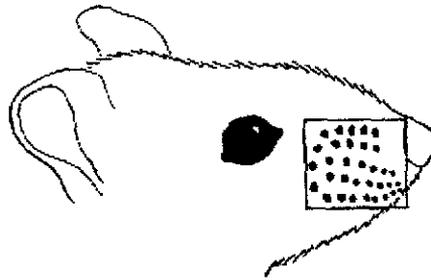
### ***El sistema somatosensorial de la rata.***

El sistema somatosensorial (S1) de la rata se ha utilizado como modelo experimental para investigar los principios y procesos celulares responsables de promover la formación y plasticidad de circuitos neuronales durante el desarrollo. Este modelo es especialmente útil debido a que cada uno de los relevos sinápticos mantiene una organización somatotópica, en registro con la distribución de los mecanorreceptores y otros receptores somatosensoriales distribuidos en la superficie del cuerpo (Fig.6 y 7). La organización somatotópica delinea a su vez representaciones anatómicas modulares de cada uno de los segmentos corporales, denominados barreletas, barreloides y barriles, a lo largo de los distintos relevos de la vía en el tallo cerebral, tálamo y S1, respectivamente (Fig.8, también ver abajo) (Woolsey y Van Der Loos, 1970; Woolsey, 1990; Riddle y col., 1992; Price, 1995; Gutiérrez-Ospina, 1997).

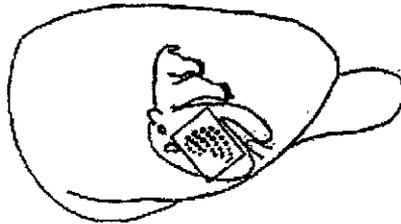
### **Generalidades estructurales del sistema somatosensorial (Fig.9)**

El sistema somatosensorial está constituido por receptores y vías sensoriales que son responsables de recibir, transferir, filtrar e integrar información táctil exteroceptiva (i.e., dolor, temperatura, discriminación gruesa y fina, presión y vibración) y propioceptiva derivada de las articulaciones y músculos. Las vías aferentes sensoriales primarias nacen en los cuerpos neuronales localizados en la cadena ganglionar dorsal paravertebral y dan origen a los mecano-, baro-, y termorreceptores localizados en la dermis y papilas dérmicas, así como a los husos musculares y tendinosos. Las aferencias sensoriales que transmiten el dolor generan terminaciones nerviosas libres, es decir, no asociadas a ningún receptor especializado, que se distribuyen en la dermis. La información somática sensorial proveniente de los receptores por las vías aferentes sensoriales primarias, se dirige hacia la médula espinal o al tallo cerebral sin hacer ningún relevo sináptico en el ganglio. Las mismas neuronas que originan a las aferencias primarias periféricas, transfieren la información hacia las astas dorsales de la médula espinal, o bien hacia los núcleos del trigémino en el tallo cerebral, a través de un proceso especializado, continuación de la vía aferente primaria (Waite y Tracey, 1995).

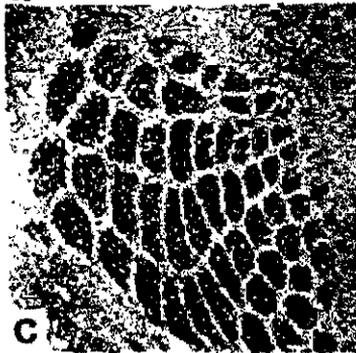
Para el caso de la información somatosensorial extero- y propioceptiva que concierne al tronco y a las extremidades, los procesos de las neuronas ganglionares que inervan estos segmentos corporales establecen contactos sinápticos con diversos núcleos de la médula espinal, dependiendo de la modalidad sensorial (i.e., temperatura, presión, vibración y dolor) que transmiten. Las neuronas espinales, nuevamente dependiendo de la modalidad sensorial, envían sus axones ipsilateral o contralateralmente hacia los funículos anterior y dorsal, tractos nerviosos a través de los cuales ascienden hasta el tallo cerebral. A lo largo del tallo cerebral, existen diversos núcleos que sirven de relevos sinápticos a los tractos somatosensoriales provenientes de la médula espinal. Por ejemplo, para la vía que conduce información táctil generada en los mecanorreceptores, y que viaja ipsilateralmente por los tractos *gracilis* y



**a**

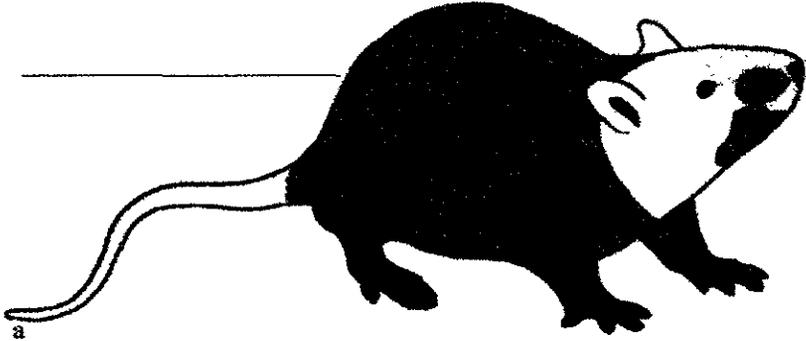


**b**

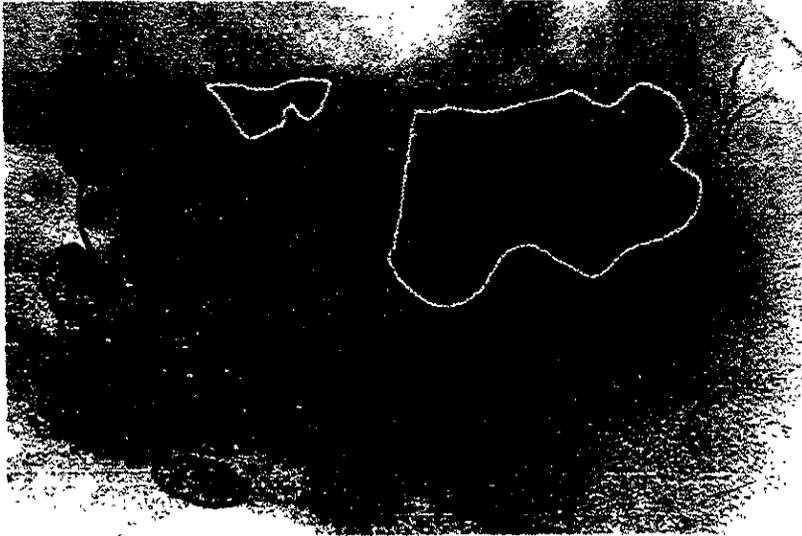


**c**

Figura 6. Distribución espacial y representación cortical de la vibrisas faciales en la rata. Los bigotes del hocico de rata (a) están representados en la capa IV de la corteza somatosensorial primaria (b), a manera de un conjunto de módulos o barriles localizados en la subzona de barriles posteromedial (PMBSF) (c). Así, cada barril de esta región representa de manera correspondiente cada uno de los bigotes faciales (Tomado de Gutiérrez-Ospina, 1997).



a



b

Figura 7. a) Dibujo que muestra los distintos segmentos corporales de la rata, cada uno de estos segmentos representados con un color diferente. b) Fotomicrografía del mapa corporal, cada segmento corporal se delinea de acuerdo al código de color mostrado en el panel a.

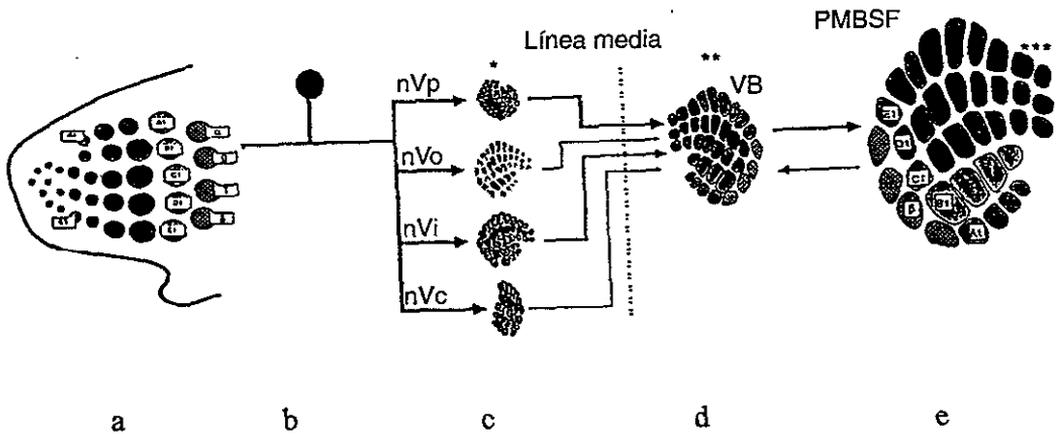


Figura 8. Esquema que representa la vía del nervio trigémino que transmite la información percibida por los bigotes hacia S1 (a). Esta vía nace en las aferentes primarias sensoriales del ganglio del trigémino (b), y esta constituida por tres relevos sinápticos. El primero es el núcleo del nervio trigémino en el tallo cerebral (c; nV). El segundo es el núcleo posteroventromedial del tálamo contralateral (d; VB). Y el tercero esta constituido por la corteza somatosensorial primaria (e; PMBSF). Esta vía se caracteriza por estar organizada en unidades citoarquitectónicas denominada barreletas en el tallo cerebral, barreloides en el tálamo y barriles en S1. Cada una de las unidades en los distintos relevos son la representación de colecciones discretas de mecanoreceptores localizados en los folículos de los bigotes (compare a y e) (Modificado de Woolsey, 1990).

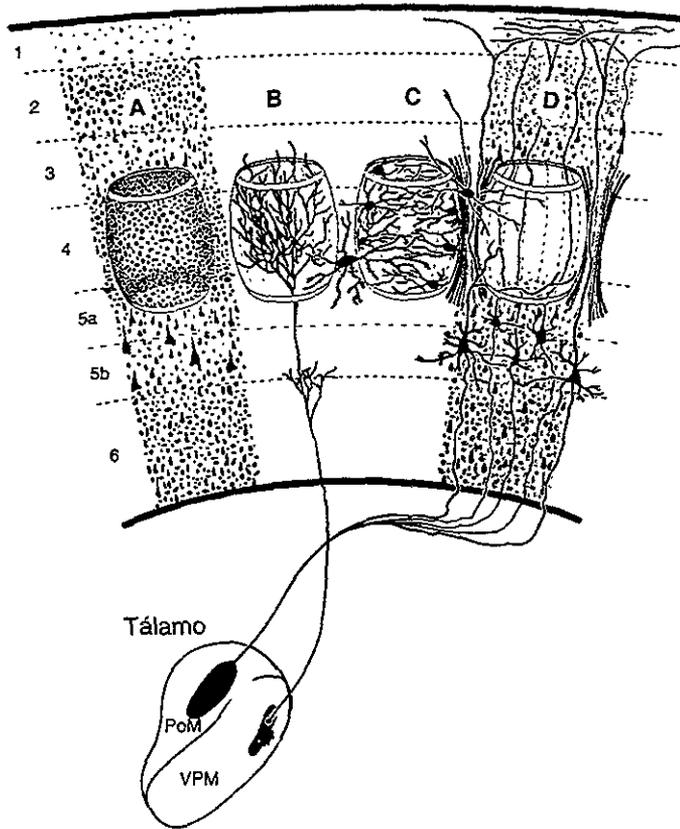


Figura 9. Esquema anatómico que representa los barriles en la capa IV de la corteza somatosensorial primaria (S1) de la rata. Note que el esquema representa un corte coronal de la corteza de la rata en el que se ilustran las seis capas que la constituyen, y la ubicación de los barriles en la capa IV, predominantemente. Los barriles están constituidos principalmente por las aferentes talámicas que provienen de los núcleos posteromedial (PoM) y ventroposteromedial (VPM) (Modificado de Waite y Tracey 1995).

*cuneatus* en los funículos posteriores, el relevo sináptico en el tallo cerebral son los núcleos homónimos. Una vez transmitida e integrada la información en los núcleos del tallo cerebral, las neuronas correspondientes proyectan a núcleos talámicos dorsales (en el caso particular de la información táctil derivada de mecanorreceptores de tronco y extremidades, el relevo talámico es el núcleo ventroposterolateral VPL) e hipotalámicos responsables de procesar las distintas modalidades de información somatosensorial, para luego, después de un tercer relevo sináptico, ser transmitida contralateralmente hacia las cortezas somatosensorial primaria y secundaria (Woolsey y Van Der Loos, 1970; Jones, 1983; Killackey, 1990; Woolsey, 1990).

La información somatosensorial proveniente de la cara y parte del cuello es, en mayor grado recibida y transferida desde la periferia hacia el tallo cerebral a través de las vías aferentes primarias generadas por las neuronas localizadas en el ganglio del nervio trigémino. Las aferencias primarias hacen relevo sináptico en el complejo nuclear del nervio trigémino, el cual es un conjunto de cinco subnúcleos que se extienden a lo largo del tallo cerebral. Algunos de estos subnúcleos proyectan hacia el cerebelo, los núcleos ventral y ventroposteromedial del tálamo, y al núcleo del nervio facial. El denominado núcleo principal del nervio trigémino proyecta hacia el núcleo ventroposteromedial del tálamo desde donde, después de un relevo sináptico, la vía sigue en dirección a las cortezas somatosensorial primaria y secundaria (Woolsey y Van Der Loos, 1970; Jones, 1983; Killackey, 1990; Woolsey, 1990). (Fig.10).

### ***Generalidades sobre el desarrollo del sistema somatosensorial.***

Establecimiento de la topografía.

El establecimiento de la topografía, es decir de los planos anatómicos mayores (i.e., dorsomedial, ventrolateral y posteroanterior), y de las relaciones espaciales de los distintos grupos neuronales entre ellos y a lo largo de los

relevo sináptico de la vía somatosensorial en roedores, ha sido estudiado más extensamente en la división cefálica de la vía. Como se mencionó con anterioridad, esta división se inicia con las aferencias primarias faciales del nervio trigémino que emergen del ganglio homónimo. De aquí, la vía proyecta secuencialmente al complejo del nervio trigémino en el tallo cerebral, al núcleo VPM(ventroposteromedial) del tálamo y a la corteza S1 (Woolsey y Van Der Loos, 1970; Jones, 1983; Killackey, 1990; Woolsey, 1990).

El establecimiento de las relaciones topográficas a lo largo de la vía trigeminal ocurre con base en tres procesos independientes entre sí, e independientes del desarrollo de la inervación periférica. El primero de estos procesos es el responsable de establecer las relaciones espaciales entre el ganglio del trigémino y el núcleo homónimo en el tallo cerebral. Esto ocurre alrededor del día 12 de gestación, y parece estar determinado por un fenómeno de fasciculación intrínseca de las aferencias primarias del nervio trigémino, asociado a la apoptosis de neuronas ganglionares. Así, existirán fascículos destinados a las regiones dorsal, ventral, caudal y oral de la cara. Esta organización primaria es "impuesta" sobre la estructura de los núcleos del nervio trigémino en el tallo cerebral cuando las aferencias primarias arriban a él. Al mismo tiempo que las vías aferentes primarias han alcanzado a las neuronas del núcleo del nervio trigémino e impuesto cierta organización en este relevo (edad gestacional 15), las neuronas de este último empiezan a extender sus procesos hacia el núcleo posteroventromedial talámico. Alrededor de la misma edad embrionaria, y por tanto de manera independiente del proceso de crecimiento de las vías aferentes trigémino-talámicas, las neuronas talámicas también inician el crecimiento de procesos en dirección a la corteza S1. Una vez más, tanto las aferentes trigemino-talámicas, como las tálamo-corticales crecen ya fasciculadas. En el caso de las primeras, su fasciculación refleja aquella observada en las aferencias primarias. Para las segundas, sin embargo, la fasciculación refleja la organización intrínseca del tálamo en sus planos dorsomedial, ventrolateral y posteroanterior. Esta organización será más tarde

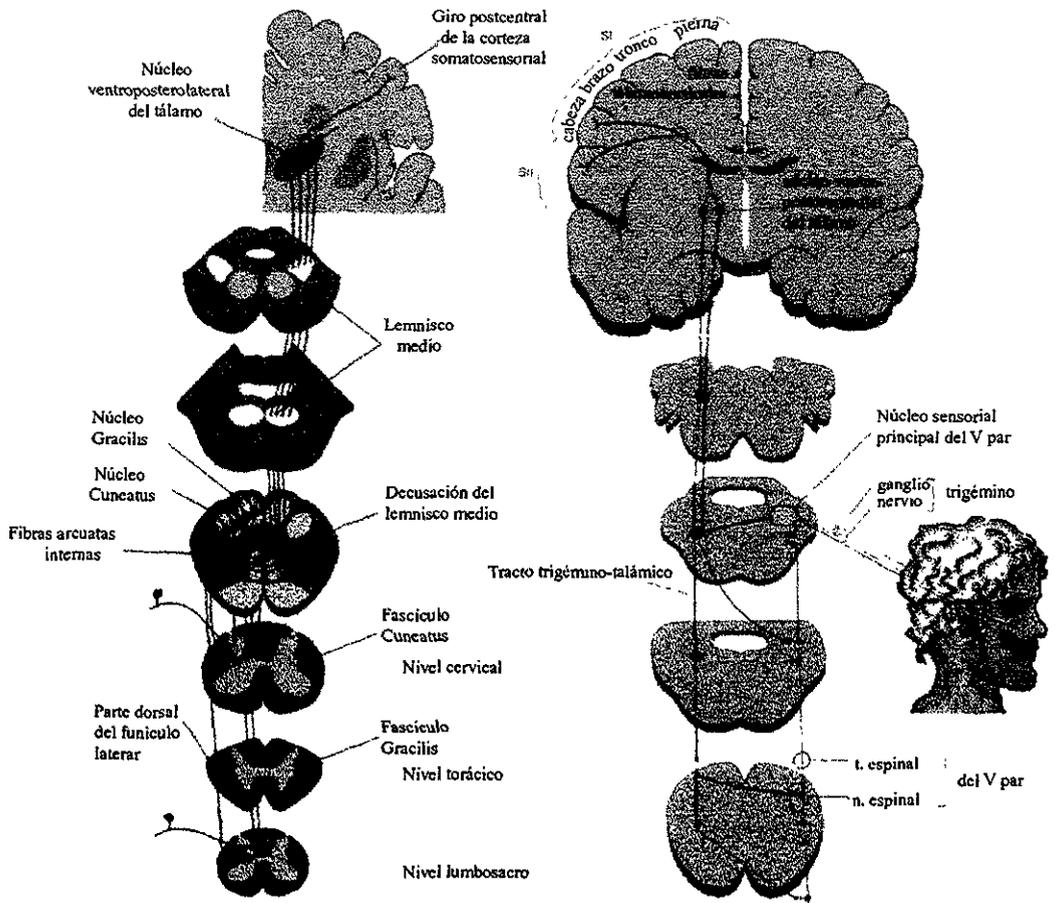


Figura 10. Imagen que muestra la vía ascendente (izquierda) que sigue la información recibida de los receptores localizados en la piel, y la vía descendente (derecha) que manda la corteza somatosensorial hacia la periferia (Modificado de Bloom, 1998).

impuesta sobre la estructura de la corteza cerebral, y se refleja en ella como un gradiente de desarrollo que sigue estrictamente los planos de diferenciación celular. Una vez conectados todos los relevos, y con base en mecanismos celulares de adhesión, las topografías de las aferencias trigémino-talámicas y tálamo-corticales finalmente coinciden (Woolsey y Van Der Loos, 1970; Jones, 1983; Killacky, 1990; Woolsey, 1990).

### ***Aspectos sobre el factor de crecimiento tipo insulina I (IGF-I).***

#### **Estructura**

El IGF-I pertenece a una familia de proteínas cuyos miembros son el IGF-II y la insulina. Está formado por 70 aminoácidos y organizado en cuatro dominios denominados A, B, C y D. Se conoce que el grupo génico del dominio B participa en la unión de IGF-I al subcampo de barriles correspondientes a las vibrasas IGFBPs. La función del dominio A es la de promover la proliferación celular y el crecimiento tisular. Finalmente, la sustitución de los residuos de tirosina en posiciones 24, 31 y 60 de la secuencia primaria de IGF-I producen la eliminación de la unión de su receptor (Daughaday y Rotwein, 1989; Pimentel, 1994 y D'Ercole y cols., 1996).

#### **El gen para IGF-I**

En el hombre, el IGF-I está codificado en un gen que se localiza en el brazo largo del cromosoma 12. Tiene un tamaño de 95 kilobases y está formado por cinco exones y cuatro intrones. La transcripción de este gen y la traducción del RNA mensajero (RNAm) puede generar dos pre-pro péptidos. Uno de ellos (IGF-IA), con tamaño de 153 residuos de aminoácidos es 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 5. Además el gen para IGF-I tiene dos promotores en el extremo 5' regulados en forma diferencial en los distintos tipos celulares (Pimentel, 1994, D'Ercole y cols., 1996).

### Fuentes de producción y factores de regulación de IGF-I

Si bien el hígado es el productor principal del IGF-I circulante, existen otras regiones del organismo que producen IGF-I, a través de mecanismos autócrinos y parácrinos. Entre ellos está el cerebro, lo que sugieren como productores y utilizadores de IGF-I local. La secreción endócrina, autócrina y parácrina está regulada por distintos factores entre los que destacan: la hormona del crecimiento, el factor de crecimiento epidérmico, la prolactina, la ACTH, las hormonas tiroideas y paratiroides, la progesterona, los estrógenos y el factor transformante de crecimiento beta (Pimentel, 1994).

### Función de IGF-I

El IGF-I modula el desarrollo embrionario y fetal, además de regular el crecimiento y el metabolismo corporal durante el desarrollo postnatal y en la vida adulta. De entre las funciones que tiene el IGF-1 cabe destacar la de modular algunos efectos de la hormona del crecimiento sobre el crecimiento celular en todos los tejidos, la regulación de funciones reproductivas a través de promover la maduración de algunos grupos celulares, estimula la reabsorción del hueso regulando la actividad osteoclástica, promueve la neovascularización y proliferación de los precursores hematopoyéticos (Pimentel, 1994)

### Receptores para el IGF-1

Los efectos sobre órganos blanco de IGF-I son mediados por un receptor específico localizado en la membrana celular (IGF-1r1). Este receptor es un heterotetrámero glicosilado formado por dos dímeros. Cada uno de estos dímeros están, a su vez, constituidos por una subunidad alfa (125 kDa), que constituye el dominio extracelular del receptor, y contiene la secuencia de aminoácidos que interacciona con el ligando. La subunidad beta, por otro lado, (90 kDa) constituye el dominio intracelular y posee actividad de tirosina cinasa.

El IGF-Ir1 es el producto de un gen localizado en el cromosoma 15 en el humano, y tienen una gran homología estructural con el gen que codifica el receptor de la insulina. De hecho, IGF-Ir1 y el receptor de la insulina puede formar receptores híbridos cuya función se desconoce. Se conocen dos isoformas del IGF-Ir1, las que se le han llamado 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 y cols., 1996).

**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, medida por la activación de 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 trasladado 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 cascada de la proteína cinasa activada por mitógenos (Pimentel, 1994, D'Ercole y cols., 1996).

Así, a través de estos mecanismos intracelulares de transducción IGF-I regula la expresión genética de diversas proteínas asociadas al control de los ciclos y de la proliferación y diferenciación celulares como son los genes de expresión temprana y sus productos (i. e., c-Fos, C-Jun, C-Myc, GAP-43) (Pimentel, 1994, D'Ercole y cols., 1996).

**Regulación de los efectos de IGF-I: Proteínas fijadoras de IGF-s (IGFBPs)**

La actividad biológica de los IGFs se modula por una familia de proteínas estructurales homólogas conocidas como IGFBPs (25-30 kDa). 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 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 mitógenos de IGF-I sobre condrocitos, la misma proteína producida por astrocitos bloquea la proliferación celular (Pimentel, 1994; Jones y Clemmons, 1995; D'Ercole y cols., 1996). Finalmente, es interesante que los mismos tejidos que expresan IGF-I, producen en paralelo su receptor y algunas de las IGFBPs (Lee y cols., 1992; Bondy y cols., 1991). Esto sugiere: a) La existencia de un mecanismo parácrino y/o autócrino por medio del cual IGF-I ejerce sus acciones sobre sus órganos blanco, y b) que las IGFBPs modulan los efectos de IGF-I directamente en el sitio en donde éste se expresa.

## **HIPÓTESIS**

Dada la conservación anátomo-funcional de las minicolumnas, se propone que el número de sinapsis es invariable en cerebros de distinto tamaño.

## **OBJETIVO GENERAL**

Determinar el número de sinapsis por columna y minicolumna en cerebros de distintos tamaños.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### ***Animales***

Se utilizaron ratones macho C56/B6, adultos (90 días de edad) control y transgénicos heterocigóticos para los genes humanos de IGF-1 e IGFBP-1 (Gutiérrez-Ospina y cols., 1996).

Los ratones fueron mantenidos bajo condiciones de luz y temperatura controladas, alimentados *ad libitum*, y con libre acceso a agua adicionada con 25mM de ZnSO<sub>4</sub>. Este compuesto activa al promotor de la enzima metalotioneina-I que dirige la expresión de ambos transgenes (Gutiérrez-Ospina y cols., 1996). La expresión de los transgenes IGF-1 y IGFBP-1 en el cerebro de nuestros ratones ha sido previamente caracterizada y muy bien documentada (Gutiérrez-Ospina y cols., 1996). A pesar de que los transgenes se expresan en todo el cerebro, existen variaciones en las dimensiones de diferentes regiones cerebrales que son proporcionales al grado de expresión del transgene. El inicio de la expresión de ambos transgenes en el cerebro coincide con el nacimiento, y alcanza un pico de expresión alrededor de los 21 días postnatales. Este patrón de expresión es, en gran medida, dependiente del consumo de zinc, si bien existe una producción endógena independiente del moderador (Gutiérrez-Ospina y cols., 1996).

### ***Obtención y procesamiento de las muestras***

Histoquímica para la enzima deshidrogenasa succínica

Animales control (n=6) y transgénicos (n=6) fueron anestesiados con pentobarbital (50mg/kg), y perfundidos con solución salina (0.15M) seguida de una solución de glicerol al 10% en agua. Los cerebros se removieron del cráneo y se pesaron. Las cortezas cerebrales fueron entonces disectadas, aplanadas entre dos portaobjetos separados por 2 mm, y congeladas en 2-metil-butano de

acuerdo al protocolo descrito por Riddle y cols., (1992). Las cortezas se cortaron tangencialmente a 30  $\mu\text{m}$  en un criostato a  $-20\text{C}^\circ$ , y los cortes se montaron en laminillas cubiertas con poli-L-lisina y se tñieron utilizando la técnica histoquímica para revelar la actividad de la enzima oxidativa deshidrogenasa succínica (SDH), la cual predice la distribución espacial de las aferentes talámicas en S1 (Killackey y Belford, 1979 y Riddle y cols., 1992).

### **Violeta de Cresilo**

Animales control y transgénicos fueron anestesiados con pentobarbital y perfundidos con solución salina seguida de una solución de paraformaldehído al 4% en amortiguador de fosfatos (0.1M, pH 7.4). Los cerebros se removieron del cráneo y se pesaron. Las cortezas cerebrales fueron entonces disectadas, aplanadas entre dos portaobjetos separados por 2mm, y postfijadas en el mismo fijador por 3 horas a temperatura ambiente. Las cortezas se cortaron tangencialmente a 50  $\mu\text{m}$  en un vibratomo.

Los cortes se montaron en laminillas cubiertas con poli-L-lisina y se tñieron utilizando la técnica de violeta de cresilo, con la cual que se hace evidente la localización de las paredes y los límites anatómicos de los barriles.

### **Microscopía Electrónica**

Animales control y transgénicos fueron anestesiados con pentobarbital y perfundidos con solución salina seguida de una solución de glutaraldehído al 5% en amortiguador de fosfatos (0.1M, pH 7.4). Los cerebros fueron extraídos del cráneo, y las cortezas disectadas, aplanadas, y postfijadas en el mismo fijador por una hora a temperatura ambiente, como se describió anteriormente. Se obtuvieron cortes tangenciales de 80  $\mu\text{m}$  en serie de la corteza utilizando un vibratomo. Los cortes fueron montados en portaobjetos, y visualizados en un microscopio estereoscópico con el objeto de identificar, por transiluminación, la región ocupada por S1. Los barriles D3 y C3 fueron microdisectados empleando

un sacabocados con un diámetro interior de 1mm. Estas muestras fueron entonces utilizadas para evaluar el número de contactos sinápticos siguiendo la técnica de tinción con ácido fosfotúngstico etanólico descrita por Bloom y Aghajanian (1968). Después de teñidas, las muestras fueron incluídas en epon y cortadas en un ultramicrotomo. Los cortes se montaron en rejillas embebidas en Formvar. Se obtuvieron cortes a tres distintos niveles de la muestra separada por 20 micras uno de otro. Los cortes fueron observados en un microscopio electrónico de transmisión (Carl Zeiss) a un aumento de 20 000X.

### ***Obtención y análisis de los datos***

Determinación de las dimensiones de los barriles.

Los cortes seriados teñidos histoquímicamente para la enzima SDH, se utilizaron para trazar mapas bidimensionales de la corteza, del PMBSF (ver figura 8) y de sus barriles con ayuda de una cámara lúcida en un aumento de 20x. Estos mapas se digitalizaron, y las áreas de sección de la corteza, del PMBSF y de sus barriles se determinaron con ayuda del programa Image (NIH), en acuerdo con los lineamentos del protocolo descrito por Riddle y cols., (1992).

Por otro lado, estos mismos cortes se usaron para calcular la altura (grosor de la capa IV cortical) y el volumen promedio de los barriles del PMBSF. 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.

Estimación del tamaño, número y densidad celular en los barriles

El área de sección neuronal y el número de neuronas en los barriles del PMBSF se estimaron en cortes tangenciales de 50  $\mu\text{m}$  de la corteza cerebral

teñidas con violeta de cresilo. 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 (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 del tamaño neuronal dentro de cada barril (Pasternak y Woolsey, 1975). Para cada grupo de animales se trazaron un total de 9000 siluetas de neuronas, con ayuda de la cámara lúcida (1500x), cuyo núcleo, nucleolo y citoplasma fueran claramente visibles. Estos dibujos se digitalizaron y las áreas neuronales medidas usando el programa Image (NIH).

Para estimar el número y densidad neuronales, se contaron las neuronas en cada uno de los 34 barriles del PMBSF en los mismo 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 la cámara lúcida a un aumento final de 450x. El número promedio de neuronas en los barriles de PMBSF se estimó con la fórmula: Número de neuronas por barril = número de neuronas en el corte por la altura del barril / 50  $\mu\text{m}$  (grosor del corte). La densidad neuronal promedio en los barriles del PMBSF se estimó mediante la fórmula siguiente: Densidad neuronal /  $\text{mm}^3$  = número de neuronas por barril / el volumen del barril.

#### Determinación del número de sinapsis

Los cortes procesados para microscopía electrónica fueron fotografiados a 20 000x de magnificación. Se obtuvieron 12 micrográficas del centro del campo (centro de barril) identificado con ayuda de cortes semifinos teñidos con azul de toluidina. Cada micrografía representó 19.53 micras cuadradas de superficie del barril, área que corresponde aproximadamente a la mitad del diámetro de una

minicolumna. El número total de contactos sinápticos por barril se estimó multiplicando el número de sinapsis en  $19.53\mu\text{m}^2$  por el área y el volumen promedio de los barriles en cada grupo de animales.

### ***Análisis de los datos***

Se obtuvieron los promedios para cada uno de los parámetros morfológicos medidos en cada grupo de animales. La significancia estadística de la diferencias encontradas entre los grupos control y los ratones transgénicos se evaluó empleando el análisis de varianza (ANOVA) y la prueba *t* de Student.

### ***Validación de los métodos***

El porcentaje de cambio del tamaño cerebral como resultado de los procedimientos de perfusión y aplanamiento se evaluó de acuerdo al método descrito por Riddle y cols., (1992). Debido a que se encontró que las perfusiones con paraformaldehído y glicerol alteran la talla cerebral en la misma proporción tanto en ratones controles como en los transgénicos, no se incluyeron factores de corrección en los datos morfométricos. La validación de los métodos usados, provienen del hecho de que todos los valores morfométricos obtenidos en nuestros ratones control fueron 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).

## RESULTADOS

### ***Observaciones Generales (Figura 11 y Tabla 1)***

El peso corporal entre animales controles y transgénicos no presentó diferencias significativas. No obstante, el peso cerebral se encontró aumentado 92% en los ratones transgénicos IGF-1 y reducido 24% en los ratones transgénicos IGFBP-1, en relación a los animales control. Así mismo, el área total de la corteza cerebral se encontró aumentada 81% en ratones transgénicos IGF-1 y disminuida 29% en ratones IGFBP-1 (ver también Gutiérrez-Ospina y cols., 1996).

### ***Dimensiones de los barriles (Figura 12 y Tabla 2)***

Como fue el caso para el peso cerebral y el área cortical, el área de sección de los barriles del PMBSF en los ratones transgénicos IGF-1 fue mayor en un 67%, en comparación con la de los animales control. En contraste, en los ratones transgénicos IGFBP-1 el área de sección de los barriles se encontró disminuida en un 25%. En concordancia, el área total de PMBSF fue mayor en un 60% y menor en un 26% en los ratones transgénicos IGF-1 e IGFBP-1, respectivamente, al compararlos con los ratones control. Finalmente, la altura y el volumen de los barriles del PMBSF se encontraron incrementados en un 17.8% y 95.4% en los ratones transgénicos IGF-1, y disminuidos en un 20.1% y 40.2% en los ratones transgénicos IGFBP-1, respectivamente, en relación a los valores control (ver también Gutiérrez-Ospina y cols., 1996).

### ***Estimación del tamaño, número y densidad neuronales (Figura 13 y Tabla 3)***

El área promedio de sección de las neuronas de los barriles del PMBSF en los ratones transgénicos IGF-1 aumentó en un 33%, mientras que aquella de los ratones transgénicos IGFBP-1 disminuyó en un 10% en comparación con los animales control. Si bien el número total de neuronas por barril en los ratones

transgénicos IGF-1 se encontró aumentado en un 24% y en los ratones transgénicos IGFBP-1 disminuido en un 15% en relación al control, el número de neuronas en una sección de 50 micras no fue significativamente diferente al comparar los distintos grupos de animales. En correspondencia a los cambios en el tamaño y número neuronales, la densidad celular en los barriles de los ratones transgénicos IGF-1 disminuyó en un 39%, mientras que en los ratones transgénicos IGFBP-1 incrementó en un porcentaje semejante (ver también Gutiérrez-Ospina y cols., 1996).

***Estimación del número de sinapsis por barril (Figura 14 y Tabla 4).***

Como era de esperarse dados los cambios de las dimensiones globales de los barriles, el número de sinapsis por barril se encontró aumentado en los ratones transgénicos IGF-I en un 55.4% y disminuidos en los ratones transgénicos IGFBP-1 en un 47.9%, al compararlos con los animales control. No obstante esto, el número de sinapsis en áreas restringidas a las dimensiones de una minicolumna fue equivalente para todos los grupos de animales.



Figura 11. Fotomicrografías que muestran cortes sagitales del cerebro en los ratones, (a) transgénicos para el gen IGF-1, (b) control y (c) transgénicos para el gen IGFBP-1. Nótese la diferencia en el tamaño entre los distintos grupos de animales.

Tabla 1. Pesos corporal y cerebral, y área de sección cortical en ratones control y transgénicos IGF-1 e IGFBP-1.

Líneas	Peso corporal (g)	Peso cerebral (g)	Área de la corteza (mm <sup>2</sup> )
Control (n=6)	33.18 ± 4.09	0.46 ± 0.01	51 ± 1
26L IGF-1 (n=6)	32.71 ± 2.34	0.88 ± 0.01* (91% ↑)	92 ± 4* (81% ↑)
BL IGFBP-1 (n=6)	32.43 ± 1.50	0.35 ± 0.01* (24% ↓)	41 ± 1* (29% ↓)

Promedio ± SEM; \* P<0.0001

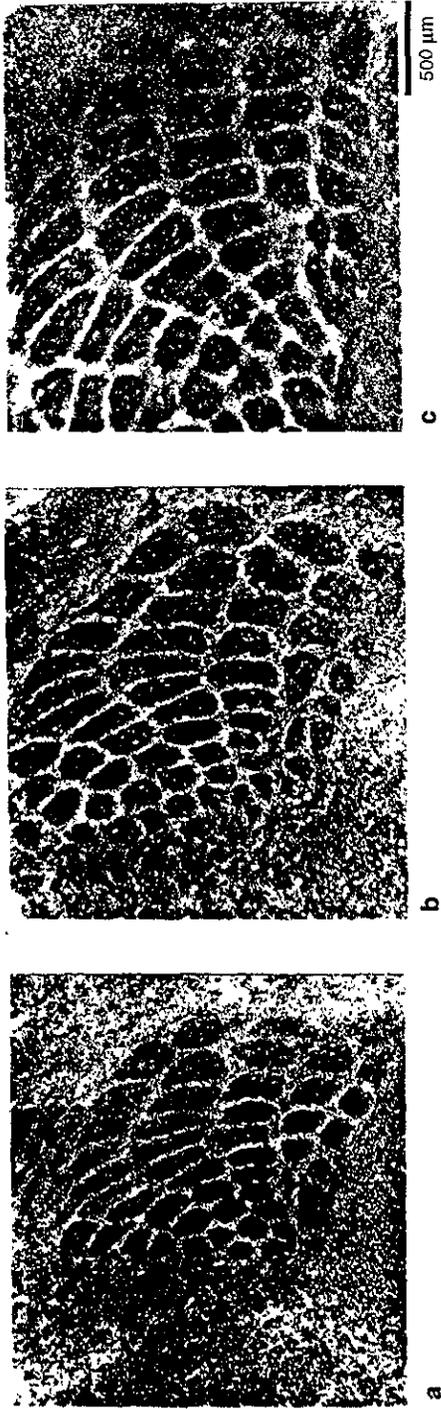


Figura 12. Fotomicrografías que muestra los barriles del PMBSF de ratones transgénicos para el gen IGF-1 (a), control (b) y ratones transgénicos para IGF-1 (c). Nótese la disminución y el incremento en el tamaño de la representación cortical de las vibrisas en los animales transgénicos para IGF-1 e IGF-1, respectivamente.

Tabla 2. Dimensiones de los barriles y área de sección de PMBSF en ratones control y transgénicos IGF-1 e IGF-1

Líneas	Área de barriles (mm <sup>2</sup> )	Área de PMBSF (mm <sup>2</sup> )	Altura del barril (mm)	Volumen del barril (mm <sup>3</sup> )
Control (n=6)	0.049 ± 0.004	1.80 ± 0.07	0.179 ± 0.001	0.0087 ± 0.004
26L IGF-1 (n=6)	0.082 ± 0.007* (67% ↑)	2.89 ± 0.01* (60% ↑)	0.211 ± 0.002* (17.9% ↑)	0.017 ± 0.013* (95.4% ↑)
BL IGF-1 (n=6)	0.037 ± 0.004* (25% ↓)	1.32 ± 0.04* (26% ↓)	0.143 ± 0.001* (20% ↓)	0.0052 ± 0.004* (40.2% ↓)

Promedio ± SEM; \* P<0.0001

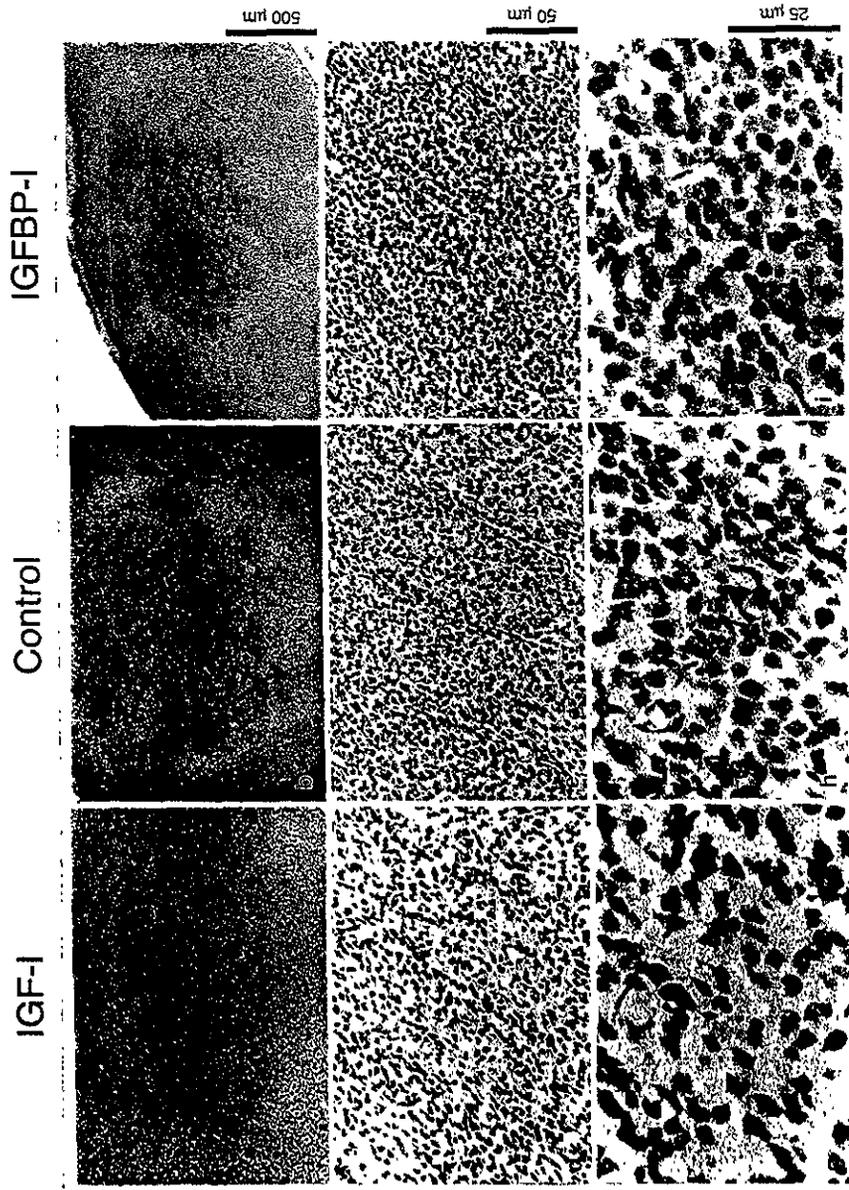


Figura 13. Fotomicrografías que muestra cortes tangenciales teñidos con violeta de cresilo a nivel de S1. Ratones transgénicos para el gen IGF-1, ratones control y ratones transgénicos para el gen IGFBP-1. Nótese la diferencia en el tamaño de la representación (a, b, c), en la densidad celular (d, e, f) y en el tamaño neuronal (g, h, i) entre los distintos grupos.

Tabla 3. Tamaño, número y densidad neuronales en los barriles de ratones control y transgénicos IGF-I e IGFBP-1.

Línea	Area de sección neural ( $\mu\text{m}^2$ )	No. De neuronas/barril	No. De neuronas/50 $\mu\text{m}$	Densidad neuronal ( $10^5/\text{mm}^3$ )
Control (n=3)	68.13 $\pm$ 12.28	1589 $\pm$ 101	444 $\pm$ 29	1.8 $\pm$ 0.41
IGF-I (n=3)	90.42 $\pm$ 13.41 <sup>a</sup> (33% $\uparrow$ )	1966 $\pm$ 84 <sup>a</sup> (24% $\uparrow$ )	466 $\pm$ 20	1.1 $\pm$ 0.08 <sup>a</sup> (39% $\downarrow$ )
IGFBP-1 (n=3)	61.41 $\pm$ 10.58 <sup>b</sup> (10% $\downarrow$ )	1344 $\pm$ 86 <sup>b</sup> (15% $\downarrow$ )	470 $\pm$ 30	2.5 $\pm$ 0.43 <sup>a</sup> (39% $\uparrow$ )

Promedio  $\pm$  SEM; <sup>a</sup> P<0.0001, <sup>b</sup> P<0.05

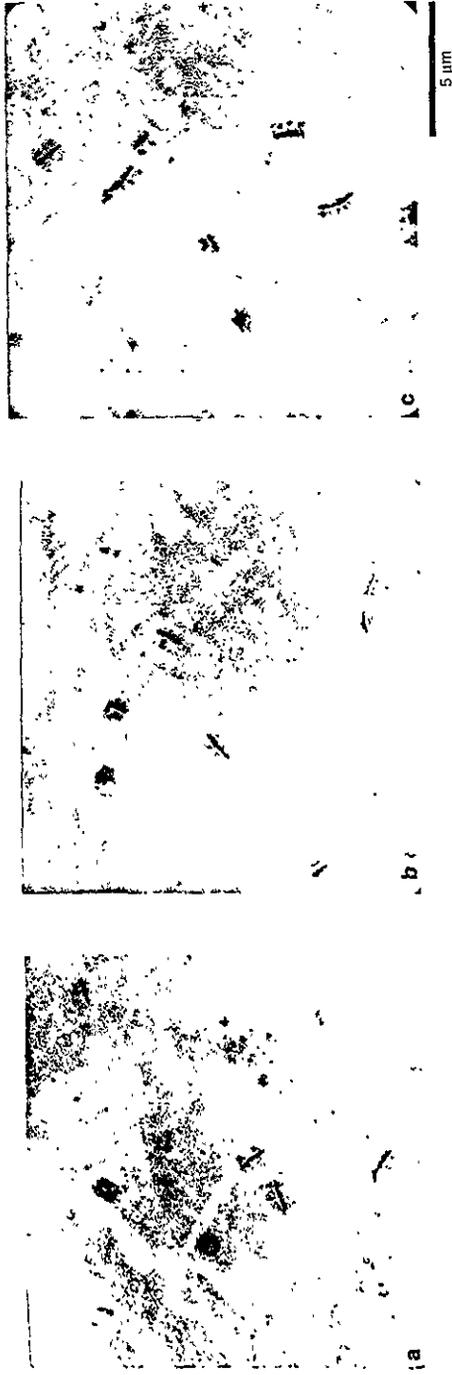


Figura 14. Micrografías que muestran el número de sinapsis en el barril D3 en ratones transgénicos para el gen IGFBP-1 (a), ratones control (b) y transgénicos para el gen IGF-1 (c). Las micrografías fueron tomadas de una región de 19.5 micras cúbicas al centro del barril. Nótese que el número de sinapsis es equivalente en todos los grupos.

Tabla 4. Número de sinapsis por barril en ratones control y transgénicos IGF-1 e IGFBP-1.

Línea	Sinapsis / barril	Sinapsis / $19.53 \mu\text{m}^3$
Control (n=6)	$74.553 \times 10^3$	$8.50 \pm 2.32$
26L IGF-1 (n=6)	$115.923 \times 10^3$ (55.4% ↑)	$6.70 \pm 1.64$
BL IGFBP-1 (n=6)	$38.783 \times 10^3$ (48% ↓)	$7.33 \pm 1.85$

Promedio  $\pm$  SEM;  $P < 0.0001$

## DISCUSIÓN

El IGF-I es un factor de naturaleza proteica que regula el crecimiento corporal. En fechas recientes, se ha sugerido que este factor, producido localmente, modula el crecimiento del cerebro fomentando la proliferación, maduración, y supervivencia neuronales. Los cambios en el peso cerebral, las áreas cortical, del PMBSF y de los barriles, así como en el número y tamaño neuronales en los barriles de ratones transgénicos con sobre expresión de IGF-I y expresión ectópica de IGFBP-1 cerebrales confirman el papel de IGF-I como factor promotor del desarrollo del cerebro. Es interesante destacar que los cambios en las dimensiones cerebrales no ocurren paralelamente a cambios en las dimensiones corporales. Se ha propuesto que el tamaño absoluto y relativo del cerebro depende, en gran parte, de la talla corporal. Nuestros resultados sugieren, sin embargo, que cambios en las dimensiones relativas y absolutas del cerebro y de las áreas que lo constituyen pueden proceder, hasta cierto punto, independientes de los cambios corporales, como producto de alteraciones en la disponibilidad local de factores de crecimiento del tipo del IGF-I (ver también Gutierrez-Ospina y cols., 1996).

Bondy y cols., (1993) han propuesto que el IGF-I promueve la sinaptogénesis en los distintos relevos de las vías sensoriales en desarrollo, durante las tres primeras semanas que siguen al nacimiento. Nuestros resultados apoyan esta idea. El "espacio" interior de los barriles esta constituido por un 3% de células gliales, un 15% de vasos sanguíneos, y el resto, por las conexiones sinápticas que se establecen entre las dendritas de las neuronas espinosas estelares de la corteza cerebral y las terminales axónicas de las vías aferentes provenientes del núcleo ventroposteromedial talámico. Es decir, el mayor porcentaje del neurópilo de los barriles lo ocupan las conexiones neuronales. Por lo tanto, cambios en las dimensiones de los barriles sugieren, en mayor grado, modificaciones en la cantidad de conexiones neuronales. Así,

los cambios del área de sección, la altura, y el volumen de los barriles en nuestros animales transgénicos apoyan la idea de que el IGF-I promueve la sinaptogénesis en los barriles de S1 durante el desarrollo. Así mismo, las modificaciones en la densidad, número y, sobre todo, del tamaño neuronal sugieren que el número de conexiones o sinapsis dentro de los barriles en desarrollo es afectado por la disponibilidad cortical de IGF-I. Existe una relación directa entre el tamaño del cuerpo neuronal, la complejidad del árbol dendrítico y su número de conexiones. También se sabe que la densidad neuronal reducida refleja un incremento en el número de conexiones neuronales. Finalmente, evidencia directa de que el IGF-I promueve la sinaptogénesis es mostrada por las estimaciones del número total de sinapsis por barril. El hecho de que los ratones transgénicos IGF-I e IGFBP-1 muestren, respectivamente, un 55% de incremento y un 48% de reducción del número total de sinapsis por barril confirma la importancia del IGF-I como factor promotor de la sinaptogénesis en la vía somatosensorial *in vivo*.

La eliminación de conexiones redundantes mediada por la competencia neuronal por factores neurotróficos liberados por los sitios blanco juega, en apariencia, un papel preponderante en el refinamiento y estabilización sináptica, y por tanto en el ensamblaje y determinación de la geometría de la circuitería neuronal (Figura11). Sin embargo, Agmon y cols., (1993) han publicado evidencia que muestra que las arborizaciones de las aferencias talámicas que inervan los barriles son elaboradas progresivamente, con una gran precisión topológica, a partir de un repertorio discreto de conexiones. Por otro lado, Riddle y cols., (1992) documentaron que el neurópilo de los barriles es construido progresiva- y selectivamente a lo largo del desarrollo postnatal. Así, en conjunto estos datos sugieren que la formación de sinapsis en los barriles de S1 involucra, en mayor medida, procesos de elaboración selectiva y no de eliminación de conexiones, como la idea convencional sugiere. El hecho que los barriles de nuestros ratones transgénicos se conserven como unidades anatómicas discretas, no obstante los cambios notables en su tamaño sugiere

que la elaboración selectiva del neuropilo está regulada por los niveles y biodisponibilidad de IGF-I. Todas estas observaciones nos indican que las reglas que gobiernan el desarrollo de las conexiones tálamo-corticales son diferentes en distintas áreas corticales. Si bien, en la corteza visual y otras regiones del sistema nervioso central, las sinapsis redundantes son eliminadas por un proceso mediado por competencia neuronal por factores neurotróficos, en la corteza somatosensorial la estrategia de desarrollo parece ser diferente. Aquí, las aferentes talámicas arriban a S1 con alta precisión topológica y elaboran sus conexiones selectivamente dependiendo de la cantidad de factor neurotrófico disponible. En este contexto, los procesos de competencia son innecesarios (Figura 11)

La neocorteza esta formada por minicolumnas de 30-50  $\mu\text{m}$  de diámetro organizadas radialmente a lo largo de la superficie cerebral. Además de las dimensiones, estos módulos poseen una estructura, número y tipo de células, patrones intrínsecos de conexión, propiedades fisiológicas y neuroquímicas comunes en todos los cerebros de los mamíferos estudiados hasta la fecha. Es aún desconocido si el número de sinapsis por minicolumna en cerebros de diferente tamaño esta también conservado. Debido a que el número de conexiones neuronales, y presumiblemente la capacidad para procesar información de los circuitos, parece estar en relación directa con el tamaño cerebral, se podría imaginar que las minicolumnas de los cerebros de mayor tamaño pudieran tener un mayor número de sinapsis. Este, sin embargo, no parece ser el caso. Nuestros resultados sugieren que el número de sinapsis en las minicolumnas de animales con cerebros grandes o pequeños es semejante, si bien el número total de sinapsis es mayor en los primeros. Estos datos, apoyan la idea de que, durante la evolución, el cerebro incrementa su tamaño en base a adicionar unidades básicas altamente estereotipadas (i.e., minicolumnas) cuya estructura es esencialmente la misma (ver también Rakic, 1988). Así mismo, nuestros datos sugieren que el incremento en el tamaño de la corteza cerebral a lo largo del desarrollo ontogenético se debe a la estabilización del

número de minicolumnas por efectos neurotróficos. Previamente se ha documentado que IGF-1 promueve la supervivencia neuronal. Así, la estabilización del número de columnas, podría resultar de un incremento de la sobrevivencia, y por tanto, del número de neuronas en las dimensiones radial y tangencial de la corteza, producto de interacciones neurotróficas. Nuestros resultados que muestran los cambios en las dimensiones de los barriles en los animales transgénicos apoyan fuertemente esta idea.

Un aspecto técnico de nuestro trabajo que podría disminuir la importancia de las presentes observaciones es que los ratones control y transgénicos presentan, presumiblemente, un contexto genético similar. Nuestros hallazgos podrían ser atribuidos, por tanto, a restricciones genéticas especie-específicas. Si bien nuestros datos no pueden descartar esta posibilidad, estudios recientes en la corteza visual de varias especies de mamíferos, incluyendo el hombre, han mostrado que el número de sinapsis por milímetro cúbico es muy similar. Esta evidencia valida nuestras observaciones, y en conjunto, sugiere que existe una restricción, no especie-específica, sino filogenética del número de conexiones por minicolumna.

Finalmente, nuestras observaciones modifican la definición de lo que es un barril cortical desde el punto de vista estructural. Tradicionalmente, los barriles han sido considerados como las representaciones anatómicas de las minicolumnas en S1 de los roedores. Los datos de que el número total de neuronas y sinapsis covarían con el tamaño del barril y que el número de sinapsis sea similar en áreas pequeñas contenidas en las dimensiones de una minicolumna apoyan que los barriles están constituidos en sí mismos por unidades estereotipadas estructuralmente. Esto no es sorprendente puesto que estudios previos han mostrado grupos de neuronas unidas por uniones estrechas formando dominios dentro de los barriles. Además, se han observado la presencia de "parches" de alta y baja actividad metabólica alternados a lo largo y ancho del neurópilo del barril. Estos dominios y parches bien pudieran representar las subunidades citoarquitectónicas que conforman cada barril.

Dicho en otras palabras, cada barril representa en realidad una macro- o hipercolumna; un conjunto de minicolumnas con características anatómicas y fisiológicas similares.

## CONCLUSIONES

Nuestros resultados confirman el papel de IGF-I como factor promotor del desarrollo de los barriles de S1.

El efecto de IGF-I no promueve la sinaptogénesis *per se*. El cambio en el número de sinapsis observado en los animales transgénicos probablemente es producto de cambios en el número de minicolumnas.

Debido a que los barriles se conservan como unidades anatómicas discretas, nuestros resultados apoyan que IGF-I promueve la elaboración discreta y progresiva de neurópilo.

La elaboración de conexiones depende de concentraciones crecientes de factores neurotróficos.

El número de sinapsis en las minicolumnas de animales con cerebros grandes o pequeños es semejante.

El tamaño final de la neocorteza resulta de la estabilización del número de minicolumnas que la constituyen.

Los barriles están constituidos por unidades altamente estereotipadas, por lo que deben ser visualizados como macrocolumnas.

El incremento en el tamaño cerebral a lo largo de la evolución puede resultar de un elevación en la producción de factores de crecimiento, seguido de un aumento en la sobrevivencia neuronal.

## **BIBLIOGRAFÍA**

1. Agmon A, Yang LT, Jones EG, O'Dowd DT (1995) Topographical precision in the thalamic projection to neonatal mouse barrel cortex. *J Neurosci* 15: 549-561.
2. Andrew A (1982) The APUD concept: Where has it led us. *Brit Med Bull* 38: 221-230.
3. Armstrong-James M (1975) The functional status and columnar organization of single cells responding to cutaneous stimulation in neonatal the somatosensory cortex SI. *J Physiol* 246: 501-538.
4. Baker PC, Schoeder TE (1967) Cytoplasmic filaments and morfogenetic movements in amphibian neural tube. *Dev Biol* 15: 432 - 438.
5. Bayer SA, Altman J (1991) Neocortical development. pp 255 New York: Raven Press.
6. Beatty J (1995) The nervous system. En: Principles of behavioral neuroscience (Beatty J eds,) pp 114-145 Madison: Brown & Benchmark Press.
7. Bloom F E, Aghajanian G K (1968) Fine structural and cytochemical analysis of the staining of synaptic junctions with phosphotungstic acid. *J Ultrastructure Research* 22: 361-375.
8. Bondy C, Lee WH (1993) Correlation between insuline-like growth factor (IGF)- Binding proteins and IGF-I gene expression during brain development. *J Neurosci* 13: 5092-5104.

9. Bourgeois JP (1997) Synaptogenesis, heterochrony and epigenesis in the mammalian neocortex. *Acta Pediatr Suppl* 422: 27-33.
10. Cowan WM (1973) Neuronal death as a regulative mechanism in the control of cell number in the nervous system. En: *Development and aging in the nervous system* (Rockstein M ed,) pp 19-41 New York: Academic Press.
11. Cowan WM, Fawcett JW, O'Leary DDM, Sandfield BB (1984) Regressive events in neurogenesis. *Science* 225: 1258-1267.
12. 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.
13. Davies AM, Larmet Y, Wright E, Vogel K (1991) Coordination of trophic interactions by separate developmental programs in sensory neurons and their target fields. *J of Cell Science Supplement* 15: 111-116.
14. D'Ercole AJ, Ye P, Calikoglu AS, Gutiérrez-Ospina G (1996) The role of the insulin-like growth factors in the central nervous system. *Molecular Neurobiology* (en prensa).
15. De Lecea L, del Rio JA, Criado JR, Alcántara S, Morales M, Danielson PE, Henriksen SJ, Soriano E, Sutcliffe G (1997) Cortistatin is expressed in a distinct subset of cortical interneurons. *J Neurosci* 17(15): 5868-5880.
16. Dingledine R, McBain (1993) Excitatory amino acid transmitters. En: *Basic neurochemistry* (Siegel GJ, Bernald W. Agranoff R, Albers W y Molinoff PB, eds) pp368-687 New York: Raven.

17. Dykes R (1983) Parallel processing of somatosensory information: a theory. *Brain Res Rev* 6: 47-115.
18. Favorov OV, Kelly DG (1994) Minicolumnar organization within somatosensory cortical segregates: Development of afferent connections. *Cerebral cortex* 4: 408-427.
19. Fletcher TL, Camilli P, Banker G (1994) Synaptogenesis in hippocampal cultures: evidence indicating that axons and dendrites become competent to form synapses at different stages of neural development. *J Neurosci* 14(11): 6695-6706.
20. Fujita T, Kobayashi S (1978) Paraneural cells in the GEP endocrine system. En: *Gut hormones* (Bloom SR, ed) pp 414 London: Churchill Livingstone.
21. Ganon WF (1998) *Fisiología Médica*. pp 981 México DF: Editorial Manual Moderno.
22. Gilbert SF (1991) *Developmental Biology*. pp 891 Sunderland: Sinauer.
23. Goldman SA, Luskin MB (1998) Strategies utilized by migrating neurons of the postnatal vertebrate forebrain. *TINS* 21:107-113.
24. Gutiérrez-Ospina G, Suha Calikoglu, Ye P, D'Ercole AJ (1996) 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. *Endocrinology* 137: 5484-5492.
25. Gutiérrez-Ospina G (1997) Efectos del factor de crecimiento tipo insulina I (IGF-1) sobre el crecimiento cerebral y el desarrollo del sistema somático

sensorial: Estudios anatómicos en la corteza somatosensorial primaria (S1) de ratones transgénicos. Tesis doctoral México DF.

26.Hatten ME, Heintz N (1999) Neurogenesis and migration. En: *Fundamental Neuroscience* (Zigmond MJ, Bloom FE, Landis SC, Roberts JL, Squire LR, eds) pp 451-476 San Diego: Academic Press.

27.Haydon PG, Drapeau P (1995) From contact to connection: early events during synaptogenesis. *Trends Neurosci* 18: 196-201.

28.Haydon PG, Zoran MJ (1994) Retrograde regulation of presynaptic development during synaptogenesis. *J Neurobiol* 25(6): 694-706.

29.Hensch TK, Fagiolini M, Mataga N, Stryker MP, Baekkeskov S, Kash SF (1998) Local GABA circuit control of experience-dependent plasticity in developing visual cortex. *Science* 282: 1504-1508.

30.Jacobson M (1991) *Developmental Neurobiology*. pp 776 New York: Plenum Press.

31.Jones EG (1983) The Thalamus. En: *Chemical Neuroanatomy* (Emson PC, ed) pp 505-550 New York: Raven Press.

32.Jones JI, Clemmons DR (1995) Insuline-like growth factors and their binding proteins: Biological actions. *Endocr Rev* 16: 3-34.

33.Katz LC, Shatz CJ (1996) Synaptic activity and the construction of cortical circuits. *Science* 274: 113-1138.

41. Lee WH, Javendan S, Bondy C (1992) Coordinate expression of insuline-like growth factor system components by neurons and neuroglia during retinal and cerebellar development. *J Neurosci* 12: 4737-4744.
42. Lerma J, Mora F, Prieto JS (1998) Sinapsis aminoacidérgicas y peptidérgicas. En: *Manual de neurociencias* (Delgado JM, Ferriz A, Mora F, Rubia FJ, eds.) pp 231-248 España: Sinesis.
43. Leise EM (1990) Modular construction of nervous system: a basic principle of design for invertebrates and vertebrates. *Brain Res Rev* 15: 1-23.
44. Levitt P, Barbe MF, Eagleson K L (1997) Patterning and specification of the cerebral cortex. *Annu Rev Neurosci* 20: 1-24.
45. Lichman JW, Burden SJ, Culican SM, Wong ROL (1999) Synaptic formation and elimination. En: *Fundamental Neuroscience* (Zigmond MJ, Bloom FE, Landis SC, Roberts JL, Squirre LR, eds) pp 547-576 San Diego: Academic Press.
- Malach R (1994) Cortical columns as devices for maximizing neuronal diversity. *Trends Neurosci* 17 (3): 101-104.
47. Martin JH y Jessell TM (1991) Development as a guide to the regional anatomy of the brain. En: *Principles of neural science*. (Kandel ER, Schwartz JH y Jessell TM, ed) pp297-308 Connecticut: Appleton & Lange.
- McCasland JS, Woolsey TA (1988a) New High-resolution 2-deoxyglucose method featuring double labeling and automated data collection. *J Com Neurol* 278(4): 543-554.

48. McCasland JS, Woolsey TA (1998b) High-resolution 2-deoxyglucose mapping of functional cortical columns in mouse barrel cortex. *J Comp Neurol* 278 (4): 555-569.
49. McConnell SK (1995) Constructing the cerebral cortex: Neurogenesis and fate determination. *Neuron* 15: 761-768.
50. Mountcastle VB (1979) An organizing principles for cerebral function: the unit module and the distributed system. En: *The neuroscience: Fourth study program Vol 1* (Schmitt FO, Worden FG, eds) pp 21-42 Cambridge: The MIT press.
51. Mountcastle VB (1997) The columnar organization of the neocortex. *Brain* 120: 701-722.
52. Nieuwenhuys R (1994) The neocortex. An overview of its evolutionary development, structure organization and synaptology. *Anal Embriol* 190: 307-337.
53. Patel-Vaidya U (1985) Ultrastructural organization of posterior and anterior barrels in the somatosensory cortex of rat. *J Neurosci Res* 14: 357-371.
54. Pansky B, Allend J, Budd CG (1988) *Review of Neuroscience*. pp 409 New York: McMillan Publishing Co.
55. Parnavelas JG, McDonald JK (1983) The cerebral cortex. En: *Chemical Neuroanatomy* (Emson PC, ed) pp 505-550 New York: Raven Press.

56. Pearlman AL (1985) *The visual cortex of the normal mouse and reeler mutant*. En: *Cerebral cortex* Vol. 3 (Peters A, Jones EG, eds) pp 1-18 New York: Plenum Press.
57. Pimentel E (1994) *Insuline-like grown factors*. En: *Growth factors*. Vol. II *Peptides growth factors* (Pimentel E, ed) pp 55-95 Florida: CRC.
58. Price JL (1995) *Thalamus*. En: *The rat Nervous System* (Paxinos G, ed) pp 629-645 San Diego: Academic Press.
59. Purves D, Lichtman JW (1985) *Early events in neural development*. En: *Principles of neural development* (Purves D, Lichtman JW) Sunderland: Sinauer.
60. Purves D (1988) *Body and brain*. pp 231 Cambridge: Harvard University Press.
61. Rakic P (1988) *Specification of cerebral cortical area*. *Science* 241: 170-176.
62. Rakic P (1990) *Critical cellular events during cortical evolution: radial unit hypothesis*. En: *The neocortex Ontogeny and phylogeny* Vol 2 (Finlay BL, Innocenti G, Scheich H, eds) pp 21-32 New York: Plenum.
63. Rakic P (1991) *Experimental manipulation of cerebral cortical areas in primates*. *Phil Trans R Soc Lond* 331: 291-294.
64. Rakic P, Suñer I, Williams RW (1991) *A novel cytoarchitectonic area induced experimentally within the primate visual cortex*. *Proc Natl Acad Sci USA* 88: 2083-2087.

65. Rakic P, Caviness VS (1995) Cortical development: view from neurological mutants two decades later. *Neuron* 14: 1101-1104.
66. Rakic P (1995) A small step for the cell, a giant leap for mankind: a hypothesis of neocortical expansion during evolution. *Trends Neurosci* 18(9): 383-388.
67. 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.
68. Ringo JL (1991) Neuronal interconnection as a function of brain size. *Brain Behav Evol* 38: 1-6.
69. Rockel AJ, Hiorns RW, Powell TPS (1980) The basic uniformity in structure of the neocortex. *Brain* 103: 221-244.
70. Salas M, Cintra L, Díaz-Cintra S (1998) Ontogenia del sistema nervioso. En: *Fisiología: Células, órganos y sistemas Vol. V* ( Muñoz-Martínez J, García X, eds) pp 31-55 México: Ediciones científicas universitarias.
71. Schlaggar BL y O'Leary DM (1994) Early development of the somatotopic map and barrel patterning in rat somatosensory cortex. *J Comp Neurol* 146:80-96.
72. Senft SL, Woolsey TA (1991) Mouse barrel cortex viewed as directed domains. *Cerebral cortex* 1: 348-363.
73. Shepherd GM (1994) *Neurobiology*. pp 760 New York: Oxford University Press.

74. Smith JL, Schoenwolf GC (1997) Neurulation: coming to closure. *TINS* 20: 510-517.
75. Sur M, Cowey A (1995). Cerebral cortex: function and development. *Neuron* 15: 497-505.
76. Swindale NV (1990) Is the cerebral cortex modular?. *TINS* 13 (12): 487-492.
77. Towe AL (1975) Notes on the hypothesis of columnar organization in somatosensory cerebral cortex. *Brain Behav Evol* 11: 16-47.
78. Talbot WS, Trevarrow B, Halpern ME, Melby AE, Farr G, Postlethwait JH, Jowett T, Kimmel CB, Kimelman T (1995) A homeobox gene essential for zebrafish notochord development. *Nature* 378: 150-158.
79. Yuste R, Katz LC (1991) Control of postsynaptic  $Ca^{2+}$  influx in developing neocortex by excitatory and inhibitory neurotransmitters. *Neuron* 6(3): 333-344.
80. Yuste R, Katz LC (1992) Neural domains in developing neocortex. *Science* 257(5070): 665-669.
81. Yuste R, Katz LC (1993) Extensive dye coupling between rat neocortical neurons during the period of circuit formation. *Neuron* 10(1): 103-114.
82. Waite PME, Tracey DJ (1995) Trigeminal sensor system. En: *The rat nervous system* (Paxinos G, ed) pp 705- 745 New York: Academic Press.

83. White EL (1976) Ultrastructure and synaptic contacts in barrels of mouse in cortex. *Brain Res* 105: 229-251.
84. Woolsey T, 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.
85. Woolsey TA (1990) Peripheral alterations and somatosensory development. En: *Development of sensory system in mammals* (Coleman JR, ed) pp 461-503 New York: John Wiley & Sons.
86. Zilles K (1990) Anatomy of the neocortex: Cytoarchitecture and myeloarchitecture. En: *The cerebral cortex of the rat* (Kolb B, Tees RC, eds) pp 77-112. Cambridge: MIT Press.