



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

Reinterpretación del proceso organización dendrítica:
Estudio sobre el desarrollo de los árboles dendríticos de las
neuronas estelares espinosas en la corteza
somatosensorial primaria de la rata.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

B I Ó L O G O

P R E S E N T A :

Luis Rodrigo Hernández Miranda

Director de Tesis
Dr. Gabriel Gutiérrez Ospina



2004

FACULTAD DE CIENCIAS
SECCION ESCOLAR



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.

ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo recepcional.
 NOMBRE: Luis Rodrigo Hernández Miranda
 FECHA: 21 de Junio del 2004
 FIRMA: *[Signature]*

ACT. MAURICIO AGUILAR GONZÁLEZ
Jefe de la División de Estudios Profesionales de la
Facultad de Ciencias
Presente

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo escrito:
 "Reinterpretación del proceso de organización dendrítica: Estudio sobre el desarrollo de los árboles dendríticos de las neuronas estelares espinosas en la corteza somatosensorial primaria de la rata."

realizado por Luis Rodrigo Hernández Miranda

con número de cuenta 097193566 , **quien cubrió los créditos de la carrera de:**
 Biología..

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis

Propietario Dr. Gabriel Gutiérrez Ospina

Luis Salceda S. **Propietario** Dra. Rocío Salceda Sacanelles

Propietario Dr. Alfonso Escobar Izquierdo

Suplente Dra. Patricia Rivas Manzano

Suplente Dr. Julio Morán Andrade

[Handwritten signatures: Gabriel Gutiérrez Ospina, Rocío Salceda Sacanelles, Alfonso Escobar Izquierdo, Patricia Rivas Manzano, Julio Morán Andrade]

Consejo Departamental de
Biología

[Signature]
 M. en C. Juan Manuel Rodríguez Chávez

FACULTAD DE CIENCIAS



UNIVERSIDAD DE ENSEÑANZA
DE BIOLOGÍA

Esta tesis se realizó bajo la dirección del Dr. Gabriel Gutiérrez Ospina en el laboratorio A-107 del Departamento de Biología Celular y Fisiología del Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM, con apoyo financiero de los donativos del consejo nacional de ciencia y tecnología (38615N y J28035N).

AGRADECIMIENTOS

A México

A la Universidad Nacional Autónoma de México.

A la Facultad de Ciencias.

A mis padres Luis Hernández y Teresa Miranda.

A mi querida hermana Ana Hernández.

A mi tutor Dr. Gabriel Gutiérrez Ospina.

A los integrantes de mi jurado por los comentarios hechos al presente trabajo.

A todos mis profesores, en especial a Dra. Patricia Rivas, Dra. Cristina Revilla, Dr. Guillermo Salgado, Dr. Víctor Valdez, M. en C. Miguel Ángel Palomino.

A todo el personal de la biblioteca del Instituto de Investigaciones Biomédicas, en especial a María Petra Muñoz.

A todo el personal del Departamento de Biología Celular y Fisiología, en especial a Isabel Reyes.

A todo el personal del bioterio del Instituto de Investigaciones Biomédicas, en especial a Adolfo Herrera Juárez y Gerardo Arrellin.

A mis amigos de la licenciatura (de los cuales recuerdo sus apellidos): Eddy Martínez, Héctor Maya, Paulina Gonzáles, Patricia Frías, Erica Lazcano, Mónica Zagaceta, Alejandro Vite, Ana Rojas, Vanesa Becerra, Miriam Martínez, Lorena Reyes, Mariana Vázquez, Candelaria López, Jonathan Antonio, Judith Estrada y Claudia Hernández.

A mis amigos de la licenciatura (de los cuales no recuerdo sus apellidos): Carolina, Sandra, Cristian, Roberto, Jocelina, Marcia, Perla, Jazmín, Melisa y Claudia.

A mis compañeros del laboratorio: Patricia, Brenda, Sofía, Magnolia, Abril, Jessica, Naima, Eileen, Julieta, Norma, Ivett, Francisco, Miguel, Eduardo, Javier.

A la señora Guille Mimblera

A **CONACYT**

Resumen

Los mecanismos celulares por los que las neuronas generan sus procesos dendríticos durante su desarrollo son aún motivo de controversia. Existen dos posturas que intentan explicar estos mecanismos. La primera sugiere que existe una sobreproducción de procesos dendríticos durante el desarrollo y una posterior eliminación de estos procesos hasta alcanzar su morfología adulta. La segunda postura supone que las neuronas generan sus procesos dendríticos progresivamente sin llegar a una sobreproducción, y en la cual no se observa eliminación significativa de ningún elemento dendrítico. Debido a esta controversia, el presente trabajo evalúa el patrón de ramificación y crecimiento dendrítico de las neuronas corticales estelares espinosas de la capa IV de la corteza somatosensorial primaria en la rata, durante el primer mes de vida postnatal, con la finalidad de aportar evidencia que sustente o refute alguna o ambas posturas. Con base en los resultados obtenidos proponemos una nueva estrategia de desarrollo que aquí denominamos "Reorganizativa". Esta nueva visión del desarrollo de los árboles dendríticos incluye eventos de ambas estrategias descritas anteriormente. En conjunto, nuestros resultados muestran que la eliminación de procesos del árbol dendrítico es compensada por el incremento en longitud de los que permanecen en el árbol. Es por esto que no se observa una pérdida de superficie dendrítica durante su desarrollo. Así, en vista de los datos vertidos en el presente estudio, es necesaria una reinterpretación del desarrollo de los árboles dendríticos en otras poblaciones del sistema nervioso.

Índice

Resumen	5
1. Introducción	7
2. Antecedentes	8
2.1 Mecanismos celulares y moleculares que modulan la formación de procesos dendríticos.	11
2.2 Desarrollo dendrítico dependiente de actividad.	13
2.3 Desarrollo dendrítico dependiente de glia.	14
2.4 Filopodios y espinas dendríticas.	14
2.5 Corteza somatosensorial primaria (SmI).	15
3. Justificación	17
4. Hipótesis	19
5. Objetivos	19
6. Materiales y Métodos	20
7. Resultados	24
8. Discusión	35
9. bibliografía	39
Anexo	45

1. Introducción

El sistema nervioso está compuesto por una amplia diversidad de tipos neuronales. Cada uno de estos tipos de neuronas se caracterizan por presentar un patrón de ramificación dendrítico estereotipado (McAllister, 2000). En los circuitos neuronales, las dendritas constituyen el sitio postsináptico principal y su patrón geométrico emerge a lo largo del desarrollo, como resultado de la interacción de ellas con los axones aferentes que las inervan (Hume y Purves, 1981; Purves y Lichtman, 1985; Purves *et al.*, 1988). Diversos estudios han mostrado que las características estructurales, las propiedades eléctricas dinámicas y las funciones integrativas de las dendritas, desempeñan un papel muy importante en el procesamiento de la información en el sistema nervioso (Agmon-Snir *et al.*, 1998; Häusser *et al.*, 2000; Vetter *et al.*, 2001). Por las razones arriba descritas, el fenómeno de desarrollo dendrítico (i.e., dendritogénesis) ha sido motivo de intensos estudios en diversos modelos *in vivo e in vitro* (Berry y Bradley, 1976; Garey y Saini, 1981; Greenough y Chang, 1988; Petit *et al.*, 1988; Bloomfield y Hitchcock, 1991; Dailey y Smith, 1996; Condrón y Zinn 1997; Wang y Macagno, 1998; Scott y Luo, 2000; Samsonovich y Ascoli, 2003).

Los mecanismos celulares por los que las neuronas generan sus procesos dendríticos son aún motivo de controversia. Existen dos posturas que intentan explicar estos mecanismos. La primera sugiere que durante el desarrollo temprano, las neuronas sobreproducen procesos dendríticos (i.e., ramas, segmentos y espinas dendríticas). Una vez alcanzada cierta edad, una fracción de dichos procesos dendríticos se eliminan. La segunda postura supone que las neuronas generan sus procesos dendríticos progresivamente sin llegar a una sobreproducción, posteriormente estos procesos dendríticos son estabilizados y

no se observa una eliminación significativa de dichos procesos. De manera interesante, se ha sugerido que ambos eventos se llevan a cabo en un periodo corto durante el desarrollo general del sistema nervioso.

Debido a la existencia de esta controversia, el presente trabajo evaluó el patrón de ramificación y crecimiento dendrítico de las neuronas corticales estelares espinosas de la capa IV de la corteza somatosensorial primaria en la rata (fig bis), durante el primer mes de vida postnatal. Esta área del cerebro de los roedores es de gran interés debido a que existe evidencia morfológica que sugiere que los axones aferentes que contactan a las neuronas espinosas estelares se elaboran de forma aditiva, es decir, no se observa la eliminación de los distintos elementos que los componen (Wise *et al.*, 1979; Parnavelas y Uylings, 1980; Simons y Woolsey, 1984; Benshalom y White, 1986; Vaughn, 1988; Petit *et al.*, 1988; Agmon *et al.*, 1993, 1995; Kalb, 1994; Micheva y Beaulieu, 1996; White *et al.*, 1997). Debido a que el desarrollo axónico y dendrítico está estrechamente relacionado, es probable que las dendritas de las neuronas estelares espinosas de la capa IV se elaboren siguiendo una estrategia semejante a la de sus aferentes axónicas.

2. Antecedentes

A lo largo de varias décadas, la idea de que el sistema nervioso de los vertebrados en desarrollo elabora sus circuitos neuronales con base en mecanismos que involucran eventos regresivos ha ganado un gran número de adeptos. Así, se piensa que durante el desarrollo temprano el sistema nervioso genera un número excesivo de neuronas y conexiones que requieren de ser eliminadas al paso del tiempo. Dicha eliminación de elementos neuronales parece conducir a un refinamiento de la conducta y de las habilidades motoras, de memoria y aprendizaje (Balice-Gordon *et al.*, 1993; Nelson *et al.*, 1993;

Crair *et al.*, 1998; Gan y Lichtman, 1998; Hall *et al.*, 2000; Keller *et al.*, 2001; Personius y Balice-Gordon, 2001). En este contexto, se ha propuesto que la dendritogénesis tiene lugar a través de eventos de sobreproducción de ramas, segmentos y espinas dendríticas. Una vez alcanzado un valor máximo y una etapa del desarrollo, el árbol dendrítico se reorganiza retrayendo selectivamente muchos de sus procesos hasta obtener su morfología adulta (Fig. 1A). Este patrón de desarrollo dendrítico ha sido ilustrado en neuronas corticales, talámicas y retinianas del mono. (Lund *et al.*, 1977; Garey y Saini, 1981). También se ha observado en las células ganglionares de la retina del gato (Ramoá *et al.*, 1988) y del hámster (Wingate y Thompson, 1994), así como en las motoneuronas de la rata (Vaughn *et al.*, 1988; Kalb, 1994).

No obstante lo arriba descrito, la estrategia regresiva no parece ser aplicable a todos los modelos de desarrollo de árboles dendríticos en distintas áreas del sistema nervioso de los vertebrados. Existe evidencia proveniente de otra serie de estudios que sugieren que el árbol dendrítico se forma por una adición de ramas y segmentos, así como también de espinas dendríticas (Fig. 1B), sin que se observe una retracción significativa de estos procesos. Este patrón de desarrollo dendrítico ha sido ilustrado en neuronas corticales, hipocámpicas y de la corteza cerebelosa de la rata (Berry y Bradley, 1976; Wise *et al.*, 1979; Parnavelas y Uylings, 1980; Petit *et al.*, 1988; Dailey y Smith, 1996). También se ha observado que las células ganglionares de la retina del pez dorado y de *Xenopus* (Sakaguchi *et al.*, 1984; Bloomfield y Hitchcock, 1991), así como las neuronas cerebelosas del mono (Rakic, 1972) desarrollan sus árboles dendríticos utilizando una estrategia aditiva.

Hasta el momento, existe información insuficiente para definir que tipo de estrategia utilizan las neuronas espinosas estelares de la capa IV de la corteza somatosensorial primaria de la rata para elaborar sus árboles dendríticos. Se ha reportado que las aferentes

talámicas que inervan a estas neuronas corticales elaboran sus árboles terminales de manera aditiva (Agmon *et al.*, 1993, 1995). Debido a que el desarrollo axónico y dendrítico está estrechamente relacionado, es probable que las dendritas de estas neuronas sigan una estrategia similar.

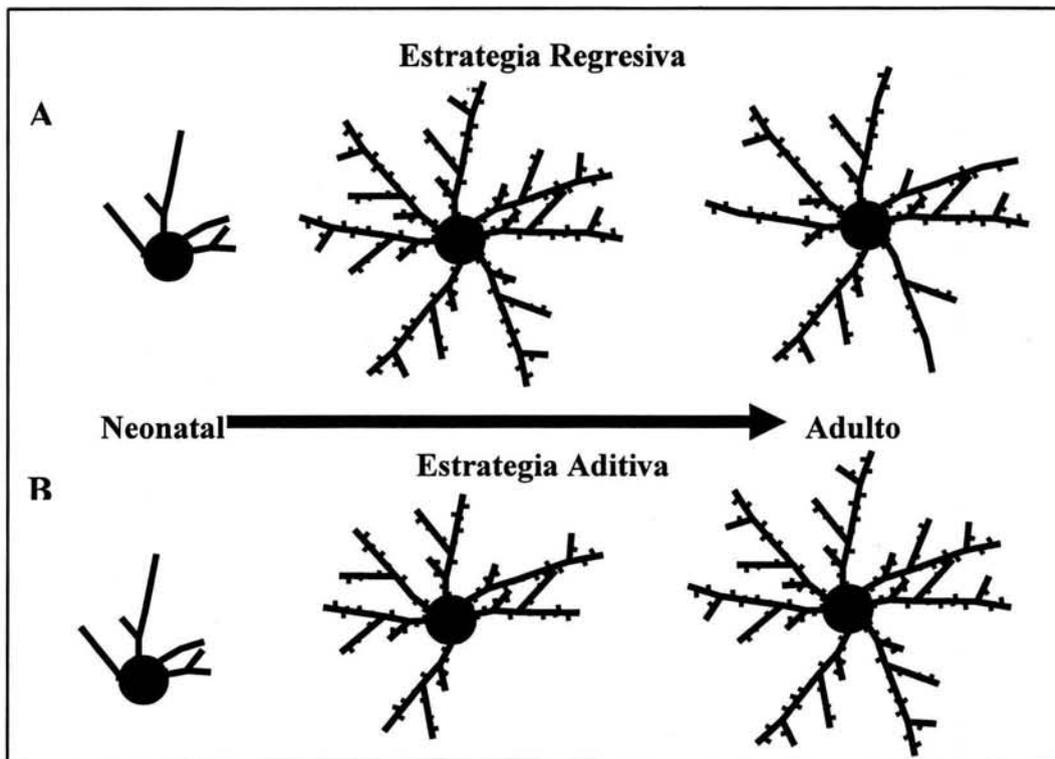


Figura 1. **Estrategia regresiva vs. Estrategia aditiva.** **A.** Neuronas recién migradas comienzan a elaborar sus procesos dendríticos de manera aditiva hasta alcanzar un máximo. Este evento inicial es seguido por una eliminación selectiva de algunos de sus procesos dendríticos hasta alcanzar su morfología adulta. **B.** Neuronas recién migradas comienzan a elaborar sus procesos dendríticos de manera aditiva hasta alcanzar un máximo. Este evento es seguido por la estabilización de los procesos dendríticos hasta la madurez, sin que se observe ninguna eliminación significativa de éstos.

En los siguientes apartados, describiremos la información referente a algunos de los mecanismos que subyacen a diversos eventos de la dendritogénesis.

2.1 Mecanismos celulares y moleculares que modulan la formación de procesos dendríticos.

El desarrollo de la forma neuronal se caracteriza por la modificación dinámica del citoesqueleto celular que conlleva a cambios de la geometría, longitud y diámetro de los procesos principales denominados axones y dendritas (Kaethner y Stuermer, 1997; Craig y Banker, 1994; Maccioni y Cambiazo, 1995; Sánchez *et al.*, 2000; Alberts *et al.*, 2002; Luo, 2002). Específicamente, los eventos involucrados en el desarrollo de los árboles dendríticos se pueden envolver en cuatro etapas. La primera de estas etapas se caracteriza por el crecimiento intrínsecamente programado de procesos dendríticos primarios desde distintas partes del cuerpo neuronal, sin una aparente polarización (Craig y Banker, 1994; Scott y Luo, 2001; Purves *et al.*, 2001). La segunda etapa involucra un crecimiento orientado de algunos de estos procesos, además de aumentos en su diámetro y longitud. La tercera etapa contempla la formación de ramas de los árboles dendríticos y el establecimiento de patrones de ramificación estereotipados. Finalmente, durante la cuarta etapa se forman las denominadas espinas dendríticas en aquellas neuronas que las presentan (Lund *et al.*, 1977; Scott y Luo, 2001).

Las diversas etapas descritas durante la dendritogénesis son el resultado de interacciones de los procesos dendríticos con elementos celulares, moléculas de señalización y con la matriz extracelular. Estas interacciones son mediadas por cascadas de señalización asociadas a la activación y transducción de familias de ligandos y receptores específicos (Crossin *et al.*, 1989; Matus *et al.*, 1990; Jhaveri *et al.*, 1991; Mitrovic *et al.*, 1994; Steindler *et al.*, 1995; Ziv y Smith, 1996; Song *et al.*, 1998; McAllister, 2000; Scott y Luo, 2001; Hely *et al.*, 2001; Dickson, 2002; Whitford *et al.*, 2002). Así, estudios recientes han mostrado que las neuronas presentan una gran susceptibilidad a distintas

moléculas de señalización extracelular que inducen o inhiben el crecimiento dendrítico modulando, de esta manera, los patrones de ramificación de los árboles dendríticos (ver Tabla 1; además McAllister, 2000; Scott y Luo, 2001; Whitford *et al.*, 2002).

La organización y reorganización del citoesqueleto dendrítico, como respuesta a las moléculas de señalización, es modulada en parte por cambios en los niveles de calcio (Ca^{2+}) intracelular (Kennedy, 1989; Marty, 1989; Berridge, 1998; Vaillant *et al.*, 2002;). Estos cambios conducen a modificaciones en el estado de fosforilación del factor de transcripción CREB, la proteína unida al factor CREB y tubulina, reacciones que son catalizadas por las enzimas calmodulina cinasa dependiente de calcio II y IV y las cinasas dependientes de moléculas de señalización extracelular (Berridge, 1998; Horch *et al.*, 1999; Hely *et al.*, 2001; Redmond *et al.*, 2002; Vaillant *et al.*, 2002). Así, los cambios en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ influyen el comportamiento de los conos de crecimiento y la elongación y ramificación de axones y dendritas (Kater & Mills, 1991).

Otras cascadas de señalización relacionadas con la organización y reorganización del citoesqueleto de los árboles dendríticos, son aquellas asociadas con las familias de las proteínas Rho y proteínas asociadas a microtúbulos (MAPs). Ambos grupos de proteínas actúan como interruptores moleculares acoplado a los receptores de membrana con el citoesqueleto celular. La familia Rho, constituida por las proteínas Rho, Rac y Cdc42, (Hall, 1998; Luo, 2002), regulan el crecimiento, la retracción y la diferenciación de los procesos dendríticos y axonales, a través de facilitar o impedir la polimerización y despolimerización de actina (Threadgill *et al.*, 1997; Hall, 1998; Ruchhoeft *et al.*, 1999; Luo, 2002). Por otro lado, la fosforilación y desfosforilación de los miembros de las MAPs facilitan o no el crecimiento, la ramificación y la estabilización de los árboles dendríticos

(Matus *et al.*, 1990; Maccioni y Cambiazo, 1995; Wu y Cline, 1998; Sánchez *et al.*, 2000; Hely *et al.*, 2001; Mantych y Ferreira, 2001; Teng *et al.*, 2001).

2.2 Desarrollo dendrítico dependiente de actividad

Durante varias décadas se ha puesto especial atención al papel que desempeña la actividad eléctrica aferente sobre la formación y el crecimiento de los árboles dendríticos (Wong y Ghosh, 2002). La diferenciación dendrítica ocurre simultáneamente con la formación de sinápsis (Dalva, 1994; Dailey y Smith, 1996; Ziv y Smith, 1996), lo que sugiere que las terminales axónicas aferentes pueden promover el desarrollo de los árboles dendríticos (Kossel *et al.*, 1997). Más aún, la experiencia sensorial parece desempeñar un papel extremadamente importante en la modulación del desarrollo de las arborizaciones dendríticas (Marin-Padilla y Stibitz, 1968; Greenough y Volkmar, 1973; Harris y Woolsey, 1979; Steffen y Van der Loos, 1980; Wingate y Thompson, 1994). Se ha observado que las aferentes mantienen la integridad de los árboles dendríticos (Kossel *et al.*, 1997), y que los árboles dendríticos tienden a orientarse hacia los territorios ricos en contactos sinápticos (Rakic, 1972; Vaughn, 1988; Blazer *et al.*, 1990; Hickmott y Merzenich, 1999; Datwani *et al.*, 2002). De acuerdo a ello, la deaferentación conduce a una disminución en la densidad dendrítica y en la complejidad de los patrones de ramificación (Benes *et al.*, 1977; Steffen y Van der Loos, 1980; Gray *et al.*, 1982). También se ha observado que la activación del receptor para N-metil-D-aspartato (NMDA), un canal-receptor operado por glutamato, promueve tanto la sinaptogenesis como el crecimiento y ramificación dendríticos (Kalb, 1994; Datwani *et al.*, 2002), y estabiliza a las espinas dendríticas (Kossel *et al.*, 1997; Wong y Wong, 2001; Datwani *et al.*, 2002).

Aunque los datos citados en el párrafo precedente apoyan que la actividad neuronal favorece la dendritogenesis, también existen estudios que contradicen esta postura. Al

respecto, se ha mostrado en embriones de algunos vertebrados que existe una disyunción espacio-temporal de las aferentes retinianas y sus dendritas blanco en el mesencéfalo (Sakaguchi *et al.*, 1984). La deaferentación no causa grandes cambios en la forma o el patrón de ramificación del árbol dendrítico (Voyvodic, 1987), aunque si en la velocidad del crecimiento dendrítico. El bloqueo de la actividad con tetrodotoxina, un inhibidor de los canales de Na⁺ sensibles a voltaje, no causa efectos deletéreos en el desarrollo del árbol dendrítico (Dalva *et al.*, 1994; Kossel *et al.*, 1997). De hecho, induce una sobreproducción de espinas dendríticas (Dalva *et al.*, 1994). Adicionalmente, el trabajo de Kossel *et al.*, (1997) muestra que el bloqueo de los distintos receptores ionotrópicos y metabotrópicos para glutamato no causa efectos en el crecimiento ni en el patrón de ramificación del árbol dendrítico. Finalmente, también se ha mostrado que la inhibición del receptor NMDA provoca una mayor ramificación y producción de espinas (Rocha y Sur, 1995).

2.3 Desarrollo dendrítico dependiente de la glía

La glía es uno de los componentes celulares principales dentro del sistema nervioso (Purves *et al.*, 2001). Se ha observado que estas células dirigen algunas de las etapas del desarrollo neurítico a través de inhibir o promover su crecimiento de manera región-específica (Shibata *et al.*, 1998). Un ejemplo de esto es el crecimiento de árboles dendríticos de las neuronas dopaminérgicas cultivadas sobre glía mesencéfálica, y no sobre glía obtenida de otras regiones del sistema nervioso (Denis-Donini, *et al.*, 1984).

2.4 Filopodios y espinas dendríticas

Durante el desarrollo temprano, las ramas dendríticas presentan filopodios (apéndices largos y delgados de 3 a 40 µm de longitud) que tienden a curvarse y ramificarse (Dailey y Smith, 1996; Ziv y Smith, 1996; Portera-Cailliau y Yuste, 2001). Los filopodios son estructuras dinámicas con un tiempo de vida de aproximadamente 10

minutos en cultivo (Dailey y Smith, 1996; Ziv y Smith, 1996). Los filopodios dendríticos funcionan como quimiosensores que se encargan de identificar compañeros sinápticos, así como también ambientes adecuados para el crecimiento de ramas y segmentos dendríticos (Dailey y Smith, 1996; Ziv y Smith, 1996; Portera-Cailliau y Yuste, 2001; Sala, 2002). Los filopodios son generados muy temprano en el desarrollo, y posteriormente son reemplazados por las espinas dendríticas las cuales soportan las sinápsis maduras (Dailey, Smith, 1996; Ziv y Smith, 1996; Harris *et al.*, 1989; Harris, 1999; McKinney *et al.*, 1999; Smart y Halpain 2000). Las espinas dendríticas, en contraste, son apéndices cortos ($< 2 \mu\text{m}$) y relativamente estables (Dailey y Smith, 1996; Ziv y Smith, 1996; Portera-Cailliau y Yuste, 2001; Grutzendler *et al.*, 2002). Se considera que las espinas dendríticas son el blanco postsináptico principal de las sinápsis excitatorias glutamatérgicas (Harris, 1999).

2.5 Corteza somatosensorial primaria (Sml)

El establecimiento de conexiones ordenadas es una característica fundamental del sistema nervioso. En la corteza cerebral estos patrones se establecen con base a las aferentes talámicas-corticales, conexiones inter- e intrahemisféricas y eferentes corticales hacia blancos subcorticales. Estas conexiones son topográficas en el sentido que hay una relación espacial ordenada entre un conjunto de proyecciones neuronales y sus neuronas blanco. En las cortezas sensoriales primarias, existe una relación evidente entre la organización de los receptores periféricos y la organización del área cortical que los representa. Dependiendo del sistema sensorial, a este tipo de organización cortical se le denomina como retinotopia, tonotopia o somatotopia (Killackey *et al.*, 1995). Así, la corteza somatosensorial primaria de los mamíferos contiene una representación isomorfa de la superficie corporal. En la corteza de los roedores esta representación corporal se

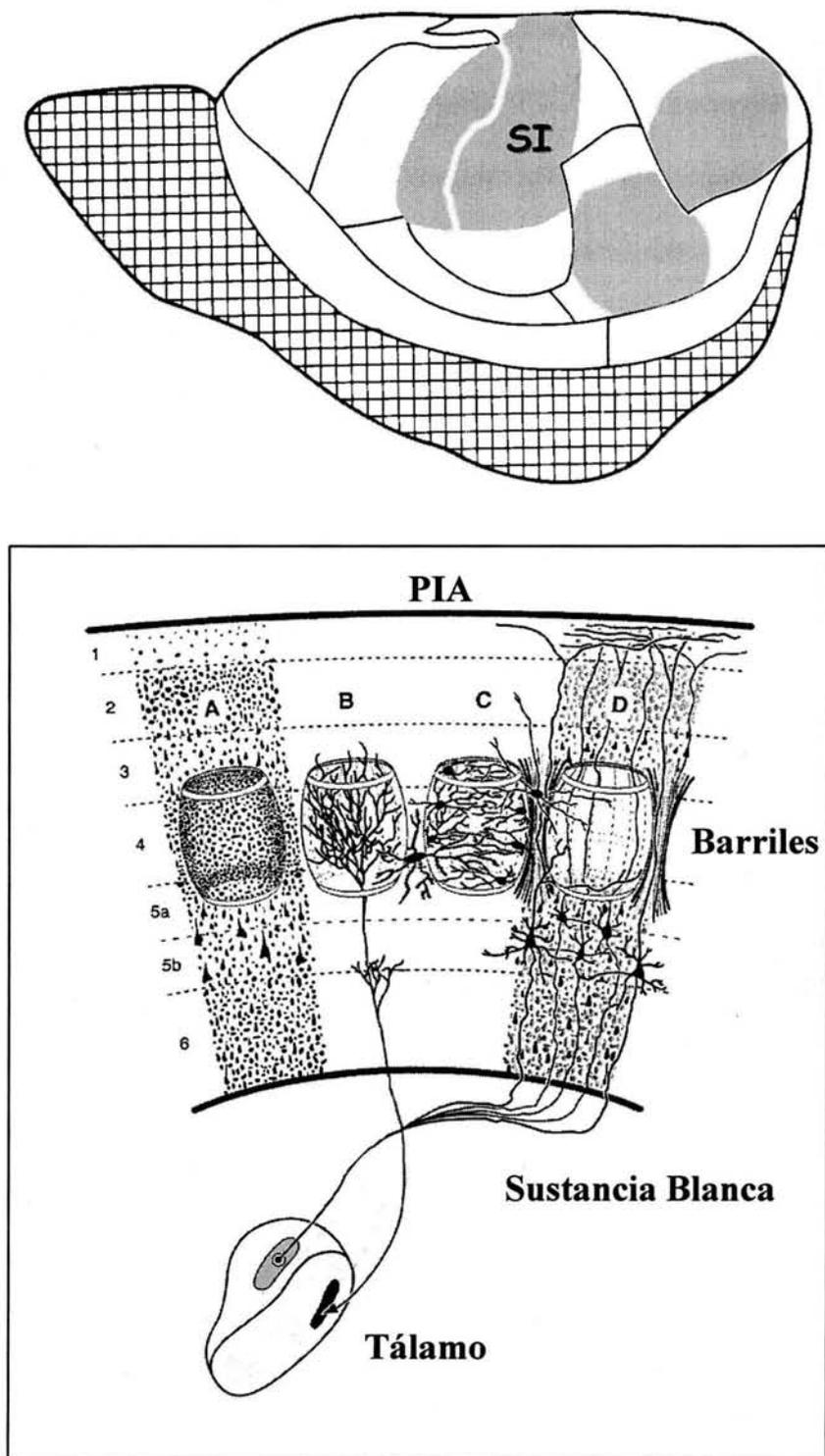


Figura 2. Corteza somatosensorial primaria de la rata. (A) Dibujo que muestra la localización de la corteza somatosensorial primaria SI en el lóbulo parietal de la rata. (B) Dibujo representativo de la organización de la corteza cerebral (SI) en corte coronal. La organización de las 6 capas corticales se da de manera decreciente, siendo la número uno la que se encuentra por debajo de la pia madre, y la sexta la que descansa sobre la sustancia blanca. La inervación que llega a la corteza provenientes del tálamo hace contacto con grupos de neuronas de la capa IV denominados barriles.

encuentra definida por unidades discretas cito-arquitectónicas llamadas “barriles”, ubicadas dentro de la capa IV cortical (Fig. 2; ver también Woolsey y Van der Loos, 1970). Las variaciones en el tamaño de los barriles reflejan, aparentemente, las diferencias en la densidad de inervación de distintos territorios cutáneos (Killackey *et al.*, 1995). La representación corporal no es exclusiva de la corteza, sino que también se puede observar en los relevos sinápticos subcorticales. Durante el desarrollo embrionario, esta representación surge inducida por la periferia y se consolida en la primera semana de vida postnatal (Rice, F. L. 1985; Schlaggar y O’Leary, 1994; Killackey *et al.*, 1995). El subcampo de barriles posteromedial (PMBSF, por sus siglas en inglés), es una subdivisión de la representación corporal que representa a las vibrisas faciales del hocico de los roedores en una relación uno a uno con los barriles (Paxinos, 1995). La caracterización de las neuronas que conforman los barriles del PMBSF ha mostrado que están compuestos por al menos dos tipos neuronales: células espinosas y no espinosas (Woolsey *et al.*, 1975). Las células espinosas son las más abundantes en la capa IV y se pueden subdividir en dos clases, las piramidales estelares (o estrelladas) y las células no piramidales estelares (o estrelladas) espinosas. Los cuerpos de estas últimas forman los bordes de los barriles y envían sus procesos dendríticos al “espacio” interior del barril. En este sitio convergen y se conectan con las aferentes talámicas (Simons y Woolsey, 1984; Erzurumlu y kind, 2001).

3. Justificación

El patrón de ramificación de los árboles dendríticos es crucial en el establecimiento de los contactos sinápticos y su ulterior fisiología. Algunos de los mecanismos que participan en la adquisición de este patrón de ramificación han comenzado a dilucidarse. Sin embargo, existen diferencias sobre la estrategia general que siguen las dendritas para generar sus árboles. En el presente trabajo estudiaremos el patrón de desarrollo de los

árboles dendríticos de las neuronas estrelladas espinosas corticales con la finalidad de aportar evidencia que sustente o refute alguna o ambas posturas.

Tabla 1. Moléculas de señalización extracelular que dirigen el desarrollo dendrítico

Molécula	Efecto en dendritas	Referencias
CPG15	Promueve el crecimiento y la complejidad de los árboles dendríticos	Nedivi et al., 1998, Cantalops et al., 2000.
Factores de crecimiento osteogenico como OP-1, BMP-6 BMP-2	Promueve el crecimiento dendrítico y el patrón de ramificación del árbol dendrítico.	Lein et al. 1995; McAllister, 2000.
IGF-I.	Promueve el crecimiento dendrítico e incrementa el patrón de ramificación del árbol dendrítico.	Niblock et al., 2000.
Neurotrofinas.	Promueven el crecimiento dendrítico y regulan el patrón de ramificación de los árboles dendrítico	Davies, 2000; Horch et al., 1999; McAllister et al., 1995 y 1996, Mertz et al., 2000; Caleo, M. & Maffei, L. 2002
Semaforinas	Guían y promueven el crecimiento dendrítico.	Polleux et al., 1998; Bagnard et al., 1998, 2000 ; Nakamura et al., 2000; Polleux et al., 2000 ; Tamagnone, y Comoglio, 2000. Fenstermaker et al., 2004
Efrinas	Promueven el desarrollo dendrítico.	Moreno-Flores et al., 2002; Thompson, 2003.
Slit	Regula el crecimiento neurítico, incrementando los patrones de ramificación dendrítica.	Whitford et al., 2002.
Hormona Tiroidea	Promueve el desarrollo dendrítico.	McAllister, 2000.
Estrógenos	Promueven el crecimiento dendrítico y la densidad de espinas dendríticas	McAllister, 2000.
Progesterona	Decrementan el crecimiento dendrítico y la densidad de espinas dendríticas.	McAllister, 2000.

4. Hipótesis

La elaboración de los árboles dendríticos de las neuronas estrelladas espinosas corticales de la rata se realiza a través de eventos aditivos durante el primer mes de vida postnatal.

5. Objetivos

5.1 Objetivo General

Caracterizar el patrón de ramificación morfológico de los árboles dendríticos de las neuronas estrelladas espinosas de la capa IV de la corteza somatosensorial primaria durante el primer mes de vida postnatal de la rata.

5.2 Objetivos particulares

1. Caracterizar el patrón de desarrollo de ramas dendríticas en neuronas estrelladas espinosas corticales durante el primer mes de vida postnatal de la rata, con técnicas de impregnación y morfométricas.
2. Caracterizar el patrón de desarrollo de los segmentos intermedios, terminales y puntos de ramificación en neuronas estrelladas espinosas corticales durante el primer mes de vida postnatal de la rata, con técnicas de impregnación y morfométricas.
3. Caracterizar el patrón de desarrollo de filopodios y espinas dendríticas en neuronas estrelladas espinosas corticales durante el primer mes de vida postnatal de la rata, con técnicas de impregnación y morfométricas.

6. Materiales y Métodos

6.1 Procesamiento de Animales

Para realizar el presente trabajo se utilizaron ratas de ambos sexos de la cepa Wistar de las edades 5, 10, 15, 20, 25, 30 días postnatales (DP) provenientes de la colonia del Instituto de Investigaciones Biomédicas. Los animales se mantuvieron en cuartos con temperatura e iluminación (ciclos de 12 horas luz/12 horas oscuridad) controladas y tuvieron acceso a comida y agua *ad libitum*.

6.2 Obtención de las muestras

Animales de 5, 10, 15, 20, 25, 30 días postnatales (n = 8 animales por edad) fueron anestesiados con pertobarbital sódico (20mg/Kg de peso corporal). Una vez anestesiados los animales fueron decapitados y sus cerebros fueron rápidamente extraídos. El PMBSF fue disecado rápidamente, cortado en pequeños bloques de 5 mm³, y posteriormente fijados en paraformaldehído al 4 %.

6.3 Procesamiento Histológico de las muestras

Los bloques fueron incluidos en una solución de Golgi-Cox (Ramón y Cajal, 1932), permitiéndose la impregnación por espacio de 60 días en oscuridad total. Transcurrido el tiempo de impregnación se sacaron los bloques de la solución de Golgi-Cox, se lavaron dos veces en agua corriente y se montaron sobre un vibratomo en el cual se realizaron cortes coronales (120 µm de espesor). Los cortes fueron colocados sobre portaobjetos gelatinizados y montados con Crystal Mount.

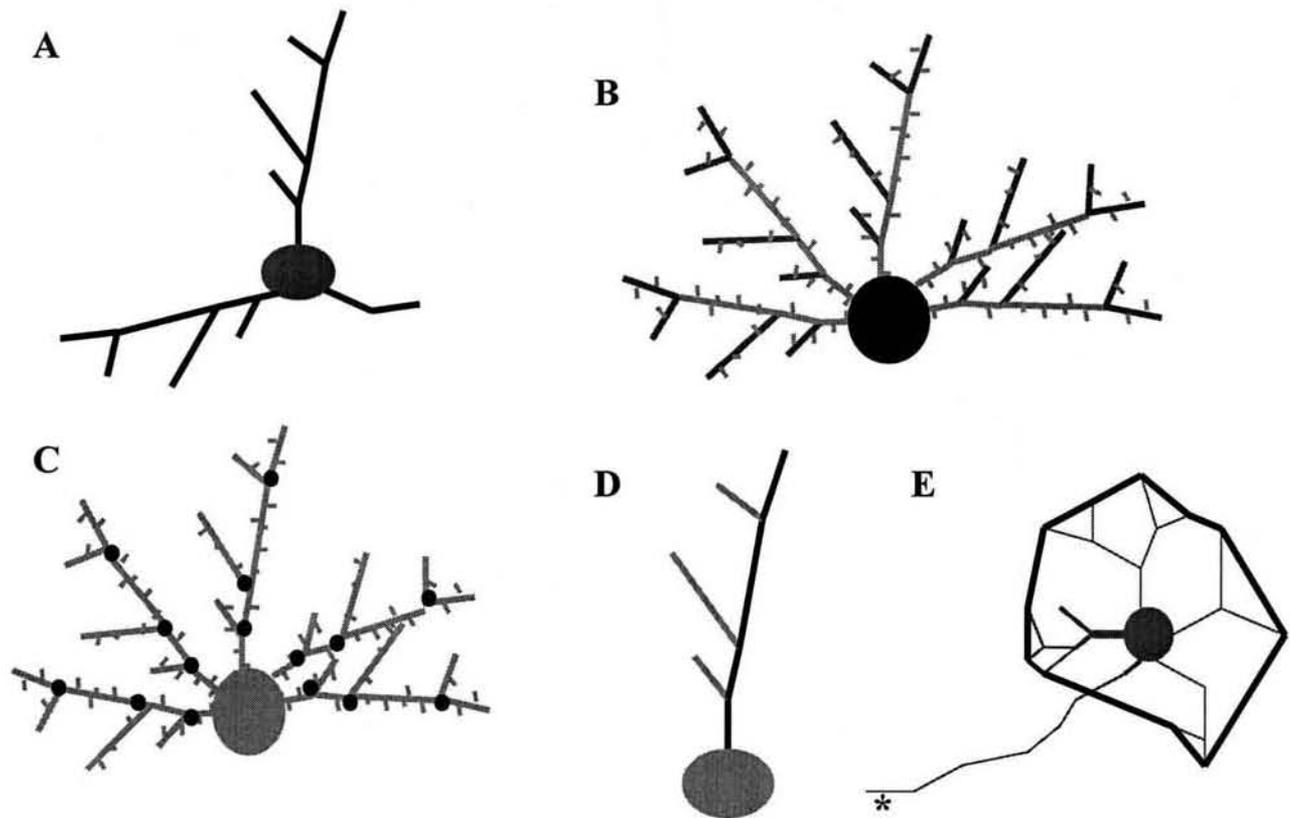


Figura 3. Dibujos del árbol dendrítico que muestra la nomenclatura usada para definir los distintos tipos de procesos dendríticos. Los trazos gruesos en color negro en A muestran a las ramas. Los trazos gruesos en color gris oscuro en B ilustran a los segmentos terminales y los trazos en gris claro a los segmentos intermedios. Nota los pequeños apéndices en B representan a las espinas dendríticas. Los círculos en negro en C representan a los puntos de ramificación. El trazo grueso en color negro en D enseña la longitud máxima de las ramas dendríticas. Finalmente, el trazo grueso en E expresa el área de distribución del árbol dendrítico

6.4 Dibujos en cámara lucida y análisis de los datos

Las laminillas se observaron en un microscopio de campo claro (Nikon) equipado con una cámara lucida. Solo se dibujaron aquellas neuronas estelares espinosas ($n=50$ /edad) que presentaron un grado de impregnación adecuado y cuyos procesos estuvieran lo más completo posible a nuestro criterio. Todos los dibujos fueron realizados a 400X, y una vez terminados se escanearon y digitalizaron utilizando un sistema computarizado de análisis de imágenes (Scion Image, NIH). El número de ramas, de segmentos terminales e

intermedios puntos de ramificación (Fig. 3C), y de espinas dendríticas se contabilizaron manualmente (Fig. 3A y B). para el caso de la complejidad de las ramas dendríticas, se tomo como primer orden al segmento dendrítico que emerge directamente del soma, como segundo orden a los procesos dendríticos resultantes de la ramificación del segmento de primer orden, y así sucesivamente. La longitud de los distintos componentes del árbol se determinó con base a los criterios siguientes:

-Para el caso de la longitud total de las ramas, se sumó la longitud de la rama primaria y de sus segmentos dendríticos.

-Para el caso de las ramas primarias, la longitud se consideró desde su base en el soma hasta el extremo más distal (Fig. 3D).

-Para los segmentos intermedios, se midió la longitud de los intersectos entre dos eventos de ramificación (Fig. 3B).

-Para los segmentos terminales, se determinó la longitud a partir del último punto de ramificación y hasta su extremo más distal (Fig. 3B).

Además se estimó el área de distribución de las arborizaciones dendríticas por célula. Esto se hizo conectando los extremos distales de cada uno de los segmentos terminales (Fig. 3E).

6.6 Análisis estadístico

Para el análisis de los datos obtenidos, se aplicó un análisis de varianza de una vía (ANOVA), seguido de una prueba post hoc de Tukey. En todos los casos se consideró como significativo un valor de p menor a 0.01

6.7 Análisis de la dimensión fractal

Para analizar la complejidad de los árboles dendríticos se determinó su dimensión fractal a través del método de conteo por cajas utilizando el paquete Harmonic Fractals

(ver anexo). El análisis de los datos obtenidos se realizó a través de un análisis de varianza de una vía (ANOVA), seguido de una prueba post hoc de Tukey, con un valor de significancia de menor a 0.01

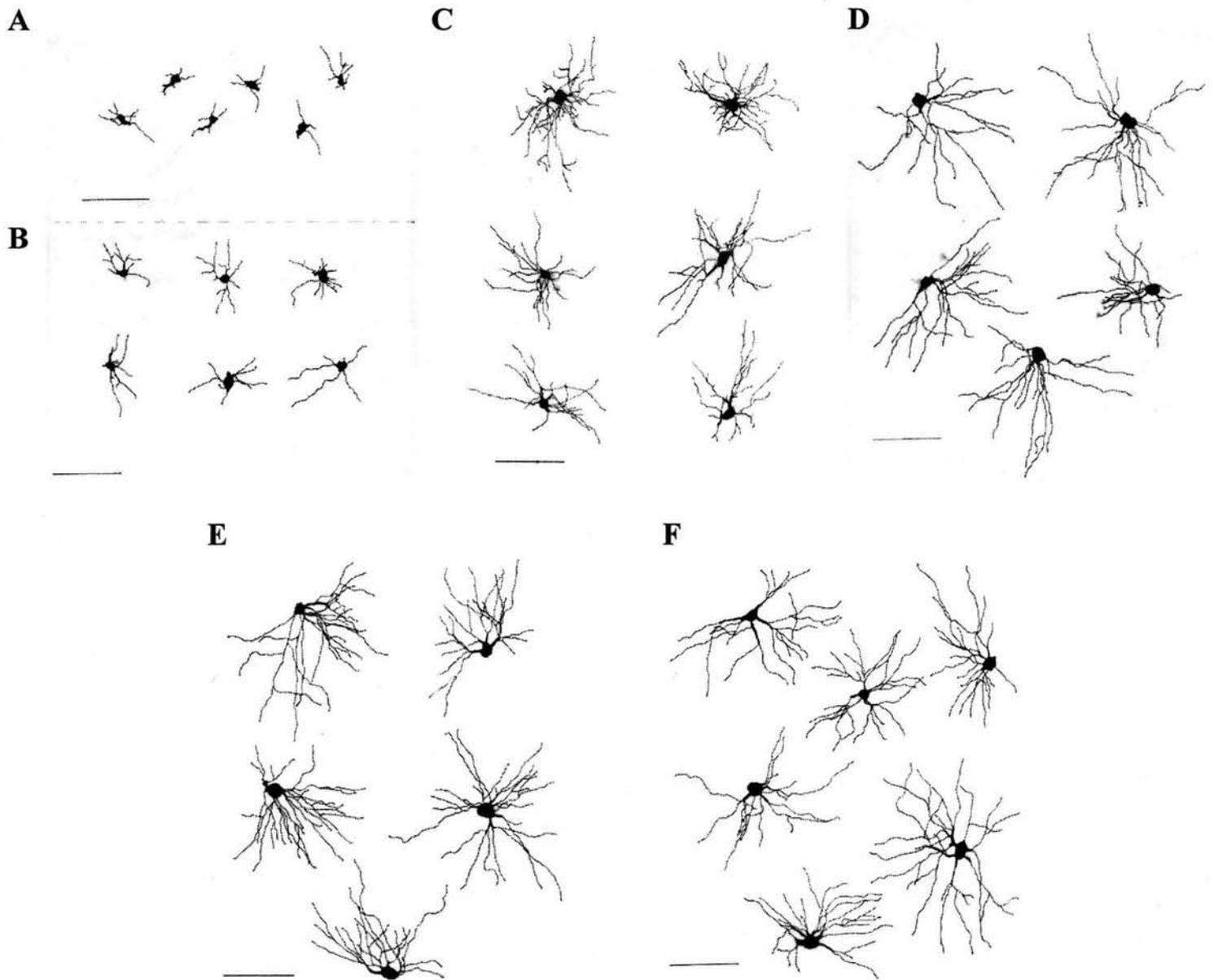


Figura 4. Dibujos representativos de cámara lucida que ilustran el desarrollo de los árboles dendríticos de las neuronas estelares espinosas de la capa IV de la corteza somatosensorial primaria en la rata durante el primer mes de vida postnatal. (A) 5DP, (B) 10DP, (C) 15DP, (D) 20DP, (E) 25DP y (F) 30DP. Barras de Escala= 100 μ m.

7. Resultados

La figura 4 ilustra el desarrollo de los árboles dendríticos de las neuronas estrelladas espinosas de la capa IV de la corteza somatosensorial primaria de la rata durante el primer mes de vida postnatal.

7.1 Patrón de ramificación

Para establecer el patrón de ramificación de los árboles dendríticos de las neuronas estrelladas espinosas se determinaron el número promedio de ramas, puntos de ramificación, y segmentos dendríticos por neurona durante el primer mes de vida postnatal.

7.1.1 Número de ramas

El número de ramas entre los 5 ($\chi = 4.76$, $ds = 1.28$) y 10DP ($\chi = 5.08$, $ds = 1.382$) no mostró diferencias significativas. En contraste, el número de ramas incrementó significativamente del 10DP hacia el término de la segunda semana de vida ($\chi = 7.78$, $ds = 2.243$). Después del 15DP, se observó la eliminación de algunas ramas, evento que culminó hacia la tercera semana postnatal ($\chi = 6.52$, $ds = 1.328$). A partir de 20DP, no se observaron más cambios en el número de ramas (25DP $\chi = 5.92$, $ds = 1.426$; 30DP $\chi = 5.92$, $ds = 1.026$, ver Fig. 5A y D).

Una de las características sobresalientes en la formación del árbol dendrítico es que no todas las ramas dendríticas se ramifican. Más aún, aquellas ramas que no se ramifican parecen disminuir conforme la edad avanza. Así, se cuantificaron el número de ramas con y sin ramificaciones. Las ramas con ramificaciones aumenta durante las primeras dos semanas de vida (5DP $\chi = 1.34$, $ds = 1.15$; 10DP $\chi = 2.98$, $ds = 1.42$; 15DP $\chi = 5.48$, $ds = 1.35$). Posterior, a 15DP el número de ramas no parece modificarse (20DP $\chi = 5.06$, $ds = 1.28$; 25DP $\chi = 4.88$, $ds = 1.15$; 30DP $\chi = 4.96$, $ds = .94$, ver fig 5B y E). Por otro lado, en

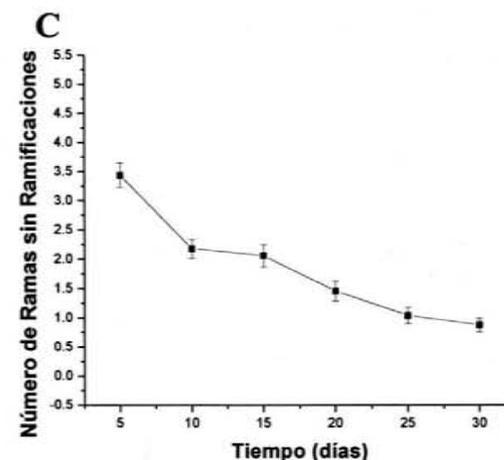
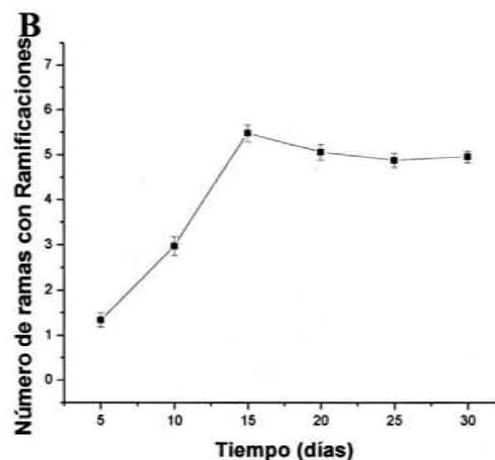
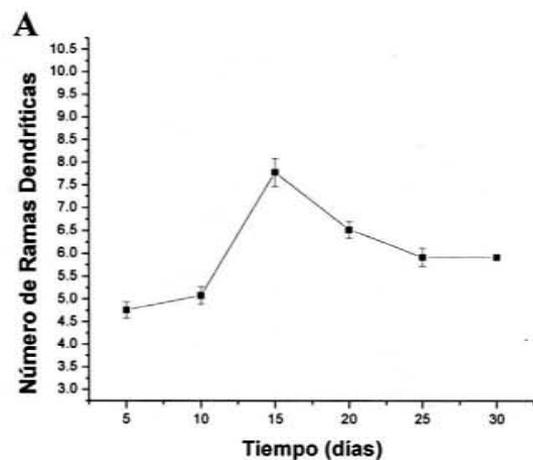
general, las ramas sin ramificaciones disminuyeron significativamente con la edad. La disminución tiene dos componentes, uno entre los 5 y 10DP (5DP $\chi = 3.44$, ds = 1.51; 10DP $\chi = 2.18$, ds = 1.17) y otro entre los 20 y 30DP (20DP $\chi = 1.46$, ds = 1.23; 25DP $\chi = 1.04$, ds = 1.04; 30DP $\chi = 0.877$, ds = 0.857), interrumpidos por una meseta entre los 10 y 20 DP (10DP $\chi = 2.18$, ds = 1.17; 15DP $\chi = 2.06$, ds = 1.34; 20DP $\chi = 1.46$, ds = 1.23, ver fig 5C y F).

7.1.2 Número puntos de ramificación

Con el objeto de evaluar el grado de complejidad del árbol dendrítico se cuantificaron el número de puntos de ramificación y el número de segmentos dendríticos. El número de puntos de ramificación a los 5 y 10 DP fue muy reducido. No se observaron diferencias en este parámetro al comparar estas edades (5DP $\chi = 1.22$, ds = 1.71; 10DP $\chi = 3.8$, ds = 2.79). El número de puntos de ramificación incrementó significativamente del 10DP hacia el término de la segunda semana de vida (15DP $\chi = 16.98$, ds = 5.56). Entre los 15 y 20DP ($\chi = 13.56$, ds = 4.99) se observó un decremento significativo en el número de puntos de ramificación. A partir de 20DP, no se observaron mas cambios en este parámetro (25DP $\chi = 15$, ds = 4.65; 30DP $\chi = 13.42$, ds = 3.87, ver fig 6).

7.1.3 Número de segmentos dendríticos

El número de segmentos totales entre los 5 ($\chi = 8.2$, ds = 3.96) y 10DP ($\chi = 12.92$, ds = 5.77) no mostró diferencias significativas. En contraste, el número de estos procesos incrementó significativamente del 10DP hacia el término de la segunda semana de vida ($\chi = 41.64$, ds = 11.35). Después del 15DP, se observó la eliminación de algunos de estos segmentos, evento que culminó hacia la tercera semana postnatal (20DP $\chi = 33.64$, ds = 0.05). A partir de 20DP, no se observaron más cambios en el número de estos procesos



D

5-10	10-15 *	15-25 *
5-15 *	10-20 *	15-30 *
5-20 *	10-25	20-25
5-25 *	10-30	20-30
5-30 *	15-20 *	25-30

E

5-10 *	10-15 *	15-25
5-15 *	10-20 *	15-30
5-20 *	10-25 *	20-25
5-25 *	10-30 *	20-30
5-30 *	15-20	25-30

F

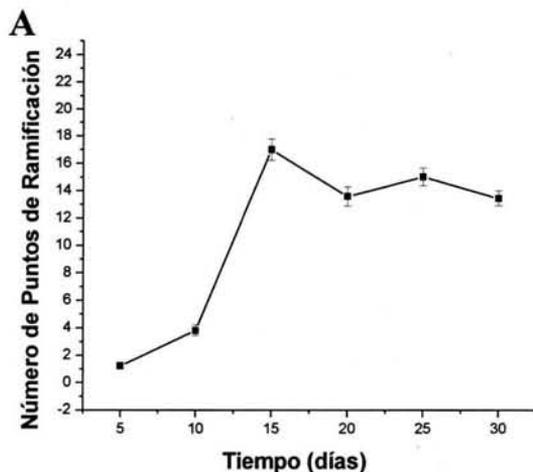
5-10 *	10-15	15-25 *
5-15 *	10-20	15-30 *
5-20 *	10-25 *	20-25
5-25 *	10-30 *	20-30
5-30 *	15-20	25-30

Figura 5. **Número de ramas dendríticas en el desarrollo.** (A, B, C) Gráficas que muestra el número total de ramas (A), de ramas con ramificaciones (B) y ramas sin ramificaciones (C) del árbol dendrítico en función del tiempo. Las tablas en (D, E, F) muestran los resultados de la comparación estadística para el número total de ramas, de ramas con y sin ramificaciones respectivamente. Anova de una vía $p < 0.01$; Tukey * $p < 0.01$.

(25DP $\chi = 35.96$, ds = 9.34; 30DP $\chi = 32.76$, ds = 7.87, ver Fig. 7A y D).

Para conocer si la eliminación de segmentos dendríticos depende de la eliminación selectiva de los segmentos intermedios, terminales o de ambos tipos, éstos se cuantificaron por separado. El número de segmentos terminales entre los 5 ($\chi = 6.58$, ds = 2.59) y 10 DP ($\chi = 8.86$, ds = 3.29) no mostró diferencias significativas. El número de éstos procesos incrementó significativamente del 10DP hacia el término de la segunda semana de vida ($\chi = 24.74$, ds = 6.03). Después del 15DP, se observó la eliminación de algunas de estos segmentos, evento que culminó hacia la tercera semana postnatal ($\chi = 20.08$, ds = 5.13). A partir de 20DP, no se observaron mas cambios en el número de estos procesos (25DP $\chi = 20.98$, ds = 4.8; 30DP $\chi = 19.44$, ds = 3.95, ver fig 7B y E).

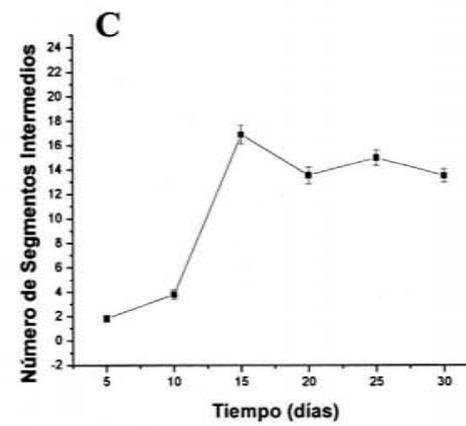
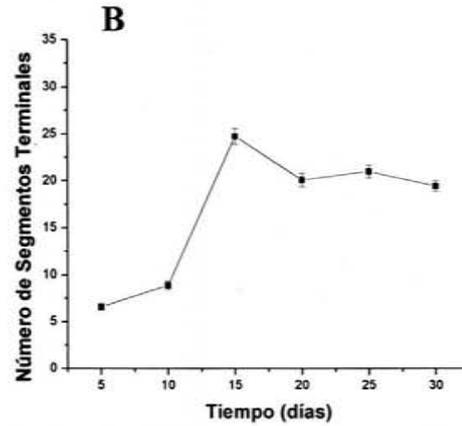
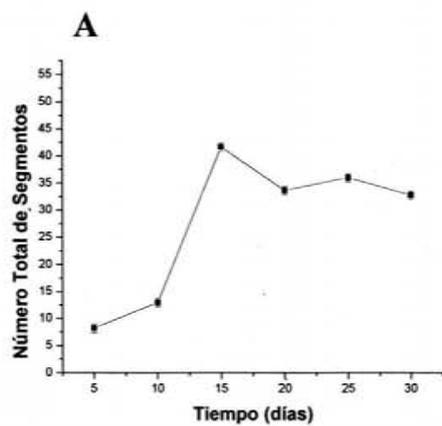
El número de segmentos intermedios entre los 5 ($\chi = 1.84$, ds = 1.82) y 10 DP ($\chi = 3.8$, ds = 2.77) no mostró diferencias significativas. El número de estos procesos incrementó significativamente del 10DP hacia el término de la segunda semana de vida ($\chi = 16.9$, ds = 5.53). Después del 15DP, no se observaron más cambios en el número de estos procesos (20DP $\chi = 13.56$, ds = 4.99; 25DP $\chi = 15$, ds = 4.65; 30DP $\chi = 13.54$, ds = 3.74, ver Fig. 7C y F).



B

5-10	10-15 *	15-25
5-15 *	10-20 *	15-30 *
5-20 *	10-25 *	20-25
5-25 *	10-30 *	20-30
5-30 *	15-20 *	25-30

Figura 6. (A) Gráfica que muestra el número de puntos de ramificación del árbol dendrítico en función del tiempo. La tabla en (B) muestra los resultados de la comparación estadística. Anova de una vía $p < 0.01$; Tukey* $p < 0.01$.



D

5-10	10-15 *	15-25
5-15 *	10-20 *	15-30 *
5-20 *	10-25 *	20-25
5-25 *	10-30 *	20-30
5-30 *	15-20 *	25-30

E

5-10	10-15 *	15-25 *
5-15 *	10-20 *	15-30 *
5-20 *	10-25 *	20-25
5-25 *	10-30 *	20-30
5-30 *	15-20 *	25-30

F

5-10	10-15 *	15-25
5-15 *	10-20 *	15-30
5-20 *	10-25 *	20-25
5-25 *	10-30 *	20-30
5-30 *	15-20	25-30

Figura 7. **Número de segmentos dendríticos en el desarrollo.** (A, B, C) Gráficas que muestra el número total de segmentos (A), de segmentos terminales (B) y de segmentos intermedios (C) del árbol dendrítico en función del tiempo. Las tablas en (D, E, F) muestran los resultados de la comparación estadística para el número total de segmentos, de segmentos terminales e intermedios respectivamente. Anova de una vía $p < 0.01$; Tukey * $p < 0.01$.

7.1.4 Número de segmentos de distinto orden por rama

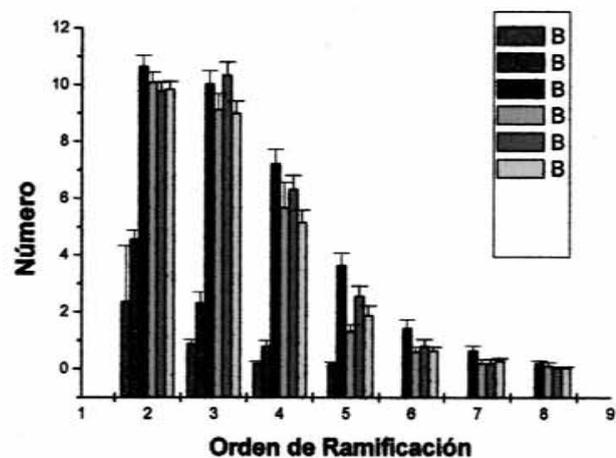
Para evaluar la complejidad de las ramas dendríticas durante su desarrollo, cuantificamos el número de segmentos de distinto orden por rama. En general, el número de segmentos de distinto orden por rama incrementa significativamente desde 5DP hasta 15DP. A partir de esta edad, el estimado del parámetro evaluado se mantiene estable (Fig. 8).

7.2 Crecimiento del árbol dendrítico: Longitud y área dendrítica

Para establecer el patrón de crecimiento de los árboles dendríticos de las neuronas estrelladas espinosas se determinaron la longitud promedio de ramas, segmentos, así como del área dendríticas por neurona durante el primer mes de vida postnatal.

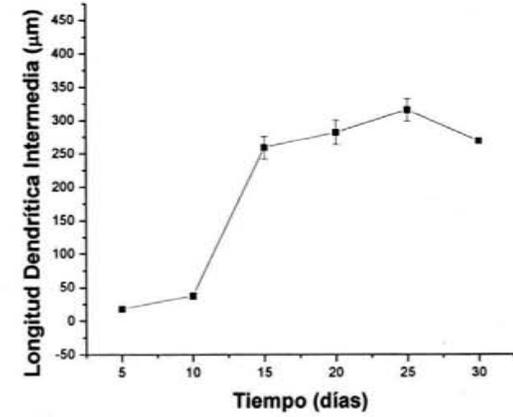
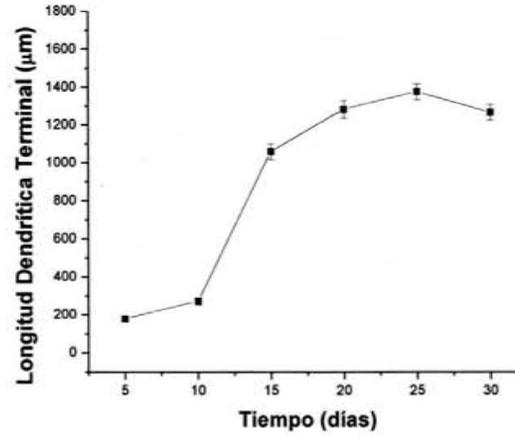
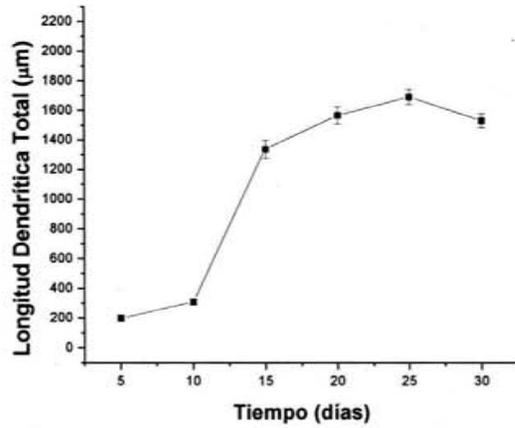
7.2.1 Longitud total del árbol dendrítico.

La longitud total del árbol dendrítico entre los 5 ($\chi = 198.17 \mu\text{m}$, $ds = 95.12 \mu\text{m}$) y 10DP ($\chi = 309.89 \mu\text{m}$, $ds = 158.05 \mu\text{m}$) no mostró diferencias significativas. En contraste, la longitud incrementó significativamente del 10DP hacia el término de la tercera semana de vida ($\chi = 1337.74 \mu\text{m}$, $ds = 438.84 \mu\text{m}$). A partir de 20DP no se observaron más cambios en la longitud total del árbol dendrítico (20DP $\chi = 1567.35 \mu\text{m}$, $ds = 412.39 \mu\text{m}$; 25DP $\chi = 1691.82 \mu\text{m}$, $ds = 358.05 \mu\text{m}$; 30DP $\chi = 1531.51 \mu\text{m}$, $ds = 330.37 \mu\text{m}$, ver Fig. 9A y D). El análisis por separado de los segmentos intermedios mostró que su longitud es similar entre 5 ($\chi = 18.03 \mu\text{m}$, $ds = 22.22 \mu\text{m}$) y 10 DP ($\chi = 37.4 \mu\text{m}$, $ds = 36.99 \mu\text{m}$). Después 10DP, no se observaron cambios en la longitud de estos procesos (15DP $\chi = 259.29 \mu\text{m}$, $ds = 121.42 \mu\text{m}$; 20DP $\chi = 282.05 \mu\text{m}$, $ds = 130.15 \mu\text{m}$; 25DP $\chi = 315.56 \mu\text{m}$, $ds = 116.37 \mu\text{m}$; 30DP $\chi = 269.17 \mu\text{m}$, $ds = 94.08 \mu\text{m}$, ver Fig. 9C y F). Con relación a los segmentos terminales, el comportamiento de su longitud es similar al observado en la longitud total del árbol dendrítico (5DP $\chi = 180.13 \mu\text{m}$, $ds = 83.25 \mu\text{m}$; 10DP $\chi = 272.59$



Días	Ordenes						
	2	3	4	5	6	7	8
5-10	*	*					
5-15	*	*	*	*	*		
5-20	*	*	*	*	*		
5-25	*	*	*	*	*		
5-30	*	*	*	*	*		
10-15	*	*	*	*	*		
10-20	*	*	*	*	*		
10-25	*	*	*	*	*		
10-30	*	*	*	*			
15-20					*		
15-25				*			
15-30				*			
20-25							
20-30							
25-30							

Figura 8. Complejidad de las ramas durante el desarrollo. (A) Gráfica que muestra el número de orden por rama del árbol dendrítico en función del tiempo. La tabla en (B) muestran los resultados de la comparación estadística. Anova de una vía $p < 0.01$; Tukey * $p < 0.01$.



5-10	10-15 *	15-25*
5-15 *	10-20 *	15-30
5-20 *	10-25 *	20-25
5-25 *	10-30 *	20-30
5-30 *	15-20 *	25-30

5-10	10-15 *	15-25*
5-15 *	10-20 *	15-30*
5-20 *	10-25 *	20-25
5-25 *	10-30 *	20-30
5-30 *	15-20 *	25-30

5-10	10-15 *	15-25
5-15 *	10-20 *	15-30
5-20 *	10-25 *	20-25
5-25 *	10-30 *	20-30
5-30 *	15-20	25-30

Figura 9. Longitud del árbol dendrítico en el desarrollo. (A, B, C) Gráficas que muestra la longitud total (A), de los segmentos terminales (B) y de los segmentos intermedios (C) del árbol dendrítico en función del tiempo. Las tablas en (D, E, F) muestran los resultados de la comparación estadística para la longitud total, y de los segmentos terminales e intermedios respectivamente. Anova de una vía $p < 0.01$; Tukey * $p < 0.01$.

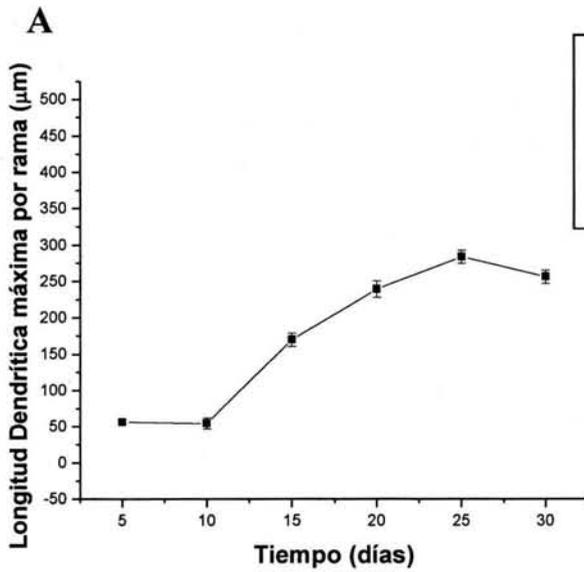
μm , $ds = 134.55 \mu\text{m}$; 15DP $\chi = 1060.11 \mu\text{m}$, $ds = 303.18 \mu\text{m}$; 20DP $\chi = 1283.3 \mu\text{m}$, $ds = 335.04 \mu\text{m}$; 25DP $\chi = 1376.74 \mu\text{m}$, $ds = 296.13 \mu\text{m}$; 30DP $\chi = 1265.87 \mu\text{m}$, $ds = 290.28 \mu\text{m}$, ver Fig. 9B y E).

7.2. 2 Longitud máxima de las ramas dendríticas.

La longitud máxima de las ramas dendríticas incrementó significativamente desde 5DP hasta 20DP (5DP $\chi = 56.81 \mu\text{m}$, $ds = 34.21 \mu\text{m}$; 10DP $\chi = 54.82 \mu\text{m}$, $ds = 49.85 \mu\text{m}$; 15DP $\chi = 170.11 \mu\text{m}$, $ds = 148.95 \mu\text{m}$; 20DP $\chi = 239.28 \mu\text{m}$, $ds = 168.11 \mu\text{m}$). A partir de esta edad, la longitud máxima se mantiene constante (25DP $\chi = 283.63 \mu\text{m}$, $ds = 194.02 \mu\text{m}$; 30DP $\chi = 256.1 \mu\text{m}$, $ds = 155.62 \mu\text{m}$, ver Fig. 10).

7.2.3 Área de distribución del árbol dendrítico

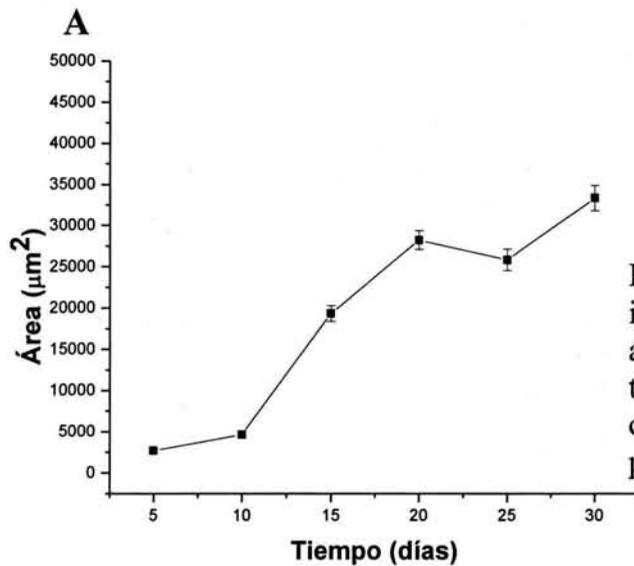
El área de distribución del árbol dendrítico es similar entre 5 ($\chi = 2715.34 \mu\text{m}$, $ds = 1495.06 \mu\text{m}$) y 10DP ($\chi = 4667.67 \mu\text{m}$, $ds = 3243.83 \mu\text{m}$). Posteriormente, incrementó significativamente de 10 a 20DP (15DP $\chi = 19353.26 \mu\text{m}$, $ds = 6783.44 \mu\text{m}$; 20DP $\chi = 28223.616 \mu\text{m}$, $ds = 7886.19 \mu\text{m}$). Entre las edades de 20 y 25 ($\chi = 25831.33 \mu\text{m}$, $ds = 9274.93 \mu\text{m}$) no se observaron diferencias, pero después de 25DP se observa un nuevo incremento (30 DP $\chi = 33342.90 \mu\text{m}$, $ds = 10843.47 \mu\text{m}$, ver Fig 11).



B

5-10 **	10-15 **	15-25 **
5-15 **	10-20 **	15-30 **
5-20 **	10-25 **	20-25
5-25 **	10-30 **	20-30
5-30 **	15-20 **	25-30

Figura 10. (A) Gráfica que muestra la longitud máxima de las ramas en los árboles dendríticos en función del tiempo. La tabla en (B) muestra los resultados de la comparación estadística. Anova de una vía $p < 0.01$; Tukey* $p < 0.01$



B

5-10	10-15 **	15-25 **
5-15 **	10-20 **	15-30 **
5-20 **	10-25 **	20-25
5-25 **	10-30 **	20-30**
5-30 **	15-20 **	25-30**

Figura 11. (A) Gráfica que muestra el incremento del área de distribución de los árboles dendríticos en función del tiempo. La tabla en (B) muestra los resultados de la comparación estadística. Anova de una vía $p < 0.01$; Tukey* $p < 0.01$

7.3 Número de filopodios y espinas dendríticas

Para establecer el patrón de formación de filopodios y espinas dendríticas de los árboles dendríticos de las neuronas estrelladas espinosas se determinaron el número

promedio de filopodios y espinas dendríticas por neurona durante el primer mes de vida postnatal.

El número de filopodios presentes en el árbol dendrítico no varió desde los 5DP hasta los 15DP (5DP $\chi = 3.44$, ds = 3.24; 10DP $\chi = 4.8$, ds = 3.67; 15DP $\chi = 3.78$, ds = 4.4). Después de esta fecha, no se observaron filopodios en el árbol dendrítico (Fig. 12).

Por otro lado, no se observaron espinas dendríticas antes de los 15DP. El número total de espinas sobre el árbol dendrítico incrementó desde 15 DP hasta 25 DP (15DP $\chi = 424.2$, ds = 128.92; 20DP $\chi = 503.34$, ds = 146.7; 25DP $\chi = 586.34$, ds = 122.46). Entre 25 y 30 DP se observó una disminución en el número de espinas (30DP $\chi = 489.24$, ds = 102.02, ver Fig. 13A y D). El número de espinas sobre segmentos terminales se comportó de manera semejante a los descrito para el total de espinas (15DP $\chi = 366.04$, ds = 112.92; 20DP $\chi = 453.66$, ds = 134.2; 25DP $\chi = 515.7$, ds = 105.12; 30DP $\chi = 428.18$, ds = 88.55, ver Fig. 13B y E). El número de las espinas localizadas sobre los segmentos intermedios no mostró cambios desde 15DP (15DP $\chi = 58.04$, ds = 37.19; 20DP $\chi = 56.62$, ds = 34.34; 25DP $\chi = 70.64$, ds = 35.45; 30DP $\chi = 61.06$, ds = 27.79, ver Fig. 13C y F).

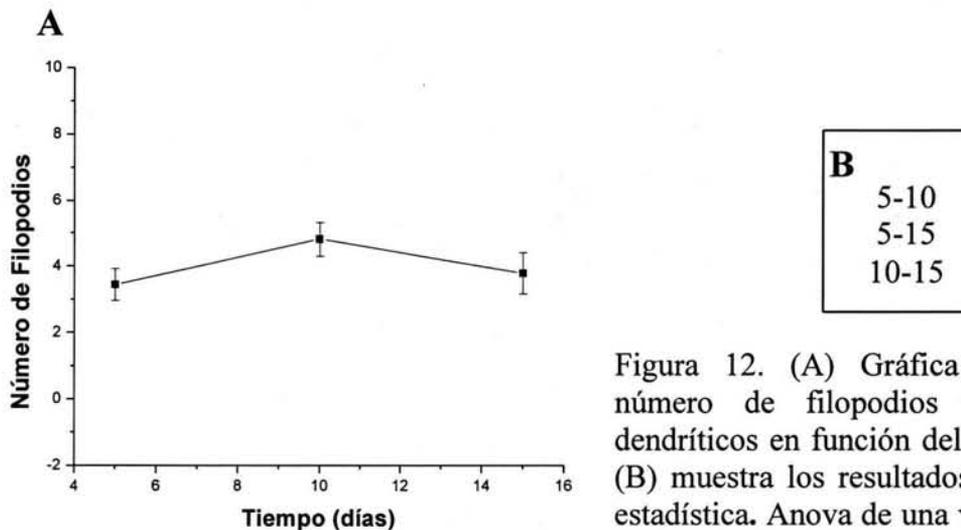
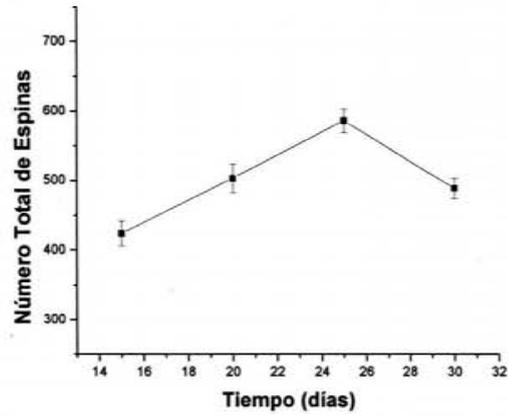
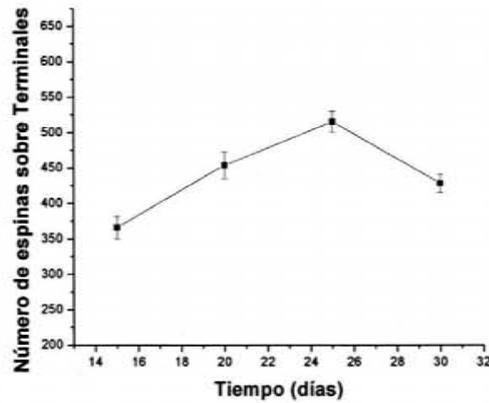


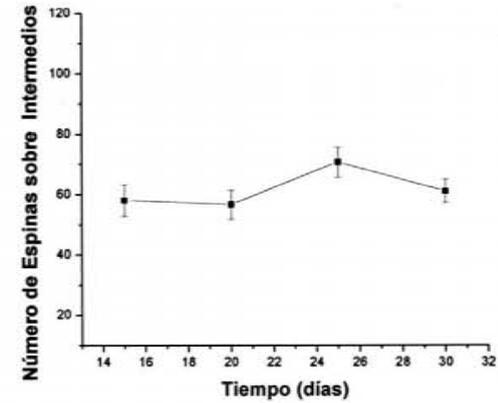
Figura 12. (A) Gráfica que muestra el número de filopodios sobre los árboles dendríticos en función del tiempo. La tabla en (B) muestra los resultados de la comparación estadística. Anova de una vía $p < 0.01$; Tukey* $p < 0.01$



15-20
15-25 *
15-30
20-25
20-30
25-30 *



15-20 *
15-25 *
15-30 *
20-25 *
20-30
25-30 *



15-20
15-25
15-30
20-25
20-30
25-30

Figura 13. **Número de espinas dendríticas en el desarrollo.** (A, B, C) Gráficas que muestra el número de espinas dendríticas total (A), sobre los segmentos terminales (B) y sobre los segmentos intermedios (C) del árbol dendrítico en función del tiempo. Las tablas en (D, E, F) muestran los resultados de la comparación estadística para las espinas totales, y sobre los segmentos terminales e intermedios respectivamente. Anova de una vía $p < 0.01$; Tukey * $p < 0.01$.

7.4 Análisis de la dimensión fractal

La complejidad del árbol incrementa durante las primeras 2 semanas postnatales (5DP $\chi = 1.123$, $ds = 0.0432$; 10DP $\chi = 1.193$, $ds = 0.093$; 15DP $\chi = 1.321$, $ds = 0.05$). Posterior a la segunda semana de vida postnatal, no se observaron diferencias en la complejidad (20DP $\chi = 1.318$, $ds = 0.044$; 25DP $\chi = 1.314$, $ds = 0.039$; 30DP $\chi = 1.291$, $ds = 0.38$, ver Fig. 16).

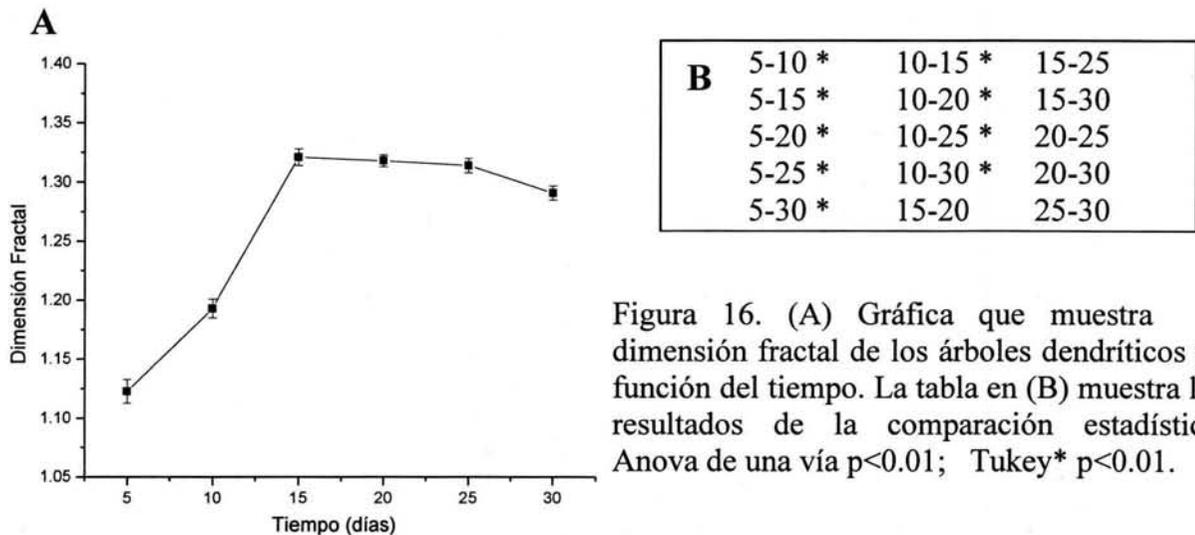


Figura 16. (A) Gráfica que muestra la dimensión fractal de los árboles dendríticos en función del tiempo. La tabla en (B) muestra los resultados de la comparación estadística. Anova de una vía $p < 0.01$; Tukey* $p < 0.01$.

8. Discusión

La visión tradicional de los mecanismos de la dendritogénesis sugiere que los árboles dendríticos se configuran con base en la sobreproducción de sus procesos dendríticos y la posterior eliminación de algunos de ellos hasta alcanzar su morfología adulta (Lund *et al.*, 1977; Garey y Saini, 1981; Ramoa *et al.*, 1988; Vaughn *et al.*, 1988; Kalb, 1994; Wingate y Thompson, 1994). No obstante, existe evidencia que muestra que los árboles dendríticos se configuran predominantemente adicionando procesos dendríticos sin eliminación (Rakic, 1972; Berry y Bradley, 1976; Wise *et al.*, 1979; Parnavelas y

Uylings, 1980; Sakaguchi *et al.*, 1984; Petit *et al.*, 1988; Bloomfield y Hitchcock, 1991; Dailey y Smith, 1996).

Nuestros resultados muestran que los árboles dendríticos de las neuronas estrelladas espinosas se construyen combinando eventos de eliminación y de adición de procesos dendríticos. Los procesos dendríticos primarios no ramificados y los segmentos terminales son sujetos a eventos de retracción durante su desarrollo. Esta conclusión se apoya en las siguientes observaciones: el árbol dendrítico sobre produce dichos elementos durante las primeras dos semanas postnatales. Posterior al término de la segunda semana postnatal, algunos de estos procesos dendríticos se eliminan evento que culmina alrededor de la tercera semana de vida. Finalmente, los procesos dendríticos que permanecen conformando al árbol dendrítico son estabilizados y consolidados hasta el término del primer mes de vida postnatal. Esta configuración aparentemente permanece estable durante la adultez (Coleman *et al.*, 1985). En contraste, los procesos dendríticos primarios con ramificaciones y los segmentos intermedios, muestra fenómenos de adición durante su desarrollo. Esto se apoya en las observaciones que muestran que estos procesos dendríticos se elaboran de manera aditiva durante las primeras dos semanas postnatales, y permanecen estables hasta el término del primer mes de vida postnatal. Más aún, tanto la longitud dendrítica total y de los segmentos intermedios y terminales, como el área de distribución del árbol dendrítico, no muestran una disminución. Por lo que no existe una pérdida de superficie dendrítica potencial de contacto sináptico después de la tercera semana postnatal.

Las espinas dendríticas que emergen sobre los segmentos terminales son sujetas a eventos de eliminación a partir de los 25DP. En contraste, las espinas dendríticas que emergen desde los troncos de los segmentos intermedios se adicionan hasta la segunda semana de vida, después de la cual se estabilizan.

Con base en los resultados obtenidos proponemos que los árboles dendríticos en el desarrollo son sujetos a eventos de reorganización, en donde existe una eliminación selectiva de los segmentos terminales y las ramas no ramificadas, y a la adición y ulterior estabilización de procesos ramificados y segmentos intermedios. Esta visión bimodal “reorganizativa” contrasta con aquellas puramente regresivas o aditivas propuestas previamente para explicar el desarrollo de los árboles dendríticos en otras poblaciones neuronales (Regresivas, Lund *et al.*, 1977; Garey y Saini, 1981; Ramoa *et al.*, 1988; Vaughn *et al.*, 1988; Kalb, 1994; Wingate y Thompson, 1994. Aditivas, Rakic, 1972; Berry y Bradley, 1976; Wise *et al.*, 1979; Parnavelas y Uylings, 1980; Sakaguchi *et al.*, 1984; Petit *et al.*, 1988; Bloomfield y Hitchcock, 1991; Dailey y Smith, 1996).

No obstante los resultados obtenidos sobre la dinámica bimodal del crecimiento de los procesos dendríticos, la superficie de membrana y de contacto potencial de las neuronas incrementa durante las primeras tres semanas de vida postnatal, estabilizándose después de esta edad. En apoyo a esta conclusión, el análisis de la dimensión fractal muestra que el árbol incrementa su complejidad durante las dos primeras semanas de vida postnatal. Posterior a esta edad, la complejidad de los árboles se mantiene estable hasta el término del primer mes de vida postnatal. En conjunto nuestros resultados muestran que la eliminación de procesos del árbol dendrítico, es compensada por el incremento en longitud de los que permanecen. Es por esto que no se observa una pérdida de superficie membranosa de las dendritas durante su desarrollo.

Nuestros resultados confirman la existencia de tres fases necesarias para la adquisición de la morfología adulta del árbol dendrítico (Lund *et al.*, 1977). En la primera, hay una producción moderada y basal de estos procesos dendríticos sin cambios aparentes dentro de los primeros días 10 DP. En la segunda, se observa un incremento tanto en el

número, como en la longitud de los procesos dendríticos. Finalmente, la tercera se caracteriza por la eliminación de algunos de los procesos terminales, la consolidación de los intermedios, y la estabilización de la superficie de membrana de los árboles dendríticos. Al término de estas fases y hacia la tercera semana de vida los árboles se estabilizan alcanzando la morfología adulta (Coleman *et al.*, 1985). Aunque no sabemos el por qué los árboles dendríticos parecen disminuir su proceso de crecimiento entre 15DP y 20DP, el hecho de que el movimiento voluntario de las vibrisas ocurra entre los días 12 a 15 de vida postnatal, sugiere que el incremento en la actividad neuronal promueve el cese del crecimiento y la posterior estabilización del árbol (Dailey y Smith, 1996; White *et al.*, 1997; Rajan y Cline, 1998; Wu y Cline, 1998; Wu *et al.*, 1999; Grutzendler *et al.*, 2002). Adicionalmente, estos resultados podrían explicar porque la configuración de los árboles dendríticos de neuronas corticales sometidas a enriquecimiento sensorial (ambientes sociales o juguetes) alrededor de la segunda semana de vida postnatal, no muestra diferencias al compararse al inicio y término del enriquecimiento (Marin-Padilla y Stibitz, 1968; Greenough y Volkmar, 1973; Maletic-Savatic *et al.*, 1999; Lendval *et al.*, 2000).

No existe evidencia suficiente que muestre como se originan las espinas dendríticas. Por años se ha considerado que los filopodios son los precursores de las espinas dendríticas (Dailey, Smith, 1996; Ziv y Smith, 1996; Engert y Bonhoeffer, 1999; Maletic-Savatic *et al.*, 1999; Portera-Cailliau y Yuste, 2001; Sala, 2002). Contrario a lo que se piensa, nuestros resultados sugieren que los filopodios no son los precursores de las espinas dendríticas. Esto es apoyado por la falta de coincidencia del número de filopodios y de espinas en las ramas dendríticas durante el desarrollo. Es decir, cuando las espinas aparecen sobre los árboles dendríticos no se observaron cambios en el número de filopodios (15DP).

Más aún, para el tiempo que los filopodios han desaparecido, las espinas continúan incrementando su número (15-25DP).

Bibliografía

1. Agmon, A., Yang, L. T., O'Dowd, D. K. y Jones, E. G. 1993. Organized Growth of Thalamocortical Axons from the Deep Tier of Terminations into Layer IV of Developing Mouse Barrel Cortex. *J Neurosci* 13, 5365-5382.
2. Agmon, A., Yang, L. T., Jones, E. G. y O'Dowd, D. K. 1995. Topological Precision in the Thalamic Projection to Neonatal mouse Barrel Cortex. *J Neurosci* 15, 549-561.
3. Agmon-Snir, H., Carr, C. E. y Rinzel, J. 1998. The role of dendrites in auditory coincidence detection. *Nature* 393, 268-272.
4. Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. y Walter, P. 2002. Molecular Biology of the Cell. Garland Science. Cap. 16
5. Bagnard, D., Lohrum, M., Uziel, D., Püschel, A. W. y Bolz J. 1998. Semaphorins act as attractive and repulsive guidance signals during the development of cortical projections. *Development* 125, 5043-5053.
6. Bagnard, D., Thomasset, N., Lohrum, M., Püschel, A. W. y Bolz J. 2000. Spatial Distributions of Guidance Molecules Regulate Chemorepulsion and chemoattraction of Growth Cones. *J Neurosci* 20, 1030-1035.
7. Balice-Gordon, R. J., Chua, C. K., Nelson, C. C. y Lichtman, J. W. 1993. Gradual Loss of Synaptic cartels Precedes axon Withdrawal at developing Neuromuscular junctions. *Neuron* 11, 801-815.
8. Benes, F. M., Parks, T. N. y Rubel, E. W. 1977. Rapid Dendritic Atrophy Following Deafferentation: An EM Morphometric Analysis. *Brain Res* 122, 1-13.
9. Benshalom, G. y White, E. L. 1986. Quantification of Thalamocortical synapses with spiny Stellate Neurons in Layer IV of Mouse Somatosensory Cortex. *J Comp Neur* 253, 303-314.
10. Berridge, M. J. 1998. Neuronal Calcium Signaling. *Neuron* 21, 13-26.
11. Berry, M. y Bradley P. 1976. The growth of the dendritic trees of Purkinje cells in the cerebellum of the rat. *Brain Res* 112, 1-35.
12. Blazer, P. F., Catsicas, S. y Clarke, P. G. H. Retrograde modulation of Dendritic geometry in the vertebrate brain during development. *Dev Brain Res* 57, 139-142.
13. Bloomfield, S. A. y Hitchcock, P. F. 1991. Dendritic Arbors of Large-Field Ganglion Cells Shows Scaled Growth during Expansion of the Goldfish Retina: A Study of Morphometric and Electrotonic Properties. *J Neurosci* 11, 910-917.
14. Caleo, M. y Maffei, L. 2002. Neurotrophins and Plasticity in the Visual Cortex. *Neuroscientist* 8, 52-61.
15. Cantallops, I., Haas K. y Cline H. T. 2000. Postsynaptic CPG15 promotes synaptic maturation and presynaptic axon arbor elaboration in vivo. *Nat. Neurosci.* 3, 1004-1011.
16. Coleman, P. D., Buell, S. J., Magagna, L., Flood, D. G. y Curcio, A. A. 1985. Stability of Dendrites in Cortical Barrels of C57BL/6N Mice Between 4 and 45 Months. *Neurobiol Agin* 7, 101-105.
17. Condrón, B. G. y Zinn, K. 1997. Regulated neurite tensión as a mechanism for determination of neuronal arbor geometries in vivo. *Curr Biol* 7, 813-816.
18. Craig, A. M. y Banker, G. 1994. Neuronal polarity. *Annu. Rev. Neurosci.* 17, 267-310.
19. Crair, M. C., Gillespie, D. C. y Stryker, M. P. 1998. The role of Visual Experience in the Development of Columns in Cat Visual Cortex. *Science* 279, 566-570.

20. Crossin, K. L., Hoffman, S., Tan, S.-S. y Edelman, G. M. 1989. Cytotactin and its Proteoglycan Ligand Mark Structural and Functional Boundaries in Somatosensory Cortex of the Early Postnatal Mouse. *Development Biology* 136, 381-392.
21. Dailey, M. E. y Smith, S. J. 1996. The Dynamics of Dendritic Structure in Developing Hippocampal Slice. *J Neurosci* 16, 2983-2994.
22. Dalva, M. B., Gosh, A. y Shatz, C. J. Independent Control of Dendritic and Axonal Form in the Developing Lateral Geniculate Nucleus. *J Neurosci* 14, 3588-3602.
23. Datwani, A., Iwasato, T., Itohara, S. y Erzurumlu, R. S. 2002. NMDA Receptor-Dependent Pattern Transfer from Afferents to Postsynaptic Cells and Dendritic Differentiation in the Barrel Cortex. *Mol Cell Neurosci* 21, 477-492.
24. Davies, A. M. 2000. Neurotrophic modulation of neurite growth. *Curr. Biol.*, 10, R198-R200.
25. Denis-Donini, S., Glowinski, J. y Prochiantz, A. 1984. Glial heterogeneity may define the three-dimensional shape of mouse mesencephalic dopaminergic neurons. *Nature* 307, 641-643.
26. Dickson, B. J. 2002. Molecular Mechanisms of Axon Guidance. *Science* 298, 1959-1964.
27. Engert, F. y Bonhoeffer, T. 1999. Dendritic spine changes associated with hippocampal long-term synaptic plasticity. *Nature* 399, 66-70.
28. Erzurumlu, R. S. y Kind, P. C. 2001. Neuronal activity: sculptor of "barrels" in neocortex. *TRENDS in Neurosci* 24, 589-595.
29. Fenstermaker, V., Chen, Y., Ghosh, A. y Yuste, R. 2004. Regulation of dendritic length and branching by Semaphorin 3A. *J Neurobiol* 58, 403-412.
30. Gan, W.-B. y Lichtman, J. W. 1998. Synaptic segregation at the Developing Neuromuscular Junction. *Science* 282, 1508-1511.
31. Garey, L. J. y Saini, K. D. 1981. Golgi Studies of the Normal Development of Neurons in the Lateral Geniculate Nucleus of the Monkey. *Exp Brain Res* 44, 117-128.
32. Gray, L., Smith, Z. y Rubel, E. W. 1982. Developmental and experiential changes in dendritic symmetry in n. laminaris of the chick. *Brain Res* 244, 360-364.
33. Greenough, W. T. y Volkmar, F. R. 1973. Patter of Dendritic Branching in Occipital Cortex of Rats Reared in Complex Environments. *Exp Neur* 40, 491-504.
34. Greenough, W. T. y Chang, F. F. 1988. Dendritic pattern formation involves both oriented regression and oriented growth in the barrels of mouse somatosensory cortex. *Dev Brain Res* 43, 148-152.
35. Grutzendler, J., Kasthuri, N. y Gan, W.-B. 2002. Long-term dendritic spine stability in the adult cortex. *Nature* 420, 812-816.
36. Hall, A. 1998. Rho GTPases and the Actin Cytoskeleton. *Science* 279, 509-514.
37. Hall, A. C., Lucas, F. R. y Salinas, P. C. 2000. axonal remodeling and synaptic Differentiation in cerebellum Is Regulated by WNT-7 a Signaling. *Cell* 100, 525-535.
38. Harris, K. M., Jensen, F. E. y Tsao, B. H. 1989. Ultrastructure, Development, and Plasticity of Dendritic Spine Sinapses in Area CA1 of the Rat hippocampus: Extending Our Vision With Serial Electron Microscopy and Three-Dimensional Analyses. *The Hippocampus* 33-52.
39. Harris, K. M. 1999. Structure, development, and plasticity of dendritic spines. *Curr Opin Neurobiol* 9, 843-848.
40. Harris, R. M. y Woolsey, T. A. 1979. Morphology of Golgi-impregnated neurons in mouse cortical barrels following vibrissae damage at different post-natal ages. *Brain Res* 161, 143-149.
41. Häusser, M., Spruston, N., y Stuart, G. J. 2000. Diversity and Dynamics of Dendritic Signaling. *Science* 290, 739-744.

42. Hely, T. A., Graham, B. y Van Ooyen, A. 2001. Acomputational Model of Dendrite elongation and Branching Based on MAP2 Phosphorylation. *J theor Biol* 210, 375-384.
43. Hickmott, P. W. y Merzenich, M. M. 1999. Dendritic Bias of Neurons in Rat Somatosensory Cortex Associated With a Functional Boundary. *J Comp Neur* 409, 385-399.
44. Horch, H. W., Krüttgen, A., Portbury, S. D. y Katz, L. C. 1999. Destabilization of Cortical Dendrites and Spines by BDNF. *Neuron* 23, 353-364.
45. Hume, R. I. y Purves, D. 1981. Geometry of neonatal neurones and regulation of synapse elimination. *Nature* 293, 469-471.
46. Jhaveri, S., Erzurumlu, R. S. y Crossin, K. 1991. Barrel construction in rodent neocortex: Role of Thalamic afferents versus extracellular matrix molecules. *Proc Natl Acad Sci USA* 88, 4489-4493.
47. Kaethner, R. J. y Stuermer, A. O. 1997. Dynamics of Process Formation during Differentiation of Tectal Neurons in Embryonic Zebrafish. *J Neurobiol* 32, 627-639.
48. Kalb, R. G. 1994. Regulation of motor neuron dendrite growth by NMDA receptor activation. *Development* 120, 3063-3071.
49. Kater, S. B. y Mills, L. R. 1991. Regulation of Growth Cone Behavior by Calcium. *J Neurosci* 11, 891-899.
50. Kennedy, M. B. 1989. Regulation of neuronal function by calcium. *Trends Neurosci* 12, 417-420.
51. Killackey, H. P., Rhoades, R. W. y Bennett-Clarke, C. A. 1995. The formation of a cortical somatotopic map. *TINS* 18, 402-407.
52. Keller-Peck, C. R., Walsh, M. K., Gan, W.-B., Feng, G., Sanes, J. R. y Litchman, J. W. 2001. Asynchronous Synapse Elimination in Neonatal Motor Units: Studies Using GFP Transgenic Mice. *Neuron* 31, 381-394.
53. Kossel, A. H., Williams, C. V., Schweizer, M. y Kater, S. B. 1997. Afferent Innervation Influences the Development of Dendritic Branches and Spines via Both Activity-Dependent and Non-Activity-Dependent Mechanisms. *J Neurosci* 17, 6314-6324.
54. Lein, P., Johnson M., Guo, X., Rueger, D. y Higgins D. 1995. Osteogenic Protein-1 Induces Dendritic Growth in Rat Sympathetic Neurons. *Neuron* 15, 597-605.
55. Lendval, B., Stern, E. A., Chen, B. y Svoboda, K. 2000. Experience-dependent plasticity of dendritic spines in the developing rat barrel cortex in vivo. *Nature* 404, 876-881.
56. Lund, J. S., Boothe, R. G. y Lund, R. D. 1977. Development of Neurons in the Visual Cortex (Area 17) of the Monkey (*Macaca nemestrina*): A Golgi Study from Fetal Day 127 to Postnatal Maturity. *J Comp Neur* 176, 149-188.
57. Luo, L. 2002. Actin Cytoskeleton Regulation in Neuronal Morphogenesis and Structural Plasticity. *Annu Rev Cell Dev Biol* 18, 601-635.
58. Maccioni, R. B. y Cambiazo, V. 1995. Role of microtubule-Associated Proteins in the control of Microtubule Assembly. *Physiol Rev* 75, 835-864.
59. Mantych, K. B. y Ferreira, A. 2001. Agrin Differentially Regulates the Rates of Axonal and Dendritic Elongation in Cultured Hippocampal Neurons. *J Neurosci* 21, 6802-6809.
60. Marin-Padilla, M. y Stibitz, G. R. 1968. Distribution of the Apical Dendritic Spines of the Layer V Pyramidal Cells of the Hamster Neocortex. *Brain Res* 11, 580-592.
61. Marty, A. 1989. The physiological role of calcium-dependent channels. *Trends Neurosci* 12, 420-428.
62. Matus, A., Delhay-Bouchaud, N. y Mariani, J. 1990. Microtubule-Associated Protein 2 (MAP2) in Purkinje Cell Dendrites: Evidence That Factors Other Than Binding to Microtubules Are Involved in Determining Its Cytoplasmic Distribution. *J Comp Neur* 297, 435-440.

63. McAllister, K. A., Lo, D. C. y Katz L. C. 1995. Neurotrophins Regulate Dendritic Growth in Developing Visual Cortex. *Neuron* 15, 791-803.
64. McAllister, K. A., Katz, L. C. y Lo, D. C. 1996. Neurotrophin Regulation of Cortical Dendritic Growth Requires Activity. *Neuron* 17, 1057-1064.
65. McAllister, K. A. 2000. Cellular and Molecular Mechanisms of Dendrite Growth. *Cereb. Cortex* 10, 963-973.
66. McKinney, R. A., Capogna, M., Dürr, R., Gähwiler, B. H. y Thompson, S. M. 1999. Miniature synaptic events maintain dendritic spines via AMPA receptor activation. *Nat Neurosci* 2, 44-49.
67. Maletic-Savatic, M., Malinow, R. y Svoboda, K. 1999. Rapid Dendritic Morphogenesis in Ca 1 Hippocampal Dendrites Induced by Synaptic Activity. *Science* 283, 1923-1927.
68. Mertz, K., Koscheck, T. y Schilling, K. 2000. Brain-Derived Neurotrophic Factor Modulates Dendritic Morphology of Cerebellar Basket and Stellate Cells: an *IN VITRO* Study. *Neuroscience* 97, 303-310.
69. Micheva, K. D. y Beaulieu, C. 1996. Quantitative Aspects of Synaptogenesis in the Rat Barrel Field Cortex With Special Reference to GABA Circuitry. *J Comp Neur* 373, 340-354.
70. Mitrovic, N., Dörries, U. y Schachner, M. 1994. Expression of the extracellular matrix glycoprotein tenascin in the somatosensory cortex of the mouse during postnatal development: an immunocytochemical and *in situ* hybridization analysis. *J Neurocytol* 23, 364-378.
71. Moreno-Flores, M. T., Martín-Aparicio, E., Ávila, J., Díaz-Nido, J. y Wandosell, F. 2002. Ephrin-B1 Promotes Dendrite Outgrowth on Cerebellar Granule Neurons. *Molecular and Cellular Neuroscience* 20, 429-446.
72. Nakamura, F., Kalb, R. G., y Strittmatter, S. M. 2000. Molecular Basis of Semaphorin-Mediated Axon Guidance. *J Neurobiol* 44, 219-229.
73. Nedivi, E., Wu, GY. y Cline, H. T. 1998. Promotion of Dendritic Growth by CPG15, an Activity-Induced Signaling Molecule. *Science* 281, 1863-1866.
74. Nelson, P. G., Fields, R. D., Yu, C. y Liu, Y. 1993. Synapse Elimination from the Mouse Neuromuscular Junction *in vitro*: A Non-Hebbian Activity-Dependent Process. *J Neurobiol* 16, 1517-1530.
75. Niblock, M. M., Brunson-Bechtold J. K. y Riddle D. R. 2000. Insulin-Like Growth Factor I Stimulates Dendritic Growth in Primary Somatosensory Cortex. *J. Neurosci* 20, 4165-4176.
76. Parnavelas, J. G. y Uylings, H. B. 1980. The growth of non-pyramidal Neurons in the Visual Cortex of the Rat: A Morphometric study. *Brain Res* 193, 373-382.
77. Paxinos, G. 1995. The Rat Nervous System. 2nd edición. Academic press. USA.
78. Personius, K. E. y Balice-Gordon, R. J. 2001. Loss of Correlates Motor Neuron Activity during Synaptic Competition at Developing Neuromuscular Synapses. *Neuron* 31, 395-408.
79. Petit, T. L., LeBoutillier, J. C., Gregorio, A. y Libstug, H. 1988. The pattern of dendritic development in the cerebral cortex of the rat. *Dev Brain Res* 41, 209-219.
80. Polleux, F., Giger R. J., Ginty, D. G., Kolodkin, A. L., y Ghosh, A. 1998. Patterning of Cortical Efferent Projections by Semaphorin-Neuropilin Interactions. *Science* 282, 1904-1906.
81. Polleux, F., Morrow T., y Ghosh, A. 2000. Semaphorin 3A is a chemoattractant for cortical apical dendrites. *Nature* 404, 567-573.
82. Portera-Cailliau, C. y Yuste, R. 2001. Sobre la función de los filopodios dendríticos. *Rev Neurol* 33, 1158-1166.
83. Purves, D. y Lichtman, J. W. 1985. Geometrical Differences Among Homologous Neurons in Mammals. *Science* 228, 298-302.

84. Purves, D., Snider, W. D., y Voyvodic, J. T. 1988. Trophic regulation of nerve cell morphology and innervation in autonomic nervous system. *Nature* 336, 123-128.
85. Purves, D., Augustine, G. J., Fitzpatrick D., Katz, L. C., LaMantia AS., McNamara J. O., & Williams S. M. 2001. *Neuroscience*. Sinauer. 488-491.
86. Rajan, I. y Cline, H. T. 1998. Glutamate Receptor Activity is Required for Normal Development of Tectal Cell Dendrites *In Vivo*. *J Neurosci* 18, 7836-7846.
87. Rakic, P. 1972. Extrinsic Cytological Determinants of Basket and Stellate Cell Dendritic Pattern in Cerebellar Molecular Layer. *J. Comp. Neur.* 146, 335-354.
88. Ramoa, A. S., Campbell, G. y Shatz, C. J. 1988. Dendritic Growth and Remodeling of Cat Retinal Ganglion Cells During Fetal and Postnatal Development. *J Neurosci* 8, 4239-4261.
89. Redmond, L., Kashani, A. H. y Gosh, A. 2002. Calcium Regulation of Dendritic Growth via CaM Kinase IV and CREB-Mediated Transcription. *Neuron* 34, 999-1010.
90. Rice, F. L. 1985. Gradual Changes in the Structure of the Barrels During Maturation of the Primary Somatosensory Cortex in the Rat. *J Comp Neur* 236, 496-503.
91. Rocha, M. y Sur M. 1995. Rapid acquisition of dendritic spines by visual thalamic neurons after blockade of N-methyl-D-aspartate receptors. *Proc Natl Acad Sci USA* 92, 8026-8030.
92. Ruchhoeft, M. L., Ohnuma, S. McNeill, L. Holt, C. E. y Harris, W. A. 1999. The Neuronal Architecture of *Xenopus* Retinal Ganglion Cells Is Sculpted by Rho-Family GTPases *In Vivo*. *J. Neurosci* 19, 8454-8463.
93. Sakaguchi, D. S., Murphey, R. K., Hunt, R. K. y Tompkins, R. 1984. The Development of Retinal Ganglion Cells in a Tetraploid strain of *Xenopus laevis*: A Morphological study Utilizing Intracellular Dye Injection. *J Comp Neur* 224, 231-251.
94. Sala, C. 2002. Molecular Regulation of Dendritic Spine Shape and Function. *Neurosignals* 11, 213-223.
95. Samsonovich AV y Ascoli GA. 2003. Statistical morphological analysis of hippocampal principal neurons indicates cell-specific repulsion of dendrites from their own cell. *J Neurosci Res* 71, 173-187.
96. Sanchez, C., Díaz-Nido, J. y Avila, J. 2000. Phosphorylation of microtubule-associated protein 2 (MAP2) and its relevance for the regulation of neuronal cytoskeleton function. *Progress in Neurobiology* 61, 133-168.
97. Scott, E. K. y Luo, L. 2001. How do dendrites take their shape?. *Nat. Neurosci* 4, 349-365.
98. Schlaggar, B. L. y O'Leary, D.D.M. 1994. Early Development of the Somatotopic Map and Barrel Patterning in Rat Somatosensory Cortex. *J Comp Neur* 346, 80-96.
99. Shibata, A., Wright, M. V., David, S., McKerracher, L., Braun, P.E. y Kater, S. B. 1998. Unique Responses of Differentiating Neuronal Growth Cones to Inhibitory Cues Presented by Oligodendrocytes. *J. Cell Biol* 142, 191-2002.
100. Simons, D. & Woolsey, T. A. 1984. Morphology of Golgi-Cox-Impregnated Barrel Neurons in Rat SmI Cortex. *J Com Neur* 230, 119-132.
101. Smart, F. M. y Halpain, S. 2000. Regulation of Dendritic Spine Stability. *Hippocampus* 10, 542-554.
102. Song, H., Ming, G., He, Z., Lehmann, M., McKerracher, L., Tessier-Lavigne, M. y Poo, M. 1998. Conversion of Neuronal Growth Cone Responses from Repulsion to attraction by Cyclic Nucleotides. *Science* 281, 1515-1518.
103. Steffen, H. y Van der Loos, H. 1980. Early Lesions of Mouse Vibrissal Follicles: Their Influence on Dendrite Orientation in Cortical Barrelfield. *Exp Brain Res* 40, 419-431.

104. Steindler, D. A., Settles, D., Erickson, H. P., Laywell, E. D., Yoshiki, A., Faissner, A. y Kusakabe, M. 1995. Tenascin Knockout Mice: Barrels, boundary Molecules, and Glial Scars. *J Neurosci* 15, 1971-1983.
105. Tamagnone, L. y Comoglio, P. M. 2000. Signalling by semaphorin receptors: cell guidance and beyond. *Trends in Cell Biology* 10, 377-383.
106. Teng, J., Takei, Y., Harada, A., Nakata, T., Chen, J. y Hirokawa, N. 2001. Synergistic effects of MAP2 and MAP1B knockout in neuronal migration, dendritic outgrowth, and microtubule organization. *J Cell Biol* 155, 65-76.
107. Thompson, S. M. 2003. Ephrins Keep dendritic spines in Shape. *Nat Neurosci* 6, 103-104.
108. Threadgill, R., Bobb, K. y Ghosh, A. 1997. Regulation of Dendritic Growth and Remodeling by Rho, Rac, and Cdc42. *Neuron* 19, 625-634.
109. Vaillant, A. R., Zanassi, P., Walsh, G. S., Aumont, A., Alonso, A. y Miller, F. D. 2002. Signaling Mechanisms Underlying Reversible, Activity-Dependent Dendrite Formation. *Neuron* 34, 985-998.
110. Vaughn, J. E. 1988. Dendritic Development and Preferential Growth Into Synaptogenic Fields: A Quantitative Study of Golgi-Impregnated Spinal Motor Neurons. *Synapses* 2, 69-78.
111. Voyvodic, J. T. 1987. Development and Regulation of Dendrites in Rat Superior Cervical Ganglion. *J Neurosci* 7, 904-912.
112. Vetter, P., Roth, A., y Häusser, M. 2001. Propagation of Action Potentials in Dendrites Depends on Dendritic Morphology. *J Neurophysiol* 85, 926-937.
113. Wang, H. y Macagno, E. R. 1998. A Detached Branch Stops Being Recognized as Self by Other Branches of a Neuron. *J Neurobiol* 35, 53-64.
114. White, E. L., Weinfeld, L. y Lev, D. L. 1997. A survey of morphogenesis during the early postnatal period in PMBSF barrels of mouse SmI cortex with emphasis on barrel D4. *Somatosensory & Motor Research* 14, 34-55.
115. Whitford, K. L., Marillat, V., Stein, E., Goodman, C. S., Tessier-Lavigne, M., Chédotal, y A. Ghosh, A. 2002. Regulation of cortical dendrite development by Slit-Robo interactions. *Neuron* 33, 47-61.
116. Whitford, K. L., Dijkhuizen, P., Polleux, F. y Ghosh, A. 2002. Molecular Control of Cortical Dendrite Development. *Annu rev Neurosci* 25, 127-149.
117. Wingate, R. J. T. y Thompson, I. D. 1994. Targeting and Activity-related Dendritic Modification in Mammalian Retinal Ganglion Cells. *J Neurosci* 14, 6621-6637.
118. Wise, S. P., Fleshman, Jr. y Jones, E. G. 1979. Maturation of Pyramidal Cell form in relation to developing Afferent and Efferent Connections of Rat Somatic Sensory Cortex. *Neuroscience* 4, 1275-1297.
119. Wong, R. O. L. y Ghosh, A. 2002. Activity-Dependent Regulation of Dendritic Growth and Patterning. *Nat Rev Neurosci* 3, 803-812.
120. Wong, W. T. y Wong, R. O. L. 2001. Changing specificity of neurotransmitter regulation of rapid dendritic remodeling during synaptogenesis. *Nature Neurosci* 4, 351-352.
121. Woolsey, T. A. y 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.
122. Woolsey, T. A., Dierker, M. L. y Wann, D. F. 1975. Mouse SmI Cortex: Qualitative and Quantitative Classification of Golgi-Impregnated Barrels Neurons. *Proc Nat Acad Sci USA* 72, 2165-2169.
123. Wu, G.-Y. y Cline, H. T. 1998. Stabilization of Dendritic Arbor Structure in Vivo by CaMKII. *Science* 279, 222-225.
124. Wu, G.-Y., Zoi D. J., Rajan, I. Y Cline, H. T. 1999. Dendritic Dynamics *In Vivo* Change during Neuronal Maturation. *J Neurosci* 19, 4472-4483.

125. Ziv, N. M. y Smith, S. J. 1996. Evidence for a Role of Dendritic Filopodia in Synaptogenesis and Spine Formation. *Neuron* 17, 91-102.

Anexo

Definición de Fractal

La palabra “fractal” fue acuñada por Mandelbrot en 1977, y hace referencia a aquellos objetos que poseen fragmentos infinitos y pueden ser caracterizados por una dimensión fraccionaria o fractal. Esta dimensión usualmente toma valores de números no enteros y que caen dentro de las dimensiones clásicas (euclidianas, ver abajo). Las propiedades de los objetos fractal son 1) Auto-similitud, que significa que las partes de un objeto se semejan al objeto completo, 2) Escala, que significa que la medida de las propiedades dependen de la escala con que se este midiendo, 3) “Dimensión fractal”, la cual provee una medida cuantitativa de la auto-similitud y la escala.

La dimensión fractal

Sabemos que en geometría clásica (euclidiana), un punto en el espacio es adimensional ($D = 0$), una recta que une a dos puntos tiene dimensión uno ($D = 1$), un cuadrado tiene dimensión dos ($D = 2$), y un cubo tiene dimensión tres ($D = 3$, ver Fig. 1). Cuando examinamos un objeto geoméricamente auto-similar con una resolución muy fina, replicas pequeñas del objeto completo emergen, las cuales son imposibles de evaluar bajo las dimensiones euclidianas. Estas estructuras no euclidianas se pueden analizar utilizando la dimensión fraccionaria o fractal. La ecuación 1 refleja lo antes descrito, si cambiamos la escala por un factor F , y encontramos que hay N piezas similares del objeto original, entonces la dimensión fractal D es dada por la siguiente ecuación:

$$N = F^D \quad (1)$$

Despejando D mediante la aplicación de logaritmos se deriva la siguiente ecuación:

$$D = \log(N) / \log(F). \quad (2)$$

Por ejemplo en la ilustración media de la fig B, cuando la escala es reducida por un factor de $F = 3$, entonces el cuadrado tendrá $N = 9$ piezas, cada una de ellas similar a la original. Sustituyendo en la ecuación 1 encontramos que $9 = 3^2$, y así la $D = 2$. Usando estos valores en la ecuación 2 obtenemos que $D = \log 9 / \log 3 = 2$. En otras palabras, el objeto observado es bidimensional.

Para el perímetro de la curva de Koch mostrada en la figura 2, cuando la escala es reducida por un factor $F = 3$, entonces $N = 4$ piezas son encontradas. Así, sustituyendo en la ecuación 2 se obtiene que $D = \log 4 / \log 3 = 1.2619$. De esta forma, el valor de la dimensión fractal de la curva de Koch es un número fraccionario que se encontrará entre 1 y 2. Es decir, se encuentra entre una línea ($D = 1$) y un área ($D = 2$), puesto que hay suficientes

segmentos para ocupar más de una línea unidimensional, pero no los suficientes para ocupar una área en el espacio.

En biología la dimensión fractal puede ser calculada a través de un método rápido y sencillo llamado Conteo por cajas (Fig. 3). Este método consiste en 1) colocar a la estructura fractal dentro de un espacio que ocupe las dimensiones euclidianas, 2) dividirlo en pequeñas cajas, 3) contar el número de cajas ($N(r)$, de tamaño r) que contengan al menos un punto de la estructura en cuestión. Finalmente, el valor de la dimensión fractal será la pendiente de graficar el $\log N(r)$ contra el $\log (1/r)$. Es decir,

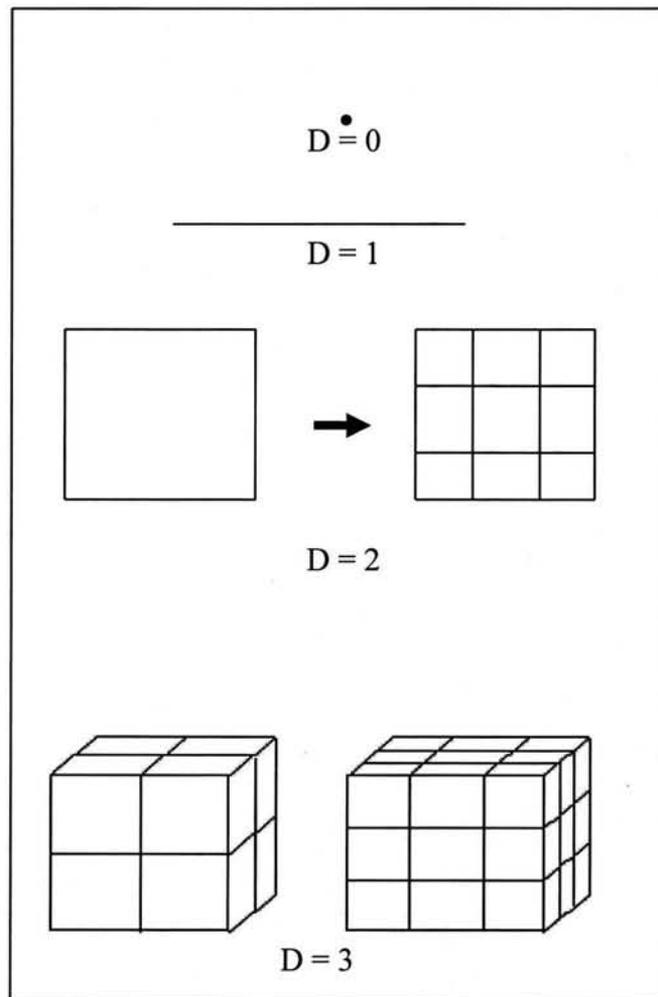


Figura 1. Objetos con dimensiones auto-similares clásicas (euclidianas) de 0, 1, 2 y 3 corresponden a nuestra idea usual de que un punto es adimensional, una línea es unidimensional, un área es bidimensional y un volumen es tridimensional.

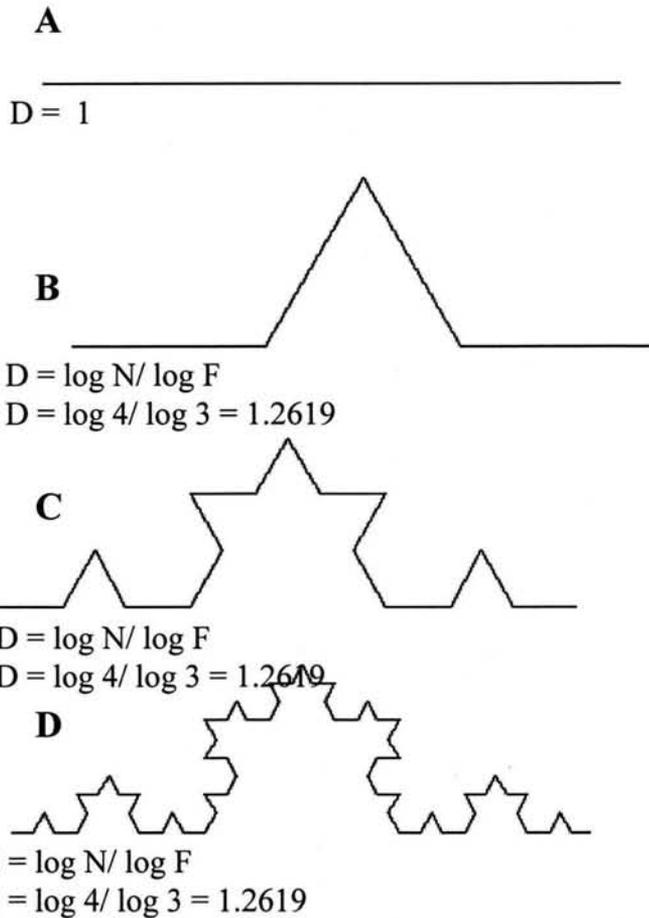


Figura 2. La curva de Koch se elabora removiendo el tercio intermedio de la línea recta principal (A), y colocando dos segmentos de líneas de igual tamaño al desplazado formando un triángulo equilátero (B), este paso o iteración puede ser repetido indefinidamente (C y D, como ejemplos). La dimensión fractal del perímetro de la curva de Koch puede ser determinada por la ecuación 1.

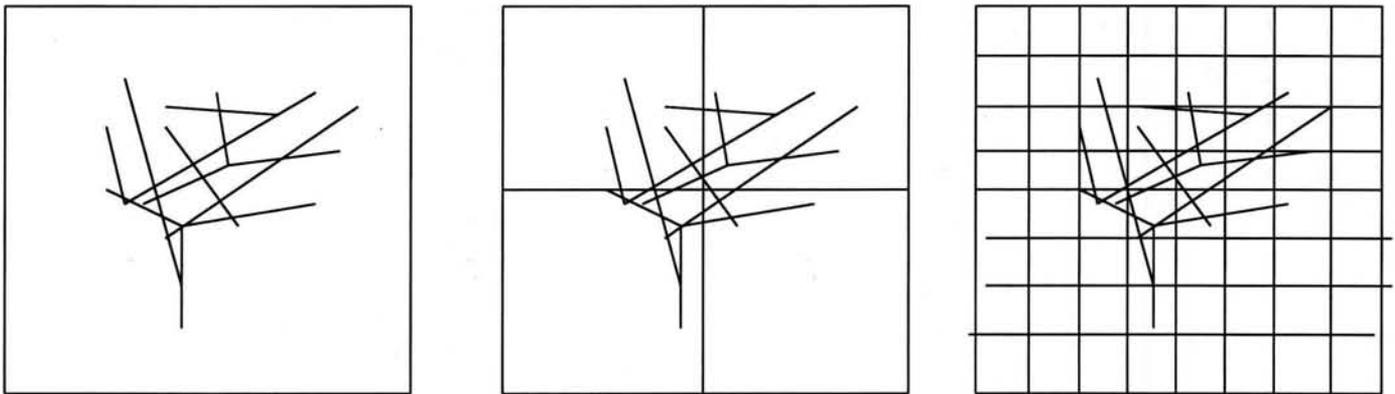


Figura 3. El método de conteo por cajas es ilustrado por una estructura dentro de un espacio bidimensional. El espacio es dividido en cajas, donde posteriormente se hará el conteo del número de cajas $N(r)$ que ocupan al menos un punto de la estructura es determinado por las cajas de menor tamaño r . La dimensión fractal es la pendiente de $\log N(r)$ contra $\log(1/r)$.

Bibliografía

Bassingthwaighe, J. B., Liebovitch, L. S. & West, B. J. 1994. Fractal Physiology. Oxford University Press. pp 20-180.