



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO  
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

---

---



LOS CIRCUITOS DE LA VÍA TÁLAMO-CORTICAL  
SOMATOSENSORIAL DE LA RATA SE FORMAN A TRAVÉS DE LA  
GENERACIÓN Y ELIMINACIÓN CONCURRENTES DE PROCESOS  
NEURONALES E INDEPENDIENTEMENTE DE LA ACTIVIDAD  
NEURONAL ASOCIADA AL USO

Tesis que presenta

M en C Eileen Uribe Querol

Para obtener el grado de Doctor en Ciencias

Tutor  
Dr. Gabriel Gutiérrez Ospina

MÉXICO, D.F.

2006



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**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.

**Para Lidia Querol**

**Para Eduardo**

**A la memoria de mi abuela**

**“...Mas es forzoso convenir en que si muchos sabios descubrieron lo que no buscaban, todos ellos buscaron con admirable tenacidad, y fueron dignos del éxito, porque con rara penetración acertaron a sorprender los grandes progresos latentes en las tímidas y fragmentarias revelaciones del acaso. *En suma: el azar afortunado suele ser casi siempre el premio del esfuerzo perseverante...*”**  
**Santiago Ramón y Cajal. *Los Tónicos de la Voluntad. Capítulo IV***

## **Agradecimientos**

Este doctorado es el esfuerzo de 5 años de trabajo, fracasos y éxitos. De felicidad y de tristeza.

Aprendí mucho de mi amigo y tutor, Gabriel Gutiérrez con quien levantamos el laboratorio de la nada y logramos realizar muchos de nuestros sueños. ¡Gracias Gabo!

A mis amigos y compañeros del laboratorio: Laura, Ivett, Norma, Naima, Jessica, Sofía, Miguel, Pancho, Abril, Paty, Luis, Horacio, Doña Guille y Doña Martha, por el tiempo, aventuras, amarguras, risas y éxitos que hemos compartido. Especialmente quiero agradecer a Eduardo, Julieta y Brenda con quienes compartí mi trabajo, discutí y aprendí de la investigación y de la vida.

A mi comité tutorial: Dr. Horacio Merchant y Dr. Julio Morán por sus críticas y apoyo a lo largo de mí doctorado.

A mis sinodales: Dr. Escobar Izquierdo, Dr. Manuel Salas, Dra. Martha León, Dr. Gabriel Roldán, Dra. Rocio Salceda y Dr. Jorge Larriva por su tiempo y sus valiosos comentarios para mejorar la tesis.

Al Dr. Noriega y a Collette por sus consejos y amistad.

Al personal del bioterio. En especial a Adolfo por tenerme siempre listas las ratas de las diferentes edades, por cuidarlas y alimentarlas bien.

Al personal de la biblioteca: Lic. Romero, Lic. Brito, Martha Cariño, Rebeca Hernández, Lucía Brito, María Muñoz (Mary) y a Alfonso Martínez (Poncho) por su ayuda y su excelente trato.

Al personal del Posgrado en Ciencias Biomédicas en especial al Dr. Espinosa, Dr. Lamoyi, Blanca, Azucena, Verónica, Zenaida y Angélica por ayudarme con los trámites a lo largo de mis estudios de doctorado y sobretodo en la parte final. A Isabel, Lucy y Paco Puente por ser tan amables siempre y ayudarme con las demandas de operación y administrativas.

A mis amigos de toda la vida: Mi Mom, Brisa, Helga, Karina, Sinué, Javier, Enrique, Carmen y Roberto por estar conmigo en las buenas y en las malas. ¡Gracias Brisa por ayudarme a editar todas las figuras de publicaciones, presentaciones y tesis!

A Moisés Santillán por su valiosa amistad y su apoyo con el programa y el tutorial para entender el análisis fractal.

Y a todos los que de una u otra forma contribuyeron a mi formación durante el doctorado. ¡Muchas gracias!

Este proyecto fue apoyado por DGAPA IN210105-3 y CONACYT J28035N y 38615N de quienes fui becaria DGAPA No de expediente 59981006 y CONACyT No. 118230.

# Índice

<b>Resumen</b>	5
<b>Abstract</b>	6
<b>Introducción</b>	10
<b>Antecedentes</b>	17
• Teoría de selección	18
• Teoría de construcción	21
• Inconvenientes de los trabajos realizados para demostrar las teorías de formación de conexiones neuronales	25
<b>Hipótesis</b>	26
<b>Objetivos</b>	26
<b>Material y Métodos</b>	27
• Animales	27
• Obtención y preparación de las muestras para inmunocitoquímica	28
• Inmunohistoquímica	28
• Obtención y preparación de las muestras para transferencias tipo Western	30
• Transferencias tipo Western	31
• Morfología Dendrítica	32
• Morfología Axonal	33
• Análisis fractal	35
• Densidad Sináptica	36

• Citocromo Oxidasa	37
<b>Resultados</b>	<b>38</b>
• Desarrollo del crecimiento de los árboles dendríticos y axónicos en los barriles de S1	38
• Los árboles dendríticos de las neuronas estrelladas espinosas se remodelan con la edad	40
• Los árboles axónicos provenientes de neuronas localizadas en el núcleo posteromedial del tálamo se remodelan con la edad	42
• La cantidad de elementos neuronales inmunopositivos para MAP2a y b en el interior de los barriles incrementa con la edad	44
• El contenido de la proteína MAP2a y b en la corteza somatosensorial se incrementa con la edad.	44
• La cantidad de elementos neuronales inmunopositivos para neurofilamentos en el interior de los barriles se incrementa con la edad	45
• El contenido de los neurofilamentos en la corteza somatosensorial se incrementa con la edad.	46
• La densidad sináptica aumenta en los barriles con la edad	47
• La marca en el neurópilo para las proteínas sinaptofisina y Shank-2 se incrementa en el interior de los barriles durante el primer mes de vida	48
• El contenido de PSD-95 y sinaptofisina en la corteza somatosensorial se incrementa con la edad.	49

• La actividad para la enzima citocromo oxidasa aumenta en los barriles a lo largo del primer mes de vida	50
<b>Discusión</b>	52
<b>Apéndice I: Guía axonal y sinaptogénesis</b>	65
<b>Apéndice II: Corticogénesis</b>	68
• Aferencias corticales	70
• Eferencias corticales	72
<b>Bibliografía</b>	73



## Resumen

Uno de los problemas en la neurobiología es el de entender cómo se establecen las conexiones de los circuitos neuronales. Al respecto, se han propuesto dos teorías. La primera plantea una sobreproducción inicial de conexiones que posteriormente se eliminan y la segunda postula que las conexiones se establecen progresivamente en el sitio blanco. En la vía tálamocortical somatosensorial existe aún controversia al respecto. Por ello, para conocer cómo se ensambla esta vía se analizaron a la vez los axones, las dendritas y las sinapsis en la capa IV de la corteza somatosensorial primaria (S1) de la rata durante el primer mes de vida postnatal. Las proteínas estructurales de dendritas, axones y sinapsis cuantificadas mediante las técnicas de inmunohistoquímica y transferencias tipo Western se incrementaron en el periodo estudiado. El análisis detallado del patrón de crecimiento de los árboles dendríticos corticales (impregnación argéntica) y de los axones talámicos (marcaje con Dil) mostró que los árboles crecen a través de procesos de formación y eliminación concurrentes de sus ramas, seguidos de aumentos en la longitud de las ramas que se estabilizan. A pesar de estos cambios, la densidad sináptica cuantificada por microscopía electrónica se incrementó con la edad. Finalmente, la actividad metabólica en S1 mostró incrementos importantes después de los 15DP que pueden estar relacionados a cambios en los patrones de actividad asociados con la actividad neuronal. En conclusión la formación de la vía tálamocortical somatosensorial integra eventos de selección y de adición de ramas pero de forma concurrente seguidos de un proceso de elongación de ramas.

## **Abstract**

The strategy used by neurons to form circuits in the barrel cortex is yet a matter of controversy. Some investigators think that barrel circuits result from a sequence of overproduction and elimination of supernumerary axonal and dendritic branches and synapses. Others suggest that a precise addition of neuronal processes and synapses underlies the development of barrel circuits. In this study, we evaluated the pattern of dendritic and axonal elaboration and synaptic density in the barrel cortex of developing rats during the first month of life. Morphometric analyses of terminal arbors of Dil-traced thalamocortical afferents and dendritic arbors of Golgi-impregnated spiny stellate neurons show that both types of processes tend to branch extensively during the first 15 days of life. Between this age and postnatal day 25, both axonal and dendritic arbors retract the most distal, highest order branches, while elongate more stable, lower order branches. Regardless of this phase of arbor remodeling, the overall complexity of axons and dendrites increases, as it does synapse density. Immunocytochemical and Western blot studies show an increment in the content of proteins considered dendritic, axonal and synaptic markers during this period. Finally, cytochrome oxidase activity in barrels increased with age. Overall these results support that neural circuits in the barrel cortex are build up through molding arbors by forming and eliminating concurrently dendritic and axonal branches. During this molding process, there is a predominance of additive events that lead to increased complexity and synapse density. The whole process is accompanied by increments in oxidative metabolic demands.

## Introducción

La viabilidad desde los nemátodos hasta los mamíferos emana de la actividad de los circuitos de su sistema nervioso. Es por ello que se piensa que la configuración anatómica y las propiedades fisiológicas de los circuitos neuronales determinan las respuestas conductuales de los organismos (Crick, 1994; Opris and Bruce, 2005). Así, se propone que alteraciones en el número, distribución y fisiología de las sinapsis en estos arreglos a lo largo de la vida de los individuos parecen estar involucrados tanto de la emergencia de la personalidad, del aprendizaje y la memoria, como de alteraciones neurológicas y cambios en los patrones de conducta (Bloom, 1994; Purves et al., 2004). De aquí la importancia de estudiar los mecanismos por medio de los cuales se forman los circuitos neuronales.

Durante el desarrollo del sistema nervioso, las poblaciones neuronales emiten proyecciones hacia sus blancos. Dichas proyecciones generan una configuración básica que puede ser modificada durante la maduración del cerebro, lo que permite la formación de circuitos neuronales maduros (Jacobson, 1993; Nicholls, 2001). Sin embargo, aún se desconocen diversos aspectos sobre las estrategias que utilizan las neuronas en distintas zonas cerebrales para formar circuitos. Debido a que el tipo de estrategia puede influir en la manera en que las neuronas procesan la información, la caracterización de la secuencia de eventos que participan en la maduración de un circuito, abre el camino para entender las reglas que obedece la generación de circuitos específicos relacionados, por ejemplo, con un movimiento o con la evocación de un recuerdo.

Los primeros intentos por relacionar una función cerebral superior con una forma determinada de ensamblaje de las redes neuronales provienen de las teorías cognoscitivas. Desde finales del siglo XIX, en el campo de la psicología, se proponía que procesos como el aprendizaje podían ser producto de la selección de conexiones intrínsecamente predeterminadas o de la adición de conexiones inducida por la interacción del individuo con el ambiente (Quartz and Sejnowski, 1997). Hay que tener en cuenta que durante estos años la teoría de selección de Darwin fue ganando aceptación en varias áreas del conocimiento. Sus postulados, como el que supone que una población de organismos está conformada por aquellos que resultaron ganadores en la lucha por los recursos, se utilizaron no sólo para tratar de entender el proceso evolutivo sino también para explicar eventos del desarrollo de los organismos. Así, Wilhelm Roux en 1881, introdujo los términos de selección y competencia para describir la formación de conexiones neuronales (Jacobson, 1991a).

Durante el transcurso del siglo XX los promotores del seleccionismo neuronal encontraron en ciertos trabajos experimentales el sustento empírico para apoyar su modelo. Este es el caso de los eventos de eliminación similares a la poda de los árboles, que Santiago Ramón y Cajal describió en las dendritas de las motoneuronas de la médula espinal, las neuronas de Purkinje y las células granulares del cerebelo (Jacobson, 1991b). Además, el seleccionismo recibió aún más apoyo de la observación que sugería que proteínas con actividad neurotrófica liberadas en el sitio blanco promueven la competencia entre los axones que pretenden conectarse ahí (Loughlin and Fallon, 1993; Purves et al., 2004). Finalmente, los hallazgos derivados del estudio de la formación de la placa

neuromuscular (Balice-Gordon et al., 1993; Culican et al., 1998; Walsh and Lichtman, 2003) de las columnas de dominancia ocular (Hubel et al., 1976; Ghosh and Shatz, 1992) y de la corteza cerebral de anfibios (Connor et al., 1994) y de mamíferos (Bourgeois et al., 1989; Bourgeois, 1997), respectivamente, consolidaron la posición seleccionista.

Es importante considerar, sin embargo, que buena parte de los experimentos que sustentan la selección de conexiones neuronales presentan limitaciones técnicas que inciden directamente sobre la interpretación de los resultados. Tal es el caso del arribo y arborización de los axones talámicos a la corteza visual. Utilizando técnicas de trazado transináptico mediante la inyección monocular de hidroxiprolina tritiada, Hubel y Wiesel (Hubel et al., 1975; Hubel et al., 1976, 1977) observaron que la distribución de los árboles de los axones talámicos se empalmaba representando una banda continua en la capa IV de la corteza visual de gatos y primates juveniles. Estos resultados sugerían un crecimiento difuso de estos axones. En contraste, en los animales adultos, se observó una marca autoradiográfica en forma de columnas que fue interpretada como la consecuencia de un proceso de retracción axonal en las zonas corticales correspondientes al ojo no marcado. Además, se postuló que la actividad dependiente del uso era la responsable de la segregación de las columnas de dominancia ocular. No obstante estas observaciones clásicas, estudios recientes realizados con trazadores fluorescentes que permiten un análisis de mayor resolución revelaron que los axones talámicos en la vía visual del hurón llegan segregados a la corteza y arborizan preferentemente en sitios específicos sin empalme (Crowley and Katz, 2000, 2002). Este ejemplo refleja claramente una contradicción en los resultados

generados por el empleo de técnicas con distinta resolución y/o sugiere que la estrategia de formación de la vía tálamocortical visual en el gato y el mono es diferente a la del hurón. De ser cierto este último punto se apoyaría el hecho de que no se pueden generalizar los hallazgos entre especies puesto que sus sistemas nerviosos se desarrollan con una temporalidad diferente.

Otro problema frecuentemente observado en los estudios que sustentan el seleccionismo neuronal radica en que la mayor parte de ellos analizan por separado los elementos que conforman un circuito. Muchos de los trabajos sólo cuantifican el número de sinapsis o la cantidad de axones que llegan a un blanco. Contados estudios consideran los arreglos espaciales de las dendritas y de los axones así como la densidad sináptica en su conjunto en la misma vía o en el mismo trabajo (Kasowski et al., 1999; Treloar et al., 1999). Este requerimiento es importante debido a que el desarrollo de los árboles dendríticos y axónicos no necesariamente es sincrónico, por lo que no se puede asumir que los elementos se comportan de la misma manera en una ventana espacio-temporal determinada. Además, se ha propuesto que el número de ramas axónicas tampoco está directamente relacionado con el número de sinapsis (Lichtman, 1977).

Uno de los modelos experimentales más utilizados para estudiar diversos aspectos de la formación de las conexiones neuronales es la corteza de barriles o somatosensorial primaria en los roedores. La capa IV de esta corteza posee una representación de los mecanorreceptores del cuerpo de roedor que se organiza en módulos llamados barriles. Los barriles se forman en los primeros 5 días de vida postnatal (5DP), lo que da la oportunidad de estudiar el proceso de formación de conexiones de manera relativamente sencilla. Fundamentalmente, los barriles

están formados por axones provenientes del tálamo y las dendritas de las neuronas estrelladas espinosas, también denominadas neuronas estelares espinosas. El barril está constituido por células estrelladas tanto lisas como espinosas, cuya densidad es mayor en los bordes del barril. Las dendritas de las neuronas estrelladas espinosas comúnmente se restringen a un barril y se orientan hacia el centro del mismo aunque un porcentaje mínimo proyecta a barriles vecinos (Woolsey et al., 1975). Aproximadamente el 15% de las células que conforman el barril son GABAérgicas y presumiblemente inhibitorias (Chmielowska et al., 1986; White and Keller, 1987). Las aferentes talámicas del núcleo ventroposteromedial terminan en el centro del barril, y hacen contacto tanto con las neuronas estrelladas lisas, con las espinosas y con las dendritas apicales de las neuronas piramidales que pasan a través del barril. Los barriles están separados por septos, sitios por donde pasan las dendritas apicales de las neuronas de la capa V. Además de estos elementos, los barriles están vascularizados y poseen células gliales que delimitan el borde de los barriles (Voutsinos-Porche et al., 2003).

El desarrollo de los barriles depende de factores neurotróficos BDNF, NT-4 (Vitalis et al., 2002; Itami et al., 2003; Lush et al., 2005) y de neurohormonas tales como el factor tipo insulina I (IGF-1), el péptido intestinal vasoactivo, la hormona de crecimiento y las hormonas tiroideas (Zilles et al., 1993; Calikoglu et al., 1996; Gutierrez-Ospina et al., 1996; Hajos et al., 1998; Bayraktar et al., 2000).

En el modelo de la corteza de los barriles, y con relación a la forma en que se desarrollan los axones en la corteza, Szent y Woolsey plantearon que los axones talamocorticales somatosensoriales crecen inicialmente de manera difusa en la

capa IV para ser más tarde refinados mediante un proceso de eliminación de un porcentaje de sus ramas (Senft and Woolsey, 1991). En contraste, Agmon y colaboradores reportaron que el arribo y la elaboración de los árboles axónicos en esta misma vía se restringe a los barriles (Agmon et al., 1993; Agmon et al., 1995). Aunque estas diferencias entre las conclusiones presentadas en los estudios pueden deberse a los problemas técnicos antes mencionados, dejan ver que aún se desconoce si la corteza somatosensorial primaria se ensambla mediante eventos de selección o de construcción.

Por todo lo anterior, el propósito principal de este trabajo fue el de caracterizar la estrategia que sigue la vía tálamocortical somatosensorial para ensamblarse. En este trabajo se estudiaron simultáneamente algunos de los elementos que componen esta conexión neuronal. El periodo de evaluación abarcó desde la llegada de los axones talámicos a la capa IV de la corteza, hasta el inicio de la consolidación sináptica. Esto es, durante el primer mes de vida postnatal.

El desarrollo de la proyección tálamocortical de la vía somatosensorial y el desarrollo de las neuronas estrelladas espinosas en la capa IV se evaluó mediante trazados del colorante Dil e impregnaciones con la técnica de Golgi, respectivamente. Se realizó un análisis morfométrico del desarrollo de los axones talámicos y de las dendritas de las neuronas estrelladas espinosas. Además, se obtuvo la densidad sináptica mediante cuantificaciones de sinapsis en microfotografías de barriles a diferentes edades.

Para complementar las observaciones morfológicas se midió la dimensión fractal que es un índice utilizado para medir complejidad de una estructura y se semicuantificaron diversas proteínas estructurales de dendritas, axones y sinapsis.



Para dendritas se escogió la proteína asociada a microtúbulos (MAP2a y b) porque mantiene la estabilidad de los microtúbulos y se localiza preferentemente en las dendritas (Dehmelt and Halpain, 2005). Los neurofilamentos se escogieron para los axones pues es una de las proteínas enriquecidas en los mismos. (Petzold, 2005), Además, ambas proteínas se han utilizado ampliamente con este fin y se sugiere que los incrementos en el contenido de la MAP2a y b y de los neurofilamentos indican aumento en el número y complejidad de dendritas y axones (Diez-Guerra and Avila, 1993; Petzold, 2005). En el caso de las sinapsis se escogió la sinaptofisina que es una proteína asociada a la membrana de las vesículas sinápticas que participan en el proceso de liberación del neurotransmisor (Thiel, 1993). En la densidad postsináptica de las espinas dendríticas se encuentran las proteínas PSD-95 y Shank (Nieto-Sampedro et al., 1982; Naisbitt et al., 1999; Romorini et al., 2004). Estas proteínas, actúan en conjunto con otras, reclutado a los canales de potasio y a los receptores que unen glutamato denominados de N-metil-D-Aspartato (NMDA) y ácido propiónico alfa amino-3-hidroxi-5-isosazoleico (AMPA) entre otras proteínas.

De manera general se observó que aunque algunas ramas distales de los árboles axónicos y dendríticos se eliminan, lo que predomina es un aumento en la complejidad de los axones y dendritas conforme la edad avanza. Además, la densidad sináptica aumentó de los 5DP a los 30DP así como las proteínas de dendritas, axones y sinapsis. Con base en estos resultados se propone que la vía tálamocortical somatosensorial combina predominantemente la formación, elongación y estabilización de ramas proximales e intermedias con la eliminación selectiva de las ramas más distales de sus árboles dendríticos y axónicos. Este

proceso de remodelación se acompaña de un incremento en el número de sinapsis. En conjunto este trabajo muestra por primera vez evidencia anatómica sobre la dinámica de formación considerando algunos de los elementos de la conexión tálamocortical de la rata.

## **Antecedentes**

La aceptación de la teoría neuronal en donde se reconoce a las neuronas como unidades independientes que se conectaban entre sí a través de sitios específicos (o sinapsis) fue el primer paso para iniciar el estudio de la formación de circuitos neuronales (Shepherd, 2004). Como se mencionó en la introducción, la vasta cantidad de conexiones y de circuitos específicos en el cerebro son producto de un proceso de desarrollo. Este proceso comienza con la proliferación y especificación de los precursores neuronales y gliales, seguido de la generación, migración y establecimiento de los distintos linajes neuronales y gliales. Posteriormente, las neuronas extienden sus axones y dendritas hacia sus sitios blanco a través de los procesos denominados de navegación y guía axonal (Cowan et al., 1997). Una vez posicionados, axones y dendritas establecen contactos con sus blancos y aferentes, respectivamente; para después consolidarlos con base en los patrones de actividad y el reforzamiento trófico (ver apéndice I). En los mamíferos, el proceso de formación de conexiones tiene lugar, durante un periodo crítico del desarrollo el cual es específico de la especie. Éste usualmente tiene lugar durante el desarrollo prenatal y las primeras semanas o años de la vida postnatal (Un ejemplo es la corticogénesis; apéndice II).

## **Teoría de selección**

En la actualidad, la concepción dominante sobre la formación de circuitos es la selección. Ésta sugiere que en las etapas tempranas del desarrollo se genera un número excesivo de ramas dendríticas y axónicas, así como de sinapsis. Este número excesivo de ramificaciones neuronales y contactos disminuye a través de

un mecanismo de eliminación inducido por interacciones competitivas entre los axones o las dendritas con relación a sus blancos (Changeux and Danchin, 1976; Purves and Lichtman, 1980; Bourgeois et al., 1989; Katz and Shatz, 1996). La teoría seleccionista supone que las células blanco expresan de manera limitada moléculas necesarias para el mantenimiento de la homeostasis de los procesos neuronales (i.e. factores de crecimiento). Esta limitación promueve la competencia y la eliminación de los procesos neuronales y de los contactos que no obtengan acceso adecuado a dichas moléculas (Changeux and Danchin, 1976; Bennett, 1983). También se ha propuesto que la eliminación puede ser resultado de la secreción de factores inhibitorios o tóxicos hacia los procesos neuronales (Aguilar et al., 1973; Connold et al., 1986). Además de los factores de crecimiento, la actividad neuronal ha sido considerada el instructor de la formación de conexiones. Se ha propuesto que una vez formados los contactos, los patrones de señales eléctricas entre los axones y las dendritas deben coincidir espaciotemporalmente, condición que potencia la liberación y disponibilidad local de factores de crecimiento, y como consecuencia la consolidación sináptica. La discordancia entre los patrones de actividad de los axones y las dendritas conlleva a la disminución en la disponibilidad local de factores de crecimiento, situación que desencadena el mecanismo de eliminación sináptica (Haydon and Zoran, 1994; Bonhoeffer, 1996).

La mayor parte de lo que se conoce con respecto a la formación y estabilización sináptica en un contexto de selección deriva del trabajo realizado en la placa neuromuscular. Diversos grupos de investigación han estudiado con detalle la formación de la placa neuromuscular utilizando diferentes técnicas *in vitro*, *in vivo*

y en tejido fijado. El consenso sugiere que inicialmente las fibras musculares son inervadas por varios axones. Al cabo de un tiempo, sólo uno de ellos persiste en la placa neuromuscular (Balice-Gordon et al., 1993; Lichtman and Colman, 2000; Keller-Peck et al., 2001). Esto mismo se ha observado durante la reinervación del músculo (Rich and Lichtman, 1989). Los eventos de eliminación de los axones redundantes han sido descritos en el ganglio submandibular (Lichtman, 1977), el núcleo geniculado lateral (Rakic and Riley, 1983; Shatz, 1983; Katz and Shatz, 1996; Meissirel et al., 1997) y la corteza visual primaria (Wiesel and Hubel, 1963) entre otros. Algunos ejemplos de vías nerviosas que parecen utilizar la estrategia seleccionista para generar conexiones se detallan en la tabla 1. El modelo se muestra en la figura 9A.

Con respecto a la elaboración del árbol dendrítico, también se ha propuesto que su desarrollo sigue un mecanismo de selección promovido por competencia semejante a la descrita por los axones. Las dendritas compiten por los axones y otras dendritas disponibles. Ahora se conoce que en algunas conexiones la retracción de los axones, los filopodios y las espinas, así como el rebrote de los mismos no están directamente relacionados con las sinapsis estables (Culican et al., 1998; Lee et al., 2006). Este mecanismo también se ha observado durante el

**Tabla 1 Ejemplos de elaboración de árboles axónicos con base en una estrategia seleccionista**

<i>Estructura</i>	<i>Especie</i>	<i>Edad</i>	<i>Método</i>	<i>Observaciones</i>	<i>Referencia</i>
Placa neuromuscular	Ratón	P0-P21	Marcaje con DiA y Dil	Un par de axones inervan el mismo músculo, posteriormente sólo uno de ellos permanece	(Balice-Gordon et al., 1993)

Bulbo Olfatorio	Ratón Rata	P1.5-P14.5 P1.5-P5.5	Histoquímica contra lectina Trazado de axones individuales con Dil o HRP	Algunos axones sensoriales que forman el glomérulo, invanan de manera exuberante diferentes capas y más de un glomérulo	(Tenne- Brown and Key, 1999)
Ganglio Submandibular	Rata	PD1- PD35	Registro intracelular y microscopia electrónica	El número de axones preganglionares individuales que inervaban a las células ganglionares son eliminados de manera gradual a lo largo de 5 semanas En cambio, el número de sinapsis por célula ganglionar se incrementan con la edad	(Lichtman, 1977)
Corteza visual	Mono	7 semanas – 18 meses	Registro e inyecciones monoculares con trazadores transinápticos (hidroxipiolina)	Empalme de los axones en la corteza a los 8 días. Para los 30 días los axones se segregan en columnas. El periodo de segregación dura aproximadamente seis semanas.	(Hubel et al., 1977)
	Hurón	P28 – P81	Marcaje con trazadores transinápticos (hidroxipiolina) o HRP	Desde la edad de P28 hasta P50 se observa una banda en la corteza visual, para 63 se puede observar un patrón segregado como en el adulto	(Ruthazer et al., 1999)
	Hurón	P19- P110	Registros	Establecimiento de periodos críticos de formación de columnas de dominancia ocular	(Issa et al., 1999)
Núcleo geniculado	Ratón	P10-P31	Marcaje con Dil en rebanadas Registros de fibras únicas Probabilidad de liberación	Comparaciones entre las corrientes de AMPA y NMDA. Se muestra como hay un número menor de axones conforme la edad avanza	(Chen and Regehr, 2000)
Tallo cerebral somatosensorial	Rata	E17	Marcaje con HRP de axones individuales Registros axonales	Competencia entre los axones, selección y arborización de los que permanecen	(Chiaia et al., 1994)
	Rata	E15- P7	Marcaje con HRP e histoquímicas para citocromo oxidasa	Competencia entre aferentes, y selección de las mismas	(Chiaia et al., 1992)
Corteza somatosensorial	Ratón	P1 – P7	Trazado con Dil y HRP en rebanadas	Existe empalme en la llegada de las aferentes talámicas y una segregación posterior	(Senft and Woolsey, 1991)

desarrollo de los árboles dendríticos de motoneuronas de la rata (Vaughn et al., 1988; Kalb, 1994), neuronas corticales, talámicas, de la retina del mono (Lund et al., 1977; Garey and Saini, 1981), del gato (Ramoia et al., 1988) y del criceto (Wingate and Thompson, 1994).

Finalmente, y en concordancia con lo que parece ocurrir con los axones y las dendritas, trabajos previos realizados en monos y otras especies de mamíferos aparentemente muestran disminuciones en el número de contactos sinápticos en diversas áreas del cerebro (Zecevic et al., 1989; Bourgeois, 1997).

### **Teoría de construcción**

No obstante la aceptación de la teoría de selección como la mejor explicación para entender la manera en que los circuitos neuronales se ensamblan durante el desarrollo, se ha mostrado que los axones de diversas vías sensoriales crecen con precisión desde su origen, invaden de manera segregada los territorios blanco y definen de manera puntual con poco empalme y pocos eventos de regresión sus blancos definitivos. La tabla 2 refiere con más detalle trabajos que apoyan este modo de elaboración de los axones en diversas vías del cerebro en desarrollo. El modelo se muestra en la figura 9B. Ejemplos de construcción se han reportado en la médula espinal (Silos-Santiago et al., 1995), en los axones sensoriales que proyectan hacia los glomérulos del bulbo olfatorio (Vassar et al., 1994; Mombaerts et al., 1996; Klenoff and Greer, 1998; Tenne-Brown and Key, 1999), los axones aferentes de la corteza entorrinal hacia el hipocampo (Frotscher and Heimrich, 1993), los axones eferentes de la retina que inervan el núcleo geniculado lateral (Meissirel et al., 1997), los axones visuales tálamocorticales (Crowley and Katz, 2000, 2002) y, los axones tálamocorticales somatosensoriales (Killackey and Belford, 1979; Catalano et al., 1991; Agmon et al., 1993; Schlaggar and O'Leary, 1994; Agmon et al., 1995).

Las dendritas de neuronas localizadas en algunas áreas del cerebro también incrementan en complejidad conforme el desarrollo avanza (Purves and LaMantia, 1990; Purves and LaMantia, 1993; Quartz and Sejnowski, 1997). Este patrón de desarrollo dendrítico se ha descrito en neuronas de la corteza somatosensorial, del hipocampo y de la corteza cerebelosa de la rata (Berry and Bradley, 1976; Belford and Killackey, 1979; Killackey and Belford, 1979; Wise et al., 1979; Parnavelas and Uylings, 1980; Petit et al., 1988; Catalano et al., 1996; Dailey and Smith, 1996). También las neuronas del cerebelo y la corteza visual del mono desarrollan sus árboles dendríticos utilizando un estrategia constructivista (Rakic, 1972).

Nuevamente, como es el caso para la teoría de selección, también existen datos a nivel sináptico que apoyan una concepción constructivista del desarrollo cerebral. Por ejemplo, en los barriles de la corteza somatosensorial primaria de roedores, el número de sinapsis glutamatérgicas y GABAérgicas aumentan durante el primer mes de vida postnatal y posteriormente se estabilizan manteniéndose alrededor del mismo número hasta la edad adulta (Micheva and Beaulieu, 1996, 1997; White et al., 1997). De manera interesante, estos datos coinciden con otros que apoyan una relativa estabilidad dendrítica en las neuronas estrelladas espinosas de los barriles en roedores a lo largo de la vida adulta (Curcio and Hinds, 1983).

**Tabla 2 Ejemplos de elaboración de árboles axónicos con base en una estrategia constructivista**



<b>Estructura</b>	<b>Especie</b>	<b>Edad</b>	<b>Método</b>	<b>Observaciones</b>	<b>Referencia</b>
Médula espinal	Rata	E15-E19	Trazado con Dil para la piel ventral y DiA para la piel dorsal del cuello	Existe poco o nada de empalme entre los axones provenientes de la parte dorsal o ventral de la piel en el asta dorsal de la médula.	(Silos-Santiago et al., 1995).
	Pollo	Estadios 28-30 E5.5-6.5	Cultivos de médulas espinales unidas a ganglios de la raíz dorsal Trazados con Dil	Desarrollo de proyecciones específicas sensoriales musculares y cutáneas Importancia del periodo de espera antes de entrar al sitio que se va a inervar, para tener los marcadores que guían de manera específica su crecimiento	(Sharma et al., 1994)
Glomérulos	Ratón	P0-P15	Estudio <i>in vivo</i> Marcaje con RH414 Tinción con sudan negro	Aumento en el tamaño y en el número de glomérulos con la edad	(LaMantia and Purves, 1989)
	Rata	E17-P0	Inmunoquímica contra GAP-43 y neurofilamentos	Aumento en la cantidad de axones con la edad	(Treloar et al., 1999)
Proyecciones paleocorticales a través de la comisura anterior	Hamster	E13-P1	Marcaje con Dil	No se observan crecimiento exuberantes, hay un crecimiento progresivo de los axones	(Lent and Guimaraes, 1991)
Conexiones interhemisféricas a través de la comisura anterior	Hamster	E14-P10	Marcaje con Dil	Aumento en la cantidad de axones con la edad. Llegada específica	(Lent and Guimaraes, 1990)
Proyecciones conticopontinas	Ratas	P0-P1	Co-cultivos Marcaje con Dil	Arribo y crecimiento específico de los axones de la capa V de la corteza al puente	(O'Leary et al., 1991)
Corteza visual primaria	Hurón	P9 a P22	Trazado <i>in vivo</i> Dextrán amino biotinilado Dextran de tetrametil rodamina	Desarrollo de conexiones específicas. Axones del núcleo geniculado lateral llegan segregados y de manera precisa a la capa IV de la corteza visual	(Crowley and Katz, 2000, 2002)
Tallo cerebral somatosensorial	Rata	P0-	SDH Cortes tangenciales	Los axones llegan segregados al núcleo ventrobasal del tallo	(Belford and Killackey, 1979)
Corteza Somatosensorial Primaria	Rata	P0 a P6	SDH Cortes transversales de corteza	Antes de los 5 días hay una marca difusa debido a que no se han segregado los barriles después de PD5 hay progresión	(Killackey and Belford, 1979)
	Ratón	P0 a P12	Rebanadas fijadas Trazado Dil	Desarrollo de conexiones específicas. Axones del núcleo ventroposteromedial del tálamo llegan segregados y de manera precisa a la capa IV de la corteza somatosensorial	(Agmon et al., 1993; Agmon et al., 1995)

Para terminar, se debe mencionar que los neurobiólogos constructivistas también han explorado la participación de los factores de crecimiento y de la actividad neuronal durante la elaboración de los circuitos neuronales. Al respecto, se sabe

que la adición de procesos dendríticos y axónicos (neurópilo) en los barriles depende de un aumento en la disponibilidad de factores de crecimiento, por lo que se hace innecesaria la competencia entre los procesos neuronales para alcanzar la madurez de los circuitos que constituyen (Gutierrez-Ospina et al., 1996). Con relación a la participación de la actividad neuronal se ha propuesto que el incremento en los niveles de actividad asociada al uso promueve la adición de neurópilo en los barriles (Riddle et al., 1993; Zheng and Purves, 1995). Sin embargo, esta última aseveración pudiera no ser tan cierta puesto que la actividad neuronal provocada en la corteza somatosensorial en respuesta a la estimulación asociada al uso es escasa durante la primera semana de vida (Landers and Sullivan, 1999). Además, el movimiento voluntario de las vibrisas en las ratas ocurre alrededor del día 12 postnatal, por lo que una parte importante del desarrollo tiene lugar en ausencia de altos niveles de actividad neuronal asociados con el uso.

Con base en esta evidencia, queda claro que las reglas que gobiernan la formación de circuitos son diferentes dependiendo del área del cerebro en desarrollo y de la especie que se evalúe. Mientras que las conexiones redundantes son eliminadas en algunas áreas, en otras áreas parecen generarse de manera puntual y aditiva (Gutierrez-Ospina et al., 1996; Quartz and Sejnowski, 1997).

### **Inconvenientes de los trabajos realizados para demostrar las teorías de formación de conexiones neuronales**

Como comenté en la introducción, los trabajos en los cuales una u otra de las estrategias en torno al cómo se desarrollan los circuitos neuronales están sujetos a limitaciones técnicas importantes. Algunas de ellas son el uso de diversos métodos de trazado y tinción celular, diferencias en las especies de animales en los que se realizaron los estudios y la evaluación de sólo uno de los elementos neuronales que forman los circuitos. Debido a estas limitaciones, pensamos que se debe reevaluar la estrategia de formación de conexiones neuronales en las diversas vías antes estudiadas. Además, es importante mencionar que la interpretación de los resultados muchas veces es sesgada hacia alguna de las teorías. Creemos que esto ayudará a resolver en parte el conflicto seleccionista-constructivista que hasta el momento permanece en la literatura neurobiológica.

De esta forma, el presente trabajo pretende iniciar este esfuerzo estudiando el desarrollo postnatal de la vía tálamocortical somatosensorial en la rata. Este no es sólo un buen modelo experimental por el fácil acceso a los elementos que los constituyen sino porque existe aún una controversia seleccionista-constructivista no resuelta sobre la estrategia que sigue este circuito para ensamblarse. Adicionalmente se hace una propuesta en torno a la participación de la actividad neuronal en este mecanismo.

## **Hipótesis**

1. La vía tálamocortical somatosensorial en la rata se establece utilizando una estrategia constructivista.

## **Objetivo General**

Describir el patrón anatómico de algunos elementos que forman la vía tálamocortical somatosensorial.

## **Objetivos Particulares**

- Describir el patrón espacio-temporal de expresión de las proteínas MAP2a y b y neurofilamentos 150 kDa en los barriles de la capa IV de la corteza somatosensorial primaria a lo largo del primer mes de vida postnatal, mediante técnicas de inmunohistoquímica y microscopia de luz.
- Determinar el contenido de MAP2a y b y neurofilamentos 150 kDa en la corteza somatosensorial primaria a lo largo del primer mes de vida postnatal, mediante técnicas de transferencia tipo Western y densitometría.
- Evaluar el patrón de crecimiento de los árboles dendríticos de las neuronas estrelladas espinosas en la capa IV de la corteza somatosensorial a lo largo del primer mes de vida postnatal, mediante impregnaciones argénticas, microscopia de luz y análisis morfométrico digital.
- Evaluar el patrón de crecimiento de las aferentes talámicas en la capa IV de S1 a lo largo del primer mes de vida postnatal, utilizando técnicas de trazado con Dil, microscopia de fluorescencia y análisis morfométrico digital.

- Describir el patrón espacio-temporal de expresión de la sinaptofisina y Shank-2 en los barriles en la capa IV de la corteza somatosensorial primaria a lo largo del primer mes de vida postnatal, mediante técnicas de inmunocitoquímica y microscopia de luz.
- Determinar el contenido de sinaptofisina y PSD-95 en la corteza somatosensorial primaria a lo largo del primer mes de vida postnatal, mediante técnicas de transferencia tipo Western y densitometría.
- Estimar la densidad sináptica en los barriles en la capa IV de la corteza somatosensorial a lo largo del primer mes de vida postnatal, mediante técnicas de microscopia electrónica y análisis morfométrico digital.
- Estimar el nivel de actividad de la enzima oxidativa citocromo oxidasa en los barriles en la capa IV de la corteza somatosensorial primaria a lo largo del primer mes de vida, mediante el uso de técnicas de histoquímica, microscopia de luz y densitometría.

## **Materiales y Métodos**

### **Animales**

Ratas Wistar de 5, 10, 15, 20, 25 y 30 días de vida postnatal (DP) de ambos sexos se sacrificaron con pentobarbital sódico de uso veterinario (i.p. 45mg/Kg de p.c.; Pet's Pharma, Nezahuacoyotl, Estado de México, México) para realizar los diferentes experimentos del trabajo. Las camadas se ajustaron a ocho crías y permanecieron con sus madres hasta el día del destete (21DP). Las ratas se mantuvieron en el bioterio del Instituto de Investigaciones Biomédicas con libre acceso al agua y comida (Harlan Teklad, Sani-Chips; Harlan Indiana, USA) y con ciclos de luz-oscuridad 12/12 de 6 de la mañana a 6 de la tarde con luz. Los animales y todos los procedimientos se realizaron de acuerdo con las normas establecidas en la guía para el cuidado y uso de animales de la National Academy of Sciences 2003. Los procedimientos experimentales se aprobaron en el comité local de derechos de los animales del Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM.

### **Obtención y preparación de las muestras para inmunohistoquímica**

Las ratas se sacrificaron y perfundieron con solución salina (0.9%) seguida de una solución fijadora (4% de paraformaldehído en amortiguador de fosfatos 0.1M, pH 7.4; PB). Terminada la perfusión, los cerebros se extrajeron y se postfijaron por dos horas a temperatura ambiente en el mismo fijador. Posteriormente, se transfirieron a una solución de sacarosa al 30% y se guardaron a 4°C por 5 días. Pasado este tiempo, se congelaron rápidamente en 2-metilbutano enfriado con hielo seco y se guardaron a -70°C hasta su uso. Antes de la inmunohistoquímica,

los cerebros se incluyeron en Tissue-tek. Se obtuvieron cortes coronales de 30 micrómetros en un criostato y se recolectaron en cajas de 24 pozos que contenían PB.

### **Inmunohistoquímica**

Los cortes coronales se incubaron toda la noche a 4°C en solución de bloqueo (3% de albúmina, 0.1% de tritón y 0.025% de azida de sodio en PB). Después de un lavado con solución de bloqueo por 15 minutos a temperatura ambiente, los cortes se incubaron con los anticuerpos primarios: anticuerpo monoclonal de ratón contra MAP2a y b (1:1,000; Chemicon International Inc, Temecula CA), anticuerpo policlonal de conejo contra neurofilamentos 150kD (1:1,000; Chemicon International Inc, Temecula CA), policlonal de conejo contra sinaptofisina humana (1:5,000; DAKO A/S, Glostrup, Denmark), y anticuerpo policlonal de conejo contra Shank-2, (1:200; Zymed Laboratories Inc, San Francisco, CA). Los anticuerpos se diluyeron en suero de bloqueo e incubaron a 4°C toda la noche. Pasado este tiempo, se lavaron en 3 ocasiones, cada una de 15 minutos, con solución de bloqueo y se incubaron 1.5 horas a temperatura ambiente con los anticuerpos secundarios correspondientes acoplados a biotina, diluidos en suero de bloqueo: anticuerpo secundario de ratón conjugado a biotina (1:500; Chemicon International Inc, Temecula CA) anticuerpo secundario IgG (H+L) de conejo conjugado a biotina (1:500; Vector laboratories, Burlingame, CA). Después se lavaron tres veces por 15 minutos con PB adicionado con 0.1% de tritón X-100 (PBT) y se incubaron una hora a temperatura ambiente con el complejo avidina-peroxidasa de acuerdo a las instrucciones del proveedor (ABC Kit, Vector Laboratories). Los cortes se lavaron

en 3 ocasiones con PB y la actividad de la enzima peroxidasa se reveló utilizando 3,3-diaminobencidina como cromógeno y cloruro de níquel y cobalto como intensificadores de la reacción, de acuerdo a las instrucciones del proveedor (Peroxidase staining kit; Vector Laboratories). La reacción de peroxidasa se detuvo lavando con PB. Finalmente, los cortes se colocaron sobre portaobjetos cubiertos con gelatina y se montaron con Cytoseal 60 (Richard-Allan Scientific). Todas las incubaciones y lavados se realizaron en agitación constante. Todos los experimentos realizados para cada edad, se repitieron en 5 ocasiones con muestras diferentes. Las preparaciones se observaron al microscopio y se tomaron microfotografías a 40X (MAP2a y b y neurofilamentos) y 100X (sinaptofisina y Shank-2) correspondientes a los barriles utilizando el programa AxioVision (Zeiss, Thornwood, NY). Dichas imágenes se utilizaron para describir el patrón de distribución y cambios en la inmunotinción de células y procesos dendríticos y axónicos, así como los cambios en la cantidad y la distribución de sitios pre y postsinápticos en la capa IV de S1 durante el primer mes de vida postnatal.

### **Obtención y preparación de las muestras para transferencias tipo Western**

Las ratas se sacrificaron y decapitaron. Se obtuvieron rápidamente sus cerebros y las cortezas se disecaron y aplanaron de acuerdo al protocolo descrito por Strominger y Woolsey (Strominger and Woolsey, 1987). Con la ayuda de un sacabocados se obtuvieron las muestras de S1, se congelaron en 2-metilbutano y guardaron a -70°C hasta su uso. Las muestras se sonicaron (tres pulsos de 40 W de 15 segundos cada uno) en amortiguador de lisis (NaCl 100mM, Tris-HCl 10mM,



PMSF 1mM; Tritón 1% y 1 tableta de inhibidores de proteasas -Complete Mini EDTA-Free; Roche-) a 4°C. Posteriormente, se centrifugaron a 14,000 rpm durante 15 minutos a 4°C y se recuperaron los sobrenadantes. Estos se utilizaron para determinar la concentración de proteínas por el método de Bradford. Finalmente, se hicieron alícuotas de 20µg de proteína que se almacenaron a -70°C, hasta su uso.

### **Transferencias tipo Western**

Las muestras de proteína (20µg/carril) se separaron por electroforesis en geles de poliacrilamida SDS-PAGE como Lameli para MAP2a y b, neurofilamentos y PSD-95. Geles de Tris-Tricina se utilizaron para sinaptofisina (Schagger and von Jagow, 1987). Los geles se transfirieron a membranas de nitrocelulosa. Posteriormente, las membranas se bloquearon con leche sin calcio al 5% en amortiguador de Tris-salina (TBS) por 12 horas a temperatura ambiente. Después se incubaron con el anticuerpo primario diluido en TBS con 0.3% de albúmina a 4°C toda la noche: 1:200 para PSD-95 (Chemicon International, Inc. Temecula CA); 1:1,000 para MAP2a y b; 1:10,000 para neurofilamentos y 1:5,000 para sinaptofisina. Pasado este tiempo, las membranas se lavaron en 3 ocasiones durante 15 minutos cada una con TBS adicionado con 0.05% de Tween (TTBS) y se incubaron con el anticuerpo secundario biotinilado correspondiente diluido en TBS con 0.3% de albúmina por dos horas a temperatura ambiente. Finalizada esta fase, las membranas se lavaron tres veces por 15 minutos con TTBS y se incubaron con el complejo avidina-peroxidasa de acuerdo a las instrucciones del

proveedor (ABC kit, Vector Laboratories). Las membranas se lavaron en tres ocasiones con TBS y la actividad de la enzima fue detectada por quimioluminiscencia según las instrucciones del proveedor (ECL kit; Amersham Pharmacia Biotech, UK límites Buckinghamshire, England). Todas las incubaciones y lavados se realizaron en agitación constante. Las membranas se expusieron a placas fotográficas (Biomax flim; Eastman Kodak Co., Rochester, NY), se revelaron y se fijaron (Fijador rápido, Kodak). Las placas se digitalizaron (Fluor-S Bio-Rad, Hercules, CA) y se analizaron los cambios mediante densitometría usando el programa Quantity One (Bio-Rad). Brevemente, en la imagen digitalizada se pueden marcar con una herramienta los recuadros correspondientes a las bandas de interés y en otro recuadro el fondo de la placa. Mediante un algoritmo el programa obtiene el valor de la densidad óptica ajustado, al que se le restó el fondo de la placa. Los valores obtenidos se compararon con un análisis de varianza ( $p < 0.05$ ) y una prueba de Tukey.

### **Morfología Dendrítica**

Las ratas se sacrificaron, perfundieron con solución salina (0.15M), decapitaron y sus cerebros se removieron rápidamente y se colocaron en una solución de Golgi-Cox durante tres meses a temperatura ambiente (Ramón y Cajal and Castro y Pascual, 1933). Después de este periodo se obtuvieron cortes coronales de 120 $\mu$ m en un vibratomo que fueron deshidratados, aclarados, colocados en portaobjetos cubiertos con gelatina y cubiertos con Cytoseal 60. Se realizaron dibujos en cámara lúcida de las neuronas estrelladas espinosas impregnadas, pertenecientes a la capa IV de la corteza somatosensorial (n=50 por edad). Los

dibujos se digitalizaron y las imágenes se utilizaron para cuantificar el número total de ramas, el número total de ramas por orden, la longitud total y la longitud total por orden con el programa Scion Image (ScionCrop, Beta 4.0.2). Brevemente, se digitalizaron las imágenes y su escala correspondiente. Posteriormente se captura el valor de la escala y se mide la longitud. Se consideraron ramas dendríticas de primer orden aquellas que emergen del soma de la neurona, las de segundo orden corresponden a las que se ramifican a partir de las de primer orden y así sucesivamente. Para evaluar con más detalle la complejidad de los árboles dendríticos también se realizó un análisis fractal utilizando el método de conteo por caja con el programa “anализador de armónicos e imágenes fractales” (Harfa; versión 5.0). Los valores obtenidos en cada uno de los parámetros evaluados se compararon estadísticamente entre edades mediante un análisis de varianza y una prueba de Tukey ( $p < 0.05$ ). Ver figura 1.

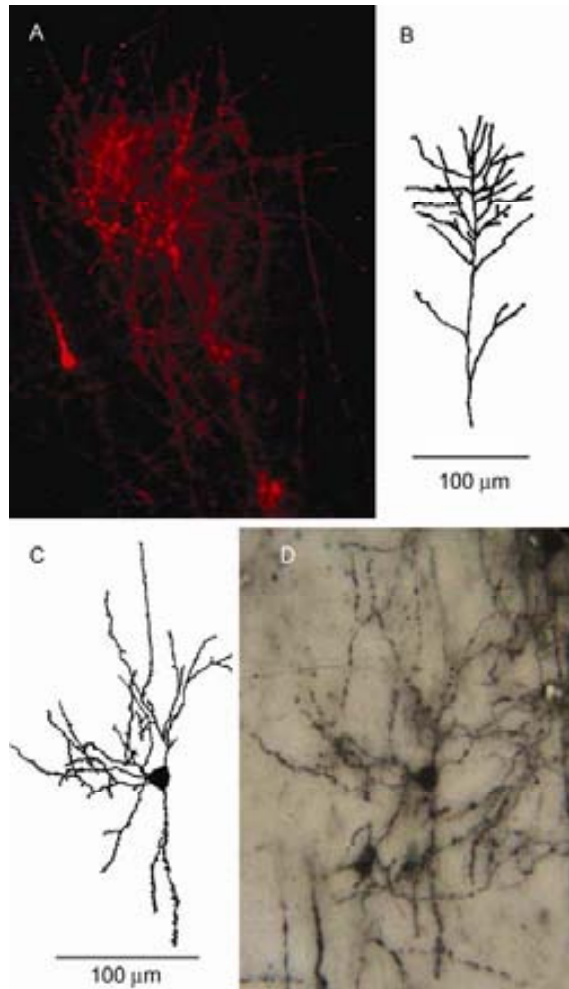
### **Morfología Axonal**

Las ratas se sacrificaron y perfundieron con solución salina (0.15 M) seguida de una solución de paraformaldehído (4%) en amortiguador de fosfatos (PB; 0.1 M, pH 7.4). Después de la decapitación, las cabezas se colocaron en frascos color ámbar que contenían el mismo fijador a temperatura ambiente por una semana. Inyecciones estereotáxicas del colorante lipofílico 1,1'-dioctadecil-3,3,3',3'-tetrametilindocarbocianina perclorada (0.5 – 1  $\mu$ L 0.025% en etanol; Dil, Molecular Probes) se aplicaron en el complejo ventrobasal del tálamo evitando atravesar S1. Las cabezas se guardaron nuevamente en los frascos ámbar con el mismo fijador por dos meses para las ratas de 5DP y 15DP y por nueve meses para las de

25DP. Después de este tiempo se obtuvieron cortes coronales de  $200\mu\text{m}$  correspondientes al campo de barriles posteromedial con un vibratomo (Vibratome, St. Louis, MO). Los cortes se colocaron en laminillas tratadas con gelatina y cubiertos con glicerol. Los barriles se identificaron y los árboles axónicos se dibujaron mediante un sistema de cámara lúcida ( $n=48$  5DP,  $n=24$  10DP,  $n=11$  15DP y  $n=8$  30DP). Los axones obtenidos de rebanadas de cerebros de 25DP fueron reconstruidos en un microscopio confocal LSM Pascal (Zeiss MicroImaging, Inc. Thornwood, NY). Los dibujos se digitalizaron y analizaron de la misma manera que para las dendritas, así como el análisis fractal. Los valores obtenidos en cada uno de los parámetros evaluados se compararon estadísticamente entre edades mediante un análisis de varianza de Kruskal-Wallis y una prueba de Dunn's ( $p<0.05$ ). Ver figura 1.

### **Análisis fractal**

Si se considera un segmento de en línea recta y se reduce su dimensión por un factor  $1/N$ . Entonces, el segmento resultante es  $1/N$  del original. Si se considera ahora un rectángulo y se multiplican todos sus valores de dimensión por  $1/N$ . El nuevo rectángulo es más pequeño, y es  $1/N^2$  del anterior. De manera similar si se toman todas las dimensiones de un cubo y se disminuyen por un factor  $1/N$ , se obtendrá un cubo más pequeño que es  $1/N^3$  del original. Sabiendo que un segmento de una línea recta es unidimensional y su dimensión es 1, un rectángulo es bidimensional y su dimensión es 2, y un cubo es tridimensional y su dimensión es 3, podemos afirmar que un objeto dado es de dimensión  $D$ , cuando todas sus



**Figura 1.- Morfología dendrítica y axonal.** Fotografías que representan reconstrucciones de un axón (A) y de una neurona estrellada espinosa (D) de 10DP y sus respectivos dibujos hechos en cámara lúcida (B y C).

dimensiones son disminuidas por un factor  $1/N$ , el objeto resultante es  $1/N \cdot D$  del original.

Un fractal es un objeto matemático cuya dimensión es más grande que la del objeto de la que se compone. Por ejemplo un fractal compuesto por líneas tendrá una dimensión fractal más grande que uno pero menor que dos. Los fractales revelan una estructura mucho más fina y compleja mientras más cerca se les observe (un ejemplo típico es la costa de Inglaterra). Así, mientras más pequeña

sea la regla con la que se mide, más grande será la longitud que se mida. De hecho la longitud fractal tiende al infinito mientras que la unidad de medida tiende a cero. Más aún, el área de dicho fractal es cero porque no llena ninguna superficie. Esto se debe al hecho de que el fractal está construido por segmentos de líneas rectas (Mandelbrot, 1983).

Se puede afirmar de las consideraciones anteriormente expresadas que la dimensión fractal es una medida que corresponde a la complejidad geométrica de un objeto. Dada su estructura geométrica fina, un fractal con una dimensión mayor a uno y más pequeña que dos es más complejo que una línea recta. Además, entre más grande sea esta dimensión estará más cerca de llenar una superficie y llegando a ser un objeto de dos dimensiones. Estructuras tipo de tres dimensiones como los dibujos de cámara lúcida de los árboles dendríticos y axónicos son un ejemplo de fractales hechos por líneas rectas. La dimensión de estos fractales es una función creciente del promedio de ramas que surgen de cada punto de ramificación. Por lo tanto, la dimensión fractal se puede utilizar como una estimación de la complejidad de los árboles dendríticos y axónicos.

### **Densidad Sináptica**

Las ratas de las edades de 5DP, 15DP y 25DP ( $n=5/\text{edad}$ ) se sacrificaron y perfundieron con solución salina (0.15 M) seguida de una solución de fijador de Karnovsky (glutaraldehído 2.5%, paraformaldehído 1% en amortiguador de carcodilato de sodio 0.2 M, pH 7.3). Los cerebros se disecaron, se aplanaron las cortezas y se postfijaron por al menos 24 horas a 4° C en el mismo fijador. Secciones tangenciales de entre 200-250 $\mu\text{m}$  se obtuvieron con un vibratomo y se

utilizaron para obtener los barriles con ayuda de un sacabocados de 2mm de diámetro. Posteriormente se contrastaron con tetróxido de osmio al 1% y se incluyeron en Epon. Tres cortes ultrafinas se obtuvieron de cada uno de los bloques separados por 65 $\mu$ m entre ellos, mediante el uso de un ultramicrotomo. Los cortes se colocaron en una rejilla cubierta con formvar y se observaron en un microscopio electrónico de transmisión. Se tomaron 10 microfotografías de cada uno de los niveles a 2500 aumentos y se obtuvieron tres armados correspondientes a 10 microfotografías. Cada micrografía tiene un área de 1,316.25 micras por lo que el área total revisada fue de 13,162 micras cuabras por armado. Así, se contaron el número de sinapsis asimétricas en una superficie total de 39,486 micrómetros cuadrados por cada barril extraído (n=2 por animal). Los valores obtenidos se compararon entre edades con base en un análisis de varianza y una prueba de Tukey ( $p<0.05$ ).

### **Citocromo Oxidasa**

Técnica histoquímica que se utilizó para evaluar la actividad metabólica de los barriles desde 5DP hasta 30DP. Las rebanadas utilizadas para los estudios realizados en esta sección del trabajo fueron consecutivas de aquellas usadas para realizar las descripciones inmunocitoquímicas. La técnica fue realizada como se ha descrito previamente (Wong-Riley, 1989). Los cortes se incubaron en una solución que contenía 0.05% de DAB, 0.03% de citocromo c y 0.02% de catalasa diluidos en 0.1M de PB. En todos los casos la reacción se detuvo a las 4 horas de incubación. Una vez que los cortes se tiñeron, las imágenes de los barriles se capturaron y digitalizaron en el sistema de análisis de imágenes descrito arriba

(ScionCorp, Beta 4.0.2). La intensidad de iluminación, el contraste y la ganancia se mantuvieron fijos durante toda la sesión de captura. Para realizar el análisis densitométrico, se trazó manualmente el contorno de los barriles y del cuerpo calloso, y se obtuvieron los valores de transmitancia. El valor de transmitancia asociado a los barriles se reporta como la diferencia porcentual relativa al cuerpo calloso. Los valores obtenidos se compararon entre edades con base en un análisis de varianza de una vía y la prueba de Tukey ( $p < 0.05$ ).

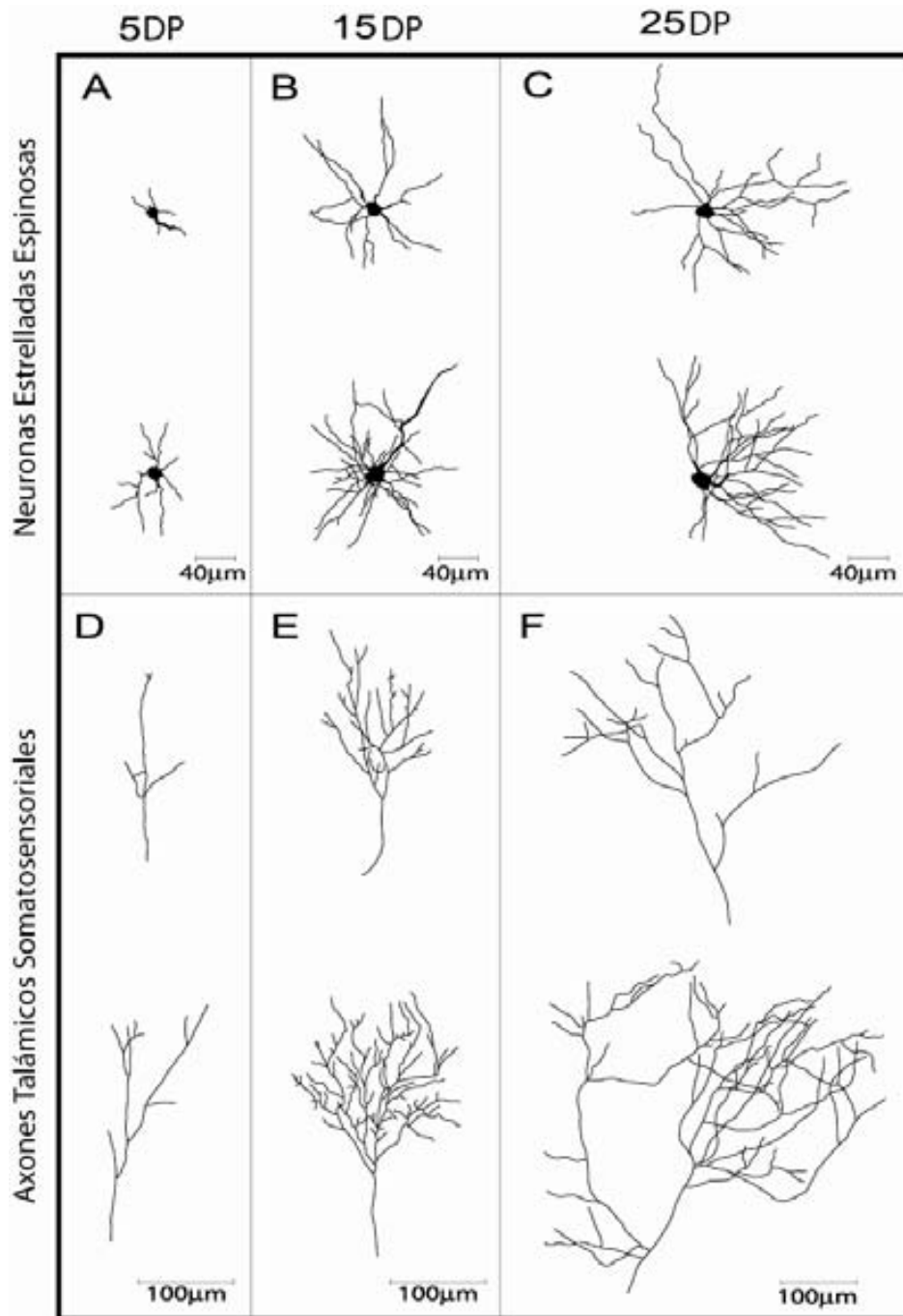
Todos los demás reactivos se obtuvieron de Sigma (Sigma, Saint Louis, Missouri)



## **Resultados**

### **Desarrollo del crecimiento de los árboles dendríticos y axónicos en los barriles de S1**

Con el objetivo de analizar el desarrollo de los árboles dendríticos de las neuronas estrelladas espinosas de la capa IV de S1, se realizaron impregnaciones de las neuronas con la técnica de Golgi y un marcaje con el colorante Dil para evaluar el desarrollo de los axones talámicos dentro de los barriles de la capa IV de S1. En la figura 2 se presentan los dibujos representativos de las neuronas estrelladas espinosas menos ramificadas y más ramificadas en cada una de las edades 5DP, 15DP y 25DP (Figura 2A, B y C, respectivamente). Independientemente de ser las más sencillas y las más complejas de cada edad, al compararlas entre edades se puede ver el aumento en complejidad de 5DP a 25DP. Las neuronas de 5DP son poco ramificadas y sus ramas son cortas. Posteriormente, las neuronas aumentan en tamaño, presentan ramas sencillas muy largas y ramas muy ramificadas. Para los 25DP el número y longitud de las ramas se ven parecidos a los 15DP pero se orientan hacia uno de los lados, esto es debido probablemente a la llegada de las aferentes talámicas (Greenough and Chang, 1988). En la figura 2 también se muestran dibujos de los axones más sencillos y más complejos en cada una de las edades 5DP, 15DP y 25DP (Figura 2D,E y F, respectivamente). En este caso se



**Figura 2.- Existe gran variabilidad entre las neuronas estrelladas espinosas corticales y los árboles talámicos de la misma edad.** Dibujos de cámara lúcida correspondientes a las neuronas estelares espinosas y a los axones talámicos más sencillos y más complejos a los 5 (A,D), 15 (B,E) y 25DP(C,F), respectivamente. A pesar de esta gran variabilidad se puede ver el incremento en la complejidad a lo largo de la edad

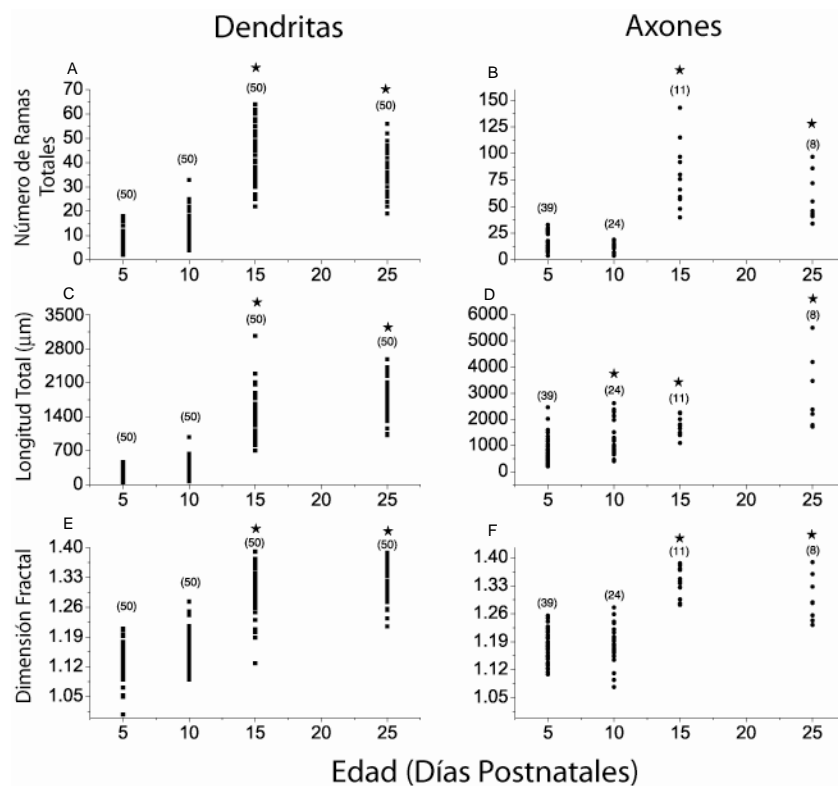
puede observar que los axones son más complejos a los 25DP que a los 5DP. Los árboles de 15DP son muy ramificados y sus ramas son cortas en comparación a los árboles de 25DP donde las ramas son más largas.

### **Los árboles dendríticos de las neuronas estrelladas espinosas se remodelan con la edad**

En términos generales, las neuronas estrelladas espinosas muestran un incremento significativo en el número de ramas dendríticas desde los 5DP y hasta los 15DP ( $p < 0.05$ ). Después de esta edad, el número de ramas de los árboles dendríticos permanece relativamente estable (Figura 2 A-C; Figura 3A). De manera semejante, la longitud dendrítica total incrementa significativamente desde 5DP hasta 15DP (Figura 3C). Entre 15DP y 25DP existe un ligero incremento que no es significativo (Figura 3C).

Otro parámetro que se evaluó fue el número de ramas dendríticas de distintos órdenes presentes en las neuronas estrelladas espinosas a distintas edades. Como se muestra en la figura 4, el número de ramas del primero al cuarto orden incrementa entre 5DP y 15DP. A los 15DP, se desarrollan las ramas que van desde quinto hasta el noveno orden. Para 25DP, sin embargo, disminuye ligeramente el número de ramas del primero al quinto orden, tienden a incrementar aquellas del sexto y séptimo órdenes, se mantienen las del octavo orden y se pierden las del noveno orden. Estos resultados indican que, en general, las neuronas estrelladas espinosas muestran una retracción de procesos dendríticos de todos los órdenes con excepción de aquellas pertenecientes al sexto y séptimo

órdenes. Es importante destacar que no obstante la retracción generalizada de procesos dendríticos entre los 15DP y 25DP, la longitud total de las ramas dendríticas por orden incrementa desde los 5DP hasta los 25DP (Figura 4). En otras palabras, aunque las neuronas en cerebros de ratas de 25DP tienden a tener un número discretamente menor de ramas dendríticas por orden con relación a sus contrapartes observadas a los 15DP, la longitud de las ramas dendríticas de distinto orden es mayor en las neuronas de 25DP que en aquellas de 15DP.



**Figura 3.- Los árboles dendríticos de las neuronas estelares espinosas corticales y los árboles axónicos tálamo-corticales se remodelan al mismo tiempo que incrementan su complejidad durante el primer mes de vida postnatal.** Gráficas que muestran análisis morfométrico de dendritas y axones que corresponden a la cuantificación del número de ramas totales (A,B), la longitud total (C,D), y la dimensión fractal (E,F) a los 5,10,15 y 25DP. El número de ramas aumenta significativamente desde los 5DP y hasta los 15DP y disminuye para 25DP. La longitud, en cambio aumenta significativamente con la edad en ambas estructuras. Por su parte, la dimensión fractal indica que la complejidad de los árboles aumenta significativamente para los 15DP y se mantiene (\* p<0.05).

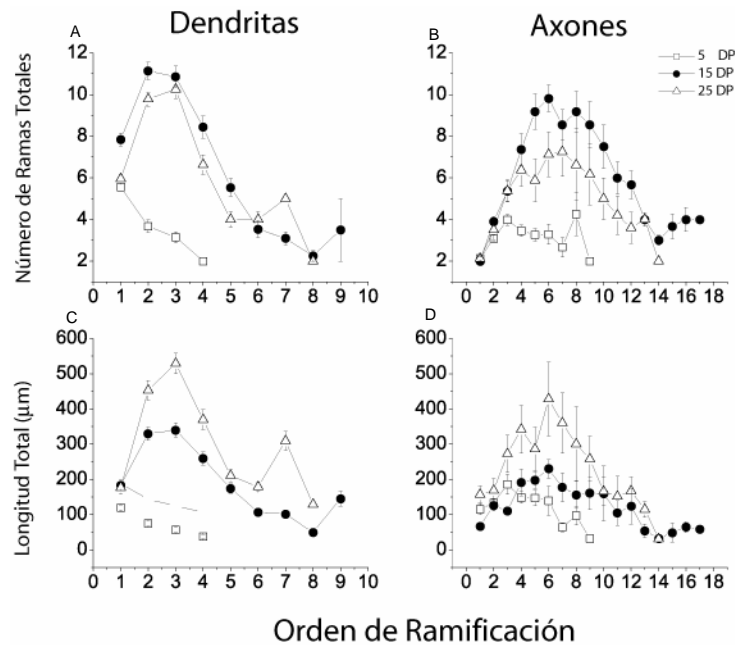
El análisis fractal del crecimiento dendrítico de las neuronas estrelladas espinosas reveló que, no obstante la intensa remodelación a la que es sujeto el árbol dendrítico de estas neuronas, su complejidad aumenta durante el primer mes de vida (Figura 3E)

### **Los árboles axónicos provenientes de neuronas localizadas en el núcleo posteromedial del tálamo se remodelan con la edad**

Nuevamente, en términos generales, los árboles terminales de los axones tálamocorticales somatosensoriales muestran un incremento en el número de ramas desde los 5DP hasta los 15DP. Después de esta edad, el número de ramas de los árboles axónicos disminuye, aunque no de manera significativa (Figura 2 D-F; Figura 3B). De forma similar, la longitud total del árbol terminal axónico incrementa significativamente entre 5DP y 10DP. Entre 10DP y 15DP, la longitud permanece relativamente constante, para finalmente entre 15DP y 25DP incrementar de forma notable (Figura 3D).

En este caso también se evaluó el número de ramas y la longitud de distintos órdenes presentes en los árboles terminales de los axones tálamocorticales somatosensoriales. Como se ilustra en la figura 4, el número de ramas del primero al noveno orden incrementa significativamente entre 5DP y 15DP. A los 15DP, se desarrollan las ramas que van desde décimo hasta el décimo séptimo orden. Para 25DP, sin embargo, disminuye el número de ramas del cuarto al décimo cuarto orden y se retraen aquellas del décimo quinto, sexto y séptimo órdenes. Estos resultados indican que, los axones tálamocorticales retraen procesos de todos los

órdenes a lo largo del primer mes de vida. A pesar de esta retracción generalizada de ramas, la longitud total de las ramas que permanecen por cada orden incrementa significativamente desde los 5DP hasta los 25DP (Figura 4B y D). Se puede observar también que los axones tálamocorticales en los cerebros de las ratas de 25DP retraen las ramas de todos los órdenes en su árbol con relación a las observadas en los 15DP, la longitud de las ramas que permanecen de distinto orden es mayor en los axones de 25DP con relación a aquellos de 15DP. Finalmente, como fue el caso para las dendritas, el análisis fractal del crecimiento de los árboles axónicos reveló que, no obstante la intensa remodelación, la complejidad del árbol incrementa durante el primer mes de vida, lo cual sugiere que aumentan también los sitios potenciales de sinapsis (Figura 3F).



**Figura 4.- Existe una retracción de procesos en varios órdenes de ramificación tanto en dendritas como en axones, así como un aumento en la longitud de las ramas restantes.** Gráficas que muestran el análisis morfométrico de ramas por orden en dendritas y en axones tanto para el número total de ramas (A,B) como la longitud de las mismas (C,D) a los 5,15 y 25DP. La dinámica entre el número de ramas y la longitud es inversa entre los 15DP y los 25 DP.

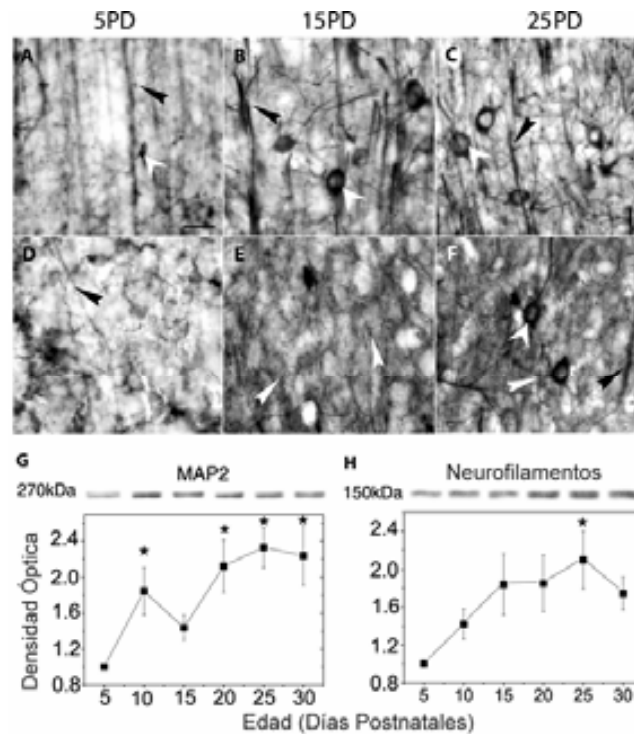
**La cantidad de elementos neuronales inmunopositivos para MAP2a y b en el interior de los barriles incrementa con la edad.**

En concordancia con el análisis morfométrico que indica un incremento de la complejidad dendrítica entre los 5DP y los 15DP, el neurópilo de los barriles en este mismo periodo mostró un aumento en la cantidad de elementos inmunoreactivos a MAP2a y b (Figura 5A-C). De hecho, mientras que en el neurópilo de los barriles a los 5DP (Figura 5A) existen pocos procesos dendríticos y algunas células marcadas, a los 15DP (Figura 5B) el número de procesos y de células marcadas se incrementan. Cualitativamente no parece existir un cambio evidente entre los 15DP y los 25DP (Figura 5C), lo que también coincide con el resultado obtenido en la morfometría dendrítica (Figura 3A y 4A).

**El contenido de la proteína MAP2a y b en la corteza somatosensorial se incrementa con la edad.**

El análisis densitométrico de las transferencias tipo Western muestran que, en general, el contenido de MAP2a y b en la corteza somatosensorial tiende a incrementar desde los 5DP y hasta los 20DP. Después de esta fecha, no se observan cambios significativos en el contenido de MAP2a y b en la corteza somatosensorial. Es importante destacar que no obstante la tendencia a incrementar con el tiempo, se observa un decremento en el contenido de MAP2a y b a los 15DP. Esta variación en el contenido probablemente refleje una remodelación de las dendritas en esta edad (ver más adelante). Después de los 20DP la cantidad de MAP2 no varía. Los porcentajes de diferencia relativos a los

5DP fueron de 85% a los 10DP, 44% a los 15DP, 112% a los 20DP, 133% a los 25DP y 123% a los 30DP.



**Figura 5.- El contenido de la proteína MAP2a y b y de neurofilamentos en la corteza somatosensorial tiende a incrementar con la edad.** Inmunocitoquímicas de cortes coronales contra MAP2a y b (A-C) y neurofilamentos (D-F) a los 5, 15, y 25DP en la capa IV de S1. Se puede apreciar que la marca para proteínas de dendritas como de axones aumentan con la edad. Las cabezas de flecha anchas indican neuronas inmunoreactivas y las cabezas de flecha delgadas indican neuropilo inmunoreactivo. Las flechas indican dendritas apicales de neuronas piramidales de la capa V que atraviesan la capa IV. Transferencias tipo Western contra MAP2 (G) y neurofilamentos (H) a los 5, 10, 15, 20, 25, y 30DP en S1. Se observa una tendencia a incrementar la cantidad de MAP2 durante los primeros 20DP, que se estabiliza posteriormente. La cantidad de neurofilamentos aumenta hasta los 15DP y luego se estabiliza. Los asteriscos denotan incrementos significativos con referencia a los 5DP. Escala 20 micras, \* $p < 0.05$ .

**La cantidad de elementos neuronales inmunopositivos para neurofilamentos en el interior de los barriles se incrementa con la edad.**



Como fue el caso para las dendritas, en concordancia con los resultados morfométricos que indican un incremento de la complejidad axónica entre los 5DP y 15DP, el neurópilo de los barriles en este mismo periodo mostró un aumento en la cantidad de elementos neuronales inmunoreactivos a neurofilamentos (Figura 5D-F). Mientras que en el neurópilo de los barriles a los 5DP se observó una tinción escasa (Figura 5D), hacia las edades más tardías ésta incrementa e incluso algunos cuerpos neuronales y dendritas muestran inmunoreactividad para neurofilamentos hacia PD25 (Figura 5F). Cualitativamente, sin embargo, no parece existir un cambio importante en la intensidad de la inmunotinción entre los 15DP y los 25DP, lo que coincide con el resultado obtenido en la morfometría axónica (Figura 3B y 4B).

### **El contenido de los neurofilamentos en la corteza somatosensorial incrementa con la edad.**

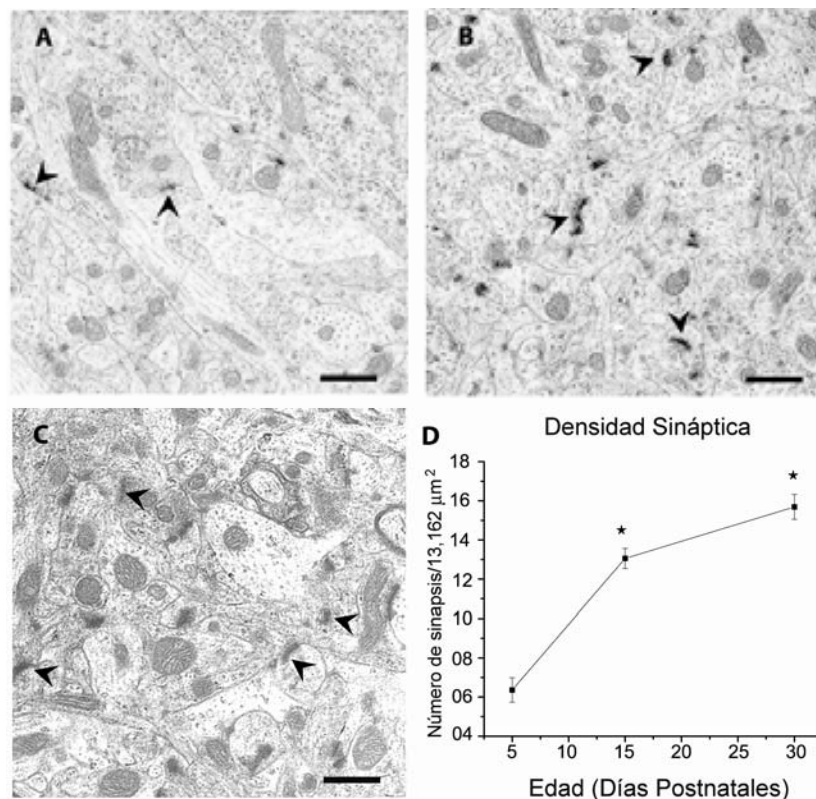
El análisis densitométrico de las transferencias tipo Western muestran que el contenido de neurofilamentos en la corteza somatosensorial tiende a incrementar desde los 5DP y hasta los 15DP. Después de esta fecha, no se observan cambios significativos en el contenido de neurofilamentos en la corteza somatosensorial.

Los porcentajes de diferencia relativos a los 5DP fueron de 42% a los 10DP, 84% a los 15DP, 85% a los 20DP, 109% a los 25DP y 80% a los 30DP (Figura 5H)

## La densidad sináptica aumenta en los barriles con la edad

Los estudios de microscopía electrónica se realizaron para estimar la densidad de sinapsis en la capa IV de la corteza somatosensorial primaria durante el primer mes de vida postnatal (Figura 6A-C). Los resultados muestran una densidad de 6 sinapsis por  $100 \mu\text{m}^2$  a los 5DP, aumentó a 13 sinapsis por  $100 \mu\text{m}^2$  para los 15DP. Para los 30DP la densidad fue de 16 sinapsis por  $100 \mu\text{m}^2$ .

La pendiente entre 5DP y 15DP es muy pronunciada lo que indica un periodo intenso de sinaptogénesis, mientras que entre los 15DP y los 25DP la sinaptogénesis continúa pero en menor grado (Figura 6D). Los porcentajes de diferencia relativos a los 5DP fueron de 105% a los 15DP y 146% a los 30DP.



**Figura 6.- La densidad sináptica aumenta en los barriles al avanzar la edad en el desarrollo.** Microscopía electrónica de la capa IV de S1 a los 5(A), 15(B) y 30DP(C). Las cabezas de flecha indican sinapsis. La gráfica muestra la cuantificación de dichas sinapsis. Existe un incremento significativo en la densidad de sinapsis entre 5DP y 15DP que continúa para PD30 (D). Los asteriscos denotan incrementos significativos con referencia a los 5DP. Escala 1 micra, \* $p < 0.05$ .

**La marca en el neurópilo para las proteínas sinaptofisina y Shank-2 se incrementa en el interior de los barriles durante el primer mes de vida.**

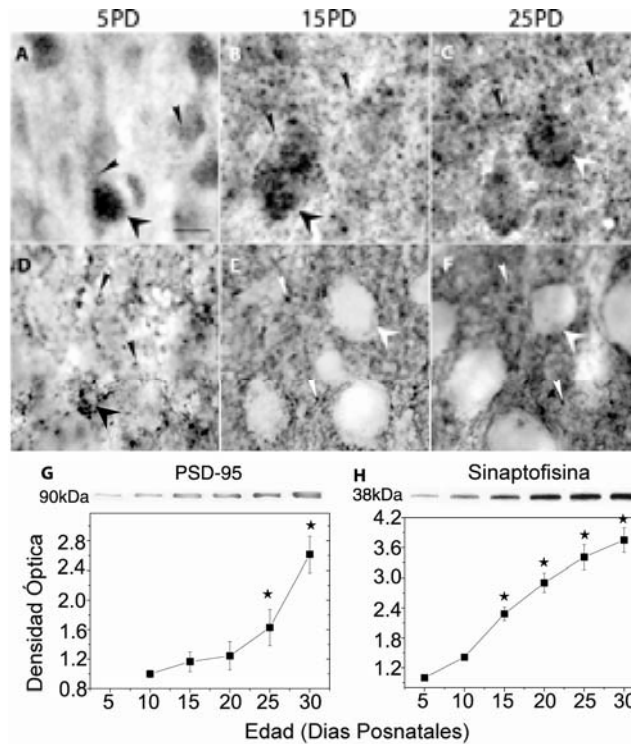
Las terminales sinápticas contienen vesículas en cuya membrana se encuentra la sinaptofisina. Esta es la razón por la que las variaciones de la marca inmunohistoquímica de esta proteína se consideran como indicativo de cambios en el número de sinapsis. Por otro lado, la proteína Shank-2, forma parte de la densidad postsináptica lo que la sitúa como un buen marcador de sitios postsinápticos, y por ende de sinapsis. La marca inmunohistoquímica de Shank-2 se incrementó claramente en el neurópilo desde los 15DP a los 25DP. Durante este tiempo, se observó una reorganización de la marca para Shank-2 en las neuronas y en el neurópilo de los barriles. Inicialmente, a los 5DP, la marca se concentró fuertemente en los somas neuronales (Figura 7A). Para los 15DP, la marca continúa siendo somática, si bien se nota algo más dispersa, y aparecen puntos en el neurópilo circundante a los cuerpos neuronales (Figura 7B). Algo semejante se observó a los 25DP. Sin embargo en esta edad, la marca en el soma de numerosas neuronas se aprecia muy dispersa y la marca en el neurópilo se incrementa (Figura 7C).

En el caso de la sinaptofisina se observa un patrón en el neurópilo punteado difuso a los 5DP (Figura 7D). A los 15DP, la marca parece organizarse de manera homogénea sobre los somas neuronales y es más intensa en el neurópilo (Figura 6E). Para los 25DP, continúa la marca sobre los somas se incrementa en el neurópilo notoriamente (Figura 7F).

**El contenido de PSD-95 y sinaptofisina en la corteza somatosensorial se incrementa con la edad.**

Otra proteína que también ha sido ampliamente utilizada como marcador de sitios postsinápticos y forma parte de la densidad postsináptica es la PSD-95. El análisis densitométrico de las transferencias tipo Western mostró que el contenido de PSD-95 no se detecta a los 5DP pero comienza a aumentar desde los 10DP hasta alcanzar un máximo en el periodo estudiado a los 30DP. Es importante mencionar que el incremento, notorio en el contenido de esta proteína, tiene lugar a partir del 20DP. Antes de esta fecha el incremento con la edad es discreto y no significativo (Figura 7G). Los porcentajes de diferencia relativos a los 10DP fueron de 17% a los 15DP, 24% a los 20DP, 64% a los 25DP y 161% a los 30DP.

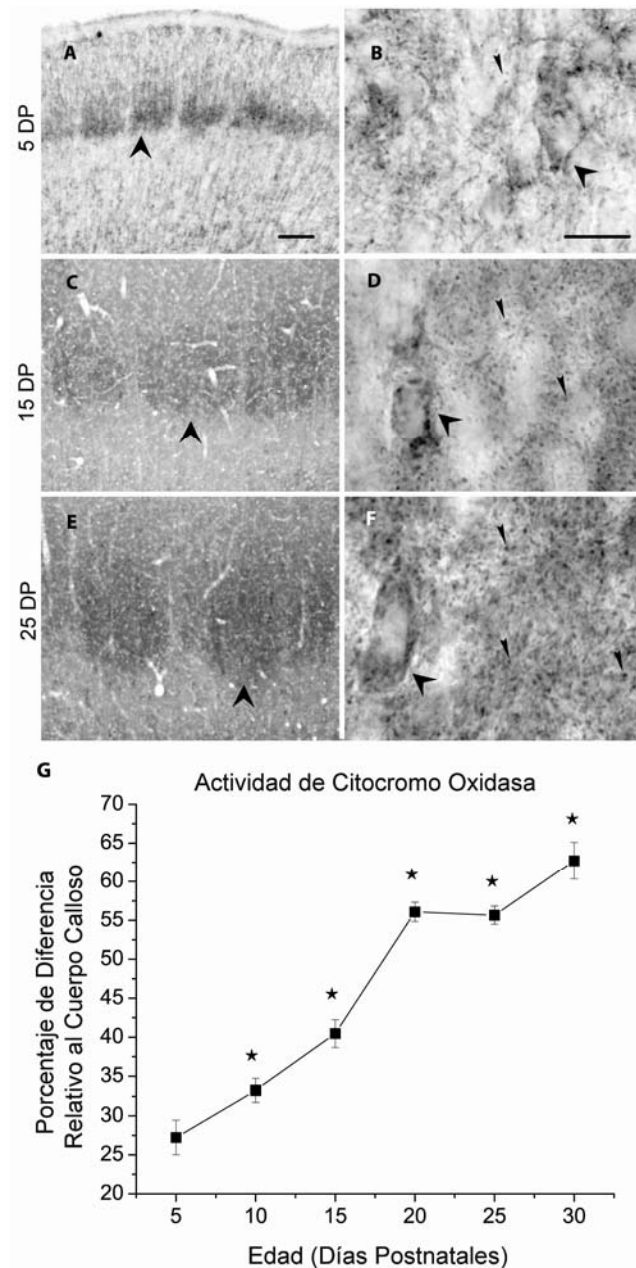
Por otro lado, el mismo tipo de análisis realizado para las transferencias tipo Western para sinaptofisina reveló que este marcador de terminales incrementa de forma muy regular desde los 5DP hasta alcanzar su máximo a los 30DP en el periodo evaluado (Figura 7H). Los porcentajes de diferencia relativos a los 5DP fueron de 41% a los 10DP, 128% a los 15DP, 190% a los 20DP, 240% a los 25DP y 275% a los 30DP. Estos resultados reflejan que el contenido de marcadores sinápticos incrementa de manera importante con la edad, lo que coincide con los resultados de la microscopía electrónica.



**Figura 7.- El contenido de las proteínas Shank-2, PSD-95 y sinaptofisina aumentan en la corteza somatosensorial con la edad.** Inmunocitoquímica en cortes coronales contra Shank-2 (A-C) y sinaptofisina (D-F) a los 5, 15, y 25DP en la capa IV de S1. Las cabezas de flecha anchas indican neuronas marcadas y las cabezas de flecha delgadas indican sitios potenciales de sinapsis. La cantidad de ambas proteínas aumenta de manera importante con la edad. La distribución de la marca cambia con la edad. Transferencia tipo Western contra PSD-95 (G) y sinaptofisina (H) a los 5, 10, 15, 20, 25, y 30DP en S1. Se puede apreciar que la cantidad de PSD-95 incrementa lentamente hasta los 20DP y posteriormente aumenta de manera significativa. En el caso de sinaptofisina el incremento es gradual. Los asteriscos denotan incrementos significativos con referencia a los 5DP. Escala 20 micras, \* $p < 0.05$ .

**La actividad para la enzima citocromo oxidasa aumenta en los barriles a lo largo del primer mes de vida.**

Con el propósito de documentar el grado de actividad sináptica en la capa IV de S1 evaluamos la actividad de la enzima oxidativa citocromo oxidasa. La técnica histoquímica para citocromo oxidasa ha sido ampliamente utilizada para localizar los barriles de S1 y para determinar su actividad metabólica. En la Figura 8 se



**Figura 8.- La actividad para la enzima citocromo oxidasa aumenta en los barriles a lo largo del primer mes de vida.** Histoquímica para citocromo oxidasa en la capa IV de S1 a los 5, 15, y 30 DP. Cortes coronales de cerebros de 5(A), 15(C) y 25DP(E). Las cabezas de flecha indican los barriles. En los paneles de la derecha se muestran ampliificaciones de los barriles, las flechas indican los sitios donde existe una mayor actividad mitocondrial. En la gráfica (G) se puede apreciar el aumento casi lineal de la actividad metabólica de los barriles. Los asteriscos denotan incrementos significativos con referencia a los 5DP. Escala 100 micras (A,C,E) y 20 micras (B,D,F), \* $p < 0.05$ .

ilustran cortes coronales de la corteza S1 donde se puede observar perfectamente teñidos los barriles, a los 5DP(A), 15DP(C) y 25DP(E). El análisis densitométrico muestra un incremento significativo entre los 5DP, los 15DP y los 20DP ( $p < 0.05$ , Figura 8G). Entre los 20DP y los 30DP no hay diferencias significativas. Los cambios con respecto a 5DP son de 23% para 10DP, 50% para 15DP, 110% para 20DP, 107% para 25DP y 143% para 30DP.

Por otro lado, la distribución de la marca histoquímica para la citocromo oxidasa cambió con la edad. A los 5DP, la marca se observa en el interior de los somas neuronales asociada a cúmulos mitocondriales (Figura 8B). A los 15DP, la marca no solamente se observa asociada a estos cúmulos en los cuerpos neuronales, sino también en aquellas localizadas en el neurópilo (Figura 8D). Para 25DP, la tinción en el neurópilo es acentuada, y los cúmulos mitocondriales en el soma tienden a dispersarse (Figura 8F).

## Discusión

En los roedores, la estrategia ontogenética que sigue la vía tálamocortical somatosensorial para establecer circuitos es aún controversial. Mientras que algunos grupos sostienen que los circuitos neuronales en esta vía se ensamblan a través de un mecanismo de selección (Senft and Woolsey, 1991; Schlaggar and O'Leary, 1994), otros postulan que este mecanismo se apega a una concepción constructivista (Agmon et al., 1993; Agmon et al., 1995; Catalano et al., 1996). Nuestros resultados no apoyan ninguna de estas posturas. Los datos obtenidos sugieren que los axones y las dendritas adicionan ramas hasta los 15DP, para luego ser sujetas a una remodelación en la que si bien existen mecanismos de eliminación de las ramas más distales, también procede de manera concurrente un mecanismo de elongación y estabilización de las ramas proximales. Esta forma de ensamblaje de los árboles dendríticos y axónicos es compatible con el modelo de formación-eliminación concurrente propuesto por Hua y Smith, en el que el crecimiento selectivo de ramas y la eliminación de algunas de ellas ocurren simultáneamente (Hua and Smith, 2004). Nuestros resultados añaden tres elementos importantes al modelo descrito. Primero, parece que en una primera fase, tanto los árboles dendríticos como axónicos predominantemente añaden elementos. En una segunda fase, los eventos de eliminación de ramas dendríticas y axónicas se acompañan de la elongación de aquellas ramas que permanecen y no de la formación de nuevas ramas. El tercer elemento que aportamos al modelo de formación-eliminación concurrente es que la porción de los árboles que esta sujeta a remodelación a través de los eventos de eliminación es la más distal del



árbol, lo que sugiere que el desarrollo de las porciones proximales y distales de los árboles dendríticos y axónicos están regulados diferencialmente y que su desarrollo es, hasta cierto punto, independiente el uno del otro. Es importante destacar que a pesar de la intensa remodelación de la que son sujetos los árboles axónicos y dendríticos entre el 15DP y el 25DP, ambos tienden a incrementar en complejidad. Esta conclusión se apoya en los valores obtenidos del análisis fractal que muestran un aumento en la complejidad de las arborizaciones dendríticas y axónicas. Esto aunado al incremento observado en el contenido de neurofilamentos y MAP2a y b en S1 con la edad (Riederer and Matus, 1985). La caída del contenido de la MAP2a y b al los 15DP pudiera reflejar el mecanismo de remodelación que ocurre en las porciones distales de los árboles dendríticos donde se necesitaría desestabilizar a los microtúbulos. Así, nosotros proponemos un modelo en el que la formación-eliminación concurrentes seguidos de un proceso de elongación que promueve un aumento de la complejidad tanto de axones como de dendritas en la vía talamo-cortical durante los primeros 25DP.

El modelo propuesto no solamente encuentra apoyo en nuestros resultados sino en datos obtenidos durante el desarrollo de los árboles axónicos de las neuronas sensoriales de la sanguijuela (Kramer and Kuwada, 1983; Wang and Macagno, 1997; Reese and Drapeau, 1998), de las motoneuronas del pez cebra (Jontes et al., 2000), y de neuronas talámicas que proyectan hacia la corteza visual en hurones (Crowley and Katz, 2000). Así mismo, el modelo concurrente modificado también se apoya por datos obtenidos en estudios que evalúan el desarrollo de árboles dendríticos de las neuronas hipocámpales (Dailey and Smith, 1996; Ziv and Smith, 1996), corticales de las capas II y III en la corteza somatosensorial

(Lendvai et al., 2000), y mitrales del bulbo olfatorio (Purves and LaMantia, 1990; Treloar et al., 2002).

Una de las observaciones fundamentales realizadas en el trabajo tiene que ver con la estrecha relación espacio-temporal de los eventos de crecimiento (5DP a 15DP), remodelación (15DP a 25DP) y estabilización (mayor a 25DP) durante el desarrollo de los árboles dendríticos y axónicos en los barriles. Estas observaciones son compatibles con la idea de que los árboles dendríticos de las neuronas corticales estrelladas espinosas y los axones provenientes de las neuronas del núcleo posteroventromedial del tálamo crecen de manera sincrónica durante el primer mes de vida postnatal. Esta conclusión difiere de datos obtenidos en cultivo que muestran que los axones y dendritas de neuronas hipocámpales maduran asincrónicamente (Craig et al., 1996). Entonces, ¿Cuál podría ser el mecanismo de sincronización?. Nuestros resultados no nos brindan claves para inferirlo. Sin embargo, se sabe que las aferentes talámicas somatosensoriales inducen un cambio en la orientación de las dendritas de las neuronas corticales asociadas con los barriles cuando aquellas penetran a la capa IV (Greenough and Chang, 1988). Este evento podría ser el inicio de un proceso de comunicación bidireccional que fomentase el desarrollo sincronizado de ambos elementos. En apoyo a este concepto, se sabe que las dendritas de las células de Purkinje requieren de señales liberadas por las fibras paralelas para asegurar un desarrollo adecuado. Al mismo tiempo, las dendritas de las neuronas de Purkinje proveen de factores que mantienen el desarrollo de las fibras paralelas. Así, esta comunicación bidireccional permite el desarrollo sincrónico de las dendritas y los axones que serán compañeros sinápticos (Jacobson, 1991a).

En contraste con la sincronización de los patrones de desarrollo de las dendritas y los axones dentro los barriles, a primera vista, la sinaptogénesis en esta vía no parecería sincronizada con la sincronía entre las dendritas y los axones, puesto que el número de sinapsis incrementa con la edad, no obstante la intensa remodelación de los axones y las dendritas. Esta discrepancia podría ser explicada si uno considera que la sinaptogénesis se da principalmente en las ramas proximales que son más estables y remodelados por eventos de elongación. En apoyo a esta conclusión, observamos que las marcas inmunohistoquímicas para la sinaptiofisina y la Shank-2 a los 5DP se concentran en la zona perisomática para luego dispersarse de forma centrífuga hacia el neurópilo en edades más tardías. Esto sugiere que la sinaptogénesis da inicio en el soma y se extiende hacia las ramas proximales y distales conforme el árbol dendrítico madura. Un mecanismo semejante ha sido reportado en el cerebelo en donde las fibras trepadoras primero establecen contactos con el cuerpo y luego se trasladan a al tercio interno de árbol dendrítico (Berry and Bradley, 1976a) . Además, datos recientes documentan que la sinaptogénesis promueve la elongación de las ramas dendríticas (Niell and Smith, 2005).

Por otro lado, el hecho de que la densidad sináptica incrementa con la edad es compatible con la idea de que la vía tálamo-cortical somatosensorial utiliza una estrategia constructiva para generar conexiones neuronales, y sugiere que las estrategias globales de desarrollo de los árboles dendríticos y axónicos no necesariamente reflejan aquella utilizada durante los eventos de sinaptogénesis. Esta idea es robustecida por datos previos que muestran que el número de sinapsis glutamatérgicas (White, 1976) y GABAérgicas (Micheva and Beaulieu,

1996) se incrementan en el neuropilo de los barriles desde el nacimiento hasta los 30DP. Después de este periodo, el número de sinapsis permanece relativamente constante sin que se haya reportado evidencia de eliminación sináptica en esta área de la corteza de roedores. En conjunto nuestros datos y datos previos contrastan con aquellos obtenidos en la corteza cerebral de monos en donde se han reportado fenómenos de eliminación sináptica a lo largo del desarrollo postnatal.

Los fenómenos de redistribución podrían interpretarse como eliminación sináptica. Es importante mencionar que los análisis derivados de estudios de microscopia electrónica asumen que el observador está analizando terminales asociadas a la vía de interés. Esto, evidentemente, no es del todo cierto puesto que, por ejemplo, en el caso de los barriles el conteo de las terminales glutamatérgicas podrían incluir no solamente las asociadas con las aferentes talámicas sino también aquellas relacionadas con las horizontales. No obstante, las conexiones horizontales se desarrollan unos días más tarde (entre 10DP y 15DP) con relación a las aferentes tálamo-corticales (entre 4-5DP y hasta 15DP), y estas últimas forman cerca del 50% de las sinapsis totales dentro del barril.

Si bien arriba se discutió que la aparente discrepancia de las estrategias de desarrollo para generar dendritas, axones y sinapsis en la vía tálamo-cortical somatosensorial podrían ser debidas a la adición de sinapsis en los sitios que son remodelados a través de eventos de elongación y no de eliminación, es posible también que la discrepancia pudiera ser real. Esta posibilidad se apoya por los datos que muestran que la expresión y cambios en el contenido de la sinaptofisina en S1 antecede a aquellas de Shank-2 y PSD-95, lo que sugiere que los axones, y

en especial las terminales, maduran antes que los sitios postsinápticos. Esto no es de sorprender puesto que se ha documentado que se necesita una maquinaria de liberación madura para iniciar la sinaptogénesis (Ahmari et al., 2000; Friedman et al., 2000), y que existe una asincronía en la maduración de las terminales y sitios postsinápticos en neuronas hipocampales en cultivo (Craig et al., 1996).

Con base en el concepto de que existe una asincronía de la maduración de los elementos sinápticos en el neurópilo de los barriles, la pregunta que surge es si los perfiles de sinapsis observados con ayuda de la microscopia electrónica corresponden a sinapsis maduras. El hecho de que el contenido de PSD-95 y Shank-2 incrementen significativamente pasados los primeros 15 días desde el nacimiento sugiere que la consolidación sináptica ocurre fundamentalmente después de esta fecha y muy probablemente asociada a la detención de los eventos de remodelación entre los 15DP y 25DP. Estos datos coinciden con el hecho de que las sinapsis en los barriles son muy plásticas y muchas de ellas silenciosas hasta antes del 15DP (Feldman et al., 1999). Con base en esto se puede inferir que la cantidad de PSD-95 está íntimamente relacionada con la morfogénesis de las espinas, la sinaptogénesis, la maduración (i.e., transformación de sinapsis silentes en activas) y consolidación sinápticas (Jontes and Smith, 2000; Okabe et al., 2001).

Otro elemento interesante de discusión en nuestro trabajo es que investigaciones previas sugieren que los relevos inferiores de la vía tálamocortical somatosensorial se ensamblan a través estrategias seleccionistas. Jacquin y colaboradores mostraron que las aferentes primarias provenientes de las neuronas del ganglio del nervio trigémino se seleccionan por mecanismos competitivos al alcanzar el

núcleo principal del nervio trigémino en el tallo cerebral. Nuestras observaciones sugieren que la relevo tálamocortical de la vía somatosensorial se ensambla por un mecanismo de formación-eliminación concurrentes con una posterior elongación que refleja incrementos en su complejidad. La razón por cual a lo largo de una vía somatosesorial sus distintos relevos se ensamblan utilizando estrategias diferentes es desconocida. Se ha propuesto, sin embargo, que las diferencias observadas entre áreas del cerebro con relación a la estrategia para formar circuitos pudieran reflejar si las estructuras son o no de reciente adquisición durante la evolución de le especie en estudio.

Uno de los principios que guía el crecimiento de los árboles dendríticos y axónicos postula que existe una relación inversa entre su grado de ramificación y su longitud. En general, árboles dendríticos y axónicos muy ramificados muestran una longitud total menor que aquellos con escasas ramificaciones. Aunque se ha propuesto que esto se debe a que los pudieran existir mecanismos moleculares independientes que promuevan la elongación o la ramificación (Smith and Skene, 1997), el mecanismo por el cual esta relación inversa entre longitud y ramificación resulta es aún poco claro.

Una de las ideas más arraigadas en la neurociencias es que la actividad neuronal promueve el refinamiento de los árboles dendríticos y axónicos, así como la sinaptogénesis. Se ha mostrado que las neuronas corticales e hipocampales de animales sometidos a enriquecimiento ambiental sensorial y/o motor muestran un incremento en el número de ramas y espinas dendríticas, así como de sinapsis. En S1, se ha mostrado que la estimulación de los bigotes incrementa la inmuno-marca para PSD-95 (Skibinska et al., 2001), sinaptofisina (Ishibashi, 2002) y GAP-

43 (Kesterson et al., 2002). Existe, sin embargo, evidencia que sustenta que el inicio de la actividad neuronal induce el colapso de los conos de crecimiento y promueve la consolidación y eliminación, y no la adición, de contactos entre las neuronas. Así mismo, se ha mostrado que la privación sensorial o la inactividad facilitan la elongación de axones y dendritas, y la adición de contactos entre las neuronas. Así, debido a que la actividad neuronal en S1 solo se puede evocar después de aplicado un estímulo hasta pasados los ocho días de nacido (Landers and Sullivan, 1999), y a que las ratas muestran movimientos voluntarios de la vibrisas hasta el día 12DP (Welker, 1964; Landers and Sullivan, 1999), es difícil sostener que la fase de adición de procesos axonales y dendríticos y sinapsis documentada en el presente trabajo entre 5DP y 15DP es debido a la actividad neuronal asociada con el uso. Esto no es de sorprender pues se sabe que un porcentaje de la estructura de, al menos, los árboles dendríticos puede elaborarse en ausencia de inervación aferente.

Considerando la información descrita en el párrafo anterior, pensamos que es el mecanismo de remodelación (formación-eliminación y posterior elongación) lo que debe estar sujeto a los efectos de la actividad neuronal asociada con el uso pues dicha remodelación ocurre entre 15 y 25DP. La existencia de este periodo de remodelación intensa en animales normales podría explicar porque no se encontraron diferencias en el número final de espinas cuando este parámetro se comparo entre ratas control y aquellas expuestas en enriquecimiento ambiental, no obstante que este último grupo mostró un incremento en la movilidad y el recambio de las espinas dendríticas entre 5DP y 25DP. Así mismo, el hecho de que el contenido de PSD-95 incrementa significativamente entre 15DP y 25DP, y

que esta proteína esté relacionada con la consolidación sináptica, nos hace suponer que la actividad asociada al uso en S1 en verdad promueve la consolidación sináptica, y no la formación de nuevos contactos. Esta última conclusión gana sustento en el hecho de que después de 15DP la densidad sináptica en los barriles de S1 es prácticamente constante, es difícil generar potenciación en sus sinapsis (Feldman et al., 1999) y dejan de existir sinapsis silenciosas en la zona (Mierau et al., 2004).

Finalmente, dos observaciones hechas en el presente trabajo requieren de ser discutidas. La primera de ellas tiene que ver con el significado de la tinción de citocromo oxidasa entre 5DP y 10DP. La segunda es como explicar la redistribución de la marca para citocromo oxidasa observada en las neuronas corticales a lo largo del primer mes de vida.

Con relación a la primera de estas interrogantes, se ha dicho que la actividad de la enzima citocromo oxidasa refleja los niveles de actividad neuronal evocada. Sin embargo, como se mencionó anteriormente, la actividad neuronal evocada es escasa en los barriles antes del 8DP y el movimiento voluntario de la vibras no ocurre antes del 12DP. Por tanto, es improbable que la presencia de la actividad de la enzima a 5DP y su consecuente incremento entre esta fecha y 10DP, refleje los niveles de actividad asociada con el uso. Una posibilidad es que refleje las demandas metabólicas asociadas al crecimiento neuronal. En apoyo a esta idea, se observó que la marca histoquímica para la citocromo oxidasa se concentra en el soma de las neuronas corticales a los 5DP, y no en el neurópilo como uno esperaría pues en neuronas maduras se le localiza fundamentalmente en los sitios postsinápticos (Wong-Riley, 1989). Sin embargo, aunque durante los primeros 10



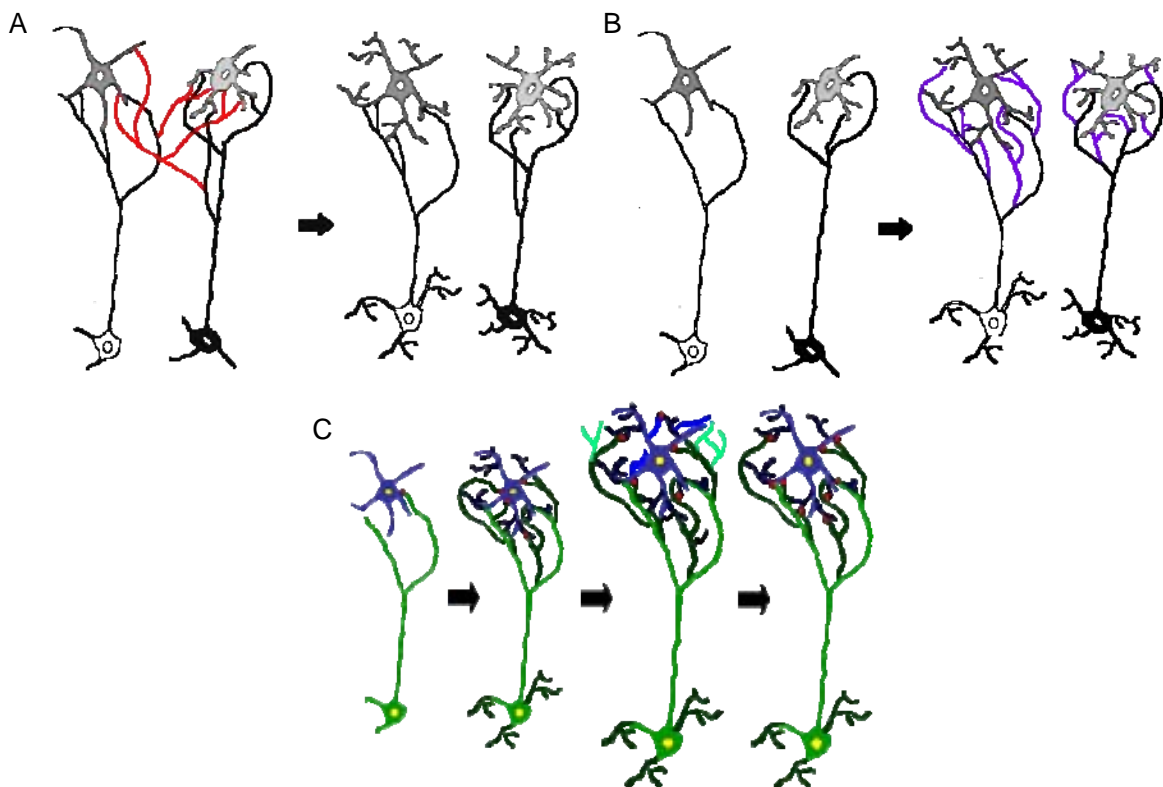
días los árboles dendríticos crecen, el crecimiento más importante ocurre entre los 10DP y los 15DP. Este crecimiento abrupto no se acompaña de un incremento de la actividad de citocromo oxidasa, lo que sugiere que no se asocia linealmente con el crecimiento. ¿Qué podría estar reflejando entonces la actividad de citocromo oxidasa durante los primeros 10 días? En un intento por aproximarnos a este problema, realizamos de manera complementaria a este trabajo un estudio que nos permitió evaluar si los índices metabólicos utilizados comúnmente para monitorear indirectamente los niveles de actividad, podrían ser sensibles a cambios en los patrones de activación (Uribe-Querol et al., 2005). Esto lo realizamos pensando en que la actividad de citocromo oxidasa en los barriles entre 5DP y 10DP pudiese reflejar cambios en los patrones y/o niveles de actividad neuronal asociada a la estimulación pasiva y no a la derivada el uso voluntario. Para ello, utilizamos un modelo de lactancia en el que la estimulación sensorial de los pezones, modifica el patrón de disparo espontáneo de las neuronas magnocelulares sin alterar el número de potenciales de acción en la unidad de tiempo (i.e., nivel de actividad). Este es un modelo interesante porque las neuronas magnocelulares no siguen el patrón de estimulación (un estímulo - una respuesta) sino que requieren de varios minutos de estimulación antes de disparar (Jiang and Wakerley, 1997). Un fenómeno semejante se ha observado en la corteza somatosensorial inmadura, cuyas neuronas requieren de que, por ejemplo, los bigotes se muevan por el experimentador durante varios minutos antes de responder al estímulo (Armstrong-James and Callahan, 1991). Así, utilizando el modelo de la lactancia pudimos mostrar que tanto la captura de glucosa radioactiva, como la actividad de las enzimas oxidativas y la densidad de

vascularización se incrementan como resultado del cambio en el patrón de actividad neuronal. Este resultado nos hace pensar que la actividad de citocromo oxidasa observada en los barriles quizás refleje cambios en el metabolismo oxidativo asociados con modificaciones en los patrones de activación, y no en los niveles de actividad, a su vez asociados con la estimulación pasiva y no al movimiento voluntario. Es evidente que estudios electrofisiológicos se requieren para evaluar con más detalle los méritos de esta idea.

El segundo aspecto relacionado con la actividad de citocromo oxidasa que requiere de explicación es la redistribución de la marca histoquímica en las neuronas corticales que se observa conforme el desarrollo avanza. A los 5DP, esta marca es somática y hacia el 15DP se detecta en los procesos dendríticos y en el neuropilo vecino. Para los 25DP, la marca histoquímica es intensa en el neuropilo. Si bien esta redistribución de la marca para citocromo oxidasa pudiera reflejar la redistribución y función de botones sinápticos a las que ya se hizo referencia anteriormente, es posible que también resulte de la multiplicación y redistribución de las mitocondrias en el citoplasma de las neuronas corticales. En apoyo a esta posibilidad, el trabajo colateral que realizamos en ratas lactantes mostró que en las neuronas magnocelulares y en la neurohipófisis –el sitio de terminación de sus axones – se incrementó la cantidad relativa de mitocondrias y se modificó su patrón de distribución (Uribe-Querol et al., 2005)

En conclusión, nuestro trabajo muestra que la vía tálamocortical somatosensorial se ensambla a través de un modelo de formación-eliminación y elongación concurrentes que conduce a un incremento de la complejidad dendrítica y axónica. Este mecanismo se acompaña de una estrategia aditiva para generar sinapsis en

la que, nos obstante la remodelación de dendritas y axones, la densidad sináptica aumenta con el tiempo. Proponemos además, que la fase inicial aditiva de ramas dendríticas y axónicas parece proceder de manera independiente de la actividad neuronal asociada con el uso, pero relacionarse con aquella debida la estimulación pasiva. La actividad neuronal asociada al uso parecería promover la remodelación de los árboles axónicos y dendríticos por medio de fenómenos de formación-eliminación concurrentes, además de reducir la tasa de sinaptogénesis a través de inducir la consolidación sináptica. Todos estos eventos probablemente se asocian a una redistribución de las mitocondrias en las neuronas corticales.



**Figura 9.- Modelos de diversas teorías de formación de conexiones neuronales.** A) Teoría seleccionista, B) Teoría constructivista y C) Propuesta de estrategia de formación-eliminación concurrentes con una posterior elongación y aumento en la complejidad neuronal.

## **Apéndice 1: Guía axonal y sinaptogénesis**

La formación de conexiones debe entenderse como un continuo, aunque se ha separado en etapas para su estudio. Dichas etapas son: la neurogénesis, la migración neuronal, la navegación, la guía axonal, y finalmente la sinaptogénesis. La formación de conexiones tiene lugar, dependiendo de la especie, durante el desarrollo prenatal y las primeras semanas o años de la vida postnatal.

Dentro de las etapas tempranas de la formación de conexiones se encuentra la transición del cono de crecimiento móvil en una sinapsis estable. El movimiento del cono de crecimiento depende de la dinámica de los componentes del citoesqueleto (e.g., la actina y los microtubulos) y su estabilización permite la formación de un botón presináptico. La guía axonal es una especialización del movimiento de las células en la cual una parte de la célula, el cono de crecimiento, es móvil. El cono de crecimiento expresa moléculas de adhesión celular que le permiten el movimiento y que modulan su adhesión a la matriz extracelular y a otras células. Además, el cono de crecimiento es guiado por moléculas de atracción y repulsión. Estas moléculas pueden ser difusibles (e.g. netrinas, semaforinas) o ancladas a las células (e.g. efrinas), y pueden promover el crecimiento, el colapso (i.e. repulsión) o estabilización (i.e. atracción) del cono de crecimiento, dependiendo de la expresión de los receptores específicos y de las respuestas celulares que estos receptores promuevan.

La estabilización inicia cuando los microtúbulos de los conos se doblan formando asas, y las proteínas asociadas a microtúbulos (MAP) establecen “amarres” entre ellos. La formación de las asas conlleva a una disminución de la movilidad del axón y a la formación de terminal (Schaefer and Nonet, 2001). Sherrington usó el

término sinapsis para expresar el efecto funcional del axón de una neurona sobre la dendrita de otra, pero no definió el área precisa de membrana responsable de dicho efecto. Con el microscopio electrónico, las especializaciones membranales se pudieron identificar tanto en la terminal presináptica como en la dendrita postsináptica y por ello la sinapsis vino a ser considerada con el área de dicha especialización membranal (Somogyi et al., 1998). La sinapsis es una conexión que transmite información que puede excitar o inhibir neuronas receptoras, siendo así la unidad estructural y funcional en la construcción de circuitos neuronales (Nieuwenhuys, 1994a; Shepherd, 2004). Al parecer, en algunas sinapsis, los componentes presinápticos llegan a la terminal en paquetes de transporte que podrían representar sinapsis prefabricadas, ya que contienen la maquinaria completa de secreción, antes de que el axón tenga contacto con el elemento postsináptico. Aún no es muy claro el papel de estos paquetes, pues en algunos casos son móviles (Nakata et al., 1998) y en otros son inmóviles (Ahmari et al., 2000) antes de que el axón llegue a su sitio blanco. Las vesículas sinápticas (VS) son otro componente de la presinapsis. Entre las proteínas que se encuentran en las VS se encuentra la sinaptofisina, la cual ha sido ampliamente utilizada como marcador presináptico (Kelly, 1991).

La presinapsis tiene una contraparte que es la postsinapsis, esta se encuentra en las dendritas o el soma de las neuronas blanco. En la postsinapsis existe una zona específica que es la densidad postsináptica. En ella se localizan proteínas como la PSD-95 y la Shank que se encargan de reclutar, entre otras proteínas, a los canales de potasio y a los receptores que unen glutamato denominados de N-metil-D-Aspartato (NMDA) y AMPA. La unión entre los elementos pre y

postsinápticos constituyen una sinapsis, y recientemente se ha mostrado que la presencia del complejo neurexina-neuroligina es muy importante durante la sinaptogénesis y son el interruptor para establecer una sinapsis (Scheiffele et al., 2000). Las neuroliginas son moléculas transmembranales de adhesión celular heterofílicas que se unen a las  $\beta$ -neurexinas.

Los componentes de la pre y postsinapsis se expresan de manera temporal, este hecho puede permitir conocer el grado de madurez de una sinapsis. Por ejemplo, la proteína Basson se expresa en presinapsis inmaduras mientras que la PSD-95 no. Las subunidades GluR1 y NR1 tienden también a estar ausentes en sinapsis inmaduras (Friedman et al., 2000).

En el caso de las sinapsis inhibitorias en lugar de tener un reclutamiento de receptores a glutamato se tiene un reclutamiento de receptores a glicina o GABA, anclados a la PSD por la gefirina, misma que se ancla a microtúbulos.

Los mecanismos moleculares precisos de ensamblaje aún se desconocen, mucha evidencia es resultado de estudios en la placa neuromuscular y en células en cultivo, y no se pueden extrapolar a todas las áreas del sistema nervioso. Además, dependiendo de si la sinapsis es central o periférica, las proteínas y su expresión temporal difieren durante las fases de sinaptogénesis.

## **Apéndice II: Corticogénesis**

El desarrollo del sistema nervioso se inicia con la inducción neural en donde determinadas regiones del ectodermo se especifican como neuroepitelio. Este neuroepitelio da origen al tubo neural que por proliferación diferencial genera tres vesículas: el prosencéfalo, el mesencéfalo y el rombencéfalo. El prosencéfalo genera a su vez al telencéfalo y al diencefalo y el rombencéfalo genera al metencéfalo y el mielencéfalo. La neocorteza deriva de la región dorsolateral de las vesículas telencefálicas. En la rata, desde el día 13 embrionario (E13) la pared del telencéfalo pierde su homogeneidad y la laminación fetal empieza (Kolb and Tees, 1990). En E13 el primordio plexiforme se empieza a formar en la parte más lateral de la pared neural del telencéfalo. Dentro de las células que componen el primordio plexiforme se encuentran las Cajal-Retzius que son generadas entre los días E11 y E15, teniendo el pico máximo de proliferación en E13. Entre los días E15 y E16, la neocorteza está básicamente formada por el neuroepitelio que se encuentra en alta actividad mitótica para generar 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. Asimismo, en este rango de edad se distinguen algunas de las primeras neuronas diferenciadas que formarán la placa cortical. El primordio plexiforme se separa en dos zonas: la zona marginal y la subplaca por la formación de la placa cortical entre E15 y E17. Para los días E17 y E18, las paredes de la corteza se han engrosado al aumentar el número de neuronas jóvenes en la placa cortical (Killackey et al., 1983). 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 E18 y E19 el grosor del neuroepitelio está muy reducido en comparación con estadios previos, 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 calloso. Finalmente, entre los días E20 y E21 el neuroepitelio se ha adelgazado considerablemente y su actividad mitótica 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 calloso, por debajo de los hemisferios cerebrales, forma ya una estructura claramente distinguible, al igual que la cápsula interna. Al nacimiento la corteza ha adquirido su plan anatómico general y empieza a diferenciarse hacia su forma adulta (Kolb and Tees, 1990; Bayer and Altman, 1991; Bayer et al., 1991).

La corteza está constituida por 6 capas o láminas como resultado de la migración predominantemente radial de los neuroblastos de acuerdo con el patrón de organización minicolumnar, de acuerdo con el gradiente de “adentro hacia fuera”. Es decir que la primera capa en formarse es la 6, luego la 5 y así sucesivamente. De la superficie a la zona ventricular se distinguen: la capa molecular (I, contiene células con axones horizontales y células de Golgi tipo II), la capa granulosa externa (II, formada por células granulares, piramidales pequeñas), la capa



piramidal (III compuesta por dos capas de células piramidales), la capa granular interna (IV, formada por células estrelladas espinosas e interneuronas), la capa piramidal interna (V, constituida primordialmente por neuronas piramidales medianas y grandes, cuyas dendritas apicales ascienden hasta la capa molecular y sus axones salen principalmente como fibras de proyección) y la capa multiforme (VI, que posee neuronas fusiformes cuyos largos axones son perpendiculares a la superficie cortical). La estructura laminada de la corteza se establece con base en el patrón de migración de células neuronales. Una vez que se establecen las neuronas en las distintas capas se forman los circuitos. Los circuitos locales de la neocorteza se separan en dos categorías: verticales y horizontales. Los circuitos verticales son conexiones que unen a las neuronas de diferentes capas unas con otras. Estas conexiones son la base de las columnas corticales. Los circuitos horizontales se presentan entre células de la misma capa. Las conexiones verticales se desarrollan a través de patrones específicos de crecimiento, que probablemente estén basados en moléculas específicas para cada capa, mientras que las horizontales poseen una remodelación tanto estructural como funcional, bajo la influencia de la actividad neuronal para llegar a los patrones del adulto.

### **Aferencias Corticales**

Existen dos tipos generales de vías aferentes a la neocorteza, las denominadas cortico corticales e intracorticales, y las interhemisféricas e intrahemisféricas. Estas aferencias relacionan estructural y funcionalmente áreas homólogas y heterólogas a lo largo del mismo hemisferio o entre ambos hemisferios cerebrales,

respectivamente (Woolsey and Van der Loos, 1970; Killackey and Belford, 1979; Nieuwenhuys, 1994a).

Existen 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, ventro posteromedial y ventro posterolateral), 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 (Woolsey and Van der Loos, 1970; Killackey and Belford, 1979). Otras vías aferentes corticales provienen de los núcleos del rafe dorsal y del locus coeruleus, localizados en la sustancia gris periacueductal del tallo cerebral (Kolb and Tees, 1990).

Los axones talamocorticales se caracterizan por tener una especificidad laminar. Durante el desarrollo los axones talamocorticales sensoriales viajan por la cápsula interna y la zona intermedia hasta alcanzar la placa cortical. Después, estas fibras pasan a través de las láminas más profundas de la corteza para formar árboles en la capa IV y hacen conexiones. (Lund and Mustari, 1977; Wise and Jones, 1978; Catalano et al., 1991; Ghosh and Shatz, 1992; Agmon et al., 1993; Catalano et al., 1996; Molnar et al., 1998).

Las terminaciones talamocorticales se segregan en dos sitios, en una zona inferior difusa entre la capa V y la capa VI y una densa capa en la zona de la capa IV y el nivel bajo de la capa III (Caviness and Frost, 1980; Frost and Caviness, 1980; Herkenham, 1980) En la capa IV las arborizaciones de los axones talamocorticales se organizan en grupos o glomérulos denominados así por Lorente de Nó, cada glomérulo se localiza en el centro de un agregado de células o barril (Woolsey and Van der Loos, 1970).

### **Eferencias Corticales**

Las distintas regiones de la corteza cerebral envían proyecciones a una gran variedad de estructuras subcorticales. Las cortezas sensoriales primarias establecen contactos recíprocos con cada uno de los núcleos talámicos de los que reciben aferencias (i.e., eferentes corticotalámicas). Asimismo, existen vías eferentes corticales que llegan a los ganglios basales y a 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 corticoespinal, responsable de enviar información que permite la ejecución de los movimientos voluntarios (Nieuwenhuys, 1994b).

## Bibliografía

- Agmon A, Yang LT, O'Dowd DK, Jones EG (1993) Organized growth of thalamocortical axons from the deep tier of terminations into layer IV of developing mouse barrel cortex. *J Neurosci* 13:5365-5382.
- Agmon A, Yang LT, Jones EG, O'Dowd DK (1995) Topological precision in the thalamic projection to neonatal mouse barrel cortex. *J Neurosci* 15:549-561.
- Aguilar CE, Bisby MA, Cooper E, Diamond J (1973) Evidence that axoplasmic transport of trophic factors is involved in the regulation of peripheral nerve fields in salamanders. *J Physiol* 234:449-464.
- Ahmari SE, Buchanan J, Smith SJ (2000) Assembly of presynaptic active zones from cytoplasmic transport packets. *Nat Neurosci* 3:445-451.
- Armstrong-James M, Callahan CA (1991) Thalamo-cortical processing of vibrissal information in the rat. II. spatiotemporal convergence in the thalamic ventroposterior medial nucleus (VPM) and its relevance to generation of receptive fields of S1 cortical "barrel" neurones. *J Comp Neurol* 303:211-224.
- Balice-Gordon RJ, Chua CK, Nelson CC, Lichtman JW (1993) Gradual loss of synaptic cartels precedes axon withdrawal at developing neuromuscular junctions. *Neuron* 11:801-815.
- Bayer SA, Altman J (1991) Development of the endopiriform nucleus and the claustrum in the rat brain. *Neuroscience* 45:391-412.
- Bayer SA, Altman J, Russo RJ, Dai XF, Simmons JA (1991) Cell migration in the rat embryonic neocortex. *J Comp Neurol* 307:499-516.
- Bayraktar T, Welker E, Freund TF, Zilles K, Staiger JF (2000) Neurons immunoreactive for vasoactive intestinal polypeptide in the rat primary somatosensory cortex: morphology and spatial relationship to barrel-related columns. *J Comp Neurol* 420:291-304.
- Belford GR, Killackey HP (1979) The development of vibrissae representation in subcortical trigeminal centers of the neonatal rat. *J Comp Neurol* 188:63-74.
- Bennett MR (1983) Development of neuromuscular synapses. *Physiol Rev* 63:915-1048.
- Berry M, Bradley P (1976a) The growth of the dendritic trees of Purkinje cells in the cerebellum of the rat. *Brain Res* 112:1-35.
- Berry M, Bradley P (1976b) The growth of the dendritic trees of Purkinje cells in irradiated agranular cerebellar cortex. *Brain Res* 116:361-387.
- Bloom FE (1994) *Neuroscience: from the molecular to the cognitive*. Amsterdam; London: Elsevier.
- Bonhoeffer T (1996) Neurotrophins and activity-dependent development of the neocortex. *Curr Opin Neurobiol* 6:119-126.
- Bourgeois JP (1997) Synaptogenesis, heterochrony and epigenesis in the mammalian neocortex. *Acta Paediatr Suppl* 422:27-33.
- Bourgeois JP, Jastreboff PJ, Rakic P (1989) Synaptogenesis in visual cortex of normal and preterm monkeys: evidence for intrinsic regulation of synaptic overproduction. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86:4297-4301.
- Calikoglu AS, Gutierrez-Ospina G, D'Ercole AJ (1996) Congenital hypothyroidism delays the formation and retards the growth of the mouse primary somatic sensory cortex (S1). *Neurosci Lett* 213:132-136.
- Catalano SM, Robertson RT, Killackey HP (1991) Early ingrowth of thalamocortical afferents to the neocortex of the prenatal rat. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88:2999-3003.

- Catalano SM, Robertson RT, Killackey HP (1996) Individual axon morphology and thalamocortical topography in developing rat somatosensory cortex. *J Comp Neurol* 367:36-53.
- Caviness VS, Jr., Frost DO (1980) Tangential organization of thalamic projections to the neocortex in the mouse. *J Comp Neurol* 194:335-367.
- Changeux JP, Danchin A (1976) Selective stabilisation of developing synapses as a mechanism for the specification of neuronal networks. *Nature* 264:705-712.
- Chen C, Regehr WG (2000) Developmental remodeling of the retinogeniculate synapse. *Neuron* 28:955-966.
- Chiaia NL, Zhang S, King TD, Rhoades RW (1994) Evidence for prenatal competition among the central arbors of trigeminal primary afferent neurons: single axon analysis. *J Comp Neurol* 345:303-313.
- Chiaia NL, Bennett-Clarke CA, Eck M, White FA, Crissman RS, Rhoades RW (1992) Evidence for prenatal competition among the central arbors of trigeminal primary afferent neurons. *J Neurosci* 12:62-76.
- Chmielowska J, Stewart MG, Bourne RC, Hamori J (1986) gamma-Aminobutyric acid immunoreactivity in mouse barrel field: a light microscopical study. *Brain Res* 368:371-374.
- Connold AL, Evers JV, Vrbova G (1986) Effect of low calcium and protease inhibitors on synapse elimination during postnatal development in the rat soleus muscle. *Brain Res* 393:99-107.
- Connor EA, Qin K, Yankelev H, DeStefano D (1994) Synaptic activity and connective tissue remodeling in denervated frog muscle. *J Cell Biol* 127:1435-1445.
- Cowan WM, Jessell TM, Zipursky SL (1997) Molecular and cellular approaches to neural development. New York; Oxford: Oxford University Press.
- Craig AM, Banker G, Chang W, McGrath ME, Serpinskaya AS (1996) Clustering of gephyrin at GABAergic but not glutamatergic synapses in cultured rat hippocampal neurons. *J Neurosci* 16:3166-3177.
- Crick F (1994) *The astonishing hypothesis: the scientific search for the soul*. New York: Scribner.
- Crowley JC, Katz LC (2000) Early development of ocular dominance columns. *Science* 290:1321-1324.
- Crowley JC, Katz LC (2002) Ocular dominance development revisited. *Curr Opin Neurobiol* 12:104-109.
- Culican SM, Nelson CC, Lichtman JW (1998) Axon withdrawal during synapse elimination at the neuromuscular junction is accompanied by disassembly of the postsynaptic specialization and withdrawal of Schwann cell processes. *J Neurosci* 18:4953-4965.
- Curcio CA, Hinds JW (1983) Stability of synaptic density and spine volume in dentate gyrus of aged rats. *Neurobiol Aging* 4:77-87.
- Dailey ME, Smith SJ (1996) The dynamics of dendritic structure in developing hippocampal slices. *J Neurosci* 16:2983-2994.
- Dehmelt L, Halpain S (2005) The MAP2/Tau family of microtubule-associated proteins. *Genome Biol* 6:204.
- Diez-Guerra FJ, Avila J (1993) MAP2 phosphorylation parallels dendrite arborization in hippocampal neurones in culture. *Neuroreport* 4:419-422.
- Feldman DE, Nicoll RA, Malenka RC (1999) Synaptic plasticity at thalamocortical synapses in developing rat somatosensory cortex: LTP, LTD, and silent synapses. *J Neurobiol* 41:92-101.

- Friedman HV, Bresler T, Garner CC, Ziv NE (2000) Assembly of new individual excitatory synapses: time course and temporal order of synaptic molecule recruitment. *Neuron* 27:57-69.
- Frost DO, Caviness VS, Jr. (1980) Radial organization of thalamic projections to the neocortex in the mouse. *J Comp Neurol* 194:369-393.
- Frotscher M, Heimrich B (1993) Formation of layer-specific fiber projections to the hippocampus in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:10400-10403.
- Garey LJ, Saini KD (1981) Golgi studies of the normal development of neurons in the lateral geniculate nucleus of the monkey. *Exp Brain Res* 44:117-128.
- Ghosh A, Shatz CJ (1992) Involvement of subplate neurons in the formation of ocular dominance columns. *Science* 255:1441-1443.
- Greenough WT, Chang FL (1988) Dendritic pattern formation involves both oriented regression and oriented growth in the barrels of mouse somatosensory cortex. *Brain Res* 471:148-152.
- Gutierrez-Ospina G, Calikoglu AS, 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.
- Hajos F, Zilles K, Zsarnovszky A, Sotonyi P, Gallatz K, Schleicher A (1998) Modular distribution of vasoactive intestinal polypeptide in the rat barrel cortex: changes induced by neonatal removal of vibrissae. *Neuroscience* 85:45-52.
- Haydon PG, Zoran MJ (1994) Retrograde regulation of presynaptic development during synaptogenesis. *J Neurobiol* 25:694-706.
- Herkenham M (1980) Laminar organization of thalamic projections to the rat neocortex. *Science* 207:532-535.
- Hua JY, Smith SJ (2004) Neural activity and the dynamics of central nervous system development. *Nat Neurosci* 7:327-332.
- Hubel DH, LeVay S, Wiesel TN (1975) Mode of termination of retinotectal fibers in macaque monkey: an autoradiographic study. *Brain Res* 96:25-40.
- Hubel DH, Wiesel TN, LeVay S (1976) Functional architecture of area 17 in normal and monocularly deprived macaque monkeys. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 40:581-589.
- Hubel DH, Wiesel TN, LeVay S (1977) Plasticity of ocular dominance columns in monkey striate cortex. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 278:377-409.
- Ishibashi H (2002) Increased synaptophysin expression through whisker stimulation in rat. *Cell Mol Neurobiol* 22:191-195.
- Issa NP, Trachtenberg JT, Chapman B, Zahs KR, Stryker MP (1999) The critical period for ocular dominance plasticity in the Ferret's visual cortex. *J Neurosci* 19:6965-6978.
- Itami C, Kimura F, Kohno T, Matsuoka M, Ichikawa M, Tsumoto T, Nakamura S (2003) Brain-derived neurotrophic factor-dependent unmasking of "silent" synapses in the developing mouse barrel cortex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:13069-13074.
- Jacobson M (1991a) Formation of dendrites and development of synaptic connections. In: *Developmental neurobiology*, pp 223-283. New York; London: Plenum.
- Jacobson M (1991b) *Developmental neurobiology*, 3rd Edition. New York; London: Plenum.
- Jacobson M (1993) *Foundations of neuroscience*. New York: Plenum Press.
- Jiang Q, Wakerley JB (1997) The milk-ejection reflex in the peri-partum rat: effects of oestradiol and progesterone on basal milk-ejection frequency and the facilitatory response to central oxytocin. *J Neuroendocrinol* 9:9-16.
- Jontes JD, Smith SJ (2000) Filopodia, spines, and the generation of synaptic diversity. *Neuron* 27:11-14.

- Jontes JD, Buchanan J, Smith SJ (2000) Growth cone and dendrite dynamics in zebrafish embryos: early events in synaptogenesis imaged in vivo. *Nat Neurosci* 3:231-237.
- Kalb RG (1994) Regulation of motor neuron dendrite growth by NMDA receptor activation. *Development* 120:3063-3071.
- Kasowski HJ, Kim H, Greer CA (1999) Compartmental organization of the olfactory bulb glomerulus. *J Comp Neurol* 407:261-274.
- Katz LC, Shatz CJ (1996) Synaptic activity and the construction of cortical circuits. *Science* 274:1133-1138.
- Keller-Peck CR, Walsh MK, Gan WB, Feng G, Sanes JR, Lichtman JW (2001) Asynchronous synapse elimination in neonatal motor units: studies using GFP transgenic mice. *Neuron* 31:381-394.
- Kelly RB (1991) Secretory granule and synaptic vesicle formation. *Curr Opin Cell Biol* 3:654-660.
- Kesterson KL, Lane RD, Rhoades RW (2002) Effects of elevated serotonin levels on patterns of GAP-43 expression during barrel development in rat somatosensory cortex. *Brain Res Dev Brain Res* 139:167-174.
- Killackey HP, Belford GR (1979) The formation of afferent patterns in the somatosensory cortex of the neonatal rat. *J Comp Neurol* 183:285-303.
- Killackey HP, Gould HJ, 3rd, Cusick CG, Pons TP, Kaas JH (1983) The relation of corpus callosum connections to architectonic fields and body surface maps in sensorimotor cortex of new and old world monkeys. *J Comp Neurol* 219:384-419.
- Klenoff JR, Greer CA (1998) Postnatal development of olfactory receptor cell axonal arbors. *J Comp Neurol* 390:256-267.
- Kolb B, Tees RC (1990) *The cerebral cortex of the rat*. Cambridge, Mass.: MIT Press.
- Kramer AP, Kuwada JY (1983) Formation of the receptive fields of leech mechanosensory neurons during embryonic development. *J Neurosci* 3:2474-2486.
- LaMantia AS, Purves D (1989) Development of glomerular pattern visualized in the olfactory bulbs of living mice. *Nature* 341:646-649.
- Landers MS, Sullivan RM (1999) Vibrissae-evoked behavior and conditioning before functional ontogeny of the somatosensory vibrissae cortex. *J Neurosci* 19:5131-5137.
- Lee WC, Huang H, Feng G, Sanes JR, Brown EN, So PT, Nedivi E (2006) Dynamic remodeling of dendritic arbors in GABAergic interneurons of adult visual cortex. *PLoS Biol* 4:e29.
- Lendvai B, Stern EA, Chen B, Svoboda K (2000) Experience-dependent plasticity of dendritic spines in the developing rat barrel cortex in vivo. *Nature* 404:876-881.
- Lent R, Guimaraes RZ (1990) Development of interhemispheric connections through the anterior commissure in hamsters. *Braz J Med Biol Res* 23:671-675.
- Lent R, Guimaraes RZ (1991) Development of paleocortical projections through the anterior commissure of hamsters adopts progressive, not regressive, strategies. *J Neurobiol* 22:475-498.
- Lichtman JW (1977) The reorganization of synaptic connexions in the rat submandibular ganglion during post-natal development. *J Physiol* 273:155-177.
- Lichtman JW, Colman H (2000) Synapse elimination and indelible memory. *Neuron* 25:269-278.
- Loughlin SE, Fallon JH (1993) *Neurotrophic factors*. San Diego: Academic Press.
- Lund JS, Boothe RG, Lund RD (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 Neurol* 176:149-188.

- Lund RD, Mustari MJ (1977) Development of the geniculocortical pathway in rats. *J Comp Neurol* 173:289-306.
- Lush ME, Ma L, Parada LF (2005) TrkB signaling regulates the developmental maturation of the somatosensory cortex. *Int J Dev Neurosci* 23:523-536.
- Mandelbrot BB (1983) *The fractal geometry of nature*. San Francisco: W.H. Freeman.
- Meissirel C, Wikler KC, Chalupa LM, Rakic P (1997) Early divergence of magnocellular and parvocellular functional subsystems in the embryonic primate visual system. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:5900-5905.
- Micheva KD, Beaulieu C (1996) Quantitative aspects of synaptogenesis in the rat barrel field cortex with special reference to GABA circuitry. *J Comp Neurol* 373:340-354.
- Micheva KD, Beaulieu C (1997) Development and plasticity of the inhibitory neocortical circuitry with an emphasis on the rodent barrel field cortex: a review. *Can J Physiol Pharmacol* 75:470-478.
- Mierau SB, Meredith RM, Upton AL, Paulsen O (2004) Dissociation of experience-dependent and -independent changes in excitatory synaptic transmission during development of barrel cortex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:15518-15523.
- Molnar Z, Adams R, Blakemore C (1998) Mechanisms underlying the early establishment of thalamocortical connections in the rat. *J Neurosci* 18:5723-5745.
- Mombaerts P, Wang F, Dulac C, Chao SK, Nemes A, Mendelsohn M, Edmondson J, Axel R (1996) Visualizing an olfactory sensory map. *Cell* 87:675-686.
- Naisbitt S, Kim E, Tu JC, Xiao B, Sala C, Valtschanoff J, Weinberg RJ, Worley PF, Sheng M (1999) Shank, a novel family of postsynaptic density proteins that binds to the NMDA receptor/PSD-95/GKAP complex and cortactin. *Neuron* 23:569-582.
- Nakata T, Terada S, Hirokawa N (1998) Visualization of the dynamics of synaptic vesicle and plasma membrane proteins in living axons. *J Cell Biol* 140:659-674.
- Nicholls JG (2001) *From neuron to brain*, 4th Edition. Sunderland, Mass.: Sinauer Associates.
- Niell CM, Smith SJ (2005) Functional imaging reveals rapid development of visual response properties in the zebrafish tectum. *Neuron* 45:941-951.
- Nieto-Sampedro M, Bussineau CM, Cotman CW (1982) Isolation, morphology, and protein and glycoprotein composition of synaptic junctional fractions from the brain of lower vertebrates: antigen PSD-95 as a junctional marker. *J Neurosci* 2:722-734.
- Nieuwenhuys R (1994a) The neocortex. An overview of its evolutionary development, structural organization and synaptology. *Anat Embryol (Berl)* 190:307-337.
- Nieuwenhuys R (1994b) Comparative neuroanatomy: place, principles, practice and programme. *Eur J Morphol* 32:142-155.
- O'Leary DD, Heffner CD, Kutka L, Lopez-Mascaraque L, Missias A, Reinoso BS (1991) A target-derived chemoattractant controls the development of the corticopontine projection by a novel mechanism of axon targeting. *Development Suppl* 2:123-130.
- Okabe S, Miwa A, Okado H (2001) Spine formation and correlated assembly of presynaptic and postsynaptic molecules. *J Neurosci* 21:6105-6114.
- Opris I, Bruce CJ (2005) Neural circuitry of judgment and decision mechanisms. *Brain Res Brain Res Rev* 48:509-526.
- Parnavelas JG, Uylings HB (1980) The growth of non-pyramidal neurons in the visual cortex of the rat: a morphometric study. *Brain Res* 193:373-382.
- Petit TL, LeBoutillier JC, Gregorio A, Libstug H (1988) The pattern of dendritic development in the cerebral cortex of the rat. *Brain Res* 469:209-219.



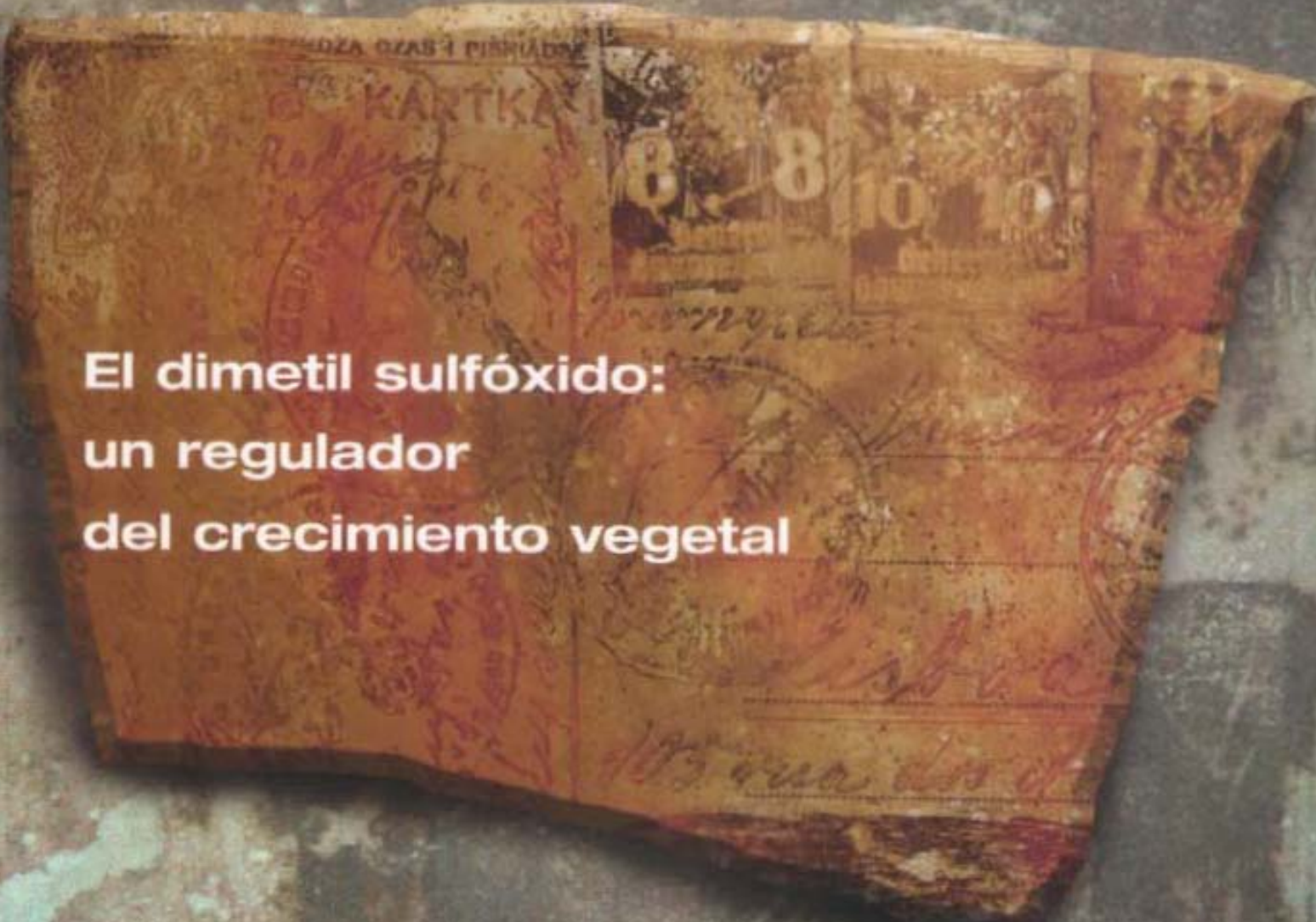
- Petzold A (2005) Neurofilament phosphoforms: surrogate markers for axonal injury, degeneration and loss. *J Neurol Sci* 233:183-198.
- Purves D, Lichtman JW (1980) Elimination of synapses in the developing nervous system. *Science* 210:153-157.
- Purves D, LaMantia AS (1990) Construction of modular circuits in the mammalian brain. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 55:445-452.
- Purves D, LaMantia A (1993) Development of blobs in the visual cortex of macaques. *J Comp Neurol* 334:169-175.
- Purves D, Purves D, Augustine GJ, Fitzpatrick D (2004) *Neuroscience*, 3rd Edition. Sunderland, Mass.: Sinauer Associates.
- Quartz SR, Sejnowski TJ (1997) The neural basis of cognitive development: a constructivist manifesto. *Behav Brain Sci* 20:537-556; discussion 556-596.
- Rakic P (1972) Extrinsic cytological determinants of basket and stellate cell dendritic pattern in the cerebellar molecular layer. *J Comp Neurol* 146:335-354.
- Rakic P, Riley KP (1983) Overproduction and elimination of retinal axons in the fetal rhesus monkey. *Science* 219:1441-1444.
- Ramoza AS, Campbell G, Shatz CJ (1988) Dendritic growth and remodeling of cat retinal ganglion cells during fetal and postnatal development. *J Neurosci* 8:4239-4261.
- Ramón y Cajal S, Castro y Pascual Fd (1933) *Elementos de técnica micrográfica del sistema nervioso*. Madrid: Tipografía artística.
- Reese D, Drapeau P (1998) Neurite growth patterns leading to functional synapses in an identified embryonic neuron. *J Neurosci* 18:5652-5662.
- Rich MM, Lichtman JW (1989) In vivo visualization of pre- and postsynaptic changes during synapse elimination in reinnervated mouse muscle. *J Neurosci* 9:1781-1805.
- Riddle DR, Gutierrez G, Zheng D, White LE, Richards A, Purves D (1993) Differential metabolic and electrical activity in the somatic sensory cortex of juvenile and adult rats. *J Neurosci* 13:4193-4213.
- Riederer B, Matus A (1985) Differential expression of distinct microtubule-associated proteins during brain development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 82:6006-6009.
- Romorini S, Piccoli G, Jiang M, Grossano P, Tonna N, Passafaro M, Zhang M, Sala C (2004) A functional role of postsynaptic density-95-guanylate kinase-associated protein complex in regulating Shank assembly and stability to synapses. *J Neurosci* 24:9391-9404.
- Ruthazer ES, Baker GE, Stryker MP (1999) Development and organization of ocular dominance bands in primary visual cortex of the sable ferret. *J Comp Neurol* 407:151-165.
- Schaefer AM, Nonet ML (2001) Cellular and molecular insights into presynaptic assembly. *Curr Opin Neurobiol* 11:127-134.
- Schagger H, von Jagow G (1987) Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal Biochem* 166:368-379.
- Scheiffele P, Fan J, Choih J, Fetter R, Serafini T (2000) Neuroligin expressed in nonneuronal cells triggers presynaptic development in contacting axons. *Cell* 101:657-669.
- Schlaggar BL, O'Leary DD (1994) Early development of the somatotopic map and barrel patterning in rat somatosensory cortex. *J Comp Neurol* 346:80-96.
- Senft SL, Woolsey TA (1991) Growth of thalamic afferents into mouse barrel cortex. *Cereb Cortex* 1:308-335.

- Sharma K, Korade Z, Frank E (1994) Development of specific muscle and cutaneous sensory projections in cultured segments of spinal cord. *Development* 120:1315-1323.
- Shatz CJ (1983) The prenatal development of the cat's retinogeniculate pathway. *J Neurosci* 3:482-499.
- Shepherd GM (2004) *The synaptic organization of the brain*, 5th Edition. Oxford; New York: Oxford University Press.
- Silos-Santiago I, Jeng B, Snider WD (1995) Sensory afferents show appropriate somatotopy at the earliest stage of projection to dorsal horn. *Neuroreport* 6:861-865.
- Skibinska A, Lech M, Kossut M (2001) PSD95 protein level rises in murine somatosensory cortex after sensory training. *Neuroreport* 12:2907-2910.
- Smith DS, Skene JH (1997) A transcription-dependent switch controls competence of adult neurons for distinct modes of axon growth. *J Neurosci* 17:646-658.
- Somogyi P, Tamas G, Lujan R, Buhl EH (1998) Salient features of synaptic organisation in the cerebral cortex. *Brain Res Brain Res Rev* 26:113-135.
- Strominger RN, Woolsey TA (1987) Templates for locating the whisker area in fresh flattened mouse and rat cortex. *J Neurosci Methods* 22:113-118.
- Tenne-Brown J, Key B (1999) Errors in lamina growth of primary olfactory axons in the rat and mouse olfactory bulb. *J Comp Neurol* 410:20-30.
- Thiel G (1993) Synapsin I, synapsin II, and synaptophysin: marker proteins of synaptic vesicles. *Brain Pathol* 3:87-95.
- Treloar HB, Purcell AL, Greer CA (1999) Glomerular formation in the developing rat olfactory bulb. *J Comp Neurol* 413:289-304.
- Treloar HB, Feinstein P, Mombaerts P, Greer CA (2002) Specificity of glomerular targeting by olfactory sensory axons. *J Neurosci* 22:2469-2477.
- Uribe-Querol E, Martinez-Martinez E, Tapia-Rodriguez M, Hernandez LR, Toscano-Marquez B, Padilla P, Gutierrez-Ospina G (2005) Metabolic indices shift in the hypothalamic-neurohypophysial system during lactation: implications for interpreting their relationship with neuronal activity. *Neuroscience* 134:1217-1222.
- Vassar R, Chao SK, Sitcheran R, Nunez JM, Vosshall LB, Axel R (1994) Topographic organization of sensory projections to the olfactory bulb. *Cell* 79:981-991.
- Vaughn JE, Barber RP, Sims TJ (1988) Dendritic development and preferential growth into synaptogenic fields: a quantitative study of Golgi-impregnated spinal motor neurons. *Synapse* 2:69-78.
- Vitalis T, Cases O, Gillies K, Hanoun N, Hamon M, Seif I, Gaspar P, Kind P, Price DJ (2002) Interactions between TrkB signaling and serotonin excess in the developing murine somatosensory cortex: a role in tangential and radial organization of thalamocortical axons. *J Neurosci* 22:4987-5000.
- Voutsinos-Porche B, Knott G, Tanaka K, Quairiaux C, Welker E, Bonvento G (2003) Glial glutamate transporters and maturation of the mouse somatosensory cortex. *Cereb Cortex* 13:1110-1121.
- Walsh MK, Lichtman JW (2003) In vivo time-lapse imaging of synaptic takeover associated with naturally occurring synapse elimination. *Neuron* 37:67-73.
- Wang H, Macagno ER (1997) The establishment of peripheral sensory arbors in the leech: in vivo time-lapse studies reveal a highly dynamic process. *J Neurosci* 17:2408-2419.
- Welker WI (1964) Analysis of sniffing of the albino rat. *Behavior* 12:223-244.
- White EL (1976) Ultrastructure and synaptic contacts in barrels of mouse SI cortex. *Brain Res* 105:229-251.

- White EL, Keller A (1987) Intrinsic circuitry involving the local axon collaterals of corticothalamic projection cells in mouse Sml cortex. *J Comp Neurol* 262:13-26.
- White EL, Weinfeld L, Lev DL (1997) A survey of morphogenesis during the early postnatal period in PMBSF barrels of mouse Sml cortex with emphasis on barrel D4. *Somatosens Mot Res* 14:34-55.
- Wiesel TN, Hubel DH (1963) Effects of visual deprivation on morphology and physiology of cells in the cats lateral geniculate body. *J Neurophysiol* 26:978-993.
- Wingate RJ, Thompson ID (1994) Targeting and activity-related dendritic modification in mammalian retinal ganglion cells. *J Neurosci* 14:6621-6637.
- Wise SP, Jones EG (1978) Developmental studies of thalamocortical and commissural connections in the rat somatic sensory cortex. *J Comp Neurol* 178:187-208.
- Wise SP, Fleshman JW, Jr., Jones EG (1979) Maturation of pyramidal cell form in relation to developing afferent and efferent connections of rat somatic sensory cortex. *Neuroscience* 4:1275-1297.
- Wong-Riley MT (1989) Cytochrome oxidase: an endogenous metabolic marker for neuronal activity. *Trends Neurosci* 12:94-101.
- Woolsey TA, Van der Loos H (1970) The structural organization of layer IV in the somatosensory region (SI) of mouse cerebral cortex. The description of a cortical field composed of discrete cytoarchitectonic units. *Brain Res* 17:205-242.
- Woolsey TA, Dierker ML, Wann DF (1975) Mouse Sml cortex: qualitative and quantitative classification of golgi-impregnated barrel neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 72:2165-2169.
- Zecevic N, Bourgeois JP, Rakic P (1989) Changes in synaptic density in motor cortex of rhesus monkey during fetal and postnatal life. *Brain Res Dev Brain Res* 50:11-32.
- Zheng D, Purves D (1995) Effects of increased neural activity on brain growth. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:1802-1806.
- Zilles K, Hajos F, Csillag A, Kalman M, Sotonyi P, Schleicher A (1993) Vasoactive intestinal polypeptide immunoreactive structures in the mouse barrel field. *Brain Res* 618:149-154.
- Ziv NE, Smith SJ (1996) Evidence for a role of dendritic filopodia in synaptogenesis and spine formation. *Neuron* 17:91-102.

# ciencia

Revista de la Academia Mexicana de Ciencias



**El dimetil sulfóxido:  
un regulador  
del crecimiento vegetal**

**Efectos de la estimulación temprana  
en el recién nacido**

**Transformación de la testosterona  
en el cerebro humano masculino**

## Regresión y reconstrucción: estrategias de formación de sinapsis en el cerebro en desarrollo



La sinaptogénesis es el proceso mediante el cual las neuronas forman conexiones durante el desarrollo del cerebro. Para ello, las neuronas emplean dos estrategias: la "regresiva" y la "construccionista", mismas que aquí se describen.

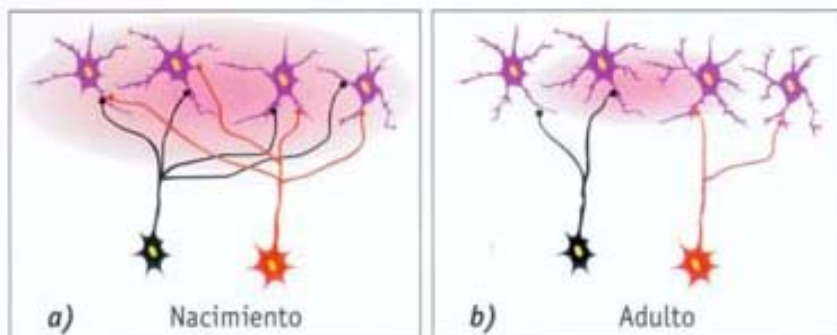
Gabriel Gutiérrez Ospina, Eileen Uribe Querol  
y Norma Sánchez Avendaño

**E**l cerebro está constituido, entre otros elementos, por cientos de miles de neuronas. Estas neuronas se relacionan entre sí a través de uniones especiales, denominadas *sinapsis*. Debido a que las sinapsis son utilizadas por las neuronas para comunicarse y transferir información, los neurobiólogos hemos dedicado mucho esfuerzo para tratar de entender cómo se forman, funcionan y modifican estas uniones interneuronales. En el presente trabajo, comentaremos específicamente las estrategias generales que parecen seguir las neuronas para establecer sinapsis durante el desarrollo del cerebro. A este proceso se le conoce como *sinaptogénesis*, y no debe ser confundido con los eventos celulares que ayudan a dirigir a las fibras nerviosas hacia su órgano blanco; esto último se conoce como *navegación axonal*.

### DESARROLLO CEREBRAL Y ELIMINACIÓN DE SINAPSIS

Durante el desarrollo cerebral, las neuronas emiten fibras en dirección a las regiones que inervarán (con las que formarán

conexiones), ayudándose de diferentes señales que guían su crecimiento (*navegación axonal*). Una vez alcanzado el territorio "blanco", estas fibras generan un número excesivo de sinapsis sobre las neuronas que se localizan en dicho territorio (*sinaptogénesis*). La sobreproducción de sinapsis es el resultado de una elevada concentración de moléculas llamadas factores de crecimiento, liberadas por las neuronas localizadas en el territorio invadido. Si este número de sinapsis persistiera hasta la vida adulta, la función del cerebro maduro se vería profundamente dificultada. Así, una vez alcanzada una densidad crítica de sinapsis, la producción de factores de crecimiento por las neuronas invadidas disminuye progresivamente, hasta alcanzar una concentración mínima que les permite retener el número de sinapsis que requieren para funcionar adecuadamente (figura 1). La



**Figura 1.** Esquema que ilustra los eventos sobresalientes que caracterizan al modelo regresivo para la formación de contactos sinápticos en el cerebro en desarrollo. **a)** En la fase inicial, un gran número de aferentes invaden el territorio blanco, y establecen contactos de manera difusa con las neuronas que en él se encuentran. Se supone que este comportamiento es inducido por el exceso de factores de crecimiento (sombreado rosa) en el territorio blanco. **b)** En etapas tardías del desarrollo, la disponibilidad de los factores de crecimiento en el territorio blanco disminuye. Esta situación conduce a una competencia entre las fibras y a la consiguiente consolidación o eliminación diferencial de las sinapsis.

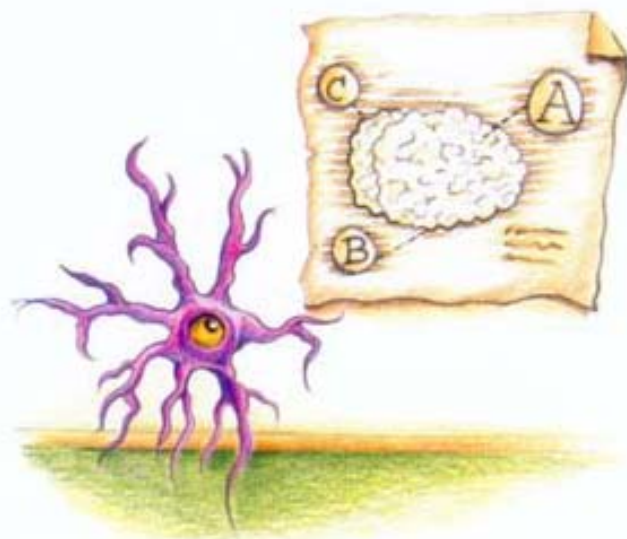
actividad neuronal parece jugar un papel fundamental en este proceso, pues la coincidencia espacio-temporal de los patrones de señales eléctricas entre la neurona que inerva y la que es inervada potencia la liberación y disponibilidad local de factores de crecimiento. Esto, a su vez, favorece la permanencia de algunas sinapsis y la eliminación de otras. A

lo largo de los años, se ha sugerido que la estrategia de eliminación sináptica es utilizada por distintos grupos de neuronas que establecen sinapsis con otros grupos neuronales localizados en la corteza cerebral, la médula espinal, el tálamo y el mesencéfalo, así como con las células que inervan los músculos que permiten el movimiento voluntario.

No obstante la gran aceptación que goza esta visión regresiva del desarrollo de las sinapsis entre los neurocientíficos, existe una serie de aspectos que son difíciles de conciliar con una imagen regresiva del desarrollo cerebral. Hay evidencia reciente que muestra que algunos factores de crecimiento, cuando están presentes en concentraciones fisiológicas, inducen la retracción selectiva de las prolongaciones neuronales, e incluso provocan la muerte neuronal. Se han documentado incrementos, en lugar de reducciones, en la disponibilidad de factores de crecimiento durante periodos en los que se supone que ocurre la eliminación de sinapsis. Por otro lado, aún no es claro si la mayor parte de los contactos que se establecen entre las neuronas en desarrollo constituyen realmente sinapsis, pues muchos de ellos carecen de los marcadores moleculares y estructurales que las caracterizan.

La eliminación sináptica tampoco parece ser compatible con el incremento, a lo largo del desarrollo, del tamaño de las neuronas y la complejidad de los circuitos neuronales. Finalmente, estudios sobre los mecanismos de la memoria y el aprendizaje indican que ambos procesos ocurren en paralelo a la formación de nuevas sinapsis en el cerebro. Esta observación es contraintuitiva si uno asume que los circuitos neuronales se forman como resultado de la eliminación de sinapsis durante el desarrollo del cerebro. De hecho, es precisamente durante el desarrollo que el individuo aprende y memoriza la mayor parte de la información que le será necesaria para conducir

en su entorno.



## EL DESARROLLO DEL CEREBRO Y LA CONSTRUCCIÓN SINÁPTICA

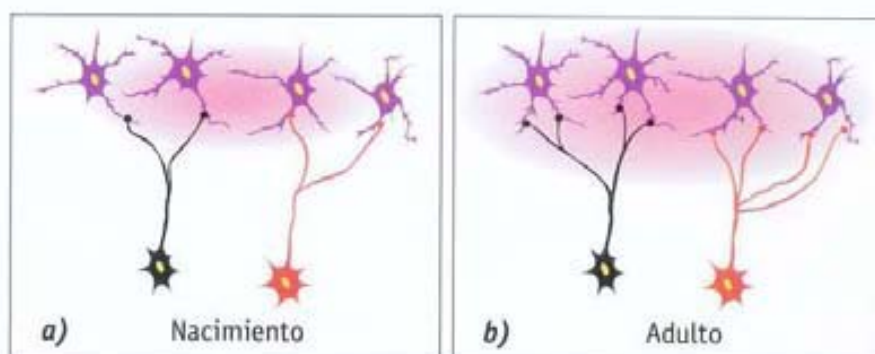
A finales del siglo pasado, distintos grupos de investigación, entre ellos el nuestro, aportaron evidencia que muestra que las neuronas forman sinapsis durante el desarrollo cerebral siguiendo una estrategia diferente a la regresión sináptica. La premisa básica de esta "nueva" estrategia es que las neuronas establecen sinapsis de manera puntual, precisa y progresiva (figura 2). Así, los circuitos neuronales aumentan su complejidad a lo largo del desarrollo a través de un proceso de adición de sinapsis. Nosotros hemos mostrado que esta generación selectiva y progresiva de sinapsis depende de la disponibilidad creciente de factores de crecimiento a lo largo del desarrollo. Así, en esta concepción "construccionista" de la formación de la circuitería cerebral, la eliminación de sinapsis jugaría un papel menor en la modelación de los circuitos neuronales. Efectivamente, si existe un incremento controlado y paulatino en la disponibilidad local de factores de crecimiento, el elemento que induce la eliminación sináptica (la reducción del acceso a factores de crecimiento) queda cancelado. Algunos ejemplos de grupos de neuronas que parecen seguir la estrategia "construccionista" se localizan en los ganglios periféricos sensoriales, la corteza cerebral, algunos núcleos talámicos y los bulbos olfatorios.

Una de las interrogantes que surgen con relación al reconocimiento de la existencia de la estrategia "construccionista" es por qué no ha sido bien aceptada por la mayoría de los neurobiólogos contemporáneos. Pensamos que esto se debe, al menos en parte, a la prevalencia de la filosofía "darwinista" para explicar el desarrollo neuronal. En esta visión, la eliminación de los elementos neuronales y conexiones nerviosas menos aptas (¿aquellas que no son utilizadas?) es necesaria para "esculpir" la geometría final de los circuitos neuronales. La mayor parte de la evidencia experimental referente a la formación de sinapsis ha sido interpretada bajo esta óptica, si bien los mismos resultados pueden ser interpretados en otro contexto. En los renglones subsiguientes describiremos algunos ejemplos que ilustran este punto.

Durante el desarrollo, el ganglio cervical superior es inervado

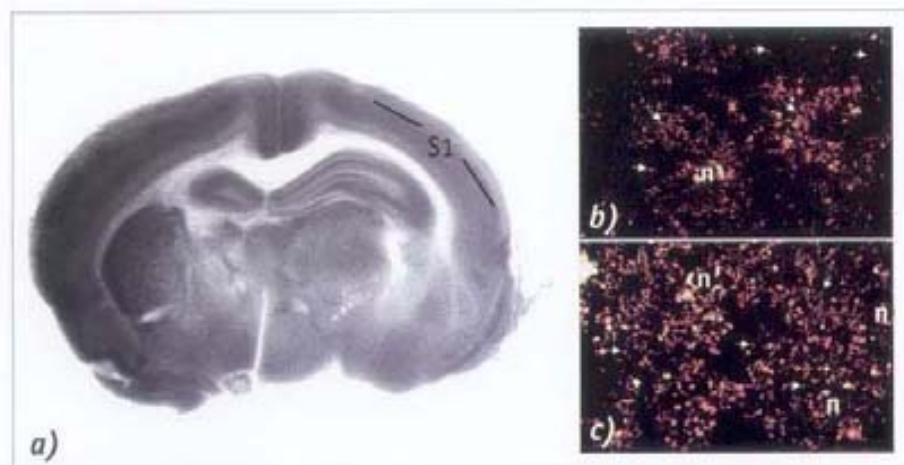


**Figura 2.** Esquema que ilustra los eventos sobresalientes que caracterizan al modelo construccionista para la formación de contactos sinápticos en el cerebro en desarrollo. **a)** En la fase inicial, un número discreto de fibras invaden el territorio blanco, y establecen contactos de manera selectiva con las neuronas que en él se encuentran. Se supone que este comportamiento es inducido por una restricción al acceso de factores de crecimiento (sombreado rosa) en el territorio blanco. **b)** En etapas tardías del desarrollo, la disponibilidad de los factores de crecimiento en el territorio blanco aumenta progresivamente. Esta situación conduce a una elaboración paulatina de los árboles terminales de las fibras nerviosas, sin que ésta sea mediada por la competencia entre ellas ni moldeada mediante la eliminación sináptica.



Los mecanismos que median la "decisión" de las neuronas acerca de la estrategia que seguirán para formar sinapsis son aún poco claros

**Figura 3.** a) Fotomicrografía que ilustra el aspecto de una rebanada del cerebro de rata que contiene, entre otras estructuras, a la corteza somatosensorial (S1). Esta rebanada fue mantenida en cultivo por 45 días. b), c) Fotomicrografías obtenidas en el microscopio confocal que ilustran la cantidad relativa de terminales nerviosas (flechas) activas identificadas mediante la incorporación del colorante supravital FM1-43. Las imágenes fueron obtenidas en la corteza somatosensorial de rebanadas de cerebro mantenidas en cultivo por 12 b) y 40 días c). Nótese el incremento en el número de terminales marcadas conforme la edad en cultivo avanza. También se observan marcados algunos cuerpos neuronales (n).



por muchas fibras preganglionares. Conforme el animal madura, el número de fibras preganglionares disminuye dramáticamente. Estos datos, a primera vista, sugerirían una eliminación de sinapsis. No obstante esta interpretación, se ha observado que, acompañando a la reducción en el número de fibras preganglionares, hay un aumento en el número de sinapsis establecidas entre las fibras preganglionares que permanecen y las neuronas ganglionares.

Otro ejemplo de estos problemas de interpretación se ha observado tanto en la corteza cerebral visual de carnívoros y primates, como en la corteza cerebral somatosensorial de roedores. En ambas regiones, experimentos realizados con trazadores radioactivos o fluorescentes sugirieron, inicialmente, que las fibras talámicas se ramifican de manera difusa en las cortezas visual y somatosensorial. Sin embargo, estudios recientes realizados con ayuda de mejores técnicas para el trazado de fibras nerviosas han mostrado que las fibras talámicas inervan a la corteza de manera precisa y que su complejidad aumenta a lo largo del desarrollo postnatal. En el laboratorio no solamente hemos confirmado estas observaciones, sino también hemos obtenido evidencia preliminar que indica que, en la corteza somatosensorial de los roedores, éste crecimiento preciso de las fibras se acompaña de un aumento en su número de terminales (figura 3).

#### ¿REGRESIONISTA O CONSTRUCCIONISTA? ÉSTE ES EL DILEMA

Los mecanismos que median la "decisión" de las neuronas acerca de la estrategia que seguirán para formar sinapsis son aún poco claros. Como se mencionó, sin embargo, es probable que las neuronas localizadas en los territorios blanco regulen el número de sinapsis que se establecen sobre ellas al modular cuidadosamente

la disponibilidad local de los factores de crecimiento. Debido a que las fibras nerviosas parecen "buscar" ávidamente estos factores, la restricción o el libre acceso a ellos podría definir el tipo de estrategia que las fibras seguirían para establecer contactos con las neuronas blanco. Así, en el esquema "regresionista", la reducida disponibilidad de factores de crecimiento conduciría a una competencia en-

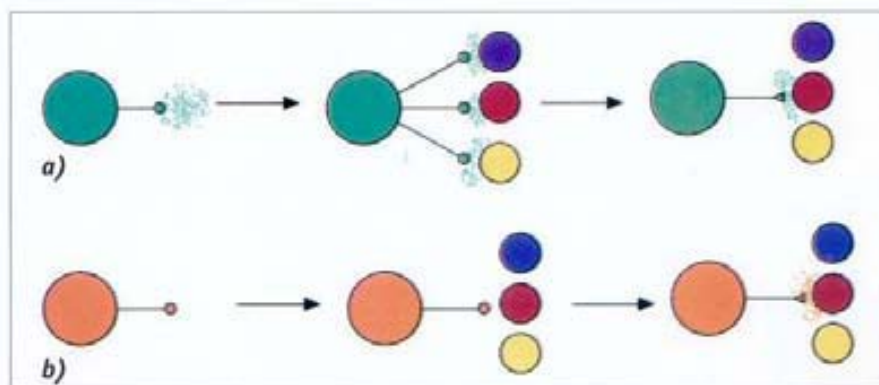


tre las fibras. Como consecuencia de esta competencia, las fibras que tuvieran un buen acceso al codiciado factor de crecimiento permanecerían y consolidarían sus sinapsis. En contraste, las fibras menos afortunadas, aquellas que no fueran expuestas a suficientes cantidades del factor de crecimiento liberado por las neuronas blanco, serían removidas y sus contactos eliminados. Por otro lado, para aquellos grupos de neuronas que "decidieran" seguir el esquema "construccionista" para elaborar sus sinapsis, la historia sería diferente. Las neuronas blanco podrían incrementar gradualmente la disponibilidad local de factores de crecimiento promoviendo así la adición paulatina y controlada de sinapsis. Esto evitaría la redundancia sináptica y la necesidad ulterior de eliminar un gran número de sinapsis en etapas posteriores del desarrollo. Si bien hay evidencia experimental que apoya la existencia de ambos mecanismos durante el desarrollo cerebral, aún desconocemos una infinidad de detalles que deben de ser aclarados antes de tener respuestas más definitivas.

Por ejemplo, en el esquema anterior, parecería que las neuronas que inervan son elementos pasivos cuyas fibras están dispuestas a seguir las instrucciones dictadas por las neuronas blanco al modificar la disponibilidad local de factores de crecimiento. Existe evidencia que sugiere, sin embargo, que las neuronas que inervan podrían auto-instruir el crecimiento de sus fibras y regular la respuesta de las neuronas blanco (figura 4). En estudios realizados en neuronas del caracol de tierra se ha mostrado que aquellas neuronas que secretan neurotransmisores desde las puntas de sus fibras en crecimiento, o cuyas fibras secretan tan pronto como establecen contactos con sus células blanco, persiguen una estrategia "regresionista" para formar sus conexiones. En contraste, algunos grupos de neuronas cuyas fibras no empiezan a secretar neurotransmisores sino hasta transcurridas varias decenas de minutos después de que contactan a sus células blanco, elaboran sinapsis de manera selectiva y progresiva. Aún no se sabe si estas reglas son aplicables al sistema nervioso de los mamíferos en desarrollo. Cabe destacar, sin embargo: 1) que las fibras de neuronas obtenidas del cerebro de distintos mamíferos poseen las proteínas asociadas a la secreción regulada de neurotransmisores antes de que contacten a sus neuronas blanco; 2) que estas fibras son capaces de secretar diferentes neurotransmisores conforme crecen

Algunos grupos de neuronas cuyas fibras no empiezan a secretar neurotransmisores sino hasta transcurridas varias decenas de minutos después de que contactan a sus células blanco, elaboran sinapsis de manera selectiva y progresiva

**Figura 4.** Esquemas que ilustran la posible participación de la secreción en el proceso de selección de la estrategia que seguirán las fibras nerviosas para establecer sinapsis sobre las neuronas del territorio "blanco". **a)** Aquellas neuronas que liberan cantidades significativas de neurotransmisores desde sus conos de crecimiento conforme se aproximan al territorio "blanco", o bien que secretan neurotransmisores (sombreado en color) tan pronto contactan a sus células blanco, seguirán una estrategia "regresionista". **b)** En contraste, las neuronas que no secretan neurotransmisores en cantidades detectables desde sus conos de crecimiento, sino hasta varias decenas de minutos después de haberse puesto en contacto con sus células blanco, seguirán una estrategia "construccionista".



hacia su territorio blanco, y 3) que estos neurotransmisores regulan, al unirse a receptores específicos, el crecimiento de las fibras nerviosas. Así, las observaciones descritas hacen probable que los resultados obtenidos en las neuronas del caracol pudieran ser aplicables a las neuronas en desarrollo de los mamíferos.

#### COMENTARIOS FINALES

Con base a lo expuesto con anterioridad, la evidencia experimental acumulada en años recientes sugiere que distintos grupos de neuronas forman sinapsis siguiendo dos estrategias básicas. En una de ellas, las neuronas producen más sinapsis de las necesarias, por lo que en etapas subsiguientes del desarrollo una fracción significativa de ellas es eliminada. En la segunda estrategia, las neuronas elaboran sinapsis de manera precisa y paulatina. La falta de redundancia hace innecesaria la eliminación sináptica más tarde en el desarrollo. Como suele ser el caso en la investigación científica, cuando existen posturas aparentemente opuestas es muy probable que, para el caso de la formación de sinapsis en el cerebro, las neuronas desarrollen estrategias híbridas, en las que las dicotomías redundancia/eliminación y precisión/construcción participen selectivamente en la generación de los circuitos neuronales. Quizás en algunas regiones del sistema nervioso en donde parecen existir estrategias puras para generar sinapsis, en realidad existan ambas estrategias, pero con cierto predominio de una o la otra. Establecer estas relaciones en el futuro inmediato será de gran relevancia, pues dicho conocimiento nos permitirá entender mejor aspectos básicos y clínicos de la relación forma/función en el cerebro normal y enfermo.

#### Bibliografía

Crair, M. C., Gillespie, D. C., y M. P. Stryker (1998), "The role of visual experience in the development of the cat visual cortex", *Science*, 279, 566-570.

- Gan, W., y J. W. Lichtman (1998), "Synaptic segregation at the developing neuromuscular junction", *Science*, 282, 1508-1511.
- Gutiérrez-Ospina, G., A. S. Calikoglu, P. Ye y A. J. D'Ercole (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.
- Hubel, D. H., T. N. Wiesel, y S. LeVay (1977), "Plasticity of ocular dominance columns in monkey striate cortex", *Phil. Trans. R. Soc. London. B.*, 278, 377-409.
- Katz, L. C., y J. C. Crowley (2002), "Development of cortical circuits: Lessons from ocular dominance columns", *Nat. Rev. Neurosci.*, 3, 34-42.
- Katz, L. C., y C. J. Shatz (1996), "Synaptic activity and the construction of cortical circuits", *Science*, 274, 1133-1137.
- LaMantia, A. S. y D. Purves (1989), "Development of glomerular pattern visualized in the olfactory bulbs of living mice", *Nature*, 341, 646-649.
- Lichtman, J. (1977), "The reorganization of synaptic connections in the rat submandibular ganglion during post-natal development", *J. Physiol.*, 273, 155-177.
- Purves, D., White, L. E., y D. R. Riddle (1996), "Is neural development darwinian?", *TINS*, 19, 460-463.
- Purves, D. y A. S. LaMantia (1993), "Development of blobs in the visual cortex of macaques", *J. Comp. Neurol.*, 334, 169-175.

---

**Gabriel Gutiérrez Ospina** es licenciado por la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). Obtuvo la maestría y el doctorado en Ciencias Fisiológicas en la misma Universidad. Recibió entrenamiento postdoctoral en las Universidades de Duke y Carolina de Norte, Carolina de Norte, Estados Unidos. Actualmente es investigador titular "A" T.C., en el Departamento de Biología Celular y Fisiología del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM. Su trabajo se centra sobre los mecanismos de formación y plasticidad de las conexiones neuronales. Es autor de numerosas publicaciones nacionales e internacionales en el área de su especialidad y ha impartido cátedra a nivel licenciatura, maestría y doctorado en diversas escuelas y facultades de la UNAM. Es nivel I del SNIC y miembro regular de la Sociedad Mexicana de Ciencias Fisiológicas, de la Academia de Ciencias de Nueva York y de la Sociedad para las Neurociencias, Estados Unidos.  
gabo@servidor.unam.mx

**Eileen Uribe Querol** es licenciada en Investigación Biomédica Básica y maestra en Ciencias por la UNAM. Actualmente está cursando el programa de doctorado en Ciencias Biomédicas en el Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM. Su trabajo se centra sobre las estrategias que gobiernan la formación de conexiones neuronales empleando modelos *in vitro*. Ha impartido cátedra en bachillerato y en las licenciaturas de Medicina y Odontología en la Universidad del Valle de México.  
equerol@rocketmail.com

**Norma Sánchez Avendaño** es licenciada en Biología por la Universidad Autónoma de Tlaxcala. Obtuvo la maestría en el Centro de Neurobiología de la UNAM y actualmente cursa el programa de doctorado en Ciencias Biomédicas en el Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM. Su trabajo pretende establecer el posible efecto de la liberación de neurotransmisores sobre las estrategias de formación sinápticas. Ha impartido cátedra en la licenciatura de Medicina en la Universidad del Valle de México.  
angelyc@excite.com

# Mecanismos de organización y reorganización de los circuitos neuronales en los mamíferos en desarrollo

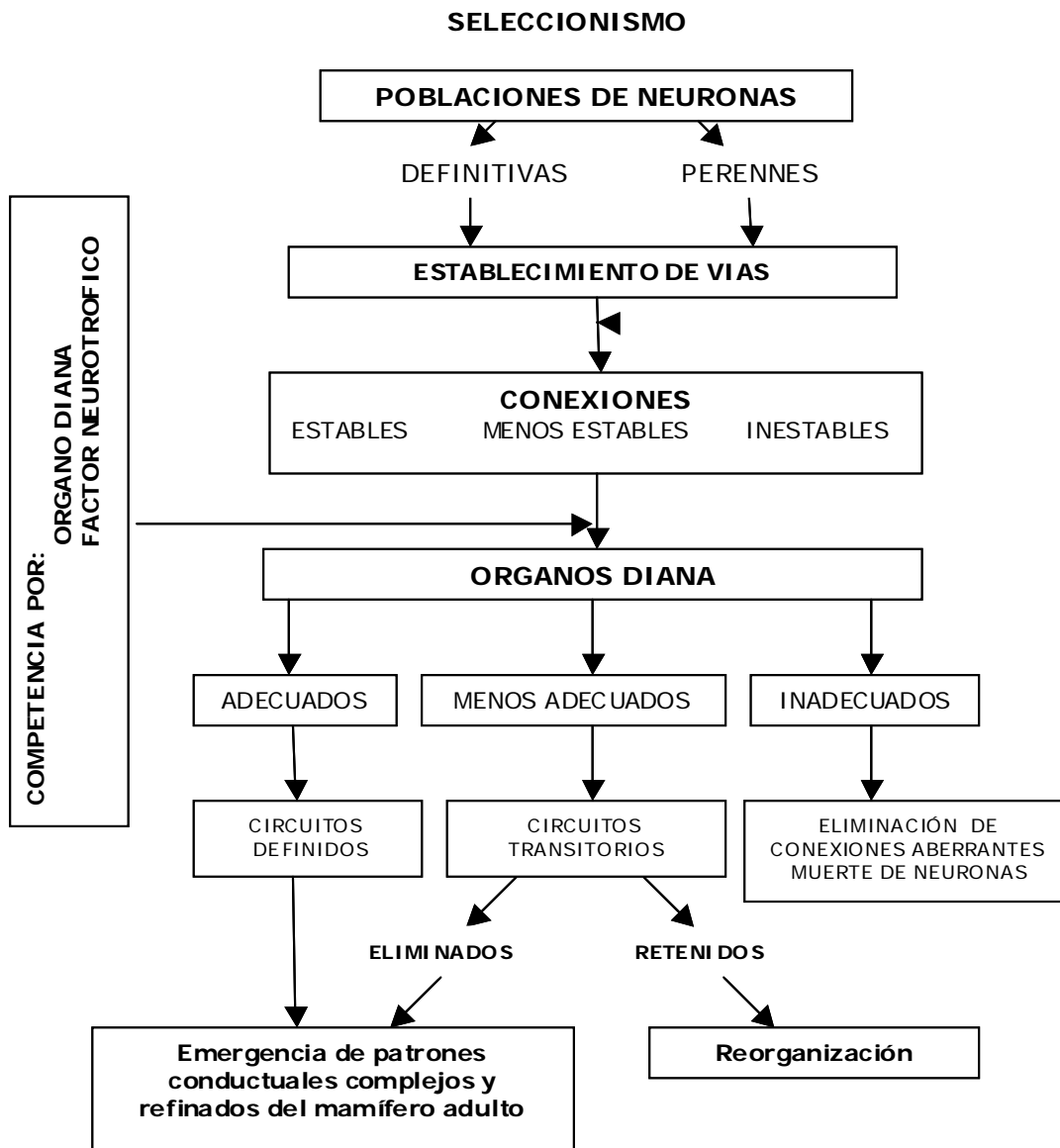
Gabriel Gutiérrez-Ospina, Eileen Uribe-Querol, Eduardo Martínez-Martínez, Luis R. Hernández, Jessica Guzmán, Brenda Toscano, Helga Geovannini, Abril Aldama, Miguel Tapia, Julieta Mendoza, Francisco Jiménez y Patricia Padilla

Departamento de Biología Celular y Fisiología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México

El desarrollo postnatal en los mamíferos es un proceso complejo a lo largo del cual se definen, entre otras cosas, la estructura y función del sistema nervioso. Durante este periodo, la maduración neurológica se caracteriza por el refinamiento de los patrones de movimiento, el incremento en la complejidad del repertorio conductual y una mejora en la habilidad para aprender y memorizar información. Se ha considerado que estas características reflejan eventos de organización y reorganización anatómica y funcional de los circuitos neuronales. Si bien esta visión parece correcta, los neurobiólogos aún no se han puesto de acuerdo con relación a los mecanismos celulares que subyacen a la organización y reorganización de los circuitos neuronales durante el desarrollo cerebral. Una de las posturas, denominada seleccionista, sostiene que los circuitos neuronales se organizan y reorganizan a través de eventos regresivos tales como la muerte neuronal y la eliminación de conexiones transitorias (4, 5, 6, 13, 19). La otra postura, referida como constructivista, afirma que los circuitos neuronales se organizan y reorganizan mediante la adición de elementos neuronales, particularmente de los procesos celulares denominados dendritas y axones y de sus uniones o sinapsis (9, 11, 14, 20). En el presente capítulo, reflexionaremos y discutiremos sobre ambas posturas, tratando de proveer al lector de una visión amplia y objetiva para que norme su criterio sobre la situación actual de esta fascinante área de la neurociencias.

## Seleccionismo y la formación de circuitos neuronales (Figura 1).

A mediados del siglo XIX, Charles Darwin publicó sus ideas en torno a la evolución de las especies por medio de la selección natural. De las innumerables ideas vertidas al seno de la teoría evolucionista, la concepción de la selección natural como el mecanismo de consolidación de caracteres físicos específicos (i.e., fenotipo) en una población dada, ha sido la que más ha influenciado las ideas que los neurobiólogos tienen sobre los eventos que subyacen a la organización y reorganización del sistema nervioso en desarrollo. En esencia, la concepción seleccionista asume que el conjunto de individuos de una población ocupa un nicho ecológico específico que les provee de recursos necesarios para su subsistencia, interacción y reproducción. Estos recursos y el acceso a ellos son limitados, lo que conlleva a un fenómeno de competencia entre los individuos de la población. Así, aquellos individuos que posean fenotipos idóneos para acceder a los recursos eficazmente serán capaces de sobrevivir, interactuar y reproducirse, lo que garantizará su continuidad y la permanencia de su patrimonio genético en la población. En caso contrario, aquellos individuos que posean fenotipos que no les permitan contender adecuadamente sucumbirán, y su patrimonio genético será eliminado del repertorio genético de la población. De esta forma, las condiciones ambientales ejercen una presión que “selecciona” a los individuos con base a sus características físicas. Debido a que el ambiente es relativamente dinámico, la condición referida permite que la composición fenotípica



**Figura 1.** Diagrama que ilustra los elementos conceptuales fundamentales de la teoría seleccionista. Dos poblaciones de neuronas que establecen conexiones estables, transitorias e inestables con órganos diana adecuados, relativamente adecuados e inadecuados. Las neuronas (perennes) que se conectan con órganos diana inadecuados mueren. Aquellas que se conectan con órganos diana adecuados permanecen y forman circuitos estables. Las conexiones de células que además de conectarse a órganos diana adecuados lo hacen con órganos diana menos adecuados, retiran sus conexiones de estos últimos. Las conexiones transitorias son, sin embargo, el sustrato para la reorganización de los circuitos en el caso de que así sea requerido. En conjunto la eliminación y selección de ciertos grupos de conexiones da como resultado el refinamiento conductual.

de la población cambie constantemente por lo que se cree que la reorganización de los fenotipos en una población posee un valor intrínsecamente adaptativo.

De manera similar a lo descrito en el párrafo precedente, el seleccionismo neuronal propone que las neuronas y conexiones que pasarán a formar parte del sistema nervioso maduro son seleccionadas a partir de una población numerosa, a través de mecanismos competitivos

(13, 19). Así, se asume que durante las fases de formación del sistema nervioso, se producen neuronas en exceso que establecen sinapsis con varios órganos diana potenciales (6). En este escenario, existen neuronas que contactan órganos diana inadecuados que no les proveen de neurorecursos. Esto se traduce en la pérdida de los contactos y en la muerte de dichas neuronas (4, 5). Existen también otro tipo de neuronas que contactan órganos diana mas

adecuados que les proveen de neurorecursos suficientes, lo que les permite estabilizar sus contactos y sobrevivir. Es importante destacar, sin embargo, que los contactos de diversas neuronas de este segundo tipo convergen sobre órganos diana comunes, generando contactos redundantes. Este exceso obliga a los órganos diana a elegir aquellos contactos con los que tengan mayor afinidad química y funcional. Una vez identificados los contactos afines, los órganos diana los favorecen brindándoles mayor accesibilidad a los neurorecursos. De esta manera, y de acuerdo al seleccionismo, se establece un marco de competencia que conduce a la estabilización de algunos grupos de contactos y a la eliminación de otros (13, 19). La eliminación de contactos, en el contexto descrito anteriormente, no conduce a la muerte celular debido a que mientras las neuronas eliminan una fracción de contactos, estabilizan otros que establecieron con órganos diana más afines. De esta forma, queda implícita la idea de que existen conexiones definitivas, transitorias y aberrantes.

¿Cuales son los neurorecursos por los que compiten las neuronas? Se ha propuesto que los neurorecursos son, por un lado, los órganos diana en sí mismos, y por otro, los factores neurotróficos de naturaleza proteica producidos y secretados por ellos (13, 19). Evidencia que apoya que los órganos blanco son motivo de competencia proviene de experimentos en los que se mostró que la implantación de una extremidad adicional previene la eliminación de neuronas y conexiones supernumerarias en la médula espinal de embriones de pollo (12). Así mismo, la retención de conexiones transitorias en presencia de un exceso de factores neurotróficos apoya que estos promueven la competencia (8).

¿Como saber si el compañero sináptico es adecuado? El seleccionismo neuronal propone que ésta decisión se toma con base en tres elementos (13, 19). El primero de ellos, es el grado de afinidad química, mediada por molécula de adhesión celular y posiblemente de histocompatibilidad, entre los posibles compañeros sinápticos. El segundo, es el grado de aprovisionamiento mutuo de neurorecursos entre los compañeros sinápticos potenciales. Y, el tercero, es el grado de reforzamiento funcional de la unión entre los compañeros sinápticos causada por la coincidencia en la activación electroquímica de ambos en respuesta al flujo de información entre ellos. Si estos elementos coinciden, la probabilidad de que de las conexiones establecidas entre compañeros sinápticos potenciales se estabilicen es alta, por lo que dichas conexiones habrán ganado la competencia. En caso contrario, serán solo conexiones transitorias y se eliminarán durante las fases subsiguientes del desarrollo neural.

Finalmente, y una vez expuestos los lineamientos básicos, es importante remarcar una falla fundamental en la concepción seleccionista neuronal cuando se considera

su equivalencia con el seleccionismo evolutivo. En este último, los individuos de la especie compiten por los recursos. Los recursos, con la excepción de los relacionados con la reproducción, no participan como factores que emitan decisiones sobre a quién permitirle o restringirle el acceso a ellos. En contraste, en el seleccionismo neuronal, los órganos diana como neurorecurso, “deciden” cuales serán las conexiones favorecidas bajo ciertas condiciones. Así las cosas, no podemos estrictamente hablar de una competencia sino de una elección. De esta forma, los eventos que subyacen al seleccionismo neural son más afines, no con eventos de selección basados en la competencia por recursos, sino con aquel relacionado con la elección de la pareja bajo un contexto evolutivo. Esto es ventajoso pues la elección brinda una mayor posibilidad que la competencia para desarrollar una reorganización fenotípica controlada.

### **Seleccionismo y la “reorganización” de los circuitos neuronales**

Para el seleccionismo neuronal, existen grupos de neuronas que son indispensables para la organización anatómica y funcional del sistema nervioso. Esto, afortunadamente, parece estar alejado de la realidad. Al menos para algunos de los grupos neuronales que mueren durante el desarrollo temprano, se ha mostrado que fungen como blancos transitorios para otros grupos de neuronas que requieren de soporte neurotrófico en su camino de encontrar al compañero sináptico “ideal”. Los cuerpos celulares y las proyecciones citoplásmicas aparentemente erróneas de las neuronas perennes proveen de guías que facilitan que los procesos celulares de las neuronas seleccionadas alcancen a sus compañeros sinápticos ideales.

Por otro lado, el seleccionismo neuronal también predice la existencia de conexiones transitorias que por ser supernumerarias son eliminadas en el transcurso del desarrollo. Esta idea, sin embargo, también parece errónea puesto que las conexiones transitorias pueden permanecer si las neuronas que las establecen no “encuentran” al compañero sináptico ideal. Así, las conexiones transitorias generan “redundancias de conectividad” que le permiten al sistema nervioso en desarrollo tener un substrato anatómico alternativo del cual echar mano para “reorganizar” los patrones de conexión entre las neuronas que sobreviven si esto es necesario (8). La retención de conexiones transitorias ha sido invocada como la explicación de los procesos de “reorganización” cortical y mesencefálica observados en distintas especies de vertebrados (7). Un ejemplo de esto sería el estrabismo. En sujetos que padecen de estrabismo, los territorios del cerebro que eran utilizados para procesar información de el ojo estrábico, adquieren la habilidad de procesar información relativa al ojo que esta bien orientado con

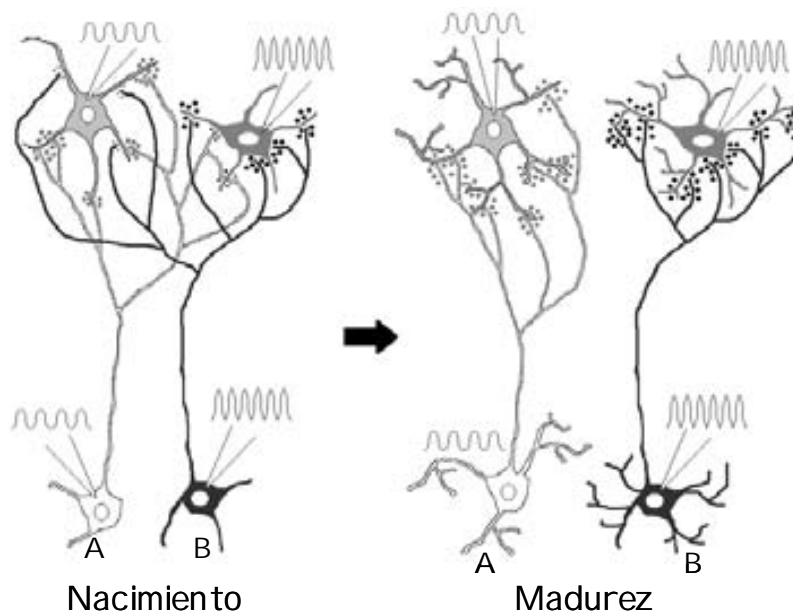
relación al espacio visual (14). No obstante estas observaciones, con base en las ideas presentadas, es claro que los mecanismos seleccionistas, en estricto, no conllevan a un proceso de reorganización de los circuitos neuronales en desarrollo. Más bien utilizan un substrato anatómico-funcional pre-existente para generar alternativas de conectividad.

### Seleccionismo, actividad neuronal y la organización / reorganización de los circuitos neuronales

Por años, se ha pensado que la organización y reorganización del sistema nervioso en desarrollo es susceptible de ser modificada por influencias ambientales. Esta idea ha sido reforzada por el aparente efecto que tiene el “enriquecimiento” del medio ambiente externo sobre el crecimiento de los procesos celulares neuronales. También, en la concepción seleccionista, y puesto que el sistema nervioso media la interacción del organismo con el medio ambiente, se ha pensado que la mayor parte de los cambios en la estructura y función cerebrales son adaptativos. Pero, ¿cómo podría el medio ambiente externo moldear la estructura y función nerviosas? Se piensa que cada atributo físico de los estímulos ambientales externos sería codificado en patrones específicos de actividad electroquímica en los distintos circuitos neuronales. Estos patrones, a su vez, producirían cambios específicos en la configuración de los circuitos neuronales, lo que conduciría a cambios de la

función nerviosa. De esta manera, los patrones de actividad electroquímica asociados a los estímulos serían traducidos en cambios morfo-fisiológicos del substrato neuronal que adaptarían al sistema nervioso al ambiente externo (13).

Se ha propuesto que la actividad electroquímica neuronal (de ahora en adelante nos referiremos a ella como actividad neuronal) puede jugar un papel inductivo o instructivo sobre la estructura y función del sistema nervioso a lo largo del desarrollo (13). Como elemento inductivo, la actividad neuronal promovería directamente la formación de conexiones definiendo así la geometría final de los circuitos neuronales. Como factor instructivo, la actividad neuronal modularía la selección de las conexiones, aunque en su ausencia los circuitos neuronales se formarían de todas maneras. De acuerdo al seleccionismo, la actividad neuronal tiene un valor instructivo, más que inductivo. Así, se ha propuesto que cada uno de los compañeros sinápticos potenciales muestran una actividad intrínseca espontánea que presenta un patrón, amplitud y frecuencia característicos. Si la actividad de ambos coincide estadísticamente en tiempo y espacio, entonces ambos entrarían en un estado de “resonancia funcional”. De esta forma, la conexión sería reforzada y se consolidaría porque el compañero post-sináptico proveería de un mayor aporte trófico al pre-sináptico (Figura 2). En éste contexto, la actividad neuronal asociada al estímulo también aumentaría la probabilidad de coincidencia facilitando el reforzamiento

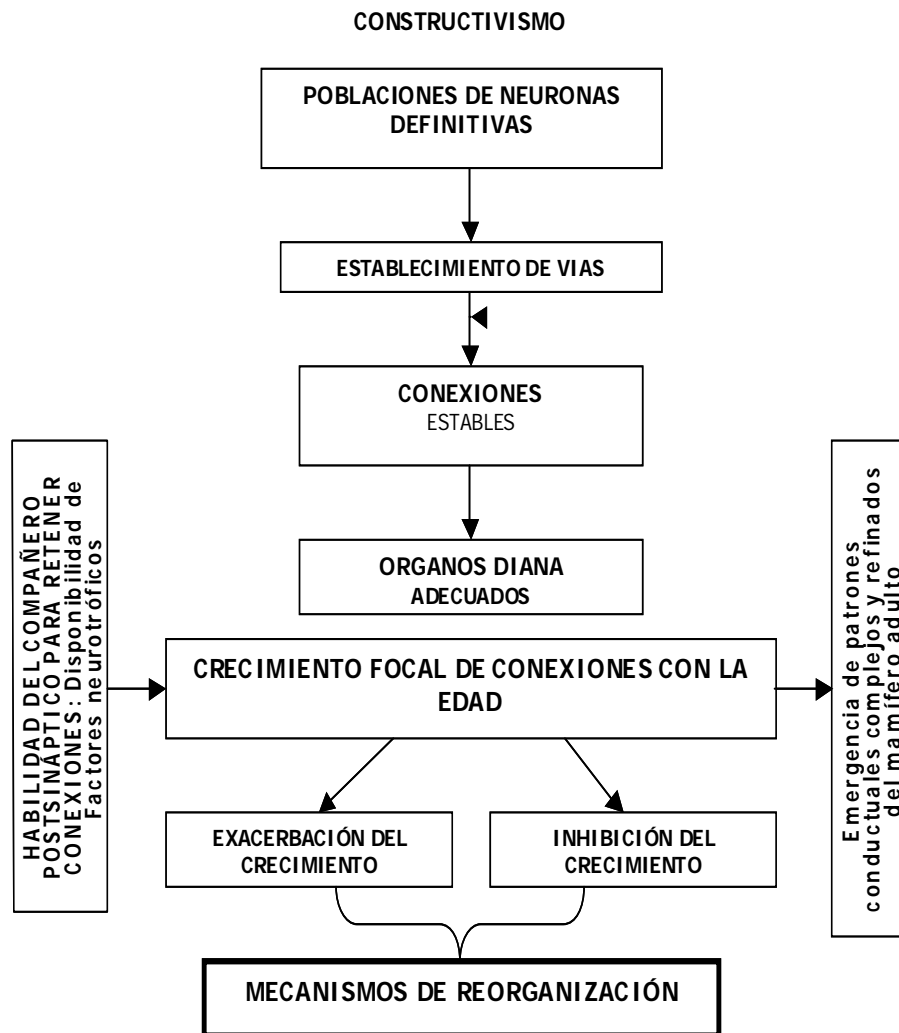


**Figura 2.** Esquema que ilustra los efectos de la actividad neuronal en el proceso de selección de las conexiones neuronales. Las neuronas presinápticas A y B proyectan sus axones a neuronas diana comunes. Cuando las neuronas postsinápticas comparan su patrón de actividad con aquel de las neuronas que las inervan, aumentan la disponibilidad de factores neurotróficos a los axones cuyo patrón de actividad es similar. Al mismo tiempo, reducen la disponibilidad de factores neurotróficos a los axones cuyo patrón de actividad es disímil. Esto conduce a la consolidación del primer grupo de contactos y a la eliminación del segundo grupo en ambos casos. Al final, los axones quedan segregados en neuronas diana diferentes.

y la consolidación sinápticas. El caso contrario, es decir la pérdida de coincidencia de los patrones de actividad entre los potenciales compañeros sinápticos, resultaría en el debilitamiento de las conexiones y su consecuente eliminación (13).

Si el esquema seleccionista al que nos referimos en el párrafo anterior fuera correcto, la capacidad que tendría la estructura del sistema nervioso para modificarse iría en detrimento conforme se alcanza la madurez puesto que se seleccionarían y estabilizarían solamente las conexiones más fuertes. Aunque durante mucho tiempo se pensó que esto en realidad era así, ahora sabemos que incluso el sistema nervioso adulto modifica su conectividad en respuesta a alteraciones del medio interno y externo. Así, la existencia de un proceso de reorganización del cerebro

adulto impone un problema conceptual para la teoría seleccionista (7). Además, se ha mostrado que dicha reorganización puede ocurrir en cuestión de minutos, por lo que se ha sugerido que resulta del desenmascaramiento de conexiones pre-existentes pero que, bajo condiciones normales, se mantenían relativamente “silentes” funcionalmente (7). Esto, evidentemente, es otro problema para la teoría seleccionista, pues se supone que las conexiones que no se utilizan se eliminan. Para salir del paso, los “seleccionistas” han propuesto que la actividad neuronal del compañero post-sináptico oscila entre diversas frecuencias, amplitudes y patrones a lo largo del tiempo, abriendo así la posibilidad de retener conexiones que presenten distintos niveles de actividad.



*Figura 3. Diagrama que ilustra los elementos conceptuales fundamentales de la teoría constructivista. Poblaciones de neuronas que establecen conexiones estables con órganos diana adecuados. Los órganos blanco proveen de factores neurotróficos que favorecen el crecimiento de las conexiones y su ulterior consolidación formándose así circuitos estables. La reorganización es producto de una exacerbación o una inhibición del crecimiento focal de conexiones. Como resultado de la modulación del crecimiento focal de conexiones emerge el patrón conductual refinado.*

### Constructivismo y la formación de los circuitos neuronales (Figura 3)

Durante una buena parte del siglo XIX y en los primeros años del siglo XX, los estudiosos del cerebro habían concebido que el sistema nervioso central elaboraba sus circuitos a través de agregar elementos neuronales durante su desarrollo. La adición de neuronas y conexiones explicaban el incremento en la complejidad y refinamiento de la conducta, así como el crecimiento del cerebro en su

conjunto. La idea constructivista, sin embargo, fue puesta en duda por Santiago Ramón y Cajal quién mostró que un importante número de neuronas perdían algunos de sus procesos citoplásmicos conforme se alcanzaba la madurez. A lo largo del siglo XX, se acumuló más evidencia que documentaba que tanto las neuronas como los procesos celulares neuronales decrecían en número y que incluso las sinapsis disminuían al paso del tiempo (4, 5). La concepción constructivista del desarrollo neuronal cayó en

Seleccionismo	
Estructura	Referencias
Dendritas	
a) Corteza del mono b) Retina de gato c) Médula espinal de la rata	Luna et. al.; 1987 <i>J Comp Neurol</i> 176: 149-188 Ramoal et. Al.; 1988 <i>J Neurosci</i> 8: 4239-4261 Kalb 1994 <i>Development</i> 120: 3063-3071.
Axones	
a) Corteza del gato  b) Oliva inferior de la rata	López-Román & Armengol 1994. <i>J Comp Neurol</i> 350: 485-496 Bressoud. & Innocenti 1999 <i>J Comp Neurol</i> 406: 87-108
Sinapsis	
a) Corteza visual del gato	Aggoun Aouaoui et. al.; 1996 <i>Eur J. Neurosci</i> 8: 1132-1148
Constructivismo	
Estructura	Referencias
Dendritas	
a) Corteza cerebelosa del mono b) Corteza de la rata c) Retina del pescado dorado y <i>Xenopus</i>	Berry & Bradley 1976. <i>Brain Res</i> 112:1-35 Parnavelas & Uylings. 1980. <i>Brain Res</i> 193: 373-382 Sakaguchi et. al.; 1984 <i>J Comp Neurol</i> 224: 231-251 Bloomfield & Hitchcock 1991. <i>J. Neurosci</i> 11: 910-917
Axones	
a) Médula espinal de rata b) Glomérulos de rata y ratón c) Hipocampo de rata d) Núcleo geniculado de mono e) Conexiones interhemisféricas comisurales de la rata f) Corteza visual primaria del hurón g) Corteza somatosensorial primaria de la rata y ratón	Silos-Santiago, et. al., 1995 <i>Neuroreport</i> Kasowski et. al. 1999 <i>J Comp Neurol</i> 407: 261-274 Treloar et. al.; 1999 <i>J Comp Neurol</i> 413: 289-304 La Mantia & Purves 1989 <i>Nature</i> 341: 646- 649. Frotscher & Heimrich 1993 <i>Proc Natl Acad Sci</i> 90: 10400-10403 Meissirel et. al. 1997 <i>Proc Natl Acad Sci</i> 94: 5900-5905 Pires-Neto & Lent, R.1993 <i>Brain Res Dev Brain Res</i> 72: 59-66 Crowley & Katz 2000 <i>Science</i> 290: 1321-1324 Katz & Crowley 2002 <i>Nat Rev Neurosci</i> 3: 34-42 Killackey & Berford 1979 <i>J Comp Neurol</i> 183: 285-303 Agmon et. al., 1993 <i>J. Neurosci</i> 13: 5365-5382 Agmon et. al. 1995 <i>J Neurosci</i> 15: 549-561 Catalano et.al. 1991 <i>Proc Natl Acad Sci</i> 88: 2999-3003
Sinapsis	
a) Corteza somatosensorial del ratón y de la rata	Micheva & Beaulieu 1996. <i>J. Comp Neurol</i> 373, 340-354 White et. al.; 1997. <i>Somatosens Mot Res</i> 14, 34-55

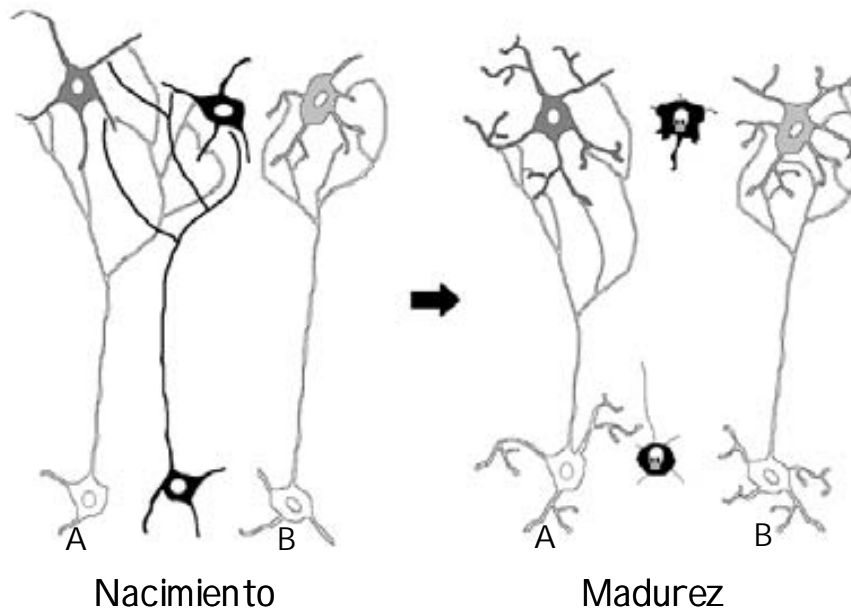
Tabla 1. Lista de algunas de las regiones del sistema nervioso que parecen elaborar sus conexiones a través de mecanismos seleccionistas o constructivistas, en distintas especies de mamíferos.



desuso, al grado que no se considera en los libros de texto contemporáneos dedicados al área de las neurociencias.

En el transcurso de las dos últimas décadas del siglo pasado, la concepción constructorista resurgió con base a un limitado, pero no despreciable, cuerpo de evidencias que mostraron que en algunas áreas (Tabla 1) del sistema nervioso de los mamíferos, el número de procesos y conexiones aumentaba con la edad hasta llegar a una meseta. Se mostró que diversos grupos de axones invaden a sus órganos blanco de manera precisa y crecen selectivamente en áreas restringidas y bien definidas (1, 2, 9, 10, 15, 17, 22, 23). En estas áreas del sistema nervioso, no se ha observado un decremento en el número de conexiones con la edad (24), y no hay evidencia de que exista competencia asociada a la restricción en la disponibilidad de factores neurotróficos y/o blancos (11). De hecho, parece que el número de conexiones aumenta en función de la cantidad de factores tróficos disponible

en el territorio blanco (11). Primero, éste fenómeno se observó en áreas que se consideran primitivas filogenéticamente, por lo que se pensó que la elaboración de circuitos a través de mecanismos constructoristas era característico de regiones cerebrales de adquisición filogenética temprana (16). Más recientemente, sin embargo, se ha mostrado que diversas zonas de la neocorteza en distintos mamíferos en desarrollo elaboran sus circuitos siguiendo un estrategia constructorista. Hasta el momento no se ha mostrado que las poblaciones de neuronas se remodelen a través de mecanismos constructoristas. Así, parece que el ajuste del número de neuronas que constituirán al sistema nervioso se da a través de eventos regresivos en un marco seleccionista, mientras que aquellos eventos relacionados con la formación de circuitos parecen seguir al menos dos estrategias diferentes una de ellas seleccionista y la otra constructorista (16; Figura 4).



**Figura 4.** Esquema que ilustra el proceso de organización de las poblaciones neuronales y de sus conexiones a través de mecanismos seleccionistas y constructoristas. El número de neuronas que constituye una población dada se ajusta después de la eliminación de conexiones aberrantes, a través de mecanismos de selección y muerte celular. Aquellas neuronas (A) que establecieron contactos con órganos diana adecuados y menos adecuados, eliminan aquellos asociados con los órganos diana menos adecuados y consolidan los contactos establecidos con los órganos diana adecuados. En contraste, las neuronas (B) que establecen contactos precisos con los órganos diana adecuados, elaboran sus conexiones al paso del tiempo.

### Constructorismo y la reorganización de los circuitos neuronales

En la visión constructorista, los circuitos se forman mediante la adición de axones, dendritas y sinapsis de manera selectiva a lo largo del desarrollo. Esta adición tiene un límite superior que parece estar definido por la habilidad del compañero post-sináptico para retener conexiones. Una

vez alcanzado este límite, el número (aún no sabemos si la distribución espacial) de conexiones parece permanecer relativamente constante por el resto de la vida. De esta manera, si durante la organización de los circuitos neuronales, las conexiones que los forman se adicionan en lugar de eliminarse, es lógico suponer que los mecanismos de reorganización de los circuitos en desarrollo pueden

resultar de la inhibición o de la exacerbación del crecimiento de los procesos neuronales y de la multiplicación sináptica. Este en verdad parece ser el caso para las modificaciones anatómicas que ocurren en la neocorteza de los animales que han perdido un órgano de los sentidos durante la vida postnatal temprana. En ellos, las áreas sensoriales corticales no afectadas directamente por la pérdida de la visión se expanden (3), y esta expansión se asocia a incrementos en el contenido de proteínas asociadas al crecimiento axones y dendritas, así como a aumentos en la longitud total y en el área ocupada por las ramas terminales de dichos procesos neuronales (Guzmán y Gutiérrez-Ospina, en preparación). Así, en el contexto constructivista, parece existir una reorganización formal de los circuitos neuronales durante el desarrollo con base a la elaboración de nuevas conexiones. Además, en contra de lo que sucede con relación al seleccionismo, la reorganización del cerebro adulto no parece ser un problema si se aprecia desde la óptica constructorista. De acuerdo a ella, una vez que el sistema nervioso alcanza la madurez, el número de conexiones establecidas entre las neuronas permanece relativamente constante. Uno puede imaginar que se establece una jerarquía funcional de los distintos grupos de conexiones ya consolidados a través de aumentar o disminuir los niveles de inhibición lateral a los que son sujetos los diferentes grupos de conexiones (7). Así, sin necesidad de invocar la formación de nuevas conexiones, podrían darse procesos de reorganización funcional por fenómenos de desenmascaramiento sináptico. En otras palabras, habría en el sistema nervioso adulto “constructivista”, un cierto grado de redundancia de conectividad jerarquizada funcionalmente que permite la redirección de los flujos de información sin necesidad de producir nuevas conexiones.

### **Constructivismo, actividad neuronal y la organización / reorganización de los circuitos neuronales.**

Como hemos discutido ya en párrafos previos, se ha propuesto que la actividad neuronal juega un papel fundamental en los procesos de organización / reorganización de los circuitos neuronales. En el contexto seleccionista, la actividad neuronal parece ser un factor instructivo que modula la formación de circuitos promoviendo el reforzamiento o el debilitamiento de las sinapsis. En el contexto constructivista, aún no conocemos con precisión si la actividad neuronal juega un papel como factor instructivo o inductivo durante la formación de los circuitos neuronales. Se ha observado, sin embargo, que la reducción de los niveles de actividad neuronal en poblaciones de neuronas que elaboran sus circuitos de manera constructiva favorece la elongación de los procesos neuronales sin alterar el patrón de distribución de sus conexiones (Geovannini et al., en preparación). Los niveles

aumentados de actividad neuronal, por otro lado, detienen el crecimiento de los axones y dendritas favoreciendo así la formación y estabilización sinápticas. Así, parece que la actividad neuronal también juega un papel instructivo durante los eventos constructivistas, particularmente en fases tardías de la elaboración de los circuitos neuronales. Con base en la información descrita, es importante destacar que la reorganización del sistema nervioso concebida desde el punto de vista constructivista tiene lugar cuando los niveles de actividad neuronal son reducidos, y no cuando estos están elevados como se ha sugerido previamente (18, 21, 25).

### **¿Es la reorganización del cerebro adaptativa?**

El seleccionismo propone que las conexiones más utilizadas se fortalecen y perduran, lo que llevaría a la “reorganización” y adaptación de la configuración de los circuitos neuronales a su entorno. El constructivismo sugiere que la disminución de los niveles de actividad en las redes neuronales promueve su reorganización. ¿Como es entonces que la reorganización de los circuitos neuronales puede ser adaptativa en el contexto constructivista? La respuesta a esta contradicción entre el seleccionismo y el constructivismo es simple: La reorganización del sistema nervioso no es intrínsecamente adaptativa, aunque circunstancialmente así lo parezca. Ejemplos como son las senso-percepciones sobre la existencia y el dolor de extremidades que fueron amputadas, y la disminución de las capacidades discriminativas para ciertos atributos físicos de estímulos táctiles y auditivos en individuos ciegos apoyan que la reorganización cerebral no es necesariamente adaptativa (3). Así, el seleccionismo neuronal con su énfasis en la naturaleza adaptativa de la reorganización cerebral, parece tener problemas para explicar ejemplos como los arriba citados. El constructivismo, en cambio, predice de manera natural que la reorganización de los circuitos neuronales puede no ser adaptativa, y más bien refleja la tendencia intrínseca de las neuronas a cambiar, reconectarse y sobrevivir.

### **Selección y construcción: ¿Dos caras de la misma moneda?**

En un intento por ayudar a resolver este aparente conflicto, en el laboratorio hemos dedicado parte de nuestra labor al estudio de los mecanismos de elaboración y reorganización de la circuitería neuronal en la corteza somatosensorial primaria de las ratas durante su desarrollo postnatal. Si bien existe evidencia de que los axones, dendritas y sinapsis aumentan en número y complejidad hasta la segunda semana de vida, también observamos que algunas ramas dendríticas se pierden entre los quince y treinta días de vida postnatal (Uribe-Querol et al., en preparación). Un análisis más detallado, sin embargo, ha

mostrado que en realidad los fenómenos regresivos dendríticos reflejan una reorganización de configuración del árbol dendrítico, puesto que la superficie total de la membrana celular se mantiene constante durante la eliminación de procesos dendríticos (Uribe-Querol et al., en preparación). Esto significa que, al menos para la corteza somatosensorial de la rata en desarrollo, existe un evento de reorganización, más que eventos regresivos. Nuestra conclusión se refuerza por el hecho de que la densidad sináptica en esta zona del cerebro de la rata incrementa hasta los veinte días de vida postnatal, manteniéndose constante a partir de esta edad (24). No sabemos aún si nuestras observaciones pueden ser generalizadas a otros modelos animales y regiones cerebrales. Existe evidencia, sin embargo, que indica que esto pudiera ser así (14).

**Agradecimientos:**

Los autores agradecen el apoyo financiero del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (proyectos J28035N y 38615N), la Dirección General de Asuntos del Personal Académico, UNAM (proyecto IN203702-2), y a los Laboratorios Roche-Syntex.

---

## Referencias

- 1.- Agmon A, Yang LT, O'Dowd DK, Jones EG. Organized growth of thalamocortical axons from the deep tier of terminations into layer IV of developing Mouse Barrel Cortex. *J. Neurosci.* 13: 5365-5382. 1993
- 2.- Agmon A, Yang LT, Jones EG, O'Dowd DK. Topological precision in the thalamic projection to neonatal mouse barrel cortex. *J. Neurosci.* 15: 549-561. 1995
- 3.- Bavelier D, Neville HJ. Cross-modal plasticity: Where and How?. *Nat. Rev.* 3:443-452. 2002
- 4.- Bourgeois JP, Jastreboff PJ, Rakic P. Synaptogenesis in visual cortex of normal and preterm monkeys: Evidence for intrinsic regulation of synaptic overproduction. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 4297-4301. 1989
- 5.- Bourgeois JP. Synaptogenesis, heterochrony and epigenesis in the mammalian neocortex. *Acta Paediatr. Suppl.* 422: 27-33. 1997
- 6.- Bressoud R, Innocenti GM. Typology, early differentiation, and exuberant growth of a set of cortical axons. *J. Comp. Neurol.* 406: 87-108. 1999
- 7.- Buonomano DV, Merzenich MM. Cortical plasticity: from synapses to maps. *Annu. Rev. Neurosci.* 21: 149-186. 1998
- 8.- Cabelli RJ, Hohn A, Shatz CJ. Inhibition of ocular dominance column formation by infusion of NT-45 or BDNF. *Science* 267: 1662-1666. 1995
- 9.- Catalano SM, Robertson RT, Killackey HP. Early ingrowth of thalamocortical afferents to the neocortex of the prenatal rat. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 2999-3003. 1991
- 10.- Crowley JC, Katz LC. Early development of ocular dominance columns. *Science* 290: 1321-1324. 2000
- 11.- Gutierrez-Ospina G, Calikoglu AS, Ye P, D'Ercole AJ. 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. *Endocrinol.* 137: 5484-5492. 1996
- 12.- Hamburger V. Motor and sensory hyperplasia following limb-bud transplantations in chick embryos. *Physiol. Zool.* 12: 268-284. 1939
- 13.- Katz LC, Shatz CJ. Synaptic activity and the construction of cortical circuits. *Science* 274: 1133-1138. 1996
- 14.- Katz LC, Crowley JC. Development of cortical circuits: Lessons from ocular dominance columns. *Nat. Rev.* 3: 34-42. 2002
- 15.- LaMantia AS, Purves D. Development of glomerular pattern visualized in the olfactory bulbs of living mice. *Nature* 341: 646-649. 1989
- 16.- Lent R. Different developmental strategies of telencephalic commissures: A comparison between the ontogeneses of visual callosal connections and of olfactory commissural connections in rodents. En: *The visual system: from genesis to maturity.* R. Lent (Ed). Birkhauser Boston. 1992. Pp: 131-146.
- 17.- Meissirel C, Wikler KC, Chalupa LM, Rakic P. Early divergence of magnocellular and parvocellular functional subsystems in the embryonic primate visual system. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 5900-5905
- 18.- Purves D, Riddle DR, White LE, Gutierrez-Ospina G. Neural activity and the development of the somatic sensory system. *Curr. Op. Neurobiol.* 120-123. 1994
- 19.- Purves D, Lichtman JW. Elimination of synapses in the developing nervous system. *Science* 210: 153-157. 1980
- 20.- Quartz SR, Sejnowski TJ. The neural basis of cognitive development: A constructivist manifesto. *Behav. Brain Sci.* 20: 537-596. 1997
- 21.- Riddle DR, Gutierrez G, Zheng D, White LE, Richards A, Purves D. Differential metabolic and electrical activity in the somatic sensory cortex of juvenile and adult rats. *J. Neuroci.* 13: 4193-4213. 1993
- 22.- Schlaggar BL, O'Leary DDM. Early development of the somatotopic map and barrel patterning in rat somatosensory cortex. *J. Comp. Neurol.* 346: 80-96. 1994
- 23.- Silos-Santiago I, Jeng B, Snider WD. Sensory afferents show appropriate somatotopy at the earliest stage of projection to dorsal horn. *NeuroReport* 6: 861-865. 1995
- 24.- White EL, Weinfeld L, Lev DL. A survey of morphogenesis during the early postnatal period in PMBSF barrels of mouse Sml cortex with emphasis on barrel D4. *Somatosen. Motor Res.* 14: 34-55. 1997
- 25.- Zheng D, Purves D. Effects of increased neural activity on brain growth. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92: 1802-1806. 1995

## Correspondencia para el autor

Gabriel Gutiérrez-Ospina  
 Departamento de Biología Celular y Fisiología,  
 Instituto de Investigaciones Biomédicas,  
 Universidad Nacional Autónoma de México,  
 México D.F., 04510.  
 Teléfono: 56 22 3865  
 Fax: 56 22 38 97

**Correo Electrónico:** gabo@servidor.unam.mx



## METABOLIC INDICES SHIFT IN THE HYPOTHALAMIC–NEUROHYPOPHYSIAL SYSTEM DURING LACTATION: IMPLICATIONS FOR INTERPRETING THEIR RELATIONSHIP WITH NEURONAL ACTIVITY

E. URIBE-QUEROL, E. MARTÍNEZ-MARTÍNEZ, M. TAPIA-RODRÍGUEZ, L. R. HERNÁNDEZ, B. TOSCANO-MÁRQUEZ, P. PADILLA AND G. GUTIÉRREZ-OSPINA\*

*Laboratory of Evolutionary and Developmental Neurobiology, Department of Cell Biology and Physiology, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Apartado Postal 70228, 04510 México, D.F., México*

**Abstract**—Metabolic indices of neuronal activity are thought to predict changes in the frequency of action potentials. There are stimuli that do not shift action potential frequency but change the temporal organization of neuronal firing following modifications of excitatory inputs by inhibitory synaptic activation. To our knowledge it is unknown whether this kind of stimulus associates with adjustments of metabolic markers of neuronal activity. Here, we used the hypothalamic–neurohypophysial system of lactating rats to address whether shifts in the temporal organization of neuronal firing relate with modifications of metabolic markers of neuronal activity. Cytochrome oxidase activity,  $^3\text{H}$ -2-deoxyglucose uptake, and the area occupied by blood vessels increased in the paraventricular nucleus and neurohypophysis of lactating rats, as compared with their virgin counterparts. Taken together, these results suggest that metabolic demands denote shifts in the temporal organization of action potentials related with the adjustment of excitatory synaptic activation, and support that changes in metabolic markers do not necessarily reflect shifts in the frequency of action potentials. © 2005 Published by Elsevier Ltd on behalf of IBRO.

**Key words:** paraventricular nucleus, succinic dehydrogenase, 2-deoxyglucose, neuronal plasticity, lactation, brain metabolism.

In the adult brain, it is thought that a significant fraction of the ATP synthesized from glucose oxidation is used to repolarize neuronal membranes following stimulation (Erecinska and Dagani, 1990; Sokoloff et al., 1996) and to fuel glial glutamate and sodium/potassium buffering systems (Pellerin and Magistretti, 1994; Sokoloff et al., 1996; Magistretti and Pellerin, 1999; Chatton et al., 2003; Loaiza et al., 2003). It is then assumed that increments in the frequency of action potentials after stimulation lead to increases in neuronal and glial energy metabolism (Dietrich et al., 1982; Humphrey and Hendrickson, 1983; Yarowsky

et al., 1983; Sokoloff et al., 1996; Magistretti and Pellerin, 1999; Sokoloff, 1999). Because of this assumption, metabolic indices such as blood flow, hemoglobin oxygenation, cytochrome oxidase activity and its oxidation state, uptake of glucose analogues, and capillary density are often used to map brain functions *in vivo* and in brain slices (Wong-Riley and Carroll, 1984; Nudo and Masterton, 1986; Mathiesen et al., 1998, 2000; Heekeren et al., 1999; Ichimi et al., 1999; Sheth et al., 2003; Conejo et al., 2004). Despite its acceptance, the concept that the frequency of action potentials correlates with metabolic activity has been challenged by observations that show that the frequency of neuronal spiking is not necessarily coupled with shifts in glucose uptake (Auker et al., 1983), blood flow (Lauritzen, 2001; Norup Nielsen and Lauritzen, 2001; Thomsen et al., 2004), and cytochrome oxidase oxidation state (Uludag et al., 2002; although see Heekeren et al., 1999; Uludag et al., 2004). Hence, metabolic markers have a non-linear relationship with neuronal spiking activity (Ances et al., 2000; Lauritzen, 2001; Sheth et al., 2003; although see Wobst et al., 2001).

Neuronal assemblies may process stimuli that do not associate with variations in action potentials frequency, but with a change in the distribution of action potentials over time (i.e. activity patterns). These types of stimuli do not shift the expression of markers commonly associated with neuronal activation or with increments in action potential frequency such as c-fos (Luckman et al., 1994). To our knowledge, it is yet unknown whether changes in the pattern of neuronal activation associate with shifts of neuronal metabolic demands. If this association occurs during meaningful behavioral states, it would have important implications for our understanding on the physiological bases underlying the generation of biological signals detected through functional imaging methods.

A good model to study the association between activity patterns and metabolic demands in neuronal networks is the magnocellular hypothalamic–neurohypophysial system during lactation. Under basal circumstances, the magnocellular neurons of the paraventricular nucleus in this system display a pattern of steady-state discharge. As nipple's pressure increases with suckling, however, these neurons show "periods of acceleration and after-inhibition [that when] combined, the total number of action potentials is not substantially different from the one observed during a similar period of background activity" (Wakerley and Lincoln, 1973). In this paper, we present data supporting that shifts in the temporal

\*Corresponding author. Tel: +52-55-5622-3865; fax: +52-55-5622-3897. E-mail address: gabo@correo.biomedicas.unam.mx (G. Gutiérrez-Ospina).

**Abbreviations:** SDH, succinic dehydrogenase; 2DG,  $^3\text{H}$ -2-deoxyglucose.

organization of action potentials during lactation associates with increases of metabolic demands in the hypothalamic–neurohypophysial system. Hence, the interpretation that changes in metabolic markers reflect only modifications in the frequency of neuronal spiking may be misleading (Riddle et al., 1993). We also advance the concept that shifts in metabolic indices also reflect changes in the temporal organization of neuronal activity associated with modifications of the strength of synaptic inputs. These results have important implications for the analysis and interpretation of neuroimaging studies.

## EXPERIMENTAL PROCEDURES

### Animals

Adult Sprague–Dawley female virgin and primiparous lactating rats (Charles River, Raleigh, NC, USA) were used in this study. Rats were housed under controlled conditions of lighting (12-h light/dark) and temperature with access to water and food *ad libitum*. Lactating rats were maintained with 12 pups until they were killed by midlactation (11 days postpartum). Animal handling and experimentation followed the Guidelines for Care and Use of Laboratory Animals published by the National Institutes of Health. The local Animal Rights and Research Committee at the Instituto de Investigaciones Biomédicas approved all experimental protocols. We minimized the number of rats used and their suffering or pain as much as possible.

### Succinic dehydrogenase activity

The measurement of the relative activity of oxidative enzymes has been used to monitor chronic metabolic demands associated with neuronal activity in brain slices (Riddle et al., 1993). SDH (Sigma, St. Louis, MO, USA) is an enzyme involved in the tricarboxylic acid cycle and respiratory chain, both pathways necessary for synthesizing ATP through glucose oxidation. To evaluate the relative activity of SDH, virgin and lactating rats ( $n=6$ /group) were deeply anesthetized with sodium pentobarbital (250 mg/kg i.p.) and killed by decapitation. The brains and hypophyses were quickly removed and frozen in 2-methylbutane (Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, MO, USA) prechilled with dry ice and stored at  $-70^{\circ}\text{C}$  until sectioning. Fifteen micron thick coronal and transverse sections from the anterior hypothalamus and hypophysis, respectively, were cut in a cryostat. These sections were stained with the histochemistry for SDH (Riddle et al., 1993). Tissue sections were examined with a bright field microscope (Nikon Optiphot-2 microscope, Nikon, Tokyo, Japan), and images were captured, digitized and analyzed using computer densitometry (see below).

### $^3\text{H}$ -2-deoxyglucose (2DG) uptake

Virgin and lactating rats ( $n=3$ /group) were anesthetized with ketamine/xylazine (40/2 mg/kg, respectively) and a catheter was implanted into the femoral vein (Riddle et al., 1993). After the surgical procedure, and once recovered from the anesthesia, virgin and lactating rats were returned to their home cages. Lactating rats had then their offspring for 48 h. In the day of the experiment, awake rats of either group were infused through the catheter with  $3\ \mu\text{Ci/g}$  of 2DG (American Radiolabeled Compounds, St. Louis, MO, USA). In the case of lactating rats, the offspring was removed from the home cage for 8–10 h before the experiment. Suckling was then allowed for 20–30 min prior to isotope injection, and it continued throughout the experiment. After the administration of 2DG, the animals were placed in a dark, silent environment for 45 min. By the end of this period, the rats were killed by an overdose of pentobarbital administered through

the catheter. Brains and hypophyses were removed, frozen and stored as described above. Coronal and transverse sections ( $15\ \mu\text{m}$ ) of the brain and hypophysis, respectively, were cut in a cryostat at  $-27^{\circ}\text{C}$ , thawed mounted onto slides coated with gelatin and processed for tritium autoradiography on film (Riddle et al., 1993). After 15 days at  $4^{\circ}\text{C}$ , the autoradiograms were developed and fixed. The corresponding tissue sections were stained with Cresyl Violet. Autoradiograms were observed under a bright field stereomicroscope (Nikon SMZ1500, Nikon, Tokyo, Japan), and images were captured, digitized and analyzed using computer densitometry (Scion Image beta 4.0.2, Scion Corp, Frederick, MD, USA).

### Densitometry

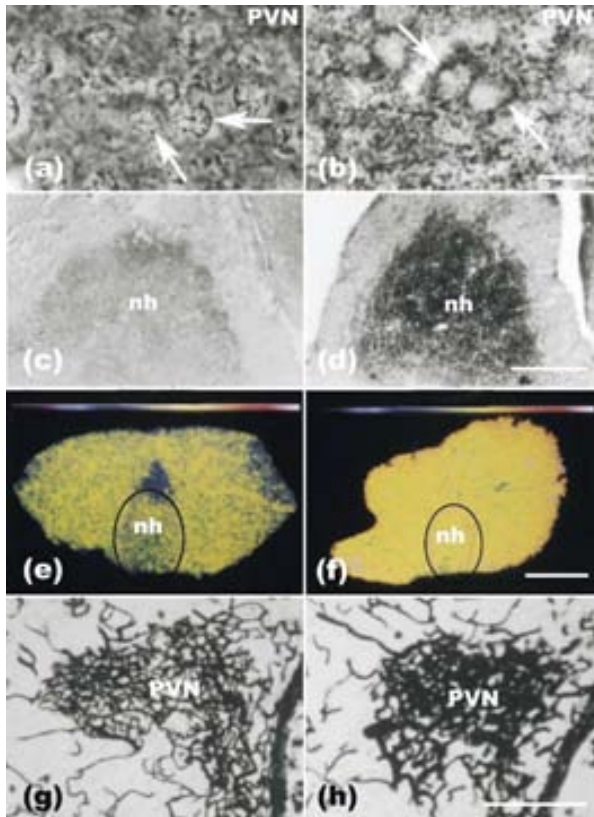
Images of the regions of interest were captured maintaining the same values of brightness and gain, and dark and bright reference images were used to correct for uneven illumination (Riddle et al., 1993). Three reasons guided our decision to carry out this study in the paraventricular nucleus. First, its anatomical distinctiveness. Second, the easiness to identify and outline individual magnocellular neurons. Third, single unit recordings have shown that these cells shift their activity pattern in response to suckling (Wakerley and Lincoln, 1973). For SDH, the density of the reaction product was assessed in individually traced magnocellular neurons (100 cells/animal group) and in the neurohypophysis as a whole. Only cells showing a negative image of the nucleus were included in the analysis. Regarding 2DG autoradiograms, it was not possible to determine 2DG accumulation in individual magnocellular neurons due to the resolution limits of this technique. The uptake of 2DG was then estimated in the paraventricular nucleus as a whole. The nucleus was outlined based on Cresyl Violet-stained sections. Optical density was estimated as a percentage of light transmittance relative to the fimbria hippocampus. Percent differences of densitometric values were averaged per animal and then per animal group. Statistical comparisons between virgin and lactating rats were carried out by using Student's *t*-test at a significance level of  $P<0.01$ .

### Percent area occupied by blood vessel

The area occupied by blood vessel is a good morphological indicator of chronic metabolic demands in excitable tissues. Therefore, we estimated this parameter in the paraventricular nucleus and neurohypophysis of virgin and lactating rats ( $n=6$ /group). The animals were anesthetized and perfused with a solution containing 2% paraformaldehyde and 0.5% glutaraldehyde followed by India ink (Riddle et al., 1993). The brains and hypophyses were removed and frozen as described above. Coronal brain sections ( $50\ \mu\text{m}$ ) containing the paraventricular nucleus and transverse sections ( $20\ \mu\text{m}$ ) of the hypophysis were cut in a cryostat, mounted on to gelatin-coated slides and slightly stained with Cresyl Violet. Once coverslipped, images of the paraventricular nucleus, neurohypophysis and fimbria hippocampus were captured and digitized. An outline of these regions was created for each section in which they appeared, and the percentage area occupied by blood vessels was estimated within this area. The values were averaged per section, animal and animal group. Mean values were compared among experimental groups by using Student's *t*-test at a significance level of  $P<0.01$ .

## RESULTS

Densitometric analyses showed that the activity of SDH and uptake of 2DG increase in the paraventricular nucleus and neurohypophysis as a result of lactation (Fig. 1a–f). Both increments were specially prominent in the neurohypophysis (Table 1) supporting that oxidative metabolism is



**Fig. 1.** Photomicrographs showing coronal sections of the paraventricular nucleus (PVN) and tangential sections of the neurohypophysis (nh) of virgin (a, c) and lactating (b, d) rats stained for SDH. Notice the difference in the distribution of the mitochondria in the PVN (arrows in a and b; scale bar=20  $\mu$ m) and the increase of staining in the PVN (c) and nh in lactating rats (d; scale bar=500  $\mu$ m). In accordance with SDH staining, the uptake of 2DG was greater in the nh of lactating rats (f) than in virgin rats (e; scale bar=1 mm); warmer colors indicate higher levels of deoxyglucose uptake. Photomicrographs in (g) and (h; scale bar=170  $\mu$ m) illustrate coronal sections of the PVN of virgin and lactating rats, respectively. The diameter and area occupied by blood vessels increased in lactating rats.

more intense in nerve terminals than in neuronal bodies (Mata et al., 1980). Magnocellular neurons not only displayed increased deposits of SDH reaction product in their cytoplasm, but a relocation of their mitochondria. While the perinuclear location was frequent in virgin rats, widespread

**Table 1.** Relative activity of SDH and uptake of 2DG in the paraventricular nucleus (PVN) and neurohypophysis (nh) of virgin and lactating rats

Group	Percentage difference relative to fimbria hippocampus (% $\pm$ SEM)			
	SDH activity		2DG uptake	
	PVN <i>n</i> =6	nh <i>n</i> =6	PVN <i>n</i> =3	nh <i>n</i> =3
Virgin	57 $\pm$ 1	3 $\pm$ 1	9 $\pm$ 1	2 $\pm$ 2
Lactating	67 $\pm$ 2* (17% $\uparrow$ )	33 $\pm$ 3* (1000% $\uparrow$ )	13 $\pm$ 1* (44% $\uparrow$ )	31 $\pm$ 1* (1450% $\uparrow$ )

Student *t*-test \* *P*<0.01.

**Table 2.** Percentage area occupied by blood vessels in the paraventricular nucleus (PVN), neurohypophysis (nh) and fimbria hippocampus (FH) of virgin and lactating rats

Group	Percentage of sampled area (% $\pm$ SEM)		
	PVN <i>n</i> =6	nh <i>n</i> =6	FH <i>n</i> =6
Virgin	64 $\pm$ 2	61 $\pm$ 1	8 $\pm$ 1
Lactating	70 $\pm$ 2* (9% $\uparrow$ )	70 $\pm$ 1* (15% $\uparrow$ )	8 $\pm$ 0.3

Student *t*-test \* *P*<0.01.

cytoplasmic distribution predominated in lactating ones (Fig. 1a, b).

Finally, the percent area occupied by blood vessels increased, relative to the fimbria hippocampus, in the paraventricular nucleus and neurohypophysis of lactating rats (Fig. 1g, h and Table 2). This difference likely results of greater blood vessel diameter and number (compare g and h in Fig. 1). As for SDH and 2DG, changes in the area occupied by blood vessels were more pronounced in the neurohypophysis than in the paraventricular nucleus. This supports that increments of the area occupied by blood vessels closely associate with increased metabolic demands (Table 2).

## DISCUSSION

Brain metabolic markers are thought to co-vary with action potential frequency. Current evidence suggests, nonetheless, that shifts in brain metabolic markers do not always reflect action potential frequency (Auker et al., 1983; Ances et al., 2000; Lauritzen, 2001; Norup Nielsen and Lauritzen, 2001; Caesar et al., 2003; Sheth et al., 2003; Thomsen et al., 2004). Here, we present data that support this view. Indeed, magnocellular neurons of the hypothalamic paraventricular nucleus shift their pattern of activity, but not much their action potential frequency during lactation (Wakerley and Lincoln, 1973). Yet, increments in the metabolic demands occur in the paraventricular–neurohypophysial pathway during suckling. This supports that metabolic indices of neuronal activity may reflect changes in the temporal organization of neuronal firing. This conclusion is strengthened by the fact that suckling and lactation do not elicit *c-fos* expression in the paraventricular and supraoptic nuclei (Fenelon et al., 1993; Luckman et al., 1994). This marker has been used to map neuronal activation in response to salt loading and dehydration, stimuli that increase action potential frequency in the hypothalamus–neurohypophysial system (Watt, 1970; Sutherland et al., 1983; Fenelon et al., 1993).

Despite striking advances in functional brain imaging, the cellular and molecular mechanisms that originate the signals detected by these techniques are still a matter of controversy (Magistretti and Pellerin, 1999; Lauritzen, 2001). It has been suggested, however, that the physiological processes involved in glutamate release and uptake, neuronal repolarization, blood flow and oxygenation,

glucose utilization and the activation of glial sodium/potassium ATPase contribute all in different degrees in the generation of signals captured during brain functional imaging studies. Our data complement these views by showing that metabolic demands also reflect shifts in the temporal organization of action potentials. Because this reorganization of activity patterns in the magnocellular paraventricular–neurohypophysial pathway results in an increase in the number of GABAergic terminals (Theodosis et al., 2004), our results suggest that a change of the GABAergic modulation of excitatory transmission may be another physiological source of signals in functional imaging studies. Our conclusion is in line with 1) the concept that GABA-mediated synaptic transmission does not contribute directly to brain imaging signals and that much of the energy consumption relates with glutamatergic transmission (Attwell and Laughlin, 2001). Furthermore, we believed that signals generated by the modulatory effect of GABA on the excitatory transmission are partly independent of glial cell functioning because GABA uptake into astrocytes is not associated with significant metabolic costs (Chatton et al., 2003).

The cellular components (i.e. neurons, glia and synapses) of the hypothalamic paraventricular nucleus undergo profound structural and functional changes when subjected to stimuli that increase or not action potential frequency. Although our results do not assess the contribution of the morphological plasticity to the increased metabolic demands in the paraventricular nucleus of lactating rats, we think such a contribution might be negligible. This is supported by studies that show that neuronal plasticity proceeds with no major changes in neuronal activity and metabolic demands (e.g. Chiaia et al., 1994).

Magnocellular neurons display subcellular plasticity when exposed to osmotic challenges. Increments in the size of their nucleus, in the amount of endoplasmic reticulum and in the number of nucleoli have been described (Hatton and Walters, 1973). Here, we illustrate a qualitative increase in the amount and changes in the distribution of mitochondria as a result of lactation. Although we did not carry out quantitative electron microscopy studies, a relative increase in the number of mitochondria per neuron must not be surprising since it has been reported in the visual cortex of rats exposed to environmental enrichment (Black et al., 1991). Also, activity-dependent redistribution of mitochondria was reported in neurons of the rat superior colliculus (Liu and Wong-Riley, 1994; Nie and Wong-Riley, 1996). Hence, changes in the amount and distribution of mitochondria likely relate with enduring shifts in metabolic demands associated with the reorganization of the neuronal firing, the enhancement of pathways of protein synthesis and secretion (Friesen and Astwood, 1967) and neuronal plasticity (Black et al., 1991) associated all with lactation.

In addition to the cellular and subcellular plasticity that occurs in the paraventricular nucleus, axons of the magnocellular neurons sprout and remodel in the neurohypophysis during lactation (Theodosis et al., 2004). This increment in the number of terminals, together with

increased metabolic demands, may explain the greater SDH activity and 2DG uptake observed in the neurohypophysis when compared with the paraventricular nucleus in lactating rats. A final consideration regarding plasticity in the hypothalamus–neurohypophysial system of lactating rats must be discussed. Although plasticity in the paraventricular nucleus and neurohypophysis in lactating rats has been attributed to increased neuronal activity, our observations suggest that this remodeling is better conceived as the result of a change in the pattern of neuronal activity during lactation. This distinction is important because it supports that shifts in the temporal organization of neuronal firing associated with changes of excitatory synaptic activation might be instructive or inductive of plasticity.

Shifts in the blood vessels density, area, diameter, and in blood flow and volume indicate ongoing changes of brain metabolic demands. Because all these parameters vary following acute and chronic neuronal activation, they are thought to reflect shifts in the levels of neuronal activity. In the present work we showed that lactation modifies the angio-architecture of the paraventricular nucleus and neurohypophysis, thus suggesting that it is also sensitive to changing patterns of neuronal activity and of synaptic activation. In addition, our observations are in line with increments in the blood volume, vascular cross-sectional area and number of blood vessels observed in the neurohypophysis following the application of hormone-releasing stimuli (Sooriyamoorthy and Livingston, 1972).

An interesting aspect of our observations regards the mechanisms inducing vascular changes and how the modifications in activity patterns/synaptic activation could instruct or induce them. The magnocellular neurons produce at least three angiogenic factors. The vascular endothelial growth factor (Ferrera et al., 1993), 14 kDa prolactin (Clapp et al., 1994), and nitric oxide (Calka and Block, 1993; Ceccatelli and Eriksson, 1993). These factors may act in concert to regulate the angio-architecture in the paraventricular and neurohypophysis during lactation. Although information supporting this possibility is lacking with respect to the two peptide messengers, nitric oxide participates in the coupling of cerebral blood flow with neuronal activation (Dirnagl et al., 1993; Akgoren et al., 1996; Thomsen et al., 2002) and promotes angiogenesis (Pipili-Synetos et al., 1993). In this regard, it is known that nitric oxide synthase gene expression increases in the paraventricular and supraoptic nuclei of lactating rats (Ceccatelli and Eriksson, 1993).

*Acknowledgments*—Authors are grateful to Laura Rivera and José G. Baltazar for their technical assistance, and to Brisa Santillán for figure editing. This work was supported by Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (J28035N, N38615), Programa de Apoyos para la Investigación y la Innovación Tecnológica, UNAM (IN203702, IN232604). E.U.-Q., E.M.-M., M.T.-R., L.R.H. and B.T.-M. are CONACyT fellows.



## REFERENCES

- Akgoren N, Dalgaard P, Lauritzen M (1996) Cerebral blood flow increases evoked by electrical stimulation of rat cerebellar cortex: relation to excitatory synaptic activity and nitric oxide synthesis. *Brain Res* 710:204–214.
- Ances BM, Zarahn E, Greenberg JH, Detre JA (2000) Coupling of neural activation to blood flow in the somatosensory cortex of rats is time-intensity separable, but not linear. *J Cereb Blood Flow Metab* 20:921–930.
- Attwell D, Laughlin SB (2001) An energy budget for signaling in the grey matter of the brain. *J Cereb Blood Flow Metab* 21:1133–1145.
- Auker CR, Meszler RM, Carpenter DO (1983) Apparent discrepancy between single-unit activity and [<sup>14</sup>C]deoxyglucose labeling in optic tectum of the rattlesnake. *J Neurophysiol* 49:1504–1516.
- Black JE, Zelazny AM, Greenough WT (1991) Capillary and mitochondrial support of neural plasticity in adult rat visual cortex. *Exp Neurol* 111:204–209.
- Caesar K, Thomsen K, Lauritzen M (2003) Dissociation of spikes, synaptic activity, and activity-dependent increments in rat cerebellar blood flow by tonic synaptic inhibition. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:16000–16005.
- Calka J, Block CH (1993) Angiotensin-(1–7) and nitric oxide synthase in the hypothalamo-neurohypophysial system. *Brain Res Bull* 30:677–685.
- Ceccatelli S, Eriksson M (1993) The effect of lactation on nitric oxide synthase gene expression. *Brain Res* 625:177–179.
- Chatton JY, Pellerin L, Magistretti PJ (2003) GABA uptake into astrocytes is not associated with significant metabolic cost: implications for brain imaging of inhibitory transmission. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:12456–12461.
- Chiaia NL, Fish SE, Bauer WR, Figley BA, Eck M, Bennett-Clarke CA, Rhoades RW (1994) Effects of postnatal blockade of cortical activity with tetrodotoxin upon the development and plasticity of vibrissa-related patterns in the somatosensory cortex of hamsters. *Somatosens Mot Res* 11:219–228.
- Clapp C, Torner L, Gutierrez-Ospina G, Alcantara E, Lopez-Gomez FJ, Nagano M, Kelly PA, Mejia S, Morales MA, Martinez de la Escalera G (1994) The prolactin gene is expressed in the hypothalamic-neurohypophysial system and the protein is processed into a 14-kDa fragment with activity like 16-kDa prolactin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:10384–10388.
- Conejo NM, Gonzalez-Pardo H, Vallejo G, Arias JL (2004) Involvement of the mammillary bodies in spatial working memory revealed by cytochrome oxidase activity. *Brain Res* 1011:107–114.
- Dietrich WD, Durham D, Lowry OH, Woolsey TA (1982) “Increased” sensory stimulation leads to changes in energy-related enzymes in the brain. *J Neurosci* 2:1608–1613.
- Dirnagl U, Lindauer U, Villringer A (1993) Role of nitric oxide in the coupling of cerebral blood flow to neuronal activation in rats. *Neurosci Lett* 149:43–46.
- Erecinska M, Dagani F (1990) Relationships between the neuronal sodium/potassium pump and energy metabolism. Effects of K<sup>+</sup>, Na<sup>+</sup>, and adenosine triphosphate in isolated brain synaptosomes. *J Gen Physiol* 95:591–616.
- Fenelon VS, Poulain DA, Theodosis DT (1993) Oxytocin neuron activation and Fos expression: a quantitative immunocytochemical analysis of the effect of lactation, parturition, osmotic and cardiovascular stimulation. *Neuroscience* 53:77–89.
- Ferrera R, Lares A, Berthod F, Guidollet J, Rodriguez C, Dureau G, Dittmar A (1993) Quantitative reduction of MTT by hearts biopsies in vitro is an index of viability. *J Mol Cell Cardiol* 25:1091–1099.
- Friesen HG, Astwood EB (1967) Changes in neurohypophysial proteins induced by dehydration and ingestion of saline. *Endocrinology* 80:278–287.
- Hatton GI, Walters JK (1973) Induced multiple nucleoli, nucleolar margination, and cell size changes in supraoptic neurons during dehydration and rehydration in the rat. *Brain Res* 59:137–154.
- Heekeren HR, Kohl M, Obrig H, Wenzel R, von Pannwitz W, Matcher SJ, Dirnagl U, Cooper CE, Villringer A (1999) Noninvasive assessment of changes in cytochrome-c oxidase oxidation in human subjects during visual stimulation. *J Cereb Blood Flow Metab* 19:592–603.
- Humphrey AL, Hendrickson AE (1983) Background and stimulus-induced patterns of high metabolic activity in the visual cortex (area 17) of the squirrel and macaque monkey. *J Neurosci* 3:345–358.
- Ichimi K, Kuchiwaki H, Inao S, Shibayama M, Yoshida J (1999) Cerebral blood flow regulation under activation of the primary somatosensory cortex during electrical stimulation of the forearm. *Neuro Res* 21:579–584.
- Lauritzen M (2001) Relationship of spikes, synaptic activity, and local changes of cerebral blood flow. *J Cereb Blood Flow Metab* 21:1367–1383.
- Liu S, Wong-Riley M (1994) Nuclear-encoded mitochondrial precursor protein: intramitochondrial delivery to dendrites and axon terminals of neurons and regulation by neuronal activity. *J Neurosci* 14:5338–5351.
- Loaiza A, Porras OH, Barros LF (2003) Glutamate triggers rapid glucose transport stimulation in astrocytes as evidenced by real-time confocal microscopy. *J Neurosci* 23:7337–7342.
- Luckman SM, Dyball RE, Leng G (1994) Induction of c-fos expression in hypothalamic magnocellular neurons requires synaptic activation and not simply increased spike activity. *J Neurosci* 14:4825–4830.
- Magistretti PJ, Pellerin L (1999) Cellular mechanisms of brain energy metabolism and their relevance to functional brain imaging. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 354:1155–1163.
- Mata M, Fink DJ, Gainer H, Smith CB, Davidsen L, Savaki H, Schwartz WJ, Sokoloff L (1980) Activity-dependent energy metabolism in rat posterior pituitary primarily reflects sodium pump activity. *J Neurochem* 34:213–215.
- Mathiesen C, Caesar K, Akgoren N, Lauritzen M (1998) Modification of activity-dependent increases of cerebral blood flow by excitatory synaptic activity and spikes in rat cerebellar cortex. *J Physiol* 512 (Pt 2):555–566.
- Mathiesen C, Caesar K, Lauritzen M (2000) Temporal coupling between neuronal activity and blood flow in rat cerebellar cortex as indicated by field potential analysis. *J Physiol* 523 (Pt 1):235–246.
- Nie F, Wong-Riley MT (1996) Mitochondrial- and nuclear-encoded subunits of cytochrome oxidase in neurons: differences in compartmental distribution, correlation with enzyme activity, and regulation by neuronal activity. *J Comp Neurol* 373:139–155.
- Norup Nielsen A, Lauritzen M (2001) Coupling and uncoupling of activity-dependent increases of neuronal activity and blood flow in rat somatosensory cortex. *J Physiol* 533:773–785.
- Nudo RJ, Masterton RB (1986) Stimulation-induced [<sup>14</sup>C]-deoxyglucose labeling of synaptic activity in the central auditory system. *J Comp Neurol* 245:553–565.
- Pellerin L, Magistretti PJ (1994) Glutamate uptake into astrocytes stimulates aerobic glycolysis: a mechanism coupling neuronal activity to glucose utilization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:10625–10629.
- Pipili-Synetos E, Sakkoula E, Maragoudakis ME (1993) Nitric oxide is involved in the regulation of angiogenesis. *Br J Pharmacol* 108:855–857.
- Riddle DR, Gutierrez G, Zheng D, White LE, Richards A, Purves D (1993) Differential metabolic and electrical activity in the somatic sensory cortex of juvenile and adult rats. *J Neurosci* 13:4193–4213.
- Sheth S, Nemoto M, Guiou M, Walker M, Pouratian N, Toga AW (2003) Evaluation of coupling between optical intrinsic signals and neuronal activity in rat somatosensory cortex. *Neuroimage* 19:884–894.
- Sokoloff L (1999) Energetics of functional activation in neural tissues. *Neurochem Res* 24:321–329.

- Sokoloff L, Takahashi S, Gotoh J, Driscoll BF, Law MJ (1996) Contribution of astroglia to functionally activated energy metabolism. *Dev Neurosci* 18:344–352.
- Sooriyamoorthy T, Livingston A (1972) Variations in the blood volume of the neural and anterior lobes of the pituitary of the rat associated with neurohypophysial hormone-releasing stimuli. *J Endocrinol* 54:407–415.
- Sutherland RC, Martin MJ, McQueen JK, Fink G (1983) Water deprivation results in increased 2-deoxyglucose uptake by paraventricular neurones as well as pars nervosa in Wistar and Brattleboro rats. *Brain Res* 271:101–108.
- Theodosis DT, Piet R, Poulain DA, Olier SH (2004) Neuronal, glial and synaptic remodeling in the adult hypothalamus: functional consequences and role of cell surface and extracellular matrix adhesion molecules. *Neurochem Int* 45:491–501.
- Thomsen K, Offenhauser N, Lauritzen M (2004) Principle neuron spiking: neither necessary nor sufficient for cerebral blood flow in rat cerebellum. *J Physiol* 560: 181–189.
- Thomsen K, Rubin I, Lauritzen M (2002) NO- and non-NO-, non-prostanoid-dependent vasodilatation in rat sciatic nerve during maturation and developing experimental diabetic neuropathy. *J Physiol* 543:977–993.
- Uludag K, Kohl M, Steinbrink J, Obrig H, Villringer A (2002) Cross talk in the Lambert-Beer calculation for near-infrared wavelengths estimated by Monte Carlo simulations. *J Biomed Opt* 7:51–59.
- Uludag K, Steinbrink J, Kohl-Bareis M, Wenzel R, Villringer A, Obrig H (2004) Cytochrome-c-oxidase redox changes during visual stimulation measured by near-infrared spectroscopy cannot be explained by a mere cross talk artefact. *Neuroimage* 22:109–119.
- Wakerley JB, Lincoln DW (1973) The milk-ejection reflex of the rat: a 20- to 40-fold acceleration in the firing of paraventricular neurones during oxytocin release. *J Endocrinol* 57:477–493.
- Watt RM (1970) Metabolic activity in single supraoptic neurones and its relation to osmotic stimulation. *Brain Res* 21:443–447.
- Wobst P, Wenzel R, Kohl M, Obrig H, Villringer A (2001) Linear aspects of changes in deoxygenated hemoglobin concentration and cytochrome oxidase oxidation during brain activation. *Neuroimage* 13:520–530.
- Wong-Riley M, Carroll EW (1984) Effect of impulse blockage on cytochrome oxidase activity in monkey visual system. *Nature* 307: 262–264.
- Yarowsky P, Kadekaro M, Sokoloff L (1983) Frequency-dependent activation of glucose utilization in the superior cervical ganglion by electrical stimulation of cervical sympathetic trunk. *Proc Natl Acad Sci U S A* 80:4179–4183.

*(Accepted 12 May 2005)*  
*(Available online 28 July 2005)*

Dr. Pat Levitt

Senior Editor  
Development/Plasticity/Repair Neuroscience

***Journal of Neuroscience***

**The elaboration of connections in the barrel cortex of developing rats follows the concurrent formation-elimination model**

Running Title: Circuit formation strategies in the barrel cortex

Eileen Uribe-Querol, Luis R. Hernández, Patricia Padilla, Eduardo Martínez-Martínez  
Horacio Merchant-Larios, and Gabriel Gutiérrez-Ospina\*

**Department of Cell Biology and Physiology**

Biomedical Research Institute  
National Autonomous University of México  
México D.F., México 04510

\*To whom correspondence should be addressed:

Gabriel Gutiérrez-Ospina  
Laboratory of Integrative Biology

**Biomedical Research Institute**

National Autonomous University of México  
México D.F., México 04510  
Pone: (525) 622-3865  
Fax: (525) 622-3897  
Email: [gabo@correo.biomedicas.unam.mx](mailto:gabo@correo.biomedicas.unam.mx)

Figures: 7  
Tables: none  
Pages: 18  
Words in manuscript: 8,041  
Words in Abstract: 249  
Words in Introduction: 517

Keywords: Synaptogenesis, axonal growth, dendritic growth, circuitry development, fractals, neurofilaments, microtubule associated protein,

Acknowledgments: Authors are thankful to Laura Rivera, Apolinar and José Guadalupe Baltazar for valuable technical assistance. Funds for supporting this work were provided by CONACyT J28035N and 38615N, Roche-Syntex, Miguel-Aleman Foundation, Ricardo Zevada Foundation and DGPA. EUQ, EMM and LRH were fellows of CONACyT.

#### Abstract

The strategy used by neurons to form circuits in the barrel cortex is yet a matter of controversy. Some investigators think that barrel circuits result from a sequence of overproduction and elimination of supernumerary axonal and dendritic branches and synapses. Others suggest that the precise addition of neuronal processes and synapses underlies the development of barrel circuits. In this study we evaluated the pattern of dendritic, axonal and synaptic elaboration in the barrel cortex of developing rats during the first month of life. Morphometric analyses of terminal arbors of DiI-traced thalamocortical afferents and dendritic arbors of Golgi-impregnated spiny stellate neurons show that both types of processes tend to branch extensively during the first 15 days of life. Between this age and postnatal day 25, both axonal and dendritic arbors retract the distal-most, highest order processes, while elongate more stable, lower order branches. Regardless of this phase of arbor remodeling, the overall complexity of axons and dendrites increases, as it does synapse density. Immunocytochemical and Western blot studies show an increment in the content of proteins considered dendritic, axonal and synaptic markers during this period. Finally, cytochrome oxidase activity in barrels increased with age. Overall these results support that neural circuits in the barrel cortex are build up through molding arbors by forming and eliminating concurrently dendritic and axonal branches. During this molding process, there is a predominance of additive events that lead to increased complexity and synapse density. The whole process is accompanied by increments in oxidative metabolic demands.

During the ontogeny of the nervous system, axonal and dendritic branches as well as synapses are thought to be formed in numbers that far exceed the amount required by the mature brain to function properly. It is widely accepted that the stage of overproduction of neuronal processes and synapses is followed by the elimination of an important fraction of them. The process of elimination is driven by competition; axons or dendrites compete for synaptic partners that may provide neurotrophic factors in sufficient amount to consolidate synapses and retain axonal and dendritic branches (Purves, 1988). Axonal and dendritic branches that establish synaptic-like contacts with incorrect partners are eliminated because they do not receive enough trophic support.

Even though the notion described above constitutes the dominant view about how the developing brain sculpts its circuitry, increasing evidence supports that the selectionist scenario is by no means a universal rule. Indeed, anatomical evidence gathered during the development of different brain structures support that axons may grow towards and within their targets by preferentially adding branches with high degree of precision until they attain their adult size (Crowley and Katz, 2000). Similarly, abundant evidence recently summarized by Quartz & Sejnowski (Quartz and Sejnowski, 1997) pinpoints that the dendritic arbors of some classes of neurons may develop preferentially by summing up branches until reaching their adult configuration. White et al (White, 1976) and Micheva & Beaulieu (Micheva and Beaulieu, 1996, 1997) also showed that, at least in the rodent primary somatosensory cortex (S1), both glutamatergic and GABAergic synapses increase their numbers during the first month of life, and no evidence of synapse elimination was reported from this age to adulthood.

An adequate system to study the strategies used by neurons to generate circuits is the rodent S1. This cortical area contains a representation of the body formed by modules termed barrels. Each barrel represents collections of mechanosensory receptors distributed throughout the body. Barrels also are the locale where thalamic afferents from neurons of the ventro postero medial (VPM) nucleus meet dendrites of the spiny stellate neurons placed in the cortical layer IV. Previous studies aimed at unraveling the strategy used by these elements to establish synaptic connections have reached controversial results. While some investigations support a regression-based strategy (Senft and Woolsey, 1991), other suggest a more constructive scenario (Killackey and Belford, 1979). To our knowledge this controversy has not been properly settled. It might be claimed that the disagreement arises from technical issues or be associated with species differences (mice v.s. rats). We think, however, that discrepancies result from the lack of information on the overall developmental pattern of VPM afferents and spiny stellate neuron dendrites over a period long enough to ensure a certain degree of morphological stability. In the rat S1 this seems to occur after the first month of life, when dendritic architecture and synapse density reach their adult values (Curcio and Hinds, 1983; White and Keller, 1987) Therefore, the aim of the present work was to analyze the strategy used by neurons that integrate the thalamo-cortical circuit to establish their synaptic relations during the first month of life.

## **Materials and Methods**

### *Animals*

To carry out the experiments described above male Wistar rats were euthanized with pentobarbital (45mg/Kg of body weight) at postnatal days (PD) 5, 10, 15, 20, 25 and 30. Litters were adjusted to eight pups each. Pups were kept with their mothers until weaning at PD21. Rats were housed in controlled temperature/lighting rooms having free access to food and water. Animal care and procedures were conducted according to the National Institutes of Health *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*. Experimental protocols were approved by local animal rights' committee at Biomedical Research Institute, National Autonomous University of Mexico.

#### *Immunocytochemistry*

Rats were euthanized and perfused with saline (0.15 M) followed by a solution containing buffered paraformaldehyde (4%). Brains were dissected and postfixed in the same fixative for 2 hours at room temperature and cryoprotected with 20% sucrose in 0.1 M PB. Brains were then frozen in 2-methylbutane chilled with dry ice. Serial coronal slices (30  $\mu$ m thick) were cut in a cryostat. Free-floating sections were incubated in blocking solution (3% bovine serum albumin, 0.1% triton X-100 and 0.025% sodium azide in PB). Slices of each age were processed in parallel simultaneously. Some of these slices were processed for cytochrome oxidase (see below) and used as a template to locate barrels precisely. The blocking step lasted 12 hours and was carried out at 4°C. Slices were incubated with the primary antibodies diluted in blocking solution, overnight at 4°C. The primary antibodies used were rabbit anti-Shank 2 (1:200; Zymed Laboratories, Inc., South San Francisco, CA), rabbit anti-human synaptophysin (1:5,000; DAKO Cytomation A/S Glostrup, Denmark), rabbit anti-neurofilament 150kDa or medium-sized neurofilaments protein (1:1,000) and mouse anti-microtubule-associated protein 2 a & b (MAP2; 1:1,000) from Chemicon International, Inc. Temecula CA. After washing with PB triton X-100 (0.1%; PBT), the slices were incubated with biotinylated goat anti-rabbit or anti-mouse secondary antibodies (1:500; Vector Laboratories, Burlingame, CA) at room temperature for 1.5 hours. After several washes with PBT, slices were incubated for 60 min with the avidin-biotin-peroxidase complex at room temperature, as recommended by the supplier (ABC kit; Vector Laboratories). Peroxidase activity was revealed and intensified by using 3,3'-diamobenzidine tetrahydrochloride (DAB), hydrogen peroxidase and nickel chloride as recommended by the supplier (Peroxidase staining kit; Vector Laboratories). Finally, the slices were washed, mounted on to glass slides coated with gelatin, air dried and coverslipped with cytoseal. Images of the immunostained barrels were captured and digitized at 40X (MAP2 and neurofilaments) and 100X (synaptophysin and Shank-2) using axioshop (Ziess, Thornwood, NY). Such images were used to study qualitatively the distribution and changes in the immunostained cells, dendritic and axonal processes (MAP2 and neurofilaments, respectively) and changes in the amount and distribution of potential pre and postsynaptic sites (synaptophysin and shank-2, respectively) within layer IV of S1 during the first month of life.

#### *Western Blot*

Cortices of euthanized rats were quickly removed, flattened and S1 samples were obtained as previously described (Strominger and Woolsey, 1987). Samples were homogenized in lysis buffer (NaCl 100 mM, phenylmethylsulfonyl fluoride 1 mM, Triton

1% in Tris-HCl 10 mM, pH 8.0) supplemented with protease inhibitors (EDTA-Free; Roche Indianapolis, IN) and centrifuged at 14000 rpm for 20 minutes at 4°C. Protein concentration was determined by Bradford. Protein samples (20 µg/lane) were resolved by SDS-PAGE as Laemmli for MAP2, neurofilaments and PSD-95. Tris-Tricine gels were used for synaptophysin. Gels were transferred to nitrocellulose membranes and blocked with 5% calcium-free milk in Tris-Saline (20 mM/37 mM, pH 7.5) supplemented with 0.05% Tween (TTBS). Membranes were then incubated with primary antibodies: rabbit anti-human synaptophysin (1:5,000; DAKO Cytomation A/S Glostrup, Denmark), rabbit anti-neurofilament 150kDa (1:10,000); mouse anti-microtubule-associated protein 2 a & b (MAP2; 1:1,000) and rabbit anti-postsynaptic density protein 95 (PSD-95; 1:200) all from Chemicon International, Inc. Temecula CA, overnight at 4°C. After washing with TTBS, membranes were incubated with the corresponding biotinylated secondary antibodies (1:500 Vector Laboratories, Burlingame, CA) for two hours at room temperature. Membranes were incubated with the avidin-peroxidase complex for 1 hour at room temperature, as recommended by the supplier (ABC kit; Vector Laboratories). Protein bands were identified by using a chemiluminescence-based detection kit according to the protocol suggested by the manufacturer (ECL, Amersham-Pharmacia-Biotech, Buckinghamshire, UK). Membranes were exposed to film sheets (Biomax film; Eastman Kodak Co., Rochester, NY). Films were digitized (Fluor-S Bio-Rad, Hercules, CA). Densitometry values were obtained using Quantity One software (Bio-Rad). Briefly, bands were outlined manually and a rectangle was drawn as background. The program calculated the optical density measures by subtracting the background of each band. Measurements of 5 blots for each marker were average and reported as folds relative to day 5. The values obtained for each parameter were compared statistically among different ages by using ANOVA ( $p < 0.05$ ) and Tukey test.

#### *Dendritic morphology*

Euthanized rats were decapitated and their brains were rapidly dissected and immerse in a Golgi-Cox solution and kept during three months at room temperature (Ramón y Cajal and Castro y Pascual, 1933). After this period, 120 µm vibratome (Vibratome, St. Louis, MO) coronal slices were obtained, dehydrated, cleared and mounted onto gelatin coated slides and coverslipped with cyto seal. Impregnated cortical layer IV spiny stellate neurons ( $n=50/\text{age}$ ) were drawn with the aid of a camera lucida. These drawings were scanned and digitalized. Digital images were then used to perform a morphometric analysis by measuring: total branch number, total branch number per order (first order branches emerge from the soma in the case of dendrites and first order branches emerge from the first branching point of axons within layer IV), total length and total length per branch order by using the software Scion Image (ScionCorp, Beta 4.0.2). To evaluate dendritic arbor complexity, a fractal analysis was carried out using the box counting method with the software harmonic and fractal image analyzer (HarFa; version 5.0). The values obtained for each parameter were compared statistically among different ages by using Kruskal-Wallis ANOVA ( $p < 0.05$ ) and Tukey test using the sigma stat program (Sigma Stat 3.0).

#### *Axonal Morphology*

Rats were euthanized and perfused with saline (0.15 M) followed by a solution containing paraformaldehyde (4%) and glutaraldehyde (0.5%) in phosphate buffer (PB; 0.1 M, pH 7.4). After decapitation, the heads were placed into jars containing the same fixative at room temperature for a week. Stereotaxic 1,1'-dioctadecyl-3,3,3',3'-tetramethylindocarbocyanine perchlorate (DiI, Molecular Probes, Eugene, OR) injections (0.5-1  $\mu$ l, 0.025% in ethanol) were placed into the ventrobasal complex of the thalamus avoiding crossing over S1. Heads were placed back into light protected jars containing the same fixative. In younger animals (PD5 to PD15), proper DiI labeling was obtained after two months at room temperature. For older animals, it was necessary to allow dye diffusion for over 9 months at room temperature. After this time, coronal sections (200  $\mu$ m) of the barrel field were obtained using a vibrotome, mounted on to gelatin-coated slides and coverslipped with glycerol. Barrels of the postero-medial subfield were identified and individual axonal arbors within them drawn with the aid of a camera lucida (PD 5 n=48; PD 10 n=24; PD15 n=11; PD25 n=8). PD25 axon images were obtained by a two-dimension reconstruction with the aid of a LSM 5 Pascal confocal microscope (Zeiss MicroImaging, Inc. Thornwood, NY). All drawings were scanned and digitized and the same morphometric analysis for dendrites was done, see above. The values obtained for each parameter were compared statistically among different ages by using Kruskal-Wallis ANOVA ( $p < 0.05$ ) and Dunn's method.

#### *Synapse Density*

Rats were euthanized and perfused with saline solution (0.15 M) followed by Karnovsky's fixative. Brains were obtained and cortices dissected, flattened and postfixed for at least 24 hours at 4°C in the same fixative. Vibratome tangential sections (200-250  $\mu$ m) were cut and used to identify C3 and D3 barrels of the postero-medial barrel subfield by trans-illumination under a dissecting microscope. Once identified, barrels were dissected using a 2mm diameter dissecting needle (Cuello, 1983), tissue slabs were postfixed, contrasted in 1% osmium tetroxide and epon included. Tissue slabs were then cut using an ultramicrotome and three ultrathin sections 65  $\mu$ m apart from each other were mounted in formvar-coated grids. This allowed the sampling of each barrel at its upper, middle and lower levels. To avoid the observer's bias, the epon blocks containing the samples were coded before being sectioned by a technician who was not involved in performing the final observations and analyses. The density of synaptic profiles was estimated using the single section method described previously (Chang *et al.*, 1993). Although this is not an unbiased method, it has been shown to produce results similar to those obtained with the dissector method when the goal is to determine relative changes in synapse number and density rather than estimations of absolute number of synapses (Wilson, 1998). The average number of synaptic contacts per 100 microns for each age group was then estimated. The values obtained were compared statistically among different ages by using One Way ANOVA ( $p < 0.05$ ) and Tukey test.

*Cytochrome oxidase.* This histochemistry was used as a benchmark of the relative position and organization of layer IV S1 barrels in all ages evaluated and to evaluate the activity within the barrels. As mentioned above some of the slices used for immunocytochemistry were used for cytochrome oxidase histochemistry. In order to reveal cytochrome oxidase activity as described previously (Wong-Riley, 1989). Briefly,



free-floating slices were incubated in CO solution (0.05% DAB, 0.03% cytochrome c and 0.02% catalase in 0.1M PB) for four hours at 37°C. The reaction was halted with three washes of 15 minutes with PBS. Images from sections in which barrels appeared were captured and digitized. Densitometry was analyzed using the Scion Image software. Values were compared statistically among different ages by using ANOVA ( $p < 0.05$ ) and Tukey test.

## Results

### **MAP2 and neurofilament immunoreactivity and content increased in S1 during the first month of life**

Immunocytochemical staining for MAP2a & b and neurofilaments are commonly used to evaluate dendritic and axonal growth (Dehmelt and Halpain, 2005), increments in these proteins immunoreactivity are thought to reflect more complex arbors. Western blot analyses, on the other hand, allow establishing overall changes in the content of dendritic and axonal cytoskeletal proteins. Despite their limitations we considered necessary to carry out these sorts of experiments to have a general idea about the pattern of dendritic and axonal development within barrels and in S1 as a whole before heading towards a more detailed anatomical study. Immunocytochemistry for MAP2 (Fig1A-C) within barrels showed increments in the amount of neuronal processes and cell bodies stained from PD5 to PD15. After PD15, the amount of neuronal elements for MAP2 stained change little. At all ages apical dendrites from layer V pyramidal cells displayed MAP2 immunostaining. Western blot analyses showed that the content of MAP2 in the developing S1 tend to increase from PD5 to PD20. There was however a decrease in MAP2 availability at PD15 that probably reflects remodeling of dendritic arbors at this age (see below; Fig. 1G). The percentages of difference relative to PD5 were 85% at P10; 44% at P15; 112% at P20; 133% at P25 and 123% at PD30.

The amount of axons showing immunoreactivity for neurofilaments increased inside barrels from PD5 to PD15 (Fig. 1D-F). Following this age neurofilaments staining is also seen in somas and dendrites of cortical neurons. Western blot analyses showed increments in the content of neurofilaments in S1 from PD5 to PD15. The content remains similar until PD30. In the case of neurofilaments there was an increment from PD5 to PD15. From PD15 to PD30 there was no changes (Fig. 1H). The percentages of difference relative to PD5 were 42% at P10; 84% at P15; 85% at P20; 109% at P25 and 80% at P30.

### **Although spiny stellate cell dendrites and thalamo-cortical arbors within layer IV remodel, they increase in complexity during the first month of life**

Immunocytochemistry and Western blot analyses suggested increments in complexity of dendritic and axonal arbors. To address in greater detail the development of dendritic (spiny stellate neurons) and axonal (thalamo-cortical) arbors within S1 barrels, we analyzed the morphology of Golgi impregnated cortical neurons and DiI traced axons. Figure 2 illustrates representative drawings of the simplest and the most complex dendritic arbors of spiny stellate neurons at PD5(A), PD15(B), and PD25(C). At PD5 the

cells presented very few, short and single or poorly ramified branches. Later, at PD15 the neurons increased their size, presented abundant longer single or more ramified branches. It was also seen that branches emerge radially from the neuron. By PD25 the number and length of the dendrites looked similar than PD15 neurons, the difference is that the branches were orientated to the hollow of the barrel, this is typically seen when thalamo-cortical axons contact these neurons. Although there is a great variety of neurons within the same age, increments in arbor complexity were clearly seen from PD5 to PD15 or PD25. From the drawings of 50 neurons per age, total branch number and total length were measured (Fig. 3A-D). Total branch number of dendritic arbors showed increments between PD5 and PD15 ( $p < 0.05$ ) followed by a slightly but not significant decrease in their number at PD25 (Fig. 3A). Total length of dendritic arbors also showed increments until PD15 ( $p < 0.05$ ), that stabilizes from PD15 to PD25 (Fig. 3C).

Total branch number of axons also increased from PD5 to PD15 ( $p < 0.05$ ) and slightly decrease at PD25 (Fig. 3B). Similarly, total length increased from PD5 to PD25 ( $p < 0.05$ ; Fig. 3D). Even though there is a dynamic process the complexity of the arbors was measured by fractal dimension analyses. Both dendritic and axonal arbor complexity enhanced during the first two postnatal weeks (Fig. 3E and F). After reaching the maximum value at PD15 no more changes were seen. To address which of the branches were involved in the slightly decreases in number at different ages, the total branch number and total length per branch order were measured (Fig. 4). Dendritic branches that grow from the soma are called first order branches and when these ones branch again they give rise to second order branches and so on. PD5 spiny stellate neurons branched until 4<sup>th</sup> order, PD15 neurons got branches of 9<sup>th</sup> order and PD 25 neurons to 8<sup>th</sup> order, so branches from 9<sup>th</sup> order were lost from PD15 to PD25 (Fig. 4A,C). Axonal branches from PD5 to PD15 increased from 9 to 17<sup>th</sup> order. And for PD25 branches from 15<sup>th</sup>, 16<sup>th</sup> and 17<sup>th</sup> order were lost (Fig. 4B, D). It is also evident that the number of branches per order is higher at PD15 for dendrites and axons (Fig. 4A, B). In the opposite side the length had an inverse result it was longer for PD25 branches than for PD15 ones (Fig. 4B, D). These results are evidence for a dynamic process of growth in the dendritic and axonal arbors during the first month of life. It is important to remember the diversity of neurons at each age so not all of them present all dendritic or axonal branching orders, Table 2 summarizes the percentages of cells that present each order at each age. It is evident from dendrites percentages that branches from 4<sup>st</sup> order are stable but from higher orders can vary the quantity. In the case of axons this stability is reached for 8<sup>th</sup> order branches. Taking all together we can conclude that the core of dendritic and axonal arbors stabilizes and the periphery is more dynamic.

### *Synaptic development in S1*

We evaluated the quantity of three synapse markers in layer IV S1 barrels: synaptophysin, PSD-95 and Shank2. Synaptic vesicle-associated proteins are usually used to visualize potential synaptic terminals. Synaptophysin is an integral protein of synaptic vesicle membranes and it is thought to be involved in the formation of an exocytotic fusion pore during vesicle release (Jahn *et al.*, 1985; Thomas *et al.*, 1988).

PSD-95 and Shank-2 are two proteins of the postsynaptic density that is a scaffold of proteins that anchor NMDA and AMPA receptors between other molecules. Immunohistochemistry for Shank2 at PD5 revealed tiny dots inside the soma and processes (Fig. 5A). At PD15 the immunostaining continued in somas but also around cells and in the neuropil (Fig. 5B). By PD25 the immunostaining intensifies in number, somas are highly stained and dots can be seen all over the barrel (Fig. 5C). The label for synaptophysin is different it appears surrounding somas. This perisomatic label increased by PD15 and became more prominent by PD25 (Fig. 5D-F). These results revealed that potential synaptic sites increased with age. Western blot analyses showed that the content of PSD-95 was undetectable until PD10 and it increased progressively from PD10 to PD25 and an important increment was seen from PD25 to PD30 ( $p < 0.05$ ; Fig. 5G). The percentages of difference relative to PD10 were 17% at P15, 24% at P20, 62% at P25 and 161% at P30. Western blot analyses for synaptophysin showed a gradual increase from PD5 to PD30 ( $p < 0.05$ ; Fig. 5H). The percentages of difference relative to PD5 were 41% at P10, 128% at P15, 190% at P20, 240% at P25 and 275% at P30. Both results reflect that the content of synaptic markers increased importantly with age and this could be the case of synapses. To estimate synaptic density within S1 barrels, electron microscopy studies were conducted during at PD5, PD15 and PD30 (Fig. 6A-C). Synapse density doubles approximately from PD5 to PD15, between PD15 and PD30 there is also an increment of 46% ( $p < 0.05$ ; Fig. 6D). These results suggest that the number of synapses increases during the first month of life.

### *Cytochrome Oxidase Activity*

Cytochrome oxidase histochemistry has been widely used to localize S1 barrels and to determine synaptic activity (Wong-Riley, 1989) Fig. 7 illustrates coronal sections of S1 cortex where barrels were clearly stained at PD5 (A), PD15 (C) and PD25 (E). The size of the barrels incremented with age as the staining did. Magnification of each barrel illustrated sites of mitochondrial activity. At PD5 increased tiny dots were present all over and around somas. This staining was intensified and the dots number increased with age. There can be seen highly stained sites surrounding somas (Fig 7B, D, F). The percentages of difference relative to PD5 were 22% at P10, 48% at P15, 105% at P20, 104% at P25 and 130% at P30 ( $p < 0.05$ ; Fig. 7G). These results showed that the activity within the barrels increased during the first month of life.

### Discussion

In rodents, the ontogenetic strategy that follows the somatosensory thalamocortical pathway to establish neural circuits is still controversial. While some groups sustain that neural circuits are built up through a selectionist mechanism (Senft and Woolsey, 1991; Schlaggar and O'Leary, 1994), other sustain that this process is given through a different mechanism known as constructivist (Agmon et al., 1993; Agmon et al., 1995; Catalano et al., 1996). Our results do not support any of these positions. The results suggests that axons and dendrites add branches until PD15, then they remodel through a processes of elimination of the ending branches concurrently with the elongation and stabilization of more proximal branches. This form of assembly of the dendritic and axonal arbors is

compatible with the model of concurrent formation-elimination proposed recently by Hua and Smith (Hua and Smith, 2004), in which the selective growth of branches and the elimination of some of them occur simultaneously. Our results add three important elements to the model previously described. First, it seems that in a first phase, dendritic and axonal arbors predominantly add (or form) elements. In a second phase, the dendritic and axonal branches undergo elimination events at the same time that there is an elongation of those branches that remain. The third element that contributes to the model of concurrent formation-elimination is that the portion of the arbors that this holds to restructuring through the events of elimination is the more distal, what suggests that the ontogeny of the proximal portions of the dendritic and axonal arbors are regular differentially and that its development is, up to a point, independent the one of the other. It is important to emphasize that in spite of the intense restructuring to which are subjects the dendritic and axonal arbors between PD15 and PD25, both increase in complexity. This conclusion is supported in the values obtained of fractal analysis that show an increase in the complexity of the dendritic and axonal arbors. Also there is a tendency to increase in the content of neurofilaments and MAP2a&b in S1 with the age (Riederer and Matus, 1985). There is a decrement in the content of MAP2a&b at PD15 that could reflect the process of restructuring that occurs in the portions that are eliminated or elongated in the dendritic arbors. So, we propose a model in which the formación-eliminación-elongation-increase the complexity of the dendritic and axonal arbors in different phases of the ontogeny of the thalamocortical pathway during the first 25 days of life. Our model proposed does not only find support in our results but in data obtained during the ontogeny of axonic arbors of the sensory neurons of the bloodsucker (Kramer and Kuwada, 1983; Wang and Macagno, 1997; Reese and Drapeau, 1998), of the motor neurons of the fish zebra (Jontes et al., 2000), and of the thalamic neurons that project toward the visual cortex in ferrets (Crowley and Katz, 2000). The concurrent model modified also is supported for data obtained in studies that evaluate the ontogeny of dendritic arbors of hippocampal neurons (Dailey and Smith, 1996; Ziv and Smith, 1996) cortical layers II and III in the somatosensory cortex (Lendvai et al., 2000) and mitral cells of the olfactory bulb (Purves and LaMantia, 1990; Treloar et al., 2002) One of the fundamental observations carried out in the work has to do with the narrow space-temporary relation of the additive growth events (PD5 to PD15), restructuring (PD15 to PD25) and stabilization (greater to PD25) during the ontogeny of the dendritic and axonal arbors in the barrels. These observations are compatible with the idea that the dendritic arbors of the spiny stellate cortical neurons and axons originating from the neurons of the ventroposteromedial nuclei of the thalamus grow in a synchronic way during the first month of postnatal life. This conclusion differs of data obtained in culture that show that dendritic and axonal hippocampal neurons mature asynchronously (Craig et al., 1996) Which could be the mechanism of synchronization? Our results do not offer keys to infer it. Nevertheless, it is known that somatosensory thalamic afferents induce a change in the orientation of the dendrites of the neurons cortical associates with the barrels when those penetrate to the layer IV (Greenough and Chang, 1988). This event could be the start of a process of bi-directional communication that promoted the synchronized development of both elements. In support to this concept, is known that dendrites of Purkinje cells require signs from parallel fibers to assure an adequate development. At the same time, the dendrites of Purkinje neurons provide factors that maintain the process of development of

parallel fibers. Thus, this bi-directional communication permits the synchronic development of dendritic and axonal arbors that will be synaptic companions (Jacobson, 1991). In contrast with the synchronization of the processes of development of dendrites and axons inside the barrels, at first sight, the synaptogenesis in this way would not seem synchronized with the dendrite and axogenesis since the number of synapses increases with the age, nevertheless the intense restructuring of dendrites and axons. This discrepancy could be explained if one considers that the synaptogenesis is given mainly in the proximal processes that are more stable and remodeled by events of elongation. In support to this conclusion, we observe that immunostaining for the synaptophysin and Shank-2 at PD5 concentrate on the perisomatic zone in order then to be scattered of form centrifuge toward the neuropil later ages. This suggests that synaptogenesis starts in the soma and extends toward the proximal and distal branches as the dendritic tree matures. A similar process has been reported in the cerebellum (Cline, 2001) where the climbing fibers first establish contacts with the body and then they are transferred to an internal third of the dendritic arbors (Berry and Bradley, 1976). Besides, recent data document that synaptogenesis promotes the elongation of dendritic branches (Jontes and Smith, 2000; Niell and Smith, 2005). On the other hand, the fact that synaptic density increments with age is compatible with the idea of that thalamocortical somatosensory pathway uses a constructive strategy to generate neural connections, and suggests that the global strategies of development of the dendritic and axonal arbors do not necessarily reflect the same strategy that synaptogenesis events use. This idea is supported by prior data that show that the number of glutamatergic (White, 1976) and GABAergic (Micheva and Beaulieu, 1996) synapses increase in the neuropil of the barrels since PD30. After this period, the number of synapse remains relatively constant without any reported evidence synaptic elimination in the somatosensory cortex of rodents. Our data contrast with those obtained in the cerebral cortex of monkeys where have been reported phenomena of synaptic elimination along the postnatal development. The phenomena of remodeling could be interpreted as synaptic elimination. It is important to mention that derived analyses of studies of electron microscopy assume that the zone observed may not reflect the entire processes but just a part and probably changes in the position of synapses. This, evidently, it is not of the all certain since, for example, in the case of the barrels the amount of glutamatergic terminals would be able to include not only the associates with the thalamic afferents but also reflect the horizontal ones. Nevertheless, the horizontal connections develop a little later (between PD10 and PD15) than thalamocortical (between 4-PD5 and PD15), and these last they form near the 50% of the total synapse inside the barrel. We think that our data support the constructivist model. It was discussed that the apparent discrepancy of the strategies of development to generate dendrites, axons and synapses in the somatosensory pathway can be explain as the addition of synapses to processes in the places that are remodeled during elongation and not elimination events, but it is also possible that the discrepancy could be real. This possibility is supported from data that show that the expression and changes in the content of the synaptophysin in S1 proceeds to those of Shank-2 and PSD-95, what suggests that axons, and especially the terminals, they mature before their postsynaptic counterparts. This it is not surprising since it has been documented that is needed a machinery of mature liberation to initiate the processes of synaptogenesis (Ahmari et al., 2000; Friedman et al., 2000), and that there is an asynchrony in postsynaptic places in

cultures of hippocampal neurons (Craig *et al.*, 1996). Based on the concept that an asynchrony of the growth of synaptic elements in the neuropil of the barrels exists, the question that arises is if the profiles of synapse observed with aid of the electron microscopy correspond to mature synapses. The fact that the content of PSD-95 and Shank-2 increase significantly after PD15 suggests that the synaptic consolidation occurs after this date and probably associated to the restructuring events between the PD15 and PD25. These data coincide with the fact that the synapse in the barrels are plastic and many of them are silent until PD15 (Feldman *et al.*, 1999). The quantity of PSD-95 is intimately related to the changes in the postsynaptic places, the synaptogenesis (i.e., transformation of silent synapses in property) and synaptic consolidation (Jontes and Smith, 2000; Okabe *et al.*, 2001; Mierau *et al.*, 2004) Another interesting element of discussion in our work is that other reserchers suggest that the lower changeovers of the thalamocortical somatosensory pathway is built up trough a selectionist strategy. Jacquin and collaborators showed that primary afferents from trigeminal ganglia are selected by competitive mechanisms to reach the main nucleus of the trigeminal nuclei at the brainstem (Jacquin and Renehan, 1995). Our observations suggest that the connections associated with the thalamocortical somatosensory pathway changeover the way somatosensorial is built up for a mechanism of addition-restructuring at the same time that increases their complexity. The reason by which along a neural pathway the strategies are different is interesting. It has been proposed, nevertheless, that the differences observed among areas of the brain with relation to the strategy to form circuits could reflect if the structures are or not of recent acquisition during the evolutionary process of species in study. One of the principles that guide the growth of neuronal processes is the inverse relation between its degree of ramification and its length. In general, dendritic and axonal arbors that are ramified show a smaller total length that those with scarce ramifications. Although it has been proposed that this itself due to that could be product of independent molecular mechanisms that promote the elongation or the ramification (Smith and Skene, 1997), the process by which this inverse relation between length and ramification turns out to be still little clear. Our results suggest that although the processes initiate its growing, new order branches add during development, these they can change its preferential way of development adjusting its proportions of ramification and length through a process of restructuring in which there is a combination of elimination-elongation of branches.

The dominance of these processes during the events of restructuring would be able to explain some neuronal processes the length is greater to the ramification magnitude or vice versa. One of the most established ideas in neurosciences is that neuronal activity promotes the dedrito-, axono- and synaptogenesis. Therefore, it has been shown that cortical and hippocampal neurons of animals exposed to sensory and/or motor enrichment environmental show an increment in the number of dendritic branches, as well as synapses. It has been shown that the stimulation of the whiskers increases the immunostaining for PSD-95 (Skibinska *et al.*, 2001), synaptophysin (Ishibashi, 2002) and GAP-43 development protein of the growth axonal (McIlvain *et al.*, 2003) in S1. It exists, nevertheless, evidence that supports that the onset of neuronal activity induces the collapse of growth cones and promotes consolidation and elimination, but not the addition, of contacts among the neurons. It has also been shown that the sensory

deprivation or the inactivity facilitates the elongation of dendrites and axons, and the addition of contacts among the neurons. Thus, neuronal activity in S1 can be detected applying stimulus after the eight days of birth (Landers and Sullivan, 1999), and to that the rats show voluntary movements of vibrissae at PD12-PD15 (Welker, 1964), it is difficult to sustain that the addition of dendritic and axonal processes and synapses documented in the present work from PD5 to PD15 is related to use dependent neuronal activity. This it is not surprising while is it known that a percentage of the structure the dendritic and axonal arbors elaborate in absence of afferent innervation. Considering all information described in the preceding paragraph, we think that is the process of restructuring (elimination-elongation) what should be subject to the effects of use dependent neuronal activity occurs between 15 and PD25.

The existence of this period of intense restructuring in normal animals would be able to explain because itself not differences in the final number of thorns were found when this parameter I am compared between control rats and those exposed at enrichment environmental, nevertheless that this last group showed an increment in the mobility of dendritic branches between PD15 and PD25. Thus same, the fact that the content of PSD-95 increment significantly between PD20 and PD25, can show that it is related to the process of synaptic consolidation, and it is associated with activity dependent events in S1, and not with the formation of new contacts. This conclusion supports the fact that after PD15 the synaptic density in the barrels of S1 is almost constant, and it is difficult to promote synaptogenesis (Feldman et al., 1999) and there is a switch from silent to functional synapses (Mierau et al., 2004; Yanagisawa et al., 2004) Finally, two observations done in the present work require to be discussed. The first one has to do with the meaning cytochrome oxidase histochemistry between PD5 and PD10. The second is like to explain the redistribution of cytochrome oxidase staining observed in the cortical neurons along the first month of life. With relation to the first one of these questioning, has been said that the activity of the enzyme citocromo oxidasa reflects the levels of activity neuronal evoked. Nevertheless, as it was mentioned previously, the activity neuronal evoked is scarce in the barrels before the 8DP and the voluntary movement of the vibrissae do not occur before the 12DP. Therefore, it is improbable that the presence of the activity of the enzyme to PD5 and its consequent increment between this date and PD10, reflect use activity dependent. A possibility is that reflect the demands metabolic associates al growth neuronal. In support to this idea, was observed that cytochrome oxidase label concentrates on the soma of the cortical neurons to the PD5, and not in the neurophil as one would expect therefore in mature neurons it is located fundamentally in postsynaptic places (Wong-Riley, 1989). Nevertheless, although during the first 10 days dendritic arbors grow, the most important growth occurs between the PD10 and the PD15. This abrupt growth does not match with increment in cytochrome oxidase activity. This suggests that both events do not associate lineally with the process of growth. Metabolic indices utilized commonly to monitor indirectly the activity levels could be sensitive to changes in activity patterns (Uribe-Querol *et al.*, 2005). PD5 and PD10 activity could reflect changes in the pattenrns and/or levels of neuronal activity associated to the passive stimulation and not to use dependent activity as seen in lactating rats (Jiang and Wakerley, 1997) and in immature somatosensory cortex (Armstrong-James and Callahan, 1991). Also there is a redistribution of cytochrome oxidase label from the soma at PD5 to the neurophil at PD15

## References

- Agmon A, Yang LT, Jones EG, O'Dowd DK (1995) Topological precision in the thalamic projection to neonatal mouse barrel cortex. *J Neurosci* 15: 549-561.
- Agmon A, Yang LT, O'Dowd DK, Jones EG (1993) Organized growth of thalamocortical axons from the deep tier of terminations into layer IV of developing mouse barrel cortex. *J Neurosci* 13: 5365-5382.
- Ahmari SE, Buchanan J, Smith SJ (2000) Assembly of presynaptic active zones from cytoplasmic transport packets. *Nat Neurosci* 3: 445-451.
- Armstrong-James M, Callahan CA (1991) Thalamo-cortical processing of vibrissal information in the rat. II. spatiotemporal convergence in the thalamic ventroposterior medial nucleus (VPM) and its relevance to generation of receptive fields of S1 cortical "barrel" neurones. *J Comp Neurol* 303: 211-224.
- Berry M, Bradley P (1976) The growth of the dendritic trees of Purkinje cells in irradiated agranular cerebellar cortex. *Brain Res* 116: 361-387.
- Catalano SM, Robertson RT, Killackey HP (1996) Individual axon morphology and thalamocortical topography in developing rat somatosensory cortex. *J Comp Neurol* 367: 36-53.
- Chang FL, Hawrylak N, Greenough WT (1993) Astrocytic and synaptic response to kindling in hippocampal subfield CA1. I. Synaptogenesis in response to kindling in vitro. *Brain Res* 603: 302-308.
- Cline HT (2001) Dendritic arbor development and synaptogenesis. *Curr Opin Neurobiol* 11: 118-126.
- Craig AM, Banker G, Chang W, McGrath ME, Serpinskaya AS (1996) Clustering of gephyrin at GABAergic but not glutamatergic synapses in cultured rat hippocampal neurons. *J Neurosci* 16: 3166-3177.
- Crowley JC, Katz LC (2000) Early development of ocular dominance columns. *Science* 290: 1321-1324.
- Curcio CA, Hinds JW (1983) Stability of synaptic density and spine volume in dentate gyrus of aged rats. *Neurobiol Aging* 4: 77-87.
- Dailey ME, Smith SJ (1996) The dynamics of dendritic structure in developing hippocampal slices. *J Neurosci* 16: 2983-2994.
- Dehmelt L, Halpain S (2005) The MAP2/Tau family of microtubule-associated proteins. *Genome Biol* 6: 204.
- Feldman DE, Nicoll RA, Malenka RC (1999) Synaptic plasticity at thalamocortical synapses in developing rat somatosensory cortex: LTP, LTD, and silent synapses. *J Neurobiol* 41: 92-101.
- Friedman HV, Bresler T, Garner CC, Ziv NE (2000) Assembly of new individual excitatory synapses: time course and temporal order of synaptic molecule recruitment. *Neuron* 27: 57-69.
- Greenough WT, Chang FL (1988) Dendritic pattern formation involves both oriented regression and oriented growth in the barrels of mouse somatosensory cortex. *Brain Res* 471: 148-152.
- Hua JY, Smith SJ (2004) Neural activity and the dynamics of central nervous system development. *Nat Neurosci* 7: 327-332.



- Ishibashi H (2002) Increased synaptophysin expression through whisker stimulation in rat. *Cell Mol Neurobiol* 22: 191-195.
- Jacobson M (1991) *Developmental neurobiology*. New York; London: Plenum.
- Jacquin MF, Renehan WE (1995) Structure-function relationships in rat brainstem subnucleus interpolaris: XII. neonatal deafferentation effects on cell morphology. *Somatosens Mot Res* 12: 209-233.
- Jahn R, Schiebler W, Ouimet C, Greengard P (1985) A 38,000-dalton membrane protein (p38) present in synaptic vesicles. *Proc Natl Acad Sci U S A* 82: 4137-4141.
- Jiang Q, Wakerley JB (1997) The milk-ejection reflex in the peri-partum rat: effects of oestradiol and progesterone on basal milk-ejection frequency and the facilitatory response to central oxytocin. *J Neuroendocrinol* 9: 9-16.
- Jontes JD, Buchanan J, Smith SJ (2000) Growth cone and dendrite dynamics in zebrafish embryos: early events in synaptogenesis imaged in vivo. *Nat Neurosci* 3: 231-237.
- Jontes JD, Smith SJ (2000) Filopodia, spines, and the generation of synaptic diversity. *Neuron* 27: 11-14.
- Killackey HP, Belford GR (1979) The formation of afferent patterns in the somatosensory cortex of the neonatal rat. *J Comp Neurol* 183: 285-303.
- Kramer AP, Kuwada JY (1983) Formation of the receptive fields of leech mechanosensory neurons during embryonic development. *J Neurosci* 3: 2474-2486.
- Landers MS, Sullivan RM (1999) Vibrissae-evoked behavior and conditioning before functional ontogeny of the somatosensory vibrissae cortex. *J Neurosci* 19: 5131-5137.
- Lendvai B, Stern EA, Chen B, Svoboda K (2000) Experience-dependent plasticity of dendritic spines in the developing rat barrel cortex in vivo. *Nature* 404: 876-881.
- McIlvain VA, Robertson DR, Maimone MM, McCasland JS (2003) Abnormal thalamocortical pathfinding and terminal arbors lead to enlarged barrels in neonatal GAP-43 heterozygous mice. *J Comp Neurol* 462: 252-264.
- Micheva KD, Beaulieu C (1996) Quantitative aspects of synaptogenesis in the rat barrel field cortex with special reference to GABA circuitry. *J Comp Neurol* 373: 340-354.
- Micheva KD, Beaulieu C (1997) Development and plasticity of the inhibitory neocortical circuitry with an emphasis on the rodent barrel field cortex: a review. *Can J Physiol Pharmacol* 75: 470-478.
- Mierau SB, Meredith RM, Upton AL, Paulsen O (2004) Dissociation of experience-dependent and -independent changes in excitatory synaptic transmission during development of barrel cortex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 15518-15523.
- Niell CM, Smith SJ (2005) Functional imaging reveals rapid development of visual response properties in the zebrafish tectum. *Neuron* 45: 941-951.
- Okabe S, Miwa A, Okado H (2001) Spine formation and correlated assembly of presynaptic and postsynaptic molecules. *J Neurosci* 21: 6105-6114.
- Purves D (1988) *Body and brain: a trophic theory of neural connections*. Cambridge, Mass.; London: Harvard University Press.
- Purves D, LaMantia AS (1990) Construction of modular circuits in the mammalian brain. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 55: 445-452.

- Quartz SR, Sejnowski TJ (1997) The neural basis of cognitive development: a constructivist manifesto. *Behav Brain Sci* 20: 537-556; discussion 556-596.
- Ramón y Cajal S, Castro y Pascual Fd (1933) *Elementos de técnica micrográfica del sistema nervioso*. Madrid: Tipografía artística.
- Reese D, Drapeau P (1998) Neurite growth patterns leading to functional synapses in an identified embryonic neuron. *J Neurosci* 18: 5652-5662.
- Riederer B, Matus A (1985) Differential expression of distinct microtubule-associated proteins during brain development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 82: 6006-6009.
- Schlaggar BL, O'Leary DD (1994) Early development of the somatotopic map and barrel patterning in rat somatosensory cortex. *J Comp Neurol* 346: 80-96.
- Senft SL, Woolsey TA (1991) Growth of thalamic afferents into mouse barrel cortex. *Cereb Cortex* 1: 308-335.
- Skibinska A, Lech M, Kossut M (2001) PSD95 protein level rises in murine somatosensory cortex after sensory training. *Neuroreport* 12: 2907-2910.
- Smith DS, Skene JH (1997) A transcription-dependent switch controls competence of adult neurons for distinct modes of axon growth. *J Neurosci* 17: 646-658.
- Strominger RN, Woolsey TA (1987) Templates for locating the whisker area in fresh flattened mouse and rat cortex. *J Neurosci Methods* 22: 113-118.
- Thomas L, Hartung K, Langosch D, Rehm H, Bamberg E, Franke WW, Betz H (1988) Identification of synaptophysin as a hexameric channel protein of the synaptic vesicle membrane. *Science* 242: 1050-1053.
- Treloar HB, Feinstein P, Mombaerts P, Greer CA (2002) Specificity of glomerular targeting by olfactory sensory axons. *J Neurosci* 22: 2469-2477.
- Uribe-Querol E, Martinez-Martinez E, Tapia-Rodriguez M, Hernandez LR, Toscano-Marquez B, Padilla P, Gutierrez-Ospina G (2005) Metabolic indices shift in the hypothalamic-neurohypophysial system during lactation: implications for interpreting their relationship with neuronal activity. *Neuroscience* 134: 1217-1222.
- Wang H, Macagno ER (1997) The establishment of peripheral sensory arbors in the leech: in vivo time-lapse studies reveal a highly dynamic process. *J Neurosci* 17: 2408-2419.
- Welker WI (1964) Analysis of sniffing of the albino rat. *Behavior* 12: 223-244.
- White EL (1976) Ultrastructure and synaptic contacts in barrels of mouse SI cortex. *Brain Res* 105: 229-251.
- White EL, Keller A (1987) Intrinsic circuitry involving the local axon collaterals of corticothalamic projection cells in mouse SmI cortex. *J Comp Neurol* 262: 13-26.
- Wilson DA (1998) Synaptic correlates of odor habituation in the rat anterior piriform cortex. *J Neurophysiol* 80: 998-1001.
- Wong-Riley MT (1989) Cytochrome oxidase: an endogenous metabolic marker for neuronal activity. *Trends Neurosci* 12: 94-101.
- Yanagisawa T, Tsumoto T, Kimura F (2004) Transiently higher release probability during critical period at thalamocortical synapses in the mouse barrel cortex: relevance to differential short-term plasticity of AMPA and NMDA EPSCs and possible involvement of silent synapses. *Eur J Neurosci* 20: 3006-3018.
- Ziv NE, Smith SJ (1996) Evidence for a role of dendritic filopodia in synaptogenesis and spine formation. *Neuron* 17: 91-102.

## Figure Legends

Figure 1. MAP2 and Neurofilaments increased in S1 barrels with age. Immunohistochemistry for MAP2 and neurofilaments at PD5 (A,D), PD15 (B,E) and PD25 (C,F) respectively. Thin arrow heads shows dendritic and axonal stained branches. Width arrow heads show stained cell bodies. Arrows illustrate apical dendrites from pyramidal S1 layer V. G, H Representative Western blots for MAP2 and neurofilaments and the analyses from PD5 to PD30 S1 samples (20µg per row), respectively. Results were normalized respect to PD5 and represent the average from five samples  $\pm$ SE. The values obtained for each parameter were compared statistically by Kruskal-Wallis ANOVA in ranks and Tukey test ( $p < 0.05$ ; \* PD5 vs. all ages). Scale bar 20µm.

Figure 2. Camara lucida drawings from dendritic (spiny stellate neurons) and axonal (thalamo-cortical) arbors within layer IV S1 barrels. The drawings represent the less and the most complicated neurons at PD5 (A,D) PD15 (B,E) and PD25 (C,F). It is clearly seen that both dendrites and axons increase in complexity.

Figure 3. Morphometric analyses of dendrites and axons. Total branch number, total length and fractal dimension were measured to evaluate changes in complexity. A,B reflect the number of branches of dendrites and axons. C,D Length is more prominent at PD25 for axons. E,F Fractal dimension The values obtained for each parameter are the average of all neurons at each age  $\pm$ SE and were compared statistically by Kruskal-Wallis ANOVA in ranks and Tukey test for dendrites A, C; and Dunn's method for axons B, D. One-way ANOVA and Tukey test were used for the comparison of fractal analyses ( $p < 0.05$ ; \* PD5 vs. all ages).

Figure 4. Higher order branches were eliminated and length increased for all branches orders from PD15 to PD25. Total branch number and total length per order was evaluated for dendrites (A,C) and axons (B,D).

Figure 5. Synaptic markers increased in S1 barrels with age. Immunohistochemistry for Shank2 and synaptophysin at PD5 (A,D), PD15 (B,E) and PD25 (C,F) respectively. Thin arrow heads show dots staining for postsynaptic and presynaptic elements, respectively. Width arrow heads show cell bodies. G, H Representative Western blots for PSD-95 and synaptophysin and the analyses from PD5 or PD10 to PD30 S1 samples (20µg per row), respectively. Results were normalized respect to the younger age and represent the average from five samples  $\pm$ SE. The values obtained for each parameter were compared statistically by one-way ANOVA and Tukey test ( $p < 0.05$ ; \* PD5 vs. all ages). Scale bar 10µm.

Figure 6. Synaptic density in S1 barrels during the first month of life. Synapses from electron microscopy pictures were counted at PD5 (A), PD15 (B) and PD30 (C). D, Plot showing changes in synaptic density at different ages. The values obtained are the average of all measurements at each age and were compared statistically by one-way ANOVA and Tukey test ( $p < 0.05$ ; \* PD5 vs. all ages). Scale bar 1µm

Figure 7. Cytochrome oxidase activity increased in S1 barrels during the first month of life. Histochemistry against cytochrome oxidase of coronal sections of S1 cortex at PD5 (A), PD15 (C) and PD25 (E) showed increments in the size and staining. Arrow heads illustrate barrels at different ages. Magnification of each barrel illustrated sites of mitochondrial activity narrow arrow heads denote sites of activity in the neuropil while wide ones show activity on cell bodies. The values obtained for each parameter were normalized against the corpus callosum and compared statistically by one-way ANOVA and Tukey test ( $p < 0.05$ ; \* PD5 vs. all ages). Scale bar 100 $\mu$ m for left panels and 20 $\mu$ m for the right panels