



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MÉXICO**

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

**ALTERACIÓN TEMPORAL EN LA ESPECIFICACIÓN DE LA
CORTEZA SOMATOSENSORIAL PRIMARIA EN RATAS
ENUCLEADAS**

TESIS

Que para obtener el título de:

Licenciado en Investigación Biomédica Básica

P R E S E N T A

Ana Sofía Ibararán Viniegra

Directores de tesis:

Dr. Gabriel Gutiérrez Ospina
Dra. Ana B. Clorinda Arias Álvarez

México D.F.

2006



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Resumen
Introducción
Planteamiento del problema
Hipótesis y objetivos
Materiales y metodos
Resultados
Discusión
Conclusiones
Bibliografía

RESUMEN

Por años, se ha pensado que el incremento en el área que ocupa la corteza somatosensorial primaria (S1) en la corteza cerebral de los roedores enucleados es el resultado de un aumento en el uso de la vía somatosensorial. Estudios realizados en el laboratorio y por otros grupos sugieren que esta explicación no es del todo correcta. Adelantos o retrasos en el inicio o la terminación de la especificación de S1, respectivamente, e incrementos en las tasas de crecimiento de los elementos neuronales que la constituyen pudieran explicar su expansión. En este trabajo evaluamos las posibles alteraciones en el tiempo de formación de S1. Utilizando como modelo a la rata encefalocorada quirúrgicamente al nacimiento, logramos documentar un adelanto de aproximadamente 10 horas en el inicio de la formación del mapa correspondiente a las vibrisas faciales en S1 en la población de las ratas enucleadas. Los primeros indicios de la formación de S1 en las ratas ciegas ocurrieron en un 68% de los animales evaluados a los 3 días con 10 horas (3d10h) y solamente en 29% de los animales controles, mientras que un porcentaje equivalente se alcanzó en las ratas control (82%) y enucleadas (83%) a los 3 días con 20 horas (3d20h). Adicionalmente, y en un intento por identificar las proteínas que pudieran estar involucradas en la re-calendarización del inicio de la formación de S1 en ratas enucleadas, analizamos el patrón de las proteínas expresadas en S1 a los 3d10h utilizando geles bidimensionales. Los resultados obtenidos hasta el momento nos

permiten afirmar que los cambios en la temporalidad del inicio de la formación de S1 en ratas enucleadas se asocian con cambios en los perfiles de algunas proteínas. Su identificación en bases de datos, por peso molecular y punto isoeléctrico, nos permite sugerir algunas moléculas que pudieran estar participando.

En conjunto, los resultados en este trabajo nos indican que la formación prematura de los barriles puede explicar, al menos en parte, la expansión de S1 en ratas enucleadas el nacimiento, y que esta modificación se asocia a cambios en los perfiles de las proteínas de S1.

INTRODUCCIÓN

Plasticidad general

La plasticidad puede definirse como los cambios que se dan constantemente en la estructura y función cerebral producto de la experiencia tanto externa como aquella que se origina en el organismo mismo. Los cambios referidos ocurren a todos niveles, desde el molecular hasta el estructural. Aún cuando la plasticidad no es una propiedad exclusiva del sistema nervioso es en él en dónde se piensa se ha desarrollado la más refinada de sus formas.

La plasticidad, suponemos, subyace a fenómenos como el aprendizaje, la memoria, la recuperación anatómico-funcional neural después de sufrido algún daño e, inclusive el desarrollo y la adquisición de la individualidad o personalidad. Por ello los procesos de plasticidad en el sistema nervioso han sido sujetos a intensos estudios por parte de la comunidad neurocientífica.

Con el fin de caracterizar los eventos moleculares, celulares, tisulares, orgánicos y sistémicos que subyacen a los procesos plásticos se han desarrollado diversos modelos. La premisa que ha guiado estos esfuerzos es que la plasticidad, independientemente de su forma, es un proceso en cuyo seno subyacen eventos comunes. Por ejemplo, en el caso de la formación de nuevas sinapsis, evento común al aprendizaje y la recuperación neural, se piensa se debieran poder identificar las mismas moléculas participando. Sin embargo, algunas moléculas que se expresan durante la reorganización de las

conexiones neuronales en etapas tempranas de la vida no se expresan en condiciones que promueven la regeneración neural. De modo que por un lado está la visión universalista de la plasticidad y por otro lado una visión reduccionista en el sentido de que la plasticidad neuronal pudiera ser explicada con base en unos cuantos eventos moleculares y celulares.

Con en objeto de generar un modelo integrativo de la plasticidad neural, decidimos utilizar la vía somatosensorial de ratas, de manera específica aquella parte que va del belfo de la rata a la corteza somatosensorial, la cual describo a continuación.

El modelo experimental

El modelo utilizado en el laboratorio consiste en ratas enucleadas y controles para estudiar fenómenos de plasticidad en el sistema nervioso. Los animales enucleados son aquellos que mediante un procedimiento quirúrgico se les remueve el tejido ocular en su totalidad el día del nacimiento denominado 0 post natal 0 (OPN).

El área cortical que estudiamos en el presente trabajo es la corteza somatosensorial primaria (S1). Esta contiene un mapa corporal en un arreglo modular constituido por barriles que representan colecciones de receptores somatosensoriales localizados bajo la piel. Dicha relación entre la periferia y estructuras centrales fue primero observada por Woolsey y Van der Loos en 1970, quienes correlacionaron la distribución de unidades citoarquitectónicas

multicelulares en la capa IV de la corteza somatosensorial de ratones, con la distribución de las vibrisas mistaciales del belfo de estos roedores, llamando dichas estructuras barriles. La presencia de estas estructuras se ha confirmado en la corteza cerebral de ratas (Waite y Tracey, 1995) y específicamente en la cepa Wistar utilizada en el laboratorio (Welker y Woolsey, 1974). De modo específico utilizamos como modelo la representación cortical de las vibrisas faciales de la rata denominada el subcampo de barriles postero medial (PMBSF - posteromedial barrel subfield - por sus siglas en inglés).

Las vibrisas mistaciales en el belfo de la rata están organizadas en cinco filas rostro-caudales conteniendo de cuatro a siete vibrisas cada una (designadas como filas A-E de dorsal a caudal). Bajo la piel asociados a los folículos se encuentra una importante colección de distintos mecanoreceptores (Lee y Woolsey, 1975), entre ellos células de Merkel, terminaciones lanceoladas, reticulares, en mazo y terminales nerviosas libres (Waite y Tracey, 1995). Los folículos se encuentran inervados por fibras procedentes de la rama infraorbitaria del nervio trigémino (Rice et al., 1986), cuyos somas se encuentran en el ganglio trigémino ubicado en la fosa craneal media dentro de la base del cráneo (Waite y Tracey, 1995). Estudios electrofisiológicos indican que cada célula del ganglio trigémino responde a estímulos de una sola vibrisa (Zucker y Welker, 1969). Una fibra de una neurona inerva solamente una vibrisa sin embargo, las vibrisas están inervadas por más de una fibra (Bates y Killackey, 1985). Los procesos de dichas

células se extienden hasta el tallo cerebral, alcanzando el núcleo del trigémino. Estas aferentes terminan en un grupo discreto, que forma bandas que corren de rostral a caudal en el plano horizontal y que en el plano transverso replican el patrón de las vibrisas faciales (Killackey et al., 1990). En el núcleo del trigémino hay otro relevo sináptico ahora con células cuyo soma se encuentra en el núcleo ventro postero medial del tálamo (NVPM), y son los axones de estas últimas los que proyectan a la corteza somatosensorial primaria, predominantemente a la capa IV. La vía se muestra en la Figura 1 paneles A, B, C y D.

Para comprender mejor el proceso de formación del mapa en S1 es necesario mencionar la relación entre el tálamo y la corteza cerebral. El tálamo es una estructura diencefálica que funciona como sitio de relevo para las vías que llevan información sensorial de la periferia al sistema nervioso central, exceptuando la información olfativa. La definición tridimensional de los territorios de proyección de los distintos núcleos talámicos en la corteza cerebral (bidimensional) es lo que se denomina como el establecimiento de la topografía. Es mediante la llegada de las aferentes talámicas a distintas regiones corticales que se delimitan los territorios de la corteza que corresponderán a los distintos núcleos talámicos, y por ende al tipo de información que una región cortical específica procesará. Dicho proceso se da durante el desarrollo embrionario y acaba cerca del día PN3 (Schlaggar et al., 1994). Una vez establecidos los límites entre los territorios corticales se da el proceso de determinación de la somatotopía. Durante esta

subsegmentación de territorios, el mapa de la periferia se imprime sobre la topografía establecida por los distintos núcleos talámicos. Los barriles corresponden a esta subsegmentación territorial. Así, dentro del territorio inervado por el NVPM del tálamo, ahora se generará un patrón que representa a la porción más periférica de dicha vía, los cúmulos de receptores asociados a las vibrisas faciales. Dicha representación puede observarse en la Figura 1 panel E.

La estructura del barril está compuesta por las aferentes tálamo-corticales (TC) que llegan de manera preferencial a la capa IV de la corteza, y en un menor grado a las capas III y VI (Buonomano y Merzenich, 1998). La capa IV está compuesta por diversos tipos neuronales: estelares espinosas, estelares no espinosas, neuronas piramidales pequeñas, interneuronas y glía. Previo a la llegada de las aferentes TC, las neuronas estelares espinosas tienen sus dendritas con una distribución radial, y es la llegada de las aferentes lo que genera una reorganización dendrítica de manera que ahora las células tienen las dendritas orientadas preferentemente hacia el axón aferente (apuntando hacia el centro del barril) y los cuerpos celulares hacia los bordes (Loeb et al., 1987). Por esto los barriles están formados por un anillo denso de neuronas granulares, con un centro con menor densidad celular y separados entre ellos por septos (Woolsey y Van der Loos, 1970). Los barriles se desarrollan a partir de una placa cortical aparentemente uniforme durante la primera semana de vida postnatal (Wise y Jones, 1978; Rice et al., 1985). Las células dentro de

los barriles responden preferencialmente a la estimulación de la vibrisa que representan, también conocida como vibrisa principal, sin embargo pueden responder con un mayor umbral a vibrisas vecinas ya que reciben inervación funcional proveniente de hasta seis a ocho vibrisas (Killackey, 1989; Nicolelis y Chapin, 1994).

Los patrones somatotópicos se forman en un orden secuencial comenzando en la periferia y terminando en la corteza cerebral. El patrón de la periferia provee un templado primario que es replicado en secuencia a cada uno de los niveles del sistema somatosensorial, y el proceso de formación de patrones en un nivel del sistema es dependiente del nivel anterior (Belford y Killackey, 1980; Erzurumlu y Killackey, 1983). A distintos niveles de la vía se van estableciendo representaciones de la periferia, las barreletes en el tallo cerebral y los barreloides en el tálamo. Esto puede observarse en la figura 1 paneles F, G y H. Las vibrisas faciales están representadas en el complejo trigeminal a tres niveles: en el núcleo espinal trigémino, en los subnúcleos caudalis e interpolaris y en el núcleo principal sensorial. En tanto, a nivel del tálamo el patrón es observable en el complejo ventrobasal ubicado en la región dorsal del tálamo (Belford y Killackey, 1979).

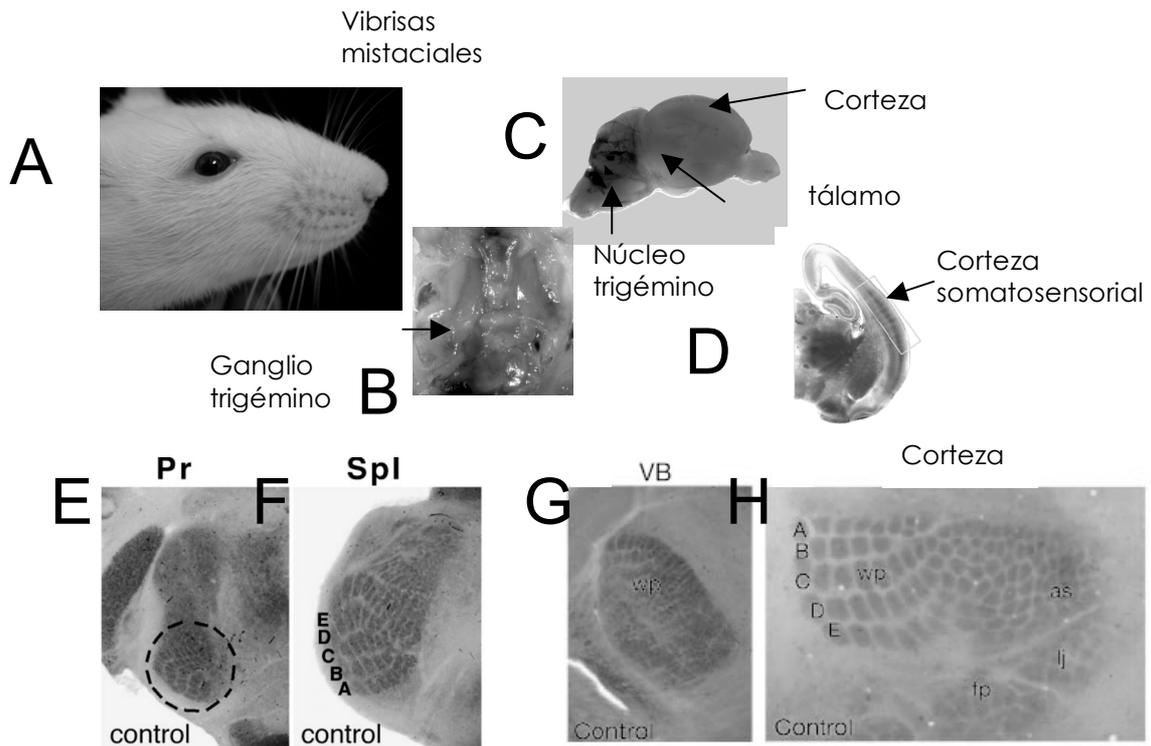


FIGURA 1. Vía somatosensorial : del bello de la rata a la corteza somatosensorial primaria. A) muestra el patrón de inserción de las vibrisas en el bello de la rata. B) muestra el ganglio del trigémino C) muestra la posición del tallo cerebral, tálamo y corteza, D) muestra un corte coronal en el que se señalan la corteza somatosensorial. Patrón relativo a las vibrisas revelado por histoquímica para citocromo oxidasa en E y F) complejo trigeminal (Pr núcleo trigémico principal, Spl núcleo trigeminal espinal), G) complejo ventro basal (VB) del tálamo H) Corteza cerebral. Modificada de Iwasato et al., 2000; Petersen, 2003.

La representación de las vibrisas en el núcleo del trigémino puede observarse alrededor del tiempo del nacimiento en la porción ventro lateral del mismo con histoquímica para la enzima succinato deshidrogenasa (SDH) y sigue el mismo gradiente que el desarrollo de los folículos pilosos de las vibrisas (Erzurumlu y Killackey, 1983). Las aferentes tálamo corticales asumen un patrón relativo a las vibrisas al final de primer día postnatal 0PN (Schlaggar y O'Leary, 1994), en tanto

el patrón complementario de células corticales y fibras de la lámina IV es aparente hasta el día 4PN (Rhoades et al., 1996).

Enucleación y plasticidad

Con el objeto de generar un modelo integrativo de la plasticidad neural, decidimos utilizar ratas en las que la vista se afecta durante las primeras horas de vida postnatal. En los mamíferos la pérdida de la vista por destrucción, disgenesia o degeneración retiniana en etapas tempranas del desarrollo da lugar a una reorganización anatómica y funcional de la corteza cerebral, dicho fenómeno recibe el nombre de plasticidad sensoriomodal. Durante el cual se reorganiza la corteza visual de manera que ahora procesa información tanto somatosensorial como auditiva, y la corteza somatosensorial primaria así como la corteza auditiva primaria expanden su área relativa (Bronchti et al., 1992 y Toldi et al., 1994a, 1994b, 1996; Negyessy et al., 2000).

Estudios de Bronchti y colaboradores (Bronchti et al., 1992) encuentran que el área que ocupa el mapa de barriles es mayor en animales enucleados. Dicha expansión se debe básicamente a un aumento del área de los barriles correspondientes a la fila más dorsal de vibrissas, y a un grupo de vibrissas rostrales cercanas a la nariz y boca. El grupo de Toldi (1994b) reportó que las neuronas de algunos barriles muestran campos receptivos más grandes, en tanto en otros se detecta una mayor sensibilidad al ángulo de deflexión de las vibrissas en animales

enucleados (Toldi et al., 1994b, 1996, 2000). Experimentos en ratones muestran que, en los animales enucleados, los barriles son 15% más grandes, y al hacer comparaciones posición específicas encuentran hasta un 33% de diferencia, siendo ésta mayor en los barriles más laterales y caudales. (Rauschecker et al., 1992). Datos obtenidos en el laboratorio han mostrado que el área promedio de los barriles que representan las vibrisas faciales en ratas enucleadas al nacimiento muestra una expansión del 16% para el día 7PN y del 18% para 60PN. Adicionalmente, existe evidencia de que, una vez formados los barriles, éstos crecen escaladamente entre 7PN y 60PN en ambos grupos de animales (Geovannini et al., por publicarse).

Al parecer, el reclutamiento de la corteza visual por información sensorial (plasticidad sensoriomodal) se debe a la estabilización de conexiones transitorias de vías sensoriales en la corteza visual, conexiones que en condiciones normales son eliminadas, pero en fenómenos de plasticidad permanecen (Bavelier y Neville, 2002).

Los cambios plásticos que ocurren en dicho modelo son de tal magnitud y espectro, que pensamos facilitarán tanto la identificación de factores moleculares, celulares y anatomo-fisiológicos que los subyacen a distintos niveles de organización, como su ulterior integración.

Posibles explicaciones de los fenómenos plásticos

Existen varias teorías con las cuales se pretende explicar la expansión de S1 en el modelo de enucleación. Sin embargo considero importante señalar que aun cuando se planteen por separado, resulta poco probable que sea solo una de ellas la que explique por si misma la plasticidad.

Con relación a la expansión de las áreas corticales primarias encargadas del procesamiento de la información táctil y auditiva en ratas ciegas, la idea dominante sostiene que dicha expansión resulta de un incremento en el uso de ambos órganos sensoriales en los individuos ciegos. Rauschecker et al. (1992) concluye que es el incremento en el uso de las vibrisas lo que induce tanto el aumento de longitud de las mismas, así como la expansión de la representación corporal en ratones enucleados. Además, existen resultados que muestran un aumento relativo en la vascularización de los barriles en ratas enucleadas, por lo que se piensa que la expansión es en verdad debida al aumento en la actividad metabólica y bioeléctrica dada por el uso incrementado de las vibrisas (Zheng y Purves, 1996; Harder et al., 2002).

No obstante la amplia aceptación de la idea descrita anteriormente, evidencia recabada en el laboratorio sugiere que, al menos la expansión de la corteza somatosensorial primaria – aquella dedicada al procesamiento de la información táctil - no es debida al incremento en el uso de los órganos sensoriales intactos. En apoyo a

esta idea, hemos documentado que índices metabólicos que supuestamente reflejan los niveles de actividad neuronal (Uribe-Querol et al., 2005), tales como la actividad de la enzima citocromo oxidasa (Wong-Riley, 1989) y la captación de deoxi-glucosa (Sokoloff, 1999) son similares en: S1, neuronas del ganglio del nervio trigémino y en el músculo de la almohadilla facial de las ratas control y enucleadas al nacimiento al compararse a los 10 y 60 días PN (Geovannini 2001; Geovannini et al., en preparación). Además, la expansión de los barriles no ocurre en ratas cuyos ojos fueron removidos quirúrgicamente el día PN7 o que se mantuvieron en oscuridad desde su nacimiento y ocurre en aquellas cuyas vibrisas fueron cauterizadas al 7PN (Geovannini 2001; Geovannini et al., en preparación). Aún cuando nuestra conclusión contradice la idea tradicional, existen experimentos en los que el bloqueo de la actividad neuronal con tetradotoxina en S1 o en la rama infraorbitaria del nervio trigémino no altera la formación de los barriles, lo que sugiere que su especificación es independiente de la actividad provocada (Chiaia et al. 1993; Henderson et al., 1994). Además, estudios electrofisiológicos y metabólicos muestran que la actividad neuronal provocada en la corteza cerebral es escasa hasta el día 7/8PN, por lo que no se logra obtener una activación regular de unidades corticales en S1 consecutiva a la estimulación de las vibrisas sino hasta el día 10PN (Armstrong-James, 1975; Landers y Sullivan, 1999). Existe además un estudio que muestra que el movimiento de las vibrisas aparece

aproximadamente a mediados de la segunda semana de vida (Welker, 1964).

Otra idea sostiene que la expansión de la corteza somatosensorial en los sujetos ciegos se debe a la retención de conexiones transitorias. Estas conexiones transitorias serían eliminadas durante el desarrollo temprano (Sur et al., 1990; Bavelier y Neville, 2002). Sin embargo, evidencia morfológica ha documentado que la circuitería neuronal en la corteza somatosensorial de la rata se ensambla de manera precisa y progresiva (Agmon et al., 1995; Catalano et al., 1995; Gutiérrez-Ospina et al., 1996). Así, la retención de conexiones transitorias como explicación de la expansión de la corteza somatosensorial en ratas ciegas es poco probable.

Si no son los cambios en los niveles de la actividad neuronal asociada al uso de la vía somatosensorial, ni la retención de conexiones transitorias lo que, por si solo, explica la expansión de la corteza somatosensorial en las ratas ciegas, ¿que podría subyacer a dicho cambio? En la literatura relacionada con la biología evolutiva y del desarrollo se acuñó el término heterocronía para referirse a los cambios en la temporalidad en que ocurren o transcurren los procesos del desarrollo, y que conducen a modificaciones en el fenotipo de los organismos. Existen diversos tipos de fenómenos heterocrónicos de entre los que destacan aquellos que conducen al peramorfismo o aumento del tamaño del rasgo fenotípico analizado. El pre-desplazamiento o inicio temprano de un evento del desarrollo, la

aceleración o mayor tasa de crecimiento y la hipermorfosis o final retrasado de un evento conducen, todos, a rasgos fenotípicos exagerados. Debido a que la expansión de la corteza somatosensorial primaria pudiera considerarse como un carácter fenotípico exagerado, es posible que ésta sea el producto de modificaciones en la calendarización o en las tasas de crecimiento de los eventos del desarrollo de la corteza somatosensorial. Como la expansión de la corteza somatosensorial ocurre durante los primeros días de vida, para luego mantener un crecimiento escalar hasta la vida adulta, es posible que el cambio en la temporalidad pudiese ocurrir durante el periodo de especificación de la corteza somatosensorial primaria en la rata. En apoyo a esta posibilidad, en estudios previos mostramos que el retraso en el inicio en la formación de los barriles conduce a una disminución en el tamaño de los mismos. No obstante este retraso, la duración del proceso de formación y su finalización son idénticas entre los animales control y desnutridos (López, 2000).

Moléculas relacionadas con el tiempo de desarrollo

Por otro lado, si bien se conocen diversas proteínas que participan en los procesos plásticos (Fox y Zahs, 1994), poco se sabe acerca de las que pudieran estar relacionadas con los cambios en la temporalidad de los eventos del desarrollo. Sin embargo, se sabe que microARNs regulan finamente la traducción de ARN mensajeros que participan en cambio de una etapa larvaria a otra, en *C. elegans* y *Drosophila*, y así

regulan el desarrollo (Rougvie, 2001; He y Hannon, 2004). Se han observado ondas temporales de expresión de miARN en cerebro de rata, algunos de ellos específicamente en neuronas corticales; sugiriendo que tienen estos un importante papel en el desarrollo de dicho órgano (Miska et al., 2004). Krichevsky et al., (2003) identificó miARNs que se asocian específicamente a la corticogénesis. Debido a que en este momento aun no tenemos moléculas candidato que pudieran estar regulando el tiempo del desarrollo y a su vez ser moduladas por miARNs, comenzamos este estudio buscando las proteínas que pudieran estar relacionadas con dicho fenómeno.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En las ratas enucleadas al nacimiento, se observa un incremento en el tamaño relativo de S1. El mecanismo que subyace a este cambio se desconoce. En la literatura se ha sugerido que se debe a cambios en los niveles de actividad asociada al uso, así como a la retención de conexiones transitorias. Sin embargo, en el presente trabajo exploramos una nueva posibilidad, que sean cambios el tiempo de desarrollo (la duración, en el inicio o la terminación y/o en la tasa de desarrollo) lo que explique la expansión de S1 en las ratas enucleadas al nacimiento.

HIPÓTESIS

La expansión de los barriles de S1 correspondientes al PMBSF en ratas enucleadas puede ser el resultado de alteraciones en los tiempos de desarrollo relacionados con el inicio, la duración y/o la terminación del proceso de especificación de los barriles. Pensamos además que este fenómeno podría verse reflejado en los patrones de expresión de proteínas en S1.

OBJETIVO GENERAL

Evaluar si existen cambios en la temporalidad de los eventos ontogenéticos cerebrales que pudieran asociarse con la expansión de la corteza somatosensorial primaria en ratas enucleadas al nacimiento.

OBJETIVOS PARTICULARES

- Determinar el momento de inicio de la especificación de los barriles correspondientes al PMBSF en la corteza somatosensorial primaria en ratas control y enucleadas al nacimiento, mediante el uso de técnicas histoquímicas.
- Comparar el patrón de expresión de proteínas de S1 de ratas control y enucleadas al nacimiento, al momento de inicio de la especificación de los barriles del PMBSF, mediante electroforesis bidimensional.

MATERIALES Y MÉTODOS

Animales:

Los experimentos se realizaron en ratas de la cepa Wistar de ambos sexos de 0, 1, 2, 3, 4 y 5 días postnatales (PN). Las camadas fueron ajustadas a ocho crías al momento de la enucleación procurando disminuir el efecto que el cuidado materno diferencial tiene sobre el cerebro (Liu et al., 2000). De los ocho animales, se procuró tener 4 hembras y 4 machos dos de ellos control y dos enucleados por cada sexo. Las madres se mantuvieron con acceso libre a comida y agua y las crías estuvieron con sus madres las 24 horas. Los animales se conservaron en cuartos con temperatura e iluminación controlada con ciclos de 12:12 luz/oscuridad.

Enucleación:

Las ratas fueron enucleadas entre las 6 y las 8 horas desde nacimiento. Las crías se separaron de sus madres y se registró su peso y sexo. Las camadas se ajustaron a ocho crías, seleccionándose aquellas con pesos más homogéneos. Posteriormente, las crías se anestesiaron por hipotermia. Una vez anestesiadas, se procedió a realizar la enucleación siguiendo protocolos descritos anteriormente (Bronchti et al., 1992). Las ratas control se manipularon de la misma forma aunque no se les practicó ningún tipo de cirugía. Terminado el procedimiento, las crías se colocaron en un cojín termorregulado o bajo una lámpara de luz incandescente hasta que parara el sangrado y retomarán su

movilidad, color y temperatura. Finalmente, las crías se devolvieron a sus madres y se sacrificaron a los días indicados.

Análisis histológico:

Obtención y tinción de las muestras:

Las ratas fueron anestesiadas por hipotermia y decapitadas. Posteriormente, se extrajo el encéfalo y las cortezas cerebrales se disectaron, se aplanaron entre dos portaobjetos separados por 2mm y se congelaron en 2-metil-butano (Sigma 270342) pre-enfriado en hielo seco. Posteriormente, las muestras se almacenaron a -70°C hasta su utilización. El día del experimento, las muestras se atemperaron en el crióstato (Leica modelo CM 1510-3) durante aproximadamente 20 minutos y se montaron con tissue tek (O.C.T. compound Sakura Finetechnical Co. Ltd. 4583). Los hemisferios se cortaron en rebanadas tangenciales de 50 μm en un crióstato y se montaron en laminillas recubiertas de gelatina. La temperatura de corte varió con la edad, siendo los más jóvenes cortados a -10° y los de edades más avanzadas a -18°C. Los juegos de laminillas se conservaron a -70°C durante toda la noche para ser procesadas al día siguiente a través de la técnica histoquímica diseñada para la detección de la actividad de la enzima citocromo oxidasa. Las laminillas se incubaron durante 12-15 horas en una solución de amortiguador de fosfatos 0.1M que contiene sacarosa 130mM (JT Baker, 4072-05), 6.7 μM citocromo C de corazón de caballo (SIGMA C-7752), 250,000 unidades de catalasa

de hígado bovino (SIGMA C-40) y 1.54mM de 3,3- diaminobencidina (SIGMA D-5637) a 37°C (Riddle et al., 1993). Finalmente, las laminillas se enjuagaron 3 veces con agua destilada, se secaron al aire libre y se montaron con Cytoseal™ 60 (Richard-Allen Scientific, 8310-4).

Análisis histológico:

Se observaron las laminillas en el microscopio estereoscópico (Nikon SMZ1500) y se clasificaron las laminillas pertenecientes a cada animal según el siguiente criterio: Ausencia de barriles, presencia de barriles aun no segregados, observados como una mancha o presencia de barriles. Para ello es necesario definir un barril como grupos de células en donde pueden distinguirse lados, paredes, bordes, septos y centros (Welker y Woosley, 1974) Las fotografías se tomaron con la cámara Axiocam MRC Zeiss acoplada al microscopio.

Estadística

Para establecer si existía diferencia en la frecuencia de los eventos entre los grupos de controles y enucleados a ambas edades utilizamos la prueba de Chi cuadrada. Dicha prueba compara la frecuencia de un evento en el grupo experimental (enucleados) respecto a un valor esperado (controles). Los parámetros para dicha prueba fueron dos grados de libertad y valor $p=0.001$. El análisis de la posible relación entre el sexo y la aparición de barriles se realizó mediante la prueba exacta de Fischer. Esta prueba analiza si la relación observada entre

dos variables independientes es real o si es meramente casual. Establecimos $p < 0.01$ para significancia, y utilizamos un valor p de dos colas, ya que no conocemos de antemano hacia donde tenderán las frecuencias observadas en el grupo experimental.

Dichas pruebas fueron seleccionadas ya que nuestros datos no corresponden a observaciones cuantitativas sino cualitativas y lo que analizamos es la frecuencia de un evento de modo que recurrimos a pruebas estadísticas no paramétricas.

Análisis del patrón de proteínas en geles de 2D.

Preparación de las muestras:

Se utilizaron ratas Wistar macho y hembra de 3d10h (edad establecida por el tiempo de aparición de barriles en animales enucleados) de ambas condiciones experimentales para el análisis del proteoma. Las ratas fueron sacrificadas por hipotermia y decapitación. Se extrajo el cerebro completo se separaron las cortezas cerebrales y se disectaron las cortezas somatosensoriales. Estas se lavaron durante 2 minutos en NaCl 0.9% (SIGMA S7653) para quitar el exceso de sangre, posteriormente se congelaron en 2-metil-butano (SIGMA) en hielo seco. Finalmente se almacenaron a -70°C hasta su utilización.

Se utilizaron entre 5 y 6 cortezas somatosensoriales de animales del mismo sexo y condición experimental por muestra, las cuales se homogenizaron en nitrógeno líquido en un mortero previamente

enfriado hasta pulverizarlas, este polvo fino se transfirió a tubos de 1.5 ml y se pesaron las muestras. Al tejido se le agregó un amortiguador de lisis en proporción 1:2 según el peso de la muestra (100µl por 50 mg de tejido). La composición del amortiguador de lisis es: urea 6M, (Biorad 161-0731), tiourea 2M (MERCK 2770784), 3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonate (CHAPS) 4% (SIGMA C9426), PMSF 60mM (SIGMA P-7626) y dithiothreitol (DTT) 100mM (Biorad 161-0611). Luego de ser mezclado, se aplicó un pulso de sonicación de 20 segundos para disgregar las células y se completó el volumen con amortiguador de lisis a 1ml. La muestra se centrifugó a 14000 rpm a 4°C (Eppendorf Centrifuge 5415R) durante 2 minutos. Finalmente se separaron sobrenadante y precipitado; el sobrenadante fue conservado a -70°C hasta su utilización en tanto el precipitado se deshechó (Modificado de Paulson et. al., 2003).

Cuantificación de proteína total:

La proteína fue cuantificada mediante el método de Bradford modificado para proteínas con detergentes (Biorad) basado en el uso de azul de coomasie. Dicha técnica es utilizada en reportes previos de análisis de proteoma (Lubec et al., 2003). Sin embargo debido a la concentración de urea utilizada el método no es exacto. Utilizamos las mismas concentraciones relativas partiendo de cantidades equivalentes de tejido, 50µl de muestra.

Para el gradiente de pH utilizado para el electroenfoque de las proteínas, utilizamos las tiras Ready Strip™ IPG strip (Biorad 163-2099) las cuales tienen el gradiente copolimerizado con la acrilamida/bisacrilamida de manera que éste no se modifica durante el corrimiento. Para establecer el rango de pH a utilizar inicialmente corrimos tiras de pH 3-10 (Ready Strip™ IPG strip Biorad 163-2099), gracias a lo cual encontramos que la mayor parte de las proteínas de la muestra estaba dentro del rango 4-7, por lo que utilizamos este rango para los siguientes análisis.

Rehidratación de las tiras:

Para las tiras de 11 cm. se utilizan hasta 200µg de proteína en un volumen total de 200µl, para ello se utiliza un amortiguador de rehidratación urea 7M (Biorad 161-0731), tiourea 2M (MERCK 2770784), CHAPS 4% (C9426) y se le adiciona en el momento de utilizarse DTT 50mM (Biorad 161-0611), triton X-100 5% (SIGMA X100), anfolitos 2.5% (Biorad 163-1113 Bio-Lyte 3/10 Ampholyte) y trazas de azul de bromofenol (Biorad 161-0404). Las tiras se rehidrataron con la muestra en la charola de rehidratación (Immobiline dry strip reswelling tray, Pharmacia Biotech) durante un mínimo de 16 horas.

Isoelectroenfoque (Primera Dimensión):

Al término de la rehidratación, las tiras fueron enjuagadas con agua destilada y colocadas en la charola de electroenfoque en el equipo

Multiphor II (Pharmacia Biotech). Se generaron los puentes con papel Whatman # 3 (Whatman, Inglaterra).

Las tiras se corrieron hasta alcanzar un mínimo de 35000 V totales en 24 horas a 20°C, de acuerdo al siguiente protocolo: 1 h a 150V, 3 h a 300V, 1 h a 1000V, 1 h a 2000 y toda la noche (ON) a 2500V utilizando la fuente de poder (2197 Power Supply LKB Bromma, Suecia). Las tiras se retiraron de la charola del Multiphor II, fueron enjuagadas con agua destilada y se guardaron a -70°C, hasta su utilización.

Segunda dimensión:

Las tiras tienen que equilibraron en un amortiguador que contiene SDS para correr la segunda dimensión. El amortiguador base para equilibrar (BEB) contiene 50mM TRIS-HCl (Biorad 161-0719) pH 8.8, 6M urea (Biorad 161-0731), 30% glicerol (SIGMA G-6279) y 2% SDS (Biorad 161-0302). Para la primera incubación se utilizan 10ml de BEB con DTT 50mM (Biorad 161-0611) durante 20 minutos en agitación a temperatura ambiente; esto con el fin de romper los puentes disulfuro generando grupos tiol (-SH). Para la segunda incubación se utilizaron 10ml de BEB con iodoacetamida (SIGMA I1149) 100mM y trazos de azul de bromofenol. La iodoacetamida carboxila los grupos tiol libres generados por el DTT. Este procedimiento se realizó en agitación a temperatura ambiente durante 25 minutos.

Utilizamos geles de poliacrilamida al 15% (T=29.2, C=0.8) de 160 x 180 x 0.75mm, sobre los cuales se colocaron las tiras de IPG luego de ser equilibradas, junto con 2 μ l de marcador de peso molecular (GIBCO BRL 10064-D12) de 210 a 10 kDa. Todo esto se selló con agarosa 0.5% (Biorad 162-0102) con azul de bromofenol. Para la corrida electroforética se utilizó una cámara Hoefer SE600 (electrophoresis unit) y una fuente de poder Biorad Powerpack HC; las condiciones de corrida fueron las siguientes: 10mA con un límite de 250V 30 min., 20mA (con el mismo límite de voltaje) hasta que el frente de corrida llegara a 2 mm. del borde inferior de los geles (aprox. 8 hrs.).

Visualización de las proteínas:

Los geles se fijaron toda una noche en metanol 50 % (JT Baker 9070-02), acético 12 % (JT Baker 9507-05). Posteriormente se realizó tinción con plata siguiendo el siguiente protocolo:

Tres lavados en etanol 50% (JT Baker 9014-03) durante 20 min. cada uno. Pretratamiento con tiosulfato de sodio penta hidratado (SIGMA S1648) 0.2g/litro durante un min. Tres lavados de 20 seg. con agua bidestilada. Impregnación con nitrato de plata (MERCK 905252) 2g /litro y 750 μ l/litro de formaldehído (SIGMA F-1268) durante 20 min. Dos lavados de 20 seg. con agua bidestilada. Un enjuague de un min. con revelador (60g/litro de carbonato de sodio (MERCK 210383R), tiosulfato de sodio 4mg/litro y 500 μ l de formaldehído) hasta obtener la imagen deseada. Dos lavados de 2 min. con agua bidestilada, 10 min. en

ácido acético 1% y finalmente 20 min. en metanol 50%. Los geles fueron escaneados en una resolución de 300dpi en un escáner Lexmark L75. Los geles se secaron en celofán dulce con una solución que contiene 35% etanol al 95% y 2% glicerol.

Análisis de geles:

Las masas moleculares (MM) fueron determinadas mediante el marcador de peso molecular con un rango de 10-210 KDa. Para los valores de *pI*, se utilizaron los valores proporcionados por los proveedores de las tiras IPG.

Para el presente trabajo se realizó un análisis preliminar de los geles comparando el patrón de expresión de las proteínas. Para dicho análisis se utilizó el programa Adobe Photoshop 7.0 (Adobe Systems Incorporated). Las imágenes fueron superpuestas para comparar los patrones y corroborar las observaciones hechas visualmente

Para calcular la MM se realizaron mediciones de la distancia de migración y estos se relacionaron con los estándares. El procedimiento se realizó utilizando el programa PRISM 4 (Versión 4.0, © GraphPad Software, Inc.) aplicando una función de decaimiento exponencial de fase única. Para calcular el *pI* se realizó una regresión lineal con base al gradiente de pH de la tira.

Para conocer la posible identidad de las proteínas de forma teórica realizamos una búsqueda de las mismas en Expasy (<http://ca.expasy.org/prosite>) con los valores de MM y *pI* obtenidos

para cada proteína de acuerdo a los siguientes parámetros: pI +/- de 0.1 y +/- 2% de error en MM. Posteriormente para las proteínas identificadas en rata (*Rattus norvegicus*) realizamos una búsqueda en Pubmed (<http://www.ncbi.nih.gov>) con el fin de identificar aquellas que se expresaran en sistema nervioso (SN).

RESULTADOS

El inicio de la especificación de los barriles está adelantada en las ratas enucleadas

Utilizamos la técnica de citocromo oxidasa para establecer el tiempo de aparición de los barriles correspondientes a la vibrisas faciales de la rata en animales controles y enucleados. Comenzamos analizando la ventana temporal en la que empiezan a formarse los barriles correspondientes al PBMSF. Inicialmente utilizamos ratas controles y enucleadas de 0, 1, 2, 3, 4 y 5 PN. Al observar los cortes tangenciales teñidos para CyOx, encontramos que los animales podían categorizarse en cuatro grupos. Aquellos en los que no hay indicios de la formación del patrón de barriles, aquellos en los que observamos un machón que abarca en su totalidad el territorio que corresponderá a la cabeza, aquellos en los que se definen la bandas que corresponden a los barriles aún sin segregarse, y aquellos en los que los barriles están claramente definidos. Esta progresión ya ha sido referida por Henderson et al. (1994). Dichos parámetros (excepto las bandas) son ejemplificados en la figura 2 panel A. Inicialmente encontramos que los barriles están ausentes a los 3PN pero están presentes a los 4PN en ambos grupos de animales (Figura 2, panel B). Procedimos a estudiar esta ventana temporal. Partiendo de lo anterior decidimos analizar animales a los 3d12h y encontramos que los animales ciegos tienen barriles en tanto los controles no tienen (datos no mostrados). De modo que nuevamente nos recorrimos en el tiempo y analizamos

animales de 3d8h y de 3d16h, sin embargo encontramos difícil determinar la presencia de barriles en estas edades ya que en general observamos manchones que pudieran corresponder a barriles no segregados pero no podíamos concluir (Figura 3).

Analizamos entonces animales de 3d10h y 3d20h. A los 3d10h encontramos que el 29% de los animales controles presentan barriles en tanto 68% de los animales enucleados los tienen. A los 3d20h encontramos que el 82% de los animales controles presentan barriles en tanto 83% de los animales enucleados los tienen (Figura 4). En la figura 4 y cuadro 3 se muestran una representación gráfica y el análisis estadístico de los porcentajes de animales que presentan barriles, manchones o ausencia de barriles a los 3d10h y 3d20h.

En las figuras 5 y 6 se muestra una representación gráfica de los porcentajes de animales por sexo y condición experimental que presentan barriles y aquellos que no los presentan a los 3d10h y 3d20h. Las gráficas permiten ver claramente que la aparición de los barriles en ambas poblaciones de animales y sexos es relativamente progresiva. El tiempo de inicio de la aparición de los primeros barriles en la población de ratas enucleadas antecede al correspondiente en las ratas control en ambos sexos. Esta diferencia tiende a desaparecer a los 3d20h. En el cuadro 4 se muestran los resultados del análisis estadístico, para analizar la posible relación entre el sexo y la aparición de barriles.

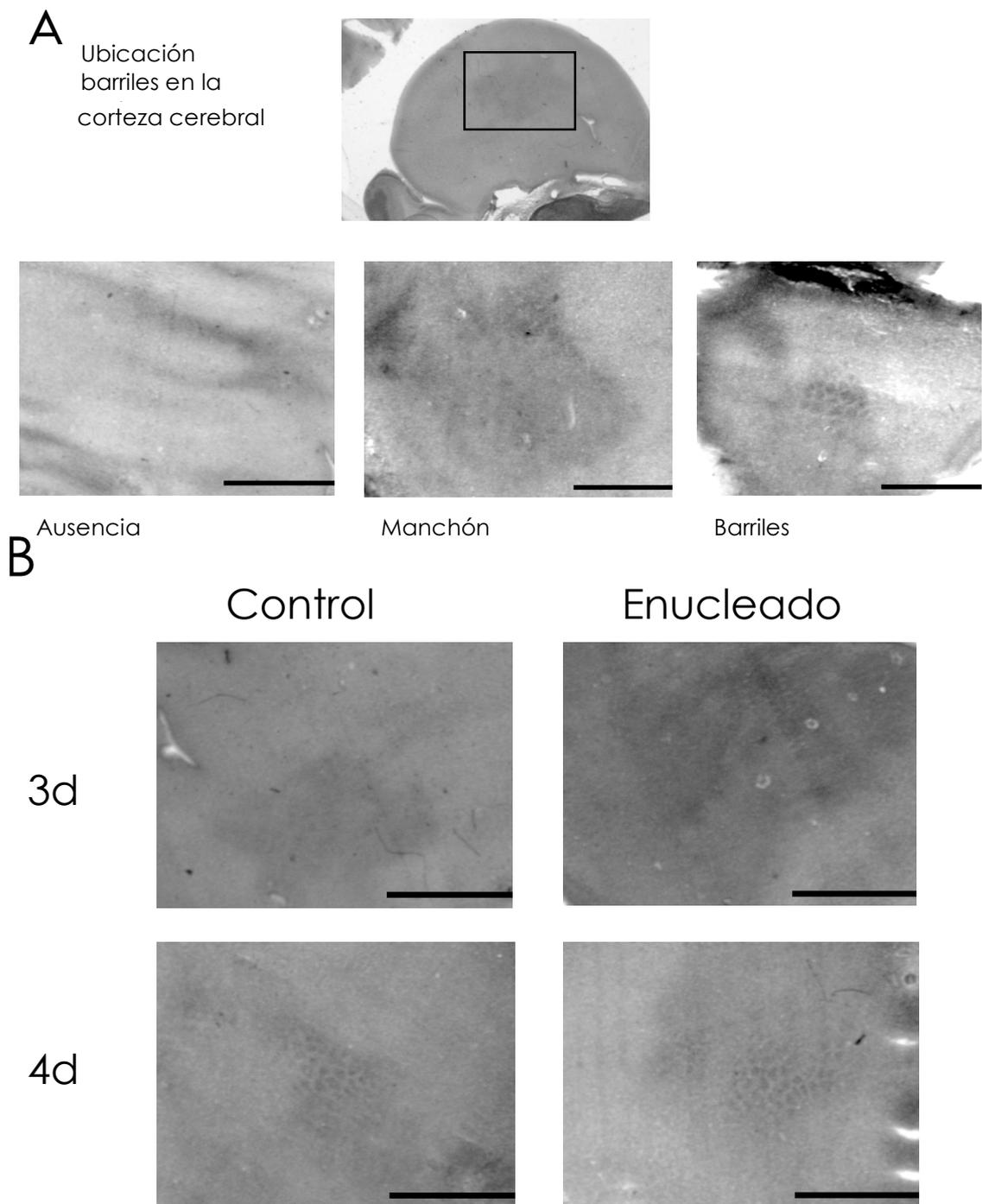
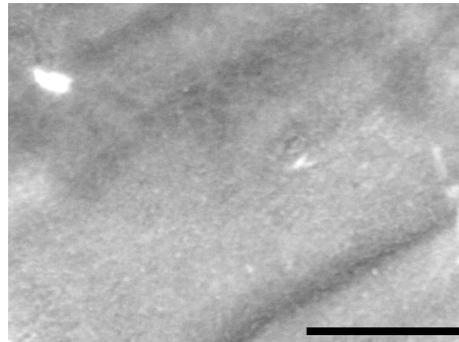
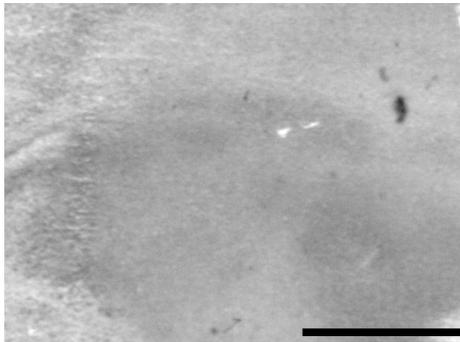


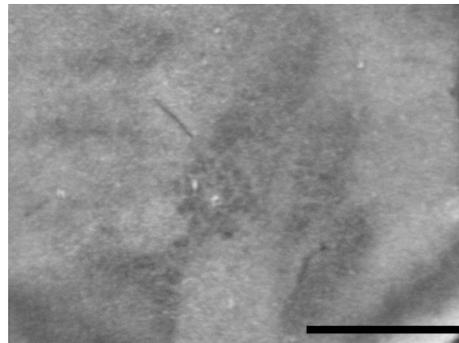
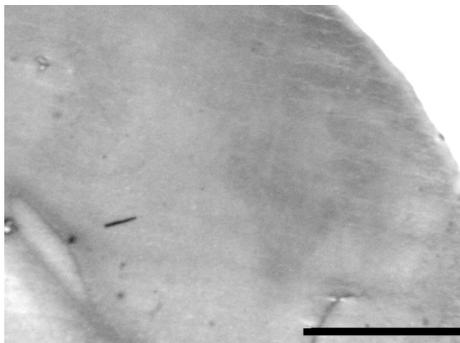
FIGURA 2. El panel A muestra cortes tangenciales de corteza de rata teñidas para CyOx. a) ausencia de barriles, en un animal de edad 3PN, b) manchón de barriles sin segregarse en un animal de 3d10h. c) barriles ya segregados en un animal de 3d20h. En el panel B se muestran rebanadas de animales controles y enucleados a los 3d y los 4d PN. La escala en todas las fotos corresponde a 2mm.

Control

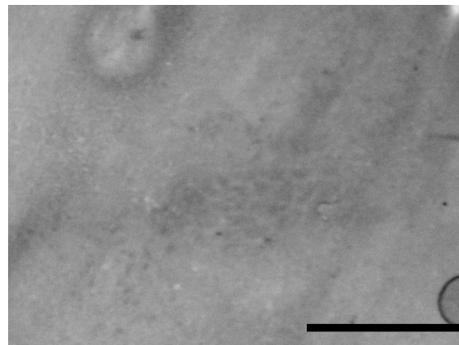
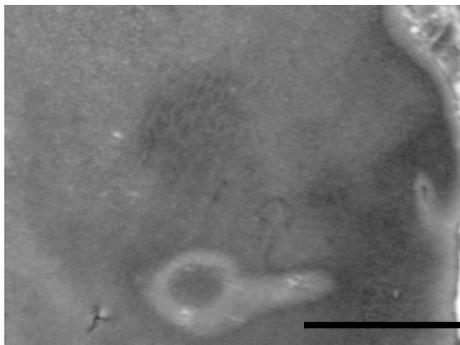
Enucleado



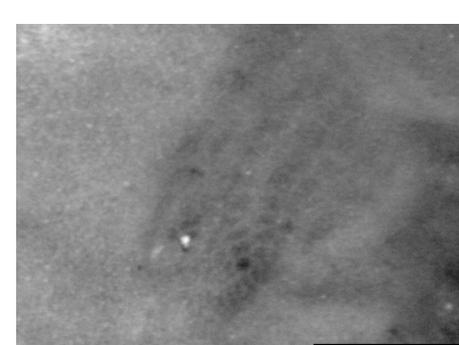
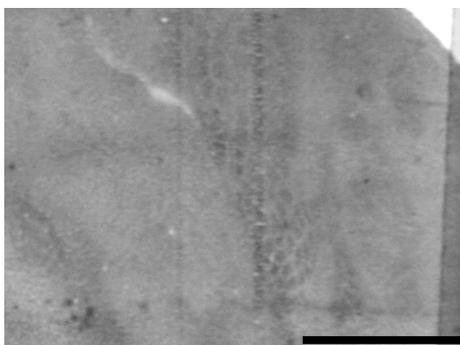
3d8h



3d10h



3d16h



3d20h

FIGURA 3. Se muestran cortes tangenciales de la corteza cerebral de animales controles y enucleados a los 3d8h, 3d10h, 3d16h y 3d20h teñidos con CyOx. La escala corresponde a 2 mm.

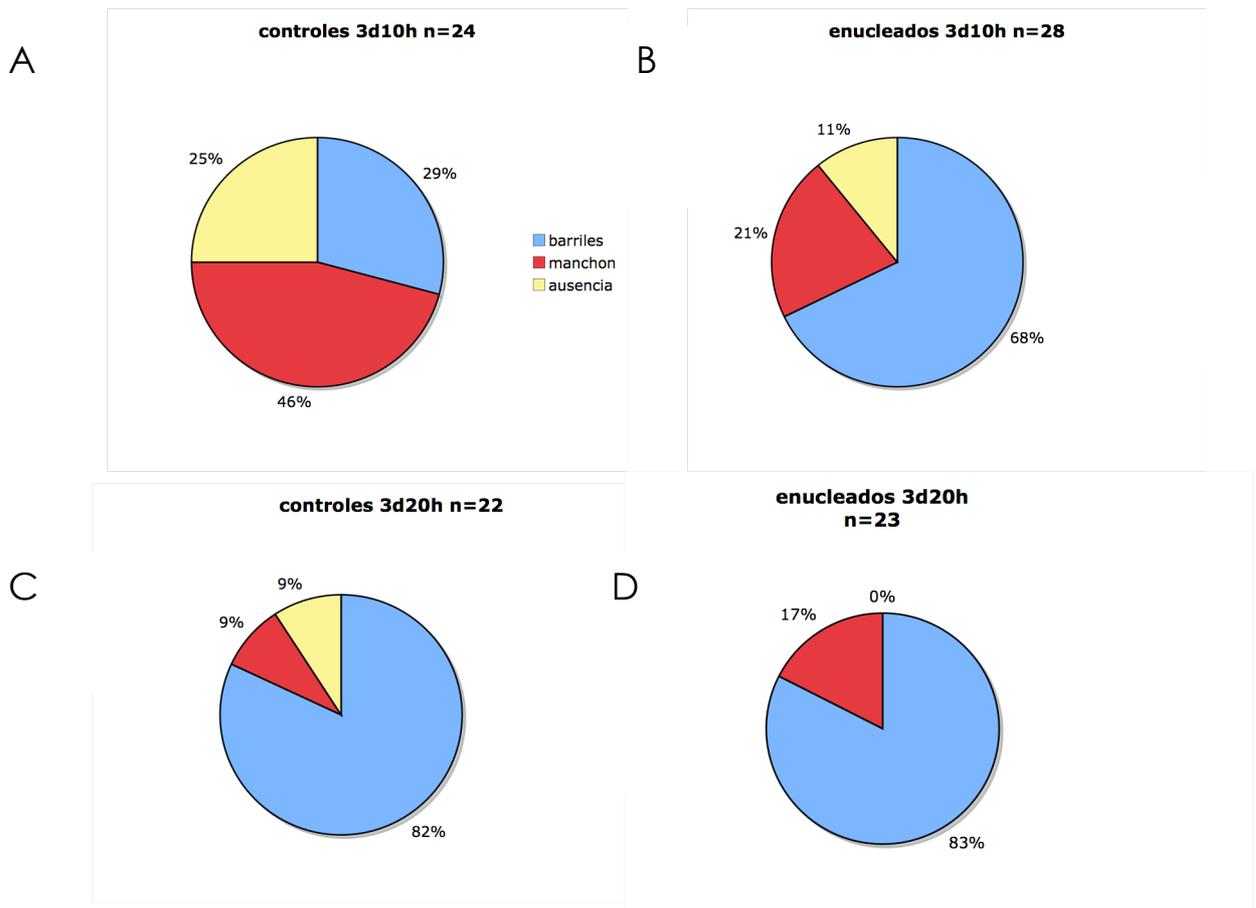


FIGURA 4. Se muestran los porcentajes de animales con barriles, manchón y ausencia. A) animales controles 3d10h B) animales enucleados 3d10h C) animales controles 3d20h D) animales enucleados 3d20h.

CUADRO 3

| Comparación de frecuencia de eventos | | | |
|---|-------------------------|------------------------|---------|
| Prueba de x² | | (x²) | |
| grupos comparados | | X ² | valor p |
| 3d10h | controles enucleados | 24.344 | 0.001* |
| 3d20h | controles enucleados | 4.056 | — |

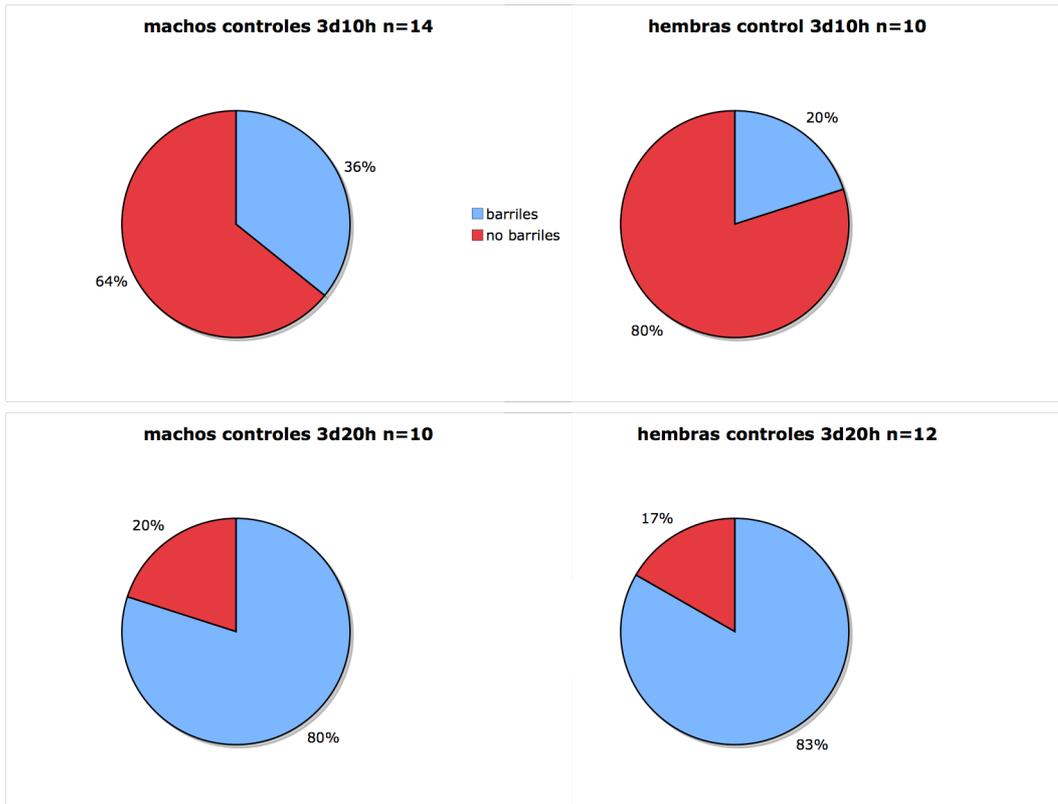


FIGURA 5. Se muestran los porcentajes de animales controles machos y hembras con barriles y sin barriles.

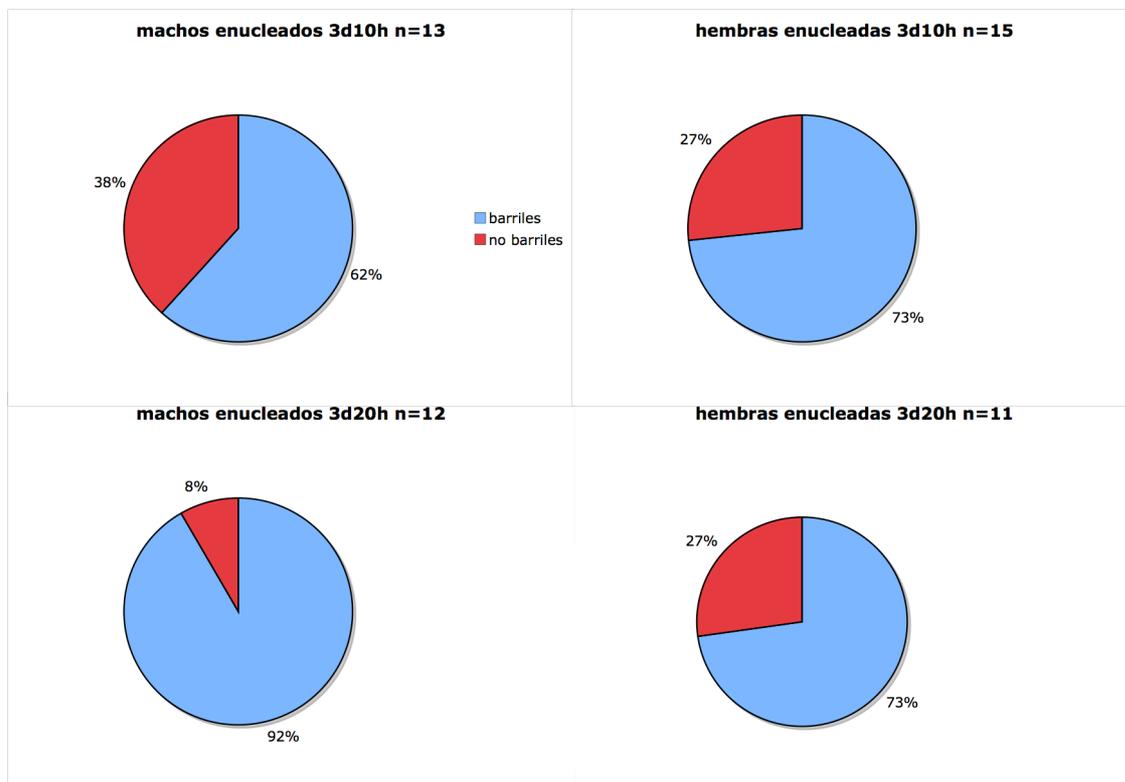


FIGURA 6. Se muestran los porcentajes de animales enucleados machos y hembras con barriles y sin barriles.

CUADRO 4

| prueba completa de Fischer | | |
|-----------------------------------|-------------------|---------|
| Grupos comparados | | valor p |
| 3d10h controles | machos hembras | 0.653 |
| 3d10h enucleados | machos hembras | 0.689 |
| 3d20h controles | machos hembras | 1.000 |
| 3d20h enucleados | machos hembras | 0.317 |

Únicamente encontramos diferencias significativas entre los animales controles y enucleados de 3d10h con un valor de $\chi^2=24.34$ con dos grados de libertad y valor p= 0.001 No encontramos diferencias significativas de dimorfismo sexual en la aparición de los barriles.

Patrones de expresión de proteínas

Habiendo establecido el tiempo (3d10h) en el cual buscaríamos proteínas que pudieran participar en la formación de los barriles en la corteza somatosensorial de la rata, procedimos a analizar los patrones de expresión de proteínas. Los gels bidimensionales realizados por duplicado con muestras independientes de animales de 3d10h (2 por condición), nos permitieron realizar el siguiente análisis:

En la figura 7 se muestra un gel de las proteínas de ratas control, las proteínas señaladas son aquellas en las que se observaron variaciones respecto con los resultados obtenidos con cerebros de ratas

enucleadas a los 3d10h (panel A: machos y panel B: hembras). Las proteínas señaladas con un número en los geles son aquellas en las que se observaron diferencias. En los cuadros 5 y 6 se muestran las variaciones de dichas proteínas con relación a la presencia y punto isoeléctrico para cada sexo. (Cuadro 5 machos, cuadro 6 hembras).

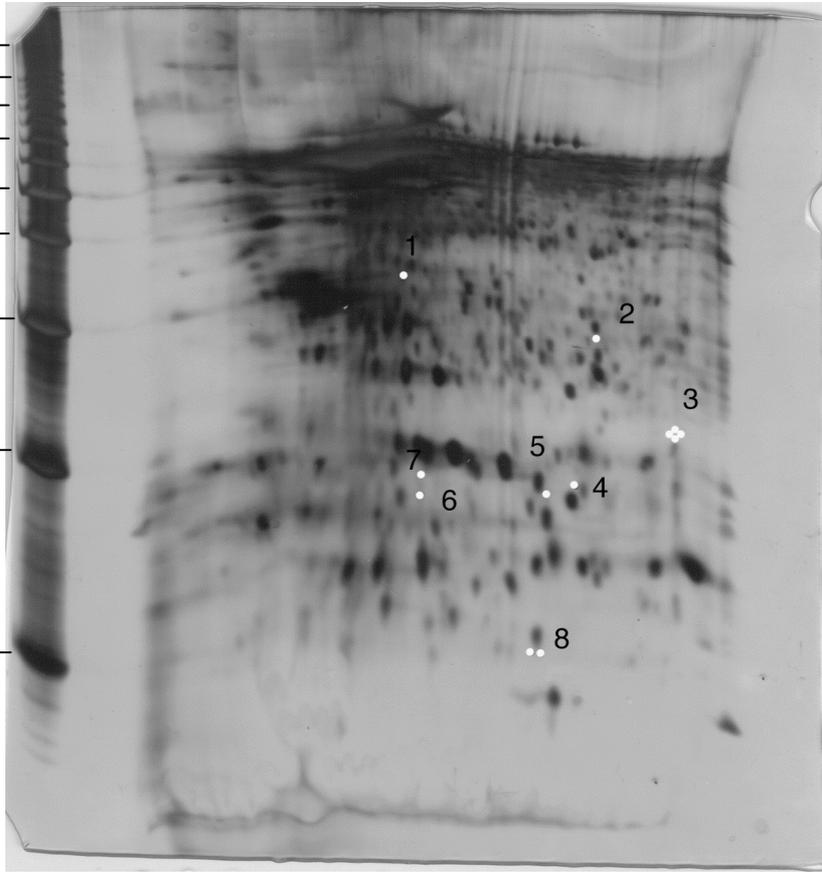
En un esfuerzo por tratar de determinar la identidad de las proteínas que varían entre los grupos experimentales se realizó una búsqueda en bancos de datos con base a la *MM* y *pI* de cada proteína. Los candidatos se muestran en el cuadro 7 (en la última columna se muestran algunas proteínas candidatas presentes en el cerebro de la rata).

A IEF

pH4

pH7

210
120
90
70
50
40
30
20
10



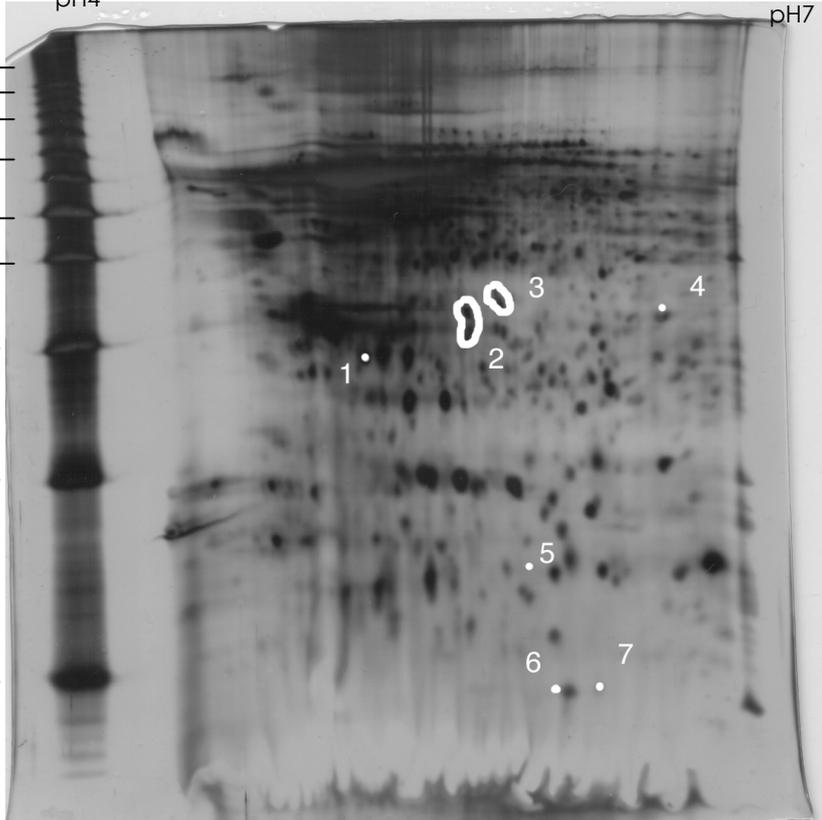
S
D
S
P
A
G
E

B IEF

pH4

pH7

210
120
90
70
50
40
30
20
10



S
D
S
P
A
G
E

FIGURA 7. Resumen comparativo por sobre posición y análisis visual de 2 geles de de animales controles y 2 geles de animales enucleados de 3d10h (panel: A: machos; panel B: hembras). Las diferencias se señalan con números.

CUADRO 5

MACHOS CONTROLES VS ENUCLEADOS

| punto | pI obs | pm KDa | variaciones |
|-------|--------|--------|-----------------------------|
| 1 | 5.32 | 36.964 | no se observa en enucleados |
| 2 | 6.32 | 30.177 | no se observa en controles |
| 3 | 6.75 | 21.993 | no se observa en controles |
| 4 | 6.30 | 18.377 | C variación pI |
| | 6.28 | 18.377 | C |
| | 6.38 | 18.377 | E |
| | 6.23 | 18.377 | E |
| 5 | 6.07 | 18.170 | no se observa en controles |
| 6 | 5.39 | 18.170 | no se observa en controles |
| 7 | 5.39 | 19.456 | no se observa en controles |
| 8 | 6.00 | 9.697 | no se observa en controles |

CUADRO 6

HEMBRAS CONTROLES VS ENUCLEADOS

| punto | pI obs | pm KDa | variaciones |
|-------|--------|----------|---|
| 1 | 5.06 | 30.590 | C variación pI |
| | 5.04 | 30.590 | C |
| | 5.15 | 30.590 | E |
| | 5.25 | 30.590 | E |
| 2 | área | área | variaciones entre grupos experimentales |
| 3 | área | área | variaciones entre grupos experimentales |
| 4 | 6.42 | 35.90332 | no se observa en enucleados |
| 5 | 5.92 | 15.42166 | no se observa en enucleados |
| 6 | 6.06 | 9.311352 | no se observa en enucleados |
| 7 | 6.28 | 9.311352 | no se observa en controles |

CUADRO 7

| Controles | | |
|------------|--|---|
| punto | proteinas que pudieran ser | funcion reportada PMID |
| 2 M | Acbd4 (proteina con dominio de unión a acetil CoA 4) | Participa en ciclo de Krebs |
| | precursor de renina | complejo renina-angiotensina regula presión arterial y balance electrolitos. 8293852/8251338/8210768 |
| | precursor del receptor de renina tenomodulina | complejo renina-angiotensina regula presión arterial y balance electrolitos. 8293852/8251338/8210768 inhibidor angiogénesis en C. elegans 16019413 |
| 6 H | CNTRa (receptor del factor neurotrófico ciliar alpha) | su ligando se expresa en glia del sistema nervioso central y periférico. Estimula la sobrevivencia y diferenciación de neuronas sensoriales. Receptor comparte subunidad con receptor de IL6 10812968. Papel durante neurogénesis 9169916 |
| | receptor de melanocortina 3 | receptor neuronal participa en la regulación de la homeostasis de energía 15975705 |
| | cadena 1 de NADH ubiquinona-oxidoreductasa | enzima mitocondrial, pertenece al complejo I de la cadena de transporte de electrones 10989660/14531279 |
| | precursor carboxipeptidasaβ | participa en la regulación de la coagulación 11460482/9776208. Enzima altamente parecidas presentes en vesículas y gránulos de secreción 3883214/6373800. |
| | dehidratasa de acido aminolevulinico | relacionada con toxicidad por plomo, y evaluación de contaminantes neurotóxicos 11161649 |
| 7 H | BID (agonista de muerte con dominio de interacción con BH3) | participa en vías de muerte/sobrevivencia celular y apoptosis, proteína proapoptótica Apoptosis en homeostasis y desarrollo normal de tejidos. 12067067/16115019. |
| | CRBP II (citoplasmic retinoid binding protein II) | proetina de unión a retinoides, relacionada con transporte y metabolismo de retinoides a través de barreras hemato/organos 2052162/8839926 |
| 8 H | no logré identificar ninguna | - |
| Enucleados | | |
| punto | proteinas que pudieran ser | funcion reportada PMID |
| 3 M | proteína precursora del β amiloide A4 (por similitud) | principal componente de amiloide cerebral en enfermedad de Alzheimer, expresión distinta en síndrome de Down 8239320. presente durante el desarrollo 1838182 |
| 4 M | proteína homóloga a C9orf42 | caudalización organizadores en anfibios 7720551. Neurogeninas (marcadores del origen de la diversidad neuronal) 9000438. Netrinas (migración celular y crecimiento axonal) 12440385. Morfogénesis de SNC 15633461. |
| | precursor de stanniocalan-2 | relacionada con la homeostasis de calcio y fosfato, acción anti-hipocalcémica. Q9R0K8 |
| | SMUG1 (uracilo-ADN glicosilasa monofuncional selectiva de cadena sencilla) | participa en la reparación de uracilos modificados por oxidación en ADN 12718543/15466595 |
| 6 M | precursor mitocondrial de la anhidrasa carbónica 5A | quimioopercepción de niveles de oxígeno/dióxido de carbono, adaptaciones de pH celular 7606251. Relación con desarrollo auditivo 2994352 |
| | ligando OX40 (miembro de la superfamilia de ligandos de factor de necrosis tumoral) | relacionados con células T y memoria AAC67236 |
| 7 M | LMW-PTP (proteín fosfatasa de tirosinas de bajo peso molecular) | rica en terminales nerviosas, pudiera participar en sinapsis 10480315. Pierde su actividad con estrés oxidativo 10814511. Participa en el desarrollo del lente ocular en proliferación celular, diferenciación y transparencia 11428869. Aumento fisiológico du |
| | LMW-PTP (proteín fosfatasa de tirosinas de bajo peso molecular) | rica en terminales nerviosas, pudiera participar en sinapsis 10480315. Pierde su actividad con estrés oxidativo 10814511. Participa en el desarrollo del lente ocular en proliferación celular, diferenciación y transparencia 11428869. Aumento fisiológico du |
| 9 M | ARN polimerasa II dirigida a ADN | síntesis de ARN |
| | Mediador de ARN polimerasa II subunidad S28 | síntesis de ARN |
| 9 H | no logré identificar ninguna | - |

DISCUSIÓN

Adelanto de la especificación de los barriles en las ratas enucleadas

En las ratas enucleadas al nacimiento, se observa un incremento en el tamaño relativo de S1. Aún cuando el mecanismo que subyace a este cambio se desconoce, existe la posibilidad de que modificaciones en el tiempo de inicio, en la duración y/o en la terminación del proceso de especificación de S1 pudieran estar involucradas. Así mismo, una aceleración de la tasa de desarrollo conduciría a una expansión. En concordancia con estas suposiciones, los datos obtenidos en el presente trabajo muestran un adelanto en el inicio de la formación de los barriles en animales enucleados. Esto se apoya en el hecho de que a los 3d10h encontramos que el 29% de los animales controles presentan barriles, en tanto que el 68% de los animales enucleados muestran barriles a esta edad. Así, el adelanto en la formación de los barriles pudiera explicarse, al menos parcialmente, por un fenómeno de pre-desplazamiento (predisplacement).

Adicionalmente resultados obtenidos en el laboratorio indican que tanto dendritas como axones muestran mayor crecimiento y complejidad en los enucleados al compararse con controles en edades equivalentes durante la primera semana de vida lo cual sugeriría que esta diferencia nace del adelanto (Hernández, 2004; Uribe-Querol en preparación). Estas diferencias pudieran atribuirse a una aceleración en la tasa de desarrollo de los elementos neuronales que constituyen la vía tálamo cortical somatosensorial.

Resulta importante señalar que el adelanto documentado en la especificación de los primeros barriles en las ratas enucleadas al nacimiento no descarta la participación de la actividad espontánea y quizá de otros mecanismos como de aquellos involucrados en la definición de los límites topográficos entre las áreas corticales. De hecho, resulta mucho más verosímil pensar que sea una combinación de estos mecanismos, y quizá otros aun no definidos, lo que finalmente genere dicha expansión.

Cambios en los patrones de expresión de proteínas entre grupos experimentales

Como se señaló en la sección de resultados se documentaron variaciones en el patrón (ausencia o presencia) de proteínas extraídas de S1 a los 3d10h en ambos grupos de animales. Con base en los geles se estimaron el punto isoeléctrico y el peso molecular de aquellas proteínas en las que se observaron cambios. La búsqueda en el banco de datos del NCBI nos arrojó una lista de proteínas candidatas entre las que destacaron varias que se relacionan con el desarrollo neuronal. De estas, y con base a resultados preliminares obtenidos en el laboratorio, la proteína OX40L resulta de particular interés, ya que ésta pertenece a la familia de $TNF\alpha$ cuyos niveles de expresión se encuentran elevados en S1 de los animales enucleados a los 10 días

de edad (Figura 8; Villafán y Gutiérrez-Ospina, resultados no publicados)

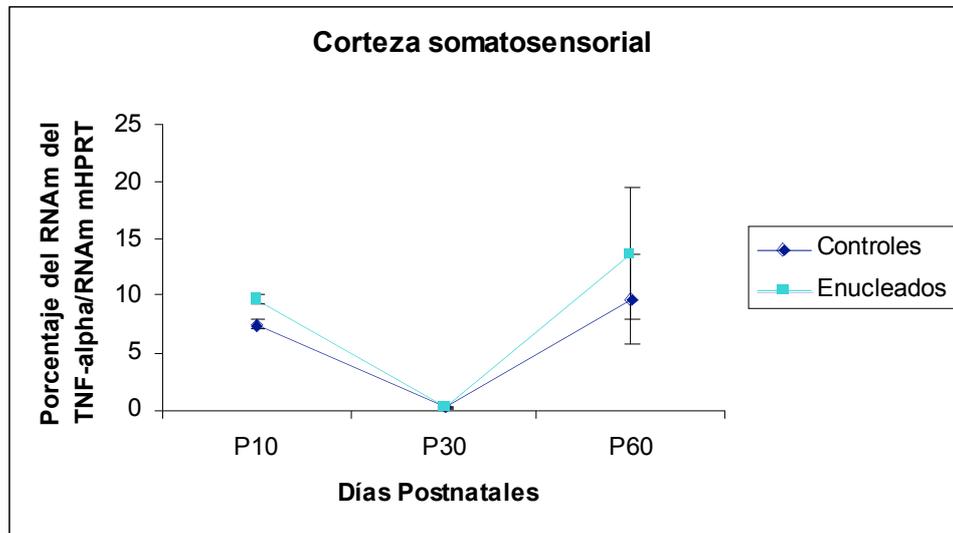


Figura 8. Gráfica que muestra los niveles de expresión relativa del ARNm TNF α en S1 de ratones CD1 controles y enucleados de 10, 30 y 60PN, respecto al nivel de expresión del ARNm de HPRT. A los 10 PN existe una diferencia estadísticamente significativa con un valor $t=0.0035$ y $p=0.001$.

Al respecto es importante resaltar que la pérdida de la función de TNF α debida a la inactivación del gen de receptor para este ligando, retrasa el desarrollo y tiempo de especificación del giro dentado en el hipocampo de ratones (Golan et al., 2004).

Adicionalmente, encontramos de manera interesante las siguientes diferencias en otras proteínas en el grupo de animales enucleados respecto a los controles:

- Identificamos proteínas relacionadas con la síntesis de ARN mensajero, lo cual sugiere un aumento en la transcripción. Una posibilidad es que dicho aumento esté relacionado con la regulación temporal del fenómeno. Esto pudiera ser a través de

la reorientación de los procesos neuronales, lo cual involucraría la síntesis de moléculas de señalización, reguladores transcripcionales o incluso miARNs.

- Se encontraron diferencias en proteínas que pueden estar relacionadas con neurogénesis, proliferación celular y diferenciación. Esto sugiere que el proceso de desarrollo postnatal es distinto entre los grupos experimentales.
- Finalmente encontramos proteínas relacionadas con migración celular y crecimiento axonal las cuales pudieran relacionarse con los cambios reportados por el laboratorio en los árboles dendríticos y axónicos que sugieren una mayor tasa de desarrollo en los elementos neuronales que constituyen los barriles.

LIMITACIONES DEL ESTUDIO

Si bien el presente estudio abre brecha en la línea de investigación general del laboratorio, es importante reflexionar sobre algunas de las limitaciones asociadas a los aspectos técnicos del mismo.

1) Con relación a la definición de la ventana temporal utilizada para la búsqueda de moléculas involucradas en la alteración temporal de la formación de los primeros barriles, considero que es importante analizar el patrón de expresión de proteínas en edades anteriores a los 3d10h ya que la serie de eventos que desencadenan en el adelanto probablemente comienzan a partir de la enucleación.

2) Debido a que distintos eventos del desarrollo pudiesen sobrelaparse en el tiempo, no sabemos con precisión si las proteínas candidatas sugeridas están involucradas en el adelanto temporal y/o en la propia formación de los barriles.

3) El número de proteínas totales separadas en nuestros geles bidimensionales es mayor que aquellas documentadas en estudios en los que se buscan cambios en el patrón de expresión de proteínas en respuesta a tratamientos farmacológicos (Paulson et al., 2003; Krapfenbauer et al., 2001). La complejidad del patrón de proteínas que obtuvimos pudiera ser simplificada a través de realizar un separación de proteínas con base en su solubilidad utilizando 4 fases distintas (aquellas solubles en amortiguador de Tris, aquellas extraídas con tritón, extraídas con CHAPS y extraídas con urea/tiourea). De manera adicional, se podrían analizar los patrones de proteínas obtenidos con otros rangos de pH o con rangos de pH más estrechos lo que mejora la resolución.

4) Una dificultad para la interpretación de las diferencias en los patrones de proteínas pudiera estar relacionada con la posible existencia de múltiples isoformas por lo que una mancha pudiera representar y/o enmascarar más de una de ellas (Yang et al., 2005).

CONCLUSIONES

1. El tiempo de inicio de la especificación de los primeros barriles del PMBSF esta adelantado en las ratas enucleadas. A este fenómeno se le conoce como pre-desplazamiento.
2. El efecto del pre-desplazamiento podría conducir a la expansión de los barriles de S1 en las ratas enucleadas.
3. Existen modificaciones en el patrón de proteínas que preliminarmente podrían asociarse con los cambios en los tiempos de especificación de los barriles en la población de ratas enucleadas.

PERSPECTIVAS DEL TRABAJO

Con la finalidad de proponer un modelo sobre los mecanismos que conducen a cambios plásticos, es necesaria la identificación precisa de las proteínas en las que se observaron variaciones entre los grupos experimentales evaluados en el presente trabajo. Para ello, sería necesario el análisis de dichas proteínas por espectrometría de masas o su secuenciación por el método de degradación. A partir de esto, podrían realizarse experimentos dirigidos a evaluar la expresión de estas proteínas mediante Westernblot o Inmunohistoquímicas.

La identificación de las proteínas sin embargo no es suficiente para establecer un mecanismo. Para ello se tendrían que establecer la forma en que ellas interactúan. Con esta finalidad se podrían realizar estudios de coimmunoprecipitación o ensayos de doble híbrido.

Para evaluar si existen alteraciones en la duración de la especificación de los barriles a nivel poblacional, es necesario comenzar por establecer el momento en el cual el 100% de la población presenta al menos un barril. A partir de esto y con los datos obtenidos en el presente trabajo se puede entonces plantear un modelo matemático para comparar la dinámica del fenómeno.

Habiendo documentado un adelanto de 10 horas en el inicio de la especificación de los primeros barriles en las ratas enucleadas al nacimiento, podemos sugerir la participación de fenómenos heterocrónicos en este proceso plástico. Queda ahora responder el cómo se induce y regula dicha alteración temporal.

BIBLIOGRAFÍA

Agmon A., Yang LT., Jones EG., O'Dowd DK. (1995) Topological precision in the thalamic projection to neonatal mouse barrel cortex. *J. Neuroscience* 15(1):549-561.

Armstrong-James M. (1975) The functional status and columnar organization of single cells responding to cutaneous stimulation in neonatal rat somatosensory cortex S1. *Journal of Physiology London* 246: 501-538.

Bates C.A., Killackey H.P. (1985) The organization of the neonatal rat's brainstem trigeminal complex and its role in the formation of central trigeminal patterns. *J. Comp. Neurol.* 240:265-287.

Bavelier D., Neville H.J. (2002) Cross-modal plasticity: where and how? *Nature Reviews Neuroscience* 3:443-452.

Belford G.R., and Killackey H.P. (1979) Vibrissae representation in subcortical trigeminal centers of the neonatal rat. *J. Comp. Neurol.* 183:305-322

Bounomano D.V., Merzenich M.M. (1998) Cortical plasticity: from synapses to maps. *Annual Review Neuroscience* 21:149-186.

Bronchti G., Schönenberger N., Welker E., Van der Loos H. (1992) Barreldfield expansion after neonatal eye removal in mice. *NeuroReport* 3: 489-492

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

Chiaia NL, Fish SE, Bauer WR, Figley BA, Eck M, Bennett-Clarke CA, Rhoades RW. (1993) 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.* 1994;11(3):219-28.

Erzurumlu R., Killackey H. (1983) Development of order in the rat trigeminal system. *J. Comp. Neurol.* 213: 365-380.

Fox K., Zahs K. (1994) Critical period control in sensory cortex. *Current Opinion in Neurobiology* 4:112-119.

Geovannini H (2001) Re-evaluación del papel de la actividad neuronal asociada con el uso y de la densidad de inervación periférica en la plasticidad sensoriomodal de la neocorteza de la rata. Tesis para obtener el título de Maestro en Ciencias (Neurobiología). Instituto de Neurobiología, UNAM.

Golan H., Levav T., Mendelsohn A., Huleihel M. (2004) Involvement of tumor necrosis factor alpha in hippocampal development and function. *Cerebral Cortex* 14:97-105.

Gutierrez-Ospina G., Calikoglu A.S., Ye P., D'Ercole A.J. (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*. Dec; 137(12):5484-92.

Harder D.R., Zhang C., Gebremedhin D. (2002) Astrocytes function in matching blood flow to metabolic activity. *News Physiol. Sci.* 16:27-31.

He L., Hannon G. (2004) MicroRNAs: Small RNAs with a big role in gene regulation. *Nature Reviews Genetics*, 5:522-530.

Henderson T.A., Johnson E.M. Jr, Osborne P.A., Jacquin M.F. (1994) Fetal NGF augmentation preserves excess trigeminal ganglion cells and interrupts whisker-related pattern formation. *J Neurosci.* May;14(5 Pt 2):3389-3403.

Hernández L. (2004). Reinterpretación del proceso de reorganización dendrítica: Estudios sobre el desarrollo de los árboles dendríticos en las neuronas estelares espinosas en S1. Tesis para obtener el título de Licenciado en Biología. Facultad de Ciencias, UNAM.

Iwasato T., Datwani A., Wolf A.M., Nishiyama H., Taguchi Y., Tonegawa S., Knopfel T., Erzurumlu R., Itohara S. (2000) Cortex restricted disruption of NMDAR1 impairs neuronal patterns in the barrel cortex. *Nature* 406:726-731.

Killackey H.P., Dawson D.R. (1989) Expansion of the Central Hindpaw Representation Following Fetal Forelimb Removal in the Rat. *Eur J Neurosci.* May;1(3):210-221.

Killackey H.P. (1989) Static and dynamic aspects of cortical somatotopy: A critical evaluation. *Journal of Cognitive Neuroscience* 1(1):3-11

Killackey H.P., Jacquin M.F., Rhoades R. (1990) en *Development of sensory systems in mammals: Development of somatosensory system structures* (Coleman JR, editor) New York, J. Wiley.

Krapfenbauer K., Berger M., Lubec G., Fountoulakis M. (2001) Changes in brain protein levels following administration of kainic acid. *Electrophoresis* 22: 2086-2091.

Krichevsky A.M., King K.S., Donahue C.P., Khrapko K., Kosik K.S. (2003) A microRNA array reveals extensive regulation of microRNAs during brain development. *RNA* 9:1274-1281.

Landers MS., Sullivan RM. (1999) Vibrissae-evoked behavior and conditioning before functional ontogeny of somatosensory vibrissae cortex. *J. Neuroscience* 19(12):5131-5137.

Lee K.J., Woolsey T.A. (1975) A proportional relationship between peripheral innervation density and cortical neuron number in the somatosensory system of the mouse. *Brain Res.* Dec 5;99(2):349-53.

Liu D., Diorio J., Day J.C. Francis D.D., Meaney M.J. (2000) Maternal care, hippocampal synaptogenesis and cognitive development in rats. *Nature Neuroscience* 3:799-806.

Loeb EP., Chang FLF., Greenough WT. (1987) Effects of neonatal 6-hydroxydopamine treatment upon morphological organization of the posteromedial barrel subfield in mouse somatosensory cortex. *Brain Research* 403(1):113-120.

López S (2000) Efectos de la malnutrición hipoproteica sobre el tiempo de especificación de la corteza somosensorial primaria de la rata. Tesis para obtener el título de Licenciado en Biología. ENEP Iztacala, UNAM.

Lubec G., Krapfenbauer K., Fountoulakis M. (2003) Proteomics in brain research: potentials and limitations. *Progress in Neurobiology* 69:193-211

Miska E.A., Alvarez-Saavedra E., Townsend M., Yoshii A., Sestan N., Rakic P., Constantine-Paton M., Horvitz H.R. (2004) Microarray analysis of microRNA expression in the developing mammalian brain. *Genome Biol.* 5(9):R68. Epub

Negyessy L, Gal V, Farkas T, Toldi J. (2000) Cross-modal plasticity of the corticothalamic circuits in rats enucleated on the first postnatal day. *Eur J Neurosci.* 2000 May; 12(5): 1654-68.

Nicolelis M.A., Chapin J.K. (1994) Spatiotemporal structure of somatosensory responses in many-neuron ensembles in the rat ventral posterior medial nucleus of the thalamus. *J. Neuroscience* 14:3511-3532.

Paulson L., Martin P., Persson A., Nilsson C., Ljung E., Westman-Brinkmalm A., Eriksson P., Blennow K., Davidsson P. Comparative genome- and proteome analysis of cerebral cortex from MK801-treated rats.

Petersen C.H. (2003) The barrel cortex- integrating molecular, cellular and systems physiology. *European journal of neurophysiology* 447:126-134.

Rauschecker J.P, Egert U., Kossel A. (1990) Effects of NMDA antagonists on developmental plasticity in kitten visual cortex. *Int. J. Developmental Neuroscience* 8(4):425-435.

Rauschecker J.P, Tian B., Korte M., Egert U. (1992) Crossmodal changes in the somatosensory vibrissa/barrel system of visually deprived animals. *Proceedings of the National Academy of Science* 89: 5063-67.

Rauschecker J.P. (1995) Compensatory plasticity and sensory substitution in the cerebral cortex. *Trends Neuroscience* Jan; 18(1):36-43.

Rhoades R.W., DellaCroce D.D., Meadows I. (1981) Reorganization of somatosensory input to superior colliculus in neonatally enucleated hamsters: anatomical and electrophysiological experiments. *J Neurophysiol.* 1981 Oct; 46(4):855-77.

Rice F.L., Gomez C., Barstow C., Burnet A., Sands P. (1985) A comparative analysis of the development of the primary somatosensory cortex: Interspecies similarities during barrel and laminar development. *J Comparative Neurology* 1985. 236: 477-495

Rice F.L., Mance A., Munger B.L. (1986) A comparative Light Microscopic analysis of the sensory innervation of the mystacial Pad. I. Innervation of vibrissal follicle-sinus complexes. *J Comparative Neurology* 252:154-74

Riddle D.R., Gutierrez G., Zheng D., White L.E., Richards A., Purvez D. (1993) Differential metabolic and electrical activity in the somatic sensory cortex of juvenile and adult rats. *Journal of Neuroscience* 13(10) 4193-4213.

Rougvie A. (2001) Control of developmental timing in animals. *Nature Reviews Genetics* 2:690-701.

Schlaggar B.L., O'Leary D. (1994) Early development of the somatotopic map and barrel patterning in the rat somatosensory cortex. *J. Comp. Neurol.* 346:80-96.

Sokoloff L. (1999) Energetics of functional activation in neural tissues. *Neurochem. Res.* 24:321-329.

Sur M., Pallas SL., Roe AW. (1990) Cross-modal plasticity in cortical development: differentiation and specification of sensory neocortex. *Trends in Neuroscience* 13(6):227-233.

Sur M., Leamy C. (2001) Development and plasticity of cortical areas and networks. *Nature Reviews Neuroscience* 2:251-262.

Toldi J., Rojik I., Feher O. (1994a) Neonatal monocular enucleation-induced cross-modal effects observed in the cortex of adult rat. *Neuroscience*. 1994 Sep; 62(1):105-14.

Toldi J., Farkas T., Völgyi B. (1994b) Neonatal enucleation induces cross-modal changes in the barrel cortex of rat. A behavioral and electrophysiological study. *Neuroscience Letters* 1994 Feb 14; 167(1-2):1-4.

Toldi J., Feher O., Wolff J.R. (1996) Neuronal plasticity induced by neonatal monocular (and binocular) enucleation. *Prog Neurobiol.* 1996 Feb; 48(3):191-218.

Uribe-Querol E., Martínez-Martínez, Tapia-Rodríguez M., Hernández L.R., Toscano-Márquez B., Padilla P., Gutiérrez-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.

Waite P., Tracey D. (1995) en *The rat Nervous System: Trigeminal Sensory System* (Paxinos G, editor) 2nd edition, New York Academic Press 1995. mutant barreless. *Science*. Mar1996, 271: 1864-1867.

Welker W.I. (1964) Analysis of sniffing in the albino rat. *Behaviour* 12:223-244.

Welker C., Woolsey TA. (1974) Structure of layer IV in the somatosensory neocortex of the rat: description and comparison with the mouse. *J Comp Neurol.* 1974 Dec 15; 158(4):437-53.

Wise S.P., Jones E.G. (1978) Developmental studies of thalamocortical and commissural connections in the rat somatic sensory cortex. *J Comparative Neurology* 178:187-208.

Wong-Riley M. (1989) Cytochrome oxidase: an endogenous metabolic marker for neuronal activity. *Trends in Neuroscience* 12(3):94-101.

Woolsey T., Van der Loos H. (1970) The structural organization of layer IV in the somatosensory region (S1) of mouse cerebral cortex. *Brain Research* 17:205-242

Yang J.W., Juranville J.F., Höger H., Fountoulakis M., Lubec G. (2005) Molecular diversity of rat brain proteins as revealed by proteomic analysis. *Molecular Diversity* 9:385-396.

Zheng D., Purves D. (1995) Effects of increased neuronal activity in brain growth. *PNAS* 92:1802-1806.

Zucker E., Welker W.I. (1969) Coding of somatic sensory input by vibrissae neurons in the rat's trigeminal ganglion. *Brain Res.* Jan; 12(1):138-56.