



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

“MODIFICACIONES ANATÓMICAS Y CELULARES DE LA
CORTEZA SOMATOSENSORIAL PRIMARIA DE RATONES
ENCEGUECIDOS AL NACIMIENTO”

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL
P R E S E N T A :
BIOL. LUIS RODRIGO HERNÁNDEZ MIRANDA

DIRECTOR DE TESIS: DR. GABRIEL GUTIERREZ OSPINA



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.

Indice General

Indice

Resumen

Abstract

1. Introducción

2. Antecedentes

2.1 Una muy breve historia de la Plasticidad Neuronal

2.2 Las cortezas sensoriales

2.3 Plasticidad en la corteza visual

2.4 Plasticidad en la corteza somatosensorial

2.5 Plasticidad intermodal-modal

2.6 Modelo experimental de la Plasticidad Inter-modal

2.7 Biología celular del desarrollo de la corteza cerebral y las semaforinas

3. Planteamiento del problema

4. Material y Métodos

4.1 Animales

4.2 Enceguecimiento neonatal

4.3 Congelamiento de las muestras y almacenamiento

4.4 Análisis del grosor de la corteza cerebral, la laminación cortical y el número neuronal en los barriles B1, C1 y D1.

4.5 Impregnación de Golgi-Cox

4.6 Selección de neuronas y dibujos en *cámara lucida*

4.7 Análisis morfológico

4.8 Inmunohistoquímica

4.9 Hibridación *in situ*

4.10 Análisis densitométrico.

4.11 Análisis estadístico.

5 Resultados

5.1 El desarrollo corporal inferido por la ganancia de peso cerebral y corporal no difiere entre ratones control y enceguedos.

5.2.1 Los animales enceguedos mostraron una reducción en el grosor de sus capas I, IV y VI mientras una expansión de su capa II/III en la corteza somatosensorial

5.3 No existen cambios en el número de neuronas que forman a los barriles

de los animales enceguedos pero si en su distribución espacial.

5.4 No existen cambios en la intensidad de la marca inmunohistoquímica para neurofilamentos-200kDa pero si en aquella para MAP-2 dendrítico de los animales enceguedos.

5.5 Análisis morfológico del componente dendrítico de la corteza somatosensorial

5.5.1 Los animales enceguedos al nacimiento mostraron un mayor crecimiento dendrítico en sus neuronas piramidales de la capa II/III en comparación a los animales control después de la segunda semana de vida

5.5.2 Los animales enceguedos al nacimiento mostraron un menor crecimiento dendrítico en sus neuronas estrelladas espinosas de la capa IV en comparación a los animales control después de la tercer semana de vida

5.5.3 Los animales enceguecidos al nacimiento no mostraron diferencias en el crecimiento dendrítico de sus neuronas piramidales de la capa V en comparación a los animales control durante su desarrollo postnatal

5.6 Modificaciones en el patrón de expresión de las semaforinas 3A y 3F en el desarrollo postnatal temprano de los animales enceguecidos.

6. Discusión

6.1 Alteraciones en el Desarrollo postnatal de la corteza somatosensorial primaria de los animales enceguecidos al nacimiento.

6.2 Adelgazamiento de la corteza somatosensorial en animales enceguecidos

6.3 Los árboles dendríticos de las neuronas piramidales de la capa II/III y IV sufren modificaciones en los animales enceguecidos.

6.4 Expresión de sema 3A y 3C en los animales enceguecidos en comparación con sus controles.

7. Bibliografía

Anexo 1

Anexo 2

Resumen

El encefalecimiento neonatal en los mamíferos lleva a la expansión de su corteza somatosensorial. Los mecanismos relacionados con esta expansión no han sido esclarecidos. Usando técnicas de impregnación de Golgi-Cox, histológicas, inmunohistoquímicas y de hibridación *in situ* en la corteza somatosensorial de ratones encefalecidos al nacimiento, nosotros nos preguntamos si la expansión de esta corteza conlleva a modificaciones en la laminación cortical, el patrón de ramificaciones dendríticas de las neuronas corticales, así como, la expresión de moléculas directoras del desarrollo cortical tales como las semaforinas 3A y 3C. Nuestros resultados muestran que el encefalecimiento neonatal produce un decremento en el grosor de la corteza somatosensorial primaria de los animales encefalecidos, ya que es significativamente menor al ser comparado con sus contrapartes control. Este adelgazamiento de la corteza somatosensorial observado en los animales encefalecidos parece afectar predominantemente a esta área cortical ya que no se observaron modificaciones en el grosor de las cortezas aledañas tales como la motora y la auditiva primarias. El encefalecimiento neonatal tiene un efecto importante en la laminación de la corteza somatosensorial primaria. Los animales encefalecidos mostraron un incremento en el grosor de las láminas II/III y del cuerpo calloso, mientras que el grosor de las capas I, IV y VI disminuyó significativamente, no se observaron cambios en la lámina V. A pesar de la reducción en el grosor de la capa IV, los barriles B1, C1 y D1 en los animales controles y encefalecidos no mostraron diferencias en el número total de neuronas que los conforman aunque si en el porcentaje de neuronas localizadas en el borde o en el interior de los barriles. El encefalecimiento también conduce a un incremento seguido de una reducción en el componente dendrítico de la corteza somatosensorial pero no de su componente axónico durante el desarrollo. Particularmente, las dendritas de las neuronas estrelladas espinosas de la capa IV en animales encefalecidos mostraron un crecimiento significativamente mayor en las dos primeras semanas de vida, y menor a partir de la tercera semana de vida cuando se compara con sus contrapartes control. En la capa II/III se observó lo contrario, ya que los animales encefalecidos desarrollaron árboles dendríticos más complejos y ramificados además de una longitud dendrítica mayor que sus contrapartes control solamente hacia la tercera semana de vida. Adicionalmente, no observamos cambios significativos en las dendritas de las neuronas piramidales de la capa V entre los animales controles y encefalecidos durante su desarrollo. Finalmente, la expresión de sema 3A y sema 3C se altera en los animales encefalecidos durante su desarrollo siendo estos cambios más notorios a los 7DP de vida.

Abstract

Neonatal enucleation in mice leads to the expansion of their somatosensory cortex. The mechanisms related to this expansion are still unclear. Using Golgi-Cox impregnation, *in situ* hybridization, histological and immunohistochemical techniques we asked if the expansion of the somatosensory cortex could be associated to modifications in the cortical lamination, dendritic arborization of cortical neurons and in the expression pattern of guiding cues involved in the cortical development such as semaphorins (sema 3A and 3C). Our results **showed** that neonatal enucleation has an effect on the thickness of the somatosensory cortex. This cortex is shorter in enucleated than in control animals. This shrinkage of the somatosensory cortex seems to be exclusive to this cortex because no changes were observed on the thickness of nearby cortices such as auditory and motor. Neonatal enucleation has also an important effect on cortical lamination of the somatosensory cortex. Eenucleated animals showed an increase on the thickness of the layer II/III and the corpus callosum while a reduction of the layer I, IV and VI. No changes were observed on layer V. In spite of the shrinkage observed on the layer IV in enucleated mice, barrels (B1, C1 and D1) do not have differences on the total number of neurons that they contain but in the distribution of them in each barrel. Neonatal enucleation leads to a reduction of the dendritic component in the somatosensory cortex, but not on the axonic component during postnatal development. Particularly, spiny stellate neurons of enucleated animals showed a significant dendritic growth during the first two postnatal weeks followed for a significant decrease on their dendritic growth after the third postnatal week when compared with control animals. Conversely, neurons of layer II/III of enucleated animals developed dendritic trees more branching and complex than their control littermates after the third postnatal week. Noticeably, no changes were observed on pyramidal dendritic trees of layer V. Finally, expression of sema 3A and sema 3C was altered in enucleated mice during the first postnatal week when compared with control animals.

1. Introducción

En los mamíferos adultos, la neocorteza o corteza cerebral presenta dos patrones anatómicos y funcionales que la caracterizan. Estos patrones corresponden a las áreas y las láminas corticales que emergen de la estructura básica del cerebro durante la ontogenia [1]. Por un lado, las áreas corticales forman mapas especie-específicas que representan en el cerebro de manera detallada el tipo de información que procesan y corresponden a las denominadas áreas motoras, sensoriales y de asociación [2]. Por otro lado, la neocorteza está compuesta por seis capas o láminas celulares que organizan la conectividad cortical [1,2]. Estas capas corticales son comúnmente referidas con números romanos en una secuencia de afuera hacia adentro, tomando como referencia de inicio a la pía madre. (Anexo 1).

Durante las pasadas tres décadas se ha mostrado que la disrupción sensorial en etapas tempranas del desarrollo resulta en modificaciones tanto en la conectividad neuronal de la corteza cerebral como en su organización cito-arquitectónica [3-11]. Esta reorganización cortical comprende cambios a nivel sináptico hasta reajustes en la geometría de los circuitos neuronales intra e inter-corticales. El resultado de este proceso es la contracción o expansión de las áreas corticales privadas e intactas de estimulación sensorial, respectivamente, en un fenómeno llamado plasticidad inter-modal [12]. Desafortunadamente, los mecanismos involucrados en la plasticidad inter-modal aún no se han esclarecido. El estudio de los mecanismos celulares y moleculares involucrados en la plasticidad inter-modal y sus consecuencias en el procesamiento de información a nivel cortical es esencial para comprender eventos de recuperación de las funciones neuronales

después de lesiones periféricas, así como otros procesos fisiológicos complejos algunos de ellos son la ontogenia cortical, el aprendizaje y la memoria.

Un modelo interesante en el estudio de la plasticidad inter-modal es la corteza somatosensorial de roedores enceguecidos al nacimiento. Particularmente el subcampo de barriles posterior-medial de la corteza somatosensorial primaria (PMBSF, por sus siglas en inglés) se encuentra expandido en los animales enceguecidos cuando se compara con sus contrapartes. El PMBSF contiene una representación isomórfica del cuerpo en los roedores, esta representación se encuentra arreglada por grupos de neuronas estrelladas espinosas que asemejan la estructura de un barril (ver mas adelante). Aquí, nosotros nos preguntamos si la expansión de PMBSF podría ser causada por un sobre crecimiento de los árboles dendríticos de las neuronas estrelladas espinosas y/o de las ramificaciones axónicas que inervan a las neuronas estrelladas, si esta expansión puede ser el resultado de un incremento en el número de neuronas que conforman a los barriles del PMBSF. Finalmente, nosotros nos preguntamos si la expansión del PMBSF altera el patrón de expresión de las semaforinas 3A y 3C las cuales se han reportado como directoras del crecimiento dendrítico y axónico de neuronas de la corteza cerebral durante el desarrollo cortical postnatal.

2. Antecedentes

2.1 Una muy breve historia de la Plasticidad Neuronal

El concepto de plasticidad neuronal no es de origen reciente, ya que la presencia de un sustrato neuronal modificable fue propuesta por Santiago Ramón y Cajal hace cerca de cien años [13]. En los años 60, el trabajo realizado por Torsten Wiesel y David Hubel [14-15] sobre la reorganización de la corteza visual en respuesta al estrabismo fue el punto de partida en el estudio sistemático de la plasticidad neuronal. El uso de diversas técnicas como inmuno-histoquímica, electrofisiológica, de microscopía electrónica y los estudios de video-microscopía en tiempo real han impulsado las investigaciones en el campo de la plasticidad neuronal en las últimas tres décadas [16]. Así, la plasticidad neuronal se ha definido como la capacidad del sistema nervioso de modificar su organización funcional y/o estructural en respuesta a eventos fisiológicos o patológicos a lo largo de la vida del organismo.

Como se infiere de la última oración del párrafo anterior, la plasticidad neuronal es un fenómeno que se presenta en cualquier momento de la vida del animal. Sin embargo, la velocidad y la magnitud con que las respuestas plásticas se producen durante el desarrollo de las áreas sensoriales como resultado de la disrupción temprana de la información sensorial, han llevado al estudio exhaustivo de dicha plasticidad durante la ontogenia [16]. A continuación enlistaré algunos ejemplos que ilustran este punto.

2.2 Las cortezas sensoriales

Las cortezas sensoriales en los mamíferos contienen una representación topográfica de los receptores localizados en su cuerpo [17-19]. Estas áreas sensoriales procesan información proveniente de cada uno de los órganos sensoriales a través de los cuales el animal interactúa con el medio. Así, la neocorteza de los mamíferos contiene mapas topográficos que representan a los receptores visuales en la retina (retinotópicos), a los tono-receptores en la cóclea (tonotópicos), a los mecanoreceptores en la superficie corporal (somatotópicos), etc [19].

2.3 Plasticidad en la corteza visual

Los cambios anatómicos y fisiológicos que subyacen a la plasticidad neuronal han sido estudiados con gran detalle en la corteza visual de los mamíferos en desarrollo perinatal [16]. Durante las primeras 4 semanas postnatales en los gatos, la estimulación individual de ambos ojos se traduce en una activación relativamente generalizada de la corteza visual primaria [14,16]. Después de la cuarta semana, esta misma estimulación produce un patrón más discreto de activación cortical [14, 16]. De esta forma, las respuestas se restringen a áreas corticales discretas y se convierten en estímulo-específicas [14,16]. Es decir, en el adulto, grupos de neuronas en la capa 4c que reciben aferentes del núcleo geniculado lateral responden preferentemente a la estimulación visual de un ojo, y se alternan con grupos de neuronas que responden a la estimulación de la retina del otro ojo. Estos grupos alternados de neuronas se han denominado columnas de dominancia ocular [16]. Durante el desarrollo de la corteza visual del gato, la oclusión unilateral de un ojo dentro de las primeras 8 semanas de vida, por la sutura unilateral de cualquiera de los

parpados o por la colocación de un lente opaco sobre uno de los ojos, resulta en un incremento en la proporción de neuronas en la corteza visual que responden a estímulos visuales provenientes del ojo abierto [14-15]. Simultáneamente, existe un decremento en las neuronas que responden a la estimulación del ojo cerrado [14-15]. Estas modificaciones en la fisiología de la corteza visual posterior a la interrupción de la información visual han sido pensadas como el resultado de cambios plásticos a nivel sinápticos que llevan al fortalecimiento de las sinapsis asociadas por el ojo abierto, mientras que las conexiones que representan al ojo ocluido presentan una reducción en su número y patrón de disparo [14-16].

2.4 Plasticidad en la corteza somatosensorial

Otro de los modelos donde se ha estudiado la plasticidad en el desarrollo es la corteza somatosensorial primaria (figura 1). Los roedores tienen vibrisas o bigotes faciales muy prominentes, los cuales son utilizados para navegar en el espacio. La información sensorial proveniente de las vibrisas es transmitida a través del nervio trigémino hacia el complejo nuclear trigeminal ubicado en el tallo cerebral [20-21]. De aquí, y después de un relevo sináptico, la vía alcanza al núcleo posterior-medial del tálamo desde el cual nuevas proyecciones se dirigen hacia el área somato-sensorial primaria que a menudo se denomina corteza de barriles [22-23]. Este nombre es derivado de la organización anatómica de las neuronas estrelladas espinosas presentes en la capa IV de esta área, la cual consiste en agregados celulares que asemejan la forma de un barril [22]. Los barriles más prominentes corresponden a las vibrisas de la cabeza del animal, donde cada vibrisa

está representada por un barril [22]. La remoción de una vibrisa o el trasplante de algunas extra ocasiona la reducción o adición en el número de barriles en la corteza [24]. Sorprendentemente, esta adición o remoción resulta también en la producción de barriles más pequeños o grandes, respectivamente, sin que exista un cambio en el tamaño total de la corteza somato-sensorial primaria [24-25]. Estos cambios plásticos han sido observados dentro de la primera semana postnatal en los roedores, cuando las sinapsis aún son inmaduras funcionalmente, lo cual sugiere que el proceso de maduración sináptica está asociado con los fenómenos plásticos durante el desarrollo [26].

2.5 Plasticidad intermodal-modal

Los estudios pioneros de Hubel y Wiesel mostraron otro fenómeno plástico extraordinario cuando cerraron ambos ojos del gato durante los primeros días postnatal mediante la sutura bilateral de sus párpados [15]. En estos animales las neuronas de la capa 4c presentaron una reducción de las respuestas estímulo-específicas, respondieron erróneamente a la estimulación proveniente de ambos ojos [15]. Sorprendentemente, un número considerable de neuronas no respondieron a ninguna estimulación visual, a pesar de que mostraban actividad neuronal espontánea [15,27]. Estos resultados dieron origen a dos importantes preguntas: ¿Qué clase de conexiones son formadas en la corteza visual que no pueden ser activadas por la estimulación visual? y ¿Son estas neuronas y sus conexiones reclutadas por circuitos neuronales diferentes de las visuales? Para dilucidar estas cuestiones la comunidad científica prestó particular atención en el desarrollo de las cortezas sensoriales en individuos ciegos y sordos. De esta manera, se ha mostrado que la

pérdida de una modalidad sensorial en etapas tempranas de la vida tiene un fuerte efecto en el desarrollo

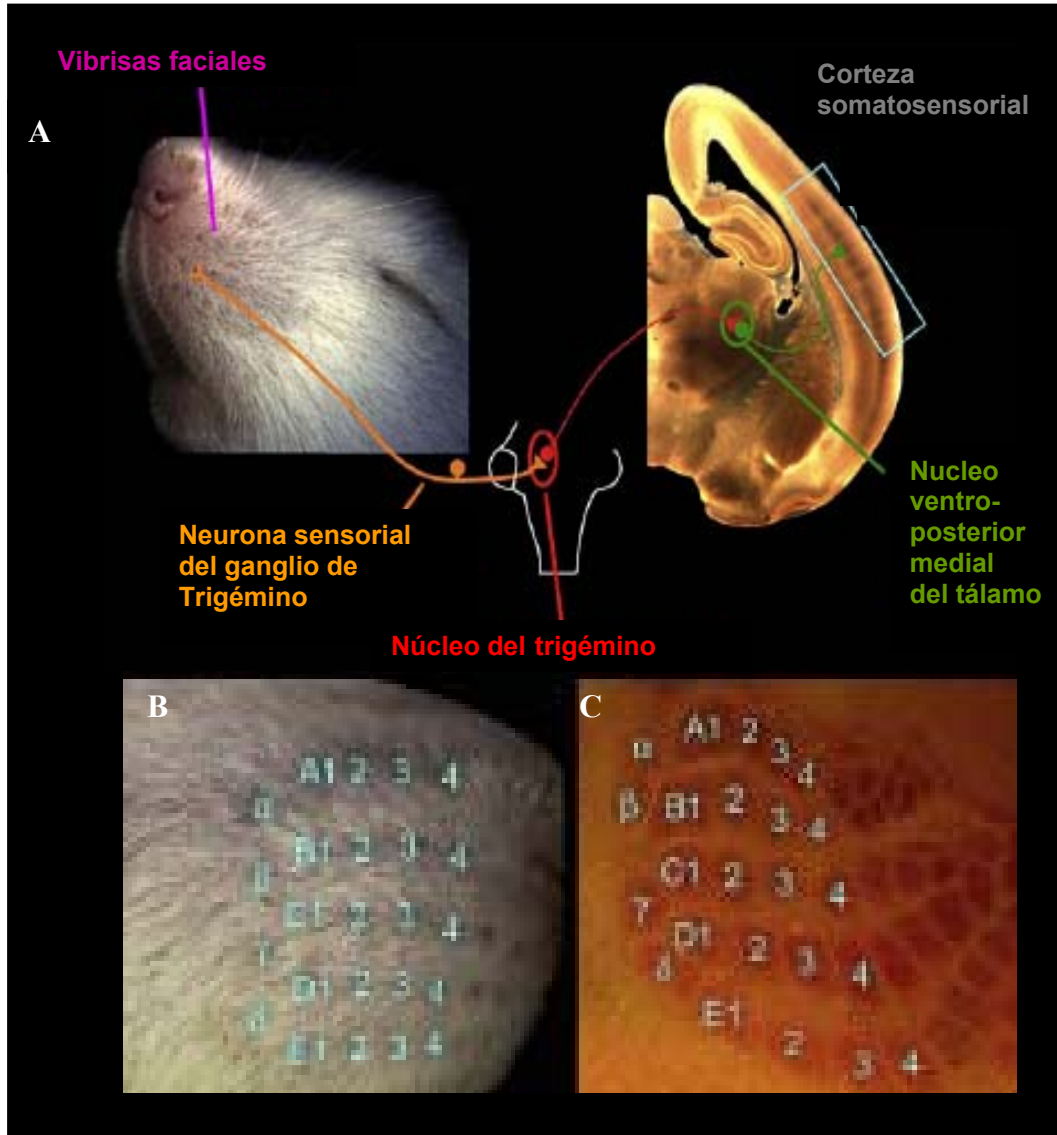


Figura 1. Sistema somatosensorial. (A) La información sensorial proveniente de las vibrisas es transmitida a la corteza somatosensorial a través de varios relevos sinápticos (ver texto). (B) Las vibrisas faciales de los roedores tienen una representación cortical en la corteza somatosensorial en arreglos celulares denominados barriles (C).

de las cortezas sensoriales intactas [28-32]. De forma similar, estos estudios mostraron por un lado, cambios conductuales en las modalidades sensoriales ilesas en animales ciegos o sordos, y por el otro, la existencia de una reorganización de las funciones corticales. Esta reorganización cortical va desde cambios a nivel sináptico hasta reajustes en la conectividad neuronal intra e intercortical que llevan a la expansión o contracción de áreas sensoriales en la corteza cerebral en un fenómeno llamado plasticidad inter-modal [12]. En los animales ciegos, el área visual se encuentra contraída mientras que las áreas somatosensorial y auditiva se observan expandidas de manera anatómica y funcional [12].

2.6 Modelo experimental de la Plasticidad Inter-modal

Con el objeto de estudiar los cambios plásticos que ocurren sobre la conectividad cortical como resultado de la plasticidad inter-modal, nuestro laboratorio ha analizado el desarrollo del sistema somatosensorial en roedores enceguecidos al nacimiento. Como se mencionó anteriormente, el área somatosensorial contiene un mapa topográfico de los mecanorreceptores en el cuerpo. Este mapa organizado en barriles es más visible en la capa 4 cortical. Los barriles más prominentes son aquellos localizados en el sub-campo de barriles posterior-medial (PMBSF por sus siglas en inglés, ver Figura 1). El PMBSF es una representación isomórfica de las vibrisas del hocico de los roedores [22]. Estudios previos han mostrado que el PMBSF sufre una expansión en roedores enceguecidos neonatalmente [33-38]. De manera individual los barriles se expanden de un 16 a un 28% en los animales enceguecidos [39]. Cuando se comparó el tamaño de la corteza cerebral de los animales controles con los enceguecidos no se observaron diferencias [39]. Esto

sugiere que la expansión del PMBSF ocurre por un alargamiento de sus componentes neuronales a expensas de otras regiones corticales. Desafortunadamente, los mecanismos involucrados en la expansión del PMBSF aún no se entienden con claridad. No obstante, algunos cambios estructurales y funcionales tales como la generación de nuevos brotes axónicos y dendríticos, la activación de sinapsis atenuadas, y el reforzamiento o atenuación sináptica se han propuesto como elementos que participan en la expansión del PMBSF [12].

2.7 Biología celular del desarrollo de la corteza cerebral y las semaforinas.

El desarrollo cortical en los mamíferos inicia durante la ontogenia y termina en etapas postnatales tempranas [2]. La acción coordinada del medio ambiente extracelular y la información intrínseca (genética) de las neuronas son pilares en la formación de la citoarquitectura cortical [2]. Los mecanismos celulares y moleculares que participan en el desarrollo de la corteza cerebral han comenzado a dilucidarse [40]. Diversas familias de moléculas de señalización extracelular y sus blancos intracelulares regulan el desarrollo cortical [41-44]. Entre estas familias de moléculas, las semaforinas han sido ampliamente estudiadas durante el desarrollo de la corteza somatosensorial por su efecto sobre el crecimiento de procesos dendríticos y axónicos [45]. Las semaforinas (sema) comprenden una gran familia de moléculas de señalización con al menos 20 miembros reportados. Se dividen en dos clases específicas para invertebrados (1 y 2), cinco para vertebrados (3-7) y una presente en algunos tipos de virus (V, de viral) [46]. Particularmente las semaforinas de la clase 3 - sema 3A, 3B, 3C, 3D y 3F - han recibido mayor atención por su acción sobre el desarrollo cortical [46]. Se sabe que sema 3A

favorece el desarrollo de los árboles dendríticos de las neuronas corticales en la primera semana de vida de los roedores, así como en el la guía de sus axones hacia la sustancia blanca. La sema 3C ejerce una acción antagónica a sema 3A durante el desarrollo cortical a través de la competencia por su receptor neuropilina 1 [45,47-50].

3. Planteamiento del problema

Los mecanismos involucrados en los fenómenos de plasticidad inter-modal son hasta el momento pobremente conocidos. La expansión de la corteza de barriles, particularmente del PMBSF, de los roedores engeguados al nacimiento ofrece un modelo excepcional para el estudio de los mecanismos que subyacen a la plasticidad inter-modal. Esta el momento muchos de los estudios realizados para entender los mecanismos de expansión del PMBSF se han enfocado en los mecanismos de transmisión sináptica y sus modificaciones. Sin embargo, la expansión de PMBSF podría también ser causada por un sobre crecimiento de los árboles dendríticos de las neuronas estrelladas espinosas y/o de los árboles axónicos que inervan a las neuronas estrelladas. Por otro lado, esta expansión puede ser el resultado de un incremento en el número de neuronas que conforman a los barriles del PMBSF. Los cambios plásticos observados en el PMBSF podrían llevar eventualmente a modificaciones en los patrones de expresión de las moléculas de señalización extracelular directoras del desarrollo cortical tales como las semaforinas 3A y 3C.

4. Material y Métodos

4.1 Animales

En este trabajo se utilizaron ratones de la cepa CD1 de las edades de 5, 7, 10, 14, 21, 28 y 60 (n= 6 animales por edad y condición) días postnatales (DP). Los animales se mantuvieron en el bioterio del Instituto de Investigaciones Biomédicas con ciclos de luz-oscuridad controlados (12-12 hrs.). El alimento y el agua fueron proporcionados *ad libitum*. El manejo de los animales y los procesos quirúrgicos se realizaron siguiendo las normas publicadas en la guía de usos y cuidados para animales de laboratorio del NIH y fueron autorizados por el comité correspondiente en el Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México.

4.2 Enceguecimiento neonatal

El enceguecimiento neonatal fue realizado bajo los lineamientos previamente descritos [33-34]. Brevemente, ratones recién nacidos fueron anestesiados por hipotermia (6-10 hrs. posteriores al nacimiento). Se hicieron delicadas incisiones en la fisura palpebral y con la ayuda de una pinza fina se removió el globo ocular y parte tejido circundante de ambos ojos. Posterior a la cirugía, los animales fueron colocados sobre un cojinete térmico para su recuperación. Los animales se regresaron a sus madres una vez recuperados del procedimiento quirúrgico.

4.3 Congelamiento de las muestras y almacenamiento

Los animales destinados para tinción de violeta de creylo, inmunohistoquímica e hibridación *in situ* fueron procesados de la siguiente manera. Seis animales por edad y condición fueron perfundidos intra-cardíacamente con solución salina (0.9%), seguida por una solución fijadora preparada con paraformaldehído (PFA 4%) en amortiguador de fosfatos (PB 0.1M). Posteriormente, los cerebros se disecaron rápidamente y postfijaron en PFA (PFA 4% en PB 0.1 M) por 4 hrs. a temperatura ambiente (TA). Ulterior a la postfijación, los cerebros se colocaron en una solución crioprotectora (Sacarosa 30% en PB 0.1M) por 24 hrs. a 4°C. Después de la crioprotección, los cerebros se congelaron con 2-metilbutano atemperado a la temperatura del hielo seco (-45°C aproximadamente). Los cerebros ya congelados fueron almacenados a -75°C hasta su utilización.

4.4 Análisis del grosor de la corteza cerebral, la laminación cortical y el número neuronal en los barriles B1, C1 y D1.

El análisis del grosor de la corteza cerebral (áreas somatosensorial, motora y auditiva) y la laminación cortical (área somatosensorial) requirió el uso de cortes coronales (25 µm) y la tinción de estos con violeta de creylo. Se capturaron imágenes de la corteza somatosensorial, audita y motora primaria a las cuales se les estimó el grosor de las áreas y láminas corticales, ya mencionadas, con la ayuda del software de análisis de imágenes del NIH (Image-J, ScionCorp, Beta 4.0.2). Brevemente, se trazaron tres líneas perpendiculares a la pía madre de las cortezas somatosensorial primaria, motora primaria y auditiva primaria con el objetivo de estimar su grosor y se promediaron los estimados de cada línea para obtener un valor representativo de cada corteza.. Se repitió el mismo procedimiento para determinar el grosor de cada una de las láminas corticales.

Para estimar el incremento en el área de los barriles del PMBSF se utilizaron cortes tangenciales (20 μm). Con el software Image J calculamos el diámetro de los barriles B1, C1 y D1. El número de neuronas por barril fue estimado por conteos de secciones transversales (20 μm) del área somatosensorial del PMBSF.

4.5 Impregnación de Golgi-Cox

Para evaluar el crecimiento dendrítico de las neuronas de las capas II/III, IV y V corticales se realizó la impregnación neuronal usando la técnica de Golgi-Cox [51]. Brevemente, animales controles y encefalecidos fueron anestesiados con pentobarbital sódico (45 mg/Kg de peso corporal) y posteriormente se decapitaron. Los cerebros de estos animales se disecaron rápidamente y colocaron en la solución de Golgi-Cox a temperatura ambiente por dos meses y medio. Transcurrido este periodo, los cerebros se seccionaron en el plano coronal con la ayuda de un Vibratomo. Secciones de 150 μm fueron obtenidas, deshidratadas, aclaradas y montadas sobre portaobjetos gelatinizados.

4.6 Selección de neuronas y dibujos en *cámara lucida*

Las neuronas piramidales de la capa II/III y V fueron seleccionadas con base en su patrón morfológico de ramificación dendrítica que incluye una dendrita apical y varias que emergen de la base de su soma. Sólo las neuronas que presentaron una dendrita apical completa fueron consideradas para el análisis morfológico. Las neuronas estrelladas espinosas del borde de los barriles ubicados en la capa IV del PMBSF fueron identificadas con base en su patrón de ramificación característico de sus árboles dendríticos y la presencia de espinas dendríticas en sus dendritas. Únicamente neuronas

que a nuestra consideración estuvieron bien impregnadas fueron dibujadas con la ayuda de una cámara lucida.

4.7 Análisis morfológico

Un total de 3600 dibujos se obtuvieron, 20 neuronas de cada capa cortical por animal fueron dibujadas. Los dibujos resultantes se escanearon y digitalizarons para su posterior análisis. Estimamos el **Número Total de Ramas Dendríticas (NTRD)**, el **Área Dendrítica (AD)** y la **Longitud Total Dendrítica (LTD)** con la ayuda del software de análisis de imágenes del NIH (Image-J, ScionCorp, Beta 4.0.2). Usando el software Harfa (versión 5.0) valoramos cuantitativamente la complejidad de los árboles dendríticos a través de la determinación de su dimensión fractal vía el método de conteo por cajas (Anexo 2).

4.8 Inmunohistoquímica

Para el marcaje específico de proteínas de axones (Neurofilamentos 200 kD) y dendritas (MAP2) maduras obtuvimos cortes coronales (20 μ m) del área somatosensorial con la ayuda de un Criostato y se montaron sobre laminillas recubiertas con adhesivos (superfrost, Fisher Scientific). Los cortes se postfijaron en PFA amortiguado (PFA 4% en PB 0.1M) por 15 min a TA y lavados con PB. Se inactivó la peroxidasa endógena (3% de H₂O₂ en PB) por 15 min a TA y se lavaron en PB. Se colocaron los cortes en suero de bloqueo (5% de Albumina en PBT, Triton 0.3% en PB) por 6 hrs. a TA. Posterior al bloqueo, los cortes se incubaron con los anticuerpos primarios respectivos: Neurofilamentos 200kD (1:300, policlonal hecho en conejo, Zymed), proteína asociada a microtúbulos-2 (MAP-2; 1:500, policlonal hecho en conejo, Zymed), Neuropilina 1

(npn1, 1:50, policlonal hecho en conejo; SantaCruz Inc.) y Neuropilina 2 (npn2, 1:50, policlonal hecho en conejo; SantaCruz Inc.) todos diluidos en suero de bloqueo. Posterior a la incubación con el anticuerpo primario correspondiente, los cortes se lavaron con PBT y se incubaron con el anticuerpo secundario (anti-conejo biotinilado, 1:500 hecho en cabra, Chemicon) diluido en PBT por 4 hrs. a TA. Los cortes fueron subsecuentemente incubados con el complejo avidina-biotina (ABC kit , Vector laboratories) diluido en PB por 2 hrs. a TA. Finalmente, se lavaron los cortes con PB y se revelaron usando el kit comercial de 3,3-diaminobencidina y H₂O₂ (Vector Laboratories) diluido en agua bidestilada H₂O.

4.9 Hibridación *in situ*

Para valorar cambios en la expresión de sema 3A y 3C obtuvimos cortes coronales (20 µm) del área somatosensorial con la ayuda de un criostato y se montaron en laminillas superfrost. Los cortes se postfijaron en PFA amortiguado (PFA 4% en PB 0.1M) por 15 min a TA y se lavaron con PBT (PB/Tween-20 0.1%, Sigma). Posteriormente, los cortes se deshidrataron en series de metanol 25%, 50%, 75% (en PBT) y 100%, y ulteriormente se rehidrataron en una serie opuesta de metanol. Los cortes se lavaron con PBT y se prehibridaron en mezcla de hibridación (formamida desionizada (Ambion) [50%], citrato de sodio (SCC) [5X] pH4.5, Heparina (Sigma) [50µl/ml], Tween-20 [0.1%], RNA de transferencia (Sigma)[50µg/ml] y DNA de esperma de salmón (Roche) [50µl/ml]) por 1 hr. a 70 °C. La hibridación fue llevada a cabo a 70°C con 5 µl de ribosonda por cada ml de mezcla de hibridación durante 24 hrs. Al día siguiente se lavaron los cortes a 70°C en solución I (Formamida (J.T. Baker) [50%], SSC [4X] pH4.5, SDS (Gibco) [1%]), 2 veces

durante 30 min, en solución II a 70 °C (NaCl [0.5M], Tris [10mM] pH7.5, Tween-20 [0.1%]) y en solución III a 70 °C en (Formamida [50%], SSC [2X] pH 4.5). Se lavaron los cortes con MABT (MAB, Acido maléico (J.T. Baker) pH 7.5 con NaOH, [0.1M] + NaCl [150mM].+ Tween-20 [0.1%]) y se bloquearon los cortes con suero de cabra al 5% en MABT por 1 hr. a TA. Posterior al bloqueo se incubo en anticuerpo anti-DIG (1:3000) por una noche a TA. Los cortes se lavaron con MABT 6 veces durante 30 min a TA y 2 veces en NTMT (NaCl [0.1M], Tris [0.2M] pH9.5, MgCl₂ [0.05M], Tween-20 [0.1%]) y se revelaron los cortes protegidos de la luz con 4.5µl de NBT, 3.5µl de BCIP (Roche) por mL de NTMT a TA. Finalmente, la reacción de revelado se inactivó lavando los cortes con NTMT y posteriormente con PBT.

4.10 Análisis densitométrico.

Se valoró la concentración de las proteínas Neurofilamentos 200kD y MAP2 de manera semicuantitativa mediante el uso del software ImageJ. Los valores densitométricos se obtuvieron de la diferencia existente entre la intensidad de la marca inmunohistoquímica y la ausencia de marca en los cortes estudiados.

4.11 Análisis estadístico.

Para todos los casos que solicitaron la comparación estadística se uso la prueba de Análisis de Variancia de una vía (ANOVA de una vía) seguida de una prueba poshoc (Tukey). Para todos los caso se tomaron como valores significativos $p \leq 0.01$.

5. Resultados

5.1 El desarrollo corporal inferido por la ganancia de peso cerebral y corporal no difiere entre ratones control y enceguedidos.

El enceguedimiento neonatal ocasiona una expansión significativa en la corteza somatosensorial en los roedores. Esta expansión de la corteza de barriles podría deberse, en parte, a una modificación general del proceso de desarrollo del organismo, esto es, los animales enceguedidos podrían ser hipermórficos (i.e. más grandes). Una manera sencilla de evaluar esta posibilidad fue monitorear los incrementos en peso cerebral y corporal en ambos grupos de animales. No observamos cambios en la ganancia de peso corporal ni en la del peso cerebral total en el desarrollo de ambos grupos (figura 2). Así, el enceguedimiento en los ratones parece no alterar el esquema general del desarrollo.

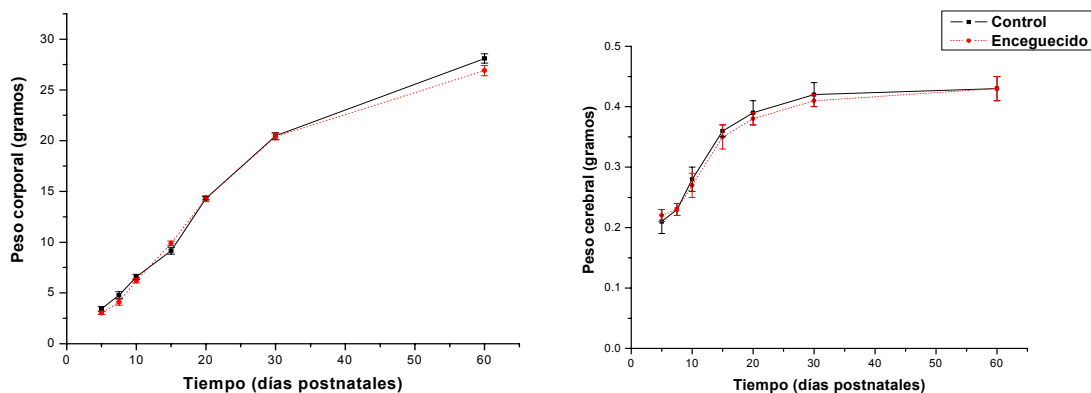


Figura 2. No existen cambios en el peso corporal ni en el peso cerebral. El desarrollo postnatal de los ratones enceguedidos al nacimiento no es comprometido al nacimiento. No se observaron diferencias en el peso corporal (A) ni en el peso cerebral (B).

5.2 Los ratones enceguecidos al nacimiento mostraron una disminución en el grosor de la corteza somatosensorial primaria.

La expansión de la corteza de barriles en los animales enceguecidos ha sido mostrada con técnicas electrofisiológicas [31,35-37]. Esta expansión también ha sido observada con técnicas histoquímicas en cortes tangenciales de la corteza cerebral [33-34]. Sin embargo, esta expansión de la corteza de barriles podría llevar a cambios en el grosor de la corteza somatosensorial y de sus láminas. Para examinar si el enceguecimiento origina alteraciones en el grosor de la corteza somatosensorial estimamos su espesor en cortes coronales (figura 3A-C). Sorprendentemente, el grosor de la corteza somatosensorial primaria de los ratones enceguecidos mostró una reducción de entre el 12-16 % en comparación a sus contrapartes control (figura 3C). Esta reducción podría ser el resultado de un adelgazamiento generalizado de la corteza cerebral de los animales enceguecidos al nacimiento. Para valorar esta hipótesis medimos el grosor de la corteza motora y auditiva que se encuentran colindantes a la corteza somatosensorial (figura 3d-e). No se observaron cambios significativos en el grosor de ambas cortezas cerebrales entre los animales controles y enucleados durante el desarrollo postnatal. Estos resultados nos llevan a concluir que la enucleación ocasiona un adelgazamiento primordialmente en la corteza somatosensorial pero no en cortezas aledañas como la corteza motora y auditiva primarias.

5.2.1 Los animales enceguecidos mostraron una reducción en el grosor de sus capas I, IV y VI mientras una expansión de su capa II/III en la corteza somatosensorial .

El adelgazamiento cortical observado en los animales enceguecidos sugiere una reorganización de la laminación cortical del área somatosensorial. Para valorar esta

hipótesis nosotros medimos el grosor de cada capa cortical en los animales control y enceguecidos. Exceptuado a la capa V cortical, las cinco capas restantes mostraron modificaciones significativas en sus dimensiones en los animales enceguecidos cuando se comparan con sus contrapartes control (Tabla 1). Así, se observó una reducción significativa en las capas I, IV y VI en su espesor mientras que la capa II/III mostró un incremento en su volumen en los animales enceguecido. Un incremento en las dimensiones del cuerpo calloso también fue observado en el grupo experimental. Aquí, concluimos que el enceguecimiento lleva a la reducción en el grosor de las capas I, IV, VI y a la expansión de la capa II/III y el cuerpo calloso.

5.3 No existen cambios en el número de neuronas que forman a los barriles de los animales enceguecidos pero si en su distribución espacial.

Los cambios anatómicos reportados en la lamina IV de la corteza somatosensorial, apuntan a que la cantidad de neuronas que conforman a los barriles varía entre los animales controles y los enceguecidos. Para probar esta conjetura estimamos el número de neuronas de tres barriles que mostraron una expansión sustancial de entre el 14-16 % (B1, $p \geq 0.05$; C1, $p \geq 0.01$ y D1, $p \geq 0.05$) en cortes transversales en los animales enceguecidos. Sorprendentemente, no observamos cambios en el número total de neuronas en los tres barriles seleccionados durante el desarrollo postnatal entre los grupos control y enceguecidos (Figura 4). No obstante lo arriba descrito, la distribución de neuronas en los barriles de los animales enceguecidos se observó más homogénea que en los barriles de los animales control. Para corroborar esta observación cuantitativamente se **contó** el número de neuronas presentes en los bordes y en la profundidad de los barriles

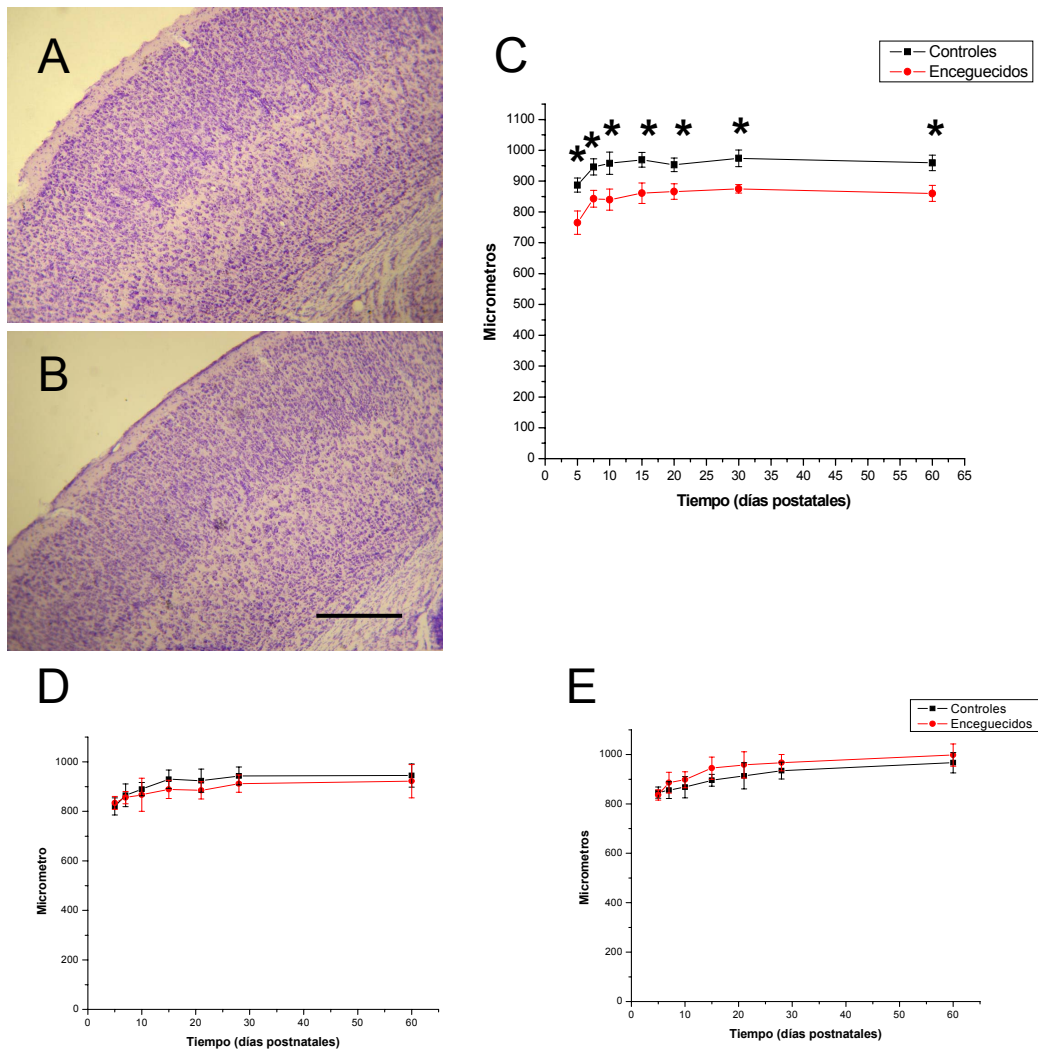


Figura 3. Decremento del grosor del área somatosensorial en ratones enceguecidos. (A) Área somatosensorial de ratones controles en comparación de sus contrapartes enceguecidas (B). Nótese el decrecemento en el grosor de la corteza somatosensorial de los animales enceguecidos (B) en comparación a los animales control (A). (C) El área somatosensorial de los ratones enceguecidos mostraron una reducción significativa en su espesor ($p \leq 0.01$). (D) No existen cambios significativos en las área motora ($p \geq 0.67$) ni en el área auditiva (E; $p \geq 0.56$).

(Tabla 2A). Los barriles de los animales control mostraron una relación de aproximadamente el 70% de las neuronas en el borde del barril y de un 30% en su interior mientras que en los barriles de los animales enceguecidos la relación fue de 55% en los bordes y del 45% en el interior (tabla 2B, $p \geq 0.05$). Tomando todos estos resultados en conjunto nosotros concluimos que la enucleación no lleva a cambios en el número de neuronas presentes en los barriles pero si en su distribución espacial dentro del barril.

5.4 No existen cambios en la intensidad de la marca inmunohistoquímica para neurofilamentos-200kDa pero si en aquella para MAP-2 dendrítico de los animales enceguecidos.

Los cambios cito-arquitectónicos observados en la corteza somatosensorial de los animales enceguecidos sugieren una reorganización de los axones y dendritas de las neuronas que la componen. Para evaluar esta suposición estimamos semi-cuantitativamente la presencia de marcadores específicos del citoesqueleto de axones (Neurofilamento 200kDa) y dendritas (MAP2) durante el desarrollo de la corteza somatosensorial en animales control y enucleados. No se observaron diferencias significativas en la intensidad de la marca para neurofilamentos entre los grupos control y enceguecidos (Figura 5A-E). En contraste, el grupo experimental mostró una reducción en la presencia de MAP2 cuando se compara con sus contrapartes control (figura 5F-J). Nuestros resultados sugieren que el enceguecimiento causa una reducción en el componente dendrítico de la corteza somatosensorial pero no de su componente axónico.

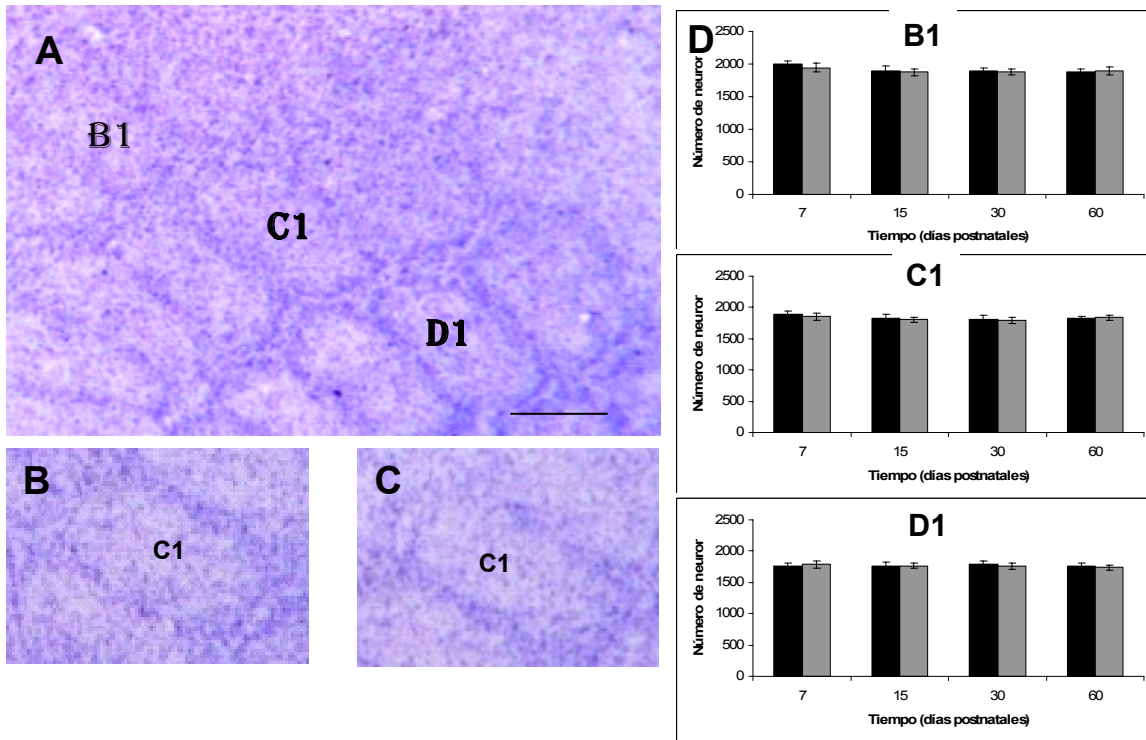


Figura 4. No existen diferencias en el número de neuronas entre los animales control y encefalicos. (A) corte tangencial del PMBSF a los 60DP donde se muestra tres de los barriles que sufren expansión en los animales encefalicos. El barril C1 se muestra en controles (B) y en encefalicos (C). (D) No se observaron cambios significativos en el numero de neuronas en los barriles B1 (B, $p \leq 0.01$); C1 (C, $p \leq 0.01$) y D1 (D, $p \leq 0.01$) de los animales controles (barras negras) en comparación con los animales encefalicos (barras grises). Barra= 100 μm en A-C.

Tablas 2A. Cambios en la distribución de neuronas que conforman a los barriles B1, C1 y D1 entre animales controles (C) y enceguecidos (E). El borde del barril es representado por B, mientras que el interior del barril por I.

DP	Condición	B1		C1		D1	
		B	I	B	I	B	I
7	C	1355.24	637.76	1303.41	585.59	1179.2	580.8
7	E	1148.14	797.86	1038.24	815.76	1088.85	696.15
15	C	1307.55	587.45	1274	546	1192.04	560.96
15	E	1068.75	806.25	1009.12	792.88	1076.04	687.96
30	C	1264.29	622.71	1268.4	543.6	369.648	571.52
30	E	1088.66	788.34	988.35	808.65	1057.2	704.8
60	C	1256.92	619.08	1258.56	565.44	1217.85	547.15
60	E	1100.26	796.74	1010.35	826.65	1045.2	696.8

Tablas 2B. Cambios porcentuales de la distribución de neuronas que conforman a los barriles B1, C1 y D1 entre animales controles (C) y enceguecidos (E). El borde del barril es representado por B, mientras que el interior del barril por I. Asterisco $p \leq 0.05$

DP	Condición	B1		C1		D1	
		B (%)	I (%)	B (%)	I (%)	B (%)	I (%)
7	C	68	32	69	31	67	31
7	E	59 *	41 *	56 *	44 *	61	39
15	C	69	31	70	30	68	32
15	E	57 *	43 *	56 *	44 *	60 *	40 *
30	C	67	33	70	30	68	32
30	E	58 *	42 *	55 *	45 *	60 *	40 *
60	C	67	33	69	31	69	31
60	E	58 *	42 *	55 *	45 *	60 *	40 *

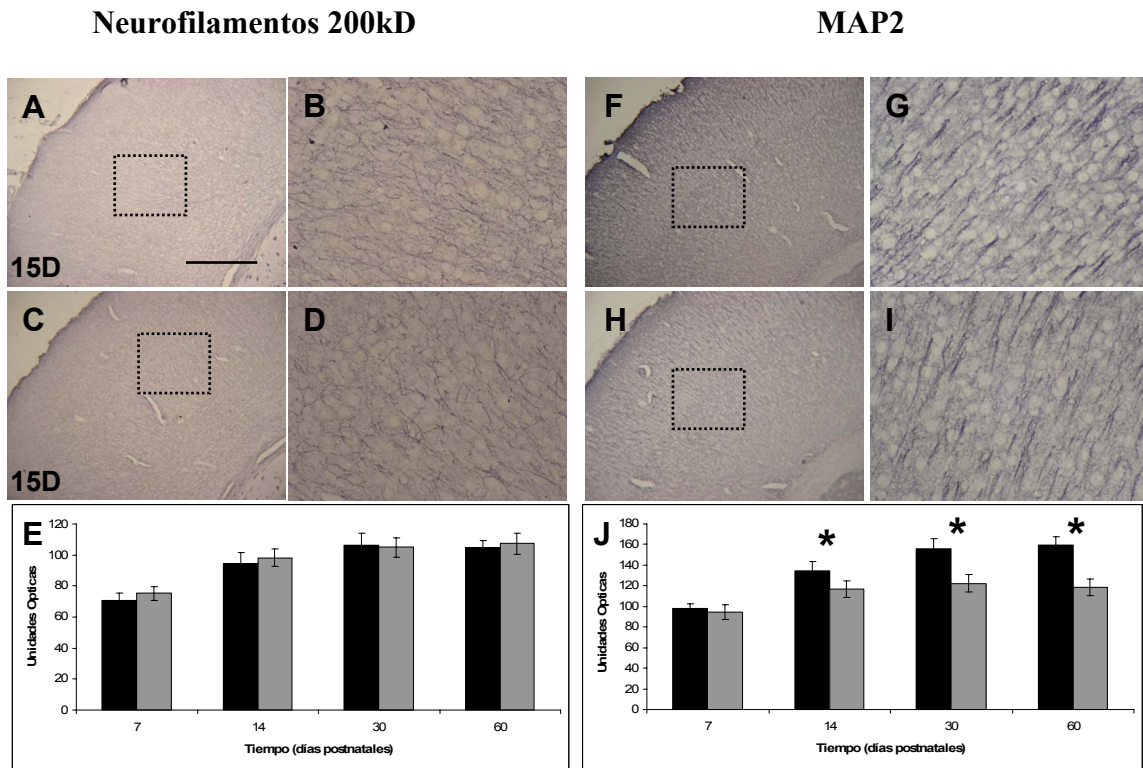


Figura 5. El Enceguecimiento conduce a una reducción en el componente dendrítico de la corteza somatosensorial pero no de su componente axónico durante el desarrollo. Marca inmunohistoquímica para neurofilamentos en el área somatosensorial de animales control (A-B) y enceguecidos (C-D). Marcaje para MAP2 en controles (F-G) y enceguecidos (H-J). (E) No existen diferencias en la inmunotinción contra neurofilamentos entre animales control (barras negras) y enucleados (barras grises, $p \geq 0.2$). (J) Reducción significativa en la inmunotinción contra MAP2 en animales enceguecidos en comparación a sus contrapartes control ($p \leq 0.01$). Barra 200 μm en A, C, F y H, y 80 μm en B, D, G e I.

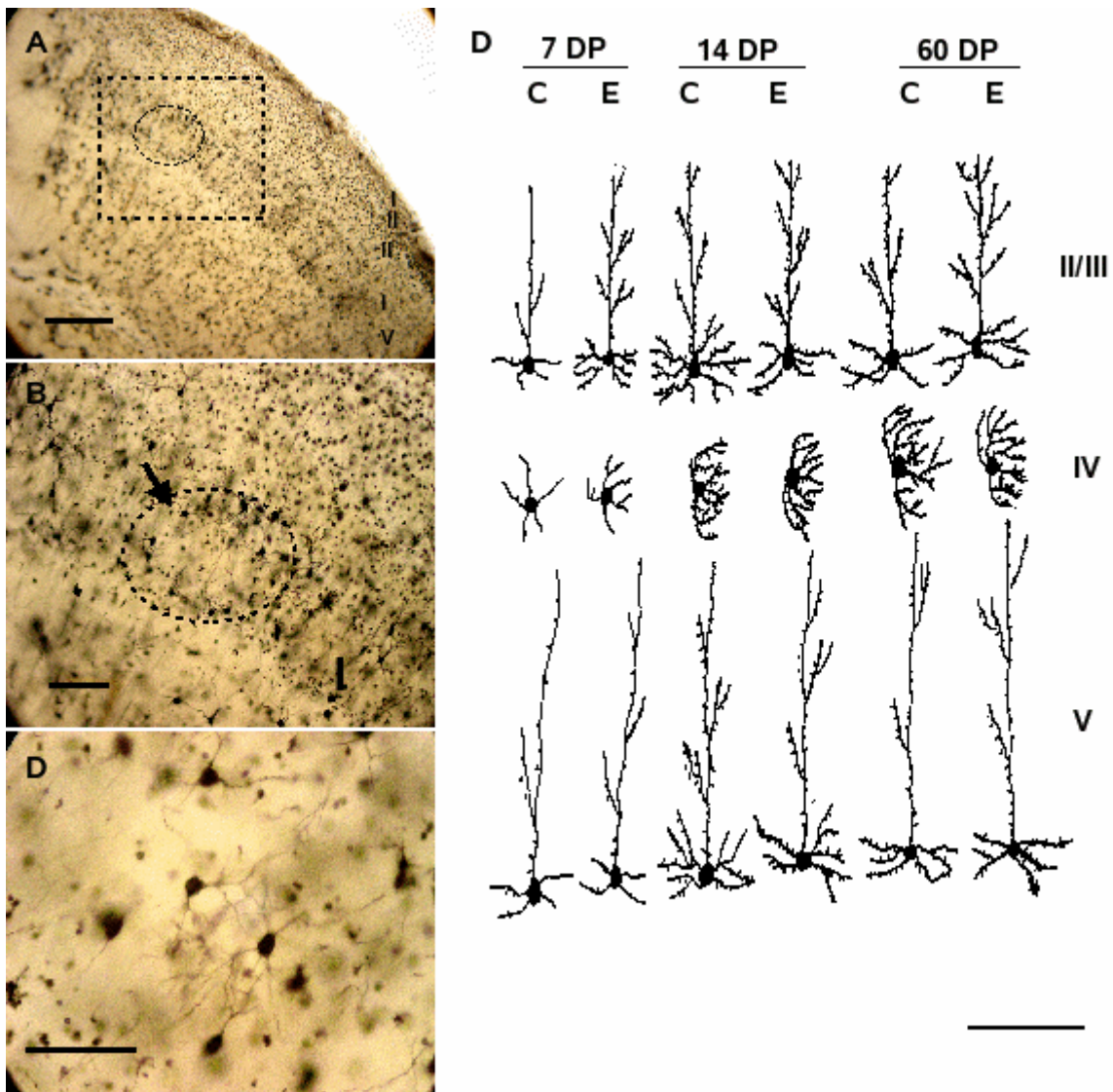


Figura 6. Impregnación neuronal vía el método Golgi-Cox y dibujos en *cámara lucida*. (A) Corteza somatosensorial primaria, el círculo muestra uno de los barriles del PMBSF que se muestra magnificado en (B). (C) Neuronas que conforman el borde de los barriles y que son señaladas en B. (D) Dibujos en *cámara lucida* de neuronas ubicadas en las capas II/III, IV y V de la corteza somatosensorial en edades 7, 14 y 60 DP de animales control y encefalicados (C y E respectivamente). Barras: 150 μm en A, 60 μm en B, 80 μm en C y 200 μm en D.

5.5 Análisis morfológico del componente dendrítico de la corteza somatosensorial

Nuestros resultados provenientes del análisis semi-cuantitativo de la presencia de la proteína MAP2 sugiere que las neuronas que constituyen a la corteza somatosensorial presentan árboles dendríticos más pequeños y/o menos ramificados. Para probar esta hipótesis realizamos dibujos bidimensionales de neuronas ubicadas en las capas II/III, V y las neuronas que conforman a los barriles localizadas en la capa IV y analizamos su desarrollo postnatal (figura 6).

5.5.1 Los animales encefaleados al nacimiento mostraron un mayor crecimiento dendrítico en sus neuronas piramidales de la capa II/III en comparación a los animales control después de la segunda semana de vida.

El crecimiento dendrítico estimado a través de **LDT** de las neuronas piramidales de la capa II/III no mostró diferencias significativas durante las tres primeras semanas de vida entre los animales controles y encefaleados. Sin embargo, hacia la cuarta semana de vida los animales encefaleados mostraron una longitud dendrítica significativamente mayor que sus contrapartes control (figura 7A). El **NTRD** de las neuronas piramidales de los animales encefaleados fue mayor que el de los controles a los días postnatales de 7, 28 y 60DP, mientras que los animales control mostraron un mayor número de ramas dendríticas a los 14DP (figura 7B). Finalmente, la complejidad de los árboles dendríticos (**DF**) de las neuronas piramidales de los animales encefaleados fue significativamente mayor a las edades de 7, 28 y 60DP, mientras que los animales control mostraron una complejidad mayor a los 14DP. A los 21DP, no se observaron diferencias entre los grupos (figura 7C). Aquí, concluimos que las neuronas piramidales de la capa II/III de los

animales enceguecidos desarrollan árboles dendríticos más grandes y complejos que sus contrapartes control hacia la cuarta semana de vida de su desarrollo postnatal.

5.5.2 Los animales enceguecidos al nacimiento mostraron un menor crecimiento dendrítico en sus neuronas estrelladas espinosas de la capa IV en comparación a los animales control después de la tercer semana de vida.

El desarrollo dendrítico de las neuronas estrelladas espinosas en los animales control mostró tres etapas bien definidas. La primera, se caracterizó por un incremento significativo en **AD**, **NTRD** y **LDT** durante las primeras tres primeras semanas postnatales. En la segunda etapa se observó un decremento en estos parámetros entre la tercera y la cuarta semana postnatales. Finalmente, después de este periodo, no se documentaron cambios mayores en estos parámetros. En contraste, los animales enceguecidos no mostraron la etapa de eliminación vista en los animales control entre 21 y 28DP.

Las neuronas estrelladas espinosas de los animales enceguecidos mostraron una mayor AD que los animales control a los 7DP. Sin embargo, en la segunda y tercera semanas postnatales, los árboles dendríticos de los animales control incrementaron su tamaño en comparación a sus contrapartes enceguecidos. No se observaron diferencias significativas a los 28 y 60DP (figura 8A). La LDT de los animales enucleados mostró una longitud dendrítica mayor que sus contrapartes control a los 7DP. No se observaron diferencias significativas entre los grupos a los 14DP. En contraste, los animales controles mostraron un longitud dendrítica mayor que los animales enucleados a los 21, 28 y 60DP (figura 8B). El NTRD de los animales enceguecidos fue mayor que el de sus contrapartes control durante las dos primeras semanas de vida. No se observaron diferencias significativas

entre ambos grupos a los 21DP. Sin embargo, las neuronas de los animales control tuvieron un mayor número de ramas dendríticas que los animales enceguecidos a los 28 y 60DP (figura 8C). Finalmente, la complejidad de los árboles dendríticos de las neuronas estrelladas espinosas fue mayor en los animales enceguecidos que en los controles durante las dos primeras semanas de vida. Después de este período, sin embargo, no se observan diferencias entre los grupos (figura 8D). Tomando en conjunto estos resultados, nosotros concluimos que las neuronas estrelladas espinosas de los animales enceguecidos desarrollan árboles dendríticos mas pequeños que sus contrapartes control durante su desarrollo postnatal.

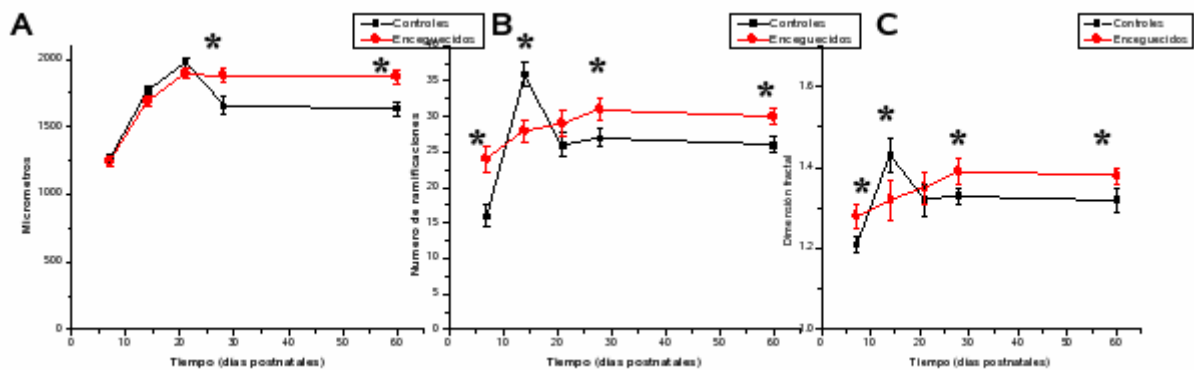


Figura 7. Las neuronas piramidales de la capa II/III muestran un mayor crecimiento hacia el termino del primer mes de vida. (A) Longitud dendritica total, (B) Numero Total de Ramificaciones dendríticas, (C) Dimension Fractal. Asteriscos ($p \leq 0.1$).

5.5.3 Los animales enceguecidos al nacimiento no mostraron diferencias en el crecimiento dendrítico de sus neuronas piramidales de la capa V en comparación a los animales control durante su desarrollo postnatal.

No se observaron diferencias significativas entre los animales controles y enceguecidos en su LDT, NTRD y DF en ninguna de las edades estudiadas (figura 9). Nosotros concluimos que el enceguecimiento postnatal no afecta el desarrollo de los árboles dendríticos de las neuronas piramidales de la capa V.

5.6 Modificaciones en el patrón de expresión de las semaforinas 3A y 3C en el desarrollo postnatal temprano de los animales enceguecidos.

La clase 3 de las semaforinas participa activamente en el desarrollo normal de la corteza cerebral de los mamíferos [45]. Se ha mostrado que sema 3A y 3C tienen efectos antagónicos en el desarrollo de axones y dendritas corticales [45,47-50]. Mientras sema 3A promueve el crecimiento dendrítico en neuronas corticales, sema 3C lo inhibe. Por otro lado, la sema 3A dirige los axones cortico-fugales e interhemisféricos hacia el cuerpo calloso, la sema 3C orienta el crecimiento de estas fibras hacia la superficie cortical. Por esta razón, en el trabajo decidimos evaluar si el patrón de expresión cortical de ambas difiere entre los ratones controles y enceguecidos. Para valorar esta posibilidad realizamos hibridaciones *in situ* para documentar el patrón de expresión del ARN mensajero que codifica para las semaforinas 3A y 3C a los 7, 14, 21, 28 y 60 DP.

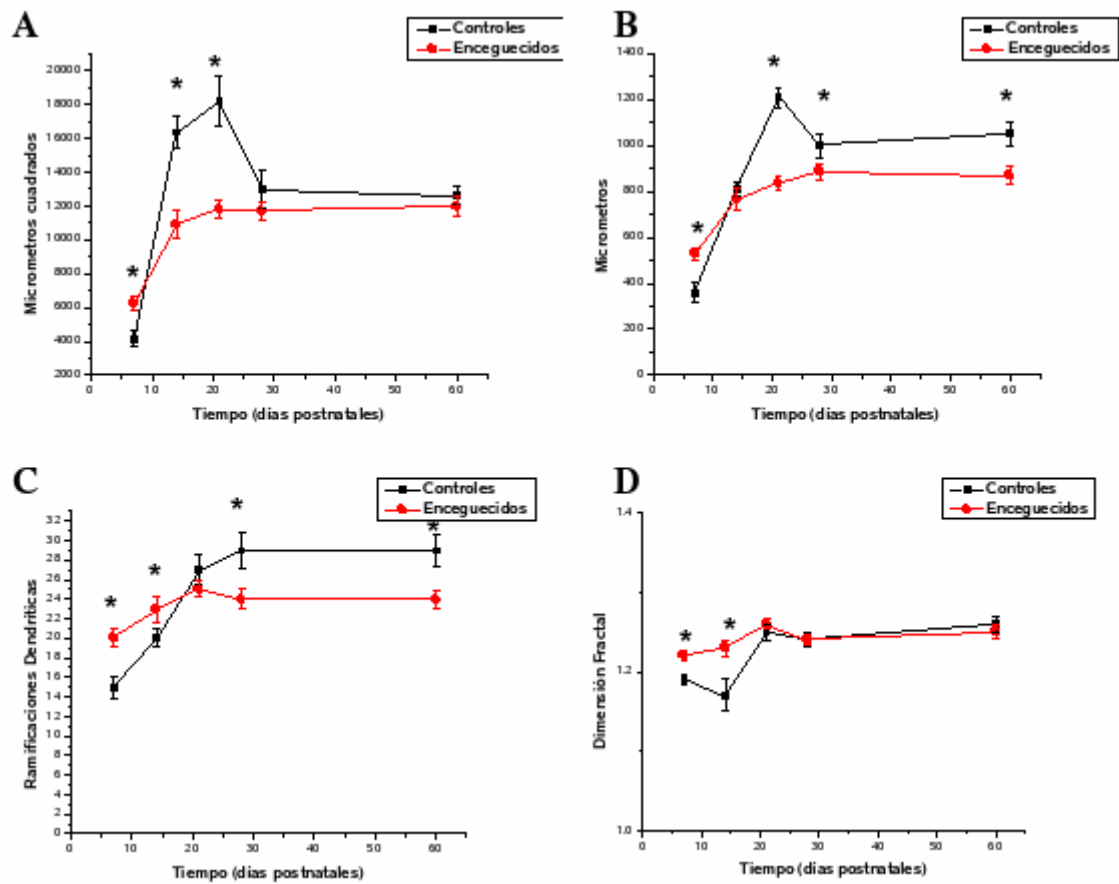


Figura 8. Las neuronas estrelladas espinosas mostraron un menor crecimiento después de la tercer semana de vida. (A) Área Dendrítica, (B) Longitud dendrítica total, (C) Numero Total de Ramificaciones dendríticas y (D) Dimensión Fractal. Asteriscos ($p \leq 0.1$).

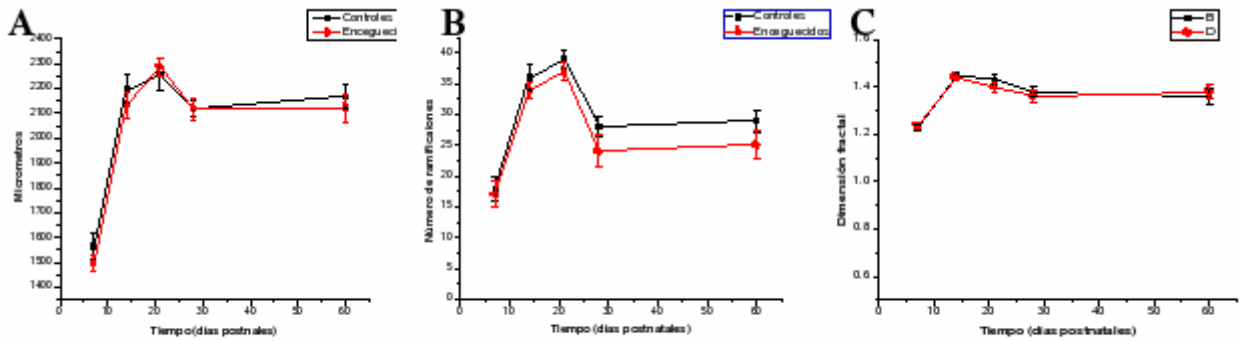


Figura 9. Las neuronas piramidales de la capa V no mostraron Diferencias entre los animales controles y encefalicos. (A) Longitud dendritica total, (B) Número Total de Ramificaciones dendríticas y (C) Dimensión Fractal.

La expresión de sema 3A a los 7DP en los animales control se encontró restringida a las capas corticales II/III y V (figura 10A-B), mientras que la expresión de sema 3A en los animales encefalicos se observó de manera homogénea en todas las capas corticales (figura 10C-D). Hacia los 14DP observamos una reducción en la expresión de sema 3A en ambos grupos de animales (figura 10E-H). La capa VI fue la única lámina cortical que presentó una marca homogénea. Aunque las capas II/III, IV y V tuvieron una escasa marca en ambos grupos de animales, en aquellos encefalicos los barriles de la capa IV mostraron expresión para sema 3A (figura 10H). Esto último no se observó en los ratones control (figura 10E). No se observaron cambios en la expresión de sema 3A entre 14 y 60DP en ambos grupos de animales (figura 10E-L). Contrario, a lo observado con la expresión de sema 3A, la expresión de sema 3C en los animales control a los 7DP se encontró en todas las capas corticales, siendo de mayor intensidad en las capas corticales II/III y V (figura 11A-B). En contraste, la expresión de sema 3C en los animales encefalicos se observó confinada a las capas corticales II/III y IV (figura 11C-D). Hacia los 14DP observamos una reducción importante en la expresión de sema 3C en

todas las capas cortical de ambos grupos de animales (figura 11E-H). Finalmente, no documentamos cambios en el patrón de expresión de sema 3C a los 14 y 60DP en ambos grupos de ratones (figura 11E-L).

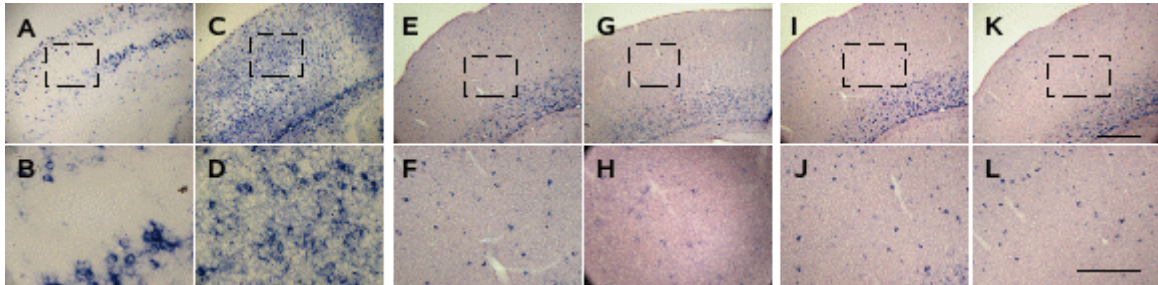


Figura 10. Expresión de sema 3A en animales controles y enceguecidos. La expresión de sema 3A a los 7DP en controles (A y B) y enceguecidos (C y D), a los 14DP en controles (E y F) y enceguecidos (G y H), y 60DP en controles (I y J) y enceguecidos (K y L). Barra en e panel superior 200 μm y en el panel inferior 100 μm .

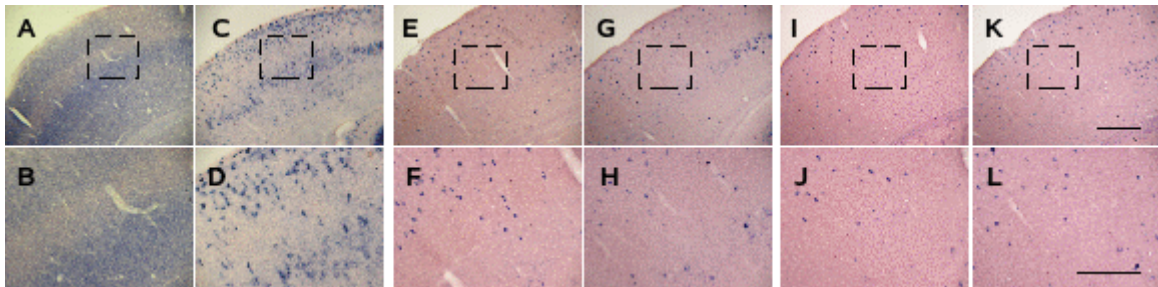


Figura 11. Expresión de sema 3C en animales controles y enceguecidos. La expresión de sema 3C a los 7DP en controles (A y B) y enceguecidos (C y D), a los 14DP en controles (E y F) y enceguecidos (G y H), y 60DP en controles (I y J) y enceguecidos (K y L). Barra en e panel superior 200 μm y en el panel inferior 100 μm .

6. Discusión

El enceguecimiento neonatal en los roedores lleva a la expansión del PMBSF en la corteza somatosensorial [33-38]. Los mecanismos relacionados con esta expansión no han sido esclarecidos. Nuestros resultados muestran que la enceguecimiento neonatal en ratones no tiene efecto en la ganancia de peso cerebral ni corporal. No obstante, el grosor de la corteza somatosensorial primaria de los animales enceguecidos es significativamente menor al ser comparado con sus contrapartes control durante su desarrollo postnatal. Este adelgazamiento de la corteza somatosensorial observado en los animales enceguecidos parece afectar predominantemente a esta área cortical ya que no se observaron modificaciones en el grosor de las cortezas aledañas tales como la motora y la auditiva primarias. El enceguecimiento neonatal tiene un efecto importante en la laminación cortical de la corteza somatosensorial primaria. Así, los animales enceguecidos mostraron un incremento en el grosor de las láminas II/III y en aquel del cuerpo calloso, mientras que el grosor de las capas I, IV y VI disminuyó significativamente, no se observaron cambios en la lámina V. A pesar de la reducción en el grosor de la capa IV, los barriles B1, C1 y D1 en los animales controles y enceguecidos no mostraron diferencias en el número total de neuronas que los conforman aunque sí en el porcentaje de neuronas localizadas en el borde (70% vs 55%, controles y enceguecidos, respectivamente) o en el interior de los barriles (30% vs 45%, controles y enceguecidos, respectivamente). El enceguecimiento también conduce a un incremento seguido de una reducción en el componente dendrítico de la corteza somatosensorial pero no de su componente axónico durante el desarrollo. Particularmente, las dendritas de las

neuronas estrelladas espinosas de la capa IV en animales enceguecidos mostraron un crecimiento significativamente mayor en las dos primeras semanas de vida, y menor a partir de la tercera semana de vida cuando se compara con sus contrapartes control. En la capa II/III se observó lo contrario, ya que los animales enceguecidos desarrollaron árboles dendríticos más complejos y ramificados además de una longitud dendrítica mayor que sus contrapartes control solamente hacia la tercera semana de vida. Adicionalmente, no documentamos cambios significativos en las dendritas de las neuronas piramidales de la capa V entre los animales controles y enceguecidos durante su desarrollo. Finalmente, la expresión de las sema 3A y sema 3C se altera en los animales enceguecidos durante su desarrollo siendo estos cambios más notorios a los 7DP de vida. A esta edad, los animales enceguecidos mostraron una sobre expresión de sema 3A y una reducción de la expresión de sema 3C en su corteza somatosensorial. A partir de la segunda semana de vida postnatal, la expresión de sema 3A y sema 3C decreció en ambos grupos de animales y permaneció sin alteraciones significativas entre 14DP hasta la edad adulta (60DP).

6.1 Alteraciones en el Desarrollo postnatal de la corteza somatosensorial primaria de los animales enceguecidos al nacimiento.

El desarrollo de la corteza cerebral del ratón inicia con la migración neuronal desde el epitelio ventricular y la zona subventricular hasta la zona marginal en el día embrionario 11 y 14 respectivamente (E11 y E14) [52-53]. Las neuronas migratorias son empacadas primeramente en una lámina llamada la pre-placa cortical [53]. Subsecuentes ondas migratorias de neuronas dividen la pre-placa cortical en la capa I y VI, estableciendo entre estas dos láminas una tercera capa denominada la placa cortical [52-53]. La placa

cortical da origen a las láminas V, IV, III y II durante el desarrollo pre y postnatal [1-2]. Hacia el día E21 la capa VI está ya establecida y para 1DP comienza la segregación de la capa V, la cual termina hacia 2DP [54]. La segregación de la capa IV se da entre 3 y 4DP, y las capas III y II son especificadas entre 5-8DP [54]. La laminación cortical es acompañada por la invasión de las aferentes talámicas [55-58]. En el caso de la corteza somatosensorial las aferentes talámicas entran en la placa cortical en 1DP, estableciendo contactos primeramente con la capa VI y ulteriormente con la capa IV hacia el 3DP [55-58]. Nuestros resultados muestran que los animales enceguecidos en las primeras horas de vida sufren una reducción en el grosor de la corteza somatosensorial durante su desarrollo postnatal. Particularmente, las capas VI y IV sufren una reducción significativa en su grosor, lo cual sugiere que cambios en el desarrollo de las aferentes talámicas podrían ocurrir dentro de los primeros 3 días de vida. En este sentido futuros trabajos deberían enfocarse en estudiar el desarrollo temprano de las aferentes talámicas en fenómenos de plasticidad intermodal y su efecto en los procesos de laminación cortical. Por otro lado, nuestros resultados mostraron que los animales enceguecidos presentan una expansión significativa en el grosor de las capas II/III y el cuerpo calloso durante su desarrollo postnatal. Este fenómeno podría ser el reflejo de modificaciones de la conectividad intracortical entre la corteza somatosensorial primaria y otras áreas sensoriales y de asociación como se ha propuesto que ocurre en los fenómenos de plasticidad inter-modal [12, 59-63]. Aquí también es necesario el estudio del desarrollo de las conexiones intracorticales en los eventos de plasticidad intermodal. El hecho de que la lamina V no sufra cambios en los animales enceguecidos nos sugiere que no existen modificaciones en la información de salida de la corteza somatosensorial.

6.2 Adelgazamiento de la corteza somatosensorial en animales enceguecidos

Como se mencionó en los antecedentes, el uso de técnicas histoquímicas para medir el área de los barriles en cortes tangenciales y el registro electrofisiológico de la corteza somatosensorial en animales enceguecidos neonatalmente, han mostrado una expansión de la corteza somatosensorial [33-38]. No obstante, nuestros resultados mostraron que el grosor de esta corteza disminuye en los animales enceguecidos. Con base en este grupo de observaciones, nosotros especulamos que las modificaciones plásticas de la corteza somatosensorial consecutivas al enceguecimiento son el producto de un adelgazamiento y expansión simultánea de los barriles. Este fenómeno explicaría tanto la constancia en el número total de neuronas presentes en los barriles de los animales enceguecidos al ser comparados con los controles, como los cambios en la distribución relativa de las neuronas que conforman los barriles en ambos grupos de animales.

6.3 Los árboles dendríticos de las neuronas piramidales de la capa II/III y IV sufren modificaciones en los animales enceguecidos.

Una de las características comunes en el desarrollo de los circuitos neuronales es la excesiva sobreproducción de sus componentes neuronales (i.e. neuronas, dendritas, espinas dendríticas, axones y sinapsis), seguido por una eliminación selectiva del excedente de éstos, evento que parece favorecer el establecimiento de una red apropiada de conectividad neuronal [64-69]. Nosotros observamos este patrón de desarrollo en los árboles dendríticos de las neuronas piramidales de la capa II/III de los animales controles, ya que, entre la segunda y tercera semana de vida, se observó una eliminación significativa del número de ramas dendríticas que se traduce en una menor longitud dendrítica y en un decremento de la complejidad de sus árboles dendríticos. No obstante,

los árboles dendríticos de sus contrapartes enceguecidas no mostraron esta eliminación de ramas dendríticas entre la segunda y tercera semana de vida. Por lo tanto, los árboles dendríticos de las neuronas piramidales de la capa II/III de los animales enceguecidos hacia la adultez son más grandes, más complejos y con un mayor número de ramificaciones. Nosotros pensamos que esta mayor complejidad de las neuronas piramidales de la capa II/III en los animales enceguecidos es el reflejo de cambios en la conectividad intra-cortical como se ha sido sugerido que ocurre en individuos ciegos y sordos [12]. Estudios de resonancia magnética funcional y tomografía de emisión de positrones han mostrado mayor actividad en las capas II/III de la corteza somatosensorial de individuos ciegos mientras el mismo fenómeno se observa en la corteza visual de individuos sordos [12].

Por otro lado, se ha documentado que las neuronas estrelladas espinosas remodelan sus árboles dendríticos por procesos de eliminación posteriormente al arribo de sus aferentes talámicas alrededor del 3-4DP [70]. En este trabajo, nosotros reportamos un segundo evento de eliminación dendrítica entre la tercera y cuarta semana de vida en los animales controles. Sin embargo, el desarrollo dendrítico de los animales enceguecidos no presentó esta segunda fase de eliminación. De hecho, los árboles dendríticos de las neuronas estrelladas espinosas de los animales enceguecidos mostraron un desarrollo mayor durante la primera semana de vida. Además los árboles dendríticos de estas neuronas en los animales enceguecidos alcanzaron su talla adulta una semana antes que sus contrapartes control hacia la tercera semana postnatal. Nosotros pensamos que el cese del crecimiento dendrítico observado en los animales enceguecidos en la tercera semana de vida puede ser originado por un incremento de la actividad sináptica ejercida por las

aferentes talámicas, ya que el pico de desarrollo sináptico ocurre a esta edad [71-72]. Además, estudios *in vitro* e *in vivo* han mostrado un cese comparable del crecimiento dendrítico, el colapso de conos de crecimiento y el arresto de la dinámica de los filopodios cuando la actividad sináptica se incrementa [73-75]. Finalmente, el desarrollo de los árboles dendríticos de las neuronas piramidales de la capa V no fue alterado por el enceguecimiento. Tomando estos datos especulamos que la información de salida de la corteza somatosensorial no es comprometida por el enceguecimiento postnatal. No obstante, es necesario evaluar esta hipótesis mediante el registro electrofisiológico de las neuronas piramidales de la capa V y sus blancos subcorticales.

6.4 Expresión de sema 3A y 3C en los animales enceguecidos en comparación con sus controles.

Nuestros resultados muestran de manera indirecta la participación de sema 3A y 3C en los eventos de plasticidad intermodal. La sobre expresión de sema 3A y el decremento en la expresión de sema 3C observados en los animales enceguecidos a los 7DP pudiera ser en parte responsable del rápido crecimiento de los árboles dendríticos de las neuronas corticales del área somatosensorial. Nosotros creemos que la semaforina 3C en los animales controles mantiene a los árboles dendríticos en un estado de crecimiento lento y mantiene baja la expresión de sema 3A, mientras que en los animales enceguecidos la sobre expresión de sema 3A promueve el desarrollo dendrítico de las neuronas corticales y regula el decremento en la expresión de sema 3C. Esta idea es apoyada por evidencia experimental *in vitro* que muestra la acción antagónica entre sema 3A y 3C en el desarrollo de árboles dendríticos [45,47-50]. De manera interesante, los animales enceguecidos mantuvieron la expresión de sema 3A a los 15DP en la corteza de barriles.

Aquí, nosotros especulamos que esa expresión de sema 3A en las neuronas estrelladas espinosas participa en el desarrollo mayor de sus árboles dendríticos en comparación con sus contrapartes control a la misma edad. No obstante, aún carecemos de información suficiente para poder discutir con certeza el significado de los cambios en la expresión de sema 3A y 3C con los fenómenos plásticos observados en el presente trabajo. Por lo tanto, es necesario diseñar experimentos de ganancia y/o pérdida de función de estas moléculas para dilucidar su participación en los eventos de crecimiento dendrítico y su papel en los mecanismos de plasticidad neuronal.

7. Bibliografía

1. Mountcastle VB. 1997. The columnar organization of the neocortex. **Brain** 120: 701-722.
2. Mountcastle VB. 1998. *Perceptual Neuroscience: The Cerebral Cortex*. Capítulo 1 **Harvard University Press**.
3. Jesen KF., Killackey HP. 1987. Terminal arbors of axons projecting to the somatosensory cortex of the adult rat. I. The normal morphology of specific thalamocortical afferents. **J Neurosci** 7: 3529-3543.
4. Jesen KF. y Killackey HP. 1987. Terminal arbors of axons projecting to the somatosensory cortex of the adult rat. II. The altered Morphology of thalamocortical afferents following neonatal infraorbital nerve cut. **J Neurosci** 7: 3544-3553.
5. Florence SL. y Kass JH. 1995. Large-scale reorganization at multiple levels of the somatosensory pathway follows therapeutic amputation of the hand in monkeys. **J Neurosci** 15: 8083-8095.
6. Nudo RJ., Milliken GW., Jenkins WM. y Merzenich MM. 1996. Use-dependent alterations of movements representations in primary motor cortex of adult squirrel monkeys. **J Neurosci** 16: 785-780.
7. Florence SL. Y Kass JH. 1998. Large-scale sprouting of cortical connections after peripheral injury in adult macaque monkeys. *Science* 282: 1117-1120.
8. Fox K. 2002. Anatomical pathways and molecular mechanisms for plasticity in the barrel cortex. **Neuroscience** 111: 799-814.
9. Foeller E. y Feldman DE. 2004. Synaptic basis for developmental plasticity in somatosensory cortex. **Curr O Neurobiol** 14: 89-95.
10. Grubb MS. y Thompson ID. 2004. The influence of early experience on development of sensory systems. **Curr O Neurobiol** 14: 503-512.
11. Churchill JD., Tharp JA., Wellman CL., Sengelaub DR. y Garraghty PE. 2004. Morphological correlates of injury-induced reorganization in primate somatosensory cortex. **BMC Neurosci** 5: 1-8.
12. Bavelier D. y Neville HJ. 2002. Cross-modal plasticity: Where and How?. **Nature Rev Neurosci** 3: 443-452.
13. Gruart A. Delgado-García JM. 2004. Regeneración neuronal y recuperación funcional tras la lesión del sistema nervioso periférico. **Rev Neurol** 38: 746-756.

14. Wiesel TN. Hubel DH. 1963. Single cell responses in striate cortex of kittens deprived of vision in one eye. *J Neurophysiol* 26: 1003- 1017.
15. Wiesel TN. Hubel DH. 1965. Comparison of the effects of unilateral and bilateral eye closure on cortical unit responses in kittens. *J Neurophysiol* 28: 1029-1040.
16. Huttenlocher PR. 2002. Neural Plasticity: The effect of environment on the development of the cerebral cortex. **Harvard University Press**.
17. Kass JH. 1993. Evolution of multiples areas and modules within neocortex. **Perspec Dev Neurobiol** 1: 101-107.
18. Krubitzer L. y Huffman KL. 2000. Arealization of te neocortex in mammals: Genetic and epigenetic contribution to the phenotype. **Brain Behav Evol** 55: 322-335.
19. Killackey HP., Rhoades RW. y Bennett-Clarke C. 1995. The formation of a cortical somatotopic map. **TINS** 18: 402-407.
20. Lazarov NE. 2002. Comparative analysis of the chemical neuroanatomy of the mammalian trigeminal ganglion and mesencephalic trigeminal nucleus. **Prog Neurobiol** 66: 19-59.
21. Riddle D., Richards A., Zsuppan F. y Purves D. 1992. Growth of the somatic sensory system and its constituents parts during postnatal development. **J Neurosci** 12: 3509-3524.
22. Woolsey TA. y Van der Loos H. 1970. The structural organization of layer IV in the somatosensory region (SI) of mouse cerebral cortex. **Brain Res** 17: 205-242.
23. Woolsey TA. 1990. Peripheral alterations and somatosensory development. Development of sensory systems in mammals. **New York:John Wiley & Sons**. 461-503.
24. Van der Loos H. y Dörfli J. 1978. Does the skin tell the somatosensory cortex how to construct a map of the periphery?. **Neurosci Lett** 7: 23-30.
25. Van der Loos H., Welker E. y Dörfli J. 1986. Selective breeding for variations in patterns of mystacial vibrissae of mice. **J Heredity** 77: 66-82.
26. Issac JT., Crair MC., Nicoll RA. y Malenka RC. 1997. Silent synapsesduring development of thalamocortical inputs. **Neuron** 18: 269-280
27. Singer W. y Treter F. 1976. Receptive-field properties and neuronal connectivity in striate and parastriate cortex of contour-deprived cats. **J Neurophysiol** 39: 13-630.

28. Fox K. y Wong RO. 2005. A comparison of experience-dependent plasticity in the visual and somatosensory systems. **Neuron**. 48: 465-77.
29. Rauschecker JP, Korte M. 1993 Auditory compensation for early blindness in cat cerebral cortex. **J Neurosci** 13:4538-48.
30. Rauschecker JP. 1995. Compensatory plasticity and sensory substitution in the cerebral cortex. **TINS** 18:36-43.
31. Toldi J, Farkas T, Volgyi B. 1994. Neonatal enucleation induces cross-modal changes in the barrel cortex of rat. A behavioural and electrophysiological study. **Neurosci Lett** 167:1-4.
32. Levanen S, Jousmaki V, Hari R. 1998. Vibration-induced auditory-cortex activation in a congenitally deaf adult. **Curr Biol** 8:869-72.
33. Bronchti G., Schönenberger N., Welker E. y Van der Loos H. 1992. Barrelfield expansion after neonatal eye removal in mice. **Neuroreport** 3: 489-492.
- 34 Rauschecker JP, Tian B, Korte M, Egert U. 1992. Cross-modal changes in the somatosensory vibrissa/barrel system of visually deprived animals. **Proc Natl Acad Sci USA** 89: 5063-5067.
35. Toldi J., Rojik I. y Feher O. 1994. Neonatal monocular enucleation-induced cross-modal effects observed in the cortex of adult rat. **Neuroscience** 62: 105-114.
36. Toldi J., Farkas T. y Völgyi B. 1994. Neonatal enucleation induces cross-modal changes in the barrel cortex of rat. A behavioral and electrophysiological study. **Neurosci Lett** 167: 1-4.
37. Toldi J., Feher O. y Wolff JR. 1996. Neuronal plasticity induced by neonatal monocular (and binocular) enucleation. **Prog Neurobiol** 48: 191-218.
38. Negyessy L., Gal V., Farkas T. y Toldi J. 2000. Cross-modal plasticity of the corticothalamic circuits in rats enucleated on the first postnatal day. **Eur J Neurosci** 12: 1654-1668.
- 39 Pascual-Leone A, Cammarota A, Wassermann EM, Brasil-Neto JP, Cohen LG, Hallett M. 1993. Modulation of motor cortical outputs to the reading hand of braille readers. **Ann Neurol**. 34:33-7.
40. Toldi J., Rojik I. y Feher O. 1994. Neonatal monocular enucleation-induced cross-modal effects observed in the cortex of adult rat. **Neuroscience** 62: 105-114.
41. Maccioni RB. y Cambiazo V. 1995. Role of microtubule-associated proteins in the control of microtubule assembly. **Physiol Rev** 75: 835-864.

42. Hall A. 1998. Rho GTPases and the actin cytoskeleton. **Science** 279: 509-514.
43. Bagnard D., Thomasser N., Lohrum M., Püschel AW. Y Bolz J. 2000. spatial distributions of guidance molecules regulate chemorepulsion and chemoattraction of growth cones. **J Neurosci** 20: 1030-1035.
44. Dickson BJ. 2002. Molecular mechanisms of axon guidance. **Science** 298: 1959-1964.
45. Tamagnone L. y Comoglio PM. 2000. Signalling by semaphorin receptors: cell guidance and beyond. **Trends in Cell Biology** 10: 377-383.
46. Bagnard D., Thomasser N., Lohrum M., Püschel AW. Y Bolz J. 2000. spatial distributions of guidance molecules regulate chemorepulsion and chemoattraction of growth cones. **J Neurosci** 20: 1030-1035.
47. Polleux F., Giger RJ., Ginty DG., Kolodkin AL. y Ghosh A. Patterning of cortical efferent projections by semaphorin-neuropilin interactions. **Science** 282: 1904-1906.
48. Bagnard D., Lohrum M., Uziel D., Püschel AW. Y Bolz J. 1998. Semaphorins act as attractive and repulsive guidance signals during the development of cortical projections. **Development** 125: 5043-5053.
49. Polleux F., Morrow T. y Ghosh A. 2000. Semaphorin 3A is a chemoattractant for cortical apical dendrites. **Nature** 404: 567-573.
50. Nakamura F., Kalb RG. Y Strittmatter SM. 2000. Molecular basis of semaphoring-mediated axons guidance. **J Neurobiol** 44: 219-229.
51. Ramon y Cajal S. y de Castro F. 1933. Elementos de Técnica Micrográfica del Sistema Nervioso. **Salvat** Cap. 1.
52. Rao MS. Jacobson M. 2005. Developmental Neurobiology. **Kluwer Academic Plenum Publishers** Cap 2 y 5.
53. Nadarajah B. y Parnavelas JG. 2002. Modes of neuronal migration in the developing cerebral cortex. **Nat Rev Neurosci** 3:423-432.
54. Bayer SA. y Altman J. 1991. Neocortical Development. **Raven Press New York**. Cap 2.
55. Erzurumlu RS. y Jhaveri S. 1990. Thalamic axons confer a blueprint of the sensory periphery onto the developing rat somatosensory cortex.

56. Jhaveri S., Erzurumlu RS. y Crossin K. 1991. Barrel construction in rodent neocortex: Role of thalamic afferents versus extracellular matrix molecules. **Proc Natl Acad Sci USA** 88: 4489-4493.
57. Agmon A., Yang LT., O'Dowd DK. y 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.
58. Agmon A., Yang LT., Jones EG y O'Dowd DK. 1995. Topological precision in the thalamic projection to neonatal Mouse barrel cortex. **J Neurosci** 15: 549-561.
59. Das A. y Gilbert CD. 1995. Long-range horizontal connections and their role in cortical reorganization revealed by optical recording of cat primary visual cortex. **Nature** 375: 780-784.
60. Kral A. 2000. Congenital auditory deprivation reduces synaptic activity within the auditory cortex in a layer-specific manner. **Cereb Cortex** 10: 714-726.
61. Pascual-Leone A y Walsh V. 2001. Fast backprojections from motion to the primary visual area necessary for visual awareness. **Science** 292: 510-512.
62. Bullier J. 2001. Interated model of visual processing. **Brain Res Brain Res Rev** 36: 96-107.
63. Bullier J. 2001. The role of feedback connections in shaping the responses of visual cortical neurons. **Prog Brain Res** 134: 193-204.
64. Heumann D. y Leuba G. 1983. Neuronal death in the developing and aging of the cerebral cortex of the Mouse. **Neuropath Appl Neurobiol** 9: 297-311.
65. Ramoa AS., Campell G. y Shatz CJ. 1988. Dendritic growth and remodeling of cat retinal ganglionic cells during fetal and postnatal development. **J Neurosci** 18: 7836-7846
66. Balice-Gordon RJ., Chua CK., Nelson CC. Y Lichtman JW. 1993. Gradual loss of synaptic cartels precedes axon withdrawal at developing neuromuscular junction. **Neuron** 11: 801-815.
67. Innocenti GM. 1995. Exuberant development of conections, and its possible permissive role in cortical evolution. **TINS** 18: 397-402.
68. Crair MC., Gillespi DC. y Stryker MP. 1998. The role of visual experience in the development of columns in cat visual cortex. **Science** 279: 566-570.
69. Hall AC., Lucas FR. y Salinas PC. 2000. Axonal remodelling and synaptic differentiation in cerebellum is regulated by WNT-7. **Cell** 100: 525-535.

70. Ramoa AS., Campell G. y Shatz CJ. 1988. Dendritic growth and remodeling of cat retinal ganglionic cells during fetal and postnatal development. **J Neurosci**18: 7836-7846
71. White EL., Weinfeld L. y Lev DL. 1997. A survey of morphogenesis during the early postnatal period in PMBSF barrels of mouse SmI cortex with emphasis on barrel D4. **Somatosens Mot Res**14:34-55.
72. Micheva KD. y Beaulieu C. 1997. Quantitative aspects of synaptogenesis in the rat barrel field cortex with special reference to GABA circuitry. **J Comp Neurol** 373:340-354.
73. Dailey ME. y Smith SJ. 1996. The dynamics of dendritic structure in developing hippocampal slice. **J Neurosci** 16: 2983-2994.
74. Ziv NM. y Smith SJ. 1996. Evidence for a role of dendritic filopodia in synaptogenesis and spine formation. **Neuron** 17: 91-102.
75. Portera-Cailliau C, Pan DT, Yuste R. 2003. Activity-regulated dynamic behavior of early dendritic protrusions: evidence for different types of dendritic filopodia. **J Neurosci** 23:7129-7142.

Anexo 1

Capas cito-arquitectonicas de la corteza cerebral de los mamíferos

Capa	Nombre	Características
I	Plexiforme	Esta capa contiene una red de axones y dendritas que corren paralelamente a la pia, también se encuentran algunas células de Cajal-Retzius y células pequeñas no espinosas y neuronas no piramidales.
II	Corpuscular	Esta capa contiene neuronas piramidales pequeñas, pero también una gran cantidad de células no piramidales, tales como las células tipo canasto de pequeño tamaño.
III	Piramidal Externa	Esta capa contiene neuronas piramidales de mediano tamaño, también contiene células nopyramidales tales como las células tipo cesto de gran tamaño, las células tipo candelabro entre otras.
IV	Granular	Esta capa contiene una gran cantidad de neuronas pequeñas que incluyen a las neuronas estrelladas, estrelladas espinosas, nopyramidales, etc.
V	Piramidal Interna	Esta capa contiene básicamente neuronas piramidales de gran tamaño.
VI	Pleomorfica	Esta capa también llamada “multiforme” contiene células de múltiples morfologías.

Tomado de Perceptual Neuroscience: The cerebral cortex. Capitulo 1. Vernon B Mountcastle. 1998. Harvard University Press.

Anexo 2

Definición de Fractal

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

La dimensión fractal

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

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

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

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

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

Para el perímetro de la curva de Koch mostrada en la figura 2, cuando la escala es reducida por un factor $F = 3$, entonces $N = 4$ piezas son encontradas. Así, sustituyendo en la ecuación 2 se obtiene que $D = \log 4 / \log 3 = 1.2619$. De esta forma, el valor de la dimensión fractal de la curva de Koch es un número fraccionario que se encontrará entre 1 y 2. Es decir, se encuentra entre una línea ($D = 1$) y un área ($D = 2$), puesto que hay suficientes segmentos para ocupar mas de una línea unidimensional, pero no los suficientes para ocupar un área en el espacio.

En biología la dimensión fractal puede ser calculada a través de un método rápido y sencillo llamado Conteo por cajas (Fig. 3). Este método consiste en 1) colocar a la

estructura fractal dentro de un espacio que ocupe las dimensiones euclidianas, 2) dividirlo en pequeñas cajas, 3) contar el número de cajas ($N(r)$), de tamaño r que contengan al menos un punto de la estructura en cuestión. Finalmente, el valor de la dimensión fractal será la pendiente de graficar el $\log N(r)$ contra el $\log(1/r)$.

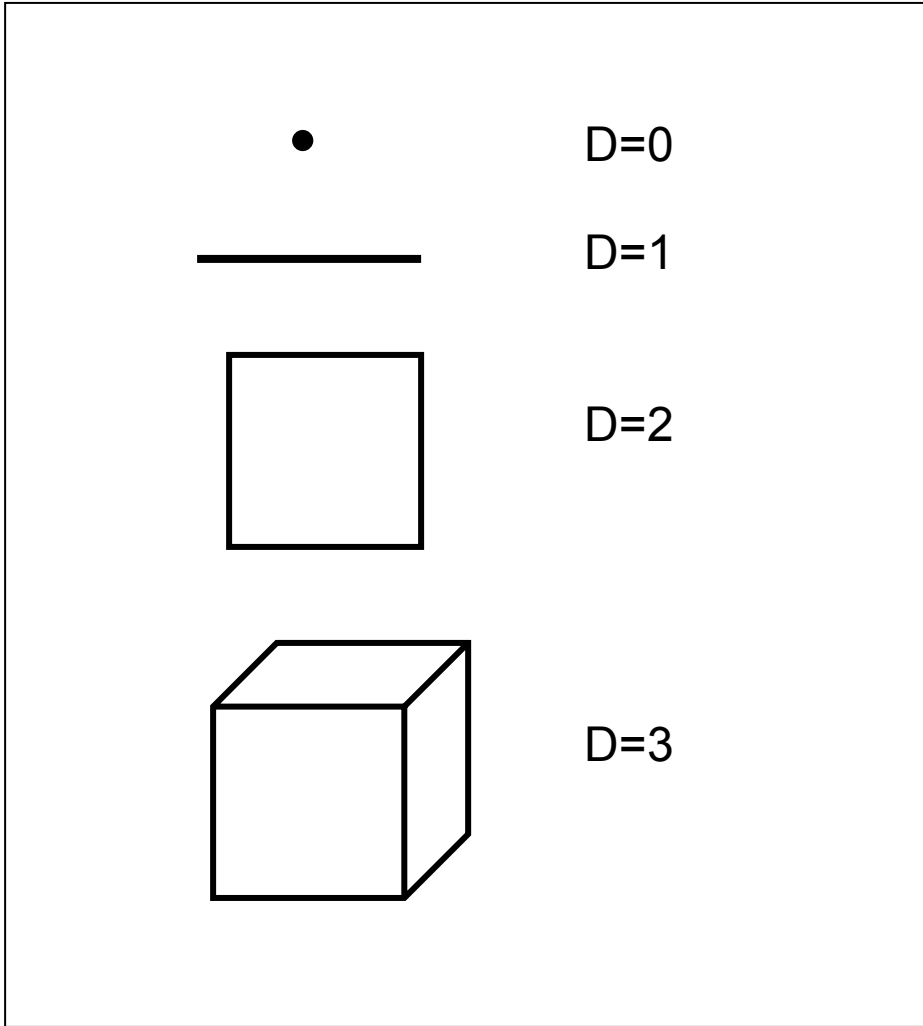


Figura 1. Objetos con dimensiones auto-similares clásicas (euclidianas) de 0,1,2 y 3 corresponden a nuestra idea usual de que un punto es adimensional, una línea es unidimensional, un área es bidimensional y un volumen es tridimensional.

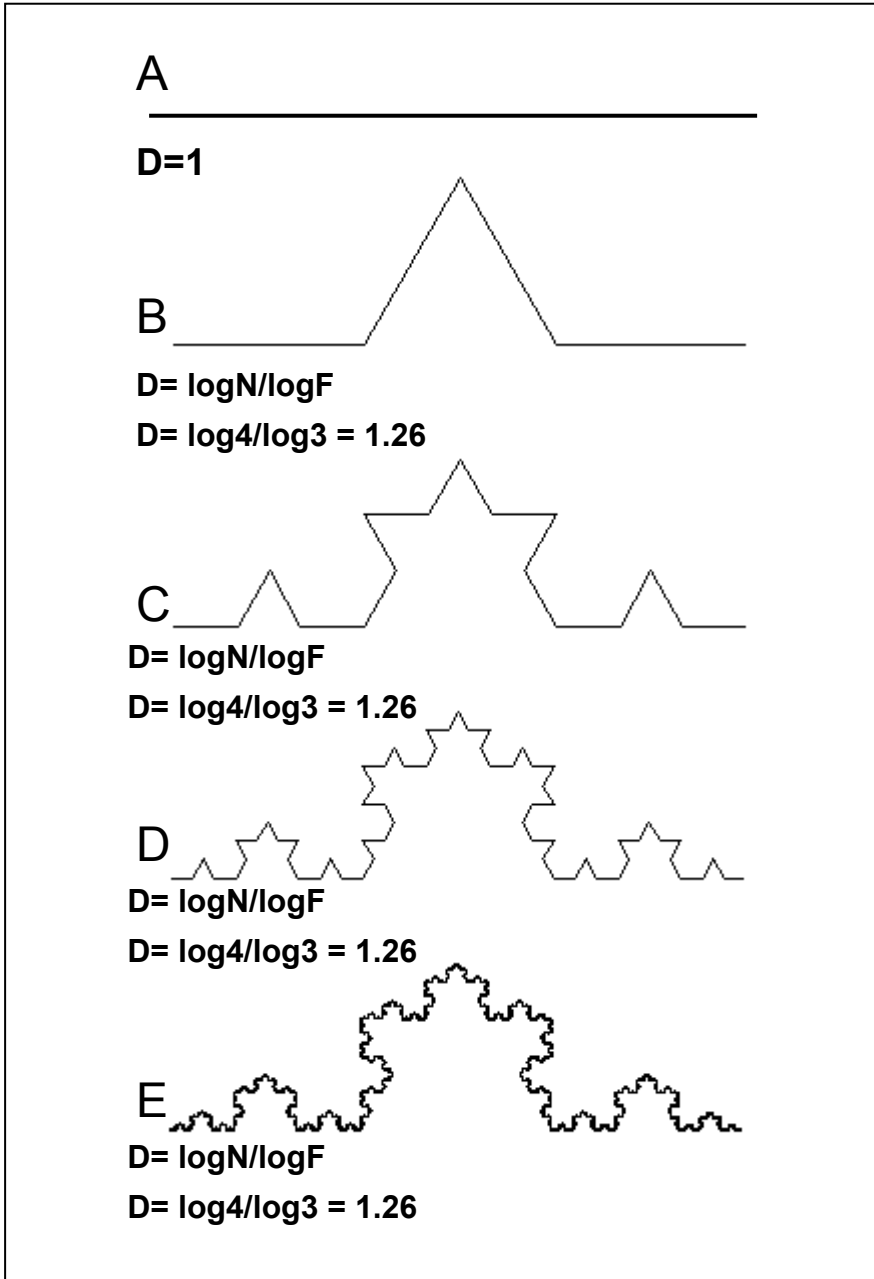


Figura 2. La curva de Koch se elabora removiendo el tercio intermedio de la línea recta principal (A), y colocando dos segmentos de líneas de igual tamaño al desplazado formando un triángulo equilátero (B), este paso o iteración puedes ser repetido indefinidamente (C, D y E como ejemplos). La dimensión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

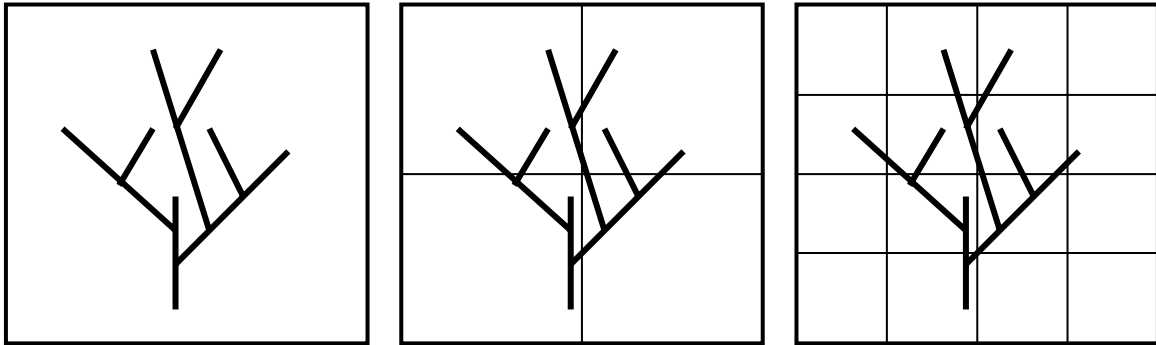


Figura 3. El método de conteo por cajas es ilustrado por una estructura dentro de un espacio bidimensional. El espacio es dividido en cajas, donde posteriormente se hará el conteo del número de cajas $N(R)$ que ocupan al menos un punto de la estructura es determinado por las cajas de menor tamaño r .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