



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Instituto de Investigaciones Biomédicas
Facultad de Medicina

**Determinación de la concentración de aminoácidos
neurotransmisores en la corteza somatosensorial de
ratas enucleadas al nacimiento**

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
LICENCIADA EN INVESTIGACIÓN
BIOMÉDICA BÁSICA
PRESENTA:

RAQUEL MARTÍNEZ MÉNDEZ

Directores de Tesis:

Dr. Gabriel Gutiérrez Ospina

M. en C. Patricia Padilla Cortés

México, D. F., febrero de 2008.



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.

El presente trabajo fue realizado en el laboratorio B220, perteneciente al Departamento de Biología Celular y Fisiología del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la dirección del Dr. Gabriel Gutiérrez Ospina y de la M. en C. Patricia Padilla Cortés.

Los recursos e infraestructura que apoyaron el desarrollo del proyecto fueron proporcionados por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología a través de una Beca de Ayudante de Investigación (Proyecto No. 45872-M). Además, durante los 4 años de la carrera recibí una beca de licenciatura proporcionada por CONACyT, a través de la Academia Mexicana de Ciencias.

AGRADECIMIENTOS

A mis padres, que siempre me han dado todo su apoyo y amor. Gracias a ellos he llegado hasta donde estoy.

A mi familia.

A mi novio, por ser tan cariñoso, tan paciente, y por darme mucho ánimo en todo lo que hago.

A mis amigos, por todo lo que aportan a mi vida, y a mis compañeros de generación, que además de amigos fueron como una segunda familia en la universidad.

Al Dr. Gabriel Gutiérrez Ospina, por las enseñanzas, por los consejos, por infundir confianza en sus estudiantes y por darnos la oportunidad de acudir a él en cualquier momento.

A la M. en C. Patricia Padilla Cortés, por el apoyo, por toda la ayuda en la realización del trabajo experimental y, más que nada, por la amistad.

A mis tutores a lo largo de la carrera: la Dra. Teresa Fortoul van der Goes, el Dr. Enrique García Hernández, el Dr. Jorge Peón Peralta y el Dr. Iván Velasco Velázquez, por su invaluable contribución en mi formación académica.

A mis compañeros de laboratorio, actuales y pasados.

A mis sinodales, por la revisión de esta tesis y por sus comentarios.

A los técnicos académicos Q. F. B. Araceli Guarneros López, Bióloga Luz María Chiu Velazquez y M. en C. Gonzalo Asariel Acero Galindo por su asesoría, y a las Dras. María Sitges Berrondo y Goar Gevorkian Markosian, investigadoras titulares de los laboratorios, por permitirme el acceso a los equipos que me permitieron realizar los experimentos.

Al personal del Bioterio del Instituto de Investigaciones Biomédicas, y en especial a Adolfo Herrera Juárez, por todo el apoyo en la obtención y el cuidado de los animales.

Al personal de la Biblioteca del instituto de Investigaciones Biomédicas.

ÍNDICE

RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	2
ANTECEDENTES	
❖ Plasticidad cortical en los mamíferos ciegos	3
❖ Mecanismos celulares y moleculares de la plasticidad cerebral	6
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	10
HIPÓTESIS	10
OBJETIVO	10
MATERIALES Y MÉTODOS	11
RESULTADOS	
❖ El patrón de los cambios en la concentración de algunos neurotransmisores a lo largo del desarrollo difiere entre las ratas control y las enucleadas	15
❖ Los niveles de algunos neurotransmisores difieren entre las ratas control y enucleadas al día postnatal 6	18
❖ La concentración de glicina aumenta en las ratas ciegas al día 60	20
❖ La relación entre glutamato y GABA se encuentra alterada en las ratas ciegas	20
DISCUSIÓN	22
CONCLUSIONES	27
PERSPECTIVAS	27
BIBLIOGRAFÍA	28

RESUMEN

La ceguera produce una reorganización extensa del cerebro que se manifiesta en parte como una expansión de la corteza somatosensorial primaria. Los mecanismos que conducen a esta expansión son poco claros, si bien se ha postulado que cambios en el tiempo de desarrollo pudiesen estar afectando tanto el momento en el que inicia la formación de la corteza somatosensorial como el crecimiento de los elementos neuronales que la constituyen.

Debido a que los neurotransmisores son moléculas que participan, no solamente en la comunicación entre las neuronas, sino también en los procesos de remodelación estructural y funcional de los circuitos neuronales, es de esperar que algunos de ellos estuviesen involucrados en los procesos de plasticidad cortical observados en los individuos ciegos. Por esta razón, en el presente trabajo se cuantificaron durante el desarrollo postnatal los niveles de aminoácidos neurotransmisores en la corteza somatosensorial primaria de ratas enucleadas al nacimiento.

Nuestros resultados muestran que en las ratas enucleadas existe una disminución en la concentración de aspartato, glutamato, glutamina, GABA, taurina y tirosina al día postnatal 6. Debido a que GABA y taurina funcionan como neurotransmisores excitadores durante la primera semana de vida, es probable que la reorganización de la corteza somatosensorial primaria en los individuos ciegos se asocie a una disminución en la excitabilidad cortical en esta etapa. Por otra parte, los niveles de glicina aumentan dos meses después de la enucleación, y a los tres meses existe un aumento en la fracción de aminoácidos inhibidores en la corteza somatosensorial. Estos hallazgos, además de indicar que las alteraciones en los niveles de neurotransmisores se mantienen varios meses después de la lesión, sugieren que un aumento en el tono inhibitorio en la edad adulta pudiese participar en la estabilización de los cambios morfo-funcionales observados en la corteza somatosensorial primaria de las ratas ciegas.

INTRODUCCIÓN

La pérdida de los receptores relacionados con algún órgano de los sentidos ocasiona modificaciones en la estructura y función del cerebro. A este fenómeno se le considera como una expresión de un proceso neural que se ha denominado genéricamente como plasticidad. Un ejemplo que ilustra lo anterior se observa cuando los mamíferos pierden la visión en etapas tempranas del desarrollo, lo que conduce a una expansión de las cortezas somatosensorial (S1) y auditiva (A1) primarias y una reactivación de la corteza visual por aferentes relacionadas con otras modalidades sensoriales. Los mecanismos que conducen a la expansión y reactivación anatómico-funcional de las cortezas sensoriales primarias son poco conocidos.

Debido a que los neurotransmisores son moléculas que participan, no solamente en la comunicación entre las neuronas, sino también en los procesos de remodelación estructural y funcional de los circuitos neuronales, es de esperar que algunos de ellos estuviesen involucrados en los procesos de plasticidad cortical observados en los individuos ciegos. Por esta razón, en el presente trabajo se cuantificaron durante el desarrollo postnatal los niveles de aminoácidos neurotransmisores en la corteza somatosensorial primaria de ratas enucleadas al nacimiento. Si bien reconocemos que los resultados obtenidos no nos brindan información directa sobre la participación de los neurotransmisores en la plasticidad cortical de los individuos ciegos, consideramos que nos aportarán datos valiosos que permitan hacer inferencias “mecánicas” para la elaboración de futuros trabajos.

ANTECEDENTES

Plasticidad cortical en los mamíferos ciegos

En los mamíferos, la ceguera que resulta de alteraciones congénitas, genéticas y accidentales, o de procesos filogenéticos, se asocia a cambios significativos de la organización morfo-funcional del cerebro. Dicha reorganización consiste en una expansión de las cortezas somatosensorial (S1) y auditiva (A1) primarias (Bronchti et al., 1992; Rauschecker et al., 1992) y una reactivación de la corteza visual por aferentes relacionadas con otras modalidades sensoriales (Yaka et al., 1999; Yaka et al., 2000; Newton et al., 2002; Kahn y Krubitzer, 2002) (Ver Figura 1). Si bien estos cambios en la organización cortical se asocian con modificaciones de las habilidades somestésicas y auditivas de los individuos ciegos, hasta la fecha son pocos los estudios que pretenden esclarecer los mecanismos que los subyacen. No obstante, existen algunos estudios realizados en roedores que muestran que la ceguera infringida desde el nacimiento ocasiona un incremento de aproximadamente 15 % en el área promedio de la corteza somatosensorial en animales adultos (Rauschecker et al., 1992, Ver Figura 4-A).

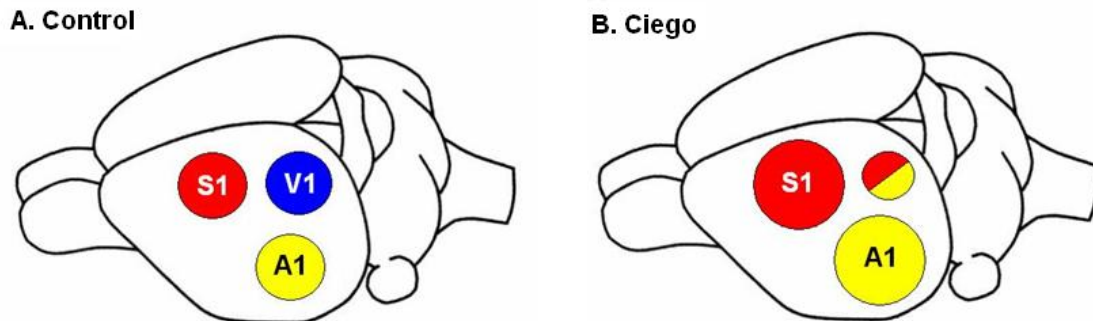


Figura 1. Reorganización de la corteza cerebral en ratas ciegas. Esquemas que ilustran la organización de las áreas sensoriales primarias: somatosensorial (S1), auditiva (A1) y visual (V1) en los roedores en un individuo normal (A) y en un individuo cegado al nacimiento (B). En los roedores ciegos, la corteza visual es reactivada por estímulos somatosensoriales y auditivos, mientras que las cortezas primarias de estas dos modalidades sensoriales se expanden.

En un análisis realizado en el laboratorio se documentó que la expansión de S1 ocurre principalmente durante los primeros días de vida postnatal, edad en la que aún no existe actividad exploratoria voluntaria de las ratas. Esto, aunado al hecho de que la remoción de los bigotes no impide el mayor crecimiento de S1 en las ratas ciegas, sugiere que la expansión no está asociada al uso aumentado de los receptores táctiles (Geovannini, 2001; Geovannini et al., sometido).

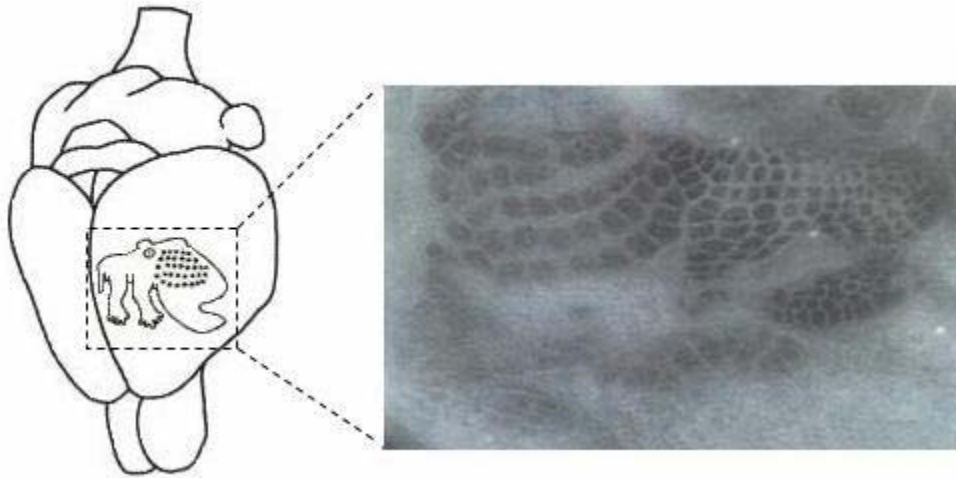


Figura 2. Mapa corporal en la corteza somatosensorial de la rata. Esquema que ilustra la representación del cuerpo de la rata en S1 en forma de módulos discretos denominados barriles, visualizados mediante la técnica histoquímica que revela la actividad de la enzima succinato deshidrogenasa. (Fotografía modificada de Riddle et al., 1993).

En un intento por entender las bases estructurales de la expansión de la corteza somatosensorial primaria, nuestro grupo de investigación dio inicio a una serie de estudios orientados al análisis del desarrollo dendrítico y axónico en animales enceguecidos al nacimiento, mediante un modelo de ceguera que consiste en la remoción quirúrgica del globo ocular y de un tramo del nervio óptico; a este procedimiento se le denomina enucleación.

En la corteza somatosensorial primaria de los roedores cada parte del cuerpo se encuentra representada por módulos denominados barriles, que forman un mapa corporal (Woolsey y van der Loos, 1970) (Ver Figura 2). Éstos son estructuras constituidas por las neuronas estelares espinosas de la capa IV de la corteza cerebral y por los axones

provenientes del tálamo que hacen sinapsis con las dendritas de estas neuronas (Ver Figura 3). Por lo tanto, si los barriles son más grandes en los individuos ciegos, es de suponerse que uno o ambos de estos elementos se encuentren alterados. Nuestros estudios muestran que, efectivamente, los axones tálamo-corticales que forman los barriles en las ratas enucleadas tienen una longitud y un área mayor al día postnatal 7 (P7) (Guzmán, 2004; Geovannini et al., sometido). Por otra parte, las dendritas de las neuronas estelares espinosas alcanzan su madurez dos semanas antes en las ratas ciegas (Hernández, 2006).

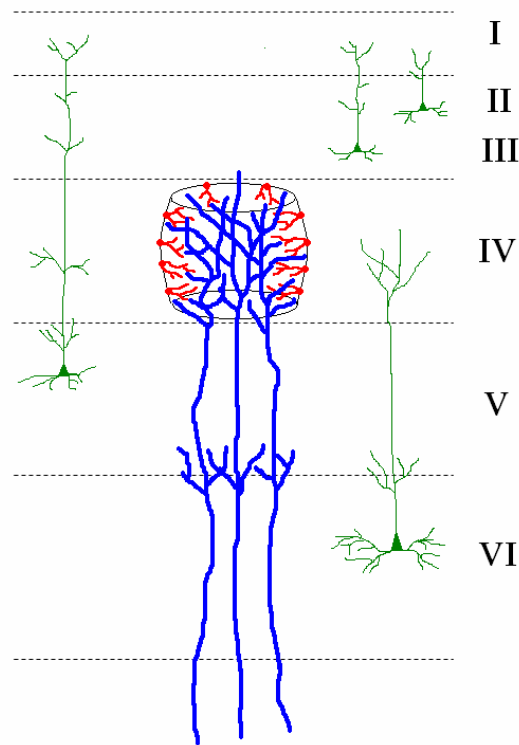


Figura 3. Componentes celulares de los barriles. Esquema que ilustra la localización de los barriles en la corteza y sus componentes estructurales. Los barriles se localizan en la capa IV de la corteza somatosensorial y están conformados por neuronas estelares espinosas pertenecientes a esta capa (ilustradas en rojo) que hacen sinapsis con los axones provenientes del núcleo ventrobasal del tálamo (en azul). Además se muestran las neuronas piramidales de otras capas de la corteza y sus dendritas (en verde).

El hecho de que los árboles terminales de los axones estén más elaborados y que las dendritas alcancen su madurez antes en los animales ciegos sugiere que las causas de la expansión pudieran deberse a cambios en el tiempo de desarrollo de los barriles en los individuos ciegos. Para evaluar esta posibilidad se determinó el momento preciso de la

formación de estas estructuras en las ratas control y enceguecidas durante los primeros cinco días de vida. Las observaciones mostraron que la formación de los barriles está adelantada en los animales ciegos (Ibarrarán, 2006; Geovannini et al., sometido).

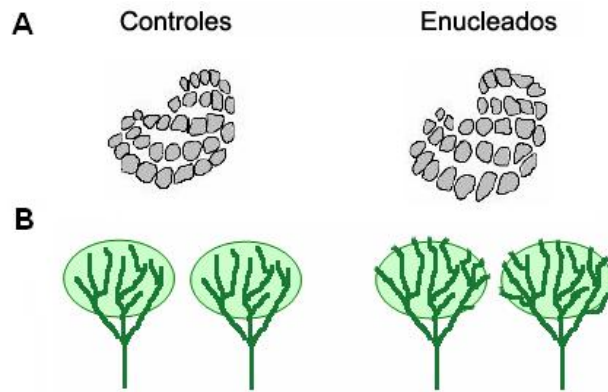


Figura 4. Expansión de los barriles y de los axones tálamo-corticales que los forman. A los 10 días de edad los barriles se encuentran expandidos en las ratas ciegas (A), y desde los 7 días de edad se observa un aumento en la longitud y en el área que ocupan los axones tálamo-corticales que los forman (B).

Mecanismos celulares y moleculares de la plasticidad cerebral

A pesar de los estudios anatómicos y fisiológicos realizados en los individuos ciegos, se sabe poco de los mecanismos celulares y moleculares que conducen a las modificaciones cerebrales mencionadas. A este respecto, los neurotransmisores son un grupo de moléculas candidatas como facilitadoras y/o moduladoras de la reorganización cerebral observada en los individuos ciegos ya que, además de participar en la comunicación entre las neuronas, actúan como reguladores de los procesos de plasticidad mediante el control de la excitabilidad neuronal y/o promoviendo el crecimiento de los procesos neuronales (Represa y Ben-Ari, 2005; Lieske et al., 1999; Lotto et al., 1999).

De acuerdo a su naturaleza química, los neurotransmisores se clasifican en aminoácidos (glutamato, aspartato, glicina, GABA y taurina) y aminas biogénicas (dopamina, noradrenalina, adrenalina, serotonina e histamina). De los aminoácidos neurotransmisores, el glutamato, el aspartato y la glicina se codifican en los genes, mientras que la taurina y el ácido gama-aminobutírico (o GABA por sus siglas en inglés)

se originan a partir de modificaciones post-traduccionales en los aminoácidos cisteína y glutamato, respectivamente. Las aminas biogénicas también se derivan de modificaciones en los aminoácidos estándares: la serotonina proviene del triptofano, la histamina se deriva de la histidina y la dopamina, la noradrenalina y la adrenalina se originan a través de una serie de reacciones a partir de la tirosina.

Se ha reportado en numerosos estudios que los cambios plásticos que ocurren en el cerebro después de una lesión van acompañados de modificaciones en los niveles de neurotransmisores. Por lo tanto, en el presente trabajo se evaluaron los cambios en la concentración de algunos aminoácidos que pudieran estar asociados con las modificaciones de la corteza somatosensorial observadas en los individuos ciegos. El efecto que las lesiones tienen sobre la neuroquímica cerebral se ha estudiado principalmente con relación a los sistemas GABAérgico y glutamatérgico por ser los neurotransmisores inhibitorio y excitador, respectivamente, más abundantes en el Sistema Nervioso Central. En la corteza somatosensorial la actividad GABAérgica controla el tamaño de los campos receptivos. El campo receptivo de una neurona somatosensorial se define en función de la región corporal estimulada que logra alterar el disparo de la neurona registrada. A este respecto, la administración local en la corteza de antagonistas para los receptores de GABA en individuos normales ocasiona una expansión de los campos receptivos en respuesta a estímulos táctiles (Dykes et al., 1984; Tremere et al., 2001). En contraste, la aplicación de agonistas de GABA impide las modificaciones en la corteza somatosensorial observadas después del aprendizaje de una tarea motora (Pleger et al., 2003). Además, se ha reportado que en las 2 semanas posteriores a una lesión en la vía somatosensorial disminuyen los niveles de GABA en la representación cortical correspondiente a la zona corporal afectada (Canu et al., 2006). Estos cambios se acompañan de reducciones en la expresión del RNA mensajero que codifica para la proteína GAD67; enzima responsable de la síntesis de GABA (Gierdalski et al., 1999).

Los receptores de algunos neurotransmisores también sufren modificaciones después de una lesión. Por ejemplo, varias semanas después de la amputación de un dígito en mapaches adultos, los niveles de las subunidades $\beta_{2/3}$ del receptor GABA_A aumentan (He et al., 2004), mientras que en los días posteriores a la lesión aumentan tanto los niveles del RNA mensajero que codifica para el receptor AMPA de glutamato

GluR2 (Gierdalski et al., 1999) como de su proteína (He et al., 2004) en las regiones corticales adyacentes a la región dañada. Este aumento en los niveles del receptor de glutamato coincide con el momento en el que se observa la expansión de los campos receptivos y se forman nuevas conexiones excitadoras. Por otro lado, el aumento en los niveles del receptor GABA coincide con el periodo en el que las nuevas conexiones se han consolidado en la corteza somatosensorial. Con base en estas observaciones se ha propuesto que el balance de excitación-inhibición es un componente fundamental en la reorganización cortical observada después de las lesiones y probablemente lo sea después de sufrir una privación sensorial.

El glutamato y el GABA no son los únicos aminoácidos que modulan la actividad y plasticidad neuronales. La estimulación eléctrica del tracto olfatorio ocasiona la liberación de aspartato dependiente de calcio (Collins, 1979). Además se ha visto que este aminoácido activa a los receptores de glutamato en la corteza olfatoria (Surtees y Collins, 1985), lo que sugiere que puede actuar como neuromodulador en algunas regiones cerebrales.

La glicina funciona como neurotransmisor inhibitorio en regiones como la médula espinal, el tallo cerebral y la retina (Belcher et al., 1976; Aprison y Daly, 1978). Existen algunos reportes que indican que en la corteza cerebral la glicina también actúa como inhibitorio (Bernardi et al., 1979; Tremblay et al., 1988). Sin embargo, existe controversia al respecto, ya que la subunidad del receptor que une al ligando sólo se expresa en niveles altos en la corteza durante el desarrollo embrionario y neonatal, mientras que en el adulto los niveles son muy bajos (Malosio et al., 1991). Además no se ha detectado la unión estricnina, un conocido agonista de los receptores glicinérgicos, en la corteza cerebral (Probst et al., 1986; Zarbin et al., 1981). Por otro lado, la glicina es un co-agonista necesario para la activación de los receptores NMDA (Johnson y Ascher, 1987; Kleckner y Dingledine, 1988; Monaghan et al., 1988; Chen et al., 2003), un tipo de receptores de glutamato ampliamente distribuido en el cerebro de los mamíferos (Brose et al., 1993). Con respecto al aspartato y a glicina, no existen muchos estudios acerca de las modificaciones que ocurren en estos sistemas de neurotransmisores después de una lesión.

La taurina es un aminoácido importante durante el desarrollo. Puede unirse a receptores inhibitorios como los de GABA_A y glicina (Haas y Hosli, 1973; Hussy et al.,

1997; Legendre, 2001), participa en la neurogénesis (Sturman, 1993), como factor trófico en la retina (Lima, 1999; Cubillos y Lima, 2006) y como osmorregulador (Pasantés-Morales et al., 1990; Schousboe et al., 1991; Oja y Saransaari, 1992; Pasantés-Morales y Schousboe, 1997). Además es un factor inductor de la potenciación a largo plazo en el hipocampo (Galarreta et al., 1996) y el estriado (Chepkova et al., 2002; Sergeeva et al., 2003). Se ha reportado que un par de semanas después de una lesión en la vía somatosensorial disminuyen los niveles taurina en S1 (Canu et al., 2006).

Los aminoácidos neurotransmisores mencionados, junto con glutamina, alanina, serina y treonina, están presentes en altas concentraciones en el cerebro de muchas especies (en promedio entre 0.4 y 10 mM; Banay-Swartz et al., 1989), mientras que el resto de los aminoácidos se encuentran en bajas cantidades (concentraciones menores a 0.1 mM). La glutamina funciona como precursor del glutamato, que a su vez es precursor de GABA. Cuando estos aminoácidos son liberados por las terminales sinápticas, las células gliales los recapturan y convierten a glutamina, ya sea de forma directa, en el caso del glutamato, o de forma indirecta, en el caso de GABA. La glutamina sintetizada en las células gliales es devuelta a las neuronas para volver a sintetizar glutamato y GABA (Bak et al., 2006). La serina y la treonina pueden funcionar como precursores de glicina, pero hasta el momento no se ha demostrado que ninguno de estos aminoácidos funcione como neurotransmisor.

Algunas aminas biogénicas también participan como moduladoras de los procesos de plasticidad y se ha visto que su concentración se modifica después de una lesión. Sin embargo, debido a la disponibilidad de los equipos para cuantificar neurotransmisores, y como una primera aproximación para responder a la pregunta de si los neurotransmisores participan en la plasticidad cerebral observada en los individuos ciegos, se decidió enfocar este estudio en los aminoácidos neurotransmisores.

Con base en los antecedentes mencionados se decidió estudiar los posibles cambios en las concentraciones de glutamato, aspartato, GABA, glicina y taurina, los cuales funcionan como neurotransmisores; de glutamina y tirosina, que sirven como precursores, y por último de alanina, que no está involucrada en la neurotransmisión ni como precursor directo de los neurotransmisores mencionados y que por lo tanto se utilizó como control.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

A pesar de los datos que se tienen sobre la participación de los neurotransmisores en los procesos de plasticidad no se sabe cuál es su papel en las modificaciones cerebrales observadas en los animales ciegos. Por esta razón es importante investigar si éstos son una causa o una consecuencia de los eventos de expansión documentados en los cerebros de estos individuos, ya que este conocimiento nos permitiría ampliar nuestra comprensión acerca del mecanismo mediante el cual los neurotransmisores intervienen en los procesos de plasticidad, y diseñar estrategias farmacológicas para la recuperación de la visión.

HIPÓTESIS

- La enucleación neonatal en las ratas ocasiona modificaciones en los niveles de algunos aminoácidos neurotransmisores.
- Algunos de estos cambios se presentan durante el periodo crítico de expansión de los barriles (primera semana de vida).
- Las ratas ciegas mantienen un perfil de niveles de neurotransmisores diferente al de ratas normales a largo plazo.

OBJETIVO

Cuantificar los niveles de los aminoácidos neurotransmisores y algunos no neurotransmisores, en la corteza somatosensorial de ratas control y ratas enucleadas al nacimiento, a diferentes etapas del desarrollo postnatal, mediante la técnica de HPLC de fase reversa.

MATERIALES Y MÉTODOS

Animales

Los experimentos se realizaron con ratas macho de la cepa Wistar. Se utilizaron animales de 2, 4, 6, 10, 30 60, 90 y 120 días postnatales. Se eligieron estas edades debido a que representan etapas críticas en el desarrollo de las ratas:

Día 2. Antes del inicio de la formación de los barriles (que ocurre aproximadamente a los 3 días de edad).

Día 4. Después del inicio de la formación de los barriles.

Día 6. Antes de la edad reportada en la que los barriles de los ciegos se observan más grandes.

Día 10. Después de la expansión de los barriles, etapa neonatal.

Día 30. Jóvenes.

Día 60. Adultos jóvenes.

Días 90 y 120. Adultos maduros (no viejos).

El número de crías por camada se ajustó a ocho animales para disminuir los efectos del tamaño de la camada sobre el desarrollo neonatal. La mitad del número de crías en cada camada se utilizó como grupo control, y la otra mitad como grupo experimental. Todos los animales tuvieron libre acceso a alimentación y agua, y se mantuvieron en cuartos con temperatura e iluminación controladas (ciclo de 12 horas iluminación / 12 horas oscuridad). Los protocolos empleados fueron aprobados por la comisión de ética para la experimentación con animales del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Enucleación

La remoción quirúrgica de los ojos se realizó siguiendo los lineamientos de los protocolos descritos previamente (Bronchti et al., 1992). Los animales recién nacidos (entre 6 y 10 horas de vida) se anestesiaron por hipotermia durante unos minutos. Se realizó una incisión fina sobre la fisura palpebral y se removió totalmente el tejido ocular

con ayuda de una pinza. Después de removidos ambos ojos, los animales se colocaron bajo una lámpara de luz incandescente y se regresaron con su madre después de que hubieron recuperado su temperatura, color y movimiento. Los animales control fueron tratados de la misma manera a excepción de la cirugía.

Procesamiento del tejido

Las ratas de 2, 4, 6, 10, 30, 60, 90 y 120 días fueron anestesiadas y decapitadas. Los cerebros se extrajeron rápidamente y las cortezas somatosensoriales de ambos hemisferios se disecaron, localizándolas de acuerdo a su posición relativa con respecto a la arteria cerebral media (Strominger y Woolsey, 1987). Las muestras de los grupos de 120, 90, 60 y 30 días se conformaron por las cortezas somatosensoriales de los hemisferios izquierdo y derecho de cada animal, utilizando un cerebro por muestra. Debido a la cantidad de tejido que se requiere para realizar la cuantificación de los aminoácidos, las muestras de los grupos experimentales correspondientes a las ratas neonatas se conformaron por las cortezas somatosensoriales primarias de varios animales. Para la edad de 10 días se utilizaron 2 cerebros en cada muestra, para el grupo de 6 días se utilizaron 3, y para las edades de 4 y 2 días se utilizaron 4 cerebros por muestra.

Las muestras se congelaron en metil- butano y fueron almacenadas a $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su uso. El día del experimento se homogenizaron en una solución de ácido perclórico 0.1N y EDTA 0.1mM, a una temperatura entre $4\text{-}8\text{ }^{\circ}\text{C}$. Para las edades de 2 y 4 días el tejido se homogenizó con 250 μl y para el resto de las edades se utilizaron 300 μl . Posteriormente el tejido homogenizado se centrifugó a 12,000 r. p. m. durante 10 minutos a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ y se recolectaron los sobrenadantes para ser almacenados a $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta el día su análisis. Los sedimentos resultantes de la centrifugación se resuspendieron en una solución de hidróxido de sodio 5mM para la posterior cuantificación de proteínas.

Determinación de la concentración de proteína

Las proteínas se cuantificaron por el método de Lowry (Lowry et al., 1951). Por cada 400 μl de proteína resuspendida en hidróxido de sodio 5mM se agregaron 2ml de

reactivo alcalino (Na_2CO_3 al 2%, Tartrato de Sodio al 0.02% y CuSO_4 al 0.01%) y se dejaron reaccionar durante 10 minutos. Posteriormente se agregaron 200 μl de reactivo Folin 1:1 y después de 30 minutos de reacción se midió la absorbancia a una longitud de onda de 660nm.

Determinación de la concentración de neurotransmisores

El análisis de los aminoácidos aspartato, glutamato, glutamina, glicina, GABA, alanina, taurina y tirosina se realizó por Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (HPLC por sus siglas en inglés). Debido a la disponibilidad de los equipos se utilizaron 2 aparatos diferentes para hacer el análisis de las muestras; las edades de 10, 30 y 60 días postnatales se analizaron con una columna Ultrasphere XL-ODS (Beckman, con dimensiones de 4.6mm x 7cm y un tamaño partícula de 3 μm) y un Equipo modular marca Gilson. Las edades de 2, 4, 6, 90 y 120 días se analizaron con una columna Nova Pak C18 (Waters, con unas dimensiones de 3.9mm x 7.5cm y un tamaño de partícula de 4 μm) y un Equipo modular marca Waters.

Para que los aminoácidos puedan ser observados se necesita agregar un compuesto al que se le denomina derivatizante. Las muestras de 10, 30 y 60 días se derivatizaron usando 50 μl de muestra y 200 μl del reactivo o-ftalaldehído (OPA), y en las demás edades se utilizaron 15 μl de muestra y 85 μl de OPA. Después de transcurridos 120 segundos de la reacción de derivatización a temperatura ambiente, se inyectó un volumen de 10 μl de este derivado en la columna. La separación se hizo mediante la elusión por gradiente, en la cual la fase móvil A consistió de un amortiguador de acetato de sodio 30mM (pH 6.8) y la fase B fue metanol. Las fases móviles se filtraron y desgasificaron antes de su uso. La fase móvil se bombeó a un flujo de 1.2 ml/min. Los aminoácidos derivados se detectaron a una longitud de onda de 340nm (sensibilidad 0.05 a. u. f.). Las concentraciones de los aminoácidos aspartato, glutamato, glutamina, glicina, GABA, taurina, alanina y tirosina se calcularon normalizando con una solución patrón de aminoácidos de concentración conocida. Esta solución se preparó en ácido perclórico y EDTA, y los aminoácidos se derivatizaron como se describió arriba.

Análisis de datos

Para analizar los resultados se utilizaron 2 tipos de pruebas estadísticas:

1. Prueba para dos grupos independientes, que nos permite evaluar las diferencias en la concentración de neurotransmisores que pudieran existir entre las ratas controles y las enucleadas a una misma edad. En este caso se usó la prueba “t” de Student cuando los datos presentaron una distribución normal, y en caso contrario se utilizó la prueba “U” de Mann-Whitney.
2. ANOVA con prueba post-hoc de Gabriel, que se utiliza para realizar comparaciones entre varios grupos con tamaño de muestra diferente. Esta comparación se efectuó entre todas las edades de un mismo grupo experimental con el objetivo de encontrar las posibles diferencias en la concentración de un mismo neurotransmisor a lo largo del desarrollo.

El valor de significancia para ambas pruebas fue definido en un valor de $p < 0.05$.

RESULTADOS

El patrón de los cambios en la concentración de algunos neurotransmisores a lo largo del desarrollo difiere entre las ratas control y las enucleadas.

Las concentraciones de los aminoácidos aspartato, glutamato, glutamina, GABA, glicina, taurina, alanina y tirosina en la corteza somatosensorial primaria de la rata se determinaron a los días postnatales 2, 4, 6, 10, 30, 60, 90 y 120. Los valores obtenidos se muestran en las Figuras 5 y 6.

Los aminoácidos aspartato, glutamato y GABA presentan su mayor concentración a lo largo del desarrollo al día P30 tanto en los individuos controles como en los enucleados. En contraste, los niveles de glicina, glutamina, taurina y alanina presentan sus mayores niveles durante los primeros días postnatales (Ver Figura 5). Los niveles de tirosina comienzan bajos en los recién nacidos en ambos grupos y presentan un incremento importante durante la primera semana de vida. Posteriormente disminuyen a niveles menores que los encontrados 2 días después del nacimiento.

Comparando los niveles obtenidos entre las ratas controles y las enucleadas, éstas últimas presentan un incremento menor en la concentración de glutamato y GABA entre los días 10 y 30, y una disminución menor en los niveles de estos neurotransmisores entre los días 30 y 60 (Figura 5-B y D). Sin embargo, a partir del día postnatal 90 los niveles de glutamato disminuyen más en las ratas enucleadas mientras que los niveles de GABA en este mismo grupo se mantienen elevados hasta el día 90, y al día 120 tienden a igualarse a los niveles de las ratas control.

La glutamina presenta un comportamiento similar al glutamato si se comparan los niveles entre las ratas controles y enucleadas. Durante los días postnatales 2, 4 y 6 los niveles son menores en los enucleados, al día 10 los niveles de ambos neurotransmisores son ligeramente mayores en estos individuos, al día 30 disminuyen con respecto a los controles, al día 60 aumentan y a los días 90 y 120 son menores en las ratas ciegas (Figura 5-B y 6-A). Por otra parte, la glutamina también muestra un comportamiento similar a GABA en algunos momentos del desarrollo. Entre los días 4 y 6 existe un

aumento significativo con respecto a la edad anterior (ver Cuadro 1) en los niveles de ambos neurotransmisores en las ratas controles (Figura 5-D y 6-A). Después del día 6 se presenta una disminución abrupta de los niveles de glutamina, en ambos grupos experimentales, que se mantienen bajos en el adulto, mientras que los niveles de GABA suben después del día 10.

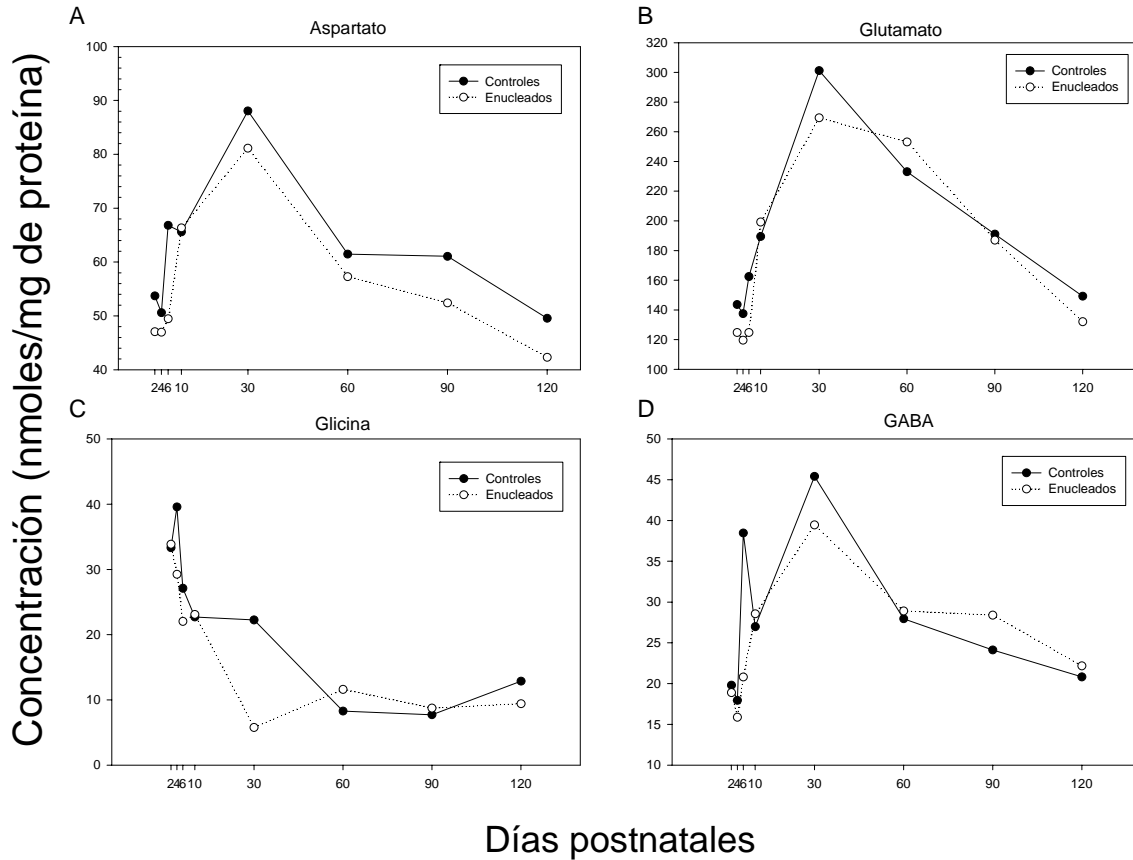


Figura 5. Concentración de aminoácidos en S1 a lo largo del desarrollo. Parte 1. Gráficas temporales que muestran la concentración de algunos aminoácidos en la corteza somatosensorial primaria de la rata a las diferentes edades estudiadas. A) Aspartato, B) Glutamato, C) Glicina, D) GABA.

Los niveles promedio de aspartato (Figura 5-A) en las ratas enucleadas permanecen menores que en las ratas controles después del día postnatal 10 y se mantienen así hasta la última edad estudiada (120 días).

La glicina presenta un patrón notoriamente distinto entre los individuos controles y enucleados (Figura 5-C). En los primeros, los niveles de este neurotransmisor se

mantienen elevados hasta el día P30, y entre P30 y P60 existe una disminución importante, mientras que en los segundos existe una disminución abrupta entre P10 y P30 y un pequeño incremento entre P30 y P60.

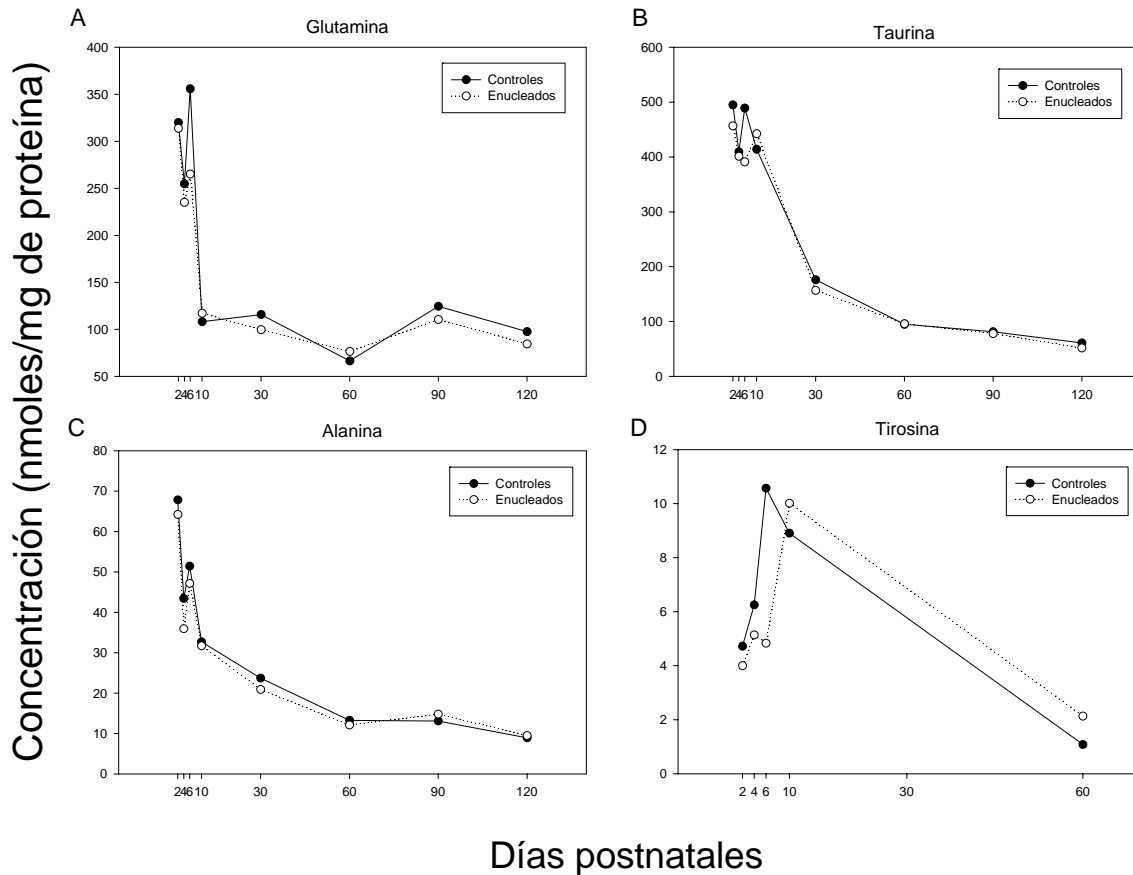


Figura 6. Concentración de aminoácidos en S1 a lo largo del desarrollo. Parte 2. Gráficas temporales que muestran la concentración de algunos aminoácidos en la corteza somatosensorial primaria de la rata a las diferentes edades estudiadas. A) Glutamina, B) Taurina, C) Alanina, D) Tirosina.

Los niveles de taurina y alanina a lo largo del desarrollo presentaron un patrón muy similar en las ratas control y las enucleadas (Figura 6-B y C). Por último, el patrón de concentración de tirosina a lo largo del desarrollo presenta la misma forma en los individuos controles y enucleados, sólo que se encuentra recorrido; en las ratas control los niveles más altos de tirosina se observan al día 6 y en las ratas enucleadas al día 10 (Figura 6-D).

Además de las diferencias que pudieran existir en la concentración de un neurotransmisor entre controles y enucleados de la misma edad, puede ser que los incrementos o disminuciones en los niveles de neurotransmisores a lo largo del desarrollo se modifiquen en las ratas ciegas, por lo que una manera de evaluar las diferencias existentes en los patrones de concentración de los aminoácidos a lo largo del desarrollo entre ambos grupos experimentales es analizando las modificaciones que se presentan entre edades adyacentes en cada grupo. Los resultados obtenidos de este análisis se muestran en el Cuadro 1. Los aminoácidos que presentaron diferencias entre controles y enucleados fueron glutamato, glicina, GABA, glutamina y tirosina.

Cuadro 1. Cambios de los niveles de neurotransmisores en el desarrollo.

ASP		GLU		GLY		GABA	
C	E	C	E	C	E	C	E
-----	-----	10 vs 30	10 vs 30	10 vs 30		4 vs 6 10 vs 30	
GLN		TAU		ALA		TYR	
C	E	C	E	C	E	C	E
4 vs 6 6 vs 10	6 vs 10	10 vs 30	10 vs 30	2 vs 4 4 vs 6 6 vs 10	2 vs 4 4 vs 6 6 vs 10	6 vs 10	

Se muestran las diferencias significativas, con un valor de $p < 0.05$, obtenidas al comparar los niveles de un neurotransmisor entre edades adyacentes. Los valores se obtuvieron mediante una ANOVA y aplicando una prueba post-hoc de Gabriel. Las comparaciones resaltadas son la que difieren entre los controles y los enucleados.

Los niveles de algunos neurotransmisores difieren entre las ratas control y enucleadas al día postnatal 6.

Para evaluar si existen diferencias significativas en los niveles de neurotransmisores de una misma edad entre las ratas controles y enucleadas, se realizó una prueba estadística de t para grupos independientes en cada edad y para cada neurotransmisor. Como se muestra en la Figura 7, se encontró una disminución

significativa en la concentración promedio de todos los aminoácidos estudiados a excepción de glicina y alanina al día postnatal 6.

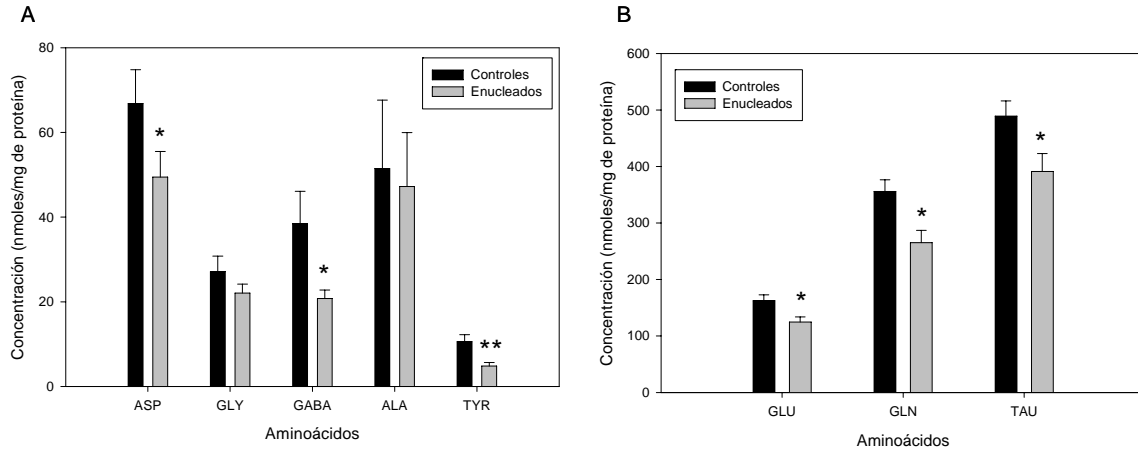


Figura 7. Niveles de aminoácidos en S1 al día P6. Gráficas que muestran el promedio y el error estándar de la concentración de los aminoácidos estudiados al día postnatal 6. A) Aspartato, glicina, GABA, alanina y tirosina. B) Glutamato, glutamina y taurina. Los aminoácidos se separaron en dos gráficas debido a las diferencias en la escala de valores en la concentración. * $p < 0.05$, Prueba t de Student Controles vs. Enucleados para aspartato, glutamina, glicina, taurina y alanina. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, Prueba de Mann-Whitney para glutamato, GABA y tirosina.

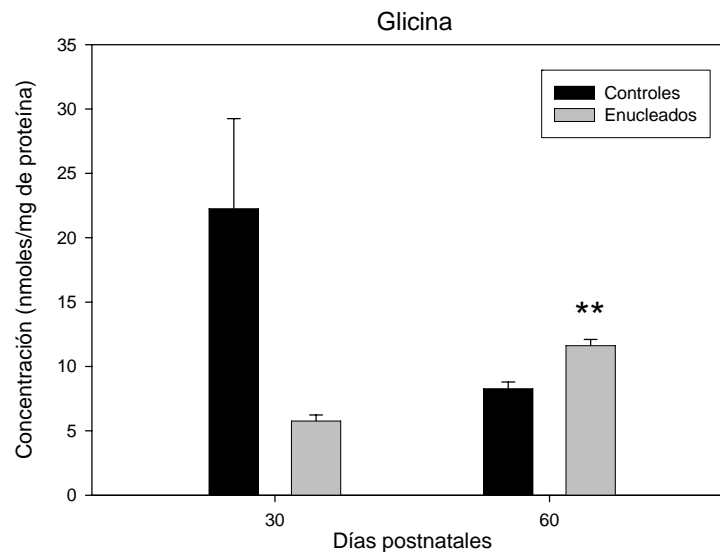


Figura 8. Niveles de glicina en P30 y P60. Gráficas que muestran el promedio y el error estándar de la concentración de glicina en S1 a los días postnatales 30 y 60. ** $p < 0.005$, Prueba t de Student Controles vs. Enucleados.

La concentración de glicina aumenta en las ratas ciegas al día 60.

Como lo sugería el patrón mostrado por los niveles de glicina a lo largo del desarrollo, existe una disminución en los niveles de este neurotransmisor al día P30 y un aumento significativo al día P60. Estas diferencias entre los grupos de individuos control y los enucleados se muestran la Figura 8.

La relación entre glutamato y GABA se encuentra alterada en las ratas ciegas.

Se ha sugerido que el balance de excitación-inhibición es un mecanismo importante en los cambios observados durante los fenómenos de reorganización cortical (Hensch y Fagiolini, 2005). Por esta razón y como una primera aproximación, se evaluó la proporción de excitación/inhibición obteniendo el cociente de la concentración de glutamato/GABA, por ser éstos los principales aminoácidos excitador e inhibidor, respectivamente, y cuya distribución es ubicua en el cerebro.

Como se muestra en la Figura 9, al día postnatal 6 existe un aumento significativo de la fracción de glutamato/GABA en las ratas enucleadas comparando los niveles con los de las ratas control. También se observa una disminución en los niveles de esta fracción entre el día 4 y 6 en las ratas control, que concuerda con el aumento en los niveles de GABA en los mismos días en estos individuos (Figura 5). Por otra parte, aunque tanto glutamato como GABA disminuyen al día 6 en las ratas enucleadas (Figura 7), es mayor la proporción de GABA que disminuye en estos individuos, lo que ocasiona la diferencia en los niveles de la fracción entre las ratas controles y enucleadas.

Entre los días 6 y 10 ocurre un aumento significativo en los niveles de la fracción glutamato/GABA en las ratas control, de manera que el cociente se iguala entre los grupos experimentales. Del día 10 al 60 la fracción presenta niveles similares en las ratas control y enucleadas, pero después del día 60 la proporción de GABA aumenta significativamente en las ratas ciegas en comparación con los controles.

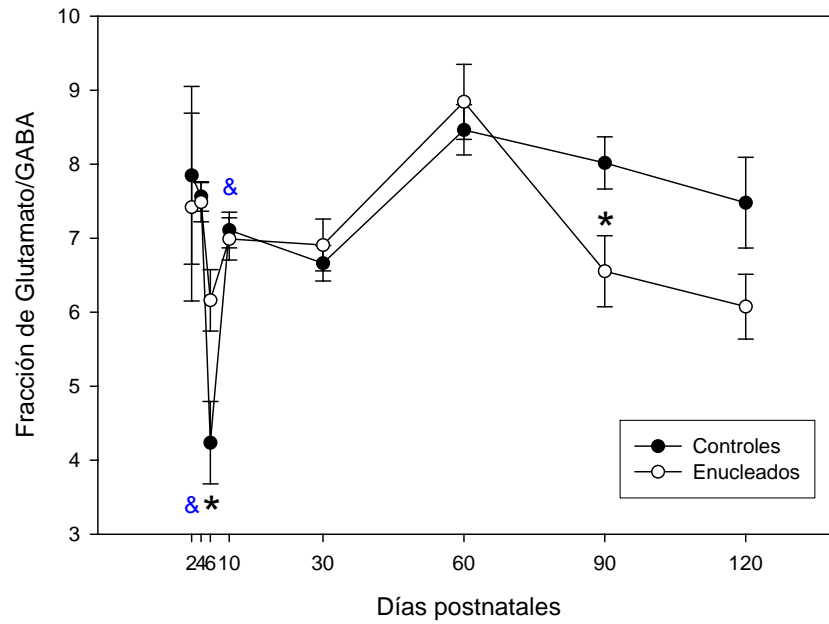


Figura 9. Cociente de la concentración Glutamato/GABA. Gráfica que muestra los resultados de dividir el contenido total de glutamato entre el contenido total de GABA en S1. * $p < 0.05$, Prueba t de Student Controles vs. Enucleados de la misma edad. & $p < 0.05$ ANOVA con prueba post-hoc de Gabriel. Los símbolos en azul representan una diferencia significativa con respecto a la edad inmediata anterior en los controles.

DISCUSIÓN

La ceguera produce una reorganización extensa del cerebro que se manifiesta en parte como una expansión de la corteza somatosensorial primaria. Los mecanismos que conducen a esta expansión son poco claros, si bien se ha postulado que procesos heterocrónicos pudiesen estar afectando tanto la especificación de la corteza somatosensorial como el crecimiento de los elementos neuronales que la constituyen. En este trabajo evaluamos los cambios en las concentraciones de algunos aminoácidos neurotransmisores durante el desarrollo postnatal en la corteza somatosensorial primaria de animales enucleados al nacimiento. Nuestros resultados muestran que en las ratas enucleadas existe una disminución en los niveles de algunos aminoácidos al día postnatal 6 y que los niveles de glicina aumentan al día 60. También obtuvimos datos que sugieren que la relación de excitación/inhibición se encuentra disminuida en etapas adultas en las ratas ciegas.

Los resultados obtenidos en este trabajo son una primera aproximación para evaluar los cambios que ocurren en los sistemas de neurotransmisores en las ratas ciegas. Varios de los aminoácidos estudiados, además de su papel en la neurotransmisión, participan en el metabolismo celular. Es importante mencionar que, debido a que las concentraciones reportadas en el presente estudio representan el contenido total de los aminoácidos en el tejido, no podemos estar seguros de que los cambios observados en su concentración reflejen modificaciones en la liberación (para el caso de los aminoácidos que funcionan como neurotransmisores). En el caso de GABA, las modificaciones en su el contenido sí nos pueden reflejar cambios en la concentración extracelular, ya que existe un reporte que sugiere que las disminuciones en la síntesis de este neurotransmisor ocasionan una disminución proporcional en su liberación (Tapia, 1976).

Al día 6 se encontraron disminuciones en el contenido total de aspartato, glutamato, glutamina, GABA, taurina y tirosina (Ver Figura 6). Esta disminución nos sugiere que a esa edad están ocurriendo modificaciones importantes en el cerebro de las ratas ciegas. Existen diversos estudios que muestran que durante la primera semana de vida postnatal las neuronas tienen una concentración de cloro intracelular mayor que en la edad adulta, ocasionando que a edades tempranas la activación de los receptores

GABA_A provoque una despolarización del potencial de membrana de las neuronas y por lo tanto actúe como excitadora (Gao y van den Pol, 2001; Ben-Ari, 2000). Por otra parte, los receptores de glicina en la corteza en desarrollo son activados principalmente por taurina, que también promueve la despolarización en las neuronas inmaduras (Flint et al., 1998; Wang et al., 2005). Por lo tanto, una disminución en los niveles de aspartato, glutamato, GABA y taurina en el día postnatal 6 nos podría indicar que existe una disminución en el tono de excitación cortical.

Se ha propuesto que el balance de excitación-inhibición es un componente fundamental en la organización y reorganización cortical observada durante el desarrollo normal y después de las lesiones (Hensch y Fagiolini, 2005). En este contexto se propone que la disminución de los mecanismos inhibidores y un aumento de los excitadores favorecerían los fenómenos de reorganización (He et al., 2004). Sin embargo, además de las modificaciones en los campos receptivos de las neuronas, otro proceso de reorganización que ocurre en la plasticidad posterior a las lesiones durante el desarrollo temprano es el crecimiento de nuevos procesos neuronales. Con respecto al papel de los neurotransmisores en el crecimiento de los procesos neuronales, existen dos hipótesis contradictorias entre sí. La primera hipótesis sugiere que los niveles altos de neurotransmisores excitadores (McCobb y Kater, 1989), así como la actividad eléctrica (Cohan et al., 1985; Cohan y Kater, 1986), inhiben la movilidad de los conos de crecimiento y el alargamiento de las neuritas. Estos estudios se han realizado en neuronas del caracol *Helisoma trivolvis* y al parecer los efectos sobre el crecimiento se deben al incremento en los niveles de calcio intracelular ocasionado por la despolarización de la membrana (Mattson et al., 1988). La segunda hipótesis sugiere que la actividad neuronal (Groc et al., 2002) y los neurotransmisores excitadores durante el desarrollo (como GABA) promueven el crecimiento de los procesos neuronales en el hipocampo (Barbin et al., 1993).

Si bien no podemos estar seguros de que los cambios encontrados en el contenido total de aminoácidos al día postnatal 6 reflejen una disminución en la concentración extracelular de los mismos, nuestros datos parecen indicar que existe una disminución en los niveles de aminoácidos excitadores en la corteza somatosensorial primaria de las ratas ciegas. Si este es el caso, una posible explicación para el fenómeno de expansión de los

barriles en los individuos ciegos sería que el crecimiento de los axones tálamo-corticales que los forman está relacionado con una disminución en los niveles de excitación cortical. Datos previos obtenidos en el laboratorio muestran que los niveles de actividad neuronal asociada al uso no difieren entre individuos controles y ciegos (Geovannini et al., sometido), lo que está en desacuerdo con la hipótesis de que la actividad neuronal promueve el crecimiento de los procesos neuronales.

Otro factor a tomar en cuenta es que, con la información que se tiene hasta el momento, no podemos determinar si las modificaciones en la concentración de neurotransmisores al día 6 son causantes de la expansión de los barriles, ya que no se ha determinado con precisión el día postnatal en el que este fenómeno de expansión inicia. Además sería importante conocer si existen diferencias en otros neurotransmisores, como serotonina, que se ha reportado que actúa como factor trófico promoviendo el crecimiento de las neuritas en cultivo (Lieske et al., 1999; Lotto et al., 1999) y de los axones tálamo corticales que forman los barriles *in vivo* (Rebsam y Gaspar, 2002). El hecho de que la concentración de tirosina disminuya significativamente en las ratas enucleadas al día 6 nos sugiere que los niveles de dopamina o de otros neurotransmisores como noradrenalina o adrenalina podrían estar alterados (Bongiovanni et al., 2006), ya que la tirosina es precursor de éstos.

La concentración de glicina aumenta en las ratas ciegas al día 60. Debido a que en la corteza cerebral de los adultos la expresión de la subunidad del receptor de glicina que une al ligando es muy baja (Malosio et al., 1991), no sabemos si el aumento en los niveles de glicina pudiera tener un efecto en los niveles de inhibición en los individuos ciegos. Por otra parte, la glicina es un co-agonista necesario para la activación de los receptores NMDA (Johnson y Ascher, 1987; Kleckner y Dingledine, 1988; Monaghan et al., 1988; Chen et al., 2003).

Durante el desarrollo existen cambios en la expresión de las subunidades NR2 de los receptores NMDA, que aunque no unen a la glicina, modifican la afinidad del receptor por este neurotransmisor (Ikeda et al., 1992; Kutsuwada et al., 1992; Priestley et al., 1995). A partir de la primera semana de vida postnatal existe un aumento gradual de la subunidad NR2A (Kew et al., 1998; Liu et al., 2004), que presenta baja afinidad para glicina, en el cerebro de las ratas, mientras que la expresión de la subunidad NR2B, que

presenta una alta afinidad para el aminoácido mencionado, disminuye paulatinamente después de las 2 semanas de vida (Kew et al., 1998; Babb et al., 2005). Específicamente, en la capa IV de la corteza somatosensorial del ratón existe un aumento en la cantidad de la subunidad NR2A y una disminución de NR2B presentes en las sinapsis al día 20. Estos cambios en la expresión de las subunidades del receptor NMDA a lo largo del desarrollo podrían constituir un mecanismo para que las concentraciones extracelulares de glicina no saturan a los receptores, y que éstos puedan responder a cambios en la liberación de este neurotransmisor. De acuerdo con esta suposición, existen estudios que sugieren que los sitios de unión de glicina en los receptores NMDA no se encuentran saturados *in vivo* (Singh et al., 1990; Czepita et al., 1996; Wilcox et al., 1996), y que un aumento en los niveles extracelulares de glicina puede ocasionar una mayor activación de estos receptores (Thomson et al., 1989; Heresco-Levy et al., 1999; Javitt et al., 2004). Además es importante evaluar si los niveles extracelulares de D-serina se modifican, ya que este aminoácido también funciona como agonista de los receptores NMDA en el sitio de unión a glicina (Wood et al., 1989; Thiels et al., 1992; Schell et al., 1995).

Para obtener un indicio de posibles cambios en el balance de excitación/inhibición en la corteza somatosensorial en las ratas ciegas, se obtuvo el cociente de la concentración de glutamato/GABA a las distintas edades postnatales. Debido a que GABA no participa como neurotransmisor inhibitor durante las dos primeras semanas de vida postnatal en la rata, los cambios en el valor del cociente glutamato/GABA sólo nos pueden indicar posibles cambios en el balance de excitación/inhibición a partir del día 30, y en las edades anteriores este cociente únicamente nos permite evaluar si la proporción entre el contenido de glutamato y GABA se modifica en los individuos ciegos.

Entre los días 4 y 6 encontramos una disminución significativa en la fracción glutamato/GABA en las ratas controles (Figura 9), que no se observa en las ratas enucleadas, por lo que el cociente es significativamente mayor en éstas al día 6. Este cambio en el cociente glutamato/GABA se debe a que en las ratas controles hay un aumento significativo en la concentración de GABA entre los días 4 y 6, mientras que en las ratas ciegas la concentración no aumenta de manera significativa.

El GABA se ha postulado como el principal neurotransmisor excitador en algunas regiones del cerebro de la rata durante la primera semana de vida (Gao y van den Pol,

2001), por lo que el incremento de la fracción glutamato/GABA al día 6 en las ratas enucleadas refuerza la idea de que en los individuos ciegos existe una disminución de los niveles de excitación cortical. Aparentemente, esta regulación se logra en parte evitando el aumento en la concentración de GABA al día 6 que ocurre durante el desarrollo normal.

Además, en este trabajo encontramos una disminución significativa en la proporción de GABA con respecto al glutamato al día 90, en las ratas enucleadas. Este hallazgo, además de indicar que las alteraciones en los niveles de neurotransmisores se mantienen varios meses después de la lesión, sugiere que un aumento en el tono inhibitorio pudiese participar en la estabilización de los cambios morfo-funcionales observados en la corteza somatosensorial primaria de las ratas ciegas.

Las implicaciones fisiológicas de los cambios en los niveles de neurotransmisores encontrados en las ratas ciegas son difíciles de explicar en un contexto únicamente a nivel cerebral. Sin embargo, datos previos del laboratorio muestran que en los individuos ciegos ocurren cambios no sólo en el cerebro sino en todo el cuerpo. La inervación de los bigotes se incrementa de manera significativa en las ratas ciegas en comparación con las ratas controles entre los días 30 y 60 (Martínez, 2004). Este aumento en la densidad de inervación al día 60 en las ratas ciegas coincide con el aumento en los niveles de glicina al mismo día. Por lo tanto, una posible explicación para el incremento en los niveles de este neurotransmisor es que se requiera de una mayor activación de los receptores NMDA debido a la mayor cantidad de información que llega a la corteza somatosensorial. Posteriormente, el aumento en los niveles de GABA al día 90 podría ayudar a refinar los campos receptivos de las neuronas.

Otra observación interesante hecha en el presente trabajo es que, a pesar de que encontramos una diferencia significativa en los niveles de taurina al día postnatal 6, el patrón de los cambios observados en la concentración de este aminoácido a lo largo del desarrollo en ambos grupos de animales es esencialmente idéntico. Debido a que la adecuada concentración de taurina es necesaria para mantener una tasa de crecimiento corporal y cerebral normales (Sturman, 1993), el hecho de que no existan diferencias en el patrón de taurina a lo largo del desarrollo entre las ratas controles y las ciegas (Cuadro 1) quizás explica la falta de diferencias en el peso corporal y el tamaño cerebral observados entre ambos grupos de animales (Martínez, 2004; Hernández, 2006).

CONCLUSIONES

- La enucleación neonatal ocasiona una disminución en los niveles de algunos aminoácidos en la corteza somatosensorial al día postnatal 6.
- Dos meses después de la enucleación aumentan los niveles de glicina.
- Tres meses después de la enucleación existe una disminución en el contenido relativo de GABA con respecto al glutamato.
- Es probable que la reorganización de la corteza somatosensorial primaria en individuos ciegos se asocie a una disminución en la excitabilidad cortical durante los primeros días de vida postnatal.

PERSPECTIVAS

Debido a los cambios encontrados en el contenido de algunos aminoácidos al día 6, sería interesante corroborar mediante micro diálisis y HPLC si la liberación de éstos y otros neurotransmisores (como las aminas biogénicas) también se modifica, y evaluar mediante electrofisiología si efectivamente existe una disminución en los niveles de excitación cortical. Además, para poder correlacionar los cambios encontrados en los niveles de neurotransmisores con el fenómeno de expansión de los barriles sería importante establecer con precisión la fecha en que se expande la corteza somatosensorial primaria en las ratas enucleadas. Estos elementos nos permitirían tener más herramientas que nos ayuden a explicar el fenómeno de reorganización de la corteza somatosensorial en los individuos ciegos.

BIBLIOGRAFÍA

- Babb, T. L., Mikuni, N., Najmd, I., Wylie, C., Olive, M., Dollar, C. y MacLennana, H. (2005). Pre- and postnatal expressions of NMDA receptors 1 and 2B subunit proteins in the normal rat cortex. *Epilepsy Research* 64: 23–30.
- Bak, L. K., Schousboe, A. y Waagepetersen, H. S. (2006). The glutamate/GABA-glutamine cycle: aspects of transport, neurotransmitter homeostasis and ammonia transfer. *Journal of Neurochemistry* 98: 641–653.
- Banay-Schwartz, M., Lajtha, A. y Palkovits, M. (1989). Changes with aging in the levels of amino acids in rat CNS structural elements. II. Taurine and small neutral amino acids. *Neurochemical Research* 14: 563-570.
- Barbin, G., Pollard, H., Gaiarsa, J. L. y Ben-Ari, Y. (1993). Involvement of GABA_A receptors in the outgrowth of cultured hippocampal neurons. *Neuroscience Letters* 152: 150-154.
- Belcher, G., Davies, J. y Ryall, R. W. (1976). Glycine-mediated inhibitory transmission of group Ia-excited inhibitory interneurons by Renshaw cells. *Journal of Physiology* 256: 651-662.
- Ben-Ari Y. (2000) Excitatory actions of GABA during development: the nature of the nurture. *Nature Reviews, Neuroscience* 3: 728-139.
- Bernardi, G., Cherubini, E., Marciani, M. G. y Stanzione, P. (1979). The inhibitory action of glycine on rat cortical neurons. *Neuroscience Letters* 12: 335-338.
- Bongiovanni, R., Young, D., Newbould, E. y Jaskiw, G. E. (2006). Increased striatal dopamine synthesis is associated with decreased tissue levels of tyrosine. *Brain Research* 1115: 26-36.
- Bronchti, G., Schonenberger, N., Welker, E. y Van der Loos, H. (1992). Barreldfield expansion after neonatal eye removal in mice. *NeuroReport* 3: 489-492.
- Brose, N., Gasic, G. P., Vetter, D. E., Sullivan, J. M. y Heinemann, S. F. (1993). Protein chemical characterization and immunocytochemical localization of the NMDA receptor subunit NMDA R1. *The Journal of Biological Chemistry* 268: 22663-22671.
- Canu, M., Treffort, N., Picquet, F., Dubreucq, G., Guerardel, Y. y Falempin, M. (2006) Concentration of amino acid neurotransmitters in the somatosensory cortex of the rat after surgical or functional deafferentation. *Experimental Brain Research* 173:623-628.
- Chen, L., Muhlhauser, M. y Yang, C. R. (2003). Glycine Tranporter-1 blockade potentiates NMDA-mediated responses in rat prefrontal cortical neurons in vitro and in vivo. *Journal of Neurophysiology* 89: 691–703.
- Chepkova, A. N., Doreulee, N., Yanovsky, Y., Mukhopadhyay, D., Haas, H. L., y Sergeeva, O. A. (2002). Long-lasting enhancement of corticostriatal neurotransmission by taurine. *European Journal of Neuroscience* 16:1523–1530.

Cohan, C. S., Haydon, P. G. y Kater, S. B. (1985) Single channel activity differs in growing and nongrowing growth cones of isolated identified neurons of *Helisoma*. *Journal of Neuroscience Research* 13: 285-300.

Cohan, C. S. y Kater, S. B. (1986) Suppression of neurite elongation and growth cone dynamics by electrical activity. *Science* 232: 1638-1640.

Collins, G. G. S. (1979). Evidence of a neurotransmitter role for aspartate and γ -aminobutyric acid in the rat olfactory cortex. *Journal of Physiology* 291: 51-60.

Cubillos, S. y Lima, L. (2006). Taurine trophic modulation of goldfish retinal outgrowth and its interaction with the optic tectum. *Amino Acids* 31: 325–331.

Curtis, D. R., Hosli, L. y Johnston, G. A. (1967). Inhibition of spinal neurons by glycine. *Nature* 215: 1502–1503.

Czepita, D., Daw, N. W. y Reid, S. N. M. (1996). Glycine at the NMDA Receptor in Cat Visual Cortex: Saturation and Changes With Age. *Journal of Neurophysiology* 75: 311-317.

Dykes, R. W., Landry, P., Metherate, R. y Hicks, T. P. (1984). Functional role of GABA in cat primary somatosensory cortex: shaping receptive fields of cortical neurons. *Journal of Neurophysiology* 52: 1066-1093.

Flint, A. C., Liu, X. y Kriegstein, A. R. (1998). Nonsynaptic Glycine Receptor Activation during Early Neocortical Development. *Neuron* 20: 43–53.

Frankfurt, M., Fuchs, E. y Wuttke, W. (1984). Sex differences in gamma-aminobutyric acid and glutamate concentrations in discrete rat brain nuclei. *Neuroscience Letters* 50: 245-250.

Gallarreta, M., Bustamante, J., Martin, D. R., y Solis, J. M. (1996). Taurine induces a long-lasting increase of synaptic efficacy and axon excitability in the hippocampus. *The Journal of Neuroscience* 16:92–102.

Gao, X. B. y van den Pol, A. N. (2001). GABA, not glutamate, a primary transmitter driving action potentials in developing hypothalamic neurons. *Journal of Neurophysiology* 85: 425-434.

Geovannini Acuña, H. 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. Director: Gutiérrez Ospina, G. Tesis Maestría. Universidad Nacional Autónoma de México, Instituto de Investigaciones Biomédicas, 2001.

Geovannini, H., Martínez-Martínez, E., Guzmán-López, J., Ibararán-Viniegra, A. S., Santiago, C., Toscano-Márquez, B., Uribe-Querol, E., Hernández-Echeagaray, E., Padilla, P. y Gutiérrez-Ospina, G. (Somatido). Shifts in developmental timing, but not increased levels of use-dependent neuronal activity, might lead to barrel expansion in the primary somatosensory cortex of developing enucleated rats.

Gierdalski, M., Jablonska, B., Smith, A., Skangiel-Kramska, J. y Kossut, M. (1999). Deafferentation induced changes in GAD67 and GluR2 mRNA expression in mouse somatosensory cortex. *Molecular Brain Research* 71: 111–119.

Groc, L., Petanjek, Z., Gustafsson, B., Ben-Ari, Y., Hanse, E. y Khazipov, R. (2002). In vivo blockade of neural activity alters dendritic development of neonatal CA1 pyramidal cells. *European Journal of Neuroscience* 16: 1931-1938.

Guzmán López, J. A. Reorganización axonal en la plasticidad de la corteza somatosensorial en respuesta a la pérdida visual. Director: Gutiérrez Ospina, G. Tesis Licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México, Instituto de Investigaciones Biomédicas, 2004.

Haas, H. L., y Hosli, L. (1973). The depression of brain stem neurones by taurine and its interaction with strychnine and bicuculline. *Brain Research* 52:399-402.

He, H., Rasmusson D. D. y Quinlan E. M. (2004). Progressive elevations in AMPA and GABA_A receptor levels in deafferented somatosensory cortex. *Journal of Neurochemistry* 90: 1186-1193.

Hensch, T. K. y Fagiolini, M. (2005). Excitatory-inhibitory balance and critical period plasticity in developing visual cortex. *Progress in Brain Research* 147: 115-124.

Heresco-Levy, U., Javitt, D. C., Ermilov, M., Mordel, C., Silipo, G. y Lichtenstein, M. (1999). Efficacy of high-dose glycine in the treatment of enduring negative symptoms of schizophrenia. *Archives of General Psychiatry* 56: 29-36.

Hernández Miranda, L. R. Modificaciones anatómicas y celulares de la corteza somatosensorial primaria de ratones encefalizados al nacimiento. Director: Gutiérrez Ospina, G. Tesis Maestría. Universidad Nacional Autónoma de México, Instituto de Investigaciones Biomédicas, 2006.

Hussy, N., Deleuze, C., Pantaloni, A., Desarmenien, M. G., y Moos, F. (1997). Agonist action of taurine on glycine receptors in rat supraoptic magnocellular neurones: Possible role in osmoregulation. *Journal of Neurophysiology* 502: 609-621.

Ibarrarán Viniegra, A. S. Alteración temporal en la especificación de la corteza somatosensorial primaria en ratas enucleadas. Director: Gutiérrez Ospina, G. Tesis Licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México, Instituto de Investigaciones Biomédicas, 2006.

Ikeda, K., Nagasawa, M., Mori, H., Araki, K., Sakimura, K., Watanabe, M., Inoue, Y. y Mishina, M. (1992). Cloning and expression of the $\epsilon 4$ subunit of the NMDA receptor channel. *FEBS Letters* 313: 34-38.

Javitt, D. C., Balla, A., Burch, S., Suckow, R., Xie, S. y Sershen, H. (2004). Reversal of phencyclidine-induced dopaminergic dysregulation by N-Methyl-D-Aspartate receptor/glycine-site agonists. *Neuropsychopharmacology* 29: 300-307.

Johnson, J. W. y Ascher, P. (1987). Glycine potentiates the NMDA response in cultured mouse brain neurons. *Nature* 325: 529-531.

Kahn, D. M. y Krubitzer, L. (2002). Massive cross-modal cortical plasticity and the emergence of a new cortical area in developmentally blind mammals. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA* 99: 11429-11434.

Kew, J. N. C., Richards, J. G., Mutel, V. y Kemp, J. A. (1998). Developmental changes in NMDA receptor glycine affinity and ifenprodil sensitivity reveal three distinct populations of NMDA receptors in individual rat cortical neurons. *The Journal of Neuroscience* 18: 1935-1943.

Kleckner, N. W. y Dingledine, R. (1988). Requirement for glycine in activation of NMDA-receptors expressed in *Xenopus* oocytes. *Science* 241: 835– 837.

Kutsuwada, T., Kashiwabuchi, N., Mori, H., Sakimura, K., Kushiya, E., Araki, K., Meguro, H., Masaki, H., Kumanishi, T., Arakawa, M. y Mishina, M. (1992). Molecular diversity of the NMDA receptor channel. *Nature* 358: 36–41.

Legendre, P. (2001). The glycinergic inhibitory synapse. *Cellular and Molecular Life Sciences* 58: 760–793.

Lieske, V., Bennett-Clarke, C. A., y Rhoades, R. W. (1999). Effects of serotonin on neurite outgrowth from thalamic neurons in vitro. *Neuroscience* 90: 967-74.

Lima, L. (1999). Taurine and its trophic effects in the retina. *Neurochemical Research* 24: 1333-1338.

Liu, X., Murray, K. D. y Jones, E. G. (2004). Switching of NMDA receptor 2A and 2B subunits at thalamic and cortical synapses during early postnatal development. *The Journal of Neuroscience* 24: 8885-8895.

Lotto, B., Upton, L., Price, D. J. y Gaspar, P. (1999). Serotonin receptor activation enhances neurite outgrowth of thalamic neurones in rodents. *Neuroscience Letters* 269: 87-90.

Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. y Randall, R. J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry* 193: 265-75.

Malosio, M. L., Marquèze-Pouey, B., Kuhse, J y Betz, H. (1991). Widespread expression of glycine receptor subunit mRNAs in the adult and developing rat brain. *The EMBO Journal* 10: 2401 -2409.

Martínez Martínez, E. Evaluación de la plasticidad periférica en ratas ciegas. Director: Gutiérrez Ospina, G. Tesis Licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México, Instituto de Investigaciones Biomédicas, 2004.

Mattson, M. P, Taylor-Hunter, A. y Kater, S. B. (1988). Neurite outgrowth in individual neurons of a neuronal population is differentially regulated by calcium and cyclic AMP. *The Journal of Neuroscience* 8: 1704-1 711.

McCobb, D. P. y Kater, S. B. (1989). Membrane voltage and neurotransmitter regulation of neuronal growth cone motility. *Developmental Biology* 130: 599-609.

Monaghan, D. T., Olverman, H. J., Nguyen, L., Watkins, J. C. y Cotman, C. W. (1988). Two classes of N-methyl-D-aspartate recognition sites: Differential distribution and differential regulation by glycine. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA* 85: 9836-9840.

Newton, J. R., Sikes, R. W. y Skavenski, A. A. (2002). Cross-modal plasticity after monocular enucleation of the adult rabbit. *Experimental Brain Research* 144: 423–429.

- Oja, S. S. y Saransaari, P. (1992). Taurine release and swelling of cerebral cortex slices from adult and developing mice of different ionic compositions. *Journal of Neuroscience Research* 32: 551-561.
- Pasantes-Morales, H., Morán, J., Schousboe, A. (1990). Volume-sensitive release of taurine from cultured astrocytes: properties and mechanism. *Glia* 3: 427-432.
- Pasantes-Morales, H. y Schousboe, A. (1997). Role of taurine in osmoregulation in brain cells: Mechanisms and functional implications. *Amino Acids* 12: 281-292.
- Pleger, B., Schwenkreis, P., Dinse, H. R., Ragert, P., Höffken, O., Malin, J. y Tegenthoff, M. (2003). Pharmacological suppression of plastic changes in human primary somatosensory cortex after motor learning. *Experimental Brain Research* 148: 525-532.
- Priestley, T., Ochu, E. y Kemp, J. A (1994). Subtypes of NMDA receptors in neurones cultured from rat brain. *NeuroReport* 5: 1763-1765.
- Probst, A., Cortés, R. y Palacios, J. M. (1986) The distribution of glycine receptors in the human brain. A light microscopic autoradiographic study using [3H]strychnine. *Neuroscience* 17: 11-35.
- Protti, D. A, Gerschenfeld, H. M. y Llano, I. (1997) GABAergic and glycinergic IPSCs in ganglion cells of rat retinal slices. *The Journal of Neuroscience* 17: 6075-6085.
- Rauschecker, J. P., Tian, B., Korte, T. M. y Egerdt, U. (1992). Crossmodal changes in the somatosensory vibrissa/barrel system of visually deprived animals. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA* 89: 5063-5067.
- Rebsam, A., Seif, I. y Gaspar, P. (2002) Refinement of thalamocortical arbors and emergence of barrel domains in the primary somatosensory cortex: a study of normal and monoamine oxidase A knock-out mice. *The Journal of Neuroscience*, 22: 8541-8552.
- Represa, A. y Ben-Ari, Y. (2005). Trophic actions of GABA on neuronal development. *TRENDS in Neurosciences* 28: 278-283.
- Schell, M. J., Molliver, M. E. y Snyder, S. H. (1995). D-Serine, an endogenous synaptic modulator: Localization to astrocytes and glutamate-stimulated release. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA* 92: 3948-3952.
- Schousboe, A., Sánchez-Olea, R., Morán, J., Pasantes-Morales, H. (1991). Hyposmolarity-induced taurine release in cerebellar granule cells is associated with diffusion and not with high-affinity transport. *Journal of Neuroscience Research* 30: 661-665.
- Sergeeva, O. A., Chepkova, A. N., Doreulee, N., Eriksson, K. S., Poelchen, W., Monnighoff, I., Heller-Stilb, B., Warskulat, U., Haussinger, D., y Haas, H. L. (2003). Taurine-induced long-lasting enhancement of synaptic transmission in mice: Role of transporters. *Journal of Physiology* 550: 911-919.
- Singh, L., Oles, R. J. y Tricklebank, M. D. (1990). Modulation of seizure susceptibility in the mouse by the strychnine-insensitive glycine recognition site of the NMDA receptor/ion channel complex. *British Journal of Pharmacology* 99: 285-288.

- Strominger, R. N. y Woolsey, T. A. (1987). Templates for locating the whisker area in fresh flattened mouse and rat cortex. *Journal of Neuroscience Methods* 22: 113-118.
- Sturman, J. A. (1993). Taurine in development. *Physiological Reviews* 73: 119-147.
- Surtees, L. y Collins, G. G. S. (1985). Receptor types mediating the excitatory actions of exogenous L-aspartate and L-glutamate in rat olfactory cortex. *Brain Research* 334: 287-295.
- Tapia, R. (1976). Evidence for a synthesis-dependent release of GABA. *Advances in Experimental Medicine and Biology* 69: 385-94.
- Thiels, E., Weisz, D. J. y Berger, T. W. (1992). In vivo modulation of N-methyl-D-aspartate receptor-dependent long-term potentiation by the glycine modulatory site. *Neuroscience* 46: 501-509.
- Thomson, A. M., Walker, V. E. y Flynn, D. M. (1989). Glycine enhances NMDA-receptor mediated synaptic potentials in neocortical slices. *Nature* 338: 422-4.
- Tremblay, N., Warren, R. y Dykes, R. W. (1988). The effects of strychnine on neurons in cat somatosensory cortex and its interaction with the inhibitory amino acids, glycine, taurine and β -alanine. *Neuroscience* 26: 745-762.
- Tremere L., Hicks, T. P. y Rasmusson, D. D. (2001). Expansion of receptive fields in raccoon somatosensory cortex in vivo by GABA_A receptor antagonism: implications for cortical reorganization. *Experimental Brain Research* 136: 447-455.
- Wang, F., Xiao, C. y Ye, J. H. (2005). Taurine activates excitatory non-synaptic glycine receptors on dopamine neurones in ventral tegmental area of young rats. *Journal of Physiology* 565: 503-516.
- Wilcox, K. S., Maki Fitzsimonds R., Johnson, B. y Dichter, M. A. (1996). Glycine Regulation of Synaptic NMDA Receptors in Hippocampal Neurons. *Journal of Neurophysiology* 76: 3415-3424.
- Wood, P. L., Emmett, M. R., Rao, T. S., Mick, S., Cler, J. e Iyengar, S. (1989). In vivo modulation of the N-methyl-D-aspartate receptor complex by D-serine: potentiation of ongoing neuronal activity as evidenced by increased cerebellar cyclic GMP. *Journal of Neurochemistry* 53: 979-981.
- Woolsey, T. A. y van der Loos, H. (1970). The structural organization of layer IV in the somatosensory region (S I) of mouse cerebral cortex. The description of a cortical field composed of discrete cytoarchitectonic units. *Brain Research* 17: 205-242.
- Yaka, R., Yinon, U. y Wollberg, Z. (1999). Auditory activation of cortical visual areas in cats after early visual deprivation. *European Journal of Neuroscience* 11: 1301-1312.
- Yaka, R., Yinon, U., Rosner, M. y Wollberg, Z. (2000). Pathological and experimentally induced blindness induces auditory activity in the cat primary visual cortex. *Experimental Brain Research* 131: 144-148.
- Zarbin, M. A., Wamsley, J. K. y Kuhar, M. J. (1981) Glycine receptor: light microscopic autoradiographic localization with [³H]strychnine. *Journal of Neuroscience* 1: 532-547.