



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

Facultad de Medicina

DESARROLLO DEL RECEPTOR 5-HT_{1B}, DE SERT Y DE
LAS AFERENCIAS TÁLAMO-CORTICALES EN RATAS
CON DESNUTRICIÓN INTRAUTERINA. UNA NUEVA
EXPLICACIÓN DEL RETRASO DE LA FORMACIÓN DE
LOS BARRILES CORTICALES

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

DOCTORA EN CIENCIAS

P R E S E N T A

GUADALUPE IVETT MEDINA AGUIRRE

DIRECTOR DE TESIS: Dr. GABRIEL MANJARREZ GUTIÉRREZ

MÉXICO, D.F.

ABRIL, 2008



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

CREDITOS

Este trabajo se realizó en los siguientes laboratorios:

- A. **Laboratorio de Patología Molecular**, Unidad de Investigaciones Biomoleculares en Cardiología, Hospital de Cardiología, Centro Médico Nacional siglo XXI, del Instituto Mexicano del Seguro Social.

- B. **Laboratorio de Biología Integrativa**, Departamento de Biología Celular y Fisiología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México.

- C. **Laboratorio de Neurontogenia**, Departamento de Fisiología, Biofísica y Neurociencias, Centro de Investigaciones y Estudios Avanzados, Instituto Politécnico Nacional.

AGRADECIMIENTOS

- ❖ Al Posgrado en Ciencias Biológicas

- ❖ Agradecemos los apoyos económicos para la elaboración de la presente tesis: A) Proyecto de la Comisión Nacional de Investigación Científica del IMSS con Número de registro 2005-785-078. B) Proyecto CONACYT 45872M. C) Laboratorio de Neurontogenia, Departamento de Fisiología, Biofísica y Neurociencias, Centro de Investigaciones y Estudios Avanzados, Instituto Politécnico Nacional.

- ❖ Al Dr. Gabriel Manjarrez Gutierrez por su valiosísima ayuda, un gran soporte académico y un gran maestro.

- ❖ A los Doctores Gabriel Gutiérrez Ospina y Jorge Hernandez Rodríguez mis co-tutores, mil gracias por sus apoyo incondicional, por su tiempo, por su amistad, confianza y por sus muy atinados comentarios al este proyecto.

- ❖ A los miembros del jurado Sofía Días, Clorinda Arias, Gabriela Morali, Jorge Hernández, Gabriel Manjarrez, Ismael Jiménez y Gabriel Gutiérrez por sus valioso comentarios y consejos.

- ❖ Al Dr. Manuel Salsas y Carmelita Torrero por su apoyo, confianza y palabras de aliento que me brindaron.

- ❖ Al Dr. Armando Mansilla Olivares por la ayuda que me brindó.

- ❖ Al Dr. Alfonso Boyzo por su valiosa ayuda y soporte técnico. Gracias amigo!!

- ❖ A Nidia Hernández por su apoyo técnico en la adquisición de las imágenes del presente proyecto.

- ❖ Al Sr. Ignacio Vargas Martínez quien se encargó del cuidado y manejo de los animales. Gracias Nacho!!

- ❖ A mis compañeros Teresa Godínez, Rocío Herrera, Laura Meneses, Nicolás Camacho y Julio Medina, quienes me apoyaron, me aguantaron y con quienes pasé ratos muy agradables. Gracias a todos!!

DEDICATORIAS

A mis Padres

A quienes con amor, cariño, empeño, esmero y con su ejemplo me han apoyado en forma incondicional en todas mis facetas, ellos han sido mi impulso para seguir adelante.

Este, es uno más de los frutos de su esfuerzo, de sus enseñanzas, de su tenacidad y constancia, que con cariño y amor he recibido, así que consideren esto como un triunfo propio producto de su impulso, apoyo y trabajo. Mi más profundo agradecimiento y muchas felicidades.

Una dedicatoria muy especial para todas y cada una de las personas que de alguna u otra forma contribuyeron para que este proyecto fuera una realidad, Mil gracias.



	ÍNDICE	1
1.1	RESUMEN	3
1.2	ABSCTRACT	3
2.	INTRODUCCIÓN	4
3.	ANTECEDENTES	5
3.1	DESNUTRICIÓN INTRAUTERINA	5
3.2	SISTEMA SEROTONINÉRGICO	9
3.2.1	Desarrollo del sistema serotoninérgico	9
3.2.2	Vía biosintética de la serotonina	10
3.2.3	Receptores serotoninérgicos	13
3.2.4	Receptor 5-HT _{1B}	14
3.2.5	Transportador de serotonina (SERT)	15
3.2.6	Desnutrición y síntesis de serotonina	16
3.3	ESTRUCTURA DE LA NEOCORTEZA	19
3.4	SISTEMA SOMATOSENSORIAL DE LA RATA	20
3.5	Desarrollo de la corteza somatosensorial	27
3.5.1	Establecimiento de la topografía	27
3.6	JUSTIFICACIÓN Y PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	29
4.	HIPÓTESIS	30
5.1	OBJETIVO GENERAL	30
5.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	30
6.	MATERIAL Y MÉTODOS	31
6.1	ANIMALES	31
6.2	ENSAYOS BIOQUÍMICOS E INMUNOHISTOLÓGICOS	33
6.2.1	Técnica de Nissl	33
6.2.2	Marcaje de la vía tálamo-cortical	34
6.2.3	Inmunohistoquímica	35
6.2.4	Grosor de la corteza	37
6.2.5	Determinación de la concentración de 5-HT	37
6.2.6	Determinación de la concentración de L-Trp	38
6.3	MANEJO ESTADÍSTICO	39
7.	RESULTADOS	40
7.1	Pesos corporales	40
7.2	Grosor de la cxS1	42
7.3	Concentración de L-Trp	42
7.4	Concentración de 5-HT	43
7.5	Marcaje de los axones tálamo-corticales	44
7.6	Inmunorreactividad de SERT	46
7.7	Inmunorreactividad de 5-HT _{1B}	47



8.	DISCUSIÓN	48
9.	CONCLUSIONES	57
10.	REFERENCIAS	59
11.	ÍNDICE DE TABLAS	69
12.	ÍNDICE DE FIGURAS	79

2. INTRODUCCIÓN

Los hallazgos observados hasta el momento han revelado que la DIU, es capaz de producir cambios importantes en el metabolismo y en la señalización serotoninérgica cerebral que afecta la formación de las cortezas sensoriales (Hernández, 1973, 1974, 1975, Manjarrez y cols., 1994, 1999, 2003, Gutiérrez-Ospina y cols., 2002). El efecto de la serotonina sobre la corteza somatosensorial lo ejerce a través de la activación de SERT y el receptor 5-HT_{1B}, expresados en las aferentes tálamo-corticales, éstos tienen un patrón de expresión que inicia desde etapas embrionarias y disminuye hasta los 15 días de edad posnatal (D'Amato y cols., 1987; Hansson y cols., 1998; Manssur-Robaey., 1998; Bennett-Clarke y cols., 1993; Boylan y cols., 2000). La DIU genera cambios durante el desarrollo, tanto neuroquímicos, morfológicos y electrofisiológicos que producen una alteración en la señalización serotoninérgica durante el desarrollo de la neocorteza (corticogénesis), ellos especifican un retraso en la maduración de la corteza sensorial y alteraciones de su función en la etapa posnatal. En la corteza somatosensorial primaria (cx51) de los roedores se encuentra la representación topográfica de los mecanorreceptores ubicados en la piel. Esta representación está formada por unidades cito-estructuradas en forma de barril. Los barriles se desarrollan durante los primeros tres o cuatro días posteriores al nacimiento, durante los cuales ocurre una reorganización de los elementos celulares que los integran. Se ha observado que la DIU en la etapa prenatal y posnatal temprana retarda alrededor de dos días la formación de los barriles (Gutiérrez-Ospina y cols., 2002), aunque no se ha establecido la causa que lo provoca. Se ha planteado que probablemente sea debido a un retraso del desarrollo de los

axones y de las ramificaciones dendritas, seguidos por una elevación en la síntesis de la 5-HT cerebral, que continúa durante la lactancia y en la edad adulta. Así, se propuso que los niveles elevados de 5-HT podrían estar retrasando la formación de los barriles. Sin embargo, dicho retraso no se corrige al disminuir la 5-HT mediante la administración de p-clorofenilalanina (inhibidor de la síntesis de 5-HT).

Todos estos hallazgos en conjunto permiten plantear, en este trabajo, que el retraso de la aparición de los barriles es causado por la demora en la llegada de las aferentes tálamo-corticales a la corteza, debido probablemente a una disminución de la expresión de SERT y/o de 5-HT_{1B} durante el desarrollo de los barriles de la capa IV de cxS1.

1.1 RESUMEN

En este estudio se evaluaron los efectos de la desnutrición intrauterina (DIU) sobre la expresión del transportador de serotonina (SERT) y del receptor 1B de serotonina (5-HT_{1B}) por densidad óptica, así como el crecimiento y el tiempo de llegada de las aferentes tálamo-corticales a la corteza somatosensorial, a través del marcaje fluorescente de las mismas. Se observó un aumento en la síntesis de 5-hidroxitriptamina (5-HT, serotonina) secundario a una elevación en la concentración del L-triptófano evaluado a través de cromatografía de líquidos de alta resolución, además se encontraron disminuidos SERT y 5-HT_{1B} y finalmente el tiempo de arribo y la segregación de las fibras tálamo-corticales fue similar en crías controles y con DIU. Los presentes resultados observados en este trabajo nos permite concluir que la DIU produce un retraso en el crecimiento físico y cerebral, un aumento en la síntesis de 5-HT y una disminución significativa de la expresión de SERT y 5-HT_{1B}. Estas alteraciones observadas en la corteza somatosensorial de las crías con DIU generan cambios en la estructura fina de los barriles, mismos que explican en parte el retraso en la formación de los barriles. Por lo tanto, estos cambios observados en el interior de los barriles durante su formación podrían ser los responsables a largo plazo de una disfunción de la corteza somatosensorial primaria (cxS1).

1.2 ABSTRACT

The effect of early nutritional restriction on serotonin transporter (SERT), serotonin receptor 1B (5-HT_{1B}) and the growth and arrival time of thalamo-cortical afferents was assessed, as a possible cause of disturbed S1 barrel formation. The rate of development and segregation of thalamo-cortical fibers was normal. However, there seems to be changes in barrel's size that may be explained by inner dendritic altered organization, possibly secondary to the observed decrease of SERT expression and changes of 5-HT_{1B} receptor. This circumstances may have prevented the appropriate role of serotonin on barrel's differentiation, during the period studied.

3. ANTECEDENTES

3.1 DESNUTRICIÓN INTRAUTERINA

La DIU, es una condición patológica, generalizada, sistémica y potencialmente reversible que se origina como resultado de la ingesta inadecuada de alimento, de la incapacidad del organismo para la utilización de los nutrimentos, de un gasto excesivo de energía (i.e, estrés), o bien por la combinación de los factores anteriormente mencionados (Manjarrez, 1992). La forma más frecuente de desnutrición combina un mayor gasto de energía con un aporte que no satisface las demandas nutricionales del organismo y como consecuencia, las reservas tisulares de energía se agotan. Esto conlleva a la activación de algunas cascadas metabólicas y a la inhibición de otras, con el objeto de compensar la deficiencia nutricional del organismo. Durante su evolución aparecen trastornos funcionales, retardo del crecimiento físico y alteraciones en el desarrollo del individuo, principalmente en el desarrollo del sistema nervioso central (SNC).

La DIU es considerada por la UNICEF como una de las enfermedades más comunes y altamente prevalente en los países en desarrollo, siendo la principal causa de morbi-mortalidad entre los niños recién nacidos (www.unicef.org/undernutrition). Para la Organización Mundial de la Salud, prevenir la desnutrición es su prioridad principal (www.who.org). Las estadísticas más recientes indican que en el mundo viven 2100 millones de niños que equivalen al 35% de la población mundial. Actualmente nacen 129 millones de individuos por año y uno de cada 12 muere antes de cumplir 5 años por causas asociadas a la desnutrición. Además, de los 11 niños que viven, uno de cada 4

niños vive en extrema pobreza, así 149 millones de niños menores de 5 años son desnutridos, de los cuales el 60% son niñas que después de 20 años aproximadamente tendrán la capacidad de procrear y cuya descendencia tendrá alteraciones genéticas por la desnutrición que padecieron junto con sus madres (Fowden y Forhead., 2004). En México existen 10 millones de niños menores de cinco años, de los cuales cuatro millones padecen algún grado de desnutrición (www.unicef.org/undernutrition).

El cuadro clínico de la DIU hace que el enfoque terapéutico esté encaminado hacia una recuperación del peso, talla y metabolismo, sin embargo, con mucha frecuencia se posterga o no se da suficiente importancia al plano neurológico. Actualmente se conoce que los niños que padecieron desnutrición presentan poco rendimiento intelectual, así como trastornos de atención (Oades, 2007). Esto significa que la DIU altera el desarrollo normal del cerebro. Se sabe que estas alteraciones se producen cuando la desnutrición se presenta durante la vida intrauterina y posnatal del individuo. Además estas alteraciones se presentan en diferentes niveles; genético, bioquímico, estructural, funcional y cognoscitivo (Morgane y cols., 1993; Hernández, 1973; Manjarrez y cols., 1996, 2003; Fowden y Forhead, 2004).

Desde la segunda mitad del siglo pasado, se comenzaron a evaluar los efectos de la desnutrición en el SNC. Los primeros estudios en animales desnutridos mostraron alteraciones en el peso cerebral y corporal (Guthrie y Brown., 1968), disminución en el contenido del ADN y ARN en el cerebro, hígado y riñón (Winick y Noble., 1965), disminución en la síntesis de mielina y desmielinización neuronal (Chase y McKhann., 1976; Bourre y cols., 1981), y

alteraciones estructurales y neuroquímicas en sinaptosomas (Gambetti y cols., 1972). Con estos estudios, tanto en modelos animales como en seres humanos, se comenzó a proponer que las alteraciones producidas por la desnutrición en el cerebro durante la etapa fetal y posnatal temprana son prácticamente irreversibles y persistentes a lo largo de la vida (Guthrie y Brown., 1968; Winick y Noble., 1965; Chase y McKhann., 1976; Bourre y cols., 1981; Gambetti y cols., 1972). Estos datos fueron confirmados en estudios posteriores en donde se encontraron alteraciones electrofisiológicas del hipocampo y la neocorteza, así como cambios conductuales en animales desnutridos (Austin y cols., 1989, 1992; Bronzino y cols., 1983; Oscós y Hernandez. 1982).

También se conocen los efectos de la DIU sobre el desarrollo posnatal de ciertas estructuras en las ratas, principalmente en la formación hipocampal, estructura relacionada con la adquisición del aprendizaje y la memoria, en donde se han descrito alteraciones en las células granulares del giro dentado y de las fibras musgosas (Díaz-Cintra y cols., 1991; Cintra y cols., 1997). Además, se han observado modificaciones morfológicas en distintos grupos neuronales, como en el *locus coeruleus* y el *rafe dorsal*. También, se conoce que la desnutrición altera la liberación o el metabolismo de noradrenalina, serotonina, glutamato y GABA en el resto del SNC (Chen y cols., 1992; Díaz-Cintra y cols., 1981, 1984 y 2007; Morgane y cols., 2002; King y cols., 2002; Rotta y cols., 2003; Díaz-Cintra y cols., 2007). En años recientes se ha entendido que la desnutrición conlleva en sí misma a un desequilibrio homeostático del organismo, producido por la falta de nutrimentos, que a su vez, desencadena las alteraciones típicas del estrés, como pérdida de peso corporal y cerebral, apoptosis en diversos órganos, disminución

de factores neurotróficos como BDNF y niveles elevados de corticosterona en sangre (Hobel y Culhane., 2003; Ron de Kloet y cols., 2005; Van der Hove y cols., 2006). Así, la desnutrición es un trastorno de orden general que hace difícil su relación específica con alteraciones funcionales sobre el SNC. La búsqueda de cambios específicos causados por la DIU es el punto de partida para una mejor comprensión de sus efectos sobre la función neuronal. A su vez estos cambios en los sistemas neuronales pueden ser la base de trastornos conductuales y cognoscitivos en los individuos con antecedentes de desnutrición severa. La evidencia experimental ha mostrado que uno de los sistemas neuronales que se altera en el encéfalo de la rata con DIU es el serotoninérgico (Hernández, 1973, 1974, 1975, 1976, 1979; Hoyer y cols., 2002; Hartig y cols., 1996; Siegel y cols., 2006; Manjarrez y cols., 1988, 1988^a, 1988^b, 1994, 1996, 1998, 1999, 2003).

3.2 SISTEMA SEROTONINÉRGICO

3.2.1 Desarrollo del sistema serotoninérgico

Con el paso del tiempo se ha incrementado la evidencia de que los neurotransmisores participan como señales bioquímicas durante el desarrollo. La 5-HT es uno de ellos. Ésta se sintetiza en neuronas serotoninérgicas, las cuales son de los primeros grupos neuronales que se desarrollan en el primordio cerebral y liberan neurotransmisor. De hecho, van liberando 5-HT a la par de su crecimiento axonal (Haydon y cols., 1987; Mercado y Hernandez., 1992; Mercado y cols., 1998). Varios estudios muestran que la 5-HT puede modular diversos eventos del desarrollo tales como la división celular, migración, diferenciación y sinaptogénesis (Lipton y Kater., 1989; Lauder, 1993; Levitt y

Rakic., 1997; Azmitia, 2001; Vitales y col., 2003; Gaspar y cols., 2003). Así, la 5-HT llama la atención como factor importante en el desarrollo de los sistemas sensoriales, especialmente del sistema somatosensorial.

Las neuronas serotoninérgicas están localizadas en regiones específicas llamadas núcleos del rafe, ubicadas en la línea media del rombencéfalo. Esta región da origen al tallo cerebral entre otras estructuras. Si bien el número de neuronas serotoninérgicas alcanzan a ser 20,000 en la rata con relación al total de neuronas del SNC son muy pocas, éstas inervan a todas las áreas del encéfalo y médula espinal (Jacobs y Azmitia., 1992; Gaspar y cols., 2003). Las neuronas serotoninérgicas se diferencian entre los días 10 y 12 embrionarios en los roedores (Levitt y Rakic., 1992; Gaspar y cols., 2003). Un día después, las neuronas de los núcleos del rafe pueden sintetizar 5-HT al mismo tiempo que comienza el crecimiento de sus ramas dendríticas y axones. En los roedores, el tiempo de maduración del sistema serotoninérgico abarca desde el día 14 fetal hasta la etapa posnatal temprana (Lidov y Molliver., 1982; Gaspar y cols., 2003).

Los núcleos del rafe son denominados como B1 al B9 y se han dividido en dos grandes grupos: del B1 al B5 son los núcleos caudales y la división rostral del rafe lo forman los grupos B6 al B9 (Lidov y Molliver., 1982; Wallace y Lauder., 1983; Gaspar y cols., 2003). Los núcleos caudales, inervan la médula espinal y cerebelo, y el grupo rostral al resto del encéfalo (Figura 1).

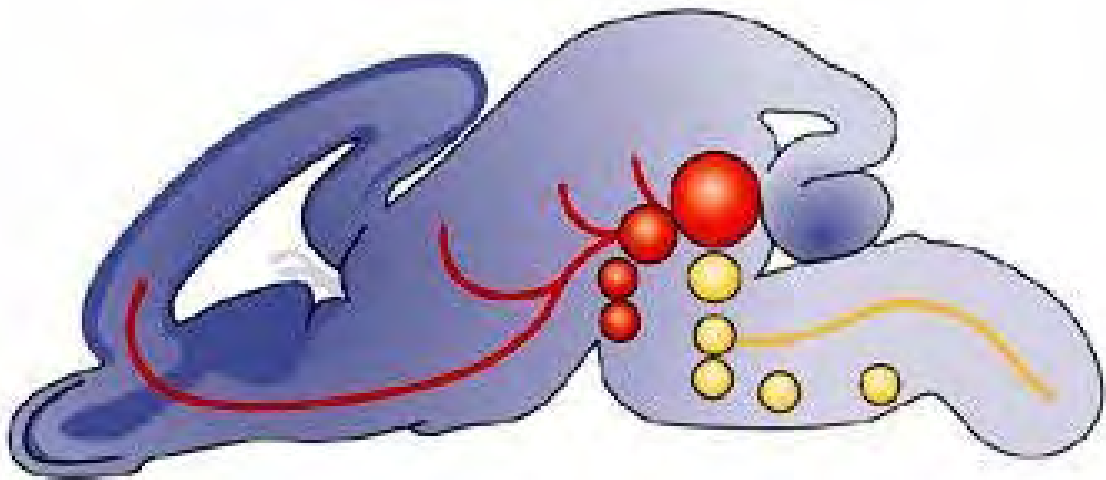


Figura 1. Localización de las neuronas serotoninérgicas en el tallo cerebral de la ratona distribuidas en nueve núcleos. Los cinco grupos caudales (amarillo) inervan el tallo y la médula espinal mientras que los 4 grupos rostrales (rojo) inervan el resto del encéfalo. Modificado de Gaspar y cols., 2003.

3.2.2 Vía biosintética de la serotonina

El L-triptófano (L-Trp), precursor de la síntesis de 5-HT, es un aminoácido no sintetizado por el organismo, por lo tanto, se obtiene de las proteínas de la dieta. El L-Trp se encuentra en el plasma sanguíneo en dos fracciones, una de ellas unida a la albúmina y la otra libre (McMenamy y Oncley., 1958). La fracción unida a la albúmina se utiliza en gran medida en las vías metabólicas de los ácidos cinurénico y nicotínico y también para la síntesis de proteínas (Poitou y Boulu., 1977), mientras que la fracción libre de L-Trp sirve como precursor de la síntesis de 5-HT en el SNC (Miller y cols., 1977; Tagliamonte y cols., 1973; Curzon y Knott., 1973). Es importante resaltar que la relación que guardan ambas fracciones determina la disponibilidad de L-Trp que atraviesa la barrera hematoencefálica, lo cual sucede a través de un mecanismo de transporte activo mediante acarreadores membranales. Una vez en el interior del cerebro el L-Trp

se transporta a las neuronas serotoninérgicas y se puede bio-transformar en 5-HT (Dahlstrom y Fuxe., 1964, Yuwiler y cols., 1977; Sourkes, 1977).

El L-Trp es hidroxilado mediante la acción de la enzima Triptófano-5-hidroxilasa (Tph) (Neckers y cols., 1971; Hamon y Glowinski., 1974; Grahame-Smith, 1964), formando un compuesto llamado 5-hidroxitriptófano (5-HTP) (Grahame-Smith, 1964), que de inmediato es descarboxilado por la enzima descarboxilasa de los aminoácidos aromáticos (DAA) (Hernandez y Illnerova., 1970; Lovenberg y cols., 1962; Sims y cols., 1973) la cual lo transforma en 5-HT (Figura 2).

En condiciones normales, la actividad de la enzima Tph en el cerebro de adultos es de 70 a 100 veces menor a la actividad que tiene la enzima DAA, además su constante de afinidad por el L-Trp es mayor a la concentración del aminoácido en el tejido nervioso. Estos aspectos bioquímicos de la enzima le confieren la característica de ser una enzima limitante y reguladora de la síntesis de serotonina (Neckers y cols., 1971; Hamon y Glowinski., 1974; Lovenberg y cols., 1962).

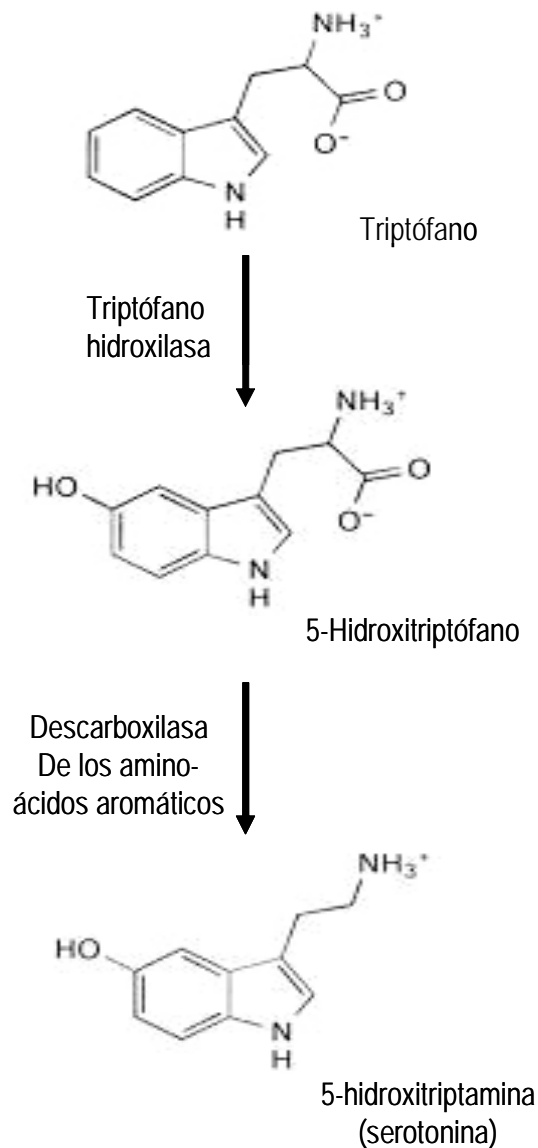


Figura 2. Vía de síntesis de 5-hidroxitriptamina (serotonina). Modificado de Goridis y Rohrer., 2002.

La 5-HT sintetizada se almacena en vesículas sinápticas que se encuentran en las terminales nerviosas serotoninérgicas, estas vesículas varían en forma y tamaño según su localización. Recientemente, se ha descrito en diversas regiones del SNC terminales serotoninérgicas no sinápticas. Este tipo de terminales le confiere a la serotonina un papel de neuromodulador (Persico y cols., 2000;

Gaspar y cols., 2003). Además del efecto modulador que participa en casi la totalidad de las funciones cerebrales, muestra un efecto inhibitor de forma indirecta estimulando el sistema GABAérgico. Así, 5-HT participa en funciones neuroendócrinas, sueño, temperatura corporal, dolor, apetito, ritmos circádianos, funciones cognoscitivas y desordenes siquiátricos (Kandel, 2001; Squire y cols., 2003; Hensler, 2006).

En la regulación de la síntesis y liberación de 5-HT en el SNC están involucrados varios factores. Éstos se han clasificado de manera arbitraria en tres grupos: El primero, corresponde a los cambios en la disponibilidad de L-Trp a nivel del plasma, en la barrera hematoencefálica y en su compartimentalización en el tejido nervioso. El segundo grupo lo forman los factores y mecanismos que regulan la actividad de la Tph para hidroxilar el L-Trp, entre éstos se encuentran la disponibilidad del oxígeno, la concentración del cofactor, tetrahidrobiopterina (BH₄) y el medio iónico del tejido nervioso, además de los mecanismos que intervienen en la regulación de la cinética de la enzima (Boadle-Biber, 1993). El tercer grupo lo constituyen los factores que intervienen en dicha regulación dentro de las propias neuronas serotoninérgicas mediante receptores específicos conocidos como autorreceptores. Los autorreceptores son 5-HT_{1A} y 5-HT_{1B}; capaces de producir hiperpolaridad de la membrana celular, una vez que son activados por 5-HT.

3.2.3 Receptores serotoninérgicos

A través de diversas técnicas se han podido caracterizar los subtipos de receptores de 5-HT que se conocen en la actualidad. Asimismo, se ha establecido

un sistema de nomenclatura para estos receptores. Este sistema ordena y da nombre a los receptores de 5-HT tomando en cuenta sus características farmacológicas, uniones a ligando, señales de transducción intracelular, así como su estructura molecular (secuencia de aminoácidos del receptor; Hoyer y cols., 1994, Siegel y cols., 2006).

Los receptores de 5-HT se han clasificado en familias. En las diferentes familias existen receptores acoplados a proteínas G, receptores que estimulan a fosfolipasa C o canales iónicos. Todos estos receptores son activados por 5-HT, así parte de la gran variedad de funciones que tiene este neurotransmisor o neuromodulador es resultado de la variedad de mecanismos de transducción, distribución neuroanatómica, afinidad química y expresión espacio-temporal de los receptores de 5-HT (Tabla 1), en las diferentes áreas del cerebro (Hoyer y cols., 1994, Siegel y cols., 2006).

La familia de receptores 5-HT₁ agrupa cinco subtipos que son 5-HT_{1A}, 5-HT_{1B}, 5-HT_{1D}, 5-HT_{1E} y 5-HT_{1F} los cuales comparten 40 al 63% de sus secuencias de aminoácidos. Estos receptores inhiben la actividad de adenilato ciclasa a través de proteínas G principalmente inhibitorias (G_{i/o}), también son capaces de abrir canales de potasio, por ello están involucrados con la hiperpolarización neuronal (Hoyer y cols., 2002, Siegel y cols., 2006).

3.2.4 Receptor 5-HT_{1B}

En el sujeto adulto el receptor 5-HT_{1B} se encuentra localizado en los ganglios basales, particularmente en el globo pálido y la sustancia negra; la localización neuroanatómica que tiene, lo involucra en desórdenes cerebrales

como la enfermedad de Parkinson. Estudios funcionales indican que el receptor 5-HT_{1B} está ubicado en las terminales presinápticas de las neuronas serotoninérgicas por lo que se le conoce como autorreceptor presináptico e inhibe la síntesis y la liberación de 5-HT. También se ha observado en neuronas no serotoninérgicas, con distribución presináptica, regulando así la liberación del neurotransmisor correspondiente, como la acetilcolina en el hipocampo, la dopamina en la corteza prefrontal o el glutamato en las neuronas tálamo-corticales (Laurent y cols. 2002). En posición postsináptica, el receptor 5-HT_{1B} se ha encontrado en el tejido vascular del cerebro, pero su función aún se desconoce (Bruinvles y cols., 1993; Hartig y cols., 1996; Hoskin y cols., 2004, Siegel y cols., 2006).

Por otro lado, se ha observado que este receptor se expresa transitoriamente en las fibras tálamo-corticales durante los primeros 15 días de vida posnatal en la corteza somatosensorial primaria de los roedores (Boylan y cols., 2000 y Young-Davies y cols., 2000).

3.2.5 Transportador de serotonina (SERT)

El SERT es un transportador altamente conservado entre las especies. Está codificado por un gen ubicado en el cromosoma 17, llamado SLC6A4 (Bellivier y cols., 1998; Fernandez y cols., 2003; Murphy y cols., 2004). El SERT es un miembro de la familia de transportadores dependientes de los iones Na⁺ y Cl⁻ extracelular y de iones K⁺ intracelular. SERT funciona uniendo un ión Na⁺, una molécula de 5-HT y un ión Cl⁻. El complejo Na⁺, 5-HT, Cl⁻ produce un cambio conformacional en su estructura, lo que permite la translocación de 5-HT al

interior de la célula. Una vez liberada la 5-HT se une un ión K^+ que permite revertir el cambio conformacional lo que expulsa de la célula al ión K^+ terminándose así el ciclo (Bellivier y col., 1998; Fernandez y cols., 2003). La función de SERT es capturar 5-HT del espacio sináptico y transportarla al interior de la terminal nerviosa en donde es metabolizado por la monoamina oxidasa tipo A. De esta forma regula la concentración del neurotransmisor en el espacio sináptico (Fernandez y cols., 2003; Murphy y cols., 2004).

Recientemente, se tiene evidencia que el SERT también se localiza en los axones tálamo-corticales, principalmente en aquellos axones que inervan las cortezas sensoriales. Su función aún se desconoce, sin embargo es importante señalar que SERT se expresa durante los primeros 15 días de edad posnatal. Por ello se ha planteado la posibilidad de que SERT juegue un papel importante en el desarrollo de la corteza somatosensorial (Manssour-Robaye y cols., 1998; Boylan y cols., 2000).

3.2.6 Desnutrición y síntesis de serotonina

Existe evidencia que apoya un vínculo entre la nutrición y la síntesis de 5-HT, así en experimentos con ratas, las cuales se sometieron a periodos de ayuno corto o a desnutrición hipocalórica-hipoproteínica durante la vida intrauterina o posnatal, el L-Trp se encontró elevado en su fracción libre y en el cerebro también aumentaron los niveles de dicho aminoácido y de 5-HT (Zeisel y cols., 1981; Spear y Scalzo, 1985; Hernandez, 1979; Manjarrez y cols., 1988, 1988^a, 1988^b; Hernandez y cols., 1973, 1974, 1975, 1976, 1989; Hernández y col., 1986).

Tabla 1: Receptores de serotonina en el Sistema Nervioso Central.

Receptores	Distribución	Mecanismo efector
<i>Familia 5-HT₁</i>		
5-HT _{1A}	Hipocampo, amígdala, septum, corteza entorrinal, hipotálamo y núcleos del rafe	Inhibición de adenilato ciclasa; activa canales de K ⁺
5-HT _{1B}	Sustancia nigra, Ganglios basales axones tálamo-corticales en la corteza somatosensorial	Inhibición de adenilato ciclasa
5-HT _{1Dβ}	Corteza frontal, colículos superiores, geniculado lateral y núcleos profundos del cerebelo	Inhibición de adenilato ciclasa
5-HT _{1D}	Globo pálido, sustancia nigra, caudado putamen	Inhibición de adenilato ciclasa
5-ht _{1E}	???	Inhibición de adenilato ciclasa
5-ht _{1F}	Corteza cerebral, estriado e hipocampo	Inhibición de adenilato ciclasa
<i>Familia 5-HT₂</i>		
5-HT _{2A}	Clastrum, corteza cerebral, bulbos	Estimulación de

	olfatorios, estriado y núcleo acumbens	fosfolipasa C; cierra canales de K ⁺
5-HT _{2B}	???	Estimulación de fosfolipasa C
5-HT _{2C}	Plexos coroides, globo pálido, corteza cerebral, septo hipotálmico, sustancia nigra, médula espinal	Estimulación de fosfolipasa C

Familia 5-HT₃

5-HT ₃ (5-HT _{3A}) (5-HT _{3B})	Hipocampo, corteza entorrinal, amígdala, núcleo acumbens, nervio del tracto solitario, nervio del trigémino, núcleo motor, nervio dorsal vago, área postrema y médula espinal	Canal iónico
5-HT ₄	Hipocampo, estriado, bulbos olfatorios, sustancia nigra	Activación de adenilato ciclasa
5-ht _{5A}	???	Inhibición de adenilato ciclasa
5-ht _{5B}	???	???
5-ht ₆	???	Activación de adenilato ciclasa
5-HT ₇	Corteza cerebral, septum, tálamo,	Activación de

Tabla 11. Receptores serotoninérgicos en el SNC. Modificada de Hensler, 2006.

Efectos similares se observan en animales normales a los que se les administraron cargas de L-Trp a razón de 50 a 150 mg/kg de peso corporal por vía intraperitoneal (Hernandez, 1979; Hernandez y col., 1986; Bourgoïn y cols., 1974). Finalmente, cuando se inyecta una dosis de L-Trp 50 mg/kg de peso corporal a ratas durante la gestación, se observa un aumento de la actividad de la enzima Tph en el cerebro fetal (Hernandez, 1979, Hernández y col., 1986) y en etapas posnatales las concentraciones del 5-HT y del ácido 5-hidroindolacético se encontraron elevadas indicando una activación importante de la vía metabólica serotoninérgica. Estos cambios son semejantes a los observados en animales con DIU (Hernandez, 1979; Manjarrez y cols., 1988, 1988^a, 1988^b; Hernandez y cols., 1989; Hernandez y Chagoya., 1986).

En el laboratorio se ha observado que ratas sometidas a desnutrición durante la etapa fetal presentan una elevación en la síntesis de 5-HT cerebral, que continúa durante la lactancia y la edad adulta (Manjarrez y cols., 2003). Esta elevación es precedida de un aumento en la concentración de L-Trp y de la actividad de la Tph2 (Manjarrez y cols., 1988, 1994, 1996, 1998, 1999, 2003), que a su vez está ocasionado por una elevación de la fracción libre de L-Trp plasmático, aminoácido esencial precursor de la síntesis de serotonina. También este incremento del neurotransmisor se ha observado en la cx51 acompañado de un retardo de dos días en la aparición de los barriles corticales con relación a los animales normales. El retraso no se corrige al disminuir la concentración de 5-HT

a través de la administración de p-clorofenilalanina (PCPA) (Gutierrez-Ospina y cols., 2002).

3.3 ESTRUCTURA DE LA NEOCORTEZA

La neocorteza en los mamíferos, especialmente en la rata, está dividida en distintas áreas denominadas cortezas primarias y secundarias, sensorio-motoras, y multimodales o asociativas (Figura 3). Las cortezas primarias y secundarias son responsables de recibir y procesar información unimodal proveniente de los órganos de los sentidos (i.e., visual, somestésica y auditiva).

Por su parte, las cortezas multimodales o asociativas integran la información proveniente de distintas regiones cerebrales, incluyendo aquella transmitida desde las cortezas sensoriales primarias y secundarias, permitiendo la percepción y la consecuente modulación de las respuestas conductuales, motoras y cognitivas (Shepherd, 1994; Waite y Tracey., 1995; Beatty, 1995; Hendry y cols., 2003).

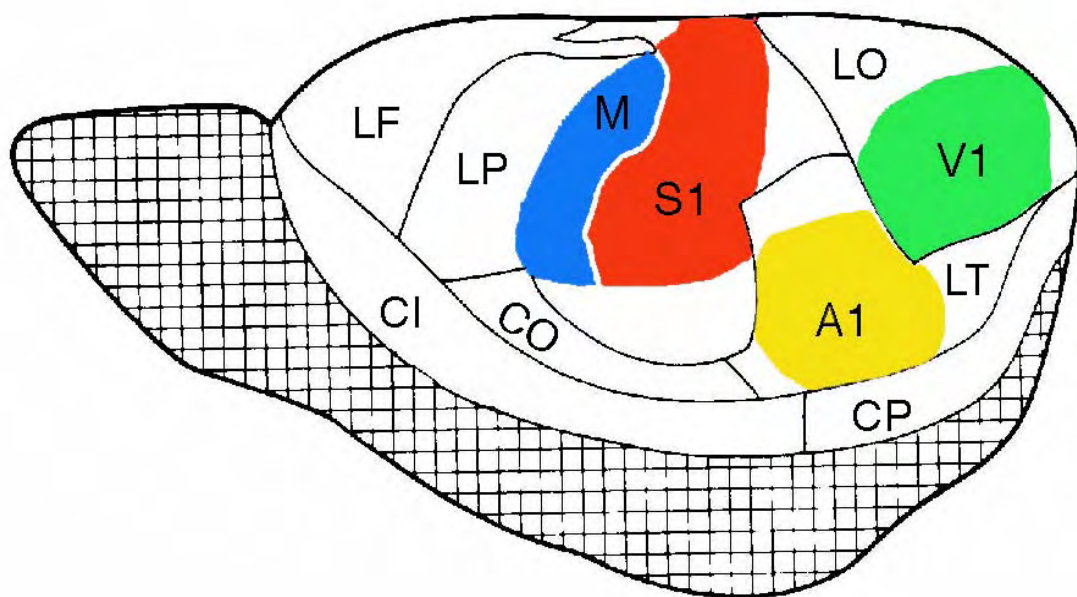


Figura 3. Vista lateral de la corteza cerebral de la rata. Se muestra el lóbulo frontal (LF), lóbulo parietal (LP), lóbulo temporal (LT), lóbulo occipital (LO), corteza orbital (CO), corteza insular (CI), corteza perirrinal (CP), corteza motora (M), corteza somatosensorial primaria (S1), corteza auditiva (A1), corteza visual (V1). Modificado de Zilles, 1990 y Beatty, 1995.

3.4 SISTEMA SOMATOSENSORIAL DE LA RATA

Los sistemas sensoriales son los encargados de recibir, procesar e integrar la información del medio ambiente que nos rodea. Cada sistema sensorial conduce estímulos específicos. Así, los receptores transducen estímulos lumínicos, sonoros, mecánicos, químicos olfativos y gustativos (Figura 4) que serán procesados en los diferentes grupos de neuronas que a su vez forman una representación ordenada de las propiedades físico-químicas y espacio-temporales de los estímulos externos (Matthews, 2001). En este trabajo nos enfocaremos al sistema somatosensorial de la rata.

El sistema somatosensorial (S1) de la rata se ha utilizado como un modelo experimental para investigar los factores y procesos celulares responsables de la formación y plasticidad de circuitos neuronales durante el desarrollo. Este modelo es especialmente útil debido a que cada uno de los relevos sinápticos mantiene una organización somatotópica, acorde con la distribución de los mecanorreceptores y otros receptores somatosensoriales distribuidos en la superficie del cuerpo (Figuras 5 y 6).

La organización somatotópica delimita a su vez las representaciones anatómicas modulares de cada uno de los segmentos corporales denominados barreletas, barreloides y barriles, a lo largo de los distintos relevos de la vía somatosensorial en el tallo cerebral, tálamo y la cxS1, respectivamente (Figura 7;

Woolsey y Van der Loos., 1970; Woolsey, 1990; Riddle y cols., 1992; Price, 1995; Gutiérrez-Ospina, 1997).

Mecanorreceptores

Corpúsculos de Pacini

Contacto; vibración
Adaptación rápida
Axón mielinizado

Corpúsculos de Meissner

Contacto; vibración
Adaptación rápida
Axón mielinizado

Corpúsculos de Ruffini

Contacto; presión
Adaptación lenta
Axón mielinizado

Discos de Merkel

Contacto; presión
Adaptación lenta
Axón mielinizado

Receptores del folículo piloso

Desplazamiento del pelo
Adaptación rápida
Axón mielinizado

Termorreceptores

Estímulos fríos
Axones pequeños mielinizados

Estímulos de calor
Axones amielínicos

Receptores nociceptivos

Conducción rápida
Axones pequeños mielínicos

Conducción lenta
Axones amielínicos

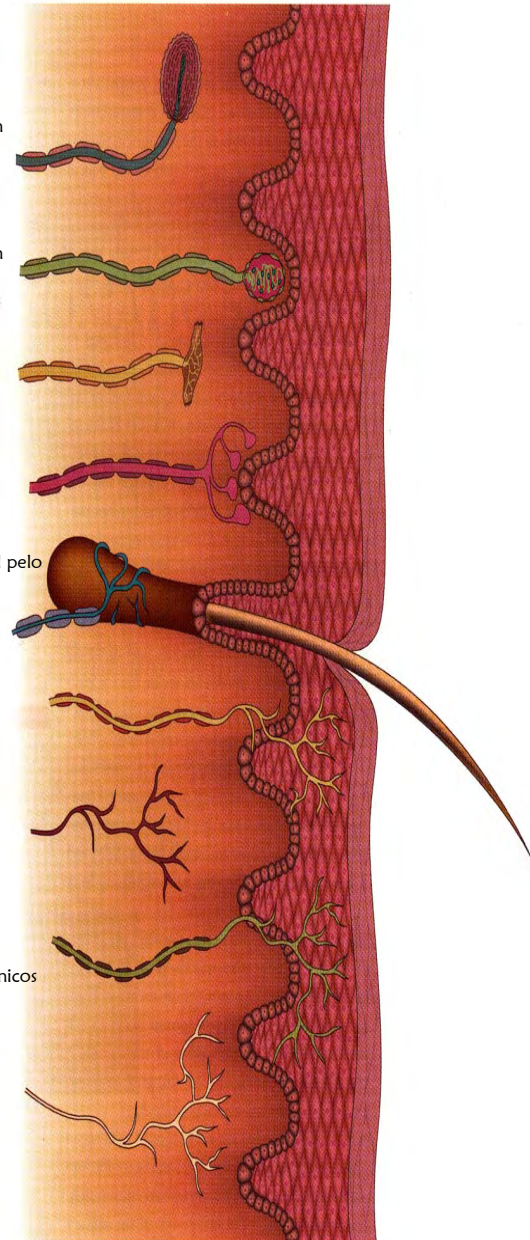
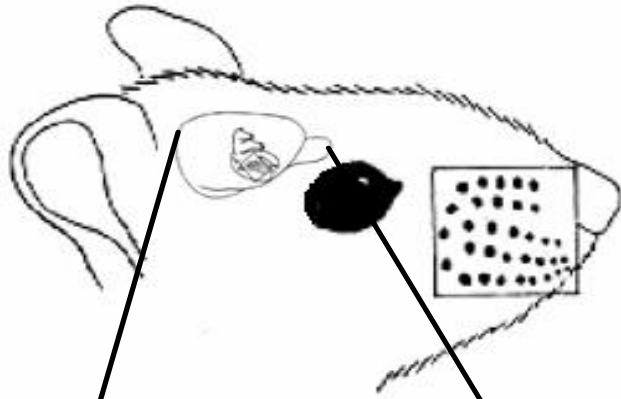


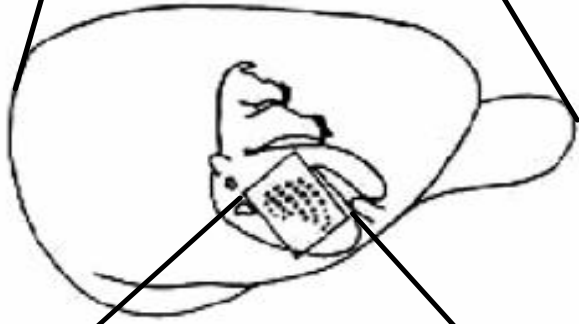
Figura 4. Tipos de mecanorreceptores, termorreceptores y receptores nociceptivos ubicados en la piel. Modificado de Matthews, 2001.

El sistema somatosensorial está constituido por receptores y vías sensoriales que son responsables de recibir, transferir, filtrar e integrar información exteroceptiva (i.e., dolor, temperatura, discriminación gruesa y fina, presión y vibración) y propioceptiva derivada de las articulaciones y músculos. Las vías aferentes sensoriales primarias nacen en los cuerpos neuronales localizados en la cadena ganglionar dorsal paravertebral y dan origen a los mecano-, baro-, y termorreceptores localizados en la dermis y papilas dérmicas, así como en los husos musculares y tendinosos. Las aferencias sensoriales que transmiten el dolor generan terminaciones nerviosas libres, es decir, no asociadas a ningún receptor especializado, que se distribuyen en la dermis (Figura 4).

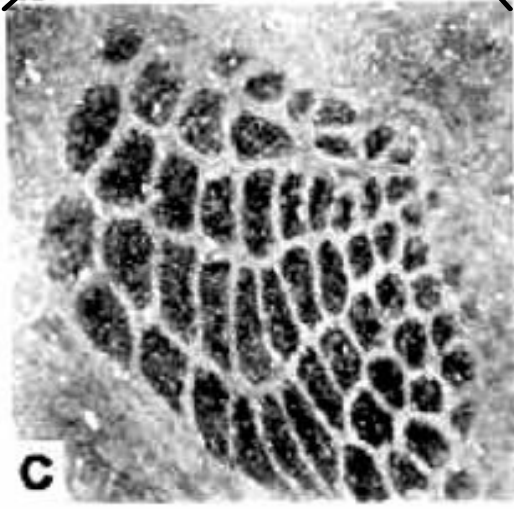
La información somática sensorial proveniente de los receptores por las vías aferentes sensoriales primarias, se dirige hacia la médula espinal o al tallo cerebral. Las mismas neuronas que originan a las aferencias primarias periféricas, transfieren la información hacia las astas dorsales de la médula espinal, o bien hacia los núcleos del trigémino en el tallo cerebral (Waite y Tracey., 1995).



a



b



c

Figura 5. Distribución espacial y representación cortical de las vibrisas faciales en la rata. Los bigotes del hocico de la rata (a) están representados en la capa IV de la corteza somatosensorial primaria (b), a manera de un conjunto de módulos o barriles localizados en el sub-campo de barriles posteromedial (c). Así, cada barril de esta región representa de manera correspondiente cada uno de las vibrisas. Tomado de Gutiérrez-Ospina, 1997.

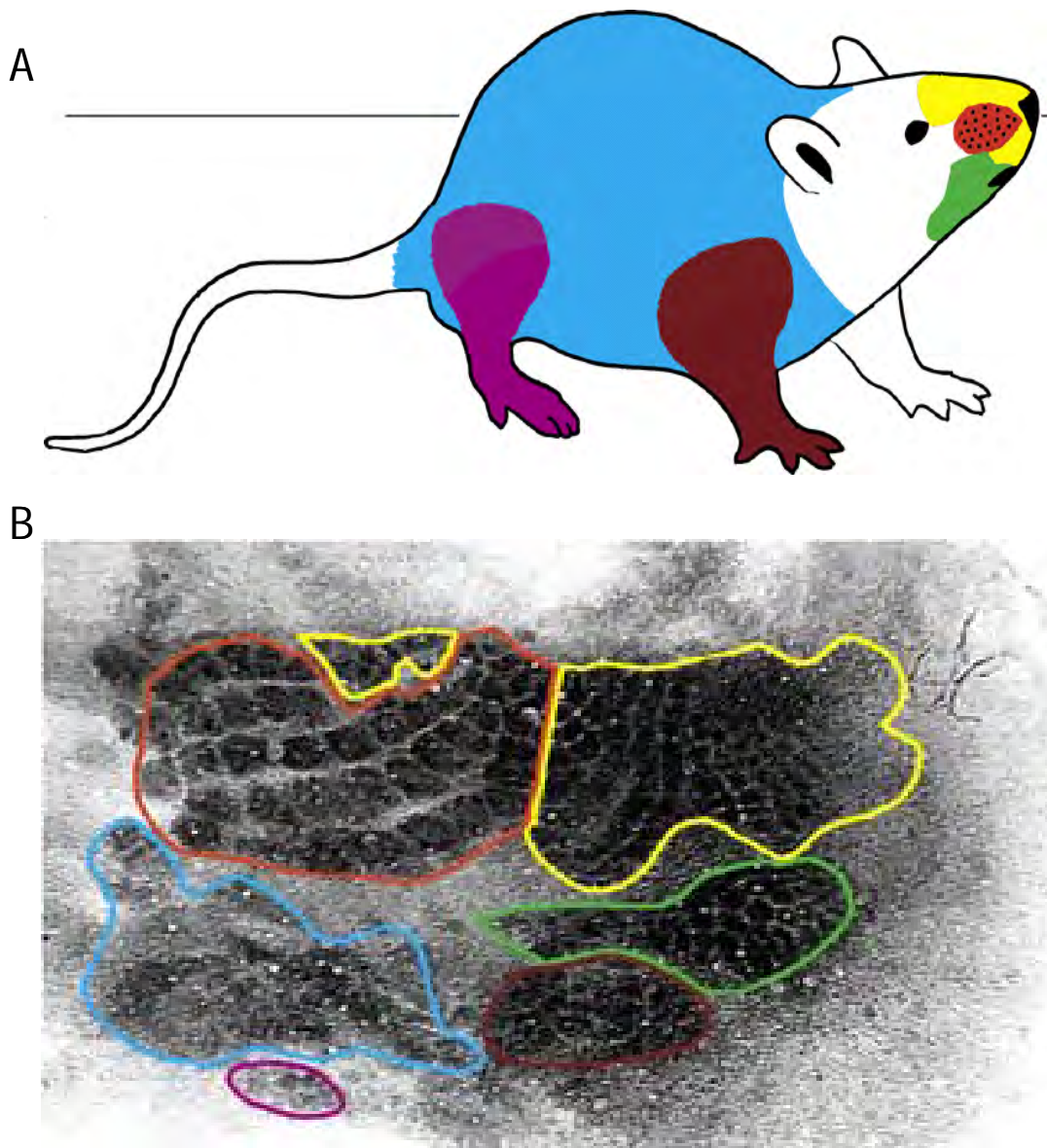


Figura 6. Representación de los distintos segmentos corporales de la rata, cada uno de estos segmentos indicados con colores diferentes. A) Dibujo de los segmentos corporales de acuerdo al código de color mostrado en el panel B. B) Fotomicrografía de la representación del mapa corporal en la corteza S1 (Medina-Aguirre, 2000).

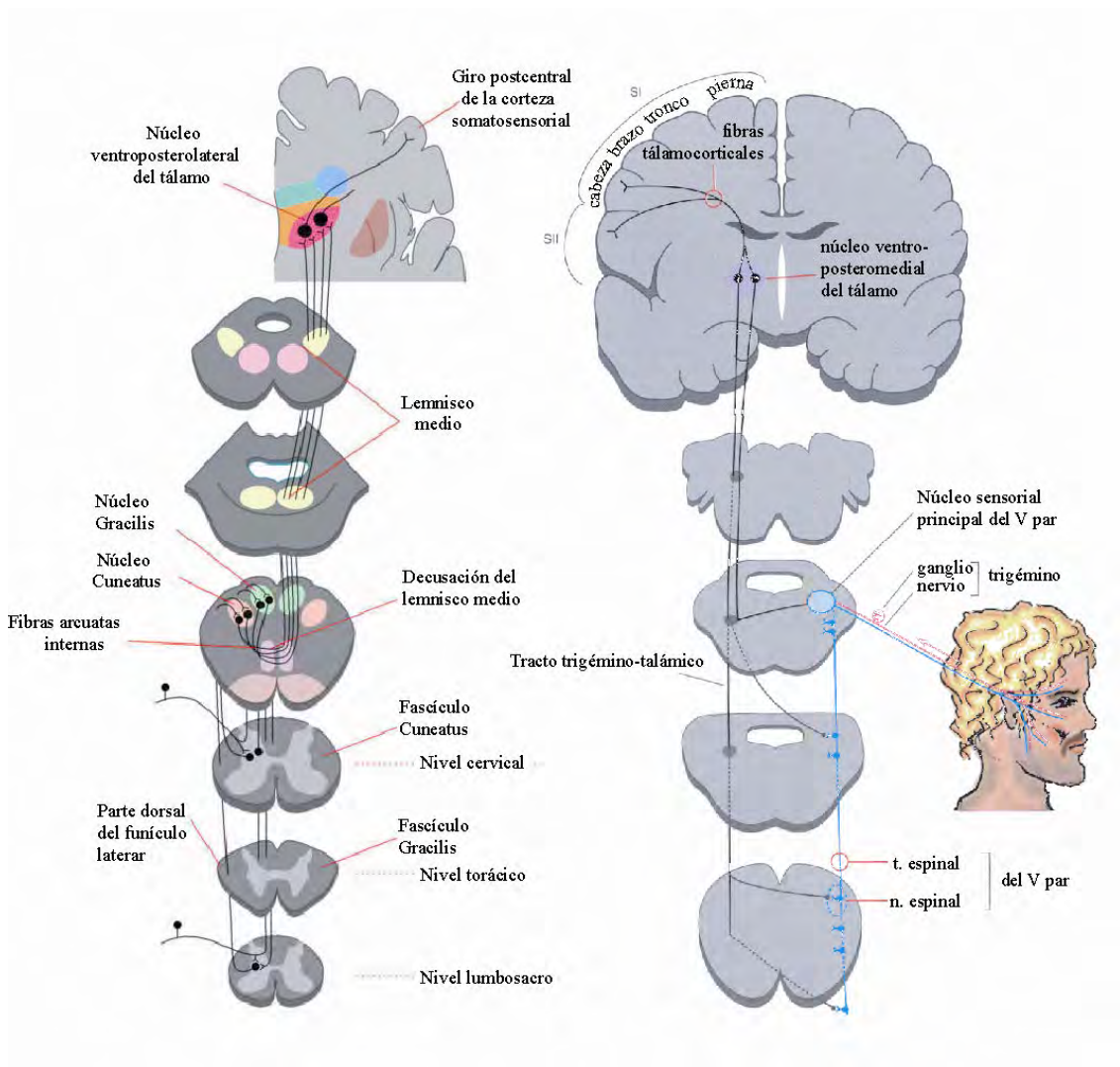


Figura 7. Esquema que ilustra la vía ascendente somatosensorial (izquierda) que sigue la información recibida de los receptores localizados en la piel proveniente del tronco y extremidades, y la vía

ascendente (derecha) que proyecta la información táctil de la cara a la corteza somatosensorial. Modificado de Stewart y cols., 2003.

Para el caso de la información somatosensorial extero- y propioceptiva que concierne al tronco y a las extremidades, los procesos de las neuronas ganglionares que inervan estos segmentos corporales establecen contactos sinápticos con diversos núcleos de la médula espinal, dependiendo de la modalidad sensorial que transmiten (i.e., temperatura, presión, vibración y dolor). Las neuronas espinales, de acuerdo a su modalidad sensorial, envían sus axones ipsilateral o contralateralmente hacia los cordones anterior y dorsal, a través de los tractos nerviosos que ascienden hasta el tallo cerebral. A lo largo del tallo cerebral, existen diversos núcleos que sirven de relevos sinápticos a los tractos somatosensoriales provenientes de la médula espinal. Por ejemplo, para la vía que conduce información táctil generada en los mecanorreceptores, y que viaja ipsilateralmente por los tractos *gracilis* y *cuneatus* en los cordones posteriores, el relevo sináptico en el tallo cerebral son los núcleos homónimos.

Una vez transmitida e integrada la información en los núcleos del tallo cerebral, las neuronas correspondientes proyectan a núcleos talámicos dorsales; en el caso particular de la información táctil derivada de los mecanorreceptores del tronco y de las extremidades, el relevo talámico es el núcleo ventroposterolateral (VPL) responsable de procesar las distintas modalidades de información somatosensorial, para luego ser transmitida contralateralmente a través de un tercer relevo sináptico hacia las cortezas somatosensorial primaria y secundaria (Figura 7; Woolsey y Van der Loos., 1970; Jones, 1983; Killackey, 1990; Woolsey, 1990).

La información somatosensorial proveniente de la cara y parte del cuello es, en mayor grado, recibida y transferida desde la periferia hacia el tallo cerebral a través de las vías aferentes primarias de las neuronas localizadas en el ganglio del nervio trigémino. Las aferencias primarias hacen relevo sináptico en el complejo nuclear del nervio trigémino, el cual es un conjunto de cinco subnúcleos que se extienden a lo largo del tallo cerebral. Algunos de estos subnúcleos proyectan hacia el cerebelo, los núcleos ventrales y ventroposteromedial del tálamo, y al núcleo del nervio facial. El denominado núcleo principal del nervio trigémino, proyecta hacia el núcleo ventroposteromedial del tálamo desde donde, después de un relevo sináptico, la vía sigue en dirección a las cortezas somatosensorial primaria y secundaria (Woolsey y Van der Loos., 1970; Jones, 1983; Killackey, 1990; Woolsey, 1990) (Figura 8).

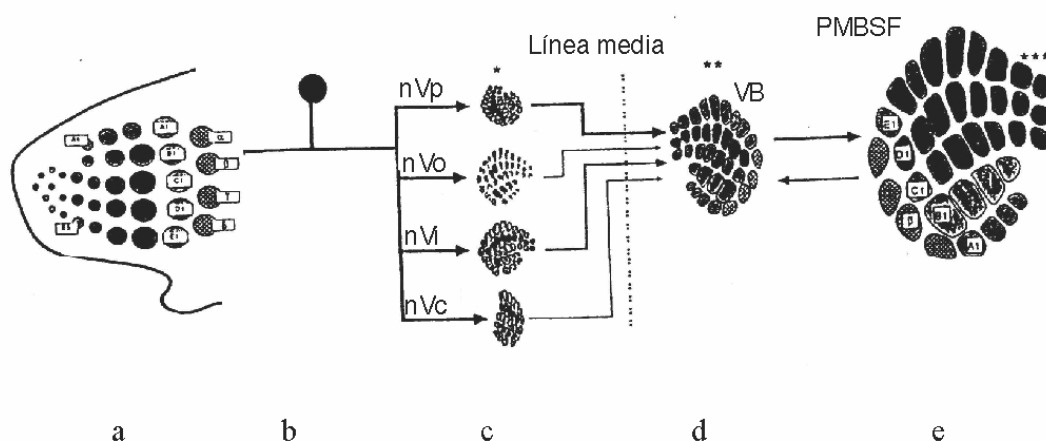


Figura 8. Vía del nervio trigémino que transmite la información generada a nivel de los bigotes (a) hacia la S1. Esta vía nace en las aferentes primarias sensoriales del ganglio del trigémino (b), y está constituida por tres relevos sinápticos. El primero es el núcleo del nervio trigémino en el tallo cerebral (c; nV). El segundo es el núcleo ventroposteromedial en el tálamo contralateral (d; VB). El tercer relevo está constituido por la corteza somatosensorial primaria (e; PMBSF). Esta vía se caracteriza por estar organizada en unidades citoarquitectónicas denominadas barreletas en el tallo cerebral, barreloides en el tálamo y barriles en la S1. Cada una de las unidades en los distintos relevos son la representación de

colecciones discretas de mecanorreceptores localizados en los folículos de los bigotes (compare a y e). Modificado de Woolsey, 1990.

3.5 Desarrollo del sistema somatosensorial

3.5.1 Establecimiento de la topografía

El establecimiento de la topografía de los planos anatómicos mayores (i.e., dorsomedial, ventrolateral y posteroanterior), y de las relaciones espaciales de los distintos grupos neuronales entre ellos y a lo largo de los relevos sinápticos de la vía somatosensorial en los roedores, ha sido estudiado más extensamente en la división cefálica de la vía. Como se mencionó con anterioridad, esta división se inicia con las aferencias primarias faciales del nervio trigémino que emergen del ganglio homónimo. De aquí, la vía proyecta secuencialmente al complejo del nervio trigémino en el tallo cerebral, al núcleo ventro-postero-medial (VPM) del tálamo y a la cxS1 (Figura 8; Woolsey y Van der Loos., 1970; Jones, 1983; Killackey, 1990; Woolsey, 1990).

El establecimiento de las relaciones topográficas a lo largo de la vía trigeminal ocurre con base a tres procesos interdependientes. El primero de estos procesos es el responsable de establecer las relaciones espaciales entre el ganglio del trigémino y el núcleo homónimo en el tallo cerebral. Esto ocurre alrededor del día 12 de gestación, y parece estar determinado por un fenómeno de fasciculación intrínseca de las aferencias primarias del nervio trigémino, asociado a la apoptosis de neuronas ganglionares. Así, existirán fascículos destinados a las regiones dorsal, ventral, caudal y oral de la cara. Esta organización primaria es “impuesta” sobre la estructura de los núcleos del nervio trigémino en el tallo cerebral cuando las aferencias primarias arriban a él, al mismo tiempo las vías aferentes primarias han alcanzado a las neuronas del núcleo del nervio trigémino

e induciendo cierta organización en este relevo (edad gestacional 15), las neuronas de este último sitio empiezan a extender sus procesos hacia el núcleo VPM. Alrededor de la misma edad embrionaria, las neuronas talámicas también inician el crecimiento de procesos en dirección a la cx51. Una vez más, tanto las aferentes trigémino-talámicas, como las tálamo-corticales crecen ya fasciculadas.

En el caso de las primeras, su fasciculación refleja aquella observada en las aferencias primarias. Para las segundas, la fasciculación refleja la organización intrínseca del tálamo en sus planos dorsomedial, ventrolateral y posteroanterior.

Esta organización será más tarde impuesta sobre la estructura de la corteza cerebral, y se refleja en ella como un gradiente de desarrollo que sigue estrictamente los planos de diferenciación celular. Una vez conectados todos los relevos, y con base en los mecanismos celulares de adhesión, las topografías de las aferencias trigémino-talámicas y tálamo-corticales finalmente coinciden (Woolsey y Van der Loos., 1970; Jones, 1983; Killackey, 1990; Woolsey, 1990).

4. HIPÓTESIS

Las alteraciones serotoninérgicas inducidas por DIU en ratas producen retardo en la llegada de las fibras tálamo-corticales, disminución en la expresión de la proteína transportadora de 5-HT y del receptor 5-HT_{1B} en la formación del barril de la capa IV en la corteza somatosensorial, durante la primera semana de vida posnatal.

5. OBJETIVO GENERAL

Determinar que la DIU en ratas produce retardo en la llegada de las fibras tálamo-corticales, disminución de la expresión de la proteína transportadora de 5-HT y del receptor 5-HT_{1B} en la capa IV de la corteza somato-sensorial primaria,

como mecanismos que expliquen el retraso de la formación de los barriles corticales.

5.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Determinar el arribo de las fibras tálamo-corticales en ratas controles y con DIU durante la primera semana de vida extrauterina, mediante técnicas de marcaje fluorescente.
2. Determinar el grosor de la cxS1 en los cortes coronales de ratas controles y con DIU teñidos con Nissl utilizados para localizar el sitio de inyección del marcador fluorescente.
3. Cuantificar la expresión del transportador de serotonina en ratas controles y con DIU durante la primera semana de vida, a través de anticuerpos específicos, utilizando técnicas de inmunohistoquímica y densitometría óptica.

Cuantificar la expresión de los receptores 5-HT_{1B} en ratas controles y con DIU durante la primera semana de vida, a través de anticuerpos específicos, utilizando técnicas de inmunohistoquímica y densitometría óptica.

3.6 JUSTIFICACIÓN Y PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En estudios previos se ha mostrado que ratas sometidas a desnutrición¹ durante etapas fetales tienen elevada de la síntesis de 5-HT cerebral, que continua durante la lactancia y la edad adulta. Esta elevación es precedida de un aumento en la concentración de L-Trp y de la actividad de Tph, que a su vez está ocasionada por la elevación de la fracción libre de L-Trp plasmático, aminoácido esencial precursor de la síntesis de 5-HT cerebral (Manjarrez y cols., 1988, 1988^a, 1988^b, 1992 y 2003). Este incremento de 5-HT, también se ha observado en la cxS1 acompañado de un retardo de dos días en la aparición de los barriles en comparación a los animales normales. Es interesante resaltar que los barriles no reaparecen al disminuir la concentración de 5-HT mediante la administración de PCPA (Gutierrez-Ospina y cols., 2002).

Todos estos hallazgos sugerirían que 5-HT juega un papel mínimo en establecimiento de la topografía y somatotopía de los barriles, pero no descarta su papel biológico en la especificación de la cxS1 y retraso en el tiempo de arribo de las fibras talámicas, probablemente debido a una disminución en la expresión del receptor 5-HT_{1B} y SERT durante el periodo de la formación de los barriles en la capa IV de la cxS1.

¹ La desnutrición es definida como la condición patológica derivada de la subutilización de los nutrientes esenciales en las células del organismo.

6. MATERIAL Y MÉTODOS

6.1 ANIMALES

Este proyecto se realizó en el Laboratorio de Patología Molecular de la Unidad de Investigación Biomolecular en Cardiología del Hospital de Cardiología, Centro Médico Nacional, Siglo XXI, del Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS), Laboratorio de Biología Integrativa, Departamento de Biología Celular y Fisiología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México y Laboratorio de Neurontogenia experimental, Departamento de Fisiología, Biofísica y Neurociencias, Centro de Investigación y Estudios Avanzados (CINVESTAV), Instituto Politécnico Nacional. Este proyecto fue aprobado por la Comisión Nacional de Investigación Científica del IMSS, los comités de investigación del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM y del CINVESTAV conforme a las normas de uso y cuidado de los animales de experimentación, publicado en National Institute of Health (USA). El estudio se llevó a cabo en un modelo experimental de DIU en rata.

Se utilizaron ratas de la cepa Wistar, hembras nulíparas, con peso corporal promedio de 250 ± 10 g. Durante dos semanas se adaptaron a las siguientes condiciones ambientales: temperatura de $22 \pm 2^\circ$ C, con ciclos de luz-oscuridad 12/12 h, humedad atmosférica entre 50 y 60%, con mínima manipulación.

Durante este período se mantuvieron con agua y alimento *ad-libitum*. El alimento utilizado fue Lab Diet SP 14, cuya composición es a base de 23% de proteínas, 49% de carbohidratos, 4.5% de grasa, 6% de fibra y 8% de cenizas, levadura de caraccoria, vitaminas y minerales (lisina, tiamina, alfa-tocoferol, calcio, sulfato ferroso manganeso, entre otros micro nutrimentos).

Al término del período de adaptación, las ratas se dividieron en dos grupos: el grupo control (C) y el grupo experimental con desnutrición (D), a este grupo se le proporcionó el 50% del alimento que consumió el grupo C en 24 h.

Este esquema de alimentación se mantuvo durante dos semanas y al término de este período las ratas de ambos grupos se aparearon con machos alimentados normalmente. Durante la gestación de ambos grupos C y D, se mantuvieron bajo las mismas condiciones descritas.

Al nacimiento, las crías de cada grupo D y C se mezclaron entre sí y se redistribuyeron al azar a diferentes madres del mismo grupo, formándose camadas de 8 crías para disminuir las diferencias individuales y entre las camadas. Se utilizaron las edades de uno, tres, cinco, siete, nueve y 11 días posnatales. El criterio de DIU que se utilizó fue una déficit mayor del 10% de peso corporal en relación a las crías controles en cada una de las edades utilizadas. El tamaño de la muestra se calculó mediante la fórmula $N = [(1/q_1 + 1/q_2) S^2 (Z\alpha + Z\beta)^2] \div E^2$. Con un valor $\alpha = 0.05$ y $\beta = 0.10$, por este método fueron incluidos seis animales por experimento para cada una de las edades de cada uno de los grupos. La obtención del tejido nervioso siempre se realizó entre las 9:00 y 11:00 h, a 4 °C. El manejo de los animales de experimentación se hizo en el bioterio del CINVESTAV, IPN, bajo las normas sanitarias y de ética vigentes.

6.2 ENSAYOS BIOQUÍMICOS E INMUNOHISTOLÓGICOS

1. Determinación de las coordenadas para la ubicación del núcleo VPM del tálamo en las ratas C y D de uno, tres, cinco y siete días de edad posnatal.

Esta evaluación se realizó en cortes coronales del cerebro teñidos con la técnica de Nissl.

2. Determinación del arribo de las aferencias tálamo-corticales mediante marcaje fluorescente con DiA [4-(4-(dilinoleylamino)styryl)-N-methylpyridinium-4-chlorobenzenesulfoname); Molecular probes], el cual se inyectó en el núcleo VPM del tálamo en ratas C y con DIU de uno, tres, cinco y siete días (Liu y cols., 1995).
3. Determinación de la proteína transportadora de serotonina (SERT) y de receptor 5-HT_{1B} por inmunohistoquímica en ratas C y con DIU de tres y siete días (Sur y Cowey. 1996, Hery y cols. 1999).
4. Determinación de la concentración de L-Trp y 5-HT en la cxS1 a través de cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) en crías C y con DIU de uno, tres, cinco, siete, nueve y 11 días respectivamente (Peat y Gibb., 1983).

6.2.1 Técnica de Nissl

Se utilizaron cuatro animales C y con DIU a las edades uno, tres, cinco y siete días, los cuales fueron anestesiados con pentobarbital sódico 40 mg/kg de peso corporal, perfundidos por vía intracardiaca con solución salina al 0.9% y paraformaldehído (PFA; Sigma) al 4% en amortiguador de fosfatos (PB) 0.1 M. Los cerebros fueron extraídos del cráneo e incluidos en agarosa al 3% para ser cortados con un vibratomo. Se obtuvieron cortes seriados de 200 μ m de todo el cerebro, los cortes fueron montados en estricto orden en portaobjetos previamente gelatinizados. Cuando los cortes montados estuvieron bien adheridos al portaobjeto se tiñeron con violeta de cresilo mediante la técnica de

Nissl. Las laminillas fueron lavadas con una solución de formol 10% y alcohol etílico 100% volumen a volumen (v-v), se continuó con alcoholes graduales (Merck) del 100, 95, 80 y 70% durante un minuto en cada concentración de alcohol etílico. Después se lavaron los cortes, un minuto con agua corriente y posteriormente se tiñeron con una solución de violeta de cresilo (Sigma) al 1% durante cinco minutos, en seguida los cortes se lavaron con agua corriente y se continuó la deshidratación con alcoholes graduales del 70, 80 y 95%, a éste último se le agrego de 250-500 μ l de ácido acético glacial (Merck) y finalmente se utilizó alcohol etílico al 100% durante un minuto. Se usó Xilol (Merck) para aclarar el tejido y los cortes fueron sellados con cyto seal 60 (Stephens Scientific).

6.2.2 Marcaje de la vía tálamo-cortical

Para obtener imágenes de la vía tálamo-cortical marcada, se necesitó la ubicación exacta del núcleo VPM del tálamo, en donde se inyectó el marcador DiA. Obtenidas las coordenadas del núcleo VPM mediante la técnica de Nissl, las crías a las edades uno, tres, cinco y siete días, controles y con DIU fueron perfundidas vía intracardíaca con solución salina 0.9% y después con una solución de PFA al 4% en PB 0.1 M pH 7.40. A continuación, los animales fueron decapitados, las cabezas se posfijaron en PFA al 4% por 10 días a 4 °C. Posterior a la posfijación, las cabezas fueron montadas en un esterotáxico, esto permitió ubicar exactamente las coordenadas de los núcleos VPM del tálamo para administrar 0.5 μ l de una solución de DiA al 2.5% disuelto en etanol al 100%. Una vez que se efectuaron las inyecciones, los cerebros fueron extraídos del cráneo y posfijados en PFA al 4% durante una semana a 37°C y una semana

a temperatura ambiente. Posteriormente, se obtuvieron cortes coronales de 150 μm con un vibratomo, se montaron con Vectashield medio de montaje para fluorescencia (Vector). El arribo de los axones talámicos a la capa IV de la cxS1 fue evaluado mediante microscopía de fluorescencia.

6.2.3 Inmunohistoquímica

Ratas de las edades tres y siete días posnatales, controles y con DIU fueron perfundidas por vía intracardíaca con solución salina al 0.9 % seguida por una solución de PFA al 4% en PB 0.1 M, pH 7.40. Los cerebros fueron extraídos y posfijados con la misma solución adicionada con sacarosa al 20% hasta que los cerebros tocaron el fondo del frasco (12 a 18 hrs, según la edad de la cría). Al día siguiente los tejidos fueron bloqueados sobre una placa de acrílico con una inclinación de 10° y seccionados a 45° con relación a la línea media del cerebro y por detrás del hipocampo, con el fin de obtener cortes coronales oblicuos con la vía tálamo-cortical completa. Se congelaron los bloques de tejido con 2-metilbutano (Sigma), previamente enfriado en hielo seco. De los bloques de tejido se obtuvieron cortes coronales oblicuos de 30 μm de grosor en un criostato. Dichos cortes fueron colectados en pozos que contenían PB 0.1 M. Después se les bloqueó la peroxidasa endógena con peróxido de hidrógeno (Merck) al 3% durante 15 min. En seguida los cortes fueron lavados 3 veces, cada uno de los lavados duró 10 min, en agitación constante, con una solución de PBS 0.1 M, con tritón X-100 al 0.3% y suero de caballo al 3% para bloquear las proteínas inespecíficas durante 6 hrs, a temperatura ambiente y en agitación constante. Los cortes fueron incubados con anticuerpos primarios específicos

contra SERT y 5-HT_{1B} (Chemicon, INC) diluidos 1:700 y 1:500 respectivamente en PBS 0.1 M, tritón X-100 al 0.3% y Suero de caballo al 3% durante 18 hrs a 4 °C en agitación constante. Después se lavaron los cortes 3 veces, cada uno durante 10 min, con la misma solución y fueron incubados con el anticuerpo secundario anti-cobayo diluido 1:700 (Chemicon, INC) en PBS 0.1 M y tritón X-100 al 0.3% durante 3 horas a temperatura ambiente y en agitación constante. Los cortes fueron lavados 3 veces durante 10 min, con PBS 0.1 M y tritón X-100 al 0.3% y posteriormente se incubaron con el complejo avidina 0.25% - biotina 0.3% (Kit AB Vector) durante 1.5 hrs, a temperatura ambiente y en agitación constante. Después se lavaron 3 veces durante 10 min con PBS 0.1 M y finalmente la ubicación de las proteínas fue revelada con el Kit DAB (Vector) por 4 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad. Los diferentes cortes seleccionados fueron montados sobre laminillas previamente gelatinizadas y selladas con cyto seal 60 (Stephens Scientific).

Con el objeto de evaluar los cambios de la expresión de la proteína transportadora de 5-HT y del receptor 5-HT_{1B} en controles y con desnutrición intrauterina, se midió la densidad de la marca en el interior de los barriles. Se capturaron y digitalizaron las imágenes de los barriles de la cxS1 y zonas interbarril, regiones que sirvieron como controles internos. En las imágenes se determinó la transmitancia de cada uno de los barriles y zonas interbarril por cada corte. El análisis de las imágenes se realizó con el programa "Image J" y para estandarizar la densidad se utilizó la escala de grises universal para fotografía de Kodak. Una vez obtenida la estandarización del programa, se contrastaron los valores de transmitancia promedio de los barriles de la cxS1 con

zonas interbarril. Los resultados para cada grupo fueron presentados como las diferencias entre la cxS1 y zonas interbarril para cada grupo y condición.

6.2.4 Grosor de la corteza somatosensorial

Se utilizaron los cortes teñidos con Nissl para evaluar el grosor de la cxS1 por edad para cada uno de los grupos, C y con DIU, mediante el programa “Image J” previamente calibrado. Se trazaron líneas en los cortes desde la capa I hasta la parte más profunda de la capa VI en la región del subcampo de los barriles postero-medial de la cxS1. Este subcampo corresponde a la representación somatosensorial de los bigotes en la cara de la rata. Se hicieron dos mediciones en cada corte en cada uno de los hemisferios en cuatro crías de cada uno de los grupos del estudio.

6.2.5 Determinación de la concentración de 5-HT

La 5-HT en la cxS1 fue determinada por cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) de acuerdo al método de Peat y Gibb., (1983). La cxS1 fue desproteinizada con una solución de HClO₄ 0.1 N, más metabisulfito de sodio 4 mM en una relación 1:3 peso/volumen (p/v), fue homogeneizada en un homogeneizador Glas Col Instruments, a una velocidad de 1,000 rpm durante 10 segundos. A continuación se centrifugó a 10,000 rpm durante 15 minutos a 4°C; después el sobrenadante fue separado y filtrado en una membrana de nylon de 0.45 µm de tamaño de poro. Posteriormente, 20 µl del filtrado fueron inyectados al HPLC (Waters corporation), utilizando una columna de simetría C₁₈ de fase reversa de 5 µm de tamaño de partícula, 3.9 x 150 mm de longitud

(Waters corporation). Se usó un sistema binario de una solución de fosfato de potasio monobásico 2 mM, pH 3.50 más ácido heptanosulfónico 1 g/L de solución y una mezcla de metanol/agua en una relación de 3:2 v/v, a razón de un mililitro por minuto. La determinación de la 5-HT se realizó mediante un detector fluorométrico (Waters Modelo 474), con una excitación de 290 nm y 330 nm de emisión. La respuesta fue obtenida mediante un sistema análogo Milenium 32 y la concentración fue considerada como la altura máxima de la señal, de acuerdo a una curva estándar de cantidades conocidas de 5-HT y fue expresada en ng/g de tejido fresco.

6.2.6 Determinación de la concentración de L-Trp

Las cxS1 fueron pesadas y homogeneizadas en HClO₄ 0.1 M y metabisulfito de sodio 4 mM en una relación 1:3 p/v, con un homogeneizador Thomas de émbolo de teflón de 10 mm de diámetro, a una velocidad de 1500 rpm en un rotor Glas-COL (Therre Haute, USA) durante un minuto. El homogeneizado fue centrifugado a 15 000 g durante 15 min a temperatura ambiente, el sobrenadante fue filtrado en una membrana de nylon de 0.4 μm de diámetro de poro. Veinte μl del sobrenadante fueron inyectados al HPLC. Se utilizó el mismo sistema de elusión y las mismas condiciones descritas para la determinación de 5-HT. La respuesta fue cuantificada por un sistema análogo Millenium 32 descrito previamente. La concentración del aminoácido fue determinada a través de los picos máximos de las señales expresadas en mV y correlacionados a una curva estándar de concentraciones conocidas de L-Trp. Las cantidades de L-Trp se expresaron en μg/g de tejido fresco.

6.3 MANEJO ESTADÍSTICO

Se formaron bases de datos, se hicieron cuadros de salida en cada una de las mediciones de los diferentes grupos del estudio. Se obtuvieron los promedios, las desviaciones estándar y un nivel de significación de $p < 0.05$ para la comparación entre los grupos a las diferentes edades del estudio a través de las pruebas de t de Student para evaluar el peso corporal de las crías, el grosor de la corteza y las concentraciones de L-Trp y 5-HT. U de Mann Whitney para evaluar la expresión de SERT y 5-HT_{1B} y ANOVA de dos vías para evaluar el peso corporal de las ratas gestantes.

7. RESULTADOS

7.1 Pesos corporales

En la figura 9 se muestra el peso corporal de las ratas hembra durante las etapas pregestacional, gestacional y en la lactancia. Al inicio de la etapa pregestacional no se observó diferencia significativa entre ambos grupos control y con desnutrición. Posteriormente, las ratas sometidas a desnutrición tuvieron disminución significativa ($p < 0.001$) del peso corporal desde la etapa pregestacional. El déficit de peso fue de 17 % antes de la gestación, 29 % durante la gestación y 28 % durante la lactancia en relación con las ratas controles (ANOVA de 2 vías, edad/condición nutricional, $F=15.6$, $F_n=4$, $DF_d=60$). El peso corporal de las crías controles y con DIU se muestran en la figura 10. Como se puede observar el patrón que mostró el grupo C fue ascendente desde el nacimiento hasta los 11 días de vida posnatal. Además, en la misma figura se ilustra el patrón del grupo con DIU. Aunque el patrón fue similar al mostrado por el grupo C, los valores del peso corporal en los animales del grupo con DIU siempre fueron significativamente más bajos ($p < 0.001$; prueba “*t* de Student”).

Peso corporal de ratas hembra durante las etapas pregestacional, gestacional y en la lactancia

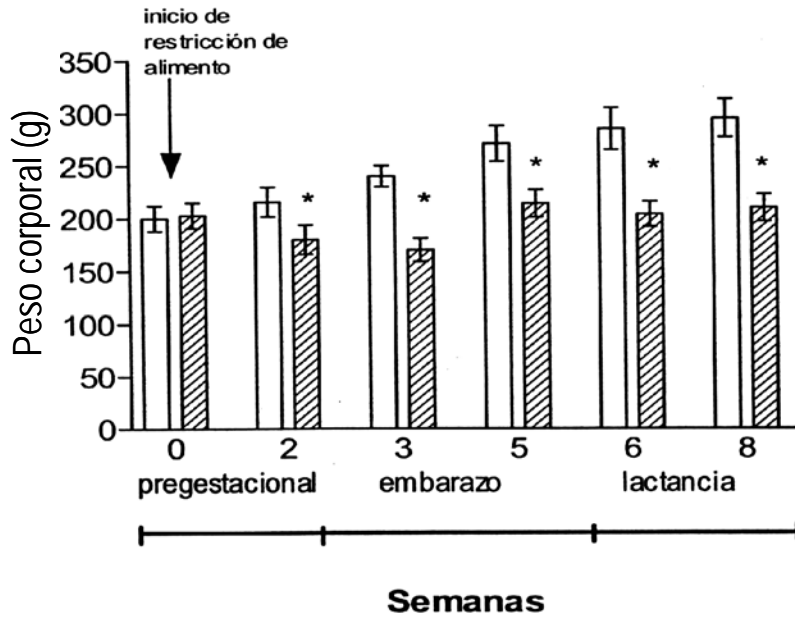


Figura 9. Pesos corporales de ratas madres controles (barras blancas) y desnutridas (barras rayadas) a lo largo del estudio. Valores promedio \pm DE de 50 animales. $F= 15.6$, $F_n=4$, $DF_d= 60$ ANOVA y t de Student, * $p < 0.001$.

Peso corporal de las crías controles y con desnutrición intrauterina

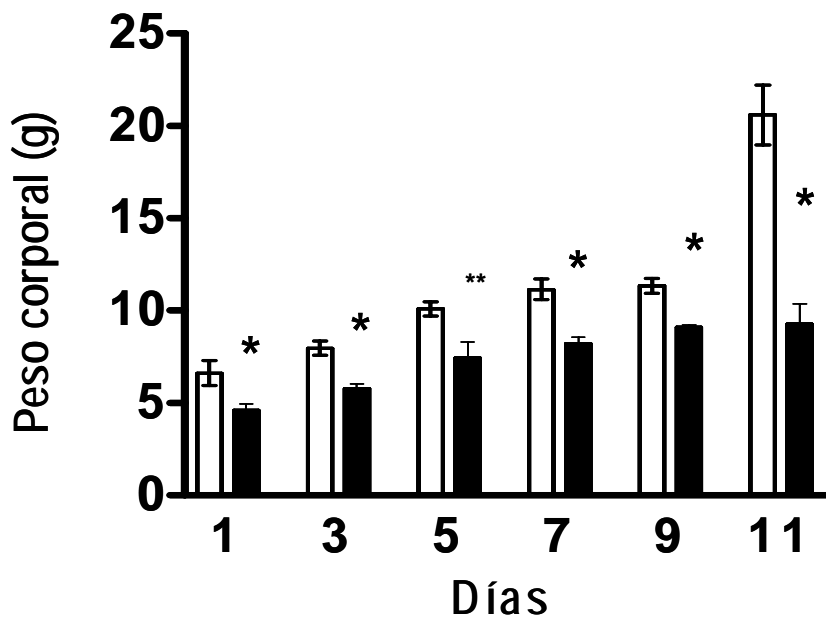


Figura 10. Ganancia de peso corporal de las crías durante el desarrollo. Cada columna representa el valor promedio de 32 animales \pm DE por grupo. Controles (barras blancas) y con desnutrición intrauterina

(barras negras). Las diferencias entre los grupos fueron determinadas por la prueba *t* de Student. ** $p < 0.05$; * $p < 0.001$.

7.2 Grosor de la cxS1

El grosor de la cxS1 en ambos grupos de crías se presenta en la figura 11. El grupo C tuvo un patrón de crecimiento progresivo desde el nacimiento hasta los nueve días. De igual manera el grupo con DIU incrementó el grosor de la cxS1 durante este periodo, sin embargo, estas crías mostraron un déficit significativo desde el nacimiento hasta los cinco días de vida extrauterina en comparación con el grupo C ($p < 0.05$; prueba “*t* de Student”). Después no se observaron diferencias significativas entre ambos grupos.

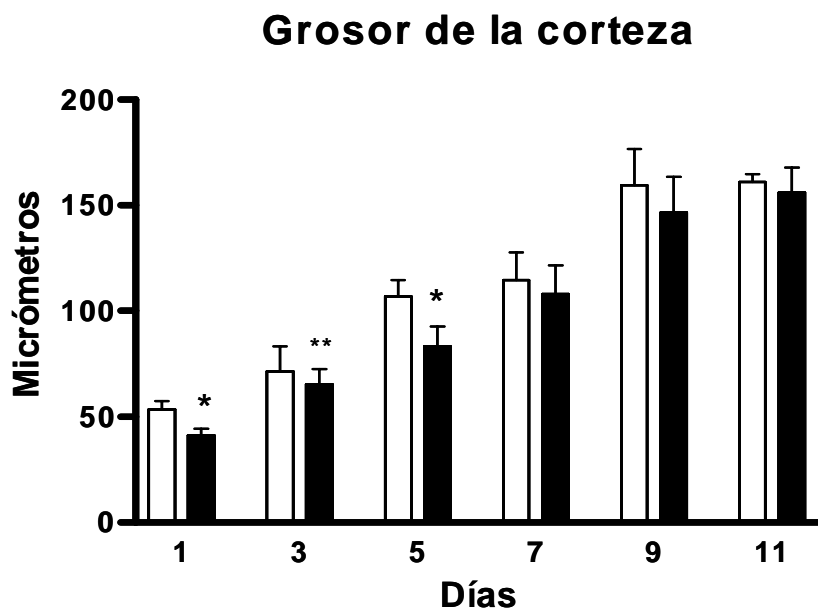


Figura 11. Grosor de la cxS1 en ratas de uno hasta los 11 días posnatales. Cada columna representa el valor promedio de 25 mediciones \pm DE por edad. Controles (barras blancas) y con desnutrición intrauterina (barras negras). Las diferencias entre los grupos fueron determinadas por la prueba *t* de Student. ** $p < 0.05$; * $p < 0.001$.

7.3 Concentración de L-Trp

La figura 12 muestra la concentración de L-Trp en la cxS1 en crías controles y con DIU. Como se puede observar, las concentraciones de L-Trp en los

animales controles disminuyen gradualmente desde el nacimiento y hasta el día nueve de vida posnatal. Un patrón semejante se observa en las crías con DIU. No obstante, las concentraciones de L-Trp fueron significativamente ($p < 0.001$) más altas en éste grupo de animales, en todos los días analizados (prueba “*t* de Student”).

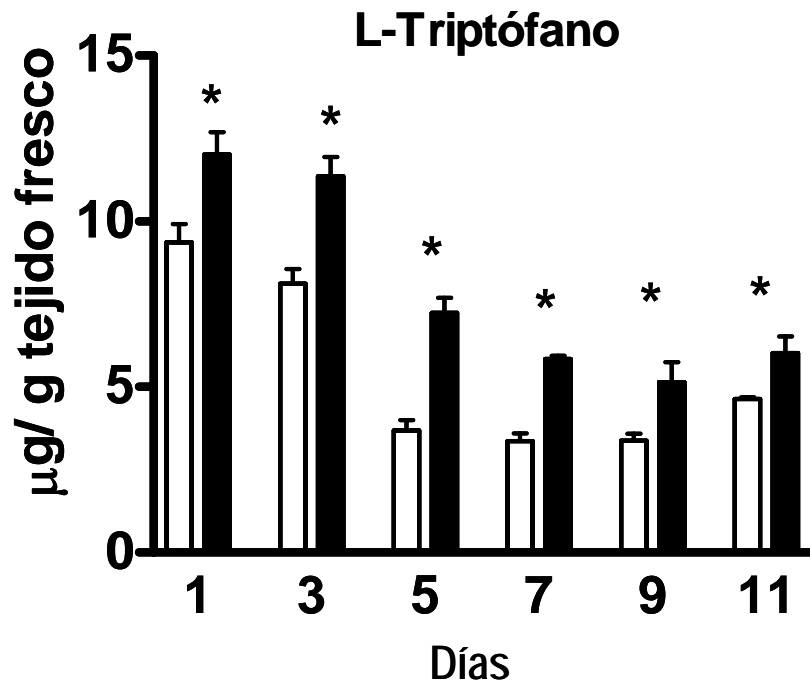


Figura 12. Concentración de L-triptófano en la cxS1 de animales controles (barras blancas) y sometidos a desnutrición intrauterina (barras negras). Cada columna representa el valor promedio \pm DE de seis experimentos efectuados por duplicado. Las diferencias fueron determinadas por la prueba *t* de Student. * $p < 0.001$.

7.4 Concentración de 5-HT

La concentración de 5-HT expresada en nanogramos por gramo de tejido húmedo en la cxS1 en animales C y con DIU se ilustran en la figura 13. Se observa que el grupo C presentó un aumento gradual del neurotransmisor desde el nacimiento y hasta los 11 días de edad posnatal. El grupo con DIU también mostró un patrón similar en el incremento gradual de la concentración de 5-HT

sin embargo, la concentración de 5-HT fue significativamente más alta en comparación a las crías normales en todas las edades estudiadas ($p < 0.001$).

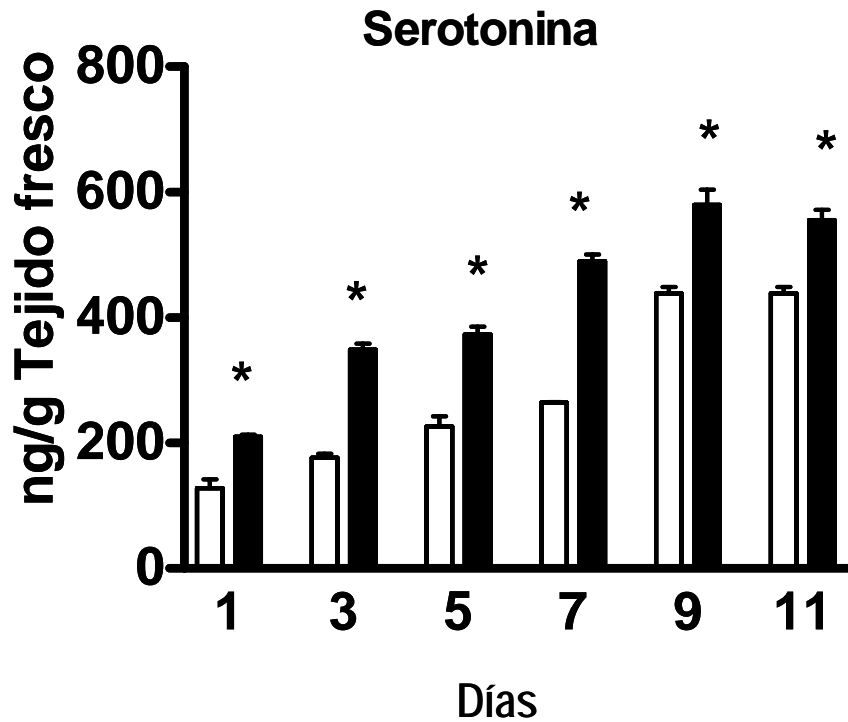


Figura 13. Concentración de serotonina en la cxS1 de animales controles (barras blancas) y sometidos a desnutrición intrauterina (barras negras). Cada columna representa el valor promedio \pm DE de seis experimentos efectuados por duplicado. Las diferencias fueron determinadas por la prueba *t* de Student. * $p < 0.001$.

7.5 Marcaje de los axones tálamo-corticales

En la Figura 14 se muestra los axones tálamo-corticales marcados con DiA en los días uno, tres, cinco y siete posnatales en ambas condiciones C y con DIU. Los axones talámicos en los animales C alcanzaron la corteza al nacimiento; observándose el mismo patrón de llegada de las fibras en las crías con DIU. Después, estos axones se segregaron en columnas a partir de los 3 días de edad en ambos grupos y a partir del quinto día de vida posnatal, se pudo observar claramente el componente citoarquitectónico tálamico.

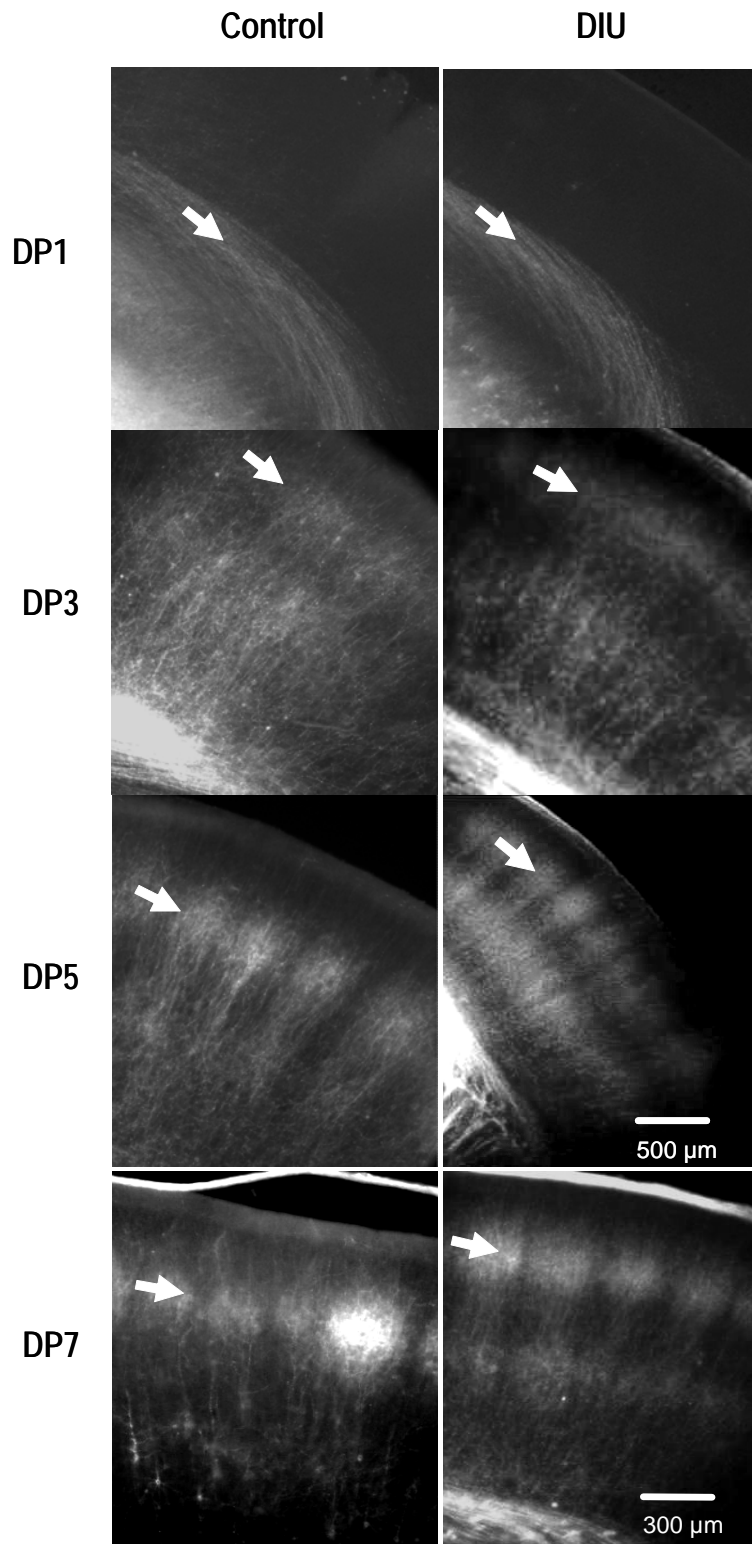


Figura 14. Fotomicrografías que muestran cortes coronales de la capa IV de la cxS1. Las flechas señalan el grupo de axones tálamo-corticales marcados con DiA en ratas controles y con DIU a las edades de uno, 3, 5 y 7 días. Note la similitud de los patrones de desarrollo axonal presentados en ambos grupos de animales. Escala DP1-DP5 = 500 μm y DP7 = 300 μm .

7.6 Inmunorreactividad de SERT

Las crías C mostraron aumento de la marca entre los días tres y siete posnatales. Las crías con DIU mostraron disminución significativa ($p < 0.05$) de la inmunorreactividad del SERT al compararlas con las crías C durante el período estudiado (prueba “U de Mann Whitney”, figura 15).

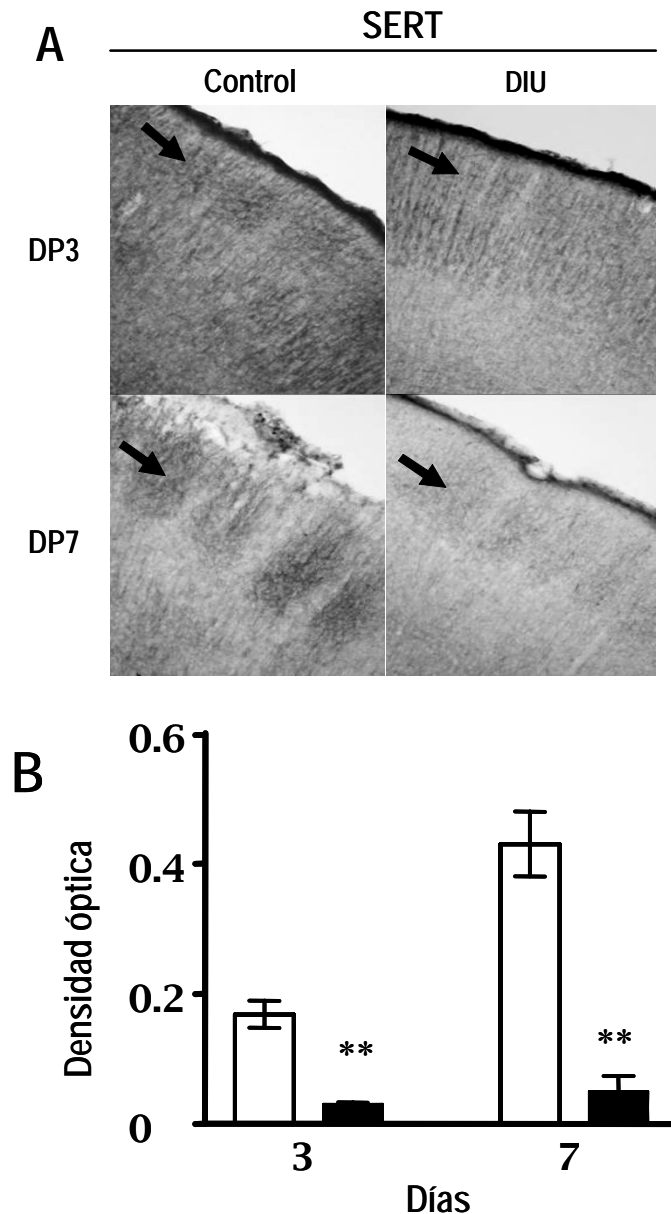


Figura 15. A) Fotomicrografías de secciones coronales de la capa IV de S1 durante el desarrollo. Las flechas muestran las aferentes tálamo-corticales inmunorreactivas al SERT. B) Gráfica que ilustra la densidad óptica de SERT a las edades de 3 y 7 días posnatales. Cada columna representa los valores promedio de 20 imágenes por animal de 6 animales \pm DE. Columnas blancas representan el grupo control; las columnas negras corresponden al grupo con DIU. Las diferencias fueron determinadas por la prueba U de Mann Whitney. ** $p < 0.05$.

7.7 Inmunorreactividad de 5-HT_{1B}

En la figura 16 se muestra el patrón de expresión de la inmunoreactividad del receptor 5-HT_{1B}, en ambas condiciones C y con DIU a los tres y siete días de edad posnatal, donde se puede observar un aumento no significativo a los tres días posparto en los animales con DIU y una disminución significativa de la inmunoreactividad a los siete días de edad en relación a las crías normales ($p < 0.05$).

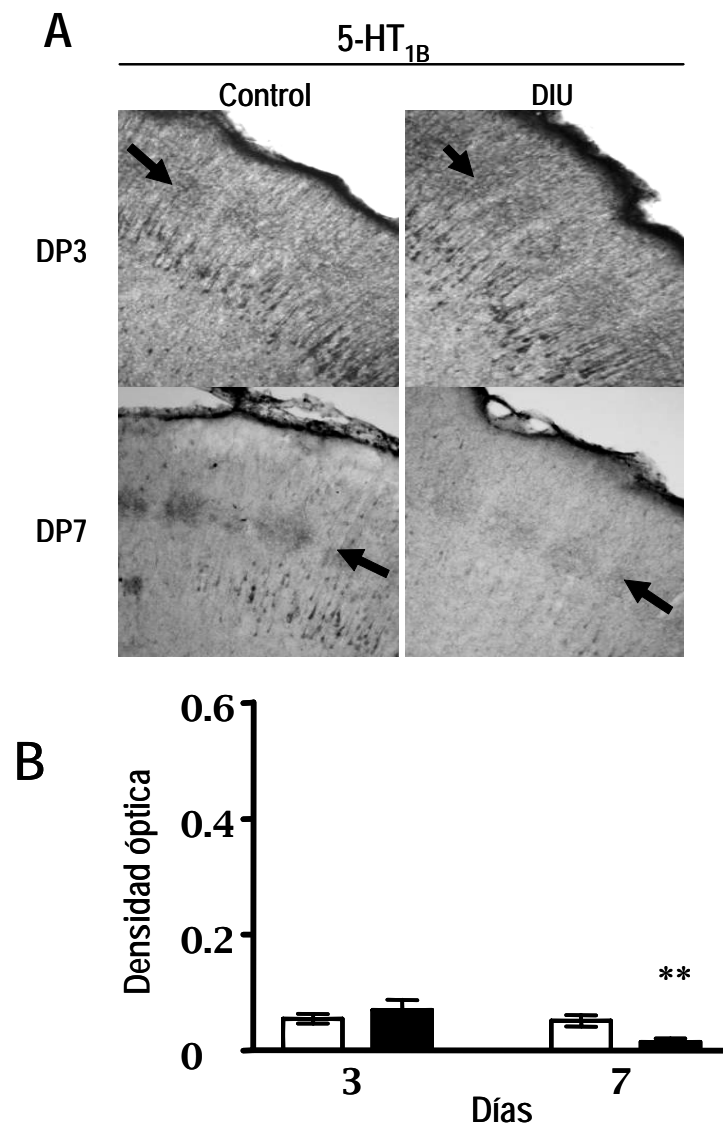


Figura 16. A) Fotomicrografías de secciones coronales de la capa IV de la S1 durante el desarrollo. Las flechas muestran la inmunoreactividad a 5-HT_{1B} en los barriles. B) Gráfica que ilustra la densidad óptica de 5-HT_{1B} a las edades de 3 y 7 días posnatales. Cada columna representa los valores promedio de 20 imágenes por animal \pm DE. Las columnas blancas representan el grupo control; las columnas negras corresponden al grupo con DIU. Las diferencias entre los grupos fueron determinadas con la prueba U de Mann Whitney. ** $p < 0.05$.

8. DISCUSIÓN

Existe evidencia experimental que sustenta que la buena nutrición en la madre, antes de la gestación, durante el embarazo y en la lactancia, es uno de los principales factores que participan en el crecimiento y desarrollo temprano del individuo. Además, durante la gestación debe de existir una apropiada integración de factores maternos y fetales. Cuando estos elementos no se logran, se produce la DIU (Levitsky, 1975; Manjarrez y cols., 1988, 1988^a, 1988^b, 1992; Morgane y cols, 1993 y 2002). Los hallazgos obtenidos en el presente trabajo muestran que las ratas hembras sometidas a un régimen de restricción de alimento del 50% de lo que comieron las ratas controles, tuvieron un déficit significativa del peso corporal antes de la gestación, durante el embarazo y en la lactancia. Estos datos sugieren que la buena alimentación en la madre, es un factor primordial que permite al feto tener los nutrimentos necesarios para un adecuado crecimiento y desarrollo durante la vida fetal y en la lactancia (Levitsky, 1975; Manjarrez y col., 1988, 1988^a, 1988^b, 1992; Morgane y cols, 1993 y 2002).

Por otro lado, los resultados de las diferentes medidas somatométricas realizadas a las crías en este estudio, confirman una vez más que la DIU genera un retraso del crecimiento físico. En casos extremos de desnutrición, existe un desequilibrio entre los diferentes mecanismos homeostáticos que regulan el crecimiento fetal y posnatal (Manjarrez y cols., 1988, 1988^a, 1988^b, 1992; Morgane y cols, 1993 y 2002). Asimismo, se confirma que las medidas somatométricas se afectan más que las cerebrales, esto sugiere que el cerebro posee mecanismos que lo protegen de eventualidades nutrimentales y/o

metabólicas. El hallazgo referido, es similar a lo observado en neonatos humanos desnutridos. En éstos, al reanudar el crecimiento producto de la mejora nutricional desde la etapa neonatal se corrigen los incrementos diarios de peso y talla con relación a la edad ósea (D´Amato y cols., 1987; Rubenstein, 1998).

Además de los cambios en el crecimiento físico, la DIU es capaz de producir alteraciones metabólicas más específicas. Uno de estos cambios es el que se ha mostrado para el sistema serotoninérgico cerebral, ya que desde la etapa fetal existe un aumento de la síntesis de la 5-HT, precedida de un aumento de la concentración de L-Trp tisular. Esto a su vez es un efecto secundario a un aumento de la fracción libre (FL) del L-Trp plasmático. La FL del L-Trp ingresa al cerebro a través de la BHE y una vez captado por las neuronas serotoninérgicas estimula la síntesis de 5-HT (revisado en Manjarrez y cols., 1988, 1988^a, 1988^b, 1992, 2003). En estos animales desnutridos se ha observado una elevación crónica del L-Trp cerebral, además un aumento de la afinidad de la Tph 2 por el L-Trp y una mayor actividad de la enzima por mecanismos de fosforilación en donde interviene el AMPc, el IP₃, el diacilglicerol y la proteína cinasa II Ca²⁺/calmodulina dependiente, (Manjarrez y cols., 1988, 1988^a, 1988^b, 1992, 2003).

Los resultados de este trabajo confirman una vez más que las crías con DIU tienen una elevación de la concentración de 5-HT en la cxS1, desde el nacimiento hasta los 11 días de edad posnatal (Gutierrez-Ospina y cols., 2002), período en el cual la serotonina juega un papel importante en la corticogénesis y sinaptogénesis, ya que cambios en la disponibilidad de serotonina, afectan el ensamblaje de los circuitos neuronales, el número de sinapsis y la

morfoarquitectura (Lauder, 1993; Levitt y Rakic., 1997; Persico y cols., 2000; Laurent y cols., 2002). Estas alteraciones pueden ser la causa de algunas patologías neuropsiquiátricas que se presentan a lo largo de la vida en los humanos, como son el autismo, la depresión, la mioclonía, las convulsiones, la hiperactividad en los niños y algunos tipos de retraso mental (Hoyer y cols., 1994; Hartig y cols., 1996; Siegel y cols., 2006).

Se ha mostrado que las neuronas serotoninérgicas del rafe rostral envían axones a partir del día 15 de la gestación que arriban al telencéfalo al día 17, ingresan al neopallium a través de dos grupos de fibras, uno superficial y el otro profundo (D´Amato y cols., 1987). Además existe otro grupo de fibras nerviosas procedentes del rafe medio y dorsal que llegan a la corteza cerebral después del nacimiento e inervan principalmente la capa IV de la cxS1 (D´Amato y cols., 1987). La capa IV de la cxS1 está formada por un conjunto de agrupaciones citoarquitectónicas conocidas como barriles, cada barril representa una vibrisa y está constituida por diferentes elementos histológicos, de los cuales las aferencias tálamo-corticales y las fibras nerviosas de las neuronas estelares espinosas forman una fracción importante (Woolsey y Van der Loos., 1970; Jones, 1983; Killackey, 1990; Woolsey, 1990). También se encuentran interneuronas y una estrecha relación de fibras nerviosas que interconectan ambos hemisferios cerebrales y una importante inervación serotoninérgica procedente de los núcleos del rafe rostral (Woolsey y Van der Loos., 1970; Jones, 1983; Killackey y cols., 1983; Killackey, 1990; Woolsey, 1990). Además durante las dos primeras semanas de vida extrauterina se ha observado que la vía tálamo-cortical somatosensorial, muestra inmunoreactividad a la 5-HT y la expresión de receptores 5-HT_{1B} (Blue y cols.,

1988; Leslie y cols., 1992; Manssour-Robaey y cols., 1998). También durante este período de formación de la cxS1 existe expresión de SERT (Manssour-Robaey y cols., 1998; Boylan y cols., 2000). Después de este período de desarrollo, las fibras serotoninérgicas transitorias disminuyen progresivamente al número observado en la edad adulta (Bennett-Clarke y cols., 1991; Lebrand y cols., 1996). Además, en diversos estudios experimentales se ha observado que la mayor disponibilidad de serotonina en la cxS1 en ratones deficientes de monoamino-oxidasa A o en ratas tratadas con clorgilina (agonista serotoninérgico), existe un cambio de la llegada de las fibras tálamo-cortical a su sitio específico en la capa IV, además un retardo en la formación de los barriles corticales (Lebrand y cols., 1996; Cases y cols., 1996). Es importante hacer notar que estas alteraciones morfoestructurales revierten en animales tratados con PCPA, molécula que inhibe la síntesis de 5-HT cerebral (Cases y cols., 1996). Sin embargo, en resultados de este laboratorio se han observado que las crías que fueron sometidas a DIU presentaron un retraso en la aparición de los barriles corticales. Estos efectos no revierten con el tratamiento con PCPA. Por lo tanto, todos estos hallazgos, en conjunto, nos permiten plantear que la 5-HT pudiera influir en el establecimiento de la topografía y somatotopía de los barriles corticales.

La hipótesis de este trabajo fue que las alteraciones serotoninérgicas inducidas por la DIU en ratas produce retardo en la llegada de las fibras tálamo-corticales, disminución de la expresión de la proteína transportadora de 5-HT y del receptor 5-HT_{1B} en la capa IV de la cxS1 durante la primera semana de vida posnatal, como mecanismos que expliquen el retraso de la aparición de los

barriles corticales observado en estas ratas con DIU (Gutierrez-Ospina y cols., 2002). Estos resultados muestran que no existió un retardo de la llegada de las vías talámicas a la cxS1 en estas crías desnutridas, ya que se observó el mismo patrón de crecimiento espacio-temporal de los axones talámo-corticales en ambas crías, normales y desnutridas desde la etapa fetal.

Se conoce que en la formación de los barriles, no sólo depende del crecimiento, llegada y segregación de los axones tálamo-corticales, sino también de la organización de las neuronas estelares espinosas y principalmente del remodelamiento de sus dendritas (Erzurumlu y Kind., 2001; Datwani y cols., 2002). Así, se propone que la DIU retarda el remodelamiento de las dendritas de estas neuronas estelares espinosas, lo que explicaría el retraso de dos días en la formación de los barriles en la capa IV de la cxS1. Por lo tanto, parece razonable plantear que la DIU no necesariamente retrasa la progresión de todos los procesos de desarrollo cerebral. ¿Entonces cuál podría ser el mecanismo por el que la DIU afecte el remodelamiento dendrítico? Los presentes resultados no contestan directamente esta importante pregunta. Sin embargo, basados en las observaciones efectuadas en ratones knockout del receptor NMDA en los que también se observaron retrasos en la formación de los barriles debido al retardo de la reorganización dendrítica, a pesar del arribo y desarrollo normal de la vía talámo-cortical (Datwani y cols., 2002). Suponemos que la inadecuada actividad glutamatérgica conlleve a una desincronización de los procesos de desarrollo de los axones y dendritas de los barriles en los animales con DIU (Erzurumlu y Kind., 2001; Datwani y cols., 2002). En apoyo a esta posibilidad se ha reportado que existe una disminución de la concentración de glutamato en la corteza

cerebral (Rotta y cols., 2003). Por otra parte, se conoce que la 5-HT disminuye la liberación de glutamato a nivel presináptico a través de la activación del receptor 5-HT_{1B} (Laurent y cols., 2002). Así, cuando el glutamato está presente en concentraciones bajas, facilita la ramificación axónica y el crecimiento de las espinas. Por el contrario, cuando glutamato esta presente en concentraciones elevadas, inhibe el crecimiento axonal y el de las espinas de las neuronas estelares espinosas de la capa IV de la cxS1. En este estudio se observó un aumento significativo de la disponibilidad de la 5-HT en el área de los barriles. Esto sugiere que probablemente también exista una inhibición importante de la liberación de glutamato en estos animales con DIU. Aspectos que se esta estudiado actualmente en el laboratorio.

Además los resultados obtenidos en las crías desnutridas mostraron una mayor expresión de los receptores 5-HT_{1B} en la cxS1 al tercer día de vida, aún cuando existió un aumento de la concentración de 5-HT. Estos hallazgos permiten sugerir que la regulación descendente de la expresión del receptor 5-HT_{1B} durante la vida fetal y al nacimiento, no depende de la concentración del neurotransmisor en el espacio sináptico, pues se esperaría una menor expresión de estos receptores en los animales desnutridos, tal y como ha sido mostrado en los animales adultos (Manjarrez y cols., 2003). Es posible que existan otros factores involucrados en la regulación de la expresión de los receptores 5-HT_{1B} durante la vida fetal, que podrían formar parte de un mecanismo diferente a lo que se ha observado en el cerebro adulto (Manjarrez y cols., 2003). También se observó que la expresión de los receptores 5-HT_{1B} en los animales desnutridos a los 7 días de edad posnatal disminuye significativamente con relación a los

animales controles, por lo que se concluye que la DIU produce disminución de la expresión de los receptores 5-HT_{1B}, secundario a una elevación de la concentración del neurotransmisor en la cxS1, una vez que el sistema serotoninérgico se encuentra en franco crecimiento y organización neuronal.

Se conoce que el principal factor que regula la expresión de los receptores 5-HT_{1B} en la membrana del soma y en las terminales nerviosas de las neuronas es la concentración del neurotransmisor. La unión del neurotransmisor al receptor desencadena una serie de eventos bioquímicos que traen como consecuencia la regulación de la expresión de estos receptores. Por ejemplo existe evidencia que el aumento intracelular de Ca²⁺ y AMPc está relacionado con los mecanismos de activación y expresión de los receptores en la membrana celular a través de mecanismos moleculares ya confirmados (Laurent y cols., 2002; Salichon y cols., 2001). Los procesos de sensibilización o desensibilización de los receptores están asociados al aumento o disminución del número de receptores o bien a modificaciones en su acoplamiento con otras proteínas del sistema de transducción de la señal en las células (Abdel-Majid y cols., 1998). En el presente trabajo se demostró en los animales con DIU una disminución significativa de la expresión de 5-HT_{1B} en el día 7 de edad posnatal, este hallazgo sugiere que la desnutrición reduce el número de receptores 5-HT_{1B} en la cxS1. Con base a este resultado, se propone que la DIU produce una desensibilización del receptor 5-HT_{1B} en la cxS1 como mecanismo que puede explicar la activación crónica del sistema serotoninérgico y el retraso de la formación de los barriles en la cxS1 observado en estos animales desnutridos durante la vida fetal.

Otro hallazgo atractivo observado en este estudio en los animales controles fue un aumento significativo de la expresión de SERT en la cxS1 durante el período posnatal estudiado. Esto puede ser debido a una sobreexpresión transitoria de esta proteína, es probable que la cantidad de SERT innecesaria pueda ser eliminada en el curso del desarrollo. Por lo tanto, SERT puede ser una proteína denominada programable, que dependiendo del nivel de estimulación, pueda permanecer o no (Huether y cols., 1997; Hansson y cols., 1998; Murphy y Lesch., 2008). Es importante hacer notar que las crías desnutridas, no presentaron el mismo patrón de desarrollo de SERT que las crías normales, sin embargo, tuvieron una menor expresión de esta proteína a partir del nacimiento. Este hallazgo es interesante puesto que se sabe que SERT se expresa transitoriamente en las fibras tálamicas, recapturando a la serotonina y transportándola en forma retrógrada a los cuerpos neuronales del tálamo. Este resultado indica que SERT desempeña un papel importante en la regulación de la concentración de serotonina a nivel cortical. Al mismo tiempo, el receptor 5-HT_{1B} se expresa transitoriamente sobre las terminales tálamo-corticales procedentes de las neuronas del núcleo VPM del tálamo. La presencia de esta maquinaria bioquímica funcional que regula, recaptura y libera 5-HT puede participar en la formación de la estructura fina de los barriles. Alternativamente, la serotonina puede ser liberada en el complejo VPM desde las neuronas tálamicas, regulado de esta manera la actividad tálamocortical y/o la inervación serotoninérgica procedente de los núcleos del rafe hacia el tálamo, coordinando así las señales entre ambas estructuras neuronales (D'Amato y cols., 1987).

Por otro lado, se ha propuesto que SERT tiene la función principal de recapturar 5-HT del espacio sináptico y transportarla hacia el interior de la terminal nerviosa, en donde es rápidamente metabolizada por la monoamina oxidasa tipo A. Además es parte fundamental en la regulación del recambio de serotonina, ya que se ha observado que presenta dos sitios de fosforilación en su molécula que son modulados a través de segundos mensajeros, uno de ellos corresponde a la proteína cinasa A dependiente de AMPc y el otro es dependiente de la proteína cinasa C. El primero regula la expresión del transportador en la membrana celular y el otro participa en la regulación de su afinidad (Huether y cols., 1997). Estos hallazgos sugieren que la afinidad y la densidad de SERT a nivel presináptico pueden también ser sujetos a mecanismos celulares de regulación, similares a los que están sometidos los receptores serotoninérgicos (Huether y cols., 1997).

Así pues se ha observado en ratas que fueron sometidas a una restricción de alimento por largo plazo, una regulación descendente de la expresión de SERT en la corteza cerebral. Este cambio solo ha sido demostrado en ratas jóvenes y no se presenta en los animales viejos (Huether y cols., 1997). Esta alteración podría ser debida a una disminución de la concentración de AMPc y una reducción de la actividad de la proteína cinasa A, a su vez resultado del aumento de la concentración de serotonina cerebral, situación similar a lo que se ha demostrado en los animales desnutridos *in útero* (Huether y cols., 1997).

Con base en los presentes resultados, se propone que la desnutrición *in útero* puede producir una desensibilización del receptor 5-HT_{1B} y SERT como mecanismos que pueden explicar el retraso de la aparición de los barriles

observado en las crías desnutridas durante el período crítico de desarrollo de la cxS1 (Medina-Aguirre y cols., 2008). Asimismo, los resultados sugieren que los barriles se ensamblan siguiendo un modelo de dos pasos. El primero se refiere a que los axones puntualmente ocupan su lugar en la capa IV de la cxS1; el segundo paso corresponde a que las dendritas se remodelen y definan los bordes de los barriles. En este modelo, axones y dendritas pueden parcialmente crecer independientemente unas de otras (Ye y D`Ercole., 2006). Esta hipótesis se apoya en los resultados previamente señalados que muestran que los axones y las dendritas comparten los campos sinaptogénicos y que pueden estar listos para formar sinapsis en diversos tiempos (Datwani y cols., 2002). Así, axones y dendritas en los barriles tiene períodos críticos diferentes, que los hacen diferencialmente vulnerables a las influencias externas (Erisir y Dreusicker., 2005; Ye y D`Ercole., 2006; Katagiri y cols., 2007) como la DIU.

9. CONCLUSIONES

- 1) La DIU produce disminución del crecimiento físico, reflejado por la reducción del peso corporal y el grosor de la corteza cerebral.
- 2) Los presentes resultados confirman que en la cxS1 de las ratas desnutridas durante la gestación tienen un aumento de la síntesis de 5-HT, secundario a una elevación de la concentración del L-Trp tisular.
- 3) La expresión de la proteína transportadora de serotonina y del receptor 5-HT_{1B} disminuyeron significativamente.
- 4) La disminución de la expresión de receptor 5-HT_{1B} y de la proteína transportadora de serotonina en los animales con DIU, sugiere que probablemente el mecanismo que regula su expresión no dependa de la concentración de 5-HT, como se ha demostrado en el cerebro de rata adulta.
- 5) Así pues, DIU produce cambios moleculares finos a nivel de las estructuras del barril en formación que podrían ser los responsables a largo plazo de una disfunción de la cxS1.

10. REFERENCIAS

Abdel-Majid RM, Leong WL, Schalkwyk LC, Smallman DS, Wong ST, Storm DR, Fine A, Dobson MJ, Guernsey DL, Neumann PE. (1998). Loss of adenylyl cyclase 1 activity disrupts patterning of mouse somatosensory cortex. *Nat. Genetics*. 19: 289-291.

Austin K, Bronzino JD, Morgane PJ. (1989). Paired-Pulse facilitation and inhibition in the dentate gyrus is dependent on behavioral state. *Exp. Brain Res.* 77: 594-604.

Austin K, Beiswanger C, Austin-La France RJ, Galler JR, Morgane PJ. (1992). Prenatal protein malnutrition alters behavioral state modulation of inhibition and facilitation in the dentate gyrus. *Brain Res. Bull.* 28: 245-255.

Azmitia EC. (2001). Modern view on an ancient chemical: serotonin effects on proliferation, maturation and apoptosis. *Brain Res. Bull.* 56: 414-424.

Beatty J. (1995). The nervous system. En: *Principles of behavioral neuroscience*. (Beatty J. Ed.), Brown & Benchmark Press, pp. 114-145.

Bennett-Clarke CA, Chiaia NL, Crissman RS, Rhoades R. (1991). The source of the transient serotonergic input to the developing visual and somatosensory cortices in rat. *Neuroscience*. 43(1): 163-183.

Bellivier F, Henry C, Szoker A, Schurhoff F, Nosten-Bertraud M, Feingold J, Launay JM, Leboyer M, Laplanche JL. (1998). Serotonin transporter gene polymorphisms in patients with unipolar or bipolar depression. *Neurosci. Lett.* 255: 143-146.

Blue ME, Yagaloff KA, Mamounas LA, Hartig PR, Molliver ME. (1988). Correspondence between 5-HT₂ receptors and serotonergic axons in rat neocortex. *Brain Res.* 453: 315-328.

Boadle-Biber MC. (1993). Regulation of serotonin synthesis. *Prog. Biophys. Molec. Biol.* 60: 1-15.

Bourgoin S, Faivre-Bauman A, Benda P, Glowinski J, Hamon M. (1974). Plasma tryptophan and 5-HT metabolism in the CNS of the newborn rat. *J. Neurochem.* 23: 319-327.

Bourre JM, Morand D, Chanez C, Dumont O, Flexor MA. (1981). Influence of intrauterine malnutrition on brain development alteration of myelination. *Biol. Neonate.* 39: 96-99.

Boylan CB, Bennett-Clarke CA, Chiaia L, Rhoades R. (2000). Time course of expression and function of the serotonin transporter in the neonatal rat's primary somatosensory cortex. *Somatosensory & motor Res.* 17: 52-60.

Bronzino JD, Austin K, Siok CJ, Cordova C, Morgane PJ. (1983). Spectral analysis of neocortical and hippocampal EEG in the protein malnourished rat. *Electroencephalogram. Clin. Neurophysiol.* 55: 699-709.

Bruinvels AT, Palacios JM, Hoyer D. (1993). Autoradiographic characterization and localization of 5-HT1D compared to 5-HT1B binding sites in rat brain. *Naunyn Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 347: 569-582.

Cases O, Vitalis T, Seif I, De Maeyer E, Sotelo C, Gaspar P. (1996). Lack of barrels in the somatosensory cortex of monoamine oxidase A deficient mice: role of serotonin excess during the critical period. *Neuron.* 16: 297-307.

Cintra L, Granados L, Aguilar A, Kemper T, DeBassio W, Galler J, Morgane PJ, Durán P, Díaz-Cintra S. (1997). Effects of prenatal protein malnutrition on mossy fibers of the hippocampal formation in rats of four age groups. *Hippocampus* 7: 184-191.

Chase HP, McKhann GM. (1976). The effects of malnutrition on the synthesis of myelin lipid. *Pediatrics.* 40: 551-559.

Chen JC, Tonkiss J, Galler JR. (1992). Prenatal malnutrition enhances serotonin release from the hippocampus. *J. Nutr.* 122: 2138-2143.

Curzon G, Knott PJ. (1973). Drugs influencing plasma and brain tryptophan. *Brit. J. Pharmacol.* 48: 352-353.

Dählstrom A, Fuxe K. (1964). Localization of monoamines in the cerebral brain stem. *Experientia.* 20: 398-399.

D'Amato RJ, Blue ME, Largent BL, Lynch DR, Ledbetter DJ, Molliver ME, Znyder SH. (1987). Ontogeny of the serotonergic projection to rat neocortex: transient expression of a dense innervation to primary sensory areas. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 84: 4322-4326.

Datwani A, Iwasato T, Itohara S, Erzurumlu RS. (2002). NMDA Receptor-dependent pattern transfer from afferents to postsynaptic cells and dendritic differentiation in the barrel cortex. *Mol. Cell. Neurosci.* 21: 477-492.

Díaz-Cintra S, Cintra L, Kemper T, Resnick O, Morgane PJ. (1981). The effects of protein deprivation on the nucleus raphe dorsalis: A morphometric Golgi study in rats of three age groups. *Brain Res.* 221: 243-255.

Díaz-Cintra S, Cintra L, Kemper T, Resnick O, Morgane PJ. (1984). The effects of protein deprivation on the nucleus locus coeruleus: A morphometric Golgi study in rats of three age groups. *Brain Res.* 304: 243-253.

Díaz-Cintra S, Cintra L, Galvan A, Aguilar A, Kemper T, Morgane PJ. (1991). Effects of prenatal protein deprivation on the postnatal development of granular cells in the fascia dentata. *J. Comp. Neurol.* 310: 356-364.

Díaz-Cintra S, González-Maciél A, Morales MA, Aguilar A, Cintra L, Prado-Alcalá RA. (2007). Protein malnutrition differentially alters the number of glutamate acid decarboxylase-67 interneurons in dentate gyrus and CA1-3 subfield of the dorsal hippocampus. *Exp. Neurol.*, doi: 10.1016/j.expneurol.2007.07.003.

Erisir A, Dreusicke M. (2005). Quantitative morphology and postsynaptic targets of thalamocortical axons in critical period and adult ferret visual cortex. *J. Comp. Neurol.* 485: 11-31.

Erzurumlu RS, Kind PC. (2001). Neural activity: sculptor of "barrels" in the neocortex. *Trends Neurosci.* 24: 589-595.

Fernandez F, Sarre S, Launay JM, Aguirre S, Guyonnet-Dupèrat V, Moisan MP, Ebinger G, Michotte Y, Mormède P, Chaouloff F. (2003). Rat strain differences in peripheral and central serotonin transporter protein expression and function. *Eur. J. Neurosci.* 17: 494-506.

Fowden AL, Forhead AJ. (2004). Endocrine mechanisms of programming. *Reproduction.* 127: 515-526.

Gambetti P, Gambetti AL, Gonatas KN, Shafer B, Stiember A. (1972). Synapsis and malnutrition morphological and biochemical study of synaptosomal fractions from rat cerebral cortex. *Brain Res.* 47: 477-484.

Gaspar P, Cases O, Maroteaux L. (2003). The developmental role of serotonin: New from mouse molecular genetics. *Nature Rev. Neurosci.* 4: 1002-1010.

Goridis C, Rohrer H. (2002). Specification of catecholaminergic and serotonergic neurons. *Nature Rev. Neurosci.* 3: 531-541.

Grahame-Smith DG. (1964). Tryptophan hydroxylation in brain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 16: 586-692.

Guthrie HA, Brown ML. (1968). Effects of severe undernutrition in early life on growth, brain size and composition in adult rats. *J. Nutr.* 94: 419-425.

Gutierrez-Ospina G. (1997). Efectos del factor de crecimiento tipo insulina I (IGF-1) sobre el crecimiento cerebral y el desarrollo del sistema somático sensorial: Estudios anatómicos en la corteza somatosensorial primaria (S1) de ratones transgénicos. Tesis doctoral, UNAM, México DF.

Gutiérrez-Ospina GG, Manjarrez-Gutiérrez G, Gonzalez C, Lopez S, Herrera R, Medina-Aguirre I, Hernandez-R J. (2002). Neither increased nor decreased

availability of cortical serotonin (5HT) disturbs barrel field formation in isocaloric undernourished rat pups. *Int. J. Dev. Neuroscience.*, 20: 497-501.

Hamon M, Glowinski J. (1974). Regulation of serotonin synthesis. *Life Sci.* 15: 1533-1548.

Hansson SR, Mezey E, Hoffman BJ. (1998). Serotonin transporter messenger RNA in the developing rat brain: early expression in serotonergic neurons and transient expression in non-serotonergic neurons. *Neurosci.* 83: 1185-1201.

Hartig PR, Hoyer D, Humphrey PPA, Martin G. (1996). Alignment of receptor nomenclature with the human genome: classification of 5-HT_{1B} and 5-HT_{1D} receptor subtype. *Trends Pharmacol. Sci.* 17: 103-105.

Haydon PG, McCobb DP, Kater SB. (1987). The regulation of neurite outgrowth, growth cone motility, and electrical synaptogenesis by serotonin. *J. Neurobiol.* 18: 197-215.

Hendry SH, Hsiao SS, Brown MC. (2003). Fundamentals of sensory system. En: *Fundamental neuroscience* (Squire LR, Bloom FE, McConnell SK, Roberts JL, Spitzer NC y Zigmond MJ. Ed.), Amsterdam: Academic Press, pp. 577-588.

Hensler JG. (2006). Serotonin. En: *Basic Neurochemistry molecular, cellular and medical aspects.* (Siegel GJ, Albers RW, Brandy ST, Price DL eds) Amsterdam: Academic Press, pp 227-248.

Hernandez RJ, Illnerova H. (1970). Activity of 5-hydroxytryptophan decarboxylase during the first twenty days of postnatal life in the rat pineal gland: effect of light. *Neuroendocrinology.* 6: 343-348.

Hernández-RJ. (1973). Developmental pattern of the serotonin synthesizing enzyme in the brain of postnatally malnourished rats. *Experientia.* 29:1487.

Hernández-RJ. (1974). A possible experimental model for studying the effects of early chronic malnutrition on neuronal biochemical and functional correlates. *Physiol. Bohemoslov.* 23: 146.

Hernández-RJ. (1975). Influences of early treatment with 6-hydroxydopamine and malnutrition on the development of monoamine pathways in the rat brain. *Physiol. Bohemoslov.* 24: 1.

Hernández-RJ. (1976). Effects of 6-hydroxydopamine and malnutrition on the early postnatal development of noradrenaline and serotonin in the rat brain. *Biol. Neonate.* 30: 181-186.

Hernandez RJ. (1979). Na⁺ -K⁺ ATPase activity in the brain cortex of rats ontogenetically malnourished and treated with serotonin precursors. *Brain Res.* 162: 348-352.

Hernandez RJ, Chagoya GG. (1986). Brain serotonin synthesis and Na⁺-K⁺ ATPase activity are increased postnatally after prenatal administration of L-tryptophan. *Dev. Brain Res.* 25: 221-226.

Hernandez RJ, Manjarrez GG, Chagoya GG. (1989). Newborn humans and rats malnourished in utero: free plasma L-tryptophan, neutral amino acid and brain serotonin synthesis. *Brain Res.* 488: 1-13.

Hery F, Boulenguez A, Semont M, Hery G, Pesce D, Becquet M, Faudon P, Deprez P, Fache MP. (1999). Identification and role of serotonin 5-HT_{1A} and 5-HT_{1B} receptors in primary cultures of rat embryonic rostral raphe nucleus neurons. *J. Neurosci.* 72: 1791-1801.

Hobel C, Culhane J. (2003). Role of psychosocial and nutritional stress on poor pregnancy outcome. *J. Nutr.* 133(5suppl.2): 1709S-1717S.

Hoskin KM, Lambert GA, Donaldson C y Zagami AS. (2004). The 5-hydroxytryptamine _{1B/1D/1F} receptor agonists eletriptan and naratriptan inhibit trigeminovascular input to the nucleus tractus solitarius en the cat. *Brain Res.* 998: 91-99.

Hoyer D, Clarke DE, Fozard JR, Hartig PR, Martin GR, Mylecharane EJ, Saxena PR, Humphrey PP. (1994). VII International Union of Pharmacology classification of receptors for 5-hydroxytryptamine (serotonin). *Pharmacol. Rev.* 46:157-203.

Hoyer D, Hannon JP, Martin GR. (2002). Molecular, pharmacological and functional diversity of 5-HT receptors. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 71: 533-554.

Huether G, Zhou D, Schmidt S, Wiltfang J, Ruther E. (1997). Long term food restriction down-regulates the density of serotonin transporter in the rat frontal cortex. *Biol. Psychiatry.* 41:1174-1180.

Jacobs BL, Azmitia EC. (1992). Structure and function of the brain serotonin system. *Physiol. Rev.* 72: 165-220.

Jones EG. (1983). The Thalamus. En: *Chemical Neuroanatomy* (Emson PC, ed), New York: Raven Press, pp 505-550.

Kandel ER. (2001). Trastornos del estado de ánimo: depresión, manía u trastornos de ansiedad. En: *Principios de Neurociencias* (Kandel ER, Schwartz JH, Jessell TM, eds), Madrid: McGraw-Hill-Interamericana, pp1 209-1225.

Katagiri H, Fagiolini M, Hensch TK. (2007). Optimization of somatic inhibition at critical period onset in mouse visual cortex. *Neuron.* 53: 805-812.

Killackey HP, Gould HJ, Cusick CG, Pons TP, Kaas JH. (1983). The relation of corpus callosum connections to architectonic field and body surface maps in

sensorymotor cortex of new and old world monkeys. *J. Comp. Neurol.* 219: 384-419.

Killackey HP. (1990). Development of somatosensory system structures. En: *Development of sensory system in mammals* (Coleman JR, ed), New York: John Wiley & Sons, pp 403-430.

King RS, Kemper TL, DeBassio WA, Ramzan M, Blatt GJ, Rosene DL, Galler JR. (2002). Birthdate and number of neurons in the serotonergic raphe nuclei in the rat with prenatal protein malnutrition. *Nutr. Neurosci.* 5: 391-397.

Lauder JM. (1993). Neurotransmitters as growth regulatory signals: role of receptors and second messengers. *Trends Neurosci.* 16: 233-239.

Laurent A, Goillard JM, Cases O, Lebrand C, Gaspar P, Ropert N. (2002). Activity-dependent presynaptic effect of serotonin 1B receptors on the somatosensory thalamocortical transmission in neonatal mice. *J. Neurosci.* 22: 886-900.

Lebrand C, Cases O, Adelbrecht C, Doye A, Alvarez C, Mestikawy SE, Seif I, Gaspar P. (1996). Transient uptake and storage of serotonin in developing thalamic neurons. *Neuron.* 17: 991-1003.

Leslie MJ, Bennett-Clarke CA, Rhoades R. (1992). Serotonin 1B receptors form a transient vibrissa-related pattern in the primary somatosensory cortex of the developing rat. *Dev. Brain Res.* 69: 143-148.

Levitt P, Rakic P. (1992). The time of genesis embryonic origin and differentiation of the brain stem monoamine neurons in the rhesus monkey. *Brain Res.* 256: 35-57.

Levitt P, Harvey JA, Friedman E, Simansky K, Murphy EH. (1997). New evidence for neurotransmitter influences on brain development. *Trends Neurosci.* 20: 269-274.

Levitsky DA. (1975). Malnutrition and animal models of cognitive development. En: *Nutrition and mental function.* (Serban G., ed.), New York: Plenum Press, pp 75-89.

Lidov HG, Molliver ME. (1982). An immunohistochemical study of serotonin neuron development in the rat: ascending pathways and terminal fields. *Brain Res. Bull.* 8: 389-430.

Lipton SA, Kater SB. (1989). Neurotransmitter of neural outgrowth, plasticity and survival. *Trends Neurosci.* 12:265-270.

Liu KL, Chuah MI, Lee KK. (1995). Soluble factors from the olfactory bulb attract olfactory Schwann cells. *J. Neurosci.* 15: 990-1000.

Lovenberg W, Weissbach H, Udenfriends S. (1962). Aromatic L-amino acid decaroxylase J. Biol. Chem. 237: 89-93.

McMenamy RH, Oncley JL. (1958). The specific binding of L-tryptophan to serum albumin. J. Biol. Chem. 233: 1436-1447.

Manjarrez GG, Chagoya GG, Hernandez RJ. (1988). Perinatal brain serotonin metabolism in rats malnourished in-utero. Biol. Neonate. 54: 232-240.

Manjarrez GG, Chagoya GG, Hernández RJ, (1988^a). Desnutrición intrauterina I: L-triptófano, serotonina y aminoácidos plasmáticos en humanos. Bol. Med. Hosp. Infant. Méx. 45: 729-744.

Manjarrez GG, Chagoya GG, Hernández RJ, (1988^b). Desnutrición intrauterina II: L-triptófano, triptofano-5-hidroxilasa y serotonina en el cerebro de rata. Bol. Med. Hosp. Infant. Méx. 45: 808-816.

Manjarrez Gutiérrez G. (1992). Activación de la vía serotoninérgica cerebral por desnutrición gestacional. Cinética de la enzima limitante. Tesis doctoral, UNAM México D.F.

Manjarrez GG, Chagoya G, Hernandez-R J. (1994). Early nutritional changes modify the kinetics and phosphorylation-capacity of tryptophan-5-hydroxylase. Int. J. Dev. Neuroscience. 12: 695-702.

Manjarrez GG, Magdaleno VM, Chagoya G, Hernandez-R J. (1996). Nutritional recovery does not reverse the activation of brain serotonin synthesis in the ontogenetically malnourished rat. Int. J. Dev. Neuroscience. 14: 641-648.

Manjarrez GG, Contreras J, Chagoya G, Hernández-R J. (1998). Free tryptophan as indicator of brain serotonin synthesis in infant. Pediatr. Neurol. 18: 57-62.

Manjarrez GG, Herrera J, Gonzalez M, Hernandez E, Manuel L, Hernandez-R J. (1999). Long-term consequences of early undernourishment on the activation of brain serotonin synthesis in the rat: effect of nutritional recovery during the period of nursing. Nutr. Neurosci. 2:57-67.

Manjarrez Gutiérrez G, Manuel-A L, Mercado-C R, Hernandez-R J. (2003). Serotonergic receptors in the brain of in utero undernourished rats. Int. J. Dev. Neuroscience. 21: 283-289.

Mansour-Robaey S, Mechawar N, Radja F, Beaulieu C, Laurent D. (1998). Quantified distribution of serotonin transporter and receptors during the postnatal development of the rat barrel field cortex. Dev. Brain Res. 107: 159-163.

Matthews GG. (2001). Sensory Systems. En: Neurobiology. Molecules, cells, and Systems (Matthews GG. Ed), Canada: Blackwell Science, pp 300.

Medina-Aguirre GI. (2000). Constancia sináptica de la corteza cerebral de los mamíferos: Estudio en la corteza somatosensorial primaria de ratones transgénicos con distinto tamaño cerebral. Tesis de licenciatura. México D.F.

Medina-Aguirre I, Gutiérrez-Ospina G, Hernández-Rodríguez J, Boyzo A, Manjarrez-Gutiérrez G. (2008). Development of 5-HT_{1B} SERT and thalamo-cortical afferents in early nutritionally restricted rats: An emerging explanation for delayed barrel formation. *Int. J. Dev. Neuroscience*. 26: 225-231.

Mercado R and Hernández-RJ. (1992). A molecular recognizing system of serotonin in rat fetal axonal growth cones: Uptake and high affinity binding. *Develop. Brain Res*. 69: 133-137.

Mercado R, Florán B and Hernández-RJ. (1998). Regulated release of serotonin from axonal growth cones isolated from the fetal rat brain. *Neurochem. Int*. 32:103-106.

Miller M, Leahy PJ, Stern CW, Morgane JP, Resnick O. (1977). Tryptophan availability: Relation to elevated brain serotonin in developmentally protein-malnourished rats. *Exp. Neurol*. 57: 142-157.

Morgane PJ, Austin-La France R, Bronzino J, Tonkiss J, Diaz-Cintra S, Cintra L, Kemper T, Galler JR. (1993). Prenatal malnutrition and development of the brain, *Neurosci. Biobehavioral Review* 17, 91-128.

Morgane PJ, Mokler DJ, Galler JR. (2002). Effects of prenatal protein malnutrition on the hippocampal formation. *Neurosci. Biobehavioral Review*. 26: 471-483.

Murphy DL, Lerner A, Rudnick G, Lesch KP. (2004). Serotonin transporter: Gen, genetic disorders and pharmacogenetics. *Mol. Interventions*. 4:109-122.

Murphy DL, Lesch KP. (2008). Targeting the murine serotonin transporter: insights into human neurobiology. *Nat. Review Neurosci*. 9: 85-96.

Neckers LM, Biggio G, Moja E, Meek JL. (1971). Modulation of brain tryptophan hydroxylase activity by brain tryptophan content. *J. Pharmacol. Exp. Ther*. 177: 457-480.

Oades RD. (2007). Role of serotonin system in ADHD: treatment implications. *Expert. Rev. Neurother*. 7: 1357-1374.

Oscós A, Hernandez-R J. (1982). Gestational malnutrition and drugs affecting brain serotonin. Effects on temporal control behavior. *Behav. Neural Biol.* 34: 358-571.

Peat M, Gibb JW. (1983). High-performance liquid chromatography determination of indolamines, dopamine and norepinephrine in rat brain with fluorometric detection. *Anal. Biochem.* 128: 275-280.

Perez-Cruet J, Tagliamonte A, Tagliamonte P, Gessa GL. (1972). Changes in brain serotonin metabolism associated with fasting and satiation in rats. *Life Sci.* 11: 31-39.

Persico AM, Altamura EC, Puglisi-Allegra R, Ventura R, Lucchese F, Keller F. (2000). Serotonin depletion and barrel cortex development: impact of growth impairment vs. Serotonin effects on thalamocortical endings. *Cerebral Cortex.* 10: 181-191.

Poitou P, Boulu R. (1977). Psychopharmacologie du tryptophane. *Path. Biol.* 25: 565-571.

Price JL. (1995). Thalamus. En: *The Rat Nervous System* (Paxinos G, ed), San Diego: Academic Press, pp 629-645.

Riddle D, Richards A, Zsuppan F, Purves D, (1992). Growth of the somatic sensory cortex and its constituent parts during postnatal development. *J Neurosci* 12: 3509-3524.

Ron de Kloet E, Jöels M, Holsboer F. (2005). Stress and the brain: from adaptation to disease. *Nat Rev Neurosci* 6: 463-475.

Rotta LN, Schmidt AP, Mello e Souza T, Nogueira CW, Souza KB, Izquierdo IA, Perry MLS y Souza DO. (2003). Effects of undernutrition on glutamatergic parameters in rat brain. *Neurochem. Res.* 8: 1181-1186.

Rubenstein JLR. (1998). A decade of serotonin research. Development of serotonergic neurons and their projections. *Biol. Psychiatry.* 44: 145-150.

Salichon N, Gaspar P, Upton AL, Picaud S, Hanoun N, Hamon M, De Maeyer E, Purphy DL, Mossner R, Lesch KP, Hen R, Seif I. (2001). Excessive activation of serotonin (5-HT) 1B receptors disrupts the formation of sensory maps in monoamine oxidase A and 5-HT transporter knock-out mice. *J. Neurosci.* 21: 884-896.

Shepherd GM, (1994). *Neurology*. New York: Oxford University Press. Pp 1050.

Siegel GJ, Albers RW, Bradi ST, Price DL. (2006). *Basic Neurochemistry, Molecular, Cellular, and Medical Aspects*. Amsterdam: Elsevier Academic Press. Pp 991.

Sims KL, Davis GA, Bloom FE. (1973). Activities of 3, 4-dihydroxy-L-Phenylalanine and 5-hydroxy-L-tryptophan decarboxylase in rat brain. Assay characteristics and distribution. *J. Neurochem.* 20: 449-464.

Sourkes TL. (1977). Kinetics of tryptophan transport into the brain. *J. Neural Transm. Suppl.* 15: 107-114.

Spear LP, Scalzo FM. (1985). Ontogenetic alterations in the effects of food and/or maternal deprivation on 5-HT, 5-HIAA and 5-HIAA/5-HT ratios. *Dev. Brain Res.* 18: 143-157.

Squire LR, Bloom FE, McConnell SK, Roberts JL, Spitzer NC, Zigmond MJ. (2003). *Fundamental neuroscience*. Amsterdam: Academic Press. Pp 1422.

Stewart H, Hendry C, Steven S, Hsiao C, Bushnell C. Somatic Sensation. (2003). En: *Fundamental Neuroscience* (Squire LR, Bloom FE, McConnell SK, Roberts JL, Spitzer NC y Zigmond MJ. Ed.), Amsterdam: Academic Press, pp775 y 778.

Sur M, Cowey A. (1996). Cerebral cortex: Function and development. *Neuron.* 15: 497-505.

Tagliamonte A, Biggio G, Varginu L, Gessa GL. (1973). Free tryptophan in serum controls brain tryptophan level and serotonin synthesis. *Life Sci.* 12: 277-287.

Van der Hove DLA, Steinbusch HWM, Sheepens A, Van der Berg WDJ, Kooiman LAM, Boosten BJG, Prickaerts J, Blanco CE. (2006). Prenatal stress and neonatal rat brain development. *Neurosci.* 137: 145-155.

Vitalis T, Parnavelas J. (2003). Serotonin and cortical development. *Exp. Neurol.* 25: 245-256.

Waite PME, Tracey DJ. (1995). Trigeminal sensor system. En: *The rat nervous system* (Paxinos G, ed) New York: Academic Press, pp 705- 745.

Wallace JA, Lauder JM. (1983). Development of the serotonergic system in the rat embryo: an immunocytochemical study. *Brain Res. Bull.* 10: 459-479.

Winick M, Noble A. (1965). Quantitative changes in DNA and RNA and Protein during prenatal and postnatal growth in the rat. *Dev. Biol.* 12: 451-458.

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

Woolsey TA (1990). Peripheral alterations and somatosensory development. En: *Development of sensory system in mammals*. (Coleman JR. Ed), New York: John Wiley & Sons, pp 461-503.

Ye P, D'Ercole AJ. (2006). Insulin-like growth factor actions during development of neural stem cells and progenitors in the central nervous system. *J. Neurosci. Res.*, 83: 1-6.

Young-Davies CL, Bennett-Clarke CA, Lane RD, Rhoades RW. (2000). Selective facilitation of the serotonin (1B) receptor causes disorganization of thalamic afferents and barrels in somatosensory cortex of rat. *J. Comp. Neurol.* 425: 130-138.

Yuwiler A, Oldendorf WH, Geller E, Braun L. (1977). Effects of albumin and amino acid competition on tryptophan uptake into brain. *J. Neurochem.* 28: 1015-1023.

Zeisel HS, Mauron C, Watkins CJ, Wurtman RJ. (1981). Developmental changes in brain indoles, serum tryptophan and other serum neutral amino acids in the rat. *Dev. Brain Res.* 1: 551-564.

Zilles K. (1990). Anatomy of the neocortex: Cytoarchitecture and myeloarchitecture. En: *The cerebral cortex of the rat* (Kolb B, Tees RC. Eds), Cambridge: MIT Press, pp77-112.

Páginas web utilizadas:

www.unicef.org/undernutrition

www.who.org

11. ÍNDICE DE TABLAS

Pags.

Tabla 1: Receptores de serotonina en el Sistema Nervioso Central

17

12. ÍNDICE DE FIGURAS

Nombre

Pags.

Figura 1	Localización de neuronas serotoninérgicas	10
Figura 2	Vía de síntesis de 5-HT	12
Figura 3	Vista lateral de la corteza cerebral de la rata	19
Figura 4	Tipos de mecanorreceptores	21
Figura 5	Distribución especial y representación de los barriles	23
Figura 6	Representación de los segmentos corporales de la rata	24
Figura 7	Vía ascendente somatosensorial y táctil de la cara	25
Figura 8	Vía táctil completa de la cara de la rata	27
Figura 9	Pesos corporales de las ratas madres	41
Figura 10	Ganancia corporal de las crías durante el desarrollo	41
Figura 11	Grosor de la corteza	42
Figura 12	Concentración de L-Trp	43
Figura 13	Concentración de 5-HT	44
Figura 14	Axones tálamo-corticales marcados con DiA	45
Figura 15	Inmunorreactividad de SERT	46
Figura 16	Inmunorreactividad de 5-HT _{1B}	47

Development of 5-HT_{1B}, SERT and thalamo-cortical afferents in early nutritionally restricted rats: An emerging explanation for delayed barrel formation

Ivett Medina-Aguirre^a, Gabriel Gutiérrez-Ospina^{b,*}, Jorge Hernández-Rodríguez^c, Alfonso Boyzo^c, Gabriel Manjarrez-Gutiérrez^{a,**}

^a *Laboratorio de Patología Molecular, Unidad de Investigación Biomolecular en Cardiología, Hospital de Cardiología, Centro Médico Nacional Siglo XXI, Instituto Mexicano del Seguro Social, México 06725, D.F., Mexico*

^b *Laboratorio de Biología Integrativa, Departamento de Biología Celular y Fisiología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, México 04510, D.F., Mexico*

^c *Laboratorio de Neuronogénesis, Departamento de Fisiología, Biofísica y Neurociencias, Centro de Investigación y Estudios Avanzados, Instituto Politécnico Nacional, México 07360, D.F., Mexico*

Received 20 October 2007; received in revised form 5 December 2007; accepted 6 December 2007

Abstract

Barrel formation is delayed in nutritionally restricted rats. The underlying cause of such delay is yet unclear. Because barrels appear upon the arrival of somatosensory thalamo-cortical afferents and the reorientation of the dendritic arborizations of cortical spiny stellate neurons, it is likely that at least one of these processes is altered by nutritional restriction. Also, the serotonergic afferent system has been implicated in regulating barrel segregation and growth during early postnatal life. We then evaluated the pattern of immunostaining of the serotonin transporter (SERT) and of the serotonin receptor 1B (5-HT_{1B}), as well as the growth and arrival time of somatosensory thalamo-cortical afferents, to infer the contribution of these elements in the delayed formation of barrels observed in nutritionally restricted rats. It was found that the rates of development and the segregation of thalamo-cortical fibers were normal in nutritionally restricted rats. SERT, but not 5-HT_{1B} immunoreactivity, was decreased in the primary somatosensory cortex during barrel specification. The availability of both proteins in nutritionally restricted rats was lower than that observed in their well fed counterparts at later developmental times. It is concluded that the delayed formation of barrels observed in nutritionally restricted rats is due to a retarded reorientation of dendritic arbors of cortical neurons. This might happen as a secondary effect of decreasing the availability of SERT and/or increasing the availability of 5-HT_{1B} receptor early in postnatal life.

© 2007 ISDN. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.

Keywords: Undernourishment; Cortical development; Somatosensory cortex; Barrels; Serotonin

1. Introduction

The primary somatosensory cortex (S1) in rodents contains a body representation formed by cytological units termed barrels

(Woolsey and Van Der Loos, 1970). These barrels represent collections of mechanosensory receptors localized underneath the skin surface. Barrels appear in S1 during the first 3–5 days of life in mice and rats (Killackey and Belford, 1980). Some experimental manipulations, however, delay the emergence of barrels (Datwani et al., 2002; Vondokmai, 1980; Gutiérrez-Ospina et al., 2002). This sort of manipulation is related to the nutritional status of the organism. Both, postnatal protein restriction (Vondokmai, 1980) and pre- and postnatal protein-caloric restriction (Gutiérrez-Ospina et al., 2002) delay the emergence of barrels by about 2 days in rats. The cause of such a delay has not been established. Because it is generally believed that the rate of development slows down in under-

Abbreviations: DAB, diaminobenzidine; DIA, lipophylic dye 4-(4-(dilinoleylamino) styryl)-N-methylpyridinium 4-chlorobenzenesulfonate; PD, postnatal day; SERT, serotonin transporter; 5-HT_{1B}, serotonin receptor 1B; S1, primary somatosensory cortex.

* Corresponding author. Fax: +52 55 56 22 38 97.

** Corresponding author. Fax: +52 55 57 61 09 52.

E-mail addresses: gabo@servidor.unam.mx (G. Gutiérrez-Ospina), willisga@df1.telmex.net.mx (G. Manjarrez-Gutiérrez).

nourished animals, one might imagine that delayed barrel formation in nutritionally restricted rats reflects the retarded development of axons and dendrites.

Barrels are formed of different cellular components. These elements are differentially distributed in two basic barrel compartments called the hollow and the wall. Hollows are rich in axons, dendrites and synapses (Patel-Vaidya, 1985; White and Peters, 1993; White et al., 2004). They also contain relatively few neuronal bodies and a percentage of glial and vascular elements (Patel-Vaidya, 1985). The origin of axons reaching the barrel hollows is heterogeneous. Some of them arise from neurons located in sub cortical structures (e.g., ventro-postero-medial nucleus of the thalamus; Miller et al., 2000), others arise from neurons placed in the ipsilateral or contra-lateral cerebral cortex (e.g., Bernardo et al., 1990a,b). Dendrites within barrel hollows arise from local neurons (Woolsey et al., 1975). Barrel walls, on the other hand, are formed predominantly by neuronal bodies that organize in a scaffold-like structure (Woolsey and Van Der Loos, 1970). For barrels to emerge in the developing S1, all of the above neuronal elements are subjected to a process of reorganization. Such reorganization has been best documented for the terminal branches of thalamo-cortical afferents and dendrites of stellate neurons both located in layer IV. Accordingly, barrels do not emerge in S1 until the bundles of somatosensory thalamo-cortical afferents reach layer IV and segregate. At this time, a few of the axonal branches misrouted are retracted, thus specifying the territories that will become barrel hollows (Senft and Woolsey, 1991; Agmon et al., 1993, 1995; Rebsam et al., 2002). On the other side of the synaptic partnership, dendrites of stellate neurons must be remodeled during barrel formation. Indeed, dendritic arbors of stellate neurons reorient towards the incoming thalamo-cortical bundles, through a process of dendritic pruning and oriented growth (Greenough and Chang, 1988). This process defines barrel walls. As one might guess, both of the processes described must occur in concert, synchronized in time and space, for barrels to form correctly (see Datwani et al., 2002 for an illustrative example). Nutritional restriction could then be altering the temporal coordination of the development of axons and dendrites, and not necessarily slowing down their rate of synchronized growth.

Increasing evidence supports the view that serotonin is a major growth factor for somatosensory thalamo-cortical afferents (Cases et al., 1996; Levitt et al., 1997; Lane et al., 2006; Vitalis and Parnavelas, 2003). In fact, it has been suggested that serotonin is taken up and released by developing somatosensory thalamo-cortical terminals. Serotonin may then control the growth of this afferent system through a process mediated by the serotonin receptor $1B$ (5HT $_{1B}$; Salichon et al., 2001; Rebsam et al., 2002). In rats subjected to nutritional restriction not only the emergence of barrels is delayed, but their size is also reduced (Vondokmai, 1980). This occurs despite the fact that serotonin levels in S1 are increased in rats subjected to nutritional restriction (Manjarrez et al., 2001; Gutiérrez-Ospina et al., 2002). It might then be that somatosensory thalamo-cortical afferents in rats subjected to

nutritional restriction have a decreased expression of the serotonin transporters (SERT) and/or of the 5HT $_{1B}$ receptors.

Hence, in the present work, we studied whether the delayed emergence of barrels observed in rats that were subjected to nutritional restriction could reflect the retarded growth of the somatosensory thalamo-cortical afferents, and whether the availability *in situ* of the receptor 5HT $_{1B}$ and/or of SERT might be subnormal during barrel formation in undernourished rats.

2. Experimental procedures

2.1. Animals

Control and undernourished Wistar rats were used as subjects in the experiments described in the present paper. The pups were kept with their mothers until the day of sacrifice and had free access to feeding. The number of pups per litter was adjusted to eight soon after birth; this reduces the effect of litter size on each animal's postnatal growth. Chronic protein-caloric under nutrition was achieved by following the protocol described in detail elsewhere (Manjarrez et al., 1988, 1994, 1996, 2001, 2003). To monitor the effectiveness of the dietary restriction, body weight gain was recorded every 2 days during 11 days, and brain L-tryptophan and serotonin levels were determined in S1 through the use of HPLC analyses as described previously (Gutiérrez-Ospina et al., 2002). The rats were bred in the animal facility located at the Centro de Investigación y de Estudios Avanzados (CINVESTAV), Instituto Politécnico Nacional where they were maintained at temperature (22 ± 2 °C), humidity (50–69%) and in light controlled rooms (12 h light on/12 h light off). All of the animal procedures used followed the norms for the care and use of experimental animals published by the National Institutes of Health (USA). The protocols were approved by local animal's rights committee's at the CINVESTAV.

2.2. Tracing the thalamo-cortical pathway

Control ($n = 8$) and undernourished ($n = 8$) rat pups were anesthetized and perfused at the ages of 1, 3, 5 and 7 days of life (PD). The perfusion was conducted through the heart using saline solution followed by buffered paraformaldehyde (4%). At the end of the procedure, the animals were decapitated and their heads placed into jars containing the same fixative; the jars were kept at room temperature. After a week, the heads were placed in a stereotaxic frame, and a single injection (0.5 μ l) of a solution (0.25%) of the lipophylic dye 4-(4-(dilinoleylamino) styryl)-N-methylpyridinium 4-chlorobenzenesulfonate (FAST DIA; Molecular Probes, In Vitrogen Detection Technologies) dissolved in ethanol was made into the ventro-basal complex of the thalamus (Keller et al., 1985). The heads were then returned to the light protected jars and kept in buffered paraformaldehyde for two more weeks at 37 °C. At the end of this time, vibratome coronal sections (150 μ m) containing S1 were prepared, mounted on gelatin-coated slides, and cover slipped with anti-fade mounting medium (VectaShield, Vector, Burlingame, CA, USA). The thalamo-cortical bundles labeled were identified in slices prepared from rats of the different groups. Observations were always made at equivalent anterior–posterior levels over the territory where barrels of the posteromedial barrel subfield (PMBSF) are located. Images were captured and digitized by using a Nikon Optiphot fluorescence microscope equipped with a digital camera (CoolPix 4300, 4.0 megapixels; Nikon).

2.3. Immunohistochemistry

Rat pups were anesthetized with pentobarbital (30 mg/kg of body weight) and perfused at PD 3, 5 and 7 ($n = 6$ per age) with normal saline followed by buffered paraformaldehyde (4%). The brains were removed, frozen in 2-methyl butane pre-chilled with dry ice and stored at -80 °C until use. The cortical mantles were dissected and post-fixed in the same fixative for 2 h at room temperature. On the day of the experiment, cortical coronal sections (30 μ m) were cut in a cryostat, mounted on to gelatin-coated slides and incubated at room temperature during 30 min in a buffered solution of hydrogen peroxide

(3%). After a thorough wash with phosphate buffer (PB; 0.1 M, pH 7.4), the sections were incubated with blocking solution (horse serum 3%, Triton X-100 0.3% in PB) for 14 h at room temperature. The blocking solution was then replaced by a solution containing the primary anti-sera raised in horse serum 3% and Triton X-100 0.3% in PB against 1:700 5-HT_{1B} receptor and 1:700 serotonin transporter (SERT), respectively. Primary antibodies (Chemicon, Temecula CA, USA) were used, diluted in blocking serum overnight at 4 °C. After 3 washes (10–15 min each) with PB, sections were incubated with the corresponding biotinylated secondary antibodies (Vector Laboratories), diluted 1:500 in a blocking solution. This incubation lasted for 2.5 h at room temperature. The ABC staining system and the DAB substrate kit (both from Vector Laboratories, Burlingame, CA) were used to detect the biotinylated antibodies and the activity of peroxidase, respectively, following the manufacturer's instructions. The enzymatic reaction was stopped after 2–3 min by washing several times in PB. Air-dried slides were cover slipped with Cytoseal 60 (Richard Scientific, Kalamazoo, MI). The sections were visualized and images of them were acquired using a Nikon Optiphot-2 microscope equipped with a digital camera Cool Pix 4300 (Nikon, Melville, NY).

2.4. Analyses of densitometry

The sections stained with immunohistochemical methods were analyzed by means of computer assisted densitometry (Image J, NIH) at the ages of PD3 and PD7. Images of every section containing PMBSF barrels were captured and digitized. Bright and dark images were used to correct for uneven illumination. Barrels were outlined individually through consecutive sections and the light transmittance measured within the outlined area by using computer-densitometry. The values of light transmittance obtained for each of the PMBSF barrels were averaged per animal and group means were estimated thereafter. To correct for intrinsic variations of the staining, the values of transmittance obtained for cortical layers different from layer IV were subtracted from those obtained for layer IV. In this study, the corrected values are reported in arbitrary units of optical density. Because variations in immunohistochemical labeling might result from differences in the amount of peroxidase available, we first determined densitometrically the saturation point of the peroxidase reaction at PD3 and PD7. The saturation point was reached after 5 min of incubation at room temperature. Based upon these results, we decided to stop the peroxidase reaction after 2.5 min. All of the measurements and analyses were performed blindly to avoid observer bias.

2.5. Statistical methods

Average densitometric data obtained for each group were analyzed by using Student's *t*-test and Mann–Whitney U tests, setting the significance value at $p < 0.05$.

3. Results

The graphs in Fig. 1 depict body weight gain, L-tryptophan and serotonin concentrations in control rats and in rats subjected to nutritional restriction. As can be seen, body weight gaining was significantly reduced as a consequence of the nutritional restriction. In accord with previous findings, undernourished rats also showed significant increments in L-tryptophan and serotonin concentration in the S1 (Gutiérrez-Ospina et al., 2002). These results corroborate the effectiveness of the nutritional paradigm used to affect body growth and brain serotonin levels.

The cortical territories that will become specified as barrels are primarily blueprinted by the somatosensory thalamo-cortical afferents (Killackey and Belford, 1979). Delayed appearance of barrels in the undernourished rat may reflect late growth of the afferent pathway into the cortex. To evaluate this possibility, somatosensory thalamo-cortical axons were traced with DiA. Their development was followed between the ages of

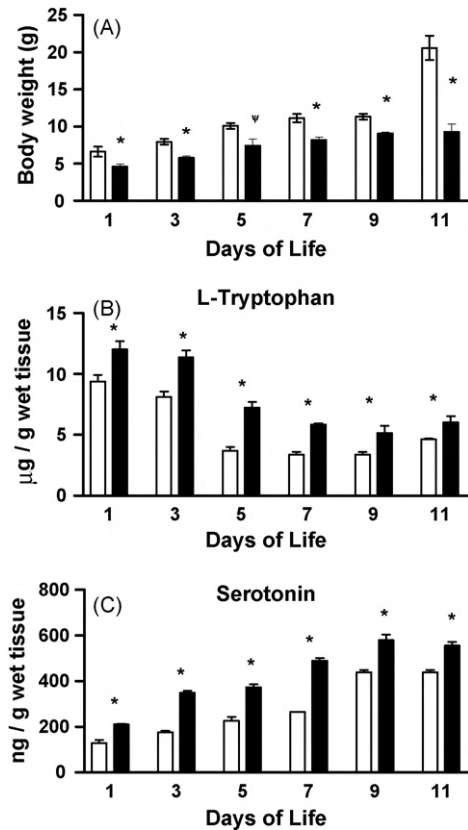


Fig. 1. (A) Bar graph illustrating the gain of body weight. Each bar represents the average values \pm S.D. of 32 animals per age depicted. (B) L-Tryptophan and (C) serotonin concentrations in S1 of control (\square) and undernourished rats (\blacksquare). Each bar represents the average value \pm S.D. from six experiments made in duplicate. Differences were determined by Student's *t*-test. $^{\psi}p < 0.05$; $^*p < 0.001$.

1–11 days. As shown in Fig. 2, DiA labeled axons in undernourished rats reached layer IV of S1 by PD3 and segregate into columns by PD5 as also occurred in control rats.

Serotonin controls the growth of somatosensory thalamo-cortical axons (Cases et al., 1996; Levitt et al., 1997; Vitalis and Parnavelas, 2003). The trophic effect of serotonin is mediated by the 5HT_{1B} receptors (5HT_{1B}; Salichon et al., 2001; Rebsam et al., 2002). SERT, on the other hand, may make available serotonin to thalamo-cortical nerve terminals by up taking it. It is possible that these terminals might in turn re-release serotonin affecting its own growth (the theory of the borrowed neurotransmitter; Lebrand et al., 1996). We then followed the developmental pattern of protein expression of the SERT and 5HT_{1B} receptor in barrels of control and undernourished rats at the ages of 1, 3, 5, 7, 9 and 11 days of life using immunohistochemistry. Over all, a reduction in the intensity of the immunoreactivity for SERT was observed in the nutritionally restricted rats, as compared with their control counterparts during the period studied (Fig. 3). This qualitative observation was supported by a semi-quantitative study of densitometry carried out at PD3 (before barrels are fully formed in control rats) and PD7 (after the period of barrel formation in control rats). The receptor 5HT_{1B} showed a different pattern of staining. The intensity of the immunoreactivity for this receptor

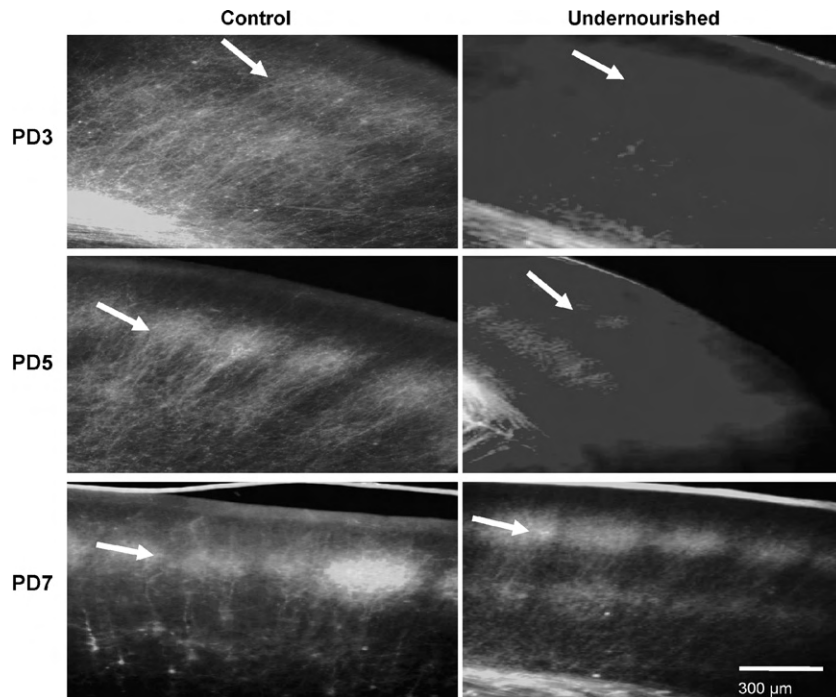


Fig. 2. Photomicrographs showing coronal section through of IV layer S1. The arrows illustrate a group DiA labeled thalamo-cortical axons in control and undernourished rats at ages 3, 5 and 7 days of life.

was slightly higher in undernourished rats before PD7 and significantly lower after this age. This impression was corroborated by a semi-quantitative study of densitometry performed at PD3 and PD7 (Fig. 4).

4. Discussion

The effects of nutritional restrictions of various sorts on the brain developmental morphology, function and neurochemistry

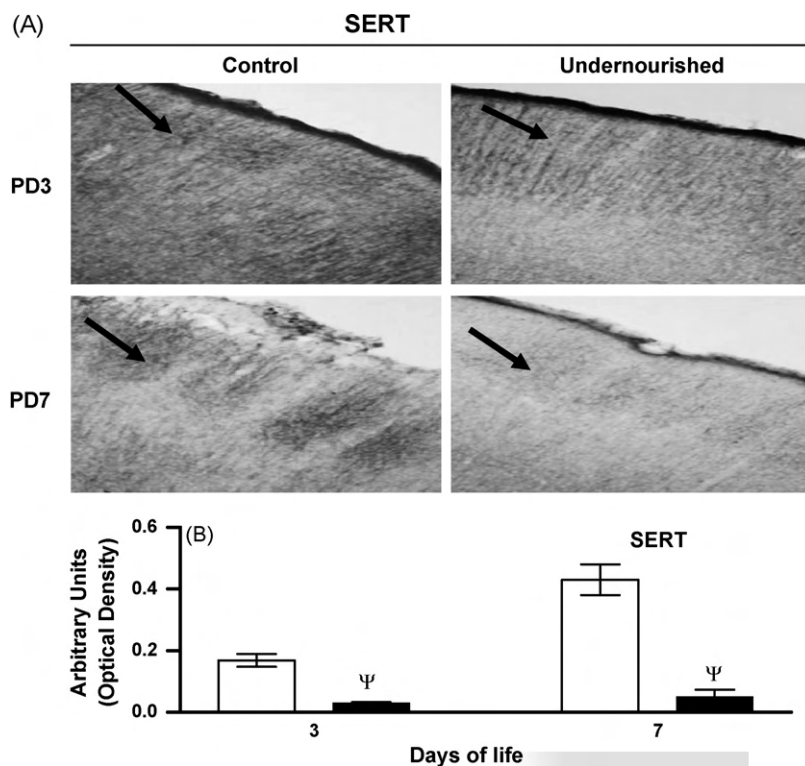


Fig. 3. (A) Photomicrographs of coronal section through IV layer of S1. The arrows show immunoreactive thalamo-cortical fibers for SERT. (B) Bar graph that illustrates the arbitrary units of optical density of SERT at ages 3 and 7 days of life. Each bar represents of average values ± S.D. of 20 images per animals. Empty bars control group; filled bars undernourished group. Differences were determined by Mann–Whitney U test. $\Psi p < 0.05$.

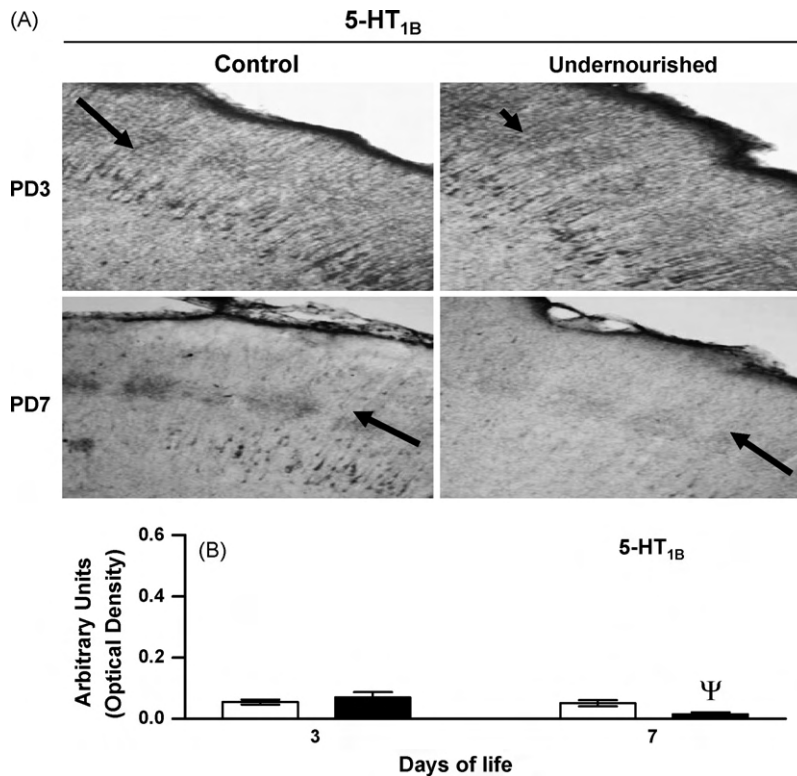


Fig. 4. (A) Photomicrographs of coronal section through IV layer of S1. The arrows illustrate immunoreactive thalamo-cortical axons for 5-HT_{1B}. (B) Bar graph shows the arbitrary units of optical density of 5-HT_{1B} at ages 3 and 7 days of life. Each bar represents of average values \pm S.D. of 20 images per animals. Empty bars control group; filled bars undernourished group. Differences were determined by Mann–Whitney U test. * $p < 0.05$.

have long been studied and thoroughly documented (Morgane et al., 1978, 2002). A concept that emerges from these studies is that prenatal, postnatal or chronic undernourishment retards to different degrees the rate of brain developmental events. In clear contradiction with this view, our results show that delayed barrel formation in nutritionally restricted rat pups does not result from a retarded growth of somatosensory thalamo-cortical axons, since they enter the cortex and then segregate at times comparable with those observed in the normally fed pups. Because barrel emergence not only depends upon the segregated growth and arrival of the somatosensory thalamo-cortical afferents into S1 (Woolsey and Van Der Loos, 1970; Killackey et al., 1995; Erzurumlu and Kind, 2001), but also on the remodeling of dendrites that arise predominantly from stellate neurons located in layer IV (Woolsey and Van Der Loos, 1970; Killackey et al., 1995; Erzurumlu and Kind, 2001), our observations support that undernourishment mainly postpones dendritic remodeling by 2 days (Gutiérrez-Ospina et al., 2002). This would lead to delayed barrel formation. Hence, it appears reasonable to conclude that nutritional restriction does not necessarily delay the progression of all brain developmental processes.

What could be the mechanism by which nutritional restriction affects dendrite remodeling? Our results do not directly address this important issue. However, a hint may come from observations made in NMDA receptor knockout mice in which the formation of barrels is also delayed in spite of the normal arrival and development of the somatosensory thalamo-

cortical pathway (Datwani et al., 2002). In these mice, dendrites of layer IV spiny neurons do not remodel on time thus barrels also form later. Because the inadequacy of the glutamatergic transmission is the most likely cause of the dislodgement of the developmental processes of axons and dendrites in the barrel cortex of NMDA receptor knockout mice, one can infer that glutamate functions as a synchronizing signal that coordinates axon and dendrite development. It is unclear if something similar indeed occurs in S1 of nutritionally restricted rats. However, the studies showing that (1) under nutrition decreases glutamate basal availability and binding (Rotta et al., 2003), (2) serotonin depresses the presynaptic release of glutamate by means of the activation of 5HT_{1B} receptors (Laurent et al., 2002) and (3) serotonin availability is greater in nutritionally restricted rat pups (Gutiérrez-Ospina et al., 2002) provide support to this possibility. In addition, in this work we showed that the immunoreactivity for 5HT_{1B} receptors in barrels tends to be higher at PD3 and then drops by PD7 in nutritionally restricted rats, as compared with their control counterparts. Therefore, it might be that glutamate availability and its synchronizing effect on barrel axon–dendrite development are reduced as a result of an increased serotonergic tone around PD3 in nutritionally restricted rats. The opposite could be true around PD7. As a whole this would result in disturbed barrel formation in nutritionally restricted rats.

A puzzling result obtained in the present work is that SERT immunoreactivity was found to be reduced at PD3 and PD7. SERT is thought to partly mediate serotonin actions on the

segregation and growth of somatosensory thalamo-cortical afferents (Xu et al., 2004). Nevertheless, thalamo-cortical afferent segregation was not affected in nutritionally restricted rats. We think that this is explained because serotonin and 5HT_{1B} receptors tend to increase during the time when segregation of the somatosensory thalamo-cortical afferents takes place (Manjarrez et al., 2003; Bolaños et al., 1997). A reduction in barrel size occurs, however, in the S1 of undernourished animals (Vondokmai, 1980). The decrease in SERT and 5-HT_{1B} receptor availability observed at later developmental times in nutritionally restricted rats might well prevent proper trophic functions of serotonin on the somatosensory thalamo-cortical afferents after barrel specification. This idea is compatible with data that shows that serotonin enhances the growth of somatosensory thalamo-cortical afferents and its depletion leads to smaller barrels (Bennett-Clarke et al., 1995). Under the light of these morphological observations, it is also important to briefly comment that increased availability of serotonin in nutritionally restricted rats is likely to result from a dual mechanism, namely, increased serotonin synthesis (Hernández, 1973, 1979; Manjarrez et al., 1988, 1994, 1996, 2003) and reduced uptake.

Finally, we believe that our results suggest that barrels are assembled according to a two step model in which the first step is for axons to pin point potential territories to be occupied by barrels, and the second step is for dendrites to specify the boundaries of such territories. In this model, axons and dendrites may grow partly independent from each other (see also Ye and D'Ercole (2006)). This circumstance explains why they may be affected differentially by nutritional restriction. This idea is supported by previous findings that show that axons and dendrites that share synaptogenic fields may be ready to form synapses at different times (Datwani et al., 2002), and so they may have slightly different critical periods that could make them differentially vulnerable to external influences (e.g., Erisir and Dreusicke, 2005; Ye and D'Ercole, 2006; Katagiri et al., 2007) among them the nutritional status.

Acknowledgments

The authors are grateful to Dr. Edmund Glaser for editing the manuscript and to Patricia Padilla, Ignacio Vargas, Rafael Leyva and Nydia Hernandez Rios for technical assistance. This research was supported by a grant from Mexican Institute of Social Security (IMSS – 2004/055) and from Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT; 45872-M to GGO). IMA was a fellow from CONACyT.

References

Agmon, A., Yang, L.T., O'Dowd, D.K., Jones, E.G., 1993. Organized growth of thalamocortical axons from the deep tier of terminations into layer IV of mouse barrel cortex. *J. Neurosci.* 13, 5365–5382.
 Agmon, A., Yang, L.T., Jones, E.G., O'Dowd, D.K., 1995. Topological precision in the thalamic projection to neonatal mouse barrel cortex. *J. Neurosci.* 15, 549–561.

Bennett-Clarke, C.A., Lane, R.D., Rhoades, R.W., 1995. Fenfluramine depletes serotonin from the developing cortex and alters thalamocortical organization. *Brain Res.* 702, 255–260.
 Bernardo, K.L., McCasland, J.S., Woolsey, T.A., 1990a. Local axonal trajectories in mouse barrel cortex. *Exp. Brain Res.* 82 (2), 247–253.
 Bernardo, K.L., McCasland, J.S., Woolsey, T.A., Strominger, R.N., 1990b. Local intra- and interlaminar connections in mouse barrel cortex. *J. Comp. Neurol.* 291 (2), 231–255.
 Bolaños, J.F., Choi, S.D., Maroteau, L., 1997. Preferential expression of 5-HT_{1D} over 5-HT_{1B} receptors during early embryogenesis. *Neuroreport* 8, 3655–3660.
 Cases, O., Vitis, I., Seif, E., De Maeyer, C., Gaspar, P., 1996. Lack of barrels in the somatosensory cortex of monoamine oxidase A-deficient mice: role of serotonin excess during the critical period. *Neuron* 16, 297–307.
 Datwani, A., Iwasato, T., Itoharu, S., Erzurumlu, R.S., 2002. NMDA receptor-dependent pattern transfer from afferents to postsynaptic cells and dendritic differentiation in the barrel cortex. *Mol. Cell Neurosci.* 21, 477–492.
 Erisir, A., Dreusicke, M., 2005. Quantitative morphology and postsynaptic targets of thalamocortical axons in critical period and adult ferret visual cortex. *J. Comp. Neurol.* 485 (1), 11–31.
 Erzurumlu, R.S., Kind, P.C., 2001. Neural activity: sculptor of “barrels” in the neocortex. *TINS* 24 (10), 589–595.
 Greenough, W.T., Chang, F.L., 1988. Dendritic pattern formation involves both oriented regression and oriented growth in barrels of mouse somatosensory cortex. *Brain Res.* 471, 148–152.
 Gutiérrez-Ospina, G.G., Manjarréz-Gutiérrez, G., González, C., López, S., Herrera, R., Medina-Aguirre, I., Hernández-R, J., 2002. Neither increased nor decreased availability of cortical serotonin (5HT) disturbs barrel field formation in isocaloric undernourished rat pups. *Int. J. Dev. Neurosci.* 20, 497–501.
 Hernández, R.J., 1973. Developmental pattern of the serotonin synthesizing enzyme in the brain of postnatally malnourished rats. *Experientia* 29, 1487–1488.
 Hernández, R.J., 1979. Ontogenetic malnutrition and interaction of monoamines and enzymes in the brain. In: Usdin, E., Kopin, J.I., Barchas, J. (Eds.), *Catecholamines Basic and Clinical Frontiers*. Pergamon Press, Oxford, pp. 830–832.
 Katagiri, H., Fagiolini, M., Hensch, T.K., 2007. Optimization of somatic inhibition at critical period onset in mouse visual cortex. *Neuron* 53 (6), 805–812.
 Keller, A., White, E.L., Cipolloni, P.B., 1985. The identification of thalamocortical axons terminals in barrels of mouse Sml cortex using immunohistochemistry of anterogradely transported lectin (*Phaseolus vulgaris leucoagglutinin*). *Brain Res.* 343, 159–165.
 Killackey, H.P., Belford, G.R., 1979. The formation of afferent patterns in the somatosensory cortex of the neonatal rat. *J. Comp. Neurol.* 183 (2), 285–303.
 Killackey, H.P., Belford, G.R., 1980. The sensitive period in the development of the trigeminal system of the neonatal rat. *J. Comp. Neurol.* 193 (2), 335–350.
 Killackey, H.P., Rhoades, R.W., Bennett-Clarke, C.A., 1995. The formation of a cortical somatotopic map. *TINS* 18 (9), 402–407.
 Lane, R.D., Chiaia, N.L., Kesterson, K.L., Rhoades, R.W., Mooney, R.D., 2006. Boundary-limited serotonergic influences on pattern organization in rat sensory cortex. *Neurosci. Lett.* 395 (2), 165–169.
 Laurent, A., Goillard, J.M., Cases, O., Lebrand, C., Gaspar, P., Ropert, N., 2002. Activity-dependent presynaptic effect of serotonin 1B receptors on the somatosensory thalamocortical transmission in neonatal mice. *J. Neurosci.* 22 (3), 886–900.
 Lebrand, C., Cases, O., Adelbrecht, C., Doye, A., Alvarez, C., Mestikawy, E.S., Seif, I., Gaspar, P., 1996. Transient uptake and storage of serotonin in developing thalamic neurons. *Neuron* 17, 823–835.
 Levitt, P., Harvey, J.A., Friedman, E., Simansky, k., Murphy, E.H., 1997. New evidence for neurotransmitter influences on brain development. *Trends Neurosci.* 20, 269–274.
 Manjarrez, G.G., Chagoya, G.G., Hernández, R.J., 1988. Perinatal brain serotonin metabolism in rats malnourished in utero. *Biol. Neonate* 54, 232–240.

- Manjarrez, G.G., Chagoya, G.G., Hernández, J., 1994. Early nutritional changes modify the kinetics and phosphorylation capacity of tryptophan-5-hydroxylase. *Int. J. Dev. Neurosci.* 12 (8), 695–702.
- Manjarrez, G.G., Magdalena, V.M., Chagoya, G., Hernández, J., 1996. Nutritional recovery does not reverse the activation of brain serotonin synthesis in the ontogenetically malnourished rat. *Int. J. Dev. Neurosci.* 14 (5), 641–648.
- Manjarrez, G.G., Hernández, Z.E., Robles, O.A., González, R.M., Hernández, R.J., 2001. Development impairment of auditory evoked N1/P2 component in rats undernourished in utero: its relation to brain serotonin activity. *Dev. Brain Res.* 127, 149–155.
- Manjarrez, G.G., Manuel, A.L., Mercado, C.R., Hernández, R.J., 2003. Serotonergic receptors in the brain of in utero undernourished rats. *Int. J. Dev. Neurosci.* 21 (5), 283–389.
- Miller, M.W., Pitts, F.A., 2000. Neurotrophin receptors in the somatosensory cortex of the mature rat: co-localization of p75, trk isoforms and c-neu. *Brain Res.* 852 (2.), 355–366.
- Morgane, P.J., Miller, M., Kemper, T., Stern, W., Forves, W., Hall, R., Bronzino, J., Kissane, J., Hawrylewicz, E., Resnick, O., 1978. The effects of protein malnutrition on the developing central nervous system in the rat. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 2, 137–230.
- Morgane, P.J., Mokler, D.J., Galler, J.R., 2002. Effects of prenatal protein malnutrition on the hippocampal formation. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 26, 471–483.
- Patel-Vaidya, U., 1985. Ultra structural organization of posterior and anterior barrels in the somatosensory cortex of rat. *J. Neurosci. Res.* 14 (2), 357–371.
- Rebsam, A., Seif, I., Gaspar, P., 2002. Refinement of thalamocortical arbors and emergence of barrel domain in the primary somatosensory cortex: a study of normal and monoamine oxidase a knock-out mice. *J. Neurosci.* 22 (19), 8541–8552.
- Rotta, L.N., Schmidt, A.P., Souza, T.M., Nogueira, C.W., Souza, K.B., Izquierdo, I.A., Perry, M.L.S., Souza, D.O., 2003. Effects of undernutrition on glutamatergic parameters in rat brain. *Neurochem. Res.* 28 (8), 1181–1186.
- Salichon, N., Gapar, P., Upton, A.L., Picaud, S., Hanoun, N., Hamon, M., DeMaeuer, E., Murphy, D.L., Mossner, R., Lesch, K.P., Hen, R., Seif, I., 2001. Excessive activation of serotonin (5-HT) 1B receptors disrupts the formation of sensory maps in monoamine oxidase and 5-HT transporter knock-out mice. *J. Neurosci.* 21, 884–896.
- Senft, S.L., Woolsey, T.A., 1991. Mouse barrel cortex viewed as dirichlet domains. *Cereb. Cortex* 1 (4), 348–363.
- Vitalis, T., Parnavelas, J., 2003. Serotonin and cortical development. *Exp. Neurol.* 25, 245–256.
- Vondokmai, R., 1980. Effects of protein malnutrition on development of mouse cortical barrels. *J. Comp. Neurol.* 191, 283–294.
- White, E.L., Peters, A., 1993. Cortical modules in the posteromedial barrel subfield (Sml) of the mouse. *J. Comp. Neurol.* 334 (1), 86–96.
- White, E.L., Weinfeld, E., Lev, D.L., 2004. Quantitative analysis of synaptic distribution along thalamocortical axons in adult mouse barrels. *J. Comp. Neurol.* 479 (1), 56–69.
- Woolsey, T., 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.
- Woolsey, T.A., Dierker, M.L., Wann, D.F., 1975. Mouse Sml cortex: quantitative and quantitative classification of Golgi-impregnated barrel neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 72 (6), 2165–2169.
- Xu, Y., Sari, Y., Zhou, C., 2004. Selective serotonin inhibitor disrupts organization of thalamocortical somatosensory barrels during development. *Dev. Brain Res.* 150, 151–161.
- Ye, P., D'Ercole, A.J., 2006. Insulin-like growth factor actions during development of neural stem cells and progenitors in the central nervous system. *J. Neurosci. Res.* 83 (1), 1–6.