

# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

# CAMBIOS GLOBALES EN LA NEUROTRANSMISIÓN Y EN LA MADURACIÓN FUNCIONAL DE LAS NEURONAS SOMATOSENSORIALES CORTICALES DURANTE EL PERIODO DE FORMACIÓN DE LOS BARRILES EN RATAS ENUCLEADAS AL NACIMIENTO

T E S I S

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE DOCTORA EN CIENCIAS PRESENTA:

# **RAQUEL MARTÍNEZ MÉNDEZ**

DIRECTOR DE TESIS: DR. GABRIEL GUTIÉRREZ OSPINA INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

COMITÉ TUTOR:

DRA. CLORINDA ARIAS ÁLVAREZ INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

> DRA. LOURDES MASSIEU TRIGO INSTITUTO DE FISIOLOGÍA CELULAR

CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX., JUNIO DE 2020



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.

# Agradecimientos

Al Dr. Gabriel Gutiérrez Ospina por su asesoría, apoyo y confianza a lo largo de todos estos años, por todas las enseñanzas y por las estimulantes pláticas sobre el proyecto y temas diversos.

A las Dras. Lourdes Massieu Trigo y Clorinda Arias Álvarez, de mi comité tutoral, por su apoyo, comentarios y sugerencias a lo largo del desarrollo de este proyecto.

A los Dres. Miguel Ángel Morales Mendoza, Violeta Gisselle López Huerta, Mónica Andrea López Hidalgo y Gabriel Roldán Roldán por revisar esta tesis y por sus valiosos comentarios.

Al M. en C. Daniel Pérez Torres por su enorme ayuda en la parte experimental, que consistió en medir y analizar los cambios en la concentración intracelular de Ca<sup>2+</sup>, y por las interesantes discusiones sobre el proyecto.

A la Dra. Margarita Gómez Chavarín por todo su apoyo en la parte experimental, en particular por la obtención y procesamiento del tejido con la técnica histoquímica para detectar la actividad de la enzima acetilcolinesterasa, y su disposición y entusiasmo para colaborar en lo que fuera necesario para concluir el proyecto.

A la M. en C. Patricia Padilla Cortés, de la Unidad de HPLC, Instituto de Investigaciones Biomédicas, por la cuantificación de los neurotransmisores en tejido y el LCE.

A la Dra. Tatiana Fiordelisio Coll por su colaboración en los experimentos de medición de calcio intracelular.

Al Dr. Jesús Ramírez Santos por el apoyo en la elaboración de pedidos de reactivos, ratas y otros asuntos administrativos.

L

Al Dr. Miguel Tapia Rodríguez, Unidad de Microscopía, Instituto de Investigaciones Biomédicas, por su apoyo en la captura de imágenes.

A la M.V.Z. Claudia V. Rivera Cerecedo y al resto del personal del Bioterio del Instituto de Fisiología Celular, de donde se obtuvieron la mayor parte de las ratas empleadas en este estudio.

Al personal de la Unidad de Modelos Biológicos del Instituto de Investigaciones Biomédicas.

Al personal de la biblioteca del Instituto de Investigaciones Biomédicas.

A mis compañeros y amigos del laboratorio, por las conversaciones sobre ciencia y diversos temas, y por hacer de ese espacio no sólo un lugar de trabajo sino de convivencia y aprendizaje constante. Son muchos los que han pasado por el laboratorio en todos los años que estuve ahí y cada uno ha aportado algo. En particular quisiera mencionar a Silvia, Leonora, Dannia y Queletzu, el grupo de apoyo moral, desahogo de penas y noches de sushi; a Margarita y a Daniel por darme ánimos y apoyarme con experimentos clave que permitieron concluir esta tesis; y a Zan y Jesús, por las charlas amenas y por seguir haciendo que me sienta parte del laboratorio cada vez que voy de visita.

I would also like to thank Prof. Jordan Ward for giving me the opportunity to join his lab, for the guidance and feedback during my academic stay and for his continuous support to this day. That year working with worms was a wonderful experience that helped me recover the confidence in me and my interest for science, and I think that was largely thanks to the great environment promoted by Jordan and the rest of the lab members.

Por último, quisiera agradecer infinitamente el amor y apoyo de mi familia y amigos. A mi esposo David, que has recorrido este camino conmigo y vivido de cerca los altibajos de esta etapa, gracias por tu amor y apoyo incondicional a lo largo de estos años. A mis papás, que han sido un ejemplo

П

y fuente de motivación a lo largo de mi vida, gracias por darme las bases para llegar hasta donde estoy y por apoyarme siempre. A mis amigos cercanos, contar con ustedes ha sido siempre muy importante para mí, gracias por escucharme y animarme cuando lo he necesitado.

# Financiamiento

El presupuesto para la ejecución de este proyecto de investigación fue proporcionado por el Instituto de Investigaciones Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Durante mi proyecto de doctorado recibí una beca (No. 50165) del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT).

# Tabla de contenido

AGRADECIMIENTOS	I
FINANCIAMIENTO	IV
RESUMEN	1
ABSTRACT	2
INTRODUCCIÓN	3
ANTECEDENTES GENERALES Y PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	4
Generalidades de la cequera en distintos modelos experimentales	4
Región de estudio: la corteza somatosensorial primaria (S1) de la rata	5
Efecto de la enucleación bilateral perinatal en el desarrollo de la S1	7
PARTE 1. PAPEL DE LA SEROTONINA EN EL PROCESO DE EXPANSIÓN DE LA CORTEZA SOMATOSENSORIAL PRIMARIA DE RATAS ENUCLEADAS AL NACIMIENTO	9
1-1. ANTEDECENTES	9
Efecto trófico de la serotonina sobre las ATCs	9
1-2. Pregunta	10
1-3. HIPÓTESIS	10
1-4. OBJETIVO GENERAL	10
1-5. OBJETIVOS PARTICULARES	11
1-6. Materiales y métodos	11
Animales	
Cuantificación de la concentración de serotonina en la S1	
Cuantificación del receptor 5-HT <sub>1B</sub> en la S1	
Bloqueo de los receptores 5-HI <sub>1B</sub>	
Analisis estadístico	1/
I-7. RESULIADOS	17
La concentración de servicinina en la S1 de racias enaciendas distrinnaye a los DF0 y 8	17
La colocación de parches de ELVAX sobre la S1 de ratas neonatas ocasiona una disminución del tamaño	
cerebral	
El ejecto de la daministración sistemica de un antagonista de los receptores SH1 <sub>1B</sub> no pudo evaluarse adecuadamente	20
1-8 Discussión	
1-9 CONCLUSIONES DE LA PARTE 1	22 24
PARTE 2. EVALUACIÓN DE CAMBIOS EN LOS NIVELES DE NEUROTRANSMISORES Y EN LA ACTIVIE NEURONAL ESPONTÁNEA ASOCIADOS CON MODIFICACIONES EN LA TEMPORALIDAD DEL DESARROLLO DE LOS BARRILES	)AD 25
2-1. ANTECEDENTES	25
Desarrollo postnatal de la S1 y efectos de la enucleación bilateral en su temporalidad	
Participación de los neurotransmisores en la formación de los barriles, plasticidad cerebral y temporalid procesos del desarrollo	'ad de 29
Participación de la actividad neuronal en la formación de los barriles, plasticidad cerebral y temporalida procesos del desarrollo.	ıd de 
2-2. Preguntas	
2-3. Hipótesis	

2-4. OBJETIVO GENERAL	35
2-5. OBJETIVOS PARTICULARES	35
2-6. Materiales y métodos	
Animales	
Cuantificación de la concentración de serotonina, glutamato y GABA en la S1 y el LCE	
Evaluación de la actividad espontánea en la S1	
Evaluación de la temporalidad de segregación de las ATCs y su avance a través de la corteza	
Análisis estadístico	
2-7. Resultados	42
La concentración de glutamato en el LCE disminuye al DP1 en ratas enucleadas perinatalmente La amplitud de los potenciales espontáneos de Ca²+ disminuye al DP1 en la S1 de ratas enucleadas	42
perinatalmente	44
La enucleación no afecta el tiempo de segregación de las ATCs ni su crecimiento antes de la formació	in del
barril	46
2-8. Discusión	48
2-9. Perspectivas	52
REFERENCIAS	53
APÉNDICE 1	60
FIGURAS SUPLEMENTARIAS	60
APÉNDICE 2	62
LISTA DE PUBLICACIONES CIENTÍFICAS PRODUCIDAS DURANTE EL PROGRAMA DE DOCTORADO	62
Artículos originales	62
Revisiones o capítulos de libro	62
APÉNDICE 3	63
ARTÍCULO CIENTÍFICO ORIGINAL ACEPTADO PARA OBTENER EL GRADO	63

## Resumen

En los mamíferos, la pérdida de la visión en etapas tempranas del desarrollo postnatal conduce a una reorganización extensa del cerebro. Ésta se manifiesta, en parte, como una expansión de la corteza somatosensorial primaria (S1), la cual resulta de su formación prematura, aunada, posiblemente, al crecimiento exacerbado de las aferentes tálamo-corticales somatosensoriales (ATCs). Si bien los procesos generales que subyacen a la expansión de la S1 en ratas enucleadas perinatalmente han sido identificados, sus elementos reguladores no se conocen. Se sabe, sin embargo, que neurotransmisores tales como el glutamato, la serotonina y el GABA, junto con la actividad neuronal espontánea, ejercen potentes efectos sobre los patrones de ramificación y las tasas de crecimiento neuronales. Así, es posible que estos elementos pudieran ser responsables de inducir la expansión de la S1 en ratas cegadas al nacimiento. Como una primera aproximación para evaluar su participación en este proceso, evaluamos los niveles de glutamato, GABA y serotonina en la S1 y en el líquido cerebroespinal (LCE) de ratas controles y enucleadas durante el proceso de formación de los barriles, estructuras citoarquitectónicas que procesan los estímulos sensoriales en la S1. Durante este periodo, se evaluó también el patrón de actividad espontánea en la S1. Por último, se buscaron datos anatómicos que indicaran si la tasa de crecimiento o la maduración de las ATCs diferían entre ratas control y enucleadas al nacimiento. Nuestros resultados muestran que en el cerebro de los individuos enucleados hay cambios transitorios a nivel de la neurotransmisión y de la actividad espontánea durante el periodo de formación de la S1. Específicamente, observamos que la concentración de glutamato disminuye en el LCE de las ratas enucleadas al día postnatal (DP) 1, al igual que la amplitud de los potenciales espontáneos de Ca<sup>2+</sup> en la S1. Por otra parte, no se documentaron cambios en la tasa de crecimiento de las ATCs durante el proceso de formación de los barriles, indicando que los cambios anatómicos que conducen a la formación temprana de los barriles ocurren principalmente a nivel cortical. Estos resultados abren la posibilidad de que la formación anticipada de la S1 y su consecuente expansión en ratas enucleadas perinatalmente esté coordinada, en parte, por cambios en los niveles globales de glutamato y en la actividad espontánea cortical.

# Abstract

Vision loss in early mammalian development leads to an extensive brain reorganization, where the primary somatosensory cortex (S1) expands. This expansion results from the precocious formation of S1, probably combined with an increase in the thalamocortical afferents (TCAs) growth rate. Though the general processes underlying S1 expansion in perinatally enucleated rats have been elucidated, their regulatory elements are not well understood. Neurotransmitters like glutamate, serotonin and GABA, together with neural spontaneous activity, have a strong influence on the growth rate and ramification of neuronal processes, so it is possible that they participate in the S1 expansion in enucleated rat pups. As a first approach to evaluate their participation in this process, we measured glutamate, GABA and serotonin levels in the S1 and cerebrospinal fluid (CSF) of control and enucleated rats during the period of barrel formation (barrels are the cytoarchitectonic units that process somatosensory stimuli in the S1 of some rodents). We also evaluated the patterns of neural spontaneous activity in the S1 during the same timeframe. Lastly, we searched for anatomical cues indicating if an increase in the growth or maturation rate of TCAs is indeed happening. Our results showed that CSF glutamate levels and S1 spontaneous spike amplitude decrease at PD1, indicating that there are transient changes in neurotransmission and spontaneous activity in the brain of enucleated rat pups during barrel formation. On the other hand, the growth rate and segregation timing of TCAs were unaffected by enucleation, suggesting that the anatomical changes leading to precocious barrel formation occur mainly at the cortical level. These results open the possibility that the precocious barrel formation and the consequent S1 expansion in perinatally enucleated rat pups is coordinated, at least partially, by changes in global glutamate and cortical spontaneous activity levels.

# Introducción

La plasticidad se refiere a la capacidad que tienen los seres vivos de cambiar en respuesta a la experiencia. Esta capacidad de cambio es fundamental porque permite a los individuos ajustar sus variables biológicas en función de las variaciones ambientales y corporales. Siendo el sistema nervioso el encargado de integrar en gran parte la información proveniente del ambiente con las señales internas del cuerpo, es de esperarse que sea uno de los órganos en los que más se vea reflejada esta capacidad de cambio.

La magnitud de la reorganización cerebral depende del tipo de evento que la desencadena y de cuándo ocurre este evento en la vida del individuo. En ciertas circunstancias, como en el caso de daño a algún sistema sensorial, las respuestas plásticas ocurren no sólo en las áreas cerebrales encargadas de procesar información proveniente de la modalidad sensorial afectada, sino que se abarcan otras modalidades sensoriales, fenómeno conocido como plasticidad intermodal. Si bien la fenomenología de la plasticidad intermodal ha sido ampliamente documentada, los mecanismos celulares y moleculares que la subyacen no se conocen por completo. Por ello, la presente tesis tuvo como objetivo elucidar algunos de ellos.

# Antecedentes generales y planteamiento del problema

#### Generalidades de la ceguera en distintos modelos experimentales

La pérdida de la visión en los mamíferos conduce a una reorganización morfológica y funcional extensa del cerebro, en la que hay modificaciones no sólo en las áreas visuales afectadas sino también en zonas del cerebro encargadas de procesar estímulos de otras modalidades sensoriales (Bronchti et al., 1992; Dehay et al., 1996; Rauschecker and Korte, 1993).

El sistema visual de los mamíferos está compuesto por los ojos, el nervio óptico, el núcleo geniculado lateral y la corteza visual. La luz se transduce en señales eléctricas por las células fotorreceptoras de la retina. Estas señales son enviadas a las neuronas bipolares y de ahí a las neuronas ganglionares de la retina, cuyos axones se agrupan en el nervio óptico. El nervio óptico transmite la información visual al núcleo geniculado lateral dorsal del tálamo y de ahí la información viaja hacia la corteza visual primaria. Parte de la información de la retina llega también a otras áreas subcorticales como la zona pretectal, que controla el reflejo pupilar, al núcleo supraquiasmático del hipotálamo, que regula los ciclos circadianos, y al colículo superior, que coordina los movimientos de los ojos y la cabeza (Purves et al., 2001).

La magnitud de la reorganización cerebral en respuesta a daños en el sistema visual depende del grado de afectación y de la etapa del desarrollo en la que se produzca (Martínez-Méndez et al., 2013). Por ejemplo, la pérdida total de la visión en etapas tempranas del desarrollo por daño severo a los ojos o la retina conduce a una reorganización del sistema nervioso a todos los niveles, desde ajustes morfológicos hasta funcionales. Entre los cambios morfológicos se observan modificaciones en el tamaño y la conectividad de diversas regiones cerebrales (Berman, 1991; Dehay et al., 1996; Trevelyan and Thompson, 1995) y cambios en el número, tamaño y distribución de neuronas, espinas dendríticas y sinapsis (Fukuda and Hsiao, 1984; Hsiao and Fukuda, 1984; Sorensen et al., 2003). Con relación a las modificaciones a nivel funcional, se observan cambios en la actividad de las neuronas y ajustes en su metabolismo y bioquímica (Cooper and Thurlow, 1985; Toldi et al., 1993). De manera general, las regiones cerebrales encargadas de procesar estímulos visuales sufren una hipoplasia, lo que se refleja en una reducción de su volumen, y a su vez son reactivadas por estímulos de otras modalidades sensoriales (Bronchti et al., 2002; Newton et al., 2002; Yaka et al., 1999). Además, las estructuras subcorticales establecen conexiones inapropiadas entre ellas y con la corteza, y hay una expansión de las cortezas somatosensorial y auditiva primarias (S1 y A1, respectivamente) (Bronchti et al., 1992; Rauschecker and Korte, 1993).

Por otra parte, cuando los ojos están presentes pero hay una disminución de los estímulos visuales que llegan a V1 -por situaciones como daños en el cristalino, lesiones parciales en la retina o por medio de la crianza en oscuridad continua- los daños en el cerebro son más moderados: la degeneración de las estructuras cerebrales visuales es menor y, aunque sigue habiendo una expansión funcional de S1 y A1, no está acompañada de un aumento de tamaño o cambio de morfología en los elementos citológicos que las conforman (Martínez-Méndez et al., 2013).

Debido a que nuestra intención es entender el proceso a través del cuál los daños en la vía visual afectan a las regiones no relacionadas con el procesamiento de la información visual en el cerebro, y la reorganización de S1 y A1 es más evidente en ausencia total de estímulos visuales, elegimos como modelo experimental a la ceguera por enucleación bilateral, que consiste en la remoción quirúrgica de los globos oculares. La cirugía se realizó entre las 6 y 10 horas posteriores al nacimiento para evaluar los efectos de la pérdida de la visión en etapas tempranas del desarrollo.

#### Región de estudio: la corteza somatosensorial primaria (S1) de la rata

La corteza somatosensorial primaria de algunos roedores y marsupiales se ha utilizado extensivamente para evaluar los cambios intermodales producidos por los daños a otros sistemas sensoriales debido a que, en varias especies de estos órdenes de mamíferos, los componentes citoarquitectónicos de S1 están organizados en módulos bien definidos que pueden ser observados fácilmente mediante el empleo de diversas técnicas histológicas (Woolsey and Van

der Loos, 1970). Estas estructuras se denominan "barriles" y reflejan el acomodo de los receptores somestésicos en las áreas de la piel que son más utilizadas por los roedores y los marsupiales para la discriminación táctil (Fig. 1A). El daño a estos receptores sensoriales durante el desarrollo temprano se ve reflejado en el tamaño de los barriles, por lo que se puede medir de manera relativamente sencilla el efecto que tienen los cambios en la organización periférica sobre la morfología de S1 (Woolsey and Wann, 1976).

En el caso de los roedores, una gran parte del mapa corporal presente en la S1 está ocupado por los barriles que responden a los estímulos provenientes de los bigotes o vibrisas mistaciales (Fig. 1A). Estos barriles forman una zona bien definida y fácilmente identificable que se ha denominado subcampo de barriles posteromedial (PMBSF por sus siglas en inglés) (Woolsey and Van der Loos, 1970).

Los folículos de las vibrisas mistaciales están inervados por las neuronas del ganglio trigeminal, que envía la información sensorial hacia el núcleo trigémino, en el tallo cerebral (Fig. 1A). En este núcleo las neuronas están organizadas en módulos citoarquitectónicos llamados barreletas, conformados por los árboles axonales provenientes del nervio trigémino, con los cuerpos de las neuronas trigemino-talámicas rodeándolos. Estos módulos están acomodados siguiendo el patrón somatotópico de las vibrisas y cada uno responde principalmente a la estimulación de una sola vibrisa (Petersen, 2007). Las neuronas trigemino-talámicas envían a su vez sus proyecciones axonales hacia el núcleo ventroposteromedial (VPM) del tálamo, transmitiendo la información somestésica al siguiente relevo en el cerebro. Las neuronas somestésicas del tálamo también se encuentran organizadas en módulos que imitan la distribución de vibrisas en el hocico de los roedores y que se denominan barreolides. Las aferentes támalo-corticales (ATCs) llegan a la capa IV de la S1, en donde hacen contacto sináptico con las neuronas estrelladas espinosas (Fig. 1B y C) (Petersen, 2007).



**Figura 1. Sistema somatosensorial de la rata.** A) Relevos que llevan la información somatosensorial de las vibrisas mistaciales hacia la S1. El número ① representa a las neuronas del ganglio trigeminal (TG), que llevan la información sensorial desde los mecanorreceptores de la piel hacia el núcleo principal del trigémino (PrV) en el tallo cerebral. El segundo relevo está formado por los axones de las neuronas trigeminotalámicas ② que llevan la información hacia el núcleo ventroposteromedial del tálamo (VPM). Las aferentes tálamo-corticales (ATCs ③) llevan a su vez la información sensorial hacia la corteza somatosensorial primaria (S1), en donde forman los centros de los barriles (representados en rosa). La línea punteada color café muestra el sitio de corte que permite obtener una rebanada de cerebro que preserve la conectividad entre el VPM y la S1. B) Esquema de una rebanada tálamo-cortical que muestra a las neuronas tálamo-corticales (representadas en rojo) formando las paredes de los barreloides (círculos grises) en el VPM, y su proyección axonal hacia la S1. C) Acercamiento del recuadro mostrado en B. Las ATCs llegan a la capa IV de la S1 y hacen contacto con las neuronas estrelladas espinosas, que forman el borde del barril (representadas en azul). El panel A se obtuvo y modificó de (Petersen, 2019).

Dentro de la lista de especies que presentan barriles en la S1, las ratas y los ratones son los dos organismos modelo más ampliamente utilizados para entender mecanismos biológicos que se pretenden generalizar a otras especies de mamíferos, principalmente a los humanos. Nosotros elegimos a la rata como organismo modelo debido a su facilidad de manipulación y a que su volumen cerebral es mayor que el de los ratones, lo que permite obtener más material para analizar los cambios histológicos y neuroquímicos desencadenados por la ceguera.

#### Efecto de la enucleación bilateral perinatal en el desarrollo de la S1

Usando a la rata como modelo experimental se ha visto que la enucleación durante las primeras 10 horas de vida ocasiona un adelanto de aproximadamente 10 horas en la formación

de los barriles al día postnatal (DP) 3. También hay un incremento en la longitud total y el área ocupada por las ATCs en la capa IV de la corteza al DP7 (Fetter-Pruneda et al., 2013), sin que exista un aumento en el número de neuronas en esta capa (Hernández-Miranda, 2006). Sin embargo, no se conocen las señales que promueven la formación adelantada de los barriles y el aumento en el crecimiento de las ATCs en los individuos enucleados.

Debido a que el sobre-crecimiento de las ATCs podría ser la causa directa de la expansión de los barriles, nuestra primera aproximación para entender cómo la ceguera afecta el tamaño de la S1 fue explorar la participación de moléculas que promueven el crecimiento de las ATCs. Una de estas moléculas es la serotonina, cuyos efectos en el crecimiento de las ATCs se expondrán en la siguiente sección.

# **PARTE 1.** Papel de la serotonina en el proceso de expansión de la corteza somatosensorial primaria de ratas enucleadas al nacimiento

### 1-1. Antedecentes

#### Efecto trófico de la serotonina sobre las ATCs

Uno de los neurotransmisores que más se ha relacionado con el desarrollo y plasticidad de los barriles es la serotonina. Los axones serotoninérgicos provenientes del núcleo del rafe llegan a los límites de la corteza antes del nacimiento (Aitken and Törk, 1988), al igual que las ATCs (Catalano et al., 1996), y durante los primeros días de vida postnatal de la rata forman agregados que semejan a los barriles en la capa IV de la S1 (D'Amato et al., 1987). Al mismo tiempo que se forman estos agregados de axones provenientes del núcleo de rafe, las ATCs se establecen en la corteza y crecen (Blue et al., 1991; Catalano et al., 1996). Estas aferentes expresan transitoriamente tanto el receptor 5-HT<sub>1B</sub> (Leslie et al., 1992) como el transportador de serotonina 5-HTT (Bennett-Clarke et al., 1996), lo que les permite internalizar a la serotonina del medio extracelular. Ambas proteínas alcanzan sus niveles más altos en los barriles poco después de que estas estructuras inician su formación (Mansour-Robaey et al., 1998), en el periodo en el que las ATCs siguen arborizando y aumentando su longitud total dentro de los límites del barril. Posteriormente, alrededor del día 12, desaparece el patrón somatotópico de los axones serotoninérgicos en la rata (Rhoades et al., 1990), aunque las agrupaciones formadas por los axones tálamo-corticales permanecen durante toda la vida del individuo. Con base en esta organización somatotópica transitoria de los axones serotoninérgicos algunos autores han sugerido que la serotonina juega un papel importante en el crecimiento de las ATCs y en la formación de los barriles (Bennett-Clarke et al., 1993; Blue et al., 1991). En concordancia, estudios in vitro e in vivo muestran que, efectivamente, ése es el caso. La longitud total de las neuritas talámicas aumenta de manera significativa cuando son expuestas a serotonina, mientras que la administración de un agonista específico para el receptor 5-HT<sub>1B</sub> tiene un efecto aún mayor (Lotto et al., 1999). Además, se ha visto que la activación exacerbada del receptor 5-HT<sub>1B</sub>, mediante un aumento pronunciado de los niveles de serotonina in vivo, ocasiona el crecimiento

de las ATCs más allá de los límites de un barril (Rebsam et al., 2002; Salichon et al., 2001), evitando la segregación de las ATCs en arborizaciones individuales (Cases et al., 1996) y provocando la ausencia total de los bordes de los barriles (Young-Davies et al., 2000). Por el contrario, la reducción de los niveles de serotonina en un 80% mediante la administración de la toxina 5,7-dihidroxi-triptamina (5,7-DHT) en ratas neonatas se relaciona con barriles de menor tamaño (Bennett-Clarke et al., 1994).

Debido a que la serotonina promueve el crecimiento de los axones tálamo-corticales y su concentración modula el tamaño de los barriles en los roedores, es posible que este neurotransmisor esté involucrado en la expansión de la corteza somatosensorial que se observa en los individuos ciegos.

#### 1-2. Pregunta

¿Es la concentración de serotonina en la S1 un factor promotor de la expansión de los barriles en las ratas enucleadas al nacimiento?

#### 1-3. Hipótesis

La enucleación perinatal ocasionará un aumento transitorio en la concentración de serotonina y/o en la cantidad del receptor  $5-HT_{1B}$  en la S1 durante la primera semana de vida. Este aumento promoverá la elongación de las TCAs y la consecuente expansión de los barriles.

#### 1-4. Objetivo general

Evaluar la participación de la serotonina y su receptor 5-HT<sub>1B</sub> en la expansión de la corteza somatosensorial primaria de las ratas enucleadas.

## 1-5. Objetivos particulares

- Determinar la concentración de serotonina en la S1 de ratas controles y enucleadas a los DP2,
  4, 6, 8 y 10.
- Cuantificar los niveles del receptor 5-HT<sub>1B</sub> en la S1 de ratas controles y enucleadas a los DP2,
  4, 6, 8 y 10.
- Establecer con precisión la fecha en que se expande la corteza somatosensorial primaria en las ratas enucleadas.

A partir de los datos que se obtengan en los puntos anteriores:

- Evaluar si el bloqueo de los receptores 5-HT<sub>1B</sub> previene la expansión de la S1 en ratas enucleadas.
- Evaluar si puede inducirse la expansión de la S1 en ratas controles mediante la aplicación de agonistas de los receptores 5-HT<sub>1B</sub>.

## 1-6. Materiales y métodos

### Animales

Los experimentos se realizaron en ratas Wistar neonatas de ambos sexos, excepto para los experimentos de cuantificación de serotonina y del receptor 5-HT<sub>1B</sub> en la S1, para los que se utilizaron únicamente machos. Después del nacimiento las camadas se ajustaron a 8-10 crías para disminuir los efectos de la competición por la leche materna sobre el desarrollo neonatal. La mitad del número de crías en cada camada se utilizó como grupo control, y la otra mitad como grupo experimental. Entre 6 y 10 horas después del nacimiento, las ratas asignadas al grupo experimental se anestesiaron por hipotermia durante 3 minutos, se les realizó una incisión fina sobre la fisura palpebral y se removió totalmente el tejido ocular con ayuda de una pinza. Después de removidos ambos ojos, los animales se colocaron sobre una almohadilla térmica y se regresaron con su madre después de que hubieron recuperado su temperatura, color y movimiento. Los animales control fueron tratados de la misma manera a excepción de la cirugía. Todos los animales tuvieron libre acceso a alimentación y agua, y se mantuvieron en cuartos con temperatura e iluminación controladas (21°C, ciclo de 12 horas iluminación / 12 horas oscuridad). Las crías se mantuvieron con su madre hasta el momento de su sacrificio. No se encontraron diferencias en la superviviencia o peso corporal entre el grupo control y el enucleado, como se ha reportado previamente (Izraeli et al., 2002; Rauschecker et al., 1992).

Todos los protocolos experimentales de este estudio fueron diseñados de acuerdo con las regulaciones incluidas en la Guía de cuidado y uso de animales de laboratorio publicada por los institutos de salud nacionales de los Estados Unidos (NIH), y aprobados por el comité de ética de la Unidad de Modelos Biológicos (Permiso No. 80) del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México. Además, se hicieron todos los esfuerzos para minimizar el número de animales utilizados y su sufrimiento.

#### Cuantificación de la concentración de serotonina en la S1

#### Obtención y procesamiento del tejido

Ratas macho controles y enucleadas de los DP2, 4, 6, 8 y 10 se anestesiaron con una sobredosis de pentobarbital (200 mg/Kg de peso) y se decapitaron. Se retiró la piel que recubre el cráneo y la porción de éste que protege la corteza cerebral y, utilizando como guía el patrón de ramificaciones arteriales derivadas de la arteria cerebral media (Strominger and Woolsey, 1987), se determinó la posición de la S1 en ambos hemisferios y se extrajo el tejido correspondiente con ayuda de una punta de pipeta de 200 µl recortada. Se utilizó la misma punta de pipeta en todos los animales de una misma edad para estandarizar la cantidad de tejido extraída. Debido a la cantidad de tejido que se requiere para realizar la cuantificación de varios animales. Para los DP2 y 4 se utilizaron cuatro individuos por muestra, para el DP6 se utilizaron tres y para los DP8 y 10 se utilizaron dos. El tejido se colectó en microtubos de propileno, que se congelaron rápidamente en metil- butano y se almacenaron a -80°C hasta su uso. Posteriormente se homogenizaron en 250 µl de ácido perclórico 0.1N y EDTA 0.1mM

utilizando un sonicador a una frecuencia de 40 Hz, se centrifugaron a 13,400 x *g* durante 30 minutos a 4 °C y se recolectaron los sobrenadantes para ser almacenados a -40°C hasta el día de su análisis. Los sedimentos resultantes de la centrifugación se resuspendieron en solución salina con fosfatos (PBS) y se utilizaron para cuanfiticar la proteína total en el tejido con el ensayo del Ácido Bicinconínico de Pierce (Thermo Scientific).

#### Cromatografía líquida de alta eficacia (High Performance Liquid Chromatography, HPLC)

La concentración de serotonina se cuantificó usando HPLC de fase reversa. Como fase líquida se utilizó un buffer de fosfato de potasio monobásico (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) 0.02 M con un pH de 3.50 y metanol-agua como acarreador, en una proporción 3:2. Se mantuvo un flujo constante de 0.66 ml/min para el buffer y de 0.34 ml/min para el acarreador. La duración de las corridas fue de 10 minutos. El tiempo de elusión y la concentración de serotonina en las muestras se calcularon con base en una solución estándar de serotonina de concentración conocida. Esta solución se preparó en ácido perclórico 0.1 M con metabisulfito de sodio 4 mM.

#### Cuantificación del receptor 5-HT<sub>1B</sub> en la S1

#### Obtención y procesamiento del tejido

Las muestras se obtuvieron utilizando el mismo protocolo que en la sección anterior (cuantificación de serotonina en la S1) y se almacenaron a -80°C hasta su uso. Posteriormente se sonicaron en buffer de lisis RIPA (Tris-HCl 25 mM, NaCl 150 mM, 1 % NP-40, 0.1% SDS, 1% desoxicolato de sodio, PMSF 1mM, Compleat), se centrifugaron a 12,000 rpm durante 20 minutos a 4 °C y se recolectaron los sobrenadantes. La proteína se cuantificó a 570 nm mediante el ensayo del Ácido Bicinconínico (Pierce).

#### Electroforesis e inmunoblot

Se corrieron 50 µg de proteína total de cada muestra en un gel de poliacrilamida al 12.5%. Las proteínas separadas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa durante 1h 30 min a

300 mA. La membrana se bloqueó con una solución de leche al 5% y suero de caballo al 3% en TBS-Tween 0.1% a temperatura ambiente durante dos horas y posteriormente se incubó con el anticuerpo primario contra 5-HT<sub>1B</sub> (Santa Cruz sc-1460, 1:250 en solución de bloqueo) durante 63 horas a 4°C. Después de tres lavados con TBS-Tween, la membrana se incubó con un anticuerpo secundario biotinilado durante dos horas y se reveló utilizando el kit de A + B (Vector) y el reactivo Immobilion (Millipore). La quimioluminiscencia se capturó con el equipo de fotodocumentación Gel-Logic 1500. Posteriormente se lavó la membrana y se incubó con solución de bloqueo durante una hora y transcurrido ese tiempo, se dejó durante 16 horas con al anticuerpo contra GAPDH (1:2000 en solución de bloqueo). Este anticuerpo se reveló de la misma manera que el anticuerpo anterior. Todos los geles se hicieron por triplicado.

#### Cuantificación de la cantidad de proteína en la membrana

Las intensidades de las bandas obtenidas en el inmunoblot se cuantificaron con el programa de análisis de imágenes Image J. La medición que se utilizó fue la densidad integrada, que es el producto del área y el valor gris promedio. El área del rectángulo trazada alrededor de cada banda fue siempre la misma. Para disminuir la variabilidad que pudiera originarse por diferencias durante la carga del gel, la medida obtenida para cada banda del receptor 5-HT<sub>1B</sub> se dividió entre la medida de la banda de GAPDH correspondiente. Luego el promedio de los enucleados de cada gel se dividió entre el promedio de los controles de ese mismo gel, y posteriormente se promediaron con los valores obtenidos en los triplicados.

## Bloqueo de los receptores 5-HT<sub>1B</sub>

#### Elaboración y colocación de parches de ELVAX

Como antagonista del receptor  $5-HT_{1B}$  se utilizó el fármaco SB-224289 (Sigma). Para aplicarlo de manera localizada en la corteza somatosensorial primaria se elaboraron parches del polímero Elvax 40p (Dupont) a los que se les agregó el fármaco. Los parches se prepararon de manera similar a la reportada previamente (Persico et al., 1997). Las perlas de Elvax se lavaron

durante 1 semana en etanol al 96%. Posteriormente se disolvieron con 1.5 ml de cloruro de metileno ( $CH_2CI_2$ ) por cada 100 mg de Elvax. A esta mezcla se le agregó el fármaco disuelto en DMSO + Fast green al 0.1 % o acetonitrilo + Fast green al 0.1, a una concentración de 20 mM. Se agregó el volumen necesario para incorporar 0.4 mg ó 1 mg del fármaco por cada 100 mg de Elvax. La mezcla de Elvax con el fármaco y el cloruro de metileno se agitó vigorosamente durante 30 minutos en un vortex y se vació entre dos portaobjetos separados por un marco de parafilm de aproximadamente 200  $\mu$ m de grosor, sostenidos mediante clips de mariposa. Se dejó solidificar sobre hielo seco por 30 minutos y después se retiró uno de los portaobjetos para permitir la evaporación del cloruro de metileno. Después de una semana a -20 °C se cortaron parches cuadrados de 2 x 2 mm con un bisturí, sobre hielo seco y con la ayuda de un microscopio esterioscópico. Los parches se almacenaron a -20 °C hasta su uso.

Entre 6 y 10 horas después del nacimiento las ratas se anestesiaron por hipotermia. Inmediatamente después de realizar la enucleación, mientras la rata seguía anestesiada, se hizo una pequeña incisión en la piel de la cabeza, se abrió una ventana de 3 x 3 mm en el cráneo, dejando un lado sin cortar, y se colocó el parche con fármaco sobre la S1 del hemisferio derecho. Posteriormente la porción de cráneo levantada se regresó a su posición original, se juntaron los bordes de la piel y se unieron con pegamento quirúrgico (Dermabond). Al DP11 las ratas se anestesiaron con una dosis letal de pentobarbital sódico y se perfundieron con solución salina al 0.9 % y paraformaldehído al 4%. Las cortezas de cada hemisferio se extrajeron y se procesaron con la técnica histológica de citocromo oxidasa.

Para evaluar la dinámica de liberación del fármaco se cortaron parches cuadrados de 5x5 mm a partir de la lámina de Elvax y se incubaron en 100 μl de PBS durante 11 días, transfiriendo el parche a PBS nuevo cada 24 horas. La determinación de la concentración se hizo por medio de HPLC.

#### Administración sistémica de SB-224289, antagonista de los receptores 5-HT<sub>1B</sub>

El fármaco SB224289 (Sigma) se disolvió en DMSO a una concentración de 5 mM. Entre 6 y 10 horas después del nacimiento las ratas se anestesiaron por hipotermia y se realizó la enucleación en la mitad de las crías. A la mitad de las ratas controles y enucleadas se les inyectaron 10 mg/kg de peso del fármaco en un volumen total de 20 µl y a la otra mitad de les inyectó el mismo volumen de DMSO. Para determinar la cantidad de fármaco que llega al cerebro de las crías se extrajo la corteza cerebral de ambos hemisferios a los 5, 10, 20, 30 y 60 minutos después de la inyección subcutánea, así como 1, 2, 3, 4, 5, 6 y 7 días post-inyección. Estas muestras se congelaron en metilbutano y se almacenaron a -80 °C. Posteriormente se sonicaron en DMSO y se centrifugaron a 12,000 rpm durante 30 minutos para obtener el sobrenadante, el cual se utilizó para determinar la concentración del fármaco mediante la técnica de HPLC.

#### Evaluación del área de los barriles después de la administración de SB-224289

Las ratas controles y enucleadas tratadas con el fármaco o con el vehículo se anestesiaron con una dosis letal de pentobarbital sódico y se perfundieron a los 7 días postnatales con solución salina al 0.9% y paraformaldehído (PFA) al 4% en PB. Las cortezas cerebrales se extrajeron y se aplanaron entre dos portaobjetos cubiertos con cinta teflón, separados entre sí por separadores de vidrio de 2mm y sostenidos con clips de mariposa. En esta configuración, el tejido se post-fijó por 24 horas en PFA. Posteriormente, se pasó por un gradiente de sacarosa al 20% y 30% en PB y (48 horas en cada solución), se congeló en metil-butano y se almacenó a -80 °C. Para visualizar a los barriles, las cortezas aplanadas se cortaron con un criostato a un grosor de 100 µm y se incubaron durante 12 horas a 37 °C en una solución que contenía diaminobenzidina 1.38 mM, citocromo C 12.1 µM, sacarosa 116.8 mM y catalasa 200 µg/ml en PB 0.1 M pH 7.4. Después de esto se montaron en portaobjetos y se capturaron las imágenes con una cámara Carl Zeiss AxioCam acoplada a un microscopio estereoscópico Nikon modelo SMZ 1500. Los barriles correspondientes al sub-campo posteromedial se calcaron manualmente a partir de las fotografías y se digitalizaron para cuantificar sus áreas con el programa ImageJ. Los valores se normalizaron con respecto al área de la corteza cerebral.

#### Análisis estadístico

Los datos se analizaron y graficaron utilizando el software Prism 6 (GraphPad Software Inc). En las gráficas se muestran los promedios y errores estándar (EE). Las comparaciones estadísticas entre controles y enucleados se hicieron con la prueba *t* de Student para datos con distribución normal, o la *U* de Mann-Whitney en caso de que los datos no tuvieran una distribución normal. Los valores de *p* menores a 0.05 se consideraron estadísticamente sinificativos y se representaron de la siguiente manera: \**p*<0.05 y \*\**p*<0.01.

#### 1-7. Resultados

#### La concentración de serotonina en la S1 de ratas enucleadas disminuye a los DP6 y 8

En los individuos enucleados hay un aumento en el crecimiento de los árboles axonales, lo que da como resultado barriles más grandes al DP7 (Fetter-Pruneda et al., 2013). Debido a que la serotonina tiene efectos tróficos sobre las ATCs, nuestra predicción fue que su concentración aumentaría en la S1 en los días posteriores a la enucleación. Para evaluar si éste era el caso, extrajimos el tejido de la S1 a los DP2, 4, 6, 8 y 10 y cuantificamos la concentración total de serotonina mediante HPLC. Contrario a lo que esperábamos, hubo una disminución en los niveles de serotonina en la S1 de los individuos enucleados a los días 6 y 8 (Fig. 2).

## Los niveles del receptor 5-HT<sub>1B</sub> no se modifican como resultado de la enucleación

Los efectos tróficos de la serotonina sobre las ATCs están mediados principalmente a través del receptor 5-HT<sub>1B</sub>, que también funciona como auto-receptor, regulando negativamente los niveles de serotonina al ser activado (Daws et al., 2000). Por lo tanto, existe la posibilidad de que los niveles de serotonina disminuyan en los individuos enucleados debido a un aumento en los niveles de 5-HT<sub>1B</sub> y que esto además tenga efectos en el crecimiento de las ATCs.

Para evaluar si los niveles del receptor 5-HT<sub>1B</sub> se modifican en la S1 como resultado de la enucleación, cuantificamos su concentración a los DP2, 4, 6, 8 y 10 mediante un ensayo de inmunoblot. No encontramos diferencias en la cantidad del receptor a ninguna de las edades estudiadas (Fig. 3).



Figura 2. Concentración total de serotonina en la S1 durante los primeros días de vida postnatal de la rata. La gráfica representa el promedio <u>+</u> EE. DP6: \*\**p* = 0.002, prueba *U* de Mann-Whitney, Ctl =  $0.328 \pm 0.058$  (n = 7) vs Enu =  $0.150 \pm 0.033$  (n = 7). DP8: \*\**p* = 0.004, prueba *U* de Mann-Whitney, Ctl =  $7.209 \pm 2.429$  (n = 6) vs Enu =  $4.10 \pm 0.597$  (n = 6).



**Figura 3. Niveles del receptor 5-HT<sub>1B</sub> en la S1 durante los primeros días de vida postnatal de la rata.** A) Los puntos representan el nivel promedio de receptor de cuatro muestras controles y cuatro muestras obtenidad de individuos enucleados que se analizaron por triplicado. Las barras representan el EE. B) La gráfica muestra la proporción de cambios en los individuos enucleados con respecto a los controles. Los puntos representan tres experimentos réplica en los que se dividió el nivel promedio de receptor de cuatro enucleados entre el promedio de cuatro controles. Las controles entre el promedio de cuatro controles entre el promedio de cuatro controles. Las controles entre el promedio de cuatro entre el promedio

líneas horizontales representan el promedio de las tres réplicas y el valor 1 (línea punteada) representa el caso en el que la cantidad de proteína es igual en ambos grupos experimentales.

# La colocación de parches de ELVAX sobre la S1 de ratas neonatas ocasiona una disminución del tamaño cerebral

Aunque no se encontraron cambios en la concentración de serotonina total en la S1 ni cambios en los niveles del receptor 5-HT<sub>1B</sub>, existe la posibilidad de que haya cambios en la actividad de los receptores que tengan efectos fisiológicos. Para evaluar esta posibilidad, administramos SB-224289, un antagonista de los receptores 5-HT<sub>1B</sub>, y evaluamos el efecto sobre el tamaño de los barriles en ratas controles y enucleadas.



Figura 4. Efecto de la colocación de parches de ELVAX sobre el tamaño de la corteza cerebral. A-B) Cortezas aplanadas y procesadas con la histoquímica para citocromo oxidasa. C) Tamaño proporcional de las cortezas a las que se les colocó el parche. El área normalizada se obtuvo dividiendo el área total de hemisferio con parche entre el área del hemisferio sin parche de cada individuo. \*\*\*\*p < 0.0001, ANOVA de una vía, individuos con parche vs. individuos sin parche.

Decidimos administrar el fármaco de manera local con el propósito de restringir su acción a la S1. Para esto implantamos parches elaborados con el polímero ELVAX y adicionados con el fármaco SB-224289 (antagonista de los receptores 5-HT<sub>1B</sub>) sobre la S1 del hemisferio derecho de ratas controles y enucleadas entre 6 y 10 horas después del nacimiento (justo después de la enucleación en el caso de las ratas enucleadas). Las cortezas de ambos hemisferios se extrajeron al día 11 y se procesaron con una histoquímica para citocromo oxidasa, con la cual pueden observarse los barriles. Al analizar el tejido se vio que la aplicación del parche ocasionó una disminución en el volumen del hemisferio cerebral sobre el que fue colocado, independientemente de si contenía fármaco o sólo vehículo. Otro de los efectos fue que los barriles del PMBSF, sobre los que se colocó el parche directamente, desaparecen, y los barriles colindantes disminuyen de tamaño considerablemente y en algunos casos ni siquiera se distinguen (Fig. 4).

Debido a la reducción inesperada en el volumen cerebral por la colocación del parche, a continuación, probamos administrar el fármaco de manera sistémica, mediante una inyección subcutánea al DPO.

# <u>El efecto de la administración sistémica de un antagonista de los receptores 5HT<sub>1B</sub> no pudo evaluarse adecuadamente</u>

Como otra alternativa para evaluar si la expansión de los barriles en ratas enucleadas puede prevenirse mediante el bloqueo de los receptores 5-HT<sub>1B</sub>, se administró el antagonista SB-224289 por vía subcutánea al DPO y se cuantificó el área de los barriles al DP7 en rebanadas tangenciales de la S1 procesadas con la histoquímica para citocromo oxidasa. Se obtuvo el área total ocupada por los barriles del PMBSF (Fig. 5A) y el área promedio de los barriles individuales (Fig. 5B) en los individuos de los 4 grupos experimentales: controles y enucleados inyectados con vehículo (DMSO) y controles y enucleados inyectados con el fármaco SB224289. Las áreas de los barriles se normalizaron con respecto al área total de la corteza cerebral del hemisferio correspondiente, para evitar posibles variaciones debidas a diferencias en el peso de las crías o a diferentes niveles de presión a la hora de aplanar el tejido para su procesamiento. También se midió el área promedio de cada barril (Fig. 5C-E) y la distribución de barriles en cada grupo experimental de acuerdo con su área relativa (Fig. 5F y G). No hubo diferencias significativas en ninguno de los parámetros evaluados entre grupos experimentales. La ausencia de la expansión

de los barriles en las ratas enucleadas inyectadas con DMSO podría deberse al reducido tamaño de muestra por la alta mortalidad y a la considerable variación en los pesos de las crías. Por esta razón, no pudieron obtenerse evidencias contundentes sobre si el bloqueo de los receptores 5-HT<sub>1B</sub> impide la expansión de los barriles en ratas enucleadas perinatalmente.



**Figura 5. Efecto de la administración de SB-224289 sobre el tamaño de los barriles.** A) Área relativa del PMBSF, normalizada con respecto al área total de la corteza. Las líneas muestran el promedio y EE. B) Área relativa promedio de los barriles del PMBSF por individuo. C) Esquema que muestra la nomenclatura de cada barril. D-E) Gráfica de cajas y bigotes que muestra el área promedio de cada barril para el grupo inyectado con vehículo (D) o con el fármaco (E). F-G) Distribución de los barriles por tamaño en el grupo inyectado con vehículo (F) o tratado con el fármaco (G). Las barras y símbolos negros corresponden a controles y los grises a enucleados en todas las gráficas.

#### 1-8. Discusión

En la primera parte de este proyecto exploramos si la expansión de los barriles en ratas enucleadas perinatalmente se debe a un efecto trófico de la serotonina sobre las ATCs a través de la activación del receptor 5-HT<sub>1B</sub>. No encontramos un aumento de los niveles totales de serotonina en la S1 durante el periodo de expansión de los barriles ni de su receptor 5-HT<sub>1B</sub>. Por el contrario, la concentración total de serotonina en el tejido de la S1 de los individuos enucleados disminuyó hacia finales de la primer semana de vida postnatal, cuando la expansión de los barriles como consecuencia de la enucleación prácticamente ha concluido (Fetter-Pruneda et al., 2013), por lo que es poco probable que la disminución observada en los niveles de serotonina esté involucrada en este proceso. Similar a la disminución observada en los niveles de serotonina, la concentración total en tejido de otros neurotransmisores como glutamato y GABA, y en general de varios aminoácidos, disminuye al DP6 en la S1 de ratas enucleadas perinatalmente (Martínez Méndez, 2008), lo que sugiere que a esa edad hay un cambio metabólico importante como consecuencia de la enucleación. Este cambio coincide con varios eventos del desarrollo de la S1 como el aumento en el reclutamiento de la transmisión GABAérgica y su cambio de excitatoria a inhibitoria (Daw et al., 2007), la aparición de marca para parvalbúmina en las capas IV y V (Sánchez et al., 1992), la disminución en la duración de las corrientes de NMDA (Crair and Malenka, 1995), la desaparición de las sinapsis silentes (Isaac et al., 1997) y el desarrollo de las proyecciones locales intracorticales (Rhoades et al., 1996).

Un hallazgo inesperado de este trabajo fue que la implantación unilateral de parches de ELVAX sobre la S1 de ratas neonatas ocasionó una disminución del tamaño del hemisferio sobre el que fue colocado. Los parches de ELVAX se han utilizando previamente en ratas neonatas en condiciones similares a las utilizadas en este estudio, sin que el efecto en el tamaño cerebral se haya reportado (Dagnew et al., 2003; Fox et al., 1996; Heck et al., 2007; Penschuck et al., 1999; Persico et al., 1997). De acuerdo con la literatura, para colocar el parche se hace una pequeña incisión en las meninges y se desliza el parche de manera que quede colocado debajo de la duramadre, o se levanta una pequeña parte de las meninges para colocar el parche directamente

sobre la superficie cortical. Sin embargo, ambos procedimientos generarían un daño local a las meninges y su separación temporal de la superficie cerebral. Se ha visto que cuando se dañan las meninges o se impide su contacto con los procesos de la glia radial, hay una reducción en el tamaño cerebral y un aumento en la apoptosis de las células de la glia radial (Radakovits et al., 2009), lo que explicaría la reducción en el tamaño del hemisferio que encontramos después de la colocación de los parches.

Aunque con nuestros experimentos no pudimos evaluar si el bloqueo del receptor 5-HT<sub>1B</sub> impide la expansión de los barriles, la ausencia de cambios en los niveles de serotonina y de este receptor durante el periodo de expansión de los barriles sugiere que el sistema serotonérgico no está involucrado en la expansión de los barriles en individuos enucleados. De hecho, hay estudios que muestran que la serotonina no juega un papel fundamental en la formación de los barriles a concentraciones fisiológicas o a niveles bajos. Por una parte, la ausencia del receptor  $5-HT_{1B}$  no tiene efectos aparentes sobre el mapa de barriles (Boylan et al., 2000b). Por otra parte, aunque la administración de fármacos que inhiben la síntesis de serotonina ocasiona una disminución en el tamaño de los barriles, parece ser que este efecto es debido a una disminución en el crecimiento del individuo y no a la disminución de los niveles de serotonina per se (Persico et al., 2000). Si bien la sobre-activación del receptor 5-HT<sub>1B</sub> por medios farmacológicos ocasiona un aumento en el crecimiento de las ATCs, este crecimiento sobrepasa los límites del barril y está acompañado de una disminución en la arborización (Rebsam et al., 2002), lo que ocasiona la ausencia del mapa corporal en lugar de dar como resultado barriles más grandes. Sin embargo, un aspecto del desarrollo de los barriles que sí es regulado por la serotonina es la temporalidad de su formación. Al respecto, ha visto que la disminución de los niveles globales de serotonina en el líquido cerebro-espinal (LCE) ocasiona un adelanto en la aparición de los barriles (Toda et al., 2013), similar al escenario observado en individuos enucleados al nacimiento. Debido a que cambios en el tiempo de desarrollo pueden dar como resultado cambios en el tamaño de los órganos, a continuación decidimos centrarnos en los mecanismos que pudieran estar afectando el tiempo de desarrollo de los barriles. Este cambio de enfogue hizo que uno de los objetivos planteados anteriormente, el de evaluar el momento en que empieza la expansión de los barriles,

se replanteara, ya que era probable que la expansión de los barriles estuviese instruida por eventos ontogenéticos que ocurren previos a su formación.

## 1-9. Conclusiones de la Parte 1

- La concentración total de serotonina en la S1 disminuye a los DP6 y 8 como resultado de la enucleación, mientras que los niveles del receptor 5-HT<sub>1B</sub> no se modifican en las edades estudiadas.
- Debido a que en estos experimentos no se vio la expansión de los barriles como consecuencia de la enucleación, no pudo evaluarse el efecto del bloqueo de los receptores 5-HT<sub>1B</sub>.

**PARTE 2.** Evaluación de cambios en los niveles de neurotransmisores y en la actividad neuronal espontánea asociados con modificaciones en la temporalidad del desarrollo de los barriles

#### 2-1. Antecedentes

En la primera parte de este trabajo mostramos que no existen cambios en la concentración total de serotonina, ni de su receptor 5-HT<sub>1B</sub>, en la S1 durante el periodo que precede a la formación de los barriles. Esto sugiere que los niveles de serotonina en el tejido no regulan crecimiento de las ATCs como consecuencia de la enucleación. Aunque no podemos descartar la posibilidad de que existan otros factores neurotróficos que estén promoviendo un mayor crecimiento de las ATCs como consecuencia de la enucleación, otra posibilidad es que el aumento en la longitud de las ATCs y el área que ocupan en la S1 de ratas enucleadas perinatalmente se deba a cambios en la temporalidad de formación y/o desarrollo de los barriles. Un inicio temprano, un final tardío o el aumento en la velocidad de desarrollo de un órgano pueden dar como resultado un aumento en su tamaño final. Como se comentó en los antecedentes generales del proyecto, en los individuos enucleados los barriles aparecen antes, lo que indica que efectivamente hay cambios en el tiempo de desarrollo de la S1 como consecuencia de la enucleación; a las 82 horas post-parto el 29% de las ratas controles tienen barriles, en comparación con un 68% de individuos enucleados con barriles a la misma edad (Fetter-Pruneda et al., 2013). Debido a esta formación adelantada de los barriles en los individuos enucleados, su periodo de desarrollo se extiende en comparación con los individuos controles.

Paralelo al desarrollo de la primera parte del proyecto, se obtuvieron resultados en el laboratorio que mostraban que, efectivamente, cambios en el tiempo de desarrollo son los responsables de la expansión de la S1 en ratas enucleadas. La remodelación de la cromatina es uno de los varios mecanismos que controlan diversos eventos del desarrollo en el cerebro, como la diferenciación y maduración neuronal y la formación de sinapsis (Akhtar et al., 2009; Balasubramaniyan et al., 2006; Koh and Sng, 2016; Sugo et al., 2010). Una marca epigenética en particular, la acetilación de la histona 4, disminuye en la capa IV de la S1 de los individuos

enucleados cuando la formación de los barriles está en proceso (Fetter-Pruneda et al., 2013). Cuando esta disminución se previene mediante la administración de ácido valpróico, un inhibidor de las desacetilasas de histonas, se normaliza el tiempo de formación de los barriles y se previene su expansión (Fetter-Pruneda et al., 2013), indicando que cambios en el tiempo de desarrollo, regulados mediante modificaciones en las marcas epigenéticas, están involucrados en la expansión de los barriles en individuos enucleados. Sin embargo, se desconoce como es que la ausencia de estímulos visuales lleva a la modificación de las marcas epigenéticas de las neuronas en la S1 o, dicho de otra manera, cómo se transmite la información de la pérdida de los globos oculares a otras modalidades sensoriales. Asimismo, no se sabe con exactitud qué procesos de la formación de los barriles están siendo modificados.

De acuerdo con lo expuesto en el párrafo anterior, se esperaría que la señal que comunica la información relativa a la pérdida de la visión entre modalidades sensoriales tenga las siguientes características: que pueda transmitirse entre diferentes regiones cerebrales, que sea capaz de modificar las marcas epigenéticas de las neuronas, que controle la temporalidad de procesos del desarrollo y que participe en la formación de los barriles. Tanto los neurotransmisores como la actividad neuronal eléctrica espontánea cumplen con estas características, por lo que es muy probable que jueguen un papel importante en su formación adelantada como consecuencia de la enucleación. Además, sus niveles, funciones y regulación están relacionados entre sí, por lo que se decidió evaluar los cambios en ambas señales. Los estudios que sustentan que tanto los neurotransmisores como la actividad eléctrica cumplen con estas características se expondrán en las siguientes secciones

Con relación a las etapas de la formación de los barriles que se modifican, en la siguiente sección se describirá con más detalle la temporalidad de este proceso bajo condiciones normales y los elementos celulares involucrados.

## Desarrollo postnatal de la S1 y efectos de la enucleación bilateral en su temporalidad

Las neuronas del núcleo VPM del tálamo comienzan a extender sus aferentes hacia la corteza en etapas embrionarias y alcanzan la capa más profunda de la corteza en desarrollo en el día embrionario 17 (Catalano et al., 1996, 1991; Erzurumlu and Jhaveri, 1990) (Fig. 6). A lo largo de su camino hacia la corteza, su tasa de crecimiento disminuye (Mire et al., 2012), posiblemente para permitir la exploración del nuevo territorio y la comunicación con las células de la subplaca cortical (Tolner et al., 2012). Al momento del nacimiento, las capas VI y V de la corteza ya se han diferenciado y las ATCs han ingresado a la parte más profunda de la placa cortical, de donde se diferenciarán las neuronas de las capas restantes (IV y II-III, Fig. 6). En el transcurso de los siguientes tres días estos axones se extenderán a lo largo de la corteza y se segregarán en arborizaciones individuales, cada una correspondiente a una única vibrisa, al tiempo que las capas superiores se van diferenciando (Catalano et al., 1996). Incluso antes de que los barriles se formen se establece una comunicación entre las células de la corteza y las ATCs que permite el desarrollo sincronizado de ambos componentes celulares y la correcta formación del barril (Tolner et al., 2012).



**Figura 6. Desarrollo postnatal de la S1.** Las ATCs están representadas en color guinda y las neuronas estrelladas espinosas en color azul. Los círculos cafés sobre los barriles representan los manchones que puede ser observados con la histoquímica para citocromo oxidasa y que aparecen por primera vez al DP3.

Las primeras neuronas de la futura capa IV comienzan a diferenciarse de la placa cortical alrededor del DP1 en la rata (Catalano et al., 1996), al mismo tiempo que las ATCs empiezan a

segregarse para formar primero manchones correspondientes a filas de vibrisas y luego vibrisas individuales (Schlaggar and O'Leary, 1994). Una vez que la capa IV se ha diferenciado, las neuronas estrelladas espinosas de esta capa orientan selectivamente sus dendritas hacia alguno de los árboles talámicos, lo que ocasiona el desplazamiento de los cuerpos celulares a la periferia del barril, formando así los bordes de estas estructuras (Mizuno et al., 2014; Zaccaria and McCasland, 2012). Los centros de los barriles pueden visualizarse por primera vez entre las 82 y 92 horas postparto con la técnica histológica para revelar la actividad de la enzima citocromo oxidasa (Fetter-Pruneda et al., 2013) (Fig. 6). Esta enzima se localiza principalmente en dendritas y se ha utilizado como un marcador de actividad neuronal (Wong-Riley and Welt, 1980), lo que indica que en ese periodo hay un incremento importante en el número de sinapsis activas entre las ATCs y las neuronas de la capa IV. Los bordes de los barriles formados por las neuronas desplazadas se pueden observar por primera vez aproximadamente un día después (Zaccaria and McCasland, 2012). Por otra parte, las tinciones o marcajes de las ATCs permiten observar a los árboles axonales incluso antes del establecimiento de las sinapsis entre las neuronas talámicas y corticales (Catalano et al., 1996).

La formación temprana de los barriles en ratas enucleadas perinatalmente podría deberse a que uno o ambos de sus componentes celulares principales (las ATCs y las neuronas estrelladas de la capa IV) maduren antes. Con esto en mente, los siguientes escenarios son posibles y conducirían al establecimiento adelantado de las sinapsis entre las ATCs y las neuronas de la capa IV en la S1:

1) La llegada de las ATCs a la capa IV de la corteza y/o su segregación se adelantan.

2) Las propiedades funcionales de las ATCs maduran antes, sin que haya cambios en su morfología.

3) Las neuronas de la capa IV maduran antes y reorientan sus dendritas precozmente hacia las arborizaciones de ATCs, sin que haya cambios en la maduración de las neuronas talámicas.
Hay dos indicios de que el tercer escenario, que las neuronas de la capa IV maduren antes, ocurre efectivamente en los individuos enucleados. El primero, como ya se mencionó, es el hecho de que hay una disminución prematura de los niveles de la histona 4 acetilada en la capa IV de la corteza durante el periodo de formación de los barriles, cambio que se ha asociado con maduración neural (Piña et al., 1988). El segundo es que los bordes de los barriles se forman antes (Fetter-Pruneda et al., 2013), y para que esto ocurra, se requiere que las neuronas estrelladas espinosas de la capa IV establezcan contactos sinápticos con las ATCs y orienten sus dendritas hacia el centro del barril (Zaccaria and McCasland, 2012). Sin embargo, no se ha evaluado si existen cambios en el tiempo de maduración de las ATCs, por lo que esa pregunta se abordó en este trabajo.

## Participación de los neurotransmisores en la formación de los barriles, plasticidad cerebral y temporalidad de procesos del desarrollo

Como se describió anteriormente, la serotonina es uno de los neurotransmisores que más se ha involucrado en el desarrollo de la S1. Además de sus efectos en el crecimiento de las ATCs (ver Parte 1 de este trabajo) y de su capacidad de regular los niveles de actividad neuronal en la S1 de manera local (Laurent et al., 2002), una disminución de su concentración global en el líquido cerebroespinal (LCE) parece desencadenar la formación de los barriles y otros procesos del desarrollo en varias regiones cerebrales (Toda et al., 2013). Por el contrario, si los niveles de serotonina se mantienen elevados farmacológicamente, los barriles no se forman hasta que se interrumpe el tratamiento (Toda et al., 2013). Sin embargo, la organización somatotópica aún puede distinguirse de manera difusa al teñir las ATCs (Boylan et al., 2000a) en estos cerebros, lo cual sugiere que los niveles elevados de serotonina evitan la transferencia adecuada del patrón somatotópico hacia las células de la corteza, probablemente afectando la posición o temporalidad de formación de las sinapsis entre las ATCs y las neuronas corticales. Es importante mencionar que, aunque no encontramos cambios en la concentración total de serotonina o de su receptor 5-HT<sub>1B</sub> en lisados de tejido de la S1 (primera parte de este trabajo), pueden ocurrir cambios en la concentración extracelular de neurotransmisores que no se reflejen en la

concentración total en el tejido y que tengan efecto sobre la formación la S1. Además, si los niveles extracelulares de serotonina regulan el momento en el que se forman los barriles, sería importante analizar más a detalle si hay modificaciones en sus niveles en las ratas enucleadas en el periodo que precede a la formación de estas estructuras.

Mientras que el efecto de las modificaciones en los niveles de serotonina sobre la formación de los barriles parece estar mediado principalmente a nivel presináptico, las modificaciones en el sistema glutamatérgico durante el desarrollo de la S1 afectan principalmente al componente postsináptico. Los receptores de glutamato tipo NMDA son esenciales para el establecimiento de las sinapsis entre las ATCs y las neuronas estrelladas espinosas de la capa IV de la corteza. En ausencia de estos receptores a nivel cortical, las dendritas presentan una motilidad mayor pero no se orientan selectivamente hacia los centros del barril (Mizuno et al., 2014), impidiendo la transmisión del mapa de barriles del tálamo a la corteza (Datwani et al., 2002). Interesantemente, el bloqueo de estos receptores a nivel cortical del DPO al DP6 da como resultado arborizaciones tálamo-corticales más grandes que se extienden más allá de los límites del barril (Lee et al., 2005), similar a lo que ocurre con el exceso de serotonina extracelular, indicando que el establecimiento correcto del mapa de barriles requiere una comunicación bidireccional entre las neuronas corticales y las ATCs, en la que los cambios en la activación del componente postsináptico afectan el crecimiento de estructuras presinápticas. Por el contrario, la aplicación de BDNF, un potenciador de la transmisión excitatoria, da como resultado arborizaciones más pequeñas (Penschuck et al., 1999), lo que sugiere que los niveles de excitablidad neuronal también son importantes para regular el tamaño de las ATCs.

Como se mencionó en el párrafo anterior, los receptores de NMDA son indispensables para la formación de los barriles. Además, la composición de estos receptores regula la temporalidad de este proceso (Yamasaki et al., 2014). La subunidad GluN2B se expresa principalmente en las neuronas glutamatérgicas que forman parte de la vía ascendente somatosensorial y en ratones heterocigotos para esta subunidad (GluN2B <sup>+/-</sup>) la formación de los barriles se retrasa un día. Por otra parte, la subunidad GluN2D se expresa normalmente en

neuronas GABAérgicas que constituyen circuitos inhibitorios locales. En ausencia de esta subunidad (ratones GluN2D <sup>-/-</sup>) los barriles se forman un día antes (Yamasaki et al., 2014). Estos resultados indican que GluN2B facilita la formación y maduración de los barriles, mientras que GluN2D la retrasa. Por último, tanto la administración de glutamato como el bloqueo de los receptores NMDA ocasionan cambios en la translocación de desacetilasas de histonas del citoplasma al núcleo de neuronas en cultivo (Chawla et al., 2003), indicando su potencial para modificar los niveles de acetilación.

GABA es otro neurotransmisor que juega un papel esencial en el desarrollo del sistema nervioso central, influenciando la proliferación de precursores neurales, la migración y diferenciación de las neuronas, el crecimiento de dendritas y axones, y controlando los patrones de actividad neuronal temprana (Kilb et al., 2013). Muchos de estos eventos ocurren antes del establecimiento de las sinapsis GABAérgicas, lo que indica que la transmisión tónica extrasináptica, que depende de los niveles extracelulares de GABA, juega un papel importante (Kilb et al., 2013). En particular, en la capa V de la S1 durante los DP2-5, la inducción de corrientes tónicas mediante la aplicación de una concentración baja de GABA disminuye la frecuencia de disparos espontáneos en la mayoría de las células y la incrementa en algunas de ellas (Sebe et al., 2010). Es importante mencionar que en las neuronas inmaduras, el bloqueo de los receptores de NMDA es liberado por la despolarización iniciada a través de los receptores de GABA (Leinekugel et al., 1997), de manera que este neurotransmisor juega un papel importante en el estado de la actividad espontánea en el cerebro en desarrollo.

Además de sus efectos sobre la actividad espontánea y la maduración neuronal, la maduración del sistema GABAérgico regula la temporalidad de los periodos críticos de plasticidad en el cerebro (Hensch, 2005; Jiang et al., 2005). Cuando se muta alguno de los genes *Clock* o *Bmal1*, que participan en la generación de los ritmos circadianos, específicamente en neuronas GABAérgicas positivas a parvalbúmina, la maduración de estas células se retrasa y el periodo crítico de plasticidad se pospone. Este retardo en la aparición del periodo crítico se revierte con la activación farmacológica de los receptores GABA<sub>A</sub> (Kobayashi et al., 2015), mostrando que el

efecto de los genes que regulan los ritmos circadianos sobre la temporalidad de la plasticidad es en parte a través de sus acciones sobre la maduración del sistema GABAérgico.

Además de sus efectos a nivel local, los cambios globales en los niveles de neurotransmisores y otras moléculas difusibles en el cerebro pueden transmitir información entre modalidades sensoriales y coordinar los eventos de plasticidad intermodal. Como se mencionó con anterioridad (Toda et al., 2013), se ha mostrado que el momento del nacimiento determina la temporalidad de eventos del desarrollo en al menos dos modalidades sensoriales, mediante la regulación de los niveles de serotonina en el LCE. Por otra parte, los niveles globales del neuropéptido oxitocina regulan la disminución intermodal en la transmisión sináptica excitatoria que ocurre en al menos dos diferentes protocolos de privación sensorial (Zheng et al., 2014).

Participación de la actividad neuronal en la formación de los barriles, plasticidad cerebral y temporalidad de procesos del desarrollo.

Cuando se empezó a estudiar el fenómeno de plasticidad intermodal, una de las primeras hipótesis que surgió sobre cómo la pérdida de la visión en las ratas ocasiona la expansión de la S1 fue que debería existir un aumento sostenido en la actividad evocada o asociada al uso a lo largo de la vía somestésica, el cual estaría a su vez ocasionando la expansión de las representaciones corticales correspondientes (Bronchti et al., 1992; Rauschecker, 1995; Zheng and Purves, 1995). Sin embargo, posteriormente se mostró que la expansión de los barriles en los individuos enucleados no resulta de un aumento en la actividad evocada a lo largo de la vía somatosensorial (Fetter-Pruneda et al., 2013); ésta ocurre durante la primera semana de vida postnatal de la rata, antes de que empiecen los movimientos voluntarios de las vibrisas y la actividad exploratoria en las crías, y una semana antes de la fecha en la que ocurre la apertura de los párpados.

Por otra parte, los patrones de actividad neuronal independientes de la experiencia sensorial, denominados como actividad espontánea, controlan muchos procesos del desarrollo como la diferenciación celular, migración, sinaptogénesis y formación de circuitos (Kilb et al., 2011; Luhmann and Khazipov, 2018). Además, son de particular importancia para el desarrollo del cerebro en etapas embrionarias y postnatales tempranas. En la vía somatosensorial las modificaciones en la actividad espontánea regulan la velocidad de crecimiento de las ATCs en etapas embrionarias (Mire et al., 2012). Además, se ha visto que el incremento de la actividad espontánea en la corteza afecta la migración neuronal e induce la formación prematura de ramas dendríticas durante el desarrollo postnatal temprano (Bando et al., 2016). Como ya se mencionó, el establecimiento del mapa de barriles requiere de una disminución en la velocidad de crecimiento de las ATCs y de la maduración sincronizada del componente talámico y cortical para que se establezcan oportunamente las sinapsis tálamo-corticales, ambos procesos regulados por la actividad espontánea. Como en este estudio la enucleación se hizo poco después del nacimiento, que coincide con la etapa en la que las neuronas de la capa IV se están diferenciando de la placa cortical, una de las predicciones fue que su actividad espontánea se modificaría en los individuos enucleados, ocasionando su maduración temprana, la formación precoz de los barriles y prolongando de esta manera la ventana de tiempo durante la cual la S1 puede crecer. Un indicio de que las neuronas corticales de los individuos enucleados efectivamente maduran antes es que su patrón de acetilación se adelanta con respecto a los individuos controles (Fetter-Pruneda et al., 2013), y se sabe que la actividad espontánea regula la translocación de desacetilasas de histonas al núcleo (Chawla et al., 2003), por lo que es posible que participe en la disminución temprana en la acetilación de histonas en las ratas enucleadas.

En apoyo a la idea de que la actividad espontánea participa en los procesos de plasticidad, se ha reportado que sus niveles se modifican de manera intermodal como consecuencia de la privación sensorial. La crianza de ratas en oscuridad continua desde el nacimiento ocasiona una disminución de la frecuencia de corrientes espontáneas en la S1 de ratones juveniles (Zheng et al., 2014) mientras que la enucleación bilateral de ratones en etapas embrionarias ocasiona un aumento de la frecuencia de ondas de Ca<sup>2+</sup> espontáneas en el núcleo VPM del tálamo (Moreno-

Juan et al., 2017). En el caso de los individuos juveniles criados en oscuridad continua, se vio que la transmisión de la información entre modalidades sensoriales se da a través de una molécula difusible que tiene efectos sobre la actividad espontánea (Zheng et al., 2014), mientras que en etapas embrionarias la actividad espontánea puede propagarse entre modalidades sensoriales a nivel del tálamo por medio de ondas de actividad, que consisten en la entrada simultánea de Ca<sup>2+</sup> al interior de las células de una población neuronal (Moreno-Juan et al., 2017). El aumento en la frecuencia de ondas espontáneas de Ca<sup>2+</sup> en el VPM se ha relacionado con el crecimiento de los barriles, ya que ocasiona el aumento en los niveles postnatales del gen  $Ror\beta$  (Moreno-Juan et al., 2017), cuya sobreexpresión genera barriles más grandes. Sin embargo, los efectos de la actividad espontánea sobre la temporalidad de formación de los barriles no se han explorado. Interesantemente, el gen  $Ror\beta$  es homólogo de genes heterocrónicos relacionados con el control de la temporalidad de procesos del desarrollo (Monsalve and Frand, 2012) y su patrón de expresión en el núcleo supraquiasmático oscila a lo largo del día (Sumi et al., 2002), sugiriendo que está relacionado con el sistema de ritmos circadianos. Estos datos, aunados al hecho de que los ritmos circadianos pueden regular la amplitud de los potenciales espontáneos (Krishnan et al., 2008), apoyan la idea de que cambios en la actividad espontánea podrían modular la temporalidad de formación de los barriles.

## 2-2. Preguntas

¿Existen cambios en la concentración de neurotransmisores en el LCE o de la actividad espontánea de las neuronas que pudieran relacionarse con la formación temprana de los barriles en ratas enucleadas?

¿Existen cambios morfológicos en la maduración de las ATCs que puedan explicar la formación adelantada de los barriles?

## 2-3. Hipótesis

La aparición adelantada de los barriles en ratas enucleadas perinatalmente se debe a cambios en los niveles de neurotransmisores detectables en el LCE y en la actividad espontánea

de las neuronas en la S1 durante su periodo de formación. Estas señales promueven la maduración precoz de las ATCs y de las neuronas estrelladas espinosas de la capa IV, de manera que las sinapsis entre ellas se establecen antes. Por lo tanto, se espera encontrar los siguientes cambios en el periodo que precede a la aparición de los barriles en individuos enucleados:

- Habrá una disminución en los niveles de serotonina en el LCE, que inducirá la formación prematura de los barriles (Toda et al., 2013).
- Habrá un aumento en los niveles de GABA en el LCE, que liberará el bloqueo de los receptores de NMDA de las neuronas de la capa IV y permitirá que la orientación selectiva de sus dendritas hacia los centros de los barriles ocurra antes (Leinekugel et al., 1997; Mizuno et al., 2014).
- Habrá una disminución en los niveles de glutamato en el LCE, lo que ocasionará una disminución en la actividad espontánea cortical (Featherstone and Shippy, 2008).
- Habrá una disminución en la frecuencia y/o amplitud de los potenciales espontáneos de las neuronas en la S1, lo que estaría promoviendo la translocación de desacetilasas de histonas al núcleo y la consecuente disminución en la acetilación de la histona 4 (Chawla et al., 2003).
- La morfología de las ATCs mostrará signos de maduración adelantada.

## 2-4. Objetivo general

Evaluar la posible participación de los niveles globales de neurotransmisores y de la actividad espontánea en la temporalidad de formación de los barriles en ratas enucleadas perinatalmente.

## 2-5. Objetivos particulares

- Cuantificar la concentración de serotonina, glutamato y GABA en la S1 y el LCE durante el periodo que precede a la aparición de los barriles (DP1-3).
- Evaluar los patrones de actividad espontánea en la S1 de ratas controles y enucleadas durante el periodo que precede a la aparición de los barriles (DP1-3).

 Evaluar si hay cambios en el crecimiento o en la temporalidad de segregación de las ATCs de ratas controles y enucleadas durante el periodo que precede a la aparición de los barriles (DP1-3).

## 2-6. Materiales y métodos

## Animales

Los experimentos se realizaron en ratas Wistar neonatas de ambos sexos. El ajuste del número de individuos por camada y la enucleación se realizaron como se describió en la sección 1-6 de este escrito. Todos los protocolos experimentales de este estudio fueron diseñados de acuerdo con las regulaciones incluidas en la Guía de cuidado y uso de animales de laboratorio publicada por los institutos de salud nacionales de los Estados Unidos (NIH), y aprobados por el comité de ética de la Unidad de Modelos Biológicos (Permiso No. 80) del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México. Además, se hicieron todos los esfuerzos para minimizar el número de animales utilizados y su sufrimiento.

## Cuantificación de la concentración de serotonina, glutamato y GABA en la S1 y el LCE

## Obtención y procesamiento de las muestras

Las ratas controles y enucleadas de 1 y 3 DP se anestesiaron por hipotermia y se les insertó un capilar de vidrio a través del cráneo hasta el ventrículo lateral con la finalidad de obtener LCE (Feliciano et al., 2014). Se obtuvieron de 10 a 20 µl de LCE por animal y para cada muestra se juntó el líquido de 4 animales. En total se colectaron cinco muestras de individuos controles y 5 muestras de individuos enucleados. Inmediatamente después de obtener el LCE, las crías se decapitaron y se obtuvo el tejido de la S1 como se describió en la sección 1-6, en el apartado "Cuantificación de la concentración de serotonina en la S1". Las muestras se almacenaron a -80°C hasta el día del análisis. Las muestras con LCE se centrifugaron a  $1000 \times g$  por 20 minutos a 4°C. Los sobrenadantes se transfirieron a tubos nuevos y se sonicaron a 40 Hz en cuatro volúmenes de ácido perclórico 0.1 N durante 20 segundos a 4°C. Posteriormente se centriguraron una vez más a 16,100 x g durante 30 min a 4°C. Las muestras de tejido se procesaron como se describió en la sección 1-6, en el apartado "Cuantificación de la concentración de serotonina en la S1".

### HPLC

Se pasaron 10 µl de cada muestra a través de una columna HyperClone ODS (Phenomenex). Para cuantificar la concentración de serotonina se utilizó una fase líquida compuesta de una mezcla de acetonitrilo y acetato de amonio (flujo de 0.8 ml/min). Para cuantificar la concentración de glutamato y GABA se hizo una reacción de derivación con o-ftalaldehído como se ha descrito previamente (Fleury and Ashley, 1983). La fase líquida se compuso de acetato de sodio y metanol (flujo de 1 ml/min) y la detección se hizo a 340 nm. La sensibilidad de detección fue de 0.10, 0.73 y 0.46 nmoles/ml para serotonina, glutamato y GABA, respectivamente.

## Evaluación de la actividad espontánea en la S1

\* Los experimentos de evaluación de la actividad espontánea fueron realizados por el estudiante de maestría Daniel Pérez Torres.

Dinámica de Ca<sup>2+</sup> intracelular en rebanadas tálamo-corticales

Las ratas controles y enucleadas se anestesiaron por hipotermia y se decapitaron a las 29 hrs (DP1), 53 hrs (DP2) y 77 hrs (DP3) post-parto. El tamaño de muestra fue de ocho individuos controles y ocho enucleados para todas las edades. El cerebro se extrajo rápidamente del cráneo y se colocó en LCE artificial (LCEA, 124 nM NaCl, 5 nM KCl, 26 nM NaHCO<sub>3</sub>, 10 nM D-(+)-Glucosa, 1.25 nM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1.3 nM MgSO<sub>4</sub> y 2 nM CaCl<sub>2</sub> ,pH 7.4, saturada con 95:5 O<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub>). El tejido se embebió en agar (Invitrogen) al 30% diluido en LCEA, y se colocó por 5 min en el refrigerador para que el cubo de agar adquiriera una consistencia sólida. Posteriormente se colocó sobre una

rampa hecha con portaobjetos de vidrio, con una inclinación de 10° sobre el eje horizontal y se le hizo un corte vertical a 55° desde la línea media. Esta orientación permitió obtener rebanadas que conservaran la conectividad tálamo-cortical intacta (Agmon and Connors, 1991). La porción rostral del tejido se desechó y la porción caudal se adhirió al portamuestras de un microtomo VT1000S (Leica Biosystems) con la cara sobre la que se hizo el corte hacia abajo. La cámara del vibratomo se llenó con LCEA frío y se obtuvieron rebanadas de 300 µm, que se transfirieron a otra cámara con LCEA oxigenado durante 10 min. Depués se incubaron durante 30 min en una solución a 35°C con Fluo 4-AM 22 μM (Invitrogen), Pluronic<sup>®</sup> F-127 0.4% (Sigma, St. Louis, MO, EUA) y dimetil sulfóxido 0.1% en LCEA. Las rebanadas se lavaron con LCEA y se transfirieron a una cámara de acrílico tratada con poli-L-lisina al 30% y se cubrieron con una malla de nylon para inmovilizarlas. El tejido se perfundió con LCEA oxigenado utilizando un flujo de 1.5-2 ml/min. Después de 10 min de estabilización, la actividad intrínseca de Ca<sup>2+</sup> intracelular se registró usando una cámara Cool-Snap HQ2 CCD (Photometrics) acoplada a un microscopio de epifluorescencia M25FA (Leica Microsystems). Los potenciales espontáneos de Ca<sup>2+</sup> de la S1 se capturaron cada 400 ms (100 ms de apertura y 300 ms de intervalo entre cuadros) utilizando un objetivo APO 2.0X, una longitud de excitación de 488 nm y un filtro de 510 nm. La longitud de cada registro fue de 5,000 cuadros. Al final de cada sesión de registro la viabilidad de la rebanada se evaluó añadiendo una solución alta en KCI (50 mM KCI, 120 mM NaCI, 10 mM HEPES and 2 mM CaCl<sub>2</sub>, pH 7.4) durante 50 s y registrando los potenciales de Ca<sup>2+</sup> de las células por 5 minutos adicionales.

## Análisis de la dinámica de Ca<sup>2+</sup> intracelular

Los registros de la dinámica de Ca<sup>2+</sup> intracelular se exportaron como secuencias de imágenes "time-lapse" en formato TIFF (Fig. 7A, Fig. S1). Primero se corrigió el movimiento de la rebanada a lo largo del registro con el plug-in "Image stabilizer" del software ImageJ (NIH, USA). Luego se trazó un polígono delimitando la capa IV de la S1 (Fig. 7B). Las células dentro de esa área que respondieron a la despolarización por KCl se marcaron manualmente utilizando el plug-in "Time series analyzer" y se agregaron al gestor de regiones de interés (ROI manager, Fig. 7B). Los valores de la intensidad de fluorescencia se obtuvieron de los registros utilizando la función "Multi-measure" y luego se procesaron con el software Igor Pro (Wavemetrics). La función semiautomática "Analyze calcium" se usó para corregir los cambios en la línea base del registro ocasionados por el blanqueamiento del fluoróforo a lo largo del tiempo y para obtener los valores normalizados de la intensidad de fluorescencia, definidos como  $\Delta F/F_0 = (F_0 - F_t)/F_0$ . Las gráficas de raster de los potenciales de Ca<sup>2+</sup> se generaron utilizando el macros "Traces to image" y la frecuencia, amplitud, constante de decaimiento ( $\tau_d$ ) y área bajo la curva de los picos se obtuvieron usando la función "Multipeak fitting" (Fig. 7C).



**Figura 7. Análisis de la dinámica de Ca<sup>2+</sup> intracelular en células de la S1**. A) Acercamiento de la S1 en una rebanada tálamo-cortical incubada con Fluo 4-AM. B) ROIs analizadas. El polígono color azul claro muestra el área ocupada por la capa IV (placa cortical al DP1) y los círculos azules representan a las células que respondieron a la despolarización por KCI. C) Parámetros de los potenciales de Ca<sup>2+</sup> que se analizaron para cada neurona seleccionada.

## Evaluación de la temporalidad de segregación de las ATCs y su avance a través de la corteza

### Histoquímica para acetilcolinesterasa (AChE)

Ocho individuos controles y diez enucleados de 24 horas de edad post-parto se anestesiaron con una dosis letal de pentobarbital y se perfundieron vía intracardiaca con solución salina al 0.9% seguida de paraformaldehído al 4% en amortiguador de fosfatos. Los cerebros se extrajeron y se separaron los hemisferios a lo largo de la línea media. La corteza de uno de los hemisferios se disectó, se colocó entre dos portaobjetos de vidrio separados por espaciadores de 2 mm y se aplanaron con la ayuda de clips de presión. El otro hemisferio cerebral se dejó intacto. Los tejidos se postfijaron durante 16 horas, se crioprotegieron con incubaciones secuenciales de sacarosa al 15 y 30% a 4°C y se cortaron a 40 µm con ayuda de un criotato (SLEE medical). Las cortezas aplanadas se cortaron en el plano tangencial a la superficie mientras que los hemisferios intactos se cortaron coronalmente. Los cortes se montaron en portaobjetos gelatinizados y se incubaron en una solución con acetato de sodio 50 mM, sulfato de cobre 4 mM, glicina 16 mM, acetilcolina yodada 4 mM y etopropazina 86 uM, protegidos de la luz. Después de 18 horas se retiró la solución de incubación y las laminillas se revelaron durante 2-3 minutos en sulfito de amonio al 0.1%, seguido de dos lavados en agua destilada. Las laminillas se dejaron secar y se montaron utilizando Cytoseal 60 (Thermo Scientific). Los cortes se fotografiaron con un microscopio EZ4E (Leica Microsystems) y se analizaron con el software ImageJ. El avance de las ATCs a través de la corteza se estimó en rebanadas coronales midiendo la distancia desde la base de la corteza hasta la parte superior de las arborizaciones (frente de crecimiento). Para obtener esta medida, la imagen se convirtió en binaria utilizando la función "Threshold", de manera que el área ocupada por las ATCs pudiera detectarse automáticamente. Se trazó un rectángulo desde la base de la corteza hasta la superficie y el área calculada entre la base de la corteza y el frente de crecimiento se dividó entre el ancho del rectángulo para obtener la altura, que corresponde a la distancia recorrida por las ATCs a través de la corteza (Fig. 10A-B).

Los cortes tangenciales de la corteza se utilizaron para cuantificar el grado de segregación de las ATCs. Se trazó un rectángulo sobre las filas de barriles C y D (Fig. 10F) y los valores de grises para cada pixel a lo largo las filas se obtuvieron utilizando la función "Plot Profile". El índice de segregación se calculó dividiendo los valores de gris de los septos entre los valores de los centros del barril.

#### Marcaje con Dil

Las ATCs se marcaron con Dil al DP1 (22-28 hrs después del nacimiento, n = 14 para controles y 14 para enucleados), DP2 (47-51 hrs, n = 14 para controles y 15 para enucleados) y DP3 (72=74 hrs, n = 15 para controles y 15 para enucleados). Para hacer el marcaje se anestesió a las ratas con una dosis letal de pentobarbital y se perfundieron vía intracardiaca con solución salina al 0.9% seguida de paraformaldehído al 10% en amortiguador de fosfatos. Los cerebros se extrajeron y se post-fijaron durante 48-72 hrs. Posteriormente se hizo un corte coronal a la altura

del tálamo posterior y la superficie expuesta se pintó con violeta de cresilo utilizando un pincel para poder observar las diferentes regiones cerebrales. Entre dos y cuatro cristales pequeños (diámetro entre 100 y 200 µm) de Dil (1,1'-Dioctadecyl-3,3,3',3'-Tetramethylindocarbocyanine Perchlorate, Life Technologies) se introdujeron bilateralmente en el núcleo VPM del tálamo utilizando un capilar de vidrio, con ayuda de un microscopio estereoscópico EZ4E (Leica Microsystems). El sitio en donde se colocaron los cristales se cubrió con un parche de agar al 3% en amortiguador de fosfatos. Los cerebros se almacenaron en viales de plástico protegidos de la luz a temperatura ambiente durante 3 a 8 semanas. Al final del periodo de incubación los cerebros se embebieron en un bloque de agar al 2% en amortiguador de fosfatos y se pegaron al portamuestras de un vibratomo VT 1000S (Leica Microsystems). Se obtuvieron cortes coronales de 150 µm, se colectaron en amortiguador de fosfatos en una caja de cultivo de 24 pozos y los núcleos se tiñeron con DAPI o Sytox Green (Life Technologies). Se montaron en laminillas gelatinizadas y se colocó un cubreobjetos encima utilizando DAKO (Agilent) como medio de montaje.

Se tomaron fotos de dos a cuatro cortes por animal que contuvieran a la S1 utilizando una longitud de onda de 594 nm en un microscopio de fluorescencia DSU B51 (Olympus). La proporción óptima de señal-ruido se determinó para cada edad y todos los cortes dentro de la misma edad se fotografiaron utilizando las mismas condiciones.

El grado de arborización de las ATCs se estimó cuantificando la densidad de botones terminales marcados con Dil en cada capa cortical con el software ImageJ. Las capas de la corteza se delimitaron manualmente usando la diferencia en densidad celular como referencia. Las terminales se identificaron automáticamente utilizando la función "Find maxima" con una tolerancia al ruido definida para cada edad (20 para DP1, 15 para DP2 y 10 para DP3). El número de partículas, cada una correspondiente a una terminal, se dividió entre el área de cada capa para obtener la densidad de terminales por capa cortical. La proporción de botones terminales por capa también se calculó para tener un estimado de la maduración de las ATCs.

## Análisis estadístico

Los datos se analizaron y graficaron utilizando el software Prism 6 (GraphPad Software Inc). En las gráficas se muestran los promedios y errores estándar (EE). Las comparaciones estadísticas entre controles y enucleados a lo largo del desarrollo se hicieron con una ANOVA de dos vías. Para comparar los promedios entre controles y enucleados a una sola edad se utilizó la prueba *t* de Student para datos con distribución normal, o la *U* de Mann-Whitney en caso de que los datos no pasaran la prueba de normalidad. Los valores de *p* menores a 0.05 se consideraron estadísticamente sinificativos y se representaron de la siguiente manera: \**p*<0.05, \*\**p*<0.01, \*\*\**p*<0.001 y \*\*\*\**p* < 0.0001.

## 2-7. Resultados

# La concentración de glutamato en el LCE disminuye al DP1 en ratas enucleadas perinatalmente

Se ha visto que la concentración global de serotonina en el LCE regula la temporalidad de formación de los barriles (Toda et al., 2013) y que un aumento en la activación global de los receptores GABA<sub>A</sub> adelanta los periodos críticos de plasticidad en diversas áreas cerebrales (Hensch, 2005). La activación de los receptores de GABA ayuda además a la activación de los receptores de NMDA en neuronas inmaduras (Leinekugel et al., 1997), crucial para la formación de los barriles (Mizuno et al., 2014), mientras que los niveles globales de glutamato afectan a la actividad espontánea de las neuronas (Featherstone and Shippy, 2008), la cual también influye en el desarrollo de los barriles. Por lo tanto, como una primera aproximación para explorar si el adelanto en la formación de los barriles como consecuencia de la enucleación pudiera estar relacionado con cambios en los niveles de algunos neurotransmisores, cuantificamos la concentración de serotonina, GABA y glutamato en el LCE y en la S1 en el periodo que precede a la aparición de los barriles.



Figura 8. Concentraciones de serotonina, glutamato y GABA en el LCE y la S1 en el periodo que precede a la formación de los barriles. A-C) Concentraciones de neurotransmisores en el LCE. D-F) Concentraciones de neurotransmisores en la S1. En todas las gráficas cada punto representa a un individuo y las líneas representan el promedio  $\pm$  EE. A) Concentración de serotonina en el LCE. Ctl:  $^{+}p = 0.047$ , prueba *U* de Mann-Whitney, DP1 = 5.60  $\pm$  1.09 (n = 5) vs DP3 = 4.73  $\pm$  0.39 (n = 5). DP3:  $^{*}p = 0.013$ , prueba *t* de Student, Ctl = 5.88  $\pm$  0.70 (n = 5) vs Enu = 4.59  $\pm$  0.19 (n = 5). B) Concentración de GABA en el LCE. Ctl:  $^{*}p = 0.01$ , prueba *t* de Student, DP1 = 245.02  $\pm$  107.27 (n = 5) vs DP3 = 61.93  $\pm$  58.75 (n = 5). Enu:  $^{*}p = 0.022$ , prueba *t* de Student, DP1 = 145.96  $\pm$  63.52 (n = 5) vs DP3 = 28.79  $\pm$  13.01 (n = 3). C) Concentración de glutamato en el LCE. DP1:  $^{*}p = 0.04$ , prueba *t* de Student, Ctl = 886.9  $\pm$  388.1 (n = 5) vs Enu = 444.6  $\pm$  108.6 (n = 5). Ctl:  $^{*}p = 0.022$ , prueba *t* de Student, DP1 = 886.9  $\pm$  388.1 (n = 5) vs DP3 = 341.7  $\pm$  190 (n = 5). Enu:  $^{*}p = 0.002$ , prueba *t* de Student, DP1 = 886.9  $\pm$  388.1 (n = 5). Concentración de Student, DP1 = 444.6  $\pm$  108.6 (n = 5) vs DP3 = 187.7  $\pm$  67.7 (n = 5). D) Concentración de serotonina en la S1. E) Concentración de GABA en la S1. F) Concentración de glutamato en la S1.

En concordancia con lo reportado por Toda et al (2013), nosotros también encontramos una disminución de serotonina en el LCE en los días previos a la aparición de los barriles (Fig. 8A). Esta disminución fue ligeramente mayor en los individuos enucleados (22% en grupo Enu vs 16% en grupo Ctl), sin embargo, no hubo una diferencia significativa al comparar al grupo control con el grupo enucleado en las edades estudiadas.

Al igual que para la serotonina, las concentraciones de GABA y glutamato disminuyeron tanto en controles como en enucleados entre los DP1 y 3. Además, la concentración extracelular de glutamato disminuyó en las ratas enucleadas al DP1 (Fig. 8C), por lo que es probable que los niveles de actividad espontánea también estén modificados (Featherstone and Shippy, 2008). Por el contrario, no encontramos cambios en la concentración total de serotonina, GABA o glutamato en la S1 (Fig. 8D-F).

## La amplitud de los potenciales espontáneos de Ca<sup>2+</sup> disminuye al DP1 en la S1 de ratas enucleadas perinatalmente

Las concentraciones extracelulares de neurotransmisores tienen efectos en la actividad espontánea de las neuronas, por lo que a continuación evaluamos si la disminución de la concentración extracelular de glutamato en ratas enucleadas se acompaña de modificaciones en la actividad espontánea de la S1. Posibles cambios en la actividad espontánea serían de gran relevancia para el fenómeno que estamos estudiando, ya que se sabe que ésta regula la localización de las desacetilasas de histonas dentro de las células (Chawla et al., 2003; Schlumm et al., 2013) y también se ha visto implicada en procesos de plasticidad intermodal (Moreno-Juan et al., 2017; Zheng et al., 2014).

Los patrones de actividad espontánea en la S1 se caracterizaron por medio de la cuantificación de la dinámica de Ca<sup>2+</sup> intracelular en células de la capa IV (Fig. 9A) en ratas controles y enucleadas durante el periodo que precede a la aparición de los barriles (DP1-3). En las ratas enucleadas el porcentaje de células con potenciales espontáneos fue ligeramente menor al DP1 pero regresó a valores similares a los de los controles a los DP2 y 3 (Fig. 9B). Se evaluaron cuatro parámetros de los potenciales espontáneos: la amplitud, frecuencia, área bajo la curva y constante de decaimiento ( $\tau_d$ ). Para obtener los valores promedio de cada parámetro se analizaron los potenciales espontáneos de cada célula (Fig. 9C y D) y se promediaron los valores de todas las células analizadas de un mismo individuo. Un primer análisis cualitativo a nivel de la población celular mostró una disminución en la amplitud de los potenciales de Ca<sup>2+</sup> en las ratas enucleadas en comparación con las controles al DP1 (Fig. 9E y F), lo cual se confirmó al analizar los registros individuales de cada célula, encontrando una disminución del 40% en la amplitud

promedio (Fig. 9G). La frecuencia de los potenciales de Ca<sup>2+</sup> (Fig. 9H) y la  $\tau_d$  (Fig. 9I) disminuyeron entre los DP1 y 3 y entre los DP1 y 2, respectivamente, en las ratas enucleadas. Aunque no hubo diferencias en el valor promedio de estos parámetros entre grupos experimentales a ninguna de las edades estudiadas, la  $\tau_d$  tiende a disminuir al DP1 en ratas enucleadas, lo que, justo con la disminución en el valor de la amplitud, ocasiona una disminución del 75% en el área bajo la curva de los potenciales espontáneos de las neuronas como consecuencia de la enucleación (Fig. 9J). Tanto el cambio en la amplitud como en el área bajo la curva fueron temporales, ya que ambos parámetros regresaron a valores normales al DP2 y se mantuvieron así hasta el DP3.



**Figura 9. Actividad espontánea en la S1 durante el periodo que precede a la formación de los barriles.** A) Rebanada tálamo-cortical de un cerebro de DP1; las células analizadas se seleccionaron de la placa cortical, que se muestra delimitado por una línea punteada. B) Porcentaje de células con potenciales espontáneos de Ca<sup>2+</sup> al DP1. C-D) Trazos representativos de la actitivad de Ca<sup>2+</sup> en una neurona de un individuo control (C) y un individuo enucleado (D). E-F) Gráficas de raster de la amplitud registrada durante 30 min en la población neural del plato cortical de una rata control (E) y una enucleada (F). G) Amplitud de los potenciales espontáneos de Ca<sup>2+</sup> al DP1. \*\**p* < 0.01, ANOVA de dos vías, Ctl (n=8) vs Enu (n=8) al DP1 (asteriscos rojos). \*\**p* < 0.01, ANOVA de dos vías, DP1 (n=8) vs DP3 (n=8) en

ratas enucleadas (asteriscos grises). H) Frecuencia de los potenciales espontáneos de Ca<sup>2+</sup>. \*\*p < 0.01, ANOVA de dos vías, DP1 (n=8) vs DP3 (n=8) en ratas enucleadas. I) Constante de decaimiento. \*p < 0.05, ANOVA de dos vías, DP1 (n=8) vs DP2 (n=7) en ratas enucleadas. J) Área de los potenciales espontáneos de Ca<sup>2+</sup> al DP1. \*\*\*p < 0.001, ANOVA de dos vías, Ctl (n=8) vs Enu (n=8) al DP1 (asteriscos rojos). \*p < 0.05, ANOVA de dos vías, DP1 (n=7) en ratas controles (asterisco negro). Todas las gráficas muestran el promedio <u>+</u> EE. Cada punto corresponde al valor promedio en un individuo.

# La enucleación no afecta el tiempo de segregación de las ATCs ni su crecimiento antes de la formación del barril

Como se mencionó en la sección de antecedentes, sabemos que el adelanto en la formación de los barriles está acompañado de un acomodo temprano de las neuronas corticales alrededor de las ATCs (Fetter-Pruneda et al., 2013). Sin embargo, se desconoce si también hay cambios en el tiempo de desarrollo de las ATCs que pudieran ocasionar la aparición temprana de los barriles. Para evaluar esta posibilidad, exploramos diferentes aspectos del desarrollo de las ATCs en el periodo que precede a la formación de los barriles, la cual ocurre a lo largo del DP3 cuando las ATCs establecen contactos sinápticos con las neuronas de la capa IV de la corteza. Como un indicativo del ritmo de crecimiento de las ATCs se midió el avance de su frente de crecimiento a través de la S1 a las 24 hrs post-parto en rebanadas coronales procesadas con la histoquímica para AChE (Fig. 10A-B). La distancia recorrida por las ATCs desde la base de la corteza fue similar entre ratas controles y enucleadas (Fig. 10C), lo que sugiere que crecen a velocidades similares en ambos grupos experimentales.

A continuación evaluamos si hay modificaciones en otro aspecto del desarrollo de las ATCs, su temporalidad de segregación. A las 24 hrs post-parto las filas de barriles podían distinguirse en todos los cerebros analizados pero los barriles invididuales se habían segregado sólo en algunos de ellos (Fig. 10D-G). Para poder cuantificar el grado de segregación y hacer comparaciones entre grupos, medimos los valores de gris de las ATCs teñidas con AChE a lo largo de las filas de barriles C y D. Esto nos dio un perfil de intesidad que permitió diferenciar claramente a los barriles de los septos. Elegimos estas filas debido a que son las que tenían una

mejor definición y aparecían en todos los individuos. Con estos datos calculamos un índice de segregación dividiendo el máximo valor de gris de los septos (que corresponde a la parte más clara entre dos arborizaciones) entre el mínimo valor de los barriles (que usualmente corresponde al centro del barril). Debido a que la segregación de las filas precede a la de los barriles individuales, el valor del índice de segregación entre filas fue más alto que entre barriles (p = 0.006), apoyando que esta medida puede distinguir entre diferentes niveles de segregación. Sin embargo, no encontramos diferencias en el grado de segregación de los barriles entre ratas controles y enucleadas (Fig. 10H), sugiriendo que el tiempo de segregación de las ATCs a barriles individuales no se modifica por la enucleación perinatal.



**Figura 10. La maduración anatómica de las ATCs no se modifica con la enucleación.** A-B) Cortes coronales representativos a través de la S1 de una rata control (A) y una enucleada (B) a las 24 horas post-parto, procesados con la histoquímica para AChE. Los árboles individuales formados por las ATCs pueden observarse como manchones cafés cerca de la superficie de la corteza. Las líneas punteadas indican la distancia recorrida por el frente de crecimiento desde la base de la corteza. C) Avance del frente de crecimiento de las ATCs a través de la S1 a las 24 hrs. La gráfica muestra el promedio <u>+</u> EE (n = 3 para Ctl y Enu). D-G) Cortes tangenciales representativos del PMBSF de una rata control (D y E) y una enucleada (F y G) mostrando la segregación parcial (D y F) o completa (E y G) de las ATCs a las 24 hrs post-parto. Las flechas señalan las filas que se analizaron para obtener el índice de segregación

entre barriles. H) Indíce de segregación entre filas y barriles individuales de la S1 de ratas de 24 hrs. La gráfica muestra el promedio  $\pm$  EE (n = 8 para Ctl y 10 para Enu). I) Corte coronal representativo a través de la S1 con los núcleos celulares teñidos con SYTOX green; las líneas punteadas delimitan las capas corticales. J) ATCs marcadas con Dil. Las flechas señalan algunos botones axonales. K) Densidad de botones terminales por capa cortical. Las líneas negras indican el valor promedio. L) Porcentaje de botones terminales por capa cortical. \*p < 0.05, \*\*p < 0.01, \*\*\*p < 0.001, \*\*\*\*p < 0.0001, ANOVA de dos vías. n = 14 para Ctl y Enu al DP1. n = 14 Ctl y 15 para Enu al DP2. n = 16 Ctl y Enu al DP3.

Por último medimos la densidad y proporción de botones terminales marcados con Dil por capa cortical para inferir el grado de arborización y maduración de las ATCs (Fig. 10I-J). Al DP3 encontramos un aumento en la **densidad** de botones marcados en la capa V con respecto al DP2 en los individuos controles (Fig. 10K). En los individuos enucleados este aumento en la densidad de botones en la capa V ocurrió un día antes, al DP2, acompañado de un aumento en las capas II/III y IV. Sin embargo, no detectamos cambios en la densidad de botones por capa entre grupos experimentales. Por otra parte, entre los DP2 y 3 el **porcentaje** de botones terminales aumentó en la capa V y disminyó en la capa II/III (Fig. 10L) en ambos grupos experimentales, posiblemente reflejando la retracción de las ATCs de la capa II/III que ocurre normalmente en esta etapa (Rebsam et al., 2002). Igual que para la densidad de botones, no encontramos diferencias en el porcentaje de botones por capa entre grupos experimentales. En resumen, no encontramos alteraciones en ninguno de los parámetros evaluados que indicaran que existe un aumento en el crecimiento de las ATCs en la capa IV antes de la formación de los barriles como consecuencia de la enucleación.

## 2-8. Discusión

Como se mencionó en los antecedentes, la enucleación bilateral en las primeras horas del desarrollo postnatal de la rata ocasiona el adelanto en la formación de los barriles, lo cual extiende su ventana de desarrollo, conduce a una mayor arborización de las ATCs una vez que los barriles se han formado y tiene como resultado final barriles más grandes. Se ha visto que la formación del borde de los barriles por las neuronas estrelladas espinosas se adelanta y se infiere que la maduración temprana de estas neuronas conduce a la formación precoz de los barriles

debido a que, incluso antes de que éstos se formen, las neuronas estrelladas de la capa IV de S1 presentan cambios epigenéticos correspondientes a etapas del desarrollo más avanzadas (Fetter-Pruneda et al., 2013). Sin embargo, no se sabe si hay una contribución del tálamo a la formación adelantada de los barriles o si esto resulta de procesos que ocurren sólo a nivel cortical. Además, las señales que desencadenan los cambios epigenéticos en las neuronas corticales de los individuos enucleados se desconocen. En este trabajo exploramos la posible participación de los neurotransmisores serotonina, GABA y glutamato, y de la actividad espontánea cortical en el control de la temporalidad de formación de los barriles, y evaluamos si existen cambios morfológicos en las ATCs en el periodo que precede a la formación de los barriles que pudieran relacionarse con el adelanto en su formación. Encontramos una disminución en la concentración de glutamato en el LCE de las ratas enucleadas y una disminución de la amplitud de los potenciales espontáneos de Ca<sup>2+</sup> en la S1 al DP1, unas cuantas horas después de la enucleación y un día antes de que ocurran los cambios epigenéticos en las neuronas corticales, lo que abre la posibilidad de que estos cambios estén entre las señales que coordinan la plasticidad intermodal. Por otra parte, no encontramos cambios en la longitud, tiempo de segregación o en la densidad de botones terminales de las ATCs en el periodo que precede a la formación de los barriles en individuos enucleados, lo que indica que la formación temprana de los barriles no se debe a cambios en el desarrollo de las ATCs, y que el aumento en su crecimiento es una consecuencia del establecimiento temprano de las sinapsis entre tálamo y corteza. Este hallazgo es importante porque sugiere que la regulación del tamaño de las áreas corticales no recae tan fuertemente en el tálamo como se había propuesto (Moreno-Juan et al., 2017), al menos en ratas enucleadas perinatalmente. Moreno-Juan et al. (2017) reportaron que la enucleación bilateral en etapas embrionarias ocasiona un aumento en la frecuencia de ondas espontáneas de Ca<sup>2+</sup> en el VPM dos días después y un aumento en los niveles del gen  $Ror\beta$  en los primeros días postnatales. Debido a que el aumento en la actividad espontánea induce la expresión de  $Ror\beta$  y a que los niveles de este gen en el VPM regulan el crecimiento de las ATCs y el tamaño de los barriles, ellos concluyeron que el área final de la S1 se especifica por las ATCs, dejando de lado una posible contribución de la corteza. Esta interpretación no concuerda del todo con los hallazgos de este trabajo, en donde encontramos que las ATCs aumentan su crecimiento sólo después de que se

han formado los barriles, y tampoco toma en cuenta posibles cambios en el tiempo de desarrollo de la S1. Sin embargo, hay algunas diferencias metodológicas entre los estudios como la edad de la enucleación, la especie de roedor utilizada, el tipo, etapa del desarrollo y zonas en las que se cuantificó la actividad espontánea, entre otras, que podrían explicar las diferentes interpretaciones entre ambos estudios. Otra posible explicación es que los mecanismos que subyacen a la plasticidad intermodal en roedores enucleados sean diferentes entre la etapa embrionaria y la postnatal.

A pesar de lo discutido en el párrafo anterior, es importante tener en cuenta que la ausencia de cambios morfológicos en el desarrollo de las ATCs no descarta su participación en la formación temprana de los barriles. La amplitud de los potenciales espontáneos de Ca<sup>2+</sup> en el VPM aumenta al DP1 como consecuencia de la enucleación, sin que haya cambios en la frecuencia (Martínez-Méndez et al., 2019; Pérez-Torres, 2019). Esto indica que las propiedades funcionales de las neuronas talámicas también se modifican, lo que, en conjunción con los cambios en la actividad de las neuronas corticales, podría dar lugar a la formación temprana de las sinapsis de los barriles.

A diferencia de otros estudios en los que han visto cambios en la frecuencia de la actividad espontánea como consencuencia de la privación sensorial (Moreno-Juan et al., 2017; Zheng et al., 2014), nosotros no encontramos cambios en la frecuencia de los potenciales espontáneos de Ca<sup>2+</sup> en ratas enucleadas. Esta diferencia puede deberse al tipo de privación sensorial utilizada en otros estudios (crianza en oscuridad contra enucleación, por ejemplo) o a la edad en la que se está registrando la actividad. En nuestro caso, registramos la actividad espontánea justo antes de la aparición de los barriles, cuando su formación está en proceso. Ya que la actividad neuronal es un proceso que se modifica rápidamente ante perturbacione ambientales, consideramos que es justo en esta etapa cuando los cambios en la actividad de las neuronas que formarán a los barriles nos pueden arrojar más información sobre cómo se modifica este proceso. Respecto al significado de que haya cambios en la amplitud o en la frecuencia, usualmente los cambios en amplitud reflejan modificaciones en el tamaño del quantum o un aumento en la densidad o

conductancia de los receptores postsinápticos. Por otra parte, los cambios en la frecuencia reflejan modificaciones en la probabilidad de liberación (por ejemplo, en el recambio vesicular) o en el número de sinapsis funcionales (Queenan et al., 2012).

Es interesante que, a diferencia de la enucleación, la crianza de ratas en oscuridad continua no conduce a una expansión citoarquitectónica de la S1. Esto indicaría que la ausencia de estímulos visuales no es suficiente para la expansión de los barriles y que probablemente haya una contribución de la retina o algún otro elemento de la vía visual en este proceso. Las células ganglionares de la retina envían proyecciones al núcleo supraquiasmático e inducen ritmicidad celular en ausencia de luz mediante la activación de los receptores de NMDA (Webb et al., 2013). Esta ritmicidad se pierde con la enucleación, y el hecho de que la expansión de los barriles en individuos enucleados está mediada por un cambio en los tiempos de desarrollo, sugiere que los ritmos circadianos podrían influir en este proceso. Sin embargo, también existe la posibilidad de que haya relojes celulares independientes en distintas áreas del cerebro que controlen la temporalidad de procesos de manera local. Por otra parte, el hecho de que la concentración de glutamato disminuya en el LCE de las ratas enucleadas concuerda con el hecho de que el sistema glutamatérgico está implicado en el mantenimiento de los ritmos celulares en ausencia de la luz. Algunas de las neuronas que participan en la regulación de los ritmos circadianos contactan directamente al LCE (Vígh et al., 2004), por lo que cambios en los niveles de neurotransmisores que secretan podrían verse reflejados en la composición del LCE.

Por último, los cambios en la amplitud de los potenciales de Ca<sup>2+</sup> en los individuos enucleados podrían deberse tanto a la alteración de los ritmos circadianos por la ausencia de señales de la retina (Krishnan et al., 2008) como a los cambios en la concentración de glutamato en el LCE (Featherstone and Shippy, 2008).

## 2-9. Perspectivas

- Manipular los niveles de glutamato y de la actividad espontánea en las ratas enucleadas y evaluar su efecto sobre la acetilación de histonas y la temporalidad de formación de los barriles.
- Evaluar si las dendritas de las neuronas estrelladas espinosas se orientan precozmente hacia los centros de los barriles en ratas enucleadas.
- Evaluar si hay cambios en las subunidades 2B y 2D del receptor de NMDA durante el proceso de formación de los barriles en individuos enucleados.
- Evaluar si la amplitud de los potenciales espontáneos de Ca<sup>2+</sup> oscila a lo largo del día en la S1
  y, en caso afirmativo, si esta osculación se modifica con la enucleación.

## Referencias

- Agmon, A., Connors, B.W., 1991. Thalamocortical responses of mouse somatosensory (barrel) cortex in vitro. Neuroscience 41, 365–379.
- Aitken, A.R., Törk, I., 1988. Early development of serotonin-containing neurons and pathways as seen in wholemount preparations of the fetal rat brain. J. Comp. Neurol. 274, 32–47. https://doi.org/10.1002/cne.902740105
- Akhtar, M.W., Raingo, J., Nelson, E.D., Montgomery, R.L., Olson, E.N., Kavalali, E.T., Monteggia, L.M., 2009. Histone deacetylases 1 and 2 form a developmental switch that controls excitatory synapse maturation and function. J. Neurosci. 29, 8288–97. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0097-09.2009
- Balasubramaniyan, V., Boddeke, E., Bakels, R., Küst, B., Kooistra, S., Veneman, A., Copray, S.,
  2006. Effects of histone deacetylation inhibition on neuronal differentiation of embryonic mouse neural stem cells. Neuroscience 143, 939–951.
  https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2006.08.082
- Bando, Y., Irie, K., Shimomura, T., Umeshima, H., Kushida, Y., Kengaku, M., Fujiyoshi, Y., Hirano, T., Tagawa, Y., 2016. Control of Spontaneous Ca2+ Transients Is Critical for Neuronal Maturation in the Developing Neocortex. Cereb. Cortex 26, 106–117. https://doi.org/10.1093/cercor/bhu180
- Bennett-Clarke, C.A., Chiaia, N.L., Rhoades, R.W., 1996. Thalamocortical afferents in rat transiently express high-affinity serotonin uptake sites. Brain Res. 733, 301–6.
- Bennett-Clarke, C.A., Leslie, M.J., Chiaia, N.L., Rhoades, R.W., 1993. Serotonin 1B receptors in the developing somatosensory and visual cortices are located on thalamocortical axons.
   Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 90, 153–7. https://doi.org/10.1073/pnas.90.1.153
- Bennett-Clarke, C.A., Leslie, M.J., Lane, R.D., Rhoades, R.W., 1994. Effect of serotonin depletion on vibrissa-related patterns of thalamic afferents in the rat's somatosensory cortex. J. Neurosci. 14, 7594–7607.
- Berman, N.E., 1991. Alterations of visual cortical connections in cats following early removal of retinal input. Brain Res. Dev. Brain Res. 63, 163–180.
- Blue, M.E., Erzurumlu, R.S., Jhaveri, S., 1991. A comparison of pattern formation by thalamocortical and serotonergic afferents in the rat barrel field cortex. Cereb. Cortex 1, 380–9. https://doi.org/10.1093/cercor/1.5.380
- Boylan, C.B., Bennett-Clarke, C.A., Crissman, R.S., Mooney, R.D., Rhoades, R.W., 2000a. Clorgyline treatment elevates cortical serotonin and temporarily disrupts the vibrissaerelated pattern in rat somatosensory cortex. J. Comp. Neurol. 427, 139–49.
- Boylan, C.B., Kesterson, K.L., Crnko-Hoppenjans, T.A., Ke, M., Rizk, T., Mooney, R.D., Rhoades, R.W., 2000b. The cortical vibrissae representation is normal in transgenic mice lacking the 5-HT(1B) receptor. Brain Res. Dev. Brain Res. 120, 91–3.
- Bronchti, G., Heil, P., Sadka, R., Hess, A., Scheich, H., Wollberg, Z., 2002. Auditory activation of "visual" cortical areas in the blind mole rat (Spalax ehrenbergi). Eur. J. Neurosci. 16, 311– 329. https://doi.org/10.1046/j.1460-9568.2002.02063.x
- Bronchti, G., Schonenberger, N., Welker, E., Van der Loos, H., 1992. Barrelfield expansion after neonatal eye removal in mice. Neuroreport 3, 489–492.

- 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 a serotonin excess during the critical period. Neuron 16, 297–307.
- Catalano, S.M., Robertson, R.T., Killackey, H.P., 1996. Individual axon morphology and thalamocortical topography in developing rat somatosensory cortex. J. Comp. Neurol. 367, 36–53. https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-9861(19960325)367:1<36::AID-CNE4>3.0.CO;2-K
- Catalano, S.M., Robertson, R.T., Killackey, H.P., 1991. Early ingrowth of thalamocortical afferents to the neocortex of the prenatal rat. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 88, 2999–3003.
- Chawla, S., Vanhoutte, P., Arnold, F.J.L., Huang, C.L.-H., Bading, H., 2003. Neuronal activitydependent nucleocytoplasmic shuttling of HDAC4 and HDAC5. J. Neurochem. 85, 151–9.
- Cooper, R.M., Thurlow, G.A., 1985. Depression and recovery of metabolic activity in rat visual system after eye removal. Exp. Neurol. 89, 322–336.
- Crair, M.C., Malenka, R.C., 1995. A critical period for long-term potentiation at thalamocortical synapses. Nature 375, 325–8. https://doi.org/10.1038/375325a0
- D'Amato, R.J., Blue, M.E., Largent, B.L., Lynch, D.R., Ledbetter, D.J., Molliver, M.E., Snyder, S.H., 1987. Ontogeny of the serotonergic projection to rat neocortex: transient expression of a dense innervation to primary sensory areas. Proc. Natl. Acad. Sci. 84, 4322–4326. https://doi.org/10.1073/pnas.84.12.4322
- Dagnew, E., Latchamsetty, K., Erinjeri, J., Miller, B., Fox, K., Woolsey, T., 2003. Glutamate Receptor Blockade Alters the Development of Intracortical Connections in Rat Barrel Cortex. Somatosens. Mot. Res. 20. https://doi.org/10.1080/0899022031000083852
- Datwani, A., Iwasato, T., Itohara, 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, 477–92.
- Daw, M.I., Ashby, M.C., Isaac, J.T.R., 2007. Coordinated developmental recruitment of latent fast spiking interneurons in layer IV barrel cortex. Nat. Neurosci. 10, 453–61. https://doi.org/10.1038/nn1866
- Daws, L.C., Gould, G.G., Teicher, S.D., Gerhardt, G.A., Frazer, A., 2000. 5-HT(1B) receptormediated regulation of serotonin clearance in rat hippocampus in vivo. J. Neurochem. 75, 2113–22. https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.2000.0752113.x
- Dehay, C., Giroud, P., Berland, M., Killackey, H., Kennedy, H., 1996. Contribution of thalamic input to the specification of cytoarchitectonic cortical fields in the primate: effects of bilateral enucleation in the fetal monkey on the boundaries, dimensions, and gyrification of striate and extrastriate cortex. J. Comp. Neurol. 367, 70–89.

https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-9861(19960325)367:1<70::AID-CNE6&gt;3.0.CO;2-G Erzurumlu, R.S., Jhaveri, S., 1990. Thalamic axons confer a blueprint of the sensory periphery

onto the developing rat somatosensory cortex. Brain Res. Dev. Brain Res. 56, 229–34. Featherstone, D.E., Shippy, S.A., 2008. Regulation of synaptic transmission by ambient extracellular glutamate. Neuroscientist 14, 171–81.

https://doi.org/10.1177/1073858407308518

Feliciano, D.M., Zhang, S., Nasrallah, C.M., Lisgo, S.N., Bordey, A., 2014. Embryonic cerebrospinal fluid nanovesicles carry evolutionarily conserved molecules and promote neural stem cell amplification. PLoS One 9, e88810.

https://doi.org/10.1371/journal.pone.0088810

- Fetter-Pruneda, I., Geovannini-Acuña, H., Santiago, C., Ibarrarán-Viniegra, A.S., Martínez-Martínez, E., Sandoval-Velasco, M., Uribe-Figueroa, L., Padilla-Cortés, P., Mercado-Célis, G., Gutiérrez-Ospina, G., 2013. Shifts in developmental timing, and not increased levels of experience-dependent neuronal activity, promote barrel expansion in the primary somatosensory cortex of rats enucleated at birth. PLoS One 8, e54940. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0054940
- Fleury, M.O., Ashley, D. V, 1983. High-performance liquid chromatographic analysis of amino acids in physiological fluids: on-line precolumn derivatization with o-phthaldialdehyde. Anal. Biochem. 133, 330–5.
- Fox, K., Schlaggar, B., Glazewski, S., O'Leary, D., 1996. Glutamate Receptor Blockade at Cortical Synapses Disrupts Development of Thalamocortical and Columnar Organization in Somatosensory Cortex. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 93. https://doi.org/10.1073/PNAS.93.11.5584
- Fukuda, Y., Hsiao, C.F., 1984. Bilateral changes in soma size of geniculate relay cells and corticogeniculate cells after neonatal monocular enucleation in rats. Brain Res. 301, 13–23.
- Heck, N., Kilb, W., Reiprich, P., Kubota, H., Furukawa, T., Fukuda, A., Luhmann, H., 2007. GABA-A Receptors Regulate Neocortical Neuronal Migration in Vitro and in Vivo. Cereb. Cortex 17. https://doi.org/10.1093/CERCOR/BHJ135
- Hensch, T.K., 2005. Critical period plasticity in local cortical circuits. Nat. Rev. Neurosci. 6, 877– 88. https://doi.org/10.1038/nrn1787
- Hernández-Miranda, L.R., 2006. Modificaciones anatomicas y celulares de la corteza somatosensorial primaria de ratones enceguecidos al nacimiento (MSc thesis). Universidad Nacional Autónoma de México.
- Hsiao, C.F., Fukuda, Y., 1984. Plastic changes in the distribution and soma size of retinal ganglion cells after neonatal monocular enucleation in rats. Brain Res. 301, 1–12.
- Isaac, J.T., Crair, M.C., Nicoll, R.A., Malenka, R.C., 1997. Silent synapses during development of thalamocortical inputs. Neuron 18, 269–80.
- Izraeli, R., Koay, G., Lamish, M., Heicklen-Klein, A.J., Heffner, H.E., Heffner, R.S., Wollberg, Z., 2002. Cross-modal neuroplasticity in neonatally enucleated hamsters: structure, electrophysiology and behaviour. Eur. J. Neurosci. 15, 693–712.
- Jiang, B., Huang, Z.J., Morales, B., Kirkwood, A., 2005. Maturation of GABAergic transmission and the timing of plasticity in visual cortex. Brain Res. Brain Res. Rev. 50, 126–33. https://doi.org/10.1016/j.brainresrev.2005.05.007
- Kilb, W., Kirischuk, S., Luhmann, H.J., 2013. Role of tonic GABAergic currents during pre- and early postnatal rodent development. Front. Neural Circuits 7, 139. https://doi.org/10.3389/fncir.2013.00139
- Kilb, W., Kirischuk, S., Luhmann, H.J., 2011. Electrical activity patterns and the functional maturation of the neocortex. Eur. J. Neurosci. 34, 1677–1686. https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2011.07878.x
- Kobayashi, Y., Ye, Z., Hensch, T.K., 2015. Clock Genes Control Cortical Critical Period Timing. Neuron 86, 264–275. https://doi.org/10.1016/j.neuron.2015.02.036
- Koh, D.X.P., Sng, J.C.G., 2016. HDAC1 negatively regulates Bdnf and Pvalb required for parvalbumin interneuron maturation in an experience-dependent manner. J. Neurochem.

139, 369–380. https://doi.org/10.1111/jnc.13773

- Krishnan, P., Chatterjee, A., Tanoue, S., Hardin, P.E., 2008. Spike amplitude of single-unit responses in antennal sensillae is controlled by the Drosophila circadian clock. Curr. Biol. 18, 803–7. https://doi.org/10.1016/j.cub.2008.04.060
- Laurent, A., Goaillard, J.-M., Cases, O., Lebrand, C., Gaspar, P., Ropert, N., 2002. Activitydependent presynaptic effect of serotonin 1B receptors on the somatosensory thalamocortical transmission in neonatal mice. J. Neurosci. 22, 886–900.
- Lee, L.-J., Iwasato, T., Itohara, S., Erzurumlu, R.S., 2005. Exuberant thalamocortical axon arborization in cortex-specific NMDAR1 knockout mice. J. Comp. Neurol. 485, 280–92. https://doi.org/10.1002/cne.20481
- Leinekugel, X., Medina, I., Khalilov, I., Ben-Ari, Y., Khazipov, R., 1997. Ca2+ oscillations mediated by the synergistic excitatory actions of GABA(A) and NMDA receptors in the neonatal hippocampus. Neuron 18, 243–55.
- Leslie, M.J., Bennett-Clarke, C.A., Rhoades, R.W., 1992. Serotonin 1B receptors form a transient vibrissa-related pattern in the primary somatosensory cortex of the developing rat. Brain Res. Dev. Brain Res. 69, 143–8.
- Lotto, B., Upton, L., Price, D.J., Gaspar, P., 1999. Serotonin receptor activation enhances neurite outgrowth of thalamic neurones in rodents. Neurosci. Lett. 269, 87–90.
- Luhmann, H.J., Khazipov, R., 2018. Neuronal activity patterns in the developing barrel cortex. Neuroscience 368, 256–267. https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2017.05.025
- Mansour-Robaey, S., Mechawar, N., Radja, F., Beaulieu, C., Descarries, L., 1998. Quantified distribution of serotonin transporter and receptors during the postnatal development of the rat barrel field cortex. Brain Res. Dev. Brain Res. 107, 159–63.
- Martínez-Méndez, R., Martínez-Martínez, E., Villafán-Monroy, H., Guzmán-López, J.A., Fuentes-Farías, A.L., Romo-González, T., Chavarría-Krauser, A., Gutiérrez-Ospina, G., 2013. Body and brain plasticity: Unraveling its principles through blindness, in: Pandalai, S.G. (Ed.), Recent Research Developments in Neuroscience, Vol. 4. Research Signpost, pp. 89–107.
- Martínez-Méndez, R., Pérez-Torres, D., Gómez-Chavarín, M., Padilla-Cortés, P., Fiordelisio, T., Gutiérrez-Ospina, G., 2019. Bilateral enucleation at birth modifies calcium spike amplitude, but not frequency, in neurons of the somatosensory thalamus and cortex: Implications for developmental cross-modal plasticity. IBRO Reports 7, 108–116. https://doi.org/10.1016/j.ibror.2019.11.003
- Martínez Méndez, R., 2008. Determinación de la concentración de aminoácidos neurotransmisores en la corteza somatosensorial de ratas enucleadas al nacimiento (BSc thesis). Universidad Nacional Autónoma de México.
- Mire, E., Mezzera, C., Leyva-Díaz, E., Paternain, A. V, Squarzoni, P., Bluy, L., Castillo-Paterna, M., López, M.J., Peregrín, S., Tessier-Lavigne, M., Garel, S., Galcerán, J., Lerma, J., López-Bendito, G., 2012. Spontaneous activity regulates Robo1 transcription to mediate a switch in thalamocortical axon growth. Nat. Neurosci. 15, 1134–43. https://doi.org/10.1038/nn.3160
- Mizuno, H., Luo, W., Tarusawa, E., Saito, Y.M., Sato, T., Yoshimura, Y., Itohara, S., Iwasato, T., 2014. NMDAR-regulated dynamics of layer 4 neuronal dendrites during thalamocortical reorganization in neonates. Neuron 82, 365–79. https://doi.org/10.1016/j.neuron.2014.02.026

Monsalve, G.C., Frand, A.R., 2012. Toward a unified model of developmental timing: A & quot;molting" approach. Worm 1, 221–30. https://doi.org/10.4161/worm.20874

- Moreno-Juan, V., Filipchuk, A., Antón-Bolaños, N., Mezzera, C., Gezelius, H., Andrés, B.,
  Rodríguez-Malmierca, L., Susín, R., Schaad, O., Iwasato, T., Schüle, R., Rutlin, M., Nelson, S.,
  Ducret, S., Valdeolmillos, M., Rijli, F.M., López-Bendito, G., 2017. Prenatal thalamic waves
  regulate cortical area size prior to sensory processing. Nat. Commun. 8, 14172.
  https://doi.org/10.1038/ncomms14172
- Newton, J.R., Sikes, R.W., Skavenski, A.A., 2002. Cross-modal plasticity after monocular enucleation of the adult rabbit. Exp. Brain Res. 144, 423–429. https://doi.org/10.1007/s00221-002-1087-8
- Penschuck, S., Giorgetta, O., Fritschy, J.M., 1999. Neuronal activity influences the growth of barrels in developing rat primary somatosensory cortex without affecting the expression pattern of four major GABAA receptor alpha subunits. Brain Res. Dev. Brain Res. 112, 117– 127.
- Pérez-Torres, D., 2019. Evaluación de la actividad intrínseca de las células del núcleo ventrobasal talámico en ratas cegadas al nacimiento (MSc thesis). Universidad Nacional Autónoma de México.
- Persico, A.M., Altamura, C., Calia, E., Puglisi-Allegra, S., Ventura, R., Lucchese, F., Keller, F.,
  2000. Serotonin depletion and barrel cortex development: impact of growth impairment
  vs. serotonin effects on thalamocortical endings. Cereb. Cortex 10, 181–91.
- Persico, A.M., Calia, E., Keller, F., 1997. Implants for sustained drug release over the somatosensory cortex of the newborn rat: a comparison of materials and surgical procedures. J. Neurosci. Methods 76, 105–113. https://doi.org/10.1016/S0165-0270(97)00087-3
- Petersen, C.C.H., 2019. Sensorimotor processing in the rodent barrel cortex. Nat. Rev. Neurosci. 20, 533–546. https://doi.org/10.1038/s41583-019-0200-y
- Petersen, C.C.H., 2007. The Functional Organization of the Barrel Cortex. Neuron 56, 339–355. https://doi.org/10.1016/j.neuron.2007.09.017
- Piña, B., Martínez, P., Suau, P., 1988. Differential acetylation of core histones in rat cerebral cortex neurons during development and aging. Eur. J. Biochem. 174, 311–5.
- Purves, D., Augustine, G.J., Fitzpatrick, D., Katz, L.C., LaMantia, A.-S., McNamara, J.O., Williams, S.M. (Eds.), 2001. Neuroscience, 2nd editio. ed. Sinauer Associates, Sunderland (MA).
- Queenan, B.N., Lee, K.J., Pak, D.T.S., 2012. Wherefore art thou, homeo(stasis)? Functional diversity in homeostatic synaptic plasticity. Neural Plast. 2012, 718203. https://doi.org/10.1155/2012/718203
- Radakovits, R., Barros, C., Belvindrah, R., Patton, B., Müller, U., 2009. Regulation of Radial Glial Survival by Signals From the Meninges. J. Neurosci. 29. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5537-08.2009
- Rauschecker, J.P., 1995. Compensatory plasticity and sensory substitution in the cerebral cortex. Trends Neurosci. 18, 36–43.
- Rauschecker, J.P., Korte, M., 1993. Auditory compensation for early blindness in cat cerebral cortex. J. Neurosci. 13, 4538–48.
- Rauschecker, J.P., Tian, B., Korte, M., Egert, U., 1992. Crossmodal changes in the somatosensory vibrissa/barrel system of visually deprived animals. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 89, 5063–

5067.

- Rebsam, A., Seif, I., Gaspar, P., 2002. Refinement of thalamocortical arbors and emergence of barrel domains in the primary somatosensory cortex: a study of normal and monoamine oxidase a knock-out mice. J. Neurosci. 22, 8541–8552.
- Rhoades, R.W., Bennett-Clarke, C.A., Chiaia, N.L., White, F.A., Macdonald, G.J., Haring, J.H., Jacquin, M.F., 1990. Development and lesion induced reorganization of the cortical representation of the rat's body surface as revealed by immunocytochemistry for serotonin. J. Comp. Neurol. 293, 190–207. https://doi.org/10.1002/cne.902930204
- Rhoades, R.W., Crissman, R.S., Bennett-Clarke, C.A., Killackey, H.P., Chiaia, N.L., 1996.
  Development and plasticity of local intracortical projections within the vibrissae representation of the rat primary somatosensory cortex. J. Comp. Neurol. 370, 524–535.
  https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-9861(19960708)370:4<524::AID-CNE8>3.0.CO;2-6
- Salichon, N., Gaspar, P., Upton, A.L., Picaud, S., Hanoun, N., Hamon, M., De Maeyer, 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 a and 5-ht transporter knock-out mice. J. Neurosci. 21, 884–96.
- Sánchez, M.P., Frassoni, C., Alvarez-Bolado, G., Spreafico, R., Fairén, A., 1992. Distribution of calbindin and parvalbumin in the developing somatosensory cortex and its primordium in the rat: an immunocytochemical study. J. Neurocytol. 21, 717–36. https://doi.org/10.1007/bf01181587
- Schlaggar, B.L., O'Leary, D.D., 1994. Early development of the somatotopic map and barrel patterning in rat somatosensory cortex. J. Comp. Neurol. 346, 80–96. https://doi.org/10.1002/cne.903460106
- Schlumm, F., Mauceri, D., Freitag, H.E., Bading, H., 2013. Nuclear calcium signaling regulates nuclear export of a subset of class IIa histone deacetylases following synaptic activity. J. Biol. Chem. 288, 8074–84. https://doi.org/10.1074/jbc.M112.432773
- Sebe, J.Y., Looke-Stewart, E.C., Estrada, R.C., Baraban, S.C., 2010. Robust tonic GABA currents can inhibit cell firing in mouse newborn neocortical pyramidal cells. Eur. J. Neurosci. 32, 1310–8. https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2010.07373.x
- Sorensen, S.A., Jones, T.A., Olavarria, J.F., 2003. Neonatal enucleation reduces the proportion of callosal boutons forming multiple synaptic contacts in rat striate cortex. Neurosci. Lett. 351, 17–20.
- Strominger, R.N., Woolsey, T.A., 1987. Templates for locating the whisker area in fresh flattened mouse and rat cortex. J. Neurosci. Methods 22, 113–8.
- Sugo, N., Oshiro, H., Takemura, M., Kobayashi, T., Kohno, Y., Uesaka, N., Song, W.-J.,
  Yamamoto, N., 2010. Nucleocytoplasmic translocation of HDAC9 regulates gene expression and dendritic growth in developing cortical neurons. Eur. J. Neurosci. 31, 1521–32. https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2010.07218.x
- Sumi, Y., Yagita, K., Yamaguchi, S., Ishida, Y., Kuroda, Y., Okamura, H., 2002. Rhythmic expression of RORβ mRNA in the mice suprachiasmatic nucleus. Neurosci. Lett. 320, 13–16. https://doi.org/10.1016/S0304-3940(02)00011-3
- Toda, T., Homma, D., Tokuoka, H., Hayakawa, I., Sugimoto, Y., Ichinose, H., Kawasaki, H., 2013. Birth Regulates the Initiation of Sensory Map Formation through Serotonin Signaling. Dev. Cell 27, 32–46. https://doi.org/10.1016/j.devcel.2013.09.002

- Toldi, J., Rojik, I., Fehér, O., 1993. Modification in primary visual cortical activity of rat induced by neonatal monocular enucleation, an electrophysiological and autoradiographic study. Acta Physiol. Hung. 81, 175–81.
- Tolner, E.A., Sheikh, A., Yukin, A.Y., Kaila, K., Kanold, P.O., 2012. Subplate Neurons Promote Spindle Bursts and Thalamocortical Patterning in the Neonatal Rat Somatosensory Cortex. J. Neurosci. 32, 692–702. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1538-11.2012
- Trevelyan, A.J., Thompson, I.D., 1995. Neonatal monocular enucleation and the geniculocortical system in the golden hamster: shrinkage in dorsal lateral geniculate nucleus and area 17 and the effects on relay cell size and number. Vis. Neurosci. 12, 971–983.
- Vígh, B., Manzano e Silva, M.J., Frank, C.L., Vincze, C., Czirok, S.J., Szabó, A., Lukáts, A., Szél, A., 2004. The system of cerebrospinal fluid-contacting neurons. Its supposed role in the nonsynaptic signal transmission of the brain. Histol. Histopathol. 19, 607–28.
- Webb, I.C., Coolen, L.M., Lehman, M.N., 2013. NMDA and PACAP receptor signaling interact to mediate retinal-induced scn cellular rhythmicity in the absence of light. PLoS One 8, e76365. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0076365
- Wong-Riley, M.T., Welt, C., 1980. Histochemical changes in cytochrome oxidase of cortical barrels after vibrissal removal in neonatal and adult mice. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 77, 2333–7.
- Woolsey, T.A., Van der Loos, H., 1970. The structural organization of layer IV in the somatosensory region (SI) of mouse cerebral cortex. The description of a cortical field composed of discrete cytoarchitectonic units. Brain Res. 17, 205–42.
- Woolsey, T.A., Wann, J.R., 1976. Areal changes in mouse cortical barrels following vibrissal damage at different postnatal ages. J. Comp. Neurol. 170, 53–66. https://doi.org/10.1002/cne.901700105
- Yaka, R., Yinon, U., Wollberg, Z., 1999. Auditory activation of cortical visual areas in cats after early visual deprivation. Eur. J. Neurosci. 11, 1301–1312.
- Yamasaki, M., Okada, R., Takasaki, C., Toki, S., Fukaya, M., Natsume, R., Sakimura, K., Mishina, M., Shirakawa, T., Watanabe, M., 2014. Opposing role of NMDA receptor GluN2B and GluN2D in somatosensory development and maturation. J. Neurosci. 34, 11534–48. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1811-14.2014
- Young-Davies, C.L., Bennett-Clarke, C.A., Lane, R.D., Rhoades, R.W., 2000. Selective facilitation of the serotonin(1B) receptor causes disorganization of thalamic afferents and barrels in somatosensory cortex of rat. J. Comp. Neurol. 425, 130–8.
- Zaccaria, K.J., McCasland, J.S., 2012. Emergence of layer IV barrel cytoarchitecture is delayed in somatosensory cortex of GAP-43 deficient mice following delayed development of dendritic asymmetry. Somatosens. Mot. Res. 29, 77–88. https://doi.org/10.3109/08990220.2012.686936
- Zheng, D., Purves, D., 1995. Effects of increased neural activity on brain growth. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 92, 1802–1806.
- Zheng, J.-J., Li, S.-J., Zhang, X.-D., Miao, W.-Y., Zhang, D., Yao, H., Yu, X., 2014. Oxytocin mediates early experience-dependent cross-modal plasticity in the sensory cortices. Nat. Neurosci. 17, 391–9. https://doi.org/10.1038/nn.3634

## Apéndice 1

## Figuras suplementarias



**Figura S1. Registro de la dinámica de Ca<sup>2+</sup> intracelular en la S1 durante el periodo que precede a la formación de los barriles.** Cortes tálamo-corticales representativos de ratas controles y enucleadas, incubados con Fluo 4-AM. Las imágenes se extrajeron de registros "time-lapse" en los que el campo visible abarca a la S1.



Figura S2. Trazos representativos de la dinámica de Ca<sup>2+</sup> intracelular en la S1 al DP1.

## Apéndice 2

Lista de publicaciones científicas producidas durante el programa de doctorado

## Artículos originales

Fetter-Pruneda I, **Martínez-Méndez R**, Olivos-Cisneros L, Díaz D, Padilla-Cortés P, Báez-Saldaña A, Gutiérrez-Ospina G. (2011). Valproic acid modulates brain plasticity through epigenetic chromatin remodeling in the blind rat: Implications for Human Sight Recovery. *Proceedings of the Western Pharmacology Society* 54: 82-87.

**Martínez-Méndez R**, Padilla-Cortés P, Gómez-Chavarín M, Gutiérrez-Ospina G. (2016) Glutamate, GABA and Serotonin concentrations in the cerebrospinal fluid and primary somatosensory cortex of birth-enucleated rats: Searching for S1 intrinsic and extrinsic epigenetic regulatory signals modulating neonatal cross-modal plasticity. *PeerJ PrePrints* 4:e1782v1.

**Martínez-Méndez R**, Pérez-Torres D, Gómez-Chavarín M, Padilla-Cortés P, Fiordelisio T, Gutiérrez-Ospina G. (2019) Bilateral enucleation at birth modifies calcium spike amplitude, but not frequency, in neurons of the somatosensory thalamus and cortex: Implications for developmental cross-modal plasticity. IBRO Reports 7:108–116.

## Revisiones o capítulos de libro

Báez-Saldaña A, Fetter-Pruneda I, Fuentes-Farías AL, Granados-Rojas L, Gutiérrez-Ospina G, **Martínez-Méndez R**, Meléndez-Herrera E, Mendoza-Torreblanca J, Sandoval-Velasco M. (2009). Brain Plasticity, Signal transduction and epigenesis: a missing link revealed. *Annual Review of Biomedical Sciences* 11:114-122.

**Martínez-Méndez R**, Martínez-Martínez E, Villafán-Monroy H, Guzmán-López JA, Fuentes-Farías AL, Romo-González T, Chavarría-Krauser A, Gutiérrez-Ospina G. Body and brain plasticity: Unraveling its principles through blindness. In: Recent Research Developments in Neuroscience, Vol. 4 (Pandalai SG, ed), pp 89–107. Research Signpost, 2013.

## Apéndice 3

Artículo científico original aceptado para obtener el grado

Contents lists available at ScienceDirect

## **IBRO** Reports

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ibror

**Research** Paper

## Bilateral enucleation at birth modifies calcium spike amplitude, but not frequency, in neurons of the somatosensory thalamus and cortex: Implications for developmental cross-modal plasticity



reports

Raquel Martínez-Méndez<sup>a,\*,1</sup>, Daniel Pérez-Torres<sup>a,1</sup>, Margarita Gómez-Chavarín<sup>a</sup>, Patricia Padilla-Cortés<sup>b</sup>, Tatiana Fiordelisio<sup>c</sup>, Gabriel Gutiérrez-Ospina<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Laboratorio de Biología de Sistemas, Departamento de Biología Celular y Fisiología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México, 04510, Mexico

<sup>b</sup> Unidad de Cromatografía de Alta Resolución, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México, 04510, Mexico <sup>c</sup> Laboratorio de Neuroendocrinología, Departamento de Ecología y Recursos Naturales, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de

México, 04510, Mexico

#### ARTICLEINFO

Keywords: Blind Barrel formation Developmental timing Developmental clock Somatosensory cortex specification Spontaneous activity

#### ABSTRACT

Bilateral eye enucleation at birth (BE) leads to an expansion of the primary somatosensory cortex (S1) in rat pups. Although increased growth of the somatosensory thalamo-cortical afferents (STCAs) in part explains S1 expansion, timing mechanisms governing S1 formation are also involved. In this work, we begin the search of a developmental clock by intending to document the existence of putative clock neurons in the somatosensory thalamus (VPM) and S1 based upon changes of spontaneous spike amplitude; a biophysical property sensitive to circadian regulation; the latter known to be shifted by enucleation. In addition, we also evaluated whether STCAs growth rate and segregation timing were modified, as parameters the clock might time. We found that spontaneous spike amplitude transiently, but significantly, increased or decreased in VPM and S1 neurons of BE rat pups, respectively, as compared to their control counterparts. The growth rate and segregation timing of STCAs was, however, unaffected by BE. These results support the existence of a developmental clock that ticks differently in the VPM and S1 after BE. This observation, together with the fact that STCAs growth rate and segregation timing is unchanged, suggests that S1 expansion in BE rats may in part be controlled at the cortical level.

#### 1. Introduction

Eye loss triggers a neocortical reorganization that renders the former visual cortex responsive to somatosensory and auditory information, while promoting the expansion of the primary somatosensory (S1) and auditory cortices [reviewed in (Bavelier and Neville, 2002); also in (Martínez-Méndez et al., 2013)]. Even though this type of brain functional morphological reorganization across sensory modalities may occur throughout life, its magnitude is time sensitive, being much greater when eye loss occurs at the earliest years of life while

neuronal circuits are being assembled (Bavelier and Neville, 2002; Martínez-Méndez et al., 2013). Up to date, we know a great deal on the phenomenological bases of cross-modal plasticity prompted by eye loss. In contrast, our understanding on the mechanisms underlying it is still fragmented (Martínez-Méndez et al., 2013).

Bilateral eye enucleation at birth in rodents has been a premier experimental unit to explore the cellular and molecular underpinnings underlying developmental cross modal plasticity. In particular, previous accounts presumed that incremental increases of the levels of evoked neuronal activity along the somatosensory pathway, throughout

margaritachavarin@gmail.com (M. Gómez-Chavarín), ppadillac@biomedicas.unam.mx (P. Padilla-Cortés), tfiorde@ciencias.unam.mx (T. Fiordelisio), gabo@biomedicas.unam.mx (G. Gutiérrez-Ospina).

<sup>1</sup> These authors contributed equally to this work.

https://doi.org/10.1016/j.ibror.2019.11.003

Received 10 March 2019; Accepted 7 November 2019

2451-8301/ © 2019 The Authors. Published by Elsevier Ltd on behalf of International Brain Research Organization. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (http://creativecommons.org/licenses/BY-NC-ND/4.0/).



*Abbreviations*: BE, birth-enucleated; S, sighted; S1, primary somatosensory cortex; STCAs, somatosensory thalamo-cortical afferents; VPM, ventral posteromedial nucleus; PD, postnatal day; ACSF, artificial cerebrospinal fluid; CP, cortical plate;  $\tau_d$ , decay time constant; Di1, 1,1'-dioctadecyl-3,3,3',3'-tetramethylindocarbocyanine Perchlorate; DAPI, 4',6-diamidino-2-phenylindole; AChE, acetylcholinesterase; SEM, standard error of the mean

Corresponding authors.

E-mail addresses: raquelmartinezm@gmail.com (R. Martínez-Méndez), danielxtx@ciencias.unam.mx (D. Pérez-Torres),
postnatal development, would lead to S1 expansion in birth-enucleated (BE) mice and rats (Rauschecker et al., 1992; Zheng and Purves, 1995). Fetter-Pruneda et al. (2013), nonetheless, first ruled out this long held presumption, and then advanced the hypothesis that S1 expansion rapidly progresses during the first days of life following enucleation after the precocious specification of the S1 and the overgrowth of the somatosensory thalamo-cortical afferents (STCAs). In addition, Fetter-Pruneda et al. (2013) revealed that S1 expansion in BE rats is prevented after administering valproic acid, a fatty acid that seems to dampen the activity voltage-gated sodium channels (McLean and Macdonald, 1986; Zona and Avoli, 1990), promotes GABAergic neuronal differentiation (Laeng et al., 2004), increases GABA levels [(Löscher, 1993; Sawaya et al., 1975); although see (Winterer, 2003)] and inhibits histone deacetylases activity (Phiel et al., 2001). In conjunction, these observations suggest that epigenetic mechanisms governing the timing of S1 specification and the rate and pattern of STCAs growth, likely by shifting patterns of spontaneous activity and local GABAergic function, might explain S1 expansion in enucleated rats.

In accordance with the general prediction by Fetter-Pruneda et al. (2013), Moreno-Juan et al. (2017) elegantly proved that fetal eye enucleation, performed before trigeminal projections reached the thalamic ventrobasal complex, leads to the postnatal expansion of S1 after increasing the frequency of fetal, TTX-sensitive spontaneous thalamic activity waves generated by syncytial neuronal ensembles projecting to the still developing S1. Wave frequency increments drive the availability of the orphan nuclear receptor  $Ror\beta$  that, in turn, instructs STCAs to grow more complex terminal arbors once they have reached S1 layer IV. Since thalamic waves are present from embryonic day 14 to postnatal day (PD) 2 (Moreno-Juan et al., 2017), they might partly explain the expansion that takes place in S1 following early postnatal en*ucleation*, since this manipulation commonly is performed throughout the first 6 h after birth [e.g., (Fetter-Pruneda et al., 2013)]. Thalamic influences, however, might be only one of the elements driving S1 cross-modal changes in BE rodents. Other elements that modulate the timing of critical periods at the cortical level like global soluble signals (Martínez-Méndez et al., 2016; Toda et al., 2013; Zheng et al., 2014), cortical oscillations (Leighton and Lohmann, 2016; Luhmann et al., 2016; van Pelt et al., 2005; Yang et al., 2013), spontaneous activity ongoing along cortico-thalamic feedback loops (Yang et al., 2013), transient subplate neurons (Luhmann et al., 2018; Tolner et al., 2012), cortical circadian gene oscillations (Bering et al., 2018; Kobayashi et al., 2015; Wisor et al., 2008) and circadian plasticity (Krzeptowski et al., 2018), to name a few, may be important to mechanistically explain S1 expansion after early postnatal enucleation.

The premature, yet reversible, formation of S1 observed in BE rats (Fetter-Pruneda et al., 2013) constitutes a circumstantial indication of the existence of a developmental clock. In the search for this clock, at least two aspects must be considered. The first one concerns with the clock itself. It is known that intrinsically generated, periodic oscillations of molecular (Keyte and Smith, 2014; Pourquié, 1998; Raff, 2007) and/ or bioelectric signals (Buzsáki, 2006) at single cell and/or cell population levels constitute the raw material based on which cells build up time-estimation devices. In our case, by the time of S1 specification, thalamic (Moreno-Juan et al., 2017), subplate (Luhmann et al., 2018; Tolner et al., 2012) and cortical cell ensembles (Leighton and Lohmann, 2016; Luhmann et al., 2016) display spontaneous, bioelectric oscillatory waves whose interplay might time S1 specification. Oscillatory cell ensembles, however, do not emerge from bareness (Buzsáki, 2006; Glass, 2001). They are formed by a small number of discrete, frequencymodulated oscillatory groups (i.e., oscillons) masked by low-resolution oscillatory waves (Perotti et al., 2019). Such discrete ensembles are themselves formed by "phase-desynchronized neurons oscillating at frequencies far away from the frequency of the macroscopic field potential" (Popovych and Tass, 2011) that might even compete one another (Chettih and Harvey, 2019). This explains why, in the present work, we decided to search for evidence supporting the existence of a

developmental thalamo-cortical clock based upon the attributes of the spontaneous spikes instead of spontaneous waves. Moreover, even though time is thought to be encoded by individual neurons' spike frequency (Finnerty et al., 2015; Wittmann, 2013), previous studies have shown that spontaneous spike amplitude, not spontaneous firing frequency, is under circadian control (Krishnan et al., 2008). Since clock genes control cortical critical period timing (Kobayashi et al., 2015; Noda et al., 2019), clock gene cortical oscillations are under the control of the suprachiasmatic nucleus (Rath et al., 2013), and enucleation modifies the manifestation of the circadian rhythm modulated by the suprachiasmatic nucleus (Lee et al., 2003; Yamazaki et al., 2002), we hypothesized that enucleation might have switched spontaneous spike amplitude of thalamic and cortical clock neurons in BE rats.

The second aspect to consider in the search of a thalamo-cortical developmental clock is the developmental processes the clock times. In this regard, Fetter-Pruneda et al. (2013) suggested that enucleation causes a precocious development of STCAs, thus leading to an extended time window for S1 to grow and expand. We then addressed whether STCAs grow faster and/or segregate earlier in S1 layer IV by using anatomical means.

Based upon these forerunners, we looked for shifts of spike amplitude in sighted (S) and BE rats and evaluated some aspects of STCAs development during S1 formation to gather evidence that could support the existence of a developmental clock. We found that the amplitude of calcium spikes increased in thalamic somatosensory neurons and decreased in S1 neurons of BE rats, as compared to those of S rats, at postnatal day (PD) 1, suggesting that there might be a thalamo-cortical clock timing S1 specification. However, STCAs preserve their segregation timing and growth rate in a similar way in control and BE rats, thus suggesting that cortical processes may govern the earlier specification of S1 in BE rats.

### 2. Material and methods

## 2.1. Animals

Experiments were carried out in neonate Wistar rats of both sexes. After birth, the number of pups was reduced to eight per litter; this adjustment pursued to decrease competition during breastfeeding. In our experiments, half of the pups were kept as sighted animals and the other half were subjected to bilateral enucleation as previously described (Fetter-Pruneda et al., 2013). Within 8 h of birth, the rats were anesthetized by hypothermia for 3 min, the skin was incised along the palpebral fissure and the eyeballs were pulled out with the help of small tweezers. The animals were warmed over a heating pad and returned to their mother after they regained consciousness and their body temperature and color was back to normal. Pups were kept with their mother until their sacrifice at PDs 1-3. Dams had free access to food and water; they were maintained in rooms with controlled temperature (21 °C) and light (12 h light/12 h dark). No significant differences in survival and body weight were found between control and enucleated pups [see also (Izraeli et al., 2002; Rauschecker et al., 1992)].

Animal handling and experimental protocols were designed and performed in accordance with the regulations published by the National Institutes of Health (NIH) Guide for the Care and Use of Laboratory Animals and approved by the Ethical Committee for the Care and Use of Laboratory Animals (Permit No. 80) at the Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México. All efforts were made to minimize the number of animals used and their suffering.

### 2.2. Evaluating spontaneous activity in the somatosensory pathway

### 2.2.1. Calcium imaging in thalamo-cortical slices

Pups were anesthetized by hypothermia and decapitated at 29 h (PD1, n = 8 S and 8 BE), 53 h (PD2, n = 8 S and 8 BE) and 77 h (PD3, n = 8 S and 8 BE) post-*partum*. The brain was quickly removed from the

skull, placed in artificial cerebrospinal fluid (ACSF, pH 7.4, composed of (in mM): 124 NaCl, 5 KCl, 26 NaHCO<sub>3</sub>, 10 D-(+)-Glucose, 1.25 NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1.3 MgSO<sub>4</sub> and 2 CaCl<sub>2</sub>, saturated with 95:5 O<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub>), embedded in 3 % agar and cut (300  $\mu m$  thick) with a VT1000S vibratome (Leica Biosystems, Germany), following precisely the protocol described by Agmon and Connors (1991). The slices were collected with a brush, transferred to another chamber filled with gassed ACSF for 10 min and incubated in a solution containing 22 µM Fluo 4-AM (Invitrogen; Eugene, OR, USA), 0.4 % Pluronic® F-127 (Sigma, St. Louis, MO, EUA) and 0.1 % dimethyl sulfoxide in ACSF for 30 min at 35 °C. The slices were rinsed with ACSF, transferred to an acrylic chamber treated with 30 % poly-L-lysine and overlaid with a nylon mesh to prevent movements. The tissue was perfused (1.5 - 2 ml/min)with gassed ACSF. After a 10 min stabilization period, the frequency and amplitude of somatic calcium spikes from groups of neurons located in the thalamic ventral posteromedial nucleus (VPM) and S1 were recorded during 30 min using a Cool-Snap HQ2 CCD camera (Photometrics, AZ, USA) coupled to a M205FA epifluorescence microscope (Leica Microsystems, Germany). Images were captured every 400 ms (100 ms aperture and 300 ms of interframe interval) under ultraviolet light (488 nm excitation / 510 nm emission wavelength) using an APO 2.0X objective. At the end of the recording session, cell viability was tested by imaging somatic calcium rises during 5 min following a single 50 s pulse of depolarizing KCl solution (50 mM KCl, 120 mM NaCl, 10 mM HEPES and 2 mM CaCl<sub>2</sub>, pH 7.4).

### 2.2.2. Analysis of calcium imaging

Somatic calcium spike frequency and amplitude were analyzed offline using TIFF-formatted, 5000 frame-long time-lapse image sequences. A single slice was analyzed per animal; this slice preserved the integrity of the thalamo-cortical pathway. Movement correction was achieved after using an "Image stabilizer" plugin (Image J; NIH, USA). Somatic calcium spikes were only analyzed in VPM and S1 cortical plate (CP) or layer IV neurons showing calcium rises after KCl depolarization. These neurons were located within a polygon overlaid on each region; VPM and CP/layer IV boundaries are easily differentiated from the surrounding structures based upon cell packing differences. The neurons were manually selected using the "Time series analyzer" plugin and added to the Region of Interest (ROI) manager. Across-time, fluorescence intensity values for each selected soma were then obtained using the "Multi-measure" function and then processed with the Igor Pro software (Wavemetrics, Lake Oswego, OR, USA). "Analyze calcium" function was used to correct the time-series slope for photo-bleaching and to obtain normalized values of fluorescence intensity based on  $\Delta F/F$ =  $(F_{max} - F_{min})/(F_{min} - F)*K_d$ . Raster plots of somatic calcium were generated using the macros "Traces to image" and the spiking frequency, amplitude, decay time constant ( $\tau_d$ ) and area under the curve were obtained using the "Multipeak fitting" function (Igor Pro software).

To determine the minimum number of neurons (104 per condition) needed to achieve a confidence level of 95 % and a margin of error (*E*) of 0.002 in the statistical analysis, we ran a pilot study and calculated the standard deviation ( $\sigma$ ) and z value of the amplitude in VPM neurons of the S group at PD1. We used those values to calculate the sample size (n) according to the formula  $n = (z\sigma/E)^2$ . We randomly chose at least 400 neurons showing Ca<sup>2+</sup> transients to analyze for each brain area, condition and age (Table 1). For each parameter measured, the average value for all the neurons from one pup was obtained first and then values obtained from each pup were averaged.

## 2.3. Estimating STCAs developmental rate

## 2.3.1. Acetylcholinesterase (AChE) histochemistry

Twenty-four hours old pups (n = 8 S and 10 BE) were given a lethal dose of sodium pentobarbital before being transcardially perfused with saline solution (0.9 %) followed by buffered paraformaldehyde (4 %).

Table	1
3.7 1	C1 · 1·

Number	of brain	slices	and	cells	analyzed.
					,

VPM	PD1		PD2		PD3		
	S	BE	s	BE	S	BE	-
Slices KCI-responsive cells (ROIs) Cells with spontaneous transients Cells used for statistical analysis	8 1465 735 445	8 1258 669 466	8 2252 938 435	8 1944 741 406	8 2966 1514 516	8 2112 1013 520	-
\$1	PD1		PD2		PD3		
	S	BE	S	BE	S	BE	-
Slices KCl-responsive cells (ROIs) Cells with spontaneous transients	8 4699 3310	8 3938 2236	5 3311 1895	7 4091 1802	8 5059 2798	8 4494 2768	-
Cells with spontaneous transients Cells used for statistical analysis S1 Slices KCI-responsive cells (ROIs) Cells with spontaneous transients	<ul> <li>735</li> <li>445</li> <li>PD1</li> <li>S</li> <li>8</li> <li>4699</li> <li>3310</li> </ul>	8 3938 2236	938 435 PD2 S 5 3311 1895	741 406 BE 7 4091 1802	PD3 PD3 S 8 5059 2798	BE 8 4494 2768	4 8

The brain was dissected and divided along the midline. The cortex of one hemisphere was peeled off and flattened between two glass slides separated by 2 mm spacers. The other hemisphere was left intact. Tissue samples were post-fixed for 16 h, cryoprotected in 15 % and 30 % sucrose solutions at 4 °C and sectioned at 40 µm using a cryostat (SLEE medical, Mainz, Germany). The flattened cortices were sectioned in a plane tangential to the pial surface. Intact hemispheres were cut through the coronal plane. Sections were mounted on gelatin-coated slides and incubated, protected from light, in jars filled with a solution containing 50 mM sodium acetate, 4 mM copper sulfate, 16 mM glycine, 4 mM acetylthiocholine iodide and 86 µM ethopropazine. After 18 h, this solution was replaced by one made of 0.1 % ammonium sulfide for 2-3 min. Two gently washes with distilled water then followed. The slides were air-dried and coverslipped with Cytoseal 60. The sections were imaged using a Leica EZ4E Microscope and analyzed with the ImageJ software. STCAs growth was estimated in coronal slices by measuring the distance from the corpus callosum to the front growth (the most superficial part of STCAs arborization). To obtain this measure, a rectangle enclosing the stained STCAs was traced from the base of the cortex to slightly above the surface and the STCAs bundles were automatically detected. The image was then converted to a binary one using the "Threshold" function. The area between the base of cortex and the STCAs front growth calculated by the software was then divided by the width of the rectangle to obtain the distance traveled by STCAs through the cortex (Fig. 3D). To estimate the degree of STCAs segregation into barrels, the cytoarchitectonic units of S1, tangential slices were used. A rectangle was traced over barrel rows C and D (Fig. 3N-O) and the grey values along each row were obtained using the "Plot Profile" function. The segregation index was calculated as the ratio between the septum and barrel grey values.

### 2.3.2. Dil tracing

S and BE pups were given a lethal dose of sodium pentobarbital before being transcardially perfused with saline solution (0.9 %) followed by buffered paraformaldehyde (10 %) at PD1 (22-28 hours after birth, n = 14 S and 14 BE), PD2 (47-51 hours, n = 14 S and 15 BE) and PD3 (72-74 hours, n = 15 S and 15 BE). The brains were removed and post-fixed for 48-72 hours. After fixation, a coronal cut was made at the level of the posterior thalamus and the exposed surface was painted with cresyl violet (0.1 % w/v) to reveal the brain's anatomy. Two to four small crystals (100-200 µm of diameter) of 1,1'-Dioctadecyl-3,3,3',3'-Tetramethylindocarbocyanine Perchlorate (Dil, Life Technologies, CA, USA) were placed bilaterally into the VPM using a glass capillary under a EZ4E stereo microscope (Leica Microsystems, Germany). The site where DiI crystals were placed was covered with an agar patch (3 % dissolved in phosphate buffer, pH 7.4, 0.1 M). The brains were then transferred to light protected, HDPE vials filled with buffered formaldehyde and stored during 3-8 weeks at room

temperature. At the end of the incubation period, the brains were embedded in buffered agar (2 % in phosphate buffer). Once solidified, the block was glued to the sample stage of a vibratome (Leica VT 1000S) and cut to obtain brain coronal sections (150 µm thick). The sections were collected in 24-well culture dishes filled with phosphate buffer, counter-stained with DAPI or Sytox Green (Life Technologies, CA, USA), washed several times, mounted in gelatin-coated slides and cover slipped with DAKO fluorescence mounting medium (Agilent, CA, USA). Two to four sections per animal containing the S1 were imaged under ultraviolet light (594 nm emission wavelength) at 10x using a DSU B51 fluorescence microscope (Olympus, Tokyo, Japan). The optimal value of signal to noise (S: R) ratio for each age was determined by, first, adjusting manually the value of the noise tolerance for each section per animal group, and then, by averaging these values per age group. Once the optimal S: R ratio per age was established, all sections of S and BE rats at corresponding ages were imaged keeping each age-specific S: R ratio constant during image acquisition sessions. We then estimated STCAs arborization based on the density of DiI-positive terminal buttons obtained across cortical layers. Boundaries between cortical layers were traced based on differences of cell somata density. Terminal buttons were identified by the "Find maxima" function (Image J) with a different set noise tolerance for each age (20 for PD1, 15 for PD2 and 10 for PD3). To estimate terminal button density per cortical layer, particle number, each corresponding to a single terminal, was divided by the sampled area for each layer. The proportion of terminal buttons in each layer was also calculated to have an estimate of STCAs maturation.

# 2.4. Statistical analysis

Data analyses were carried out by using GraphPad Prism 8 (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA). Data are given as means  $\pm$  standard error of the mean (SEM). The statistical comparisons between S and BE groups and across ages were conducted by using a two-way ANOVA. When variables were compared between S and BE groups at one age only, an unpaired two-tailed Student's *t*-test, or a Mann-Whitney's *U*-Test when data failed to pass the Shapiro Wilk's normality test, was used. *P* values < 0.05 were considered statistically significant and were represented as follows: \*p < 0.05, \*\*p < 0.01, \*\*\*p < 0.001 and \*\*\*\*p < 0.0001.

# 3. Results

# 3.1. Calcium spike amplitude, but not frequency, shifted in VPM and S1 neurons of BE rats at PD1

The reversible, premature formation of S1 in BE rats (Fetter-Pruneda et al., 2013) suggests the existence of a clock that times the formation of barrels, the cytoarchitectonic units of S1, under average developmental conditions and/or during the reorganization response that follows early postnatal eye loss. Because previous work showed that individual neuron spike amplitude, not frequency, is under circadian control [an incontrovertible time keeping process; (Krishnan et al., 2008)], as are cortical oscillations (Rath et al., 2013) and cortical plasticity (Bering et al., 2018; Kobayashi et al., 2015; Krzeptowski et al., 2018), we looked for changes in the spike amplitude of VPM and S1 neurons (Fig. 1 A and 2 A) as supportive evidence of the existence of the clock's substrate. In the VPM, the percentage of spontaneously spiking neurons was similar between S and BE rats from PD1 to PD3 (Fig. 1B). Qualitative observations suggested that spike amplitude in VPM neurons increased at PD1 only after neonatal enucleation (Fig. 1C and E). Accordingly, quantitative analyses of calcium traces of individual neurons (Fig. 1D and F), confirmed that enucleation increased by 47 % the amplitude of calcium spikes at PD1 (Fig. 1G; 0.0417  $\pm$ 0.0037  $\Delta$ F/F in S rats vs. 0.0613  $\pm$  0.0033  $\Delta$ F/F in BE rats). This increase was transient since amplitude values fell back into normal values by PD2 and stayed there at PD3 (Fig. 1G). By contrast, the spike frequency (Fig. 1H),  $\tau_d$  (Fig. S1A) and area under the curve (Fig. S1B) were similar between S and BE rats.

In the S1 the percentage of spontaneously spiking neurons tended to be lower in BE rats at PD1, and was very similar between both experimental groups at PD2 and PD3 (Fig. 2B). Contrary to the findings in the VPM, qualitative observations in S1 neurons revealed that spike amplitude decreased only at PD1 after neonatal enucleation (Fig. 2C and F). Accordingly, quantitative analyses of calcium traces of individual neurons (Fig. 2D and F), confirmed that enucleation decreased by 40 % the spike amplitude (Fig. 2G; 0.0516 + 0.0038  $\Delta$ F/F in S rats vs. 0.0309 + 0.0037  $\Delta$ F/F in BE rats), and by 75 % the average area under the calcium spike curves (Fig. S2A; 7.10 + 1.41 in S rats vs. 1.77 + 0.22 in BE rats) at PD1. These changes were temporary, with both parameters upraising to reach normal values by PD2-PD3. Spike frequency decreased between PD1 and PD3 in BE pups (Fig. 2H, 21.95 +  $3.05 \text{ h}^{-1}$  at PD1 vs  $9.20 \pm 0.86 \text{ h}^{-1}$  at PD3 in BE group) but, once again, the values were comparable between S and BE rats at all the ages analyzed.

### 3.2. Enucleation does not affect STCAs growth rate or segregation timing

Fetter-Pruneda et al. (2013) suggested that the premature formation of S1 observed in BE rats resulted from the precocious development of STCAs shortly after enucleation, leading to an extended time window for S1 to grow and expand. We assessed this presumption by exploring different aspects of STCAs development in the period preceding the formation of the barrels, which takes place along PD3 when STCAs establish synaptic connections with layer IV neurons. First, as an indicative of STCAs growth rate, we measured the advance of the STCAs growth front through the cortex 24 h after birth in AChE-labeled coronal sections (Fig. 3A-B). The distance traveled by the STCAs from the base of the cortex was similar between S and BE pups (Fig. 3C), suggesting that STCAs grow (i.e., elongate) at a similar rate in both experimental groups.

Next we estimated if there were modifications in the timing of STCAs segregation, another aspect of STCAs development. Twenty-four hours after birth the barrel rows were visible in all the brains analyzed, but individual barrels had segregated in just some of them (Fig. 3D-G). We estimated a segregation index by measuring the intensity profile of AChE-stained STCAs along the barrel rows C and D (Fig. 3F) and obtaining the ratio between the barrel and septum grey values. As the segregation of barrel rows precedes that of individual barrels, the segregation index between rows was higher than between barrels at the age analyzed (p = 0.006, data not shown), supporting that our method can distinguish between different levels of segregation. The segregation index between barrels was similar between S and BE pups, suggesting that STCAs segregation timing is not affected by enucleation at birth. Lastly, as another measure of STCAs development, we measured the density and proportion of terminal buttons per cortical layer from PD1 to PD3 to infer their degree of arborization and maturation (Fig. 3I-J). We found an increase in the density of STCAs button density in layer V at PD3 with respect to the previous age in S pups (Fig. 3K, 74.77 + 5.46buttons/10,000  $\mu^2$  at PD2 vs 92.45 + 3.59 buttons/10,000  $\mu^2$  at PD3). In BE pups this increase in layer V button density occurred one day before, at PD2 (64.02 + 3.29 buttons/10,000  $\mu^2$  at PD1 vs 86.76 + 5.23 buttons/10,000  $\mu^2$  at PD2), and was mirrored by a similar increase in density in layers II-III and IV (layer II-III: 8.85 + 1.10 buttons/ 10,000  $\mu^2$  at PD1 vs 20.85 <u>+</u> 2.80 buttons/10,000  $\mu^2$  at PD2; layer IV: 21.26 <u>+</u> 1.49 buttons/10,000  $\mu^2$  at PD1 vs 38.54 <u>+</u> 4.46 buttons/ 10,000  $\mu^2$  at PD2). However, no significant changes in the density of terminal buttons per layer were detected between experimental groups. On the other hand, between PD2 and PD3 the percentage of terminal buttons increased in layer V (Fig. 3L, S: 66.13 + 2.35 buttons/10,000  $\mu^2$  at PD2 vs 71.04 <u>+</u> 1.48 buttons/10,000  $\mu^2$  at PD3; BE: 66.94 <u>+</u> 1.67 buttons/10,000  $\mu^2$  at PD2 vs 73.22 <u>+</u> 1.37 buttons/10,000  $\mu^2$  at PD3) and decreased in layer II-III (Fig. 3L, S: 9.92  $\pm$  1.77 buttons/10,000  $\mu^2$ 



**Fig. 1.** Somatic calcium spike activity in VPM neurons before barrel formation. A) Digital photograph of a representative thalamocortical slice obtained from a brain of a PD1, S rat pup. The discontinuous outline indicates the location of VPM in the thalamus from where somatic calcium spike activity was recorded. B) Mean percentage of cells with spontaneous  $Ca^{2+}$  activity. C) and E) Raster plots of the amplitude recorded in the VPM neural population of S (C) and BE pups (E) during 30 min at PD1. D) and F) Representative examples of the  $Ca^{2+}$  activity in individual S (D) and BE (F) neurons at PD1. G) Mean amplitude of  $Ca^{2+}$  spikes. \*\*\*p < 0.001, two-way ANOVA, S (n=8) vs BE (n=8) at PD1. \*p < 0.05, two-way ANOVA, PD1 (n=8) vs PD2 (n=8) in BE rats. H) Mean frequency of  $Ca^{2+}$  spikes.

at PD2 vs 3.22  $\pm$  0.30 buttons/10,000  $\mu^2$  at PD3; BE: 7.69  $\pm$  0.61 buttons/10,000  $\mu^2$  at PD2 vs 3.06  $\pm$  0.48 buttons/10,000  $\mu^2$  at PD3) in both experimental groups, possibly reflecting the retraction of STCAs from layer II-III that occurs with development (Rebsam et al., 2002). As was the case for the density of buttons, we did not detect differences in the percentage of buttons per layer between experimental groups.

In summary, we did not find alterations in any of the parameters evaluated that indicated an increase in STCAs growth in layer IV before barrel formation.

# 4. Discussion

Bilateral eye enucleation at birth leads to the expansion of S1. Even though the cellular mechanisms governing this manifestation of cortical reorganization are for the most part unclear, Fetter-Pruneda et al. (2013) showed that shifts in developmental timing underlie S1 expansion in BE rats, thus suggesting that a developmental clock times not only S1 specification but also its plasticity. Up to date, no evidence has been offered on the presence of a developmental clock capable of modulating areal specification and/or plasticity in the cerebral cortex. However, the study of oscillatory phenomena may provide cues on the existence of such time-estimation devices. Accordingly, it has been shown that knocking out clock genes, a manipulation that interferes with the molecular circadian oscillation, increases the length of the period along of which ocular column plasticity may be produced in the mouse cerebral cortex (Kobayashi et al., 2015). Oscillatory phenomena, nevertheless, manifest not only at the molecular and population levels. In the nervous system, they are even displayed at a single cell level, as spontaneous fluctuations of the cell membrane's bioelectrical properties. In this regard, Krishnan et al. (2008) showed that response amplitude, not spike frequency, is a parameter subjected to circadian temporal regulation. So in this work, since enucleation alters circadian rhythmicity, we evaluated shifts in spontaneous peak amplitude of neurons located in the VPM and S1 in BE mice, as a mean to begin gathering evidence on the existence of a developmental clock during S1 formation and plasticity. Our results showed that VPM and S1 neurons



**Fig. 2.** Somatic calcium spike activity in S1 neurons before barrel formation. A) Digital photograph of a representative thalamo-cortical slice obtained from a brain of a PD1, S rat pup. The discontinuous outline indicates the location of the cortical plate from where somatic calcium spike activity was recorded. B) Mean percentage of cells with spontaneous  $Ca^{2+}$  activity. C) and E) Raster plots of the amplitude recorded in the S1 neural population of S (C) and BE pups (E) during 30 min at PD1. D) and F) Representative examples of the  $Ca^{2+}$  activity in individual S (D) and BE (F) neurons at PD1. G) Mean amplitude of  $Ca^{2+}$  spikes. \*\*p < 0.01, two-way ANOVA, S (n=8) vs BE (n=8) at PD1 (red asterisks). \*\*p < 0.01, two-way ANOVA, PD1 (n=8) vs PD3 (n=8) in BE rats (grey asterisks). H) Mean frequency of  $Ca^{2+}$  spikes. \*\*p < 0.01, two-way ANOVA, PD1 (n=8) vs PD3 (n=8) in BE rats.

respectively increased by 47 % or decreased by 40 % the amplitude, not the frequency, of spontaneous calcium spikes only at PD1, as compared with the S littermates, thus circumstantially supporting the notion that a thalamo-cortical developmental clock may set forward the formation of S1 in BE rats. Isolated, however, our results must not be considered as conclusive. Slice recordings following time reversal experiments (e.g., Fetter-Pruneda et al., 2013) or intrusive biophysical manipulations conducted in vivo aimed at shifting VPM and/or S1 individual neurons amplitude must surely help at evaluating the merits of the possibility brought by our experiments. Also, it would be important to evaluate oscillations at a more global scale, since interfering with thalamic waves prenatally prevents S1 expansion postnatally in prenatally enucleated mice (Moreno-Juan et al., 2017) and robust bioelectrical oscillations with instructive/organizational properties are underway at the cortical level during the first week of life (Leighton and Lohmann, 2016; Luhmann et al., 2016; van Pelt et al., 2005; Yang et al., 2013). In this regard, it is interesting that the spike amplitude increased whereas

spike frequency decreased from PD1 to PD3 in S1, but not in VPM neurons, of BE rats. Although we ignore the meaning of this finding, decreased frequency and increased amplitude may facilitate cortical cells to be recruited into oscillatory neuronal ensembles (Buzsáki, 2006). As the composition of neuronal ion channels and neuro-transmitter receptors dynamically shift during development (Carpenter et al., 1990; Spitzer, 2015), the opposite effect of enucleation in the VPM and S1 neuronal amplitude may reflect differences in the maturation between VPM and S1 neurons, since thalamic neurons are born three days before cortical cells (Altman and Bayer, 1979; Ignacio et al., 1995). It may also reflect differences between the intrinsic electrophysiological properties of VPM and S1 neurons [reviewed in (Llinás, 2014)] and/or a process of homeostatic plasticity (Gainey and Feldman, 2017; Queenan et al., 2012) in which cortical spike amplitude decreases as a consequence of VPM increased spike amplitude.

Thalamic afferents play a major role during S1 specification (Antón-Bolaños et al., 2019; Martini et al., 2018; Senft and Woolsey, 1991).



**Fig. 3.** STCAs developmental timetable before barrel formation. A) and B) Digital photographs of representative S1 coronal sections processed with AChE histochemistry from S (A) and BE (B) 24 -h-old pups. The dashed lines indicate the distance that the STCAs have traveled from the base of the cortex; the line ends at the STCAs growth front. C) Scatter plot showing the radial distance travelled by STCAs 24 h after birth in their way to the cortical surface. Lines represent the mean  $\pm$  SEM (n = 3 for S and BE groups). D–G) Digital photographs of AChE-stained, tangential sections cut through the S1 of S (D–E) and BE (F–G) 24 -h-old pups with partial (D and F) or full STCAs segregation (E and G). Arrows in F pinpoint the barrel rows analyzed to obtain the segregation index. H) Inter-row and inter-barrel segregation index between and along D and E barrel rows of 24 -h-old S and BE pups. Graph shows the mean  $\pm$  SEM (n = 8 for control group and 10 for BE). I) Digital photograph of a representative S1 coronal section stained with SYTOX green. Dashed lines define the boundaries between cortical layers. J) Photomicrograph showing Dil-traced STCAs. Arrows indicate terminal buttons. K) Density of terminal buttons per cortical layer from PD1 to PD3. The black lines indicate the mean value. L) Percentage of terminal buttons per cortical layer from PD1 to PD3. \*p < 0.05, \*\*p < 0.01, \*\*\*p < 0.001, \*\*\*p < 0.0001, two-way ANOVA. n = 14 for PD1 S and BE groups. n = 16 for PD3 S and BE groups.

Thus, Fetter-Pruneda et al. (2013) suggested that the precocious development of STCAs would lead to the premature formation of the barrels in BE rats. We then evaluated the merits of this suggestion by monitoring STCAs ingrowth into S1, their segregation timing into barrels and their density and distribution of terminal buttons across the cortical layers. Contrary to the prediction, we found no differences in the STCAs growth, segregation timing or terminal button density between S- and BE-rat pups in the period preceding the barrels formation. These results then support that S1 expansion likely results from the combined effects of the pre-displacement of S1 specification (Fetter-Pruneda et al., 2013) and the increment of STCAs arborization once barrels have formed (Fetter-Pruneda et al., 2013; Moreno-Juan et al., 2017). Both processes seem regulated by epigenetic factors translated into morphological changes by shifting patterns of spontaneous neuronal activity (Moreno-Juan et al., 2017) possibly followed by modification of histone acetylation levels (Fetter-Pruneda et al., 2013). Experiments aimed at demonstrating causal relationships between shifts of spontaneous calcium spikes amplitude and/or frequency with modifications histone acetylation levels surely would help in establishing the strength of this prediction. In the meantime, previous studies in the hippocampal formation support that such a relationship might exist (Chawla et al., 2003; Schlumm et al., 2013).

Lastly, up to this date, S1 cross-modal expansion, at least in rodents, has been conceptually conceived as being a homogenous response process across S1 to pre- or early postnatal eye enucleation. This impression, however, is likely inappropriate since S1 specification proceeds following a rostral to caudal / lateral to medial gradient and different representations appear at different times (McCandlish et al., 1989, 1993; Schlaggar and O'Leary, 1994), an ideal substrate to generate within- and inter-individual variations. The idiosyncratic response to postnatal enucleation is confirmed by observations showing that not all the barrels in the rodent S1 expand, and among the ones that do so,

the magnitude of the expansion greatly differs within and across body representations (Bronchti et al., 1992; Rauschecker et al., 1992; Zheng and Purves, 1995). This circumstance is important because any intention to generalize a mechanism to explain S1 specification and plasticity may be doomed to fail because different barrels located in distinct body representations might follow distinctive rules.

## **Funding source**

Financial support was provided by the Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México. RMM (50165) and DPT (629895) received a scholarship from Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), Mexico. None of the sponsors of this research had any role in the study design; the collection, analysis and interpretation of data; in the writing of the report; and in the decision to submit the article for publication.

# Author contributions

Conception and design of the study: RMM, DPT, GGO. Acquisition of data: RMM, DPT, MGC, PPC and TFC. Analysis and interpretation of data: RMM, DPT, TFC and GGO. Drafting of the manuscript: RMM and GGO. Critical review of manuscript: All authors. Approval of final manuscript: All authors.

# **Conflict of interest**

None.

# Acknowledgments

Authors thank Miguel Tapia-Rodríguez and Jesús Ramírez-Santos

for technical support when conducting microscopic and histological analyses. Raquel Martínez-Méndez is a doctoral student at Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México and received a scholarship (50165) from CONACYT. The work reported in this manuscript is part of her doctoral dissertation.

#### References

- Agmon, A., Connors, B.W., 1991. Thalamocortical responses of mouse somatosensory (barrel) cortex in vitro. Neuroscience 41, 365–379.
- Altman, J., Bayer, S.A., 1979. Development of the diencephalon in the rat. IV. Quantitative study of the time of origin of neurons and the internuclear chronological gradients in the thalamus. J. Comp. Neurol. 188, 455–471. https://doi.org/10.1002/ cne.901880308.
- Antón-Bolaños, N., Sempere-Ferràndez, A., Guillamón-Vivancos, T., Martini, F.J., Pérez-Saiz, L., Gezelius, H., Filipchuk, A., Valdeolmillos, M., López-Bendito, G., 2019. Prenatal activity from thalamic neurons governs the emergence of functional cortical maps in mice. Science (80-) 364, 987–990. https://doi.org/10.1126/science. aav7617.
- Bavelier, D., Neville, H.J., 2002. Cross-modal plasticity: where and how? Nat. Rev. Neurosci. 3, 443–452. https://doi.org/10.1038/nrn848.
- Bering, T., Carstensen, M.B., Wörtwein, G., Weikop, P., Rath, M.F., 2018. The circadian oscillator of the cerebral cortex: molecular, biochemical and behavioral effects of deleting the arntl clock gene in cortical neurons. Cereb. Cortex 28, 644–657. https:// doi.org/10.1093/cercor/bhw406.
- Bronchti, G., Schonenberger, N., Welker, E., Van der Loos, H., 1992. Barrelfield expansion after neonatal eye removal in mice. Neuroreport 3, 489–492.
- Buzsáki, G., 2006. Rhythms of the Brain. Oxford University Press, New York.
- Carpenter, M.K., Parker, I., Miledi, R., 1990. Changes in messenger RNAs coding for neurotransmitter receptors and voltage-operated channels in the developing rat cerebral cortex. Dev. Biol. 138, 313–323. https://doi.org/10.1016/0012-1606(90) 90199-s.
- Chawla, S., Vanhoutte, P., Arnold, F.J.L., Huang, C.L.-H., Bading, H., 2003. Neuronal activity-dependent nucleocytoplasmic shuttling of HDAC4 and HDAC5. J. Neurochem. 85, 151–159.
- Chettih, S.N., Harvey, C.D., 2019. Single-neuron perturbations reveal feature-specific competition in V1. Nature 567, 334–340. https://doi.org/10.1038/s41586-019-0997-6.
- Fetter-Pruneda, I., Geovannini-Acuña, H., Santiago, C., Ibarrarán-Viniegra, A.S., Martínez-Martínez, E., Sandoval-Velasco, M., Uribe-Figueroa, L., Padilla-Cortés, P., Mercado-Célis, G., Gutiérrez-Ospina, G., 2013. Shifts in developmental timing, and not increased levels of experience-dependent neuronal activity, promote barrel expansion in the primary somatosensory cortex of rats enucleated at birth. PLoS One 8, e54940. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0054940.
- Finnerty, G.T., Shadlen, M.N., Jazayeri, M., Nobre, A.C., Buonomano, D.V., 2015. Time in cortical circuits. J. Neurosci. 35, 13912–13916. https://doi.org/10.1523/ JNEUROSCI.2654-15.2015.
- Gainey, M.A., Feldman, D.E., 2017. Multiple shared mechanisms for homeostatic plasticity in rodent somatosensory and visual cortex. Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci. 372, 20160157. https://doi.org/10.1098/rstb.2016.0157.
- Glass, L., 2001. Synchronization and rhythmic processes in physiology. Nature 410, 277–284. https://doi.org/10.1038/35065745.
- Ignacio, M.P., Kimm, E.J., Kageyama, G.H., Yu, J., Robertson, R.T., 1995. Postnatal migration of neurons and formation of laminae in rat cerebral cortex. Anat. Embryol. (Berl.) 191, 89–100.
- Izraeli, R., Koay, G., Lamish, M., Heicklen-Klein, A.J., Heffner, H.E., Heffner, R.S., Wollberg, Z., 2002. Cross-modal neuroplasticity in neonatally enucleated hamsters: structure, electrophysiology and behaviour. Eur. J. Neurosci. 15, 693–712.
- Keyte, A.L., Smith, K.K., 2014. Heterochrony and developmental timing mechanisms: changing ontogenies in evolution. Semin. Cell Dev. Biol. 34, 99–107. https://doi.org/ 10.1016/j.semcdb.2014.06.015.
- Kobayashi, Y., Ye, Z., Hensch, T.K., 2015. Clock genes control cortical critical period timing. Neuron 86, 264–275. https://doi.org/10.1016/j.neuron.2015.02.036.
- Krishnan, P., Chatterjee, A., Tanoue, S., Hardin, P.E., 2008. Spike amplitude of single-unit responses in antennal sensillae is controlled by the Drosophila circadian clock. Curr. Biol. 18, 803–807. https://doi.org/10.1016/j.cub.2008.04.060.
- Krzeptowski, W., Hess, G., Pyza, E., 2018. Circadian plasticity in the brain of insects and rodents. Front. Neural Circuits 12, 32. https://doi.org/10.3389/fncir.2018.00032.
- Laeng, P., Pitts, R.L., Lemire, A.L., Drabik, C.E., Weiner, A., Tang, H., Thyagarajan, R., Mallon, B.S., Altar, C.A., 2004. The mood stabilizer valproic acid stimulates GABA neurogenesis from rat forebrain stem cells. J. Neurochem. 91, 238–251. https://doi. org/10.1111/j.1471-4159.2004.02725.x.
- Lee, H.S., Nelms, J.L., Nguyen, M., Silver, R., Lehman, M.N., 2003. The eye is necessary for a circadian rhythm in the suprachiasmatic nucleus. Nat. Neurosci. 6, 111–112. https://doi.org/10.1038/nn1006.
- Leighton, A.H., Lohmann, C., 2016. The wiring of developing sensory circuits—from patterned spontaneous activity to synaptic plasticity mechanisms. Front. Neural Circuits 10. https://doi.org/10.3389/fncir.2016.00071.
- Llinás, R.R., 2014. Intrinsic electrical properties of mammalian neurons and CNS function: a historical perspective. Front. Cell. Neurosci. 8, 320. https://doi.org/10.3389/ fncel.2014.00320.
- Löscher, W., 1993. Effects of the antiepileptic drug valproate on metabolism and function of inhibitory and excitatory amino acids in the brain. Neurochem. Res. 18, 485–502.

### https://doi.org/10.1007/bf00967253.

- Luhmann, H.J., Kirischuk, S., Kilb, W., 2018. The superior function of the subplate in early neocortical development. Front. Neuroanat. 12, 97. https://doi.org/10.3389/ fnana.2018.00097.
- Luhmann, H.J., Sinning, A., Yang, J.-W., Reyes-Puerta, V., Stüttgen, M.C., Kirischuk, S., Kilb, W., 2016. Spontaneous neuronal activity in developing neocortical networks: from single cells to large-scale interactions. Front. Neural Circuits 10, 40. https://doi. org/10.3389/fncir.2016.00040.
- Martínez-Méndez, R., Martínez-Martínez, E., Villafán-Monroy, H., Guzmán-López, J.A., Fuentes-Farías, A.L., Romo-González, T., Chavarría-Krauser, A., Gutiérrez-Ospina, G., 2013. Body and brain plasticity: unraveling its principles through blindness. In: In: Pandalai, S.G. (Ed.), Recent Research Developments in Neuroscience Vol. 4. Research Signpost, pp. 89–107.
- Martínez-Méndez, R., Padilla-Cortés, P., Gómez-Chavarín, M., Gutiérrez-Ospina, G., 2016. Glutamate, GABA and Serotonin concentrations in the cerebrospinal fluid and primary somatosensory cortex of birth-enucleated rats: searching for S1 intrinsic and extrinsic epigenetic regulatory signals modulating neonatal cross-modal plasticity. PeerJ Prepr. 4 e1782v1.
- Martini, F.J., Moreno-Juan, V., Filipchuk, A., Valdeolmillos, M., López-Bendito, G., 2018. Impact of thalamocortical input on barrel cortex development. Neuroscience 368, 246–255. https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2017.04.005.
- McCandlish, C., Waters, R.S., Cooper, N.G., 1989. Early development of the representation of the body surface in SI cortex barrel field in neonatal rats as demonstrated with peanut agglutinin binding: evidence for differential development within the rattunculus. Exp. Brain Res. 77, 425–431. https://doi.org/10.1007/bf00275001.
- McCandlish, C.A., Li, C.X., Waters, R.S., 1993. Early development of the SI cortical barrel field representation in neonatal rats follows a lateral-to-medial gradient: an electrophysiological study. Exp. Brain Res. 92, 369–374. https://doi.org/10.1007/ bf00229024.
- McLean, M.J., Macdonald, R.L., 1986. Sodium valproate, but not ethosuximide, produces use- and voltage-dependent limitation of high frequency repetitive firing of action potentials of mouse central neurons in cell culture. J. Pharmacol. Exp. Ther. 237, 1001–1011.
- Moreno-Juan, V., Filipchuk, A., Antón-Bolaños, N., Mezzera, C., Gezelius, H., Andrés, B., Rodríguez-Malmierca, L., Susín, R., Schaad, O., Iwasato, T., Schüle, R., Rutlin, M., Nelson, S., Ducret, S., Valdeolmillos, M., Rijli, F.M., López-Bendito, G., 2017. Prenatal thalamic waves regulate cortical area size prior to sensory processing. Nat. Commun. 8, 14172. https://doi.org/10.1038/ncomms14172.
- Noda, M., Iwamoto, I., Tabata, H., Yamagata, T., Ito, H., Nagata, K.-I., 2019. Role of Per3, a circadian clock gene, in embryonic development of mouse cerebral cortex. Sci. Rep. 9, 5874. https://doi.org/10.1038/s41598-019-42390-9.
- Perotti, L., DeVito, J., Bessis, D., Dabaghian, Y., 2019. Discrete structure of the brain rhythms. Sci. Rep. 9, 1105. https://doi.org/10.1038/s41598-018-37196-0.
  Phiel, C.J., Zhang, F., Huang, E.Y., Guenther, M.G., Lazar, M.A., Klein, P.S., 2001. Histone
- Phiel, C.J., Zhang, F., Huang, E.Y., Guenther, M.G., Lazar, M.A., Klein, P.S., 2001. Histone deacetylase is a direct target of valproic acid, a potent anticonvulsant, mood stabilizer, and teratogen. J. Biol. Chem. 276, 36734–36741. https://doi.org/10.1074/jbc. M101287200.
- Popovych, O.V., Tass, P.A., 2011. Macroscopic entrainment of periodically forced oscillatory ensembles. Prog. Biophys. Mol. Biol. 105, 98–108. https://doi.org/10.1016/j. pbiomolbio.2010.09.018.
- Pourquié, O., 1998. Clocks regulating developmental processes. Curr. Opin. Neurobiol. 8, 665–670.
- Queenan, B.N., Lee, K.J., Pak, D.T.S., 2012. Wherefore art thou, homeo(stasis)? Functional diversity in homeostatic synaptic plasticity. Neural Plast. 2012, 718203. https://doi.org/10.1155/2012/718203.
- Raff, M., 2007. Intracellular developmental timers. Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol. 72, 431–435. https://doi.org/10.1101/sqb.2007.72.007.
- Rath, M.F., Rohde, K., Fahrenkrug, J., Møller, M., 2013. Circadian clock components in the rat neocortex: daily dynamics, localization and regulation. Brain Struct. Funct. 218, 551–562. https://doi.org/10.1007/s00429-012-0415-4.
- Rauschecker, J.P., Tian, B., Korte, M., Egert, U., 1992. Crossmodal changes in the somatosensory vibrissa/barrel system of visually deprived animals. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 89, 5063–5067.
- Sawaya, M.C.B., Horton, R.W., Meldrum, B.S., 1975. Effects of anticonvulsant drugs on the cerebral enzymes metabolizing GABA. Epilepsia 16, 649–655. https://doi.org/10. 1111/j.1528-1157.1975.tb04747.x.
- Schlaggar, B.L., O'Leary, D.D., 1994. Early development of the somatotopic map and barrel patterning in rat somatosensory cortex. J. Comp. Neurol. 346, 80–96. https:// doi.org/10.1002/cne.903460106.
- Schlumm, F., Mauceri, D., Freitag, H.E., Bading, H., 2013. Nuclear calcium signaling regulates nuclear export of a subset of class IIa histone deacetylases following synaptic activity. J. Biol. Chem. 288, 8074–8084. https://doi.org/10.1074/jbc.M112. 432773.
- Senft, S.L., Woolsey, T.A., 1991. Growth of thalamic afferents into mouse barrel cortex. Cereb. Cortex 1, 308–335. https://doi.org/10.1093/cercor/1.4.308.
- Spitzer, N.C., 2015. Neurotransmitter switching? No surprise. Neuron 86, 1131–1144. https://doi.org/10.1016/j.neuron.2015.05.028.
- Toda, T., Homma, D., Tokuoka, H., Hayakawa, I., Sugimoto, Y., Ichinose, H., Kawasaki, H., 2013. Birth regulates the initiation of sensory map formation through serotonin signaling. Dev. Cell 27, 32–46. https://doi.org/10.1016/j.devcel.2013.09.002.
- Tolner, E.A., Sheikh, A., Yukin, A.Y., Kaila, K., Kanold, P.O., 2012. Subplate neurons promote spindle bursts and thalamocortical patterning in the neonatal rat somatosensory cortex. J. Neurosci. 32, 692–702. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI. 1538-11.2012.
- van Pelt, J., Vajda, I., Wolters, P.S., Corner, M.A., Ramakers, G.J.A., 2005. Dynamics and plasticity in developing neuronal networks in vitro. Prog. Brain Res. 171–188.