

03021
8



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MÉXICO

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMEDICAS
Facultad de Medicina

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Evaluación de los efectos de la serotonina sobre
los procesos de plasticidad intramodal: Estudio
en la corteza somatosensorial primaria de la
rata.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
LICENCIADA EN INVESTIGACION
BIOMEDICA BASICA
P R E S E N T A
Naima Lajud Avila

DIRECTOR DE TESIS:
Gabriel Gutiérrez Ospina

México. D.F.

JUN. 2003

1



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



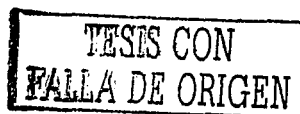
UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Índice



pág.

Agradecimientos	3
Resumen	4
Introducción	6
Neuroquímica de la serotonina	7
a) Síntesis	7
b) Almacenamiento, liberación e inactivación	7
c) Degradación	9
Anatomía y Fisiología de sistema serotoninérgico	9
a) Aspectos anatómicos relacionados con las neuronas serotoninérgicas	9
b) Receptores y mecanismos de transducción relacionados con el sistema serotoninérgico	11
c) Aspectos fisiológicos relacionados con el sistema serotoninérgico	13
Antecedentes	14
serotonina, desarrollo y plasticidad cerebral	16
Plasticidad intramodal en S1	21
Justificación	23
Hipótesis	23
Objetivos	24
Materiales y Métodos	26
Resultados	31
Discusión	40
Conclusiones	46
Bibliografía	47

Dirección General de Bibliotecas
Trazado en formato electrónico e imp.
de mi trabajo recepción
Naama Lajud Avila

04 JUN 2003

[Handwritten signature]

Agradecimientos

A mi familia, Rafael, Alejandro, mis papás y mi tía. Por que entre todos me educaron y me dieron las bases para poder llegar hasta aquí. Por su cariño, su paciencia y las cosas que aprendí de cada uno y que ahora me hacen quien soy. Al klan Lajud, a los Avila y especialmente a mi abuela Cuca.

A las chicas súper T (Elena, Yu, Ale, Kat y lizbeth), Amigas que puedo decir... esas tardes de café, esos sábados de reven, las lágrimas, la complicidad, en fin todos estos años; son las cosas que realmente valen y que permiten que uno siga adelante.

A los biomédicos de la luz (Luiso, Yu, Pelón, Mary, David, Danielo, Héctor, Paco, Karen, Liv y Yayoi), por las discusiones, las fiestas (aún aquellas con tequila), por lo que me enseñaron y lo que descubrimos juntos, en fin, por la amistad.

A todos lo demás con los que he compartido estos años: los viejos amigos (Bob y Oscar; Roberto, Mary y Barrón; Iván y Paty, Chelito, Quique y Fernando) y los nuevos amigos (los rock stars-rock staff nana panchos; Israel, Anaí y las Jandete; Pelo y Norma).

A Javier, por los buenos momentos y las largas noches conversando

A mi jefa (Elizabeth), Sergio Sánchez, Ricardo Tapia y Gabriel Gutiérrez, por la formación tanto académica como personal, por su paciencia y el empeño que pusieron en enseñarme.

Al personal de la biblioteca, Especialmente a la Sra. Mari.

A los proyectos 38615N y J28035 de CONACYT por el apoyo financiero para la realización de este trabajo

Resumen

La cauterización de una línea de vibrisas faciales en roedores recién nacidos conduce a la fusión e hipotrofia de las representaciones corticales (i.e. barriles), correspondientes a las vibrisas eliminadas, y a una expansión de los correspondientes a las vibrisas intactas vecinas a aquellas que fueron removidas. Los mecanismos que subyacen a este cambio en la organización cortical son aún poco claros. Debido a que, por un lado, se ha mostrado que la serotonina regula el crecimiento axonal en la vía tálamo-cortical somatosensorial, y por otro, el rebrote axónico, uno de los factores comunes en las respuestas plásticas cerebrales; en el presente trabajo evaluamos los efectos de la disminución de serotonina cortical sobre la plasticidad intramodal en ratas en desarrollo. Para ello, se cauterizaron y removieron las vibrisas faciales de las líneas C o D en animales recién nacidos, y se evaluó el tamaño de la representación cortical de las vibrisas, el porcentaje de expansión de los barriles adyacentes y no adyacentes a la zona cortical privada, la frecuencia con la que los barriles presentaban cierto grado de expansión, y el número total de barriles expandidos, en animales tratados y no tratados con paracloro-fenilalanina (PCPA), un inhibidor no tóxico e irreversible de la síntesis de serotonina. Las representaciones corticales de las vibrisas en animales control, privados y privados tratados con PCPA fueron visualizadas con una histoquímica para citocromo oxidasa, reacción que indica indirectamente la distribución de las aferentes tálamo-corticales somatosensoriales, e integradas y medidas en mapas bidimensionales digitalizados con ayuda de un sistema de cómputo. Si bien la

disminución en la concentración de serotonina cortical no afectó el área total de la representación cortical de las vibrisas, ni la presencia de la respuesta plástica intramodal, esta manipulación disminuyó el grado de expansión de los barriles adyacentes y aumentó aquella observada en los barriles no adyacentes a la zona cortical privada. Además, la disminución de serotonina cortical indujo que un mayor número de barriles presentara una expansión de 0 a 10%. En contraste la expansión de los barriles en animales privados no tratados con PCPA mostraron una expansión distribuida entre 0 y 50%. No obstante esta diferencia, el número total de barriles expandidos, no fue diferente entre los grupos experimentales. Se sabe que el tratamiento con PCPA puede inducir deficiencias nutricionales durante el desarrollo (Turlejski et. Al. 1997). Debido a que en nuestro estudio no hubo diferencias en el peso corporal y cerebral al sacrificio al comparar animales control, privados, y privados tratados con PCPA, nuestros resultados no pueden ser atribuidos a desnutrición inducida por el PCPA. Así, nuestros resultados muestran que las respuestas plásticas intramodales de los barriles en la corteza somatosensorial primaria (S1) son heterogéneas e independientes de la distancia que separa a los barriles modificados de la zona cortical privada de estímulo sensorial. En conjunto, nuestras observaciones apoyan que la serotonina pudiera tener un papel facilitador de la plasticidad intramodal en S1 en ratas en desarrollo, y que esta función pudiera llevarse a cabo a por una acción directa de la serotonina sobre las aferentes tálamo-corticales.

Introducción

Los mecanismos y procesos celulares que subyacen a la plasticidad cerebral constituyen uno de los problemas más importantes en las neurociencias contemporáneas (Merzenich et al 1998, Yuste et al 1998). Esto se debe a que los procesos plásticos parecen ser la base de la organización e individualización del cerebro durante el desarrollo, del aprendizaje y la memoria y de distintos procesos neuropatológicos en individuos en desarrollo, adultos y ancianos. Quizás esto explique la gran cantidad de esfuerzo que se ha hecho para entender las bases moleculares y celulares de las respuestas plásticas cerebrales. No obstante este esfuerzo, nuestro entendimiento de los detalles finos sobre los mecanismos de plasticidad cerebral es aún muy reducido y fragmentado. Se ha propuesto que distintos neurotransmisores, entre ellos la serotonina, podrían inducir, inhibir o fomentar diversos cambios morfológicos y fisiológicos de las neuronas, cuando el sistema nervioso es sometido a distintas exigencias por el medio ambiente interno y/o externo. También se ha observado la presencia de serotonina durante fases críticas del desarrollo neuronal, en las cuales la estructura y función cerebrales son muy susceptibles a ser modificadas (Fujimiya y cols. 1986). Así mismo, se sabe que la serotonina fomenta el crecimiento axonal durante estas fases críticas del desarrollo neuronal (Blue y cols. 1987). Por ello, en los siguientes párrafos, describiremos la información referente a la bioquímica de la serotonina, su posible participación como factor trófico durante el desarrollo neuronal, y su papel como molécula trófica para el desarrollo de las aferentes tálamo-corticales.

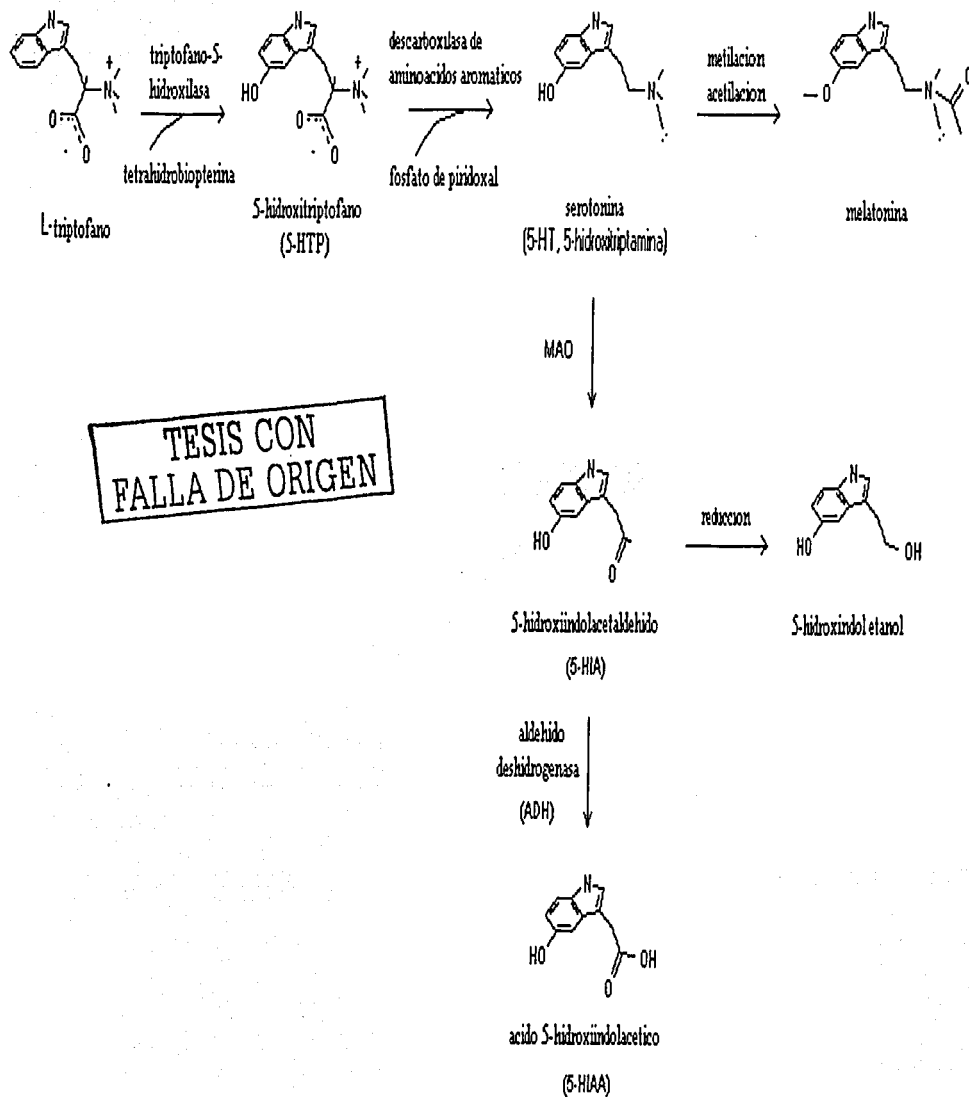
Neuroquímica de la serotonina

a) Síntesis

La serotonina o 5-hidroxitriptamina es una indolalquilamina cuya fórmula química es 3-(2-aminoetil) indol-5-ol (Figura 1). Es una amina bioactiva derivada del L-triptofano y sintetizada a través de una vía metabólica cuyo paso limitante lo establece la enzima L-triptofano-5-hidroxilasa. La actividad y concentración de esta enzima son moduladas por la disponibilidad de L-triptofano plasmático, la concentración de calcio intracelular y por las reacciones de fosforilación catalizadas por las enzimas calcio-calmodulina cinasa II y/o cinasa dependiente de AMPc. (Kandel y cols. 2001)

b) Almacenamiento, liberación e inactivación

En las neuronas serotoninérgicas, la mayor parte de la serotonina es almacenada dentro de vesículas ubicadas en las terminales nerviosas. Estas vesículas pueden ser electrón-claras o densas y miden de 40 a 60 y de 70 a 120 nm de diámetro, respectivamente. La serotonina se almacena en las vesículas a través de un transportador y se asocia a distintas proteínas fijadoras una vez dentro de ellas. En general los datos disponibles permiten sugerir que la serotonina es liberada al espacio sináptico a través de procesos de exocitosis dependientes de la despolarización neuronal y de la concentración de calcio en la terminal nerviosa (Kandel y cols. 2001).



TESIS CON FALLA DE ORIGEN

Figura 1. Esquema que ilustra a la vía metabólica de la síntesis y degradación la serotonina.

La finalización de los efectos sinápticos de la serotonina ocurre principalmente a través de su recaptura por las terminales nerviosas. La recaptura de esta amina se realiza por medio de un transportador membranal de alta afinidad que requiere de la hidrólisis de ATP y de la fuerza electromotriz asociada a un gradiente electroquímico del sodio. También se ha documentado la presencia del transportador de serotonina en astrocitos, por lo que se ha propuesto que estas células participan en la eliminación de la serotonina de los espacios extracelular y sináptico (Kandel y cols. 2001).

c) Degradación

En el tejido nervioso, la serotonina es degradada por una deaminación oxidativa. La reacción es catalizada predominantemente por la enzima monoamino oxidasa A (MAO-A) y por la enzima aldehído deshidrogenasa (Figura 1). El producto final de estas reacciones es el ácido 5-hidroxiindolacético, el cual difunde al intersticio una vez excretado desde las neuronas e ingresa al líquido cefalorraquídeo a través del cual es eliminado del cerebro (Kandel y cols. 2001).

Anatomía y Fisiología del sistema serotoninérgico

a) Aspectos anatómicos relacionados con las neuronas serotoninérgicas

Las neuronas serotoninérgicas se encuentran agrupadas en un conjunto de núcleos ubicados a lo largo del tallo cerebral (Figura 2). Estos núcleos se han dividido en dos sistemas uno caudal y otro rostral. El sistema caudal está formado por los grupos neuronales B1 (Núcleo pálido de rafe), B2 (Núcleo oscuro del rafe),

B3 (Núcleo rafe Magno) y B4 (Núcleo dorsolateral oscuro del rafe) que están localizados en la regiones medial y paramedial del bulbo y del puente caudal. Las fibras de estos grupos de neuronas proyectan hacia diferentes tipos neuronales de la médula espinal (Paxinos et al 1995, Kandel y cols. 20001).

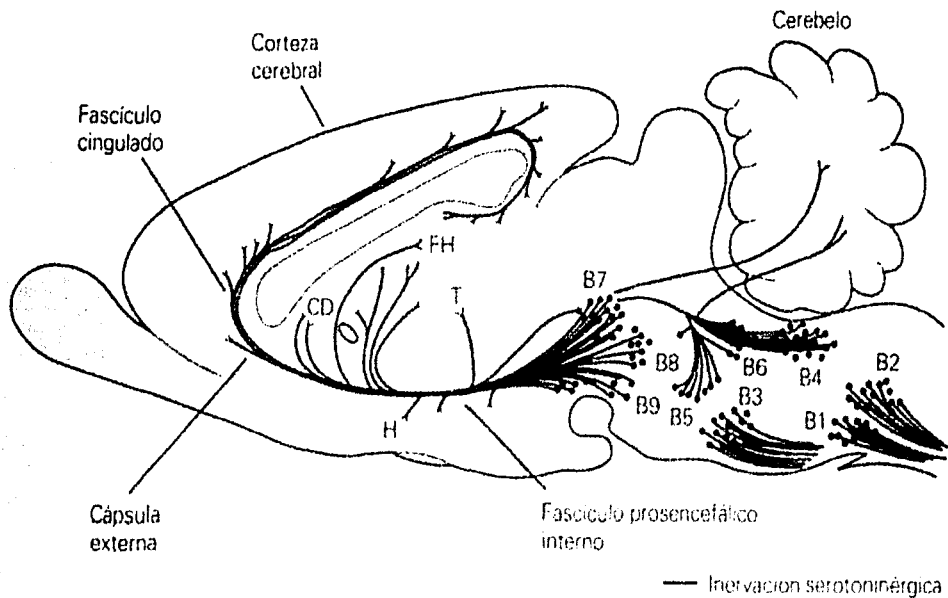


Figura 2. Esquema que ilustra la distribución de los principales núcleos y vías serotoninérgicas en el cerebro de la rata (Tomado de Kandel y cols. 2001).

El sistema rostral comprende a los grupos B5 a B9. Estos grupos se asocian a los núcleos del rafe dorsal y medial, lineal caudal y pontino *oralis*, ubicados en la protuberancia, el mesencéfalo y las regiones surpraleminiscales. El sistema rostral da origen a dos vías ascendentes conocidas como ventral y dorsal. La vía ventral

se origina principalmente en los núcleos B6 (Núcleo de rafe dorsal, región caudal), B7 (Núcleo principal del rafe Dorsal, región ventral) y B8 (Núcleo medial del rafe). Las neuronas de estos grupos proyectan de manera extensa hacia numerosas regiones y núcleos del mesencéfalo, diencefalo, ganglios basales, sistema límbico y la neocorteza. Las neuronas de los grupos B7 y B8 dan origen a las fibras que constituyen la vía dorsal. Estas neuronas envían un grupo de fibras nerviosas hacia el mesencéfalo y otro grupo se une a la vía ventral para inervar, en conjunto, las estructuras telencefálicas. Finalmente, existe una vía serotoninérgica que tiene su origen en el grupo B5 que inerva el cerebelo, la protuberancia y el bulbo raquídeo (Kandel y cols. 2001).

b) Receptores y mecanismos de transducción relacionados con el sistema serotoninérgico.

Los efectos de la serotonina en el sistema nervioso central son mediados por distintos receptores (Cuadro 1), agrupados en dos familias conocidas como 5HT₁ y 5HT₂ (ver cuadro 1). Se han descrito, además, otros subtipos de receptores como son el 5HT₃, 5HT₄, 5HT₅, 5HT₆ y 5HT₇ (Kandel y cols. 2001).

Cuadro 1

Tipo	Subtipos	Características	Localización
5HT ₁	A B C F	<ul style="list-style-type: none"> • Acoplados a proteínas G • Disminuyen el AMPc • A y B pueden funcionar como autoreceptores • A modifica las conductancias de K 	hipocampo, septo, amígdala, ganglios basales, mesencéfalo y corteza entorinal y frontal.
5HT ₂	A C	<ul style="list-style-type: none"> • Acoplados a proteínas G • Aumentan los niveles intracelulares de diacilglicerol e inositol trifosfato 	claustró, núcleo accumbens, tubérculo olfatorio, corteza piriforme, y en las capas I-IV de la neocorteza. subtipo C en células epiteliales ependimarias
5HT ₃	-----	<ul style="list-style-type: none"> • Canales catiónicos dependientes de ligando • Respuestas excitatorias rápidas • Similares a los receptores nicotínicos para Ach 	Ampliamente distribuidos en los tejidos periféricos y en el cerebro, el área postrema, la corteza entorinal, la amígdala y algunos núcleos del tallo cerebral
5HT ₄	-----	<ul style="list-style-type: none"> • Acoplados a proteínas G • Aumentan el AMPc • Respuestas inhibitorias y excitatorias 	Periferia y ganglios basales
5HT ₅	A B	<ul style="list-style-type: none"> • Los A probablemente disminuyen el AMPc 	-----
5HT ₆	-----	<ul style="list-style-type: none"> • Aumentan el AMPc 	-----
5HT ₇	-----	<ul style="list-style-type: none"> • Aumentan el AMPc 	-----

c) Aspectos fisiológicos relacionados con el sistema serotoninérgico.

Las neuronas serotoninérgicas dan origen a fibras delgadas, no mielinizadas que poseen una velocidad de conducción lenta. Estas células se caracterizan por poseer un patrón de actividad eléctrica espontáneo regular y lento. En animales en libre movimiento, las neuronas serotoninérgicas disparan más rápidamente durante el movimiento activo y más lentamente durante el movimiento discreto, el sueño, y en estados en los que los animales concentran su atención a estímulos sensoriales. Con base en estas observaciones, se ha postulado que el papel de las vías serotoninérgicas es la facilitación de los comandos motores y de la función de los generadores centrales de movimiento y la supresión del procesamiento sensorial concurrente.

Además, la serotonina parece jugar un papel importante en la regulación de la conducta alimentaria y el control del peso corporal; las conductas de agresión y aspectos de regulación endocrina de la función reproductiva entre otras. (Kandel y cols. 2001)

Antecedentes

La plasticidad es una capacidad general de los sistemas biológicos que les permite modificar su estructura y función como resultado de su interacción con el ambiente. Si bien, esta capacidad no tiene un valor adaptativo intrínseco, si permite que los organismos generen un mayor repertorio de respuestas estructurales y funcionales, lo que aumenta la probabilidad de que alguna de ellas sea de carácter adaptativo. Es muy probable que la plasticidad fenotípica pudiera ser objeto de selección durante la evolución. Es importante, por otro lado, enfatizar el hecho de que las modificaciones plásticas son mucho más evidentes durante las etapas tempranas del desarrollo en la mayoría de los seres vivos, aunque también ocurren en animales adultos de forma más discreta.

El cerebro es el órgano en donde la plasticidad ha alcanzado su mayor grado de complejidad. Por largo tiempo se ha considerado que la plasticidad neuronal o modificación de la morfofisiología neuronal, ocurre en respuesta a cambios en los niveles de activación y/o a modificaciones de los patrones de activación de los circuitos neuronales (Shatz 1990, Goodman y Shatz 1993, Katz y Shatz 1996). Sin embargo, estudios realizados en cerebros de diversas especies de mamíferos durante el desarrollo postnatal sugieren que estos cambios pudieran ser el resultado de alteraciones en las interacciones celulares y moleculares (i.e. moléculas de adhesión) que subyacen a la formación de los circuitos neuronales, de manera independiente a la actividad neuronal asociada a la estimulación (Yuste y Sur y cols. 1999). Si la actividad neuronal asociada a la estimulación no juega el

papel principal como factor promotor de la plasticidad neuronal durante el desarrollo cerebral, ¿cuales son los factores que la promueven?

Se han propuesto distintas moléculas que pudieran inducir cambios plásticos en los circuitos neuronales de manera independiente de la actividad neuronal asociada a la estimulación. Entre estas moléculas cabe destacar algunas proteínas con efectos tróficos, como el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF, Cohen-Cori y cols. 1996), diversas proteínas de la matriz extracelular como la efrina 5 (Gerlai y cols. 2001, Lyckman y cols. 2001) y algunos neurotransmisores (Lauder y cols. 1986).

Ahora sabemos que los neurotransmisores actúan como factores tróficos y reguladores de la actividad morfogénica en el sistema nervioso, de manera independientemente de su función sobre la actividad sináptica (Lauder et,al 1986). Por ejemplo, la acetilcolina y la dopamina regulan el desarrollo de sus células blanco (Hohmann y cols. 1998). Si se depletan los niveles de dopamina neonatalmente se retarda el crecimiento de las células estriatales (Tensión y cols. 1983). También al lesionar las neuronas colinérgicas del cerebro anterior se produce una laminación anormal de la corteza y una localización errónea de las neuronas piramidales (Hohmann y cols. 1988). Por otro lado, las células GABAérgicas son de las primeras en aparecer durante el desarrollo del cerebro embrionario y la médula espinal (Lauder y cols. 1986. Schaffner y cols. 1993). Además, en la zona de la subplaca aparecen neuronas GABAérgicas durante las etapas tempranas del desarrollo cortical donde cuya función parece ser la de

proveer de soporte trófico para las aferentes que transitan a través de ellas en dirección a la corteza cerebral (Chun, 1989).

Otro neurotransmisor al que se le han atribuido funciones neurotróficas es la serotonina, ya que este neurotransmisor también funciona como regulador del fenotipo de sus células blanco (Lauder y cols. 1990). La eliminación de la serotonina en etapas fetales mediante la administración de PCPA produce a una neurogénesis retardada en aquellas regiones que reciben inervación serotoninérgica durante el desarrollo temprano (Lauder, 1990). Además se ha observado que ratas tratadas prenatalmente con agonistas serotoninérgicos, muestran un patrón anormal de crecimiento de las fibras serotoninérgicas (Whitaker-Azmitia y cols. 1990).

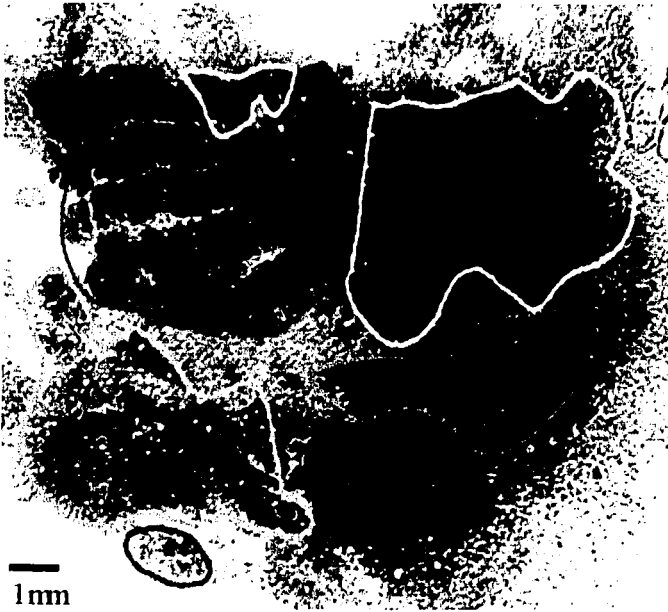
A pesar de la información que asocia a la serotonina con el desarrollo neuronal, hasta el momento no se ha aclarado su participación en los procesos de plasticidad neuronal. Por ello, en el presente trabajo intentamos evaluar el papel de la serotonina como factor promotor y/o modulador de las respuestas plásticas en la corteza somatosensorial primaria (S1) de la rata en desarrollo.

serotonina en el desarrollo y plasticidad cerebral.

El empleo de técnicas de histofluorescencia e inmunocitoquímica han demostrado la presencia de serotonina en etapas tempranas del desarrollo embrionario. En particular, en el sistema nervioso, se ha propuesto que la serotonina es capaz de regular la proliferación celular de precursores neuronales, participa en el cierre del

tubo neural y fomenta el crecimiento de procesos neuríticos y la diferenciación fenotípica de algunos grupos de neuronas en desarrollo (Lauder y cols. 1990). La serotonina no solamente parece jugar un papel central en el desarrollo embrionario del cerebro. Se ha reportado evidencia que apoya que la serotonina participa en la especificación postnatal de las áreas sensoriales primarias en la neocorteza y en los procesos de plasticidad necesarios para la consolidación de los contactos sinápticos (Blue y cols. 1987, DAmato y cols. 1987). También se ha propuesto que la serotonina regula la duración y el inicio de los periodos críticos neocorticales (Lauder y cols. 1980, Osterheld-Hass y Hornung y cols. 1996).

Uno de los modelos más utilizados para estudiar los mecanismos implicadas en el desarrollo y plasticidad de la neocorteza en los mamíferos lo constituye la corteza somatosensorial primaria (S1) de la rata. La capa IV de la S1 contiene una representación anatómica de todos los somato-receptores del cuerpo del animal. Esta representación está organizada en módulos citoarquitectónicos denominados barriles, que se desarrollan durante la primera semana de vida (Woolsey et al 1975, Rice and Van der Loss y cols. 1977). (Figura 3).



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

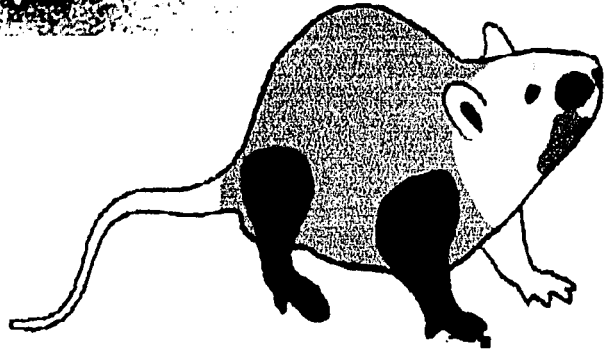


Figura 3. Fotomicrografía que ilustra un corte tangencial a nivel de la capa IV de la corteza cerebral de la rata, teñido con la técnica histoquímica para detectar la actividad de la enzima ATPasa de sodio/potasio. Esta región del cerebro contiene una representación del cuerpo constituida por módulos o barriles. Las distintas sub-representaciones están delineadas en códigos de color de acuerdo a los de los segmentos corporales coloreados diferencialmente en el dibujo de la rata de la derecha (Tomado de Medina, 2000)

Existe una zona de la S1 llamada el subcampo de barriles posteromedial (PMBSF, por sus siglas en inglés), que representa a las vibrisas faciales del animal en una relación uno a uno con los barriles (figura 4). Esta organización uno a uno se mantiene tanto en el tálamo (barreloides) como en el tallo cerebral (barreletas Paxinos y cols.1995)

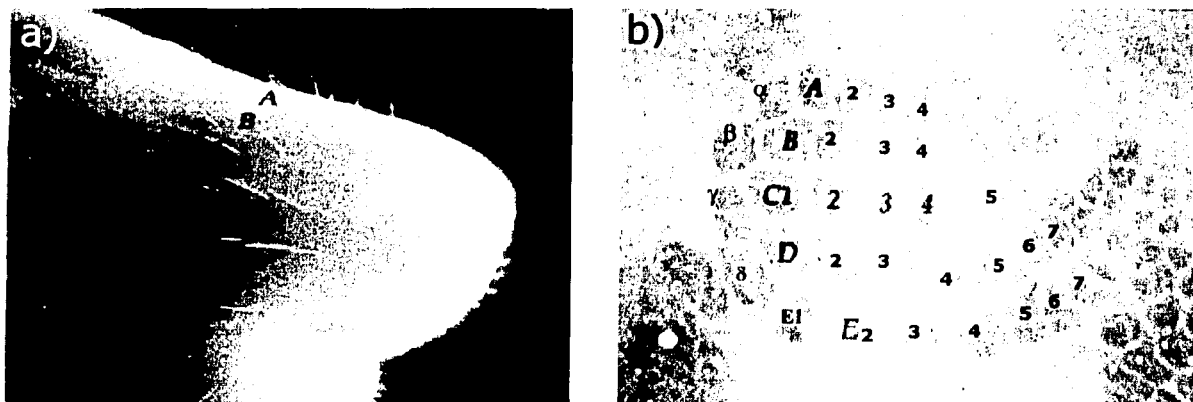


Figura 4: Fotomicrografías que muestran la distribución de las vibrisas faciales de la rata (a), así como la distribución de los barriles (b) en el PMBSF de la corteza somatosensorial primaria de la rata. Las vibrisas faciales y los barriles se encuentran organizadas en 5 líneas horizontales denominadas A, B, C, D y E. En la parte posterior y entre cada una de estas líneas se encuentran las vibrisas / barriles más grandes a los cuales se les ha nombrado α , β , γ y δ .

Se ha documentado la presencia de axones inmunoreactivos para serotonina en S1 durante su periodo de su especificación (Fujimiya y cols. 1986, Cases y cols. 1996). Estas fibras parecen originarse, al menos un porcentaje importante de ellas, en el núcleo del rafe dorsal, pero otras parecen corresponder a la propias aferentes tálamo-corticales (Kirifides et al 2001). Asimismo, se ha mostrado que

las aferentes tálamo-corticales somatosensoriales expresan el receptor 5HT_{1B} y el transportador para serotonina durante el periodo del desarrollo que corresponde a su especificación y crecimiento inicial (Bennett-Clarke y cols.1993, Boylan et al 2000). Todos estos datos, en su conjunto, sugieren que la serotonina pudiera jugar un papel central en los procesos de especificación de las áreas corticales en el cerebro de los mamíferos, a través de modular el crecimiento de las aferentes talamo-corticales (Young-Davies y cols. 2000).

En apoyo a esta última conclusión, se ha observado que neuronas talámicas en desarrollo cultivadas y tratadas con serotonina, incrementan el número de ramificaciones (Lieske y cols. 1999.) Las aferentes tálamo-corticales de ratones deficientes en mono-amino oxidasa A o de ratas tratadas con clorgilina, procedimientos que incrementan la concentración de serotonina cortical, ocupan regiones corticales que normalmente carecen de estas fibras (Boylan et al 2000,). En éstos animales también se retarda la formación de los barriles y los efectos descritos se revierten cuando se tratan los animales con PCPA (Cases y cols. 1996, Holschneider y cols. 2000).

No obstante la evidencia que apoya la participación de la serotonina en el desarrollo temprano de S1, nuestro conocimiento acerca del papel preciso de éste neurotransmisor y/o neuromodulador en procesos de plasticidad de los barriles es aún poco claro. Aunque algunos trabajos previos sugieren que la serotonina podría tener un papel menor en las respuestas plásticas corticales durante el desarrollo (Turlejski y cols. 1997), estos estudios tienen algunas limitaciones técnicas que

hacen difícil su interpretación. Por ejemplo, en uno de ellos se utilizaron neurotoxinas que eliminan permanentemente a las neuronas serotoninérgicas, por lo que no podemos diferenciar si la falta de efecto es debido a la ausencia de las células o bien, a la del neurotransmisor. Se sabe que la eliminación de una población celular conlleva al rebrote axónico de aferentes vecinas, con la consecuente invasión del territorio nominalmente privado. Además, en el estudio referido las técnicas anatómicas utilizadas para detectar la presencia de cambios plásticos corticales pudieran subestimar los cambios citológicos reales.

Plasticidad intramodal en S1

La plasticidad intramodal se define como los cambios estructurales y funcionales que ocurren en un área primaria sensorial y/o motoras del cerebro como respuesta a la pérdida parcial de los órganos sensoriales. Un ejemplo de ello ocurre en roedores a los que se les han cauterizado selectivamente algunas de las líneas de vibras faciales (i.e., bigotes) al nacimiento. En estos animales, los barriles correspondientes a las vibras cauterizadas se atrofian y se fusionan formando una banda, mientras que los barriles adyacentes se expanden invadiendo el territorio que originalmente correspondían a los otros barriles (Killackey y Belford, 1979).

Si bien se ha mostrado que parte de esta respuesta plástica en el cerebro en desarrollo depende de la integridad de la transmisión glutamatérgica (Schlaggar et al 1993, Datwani y cols.2002), aún se desconoce si la serotonina pudiera modularla. Estudios recientes sugieren que se requiere de la interacción de varios

neurotransmisores y factores de crecimiento para que una respuesta plástica se despliegue en su totalidad. Así, en el presente trabajo analizamos la posible participación de la serotonina como modulador de las respuestas plásticas cerebrales utilizando el modelo de la privación neonatal selectiva de las vibrisas faciales. El énfasis fue puesto en tratar de determinar la constancia de las respuestas plásticas entre los individuos privados, y la posible participación de la serotonina en la modulación de la respuesta plástica individual.

Justificación

La plasticidad cerebral constituye uno de los procesos necesarios para el funcionamiento del sistema nervioso. Esta propiedad permite ajustar la estructura y función neuronales a los requerimientos del organismo. Los procesos plásticos también permiten compensar la pérdida funcional asociada a alteraciones anatómicas en los circuitos neuronales, cuando éstos han sido dañados. Sin embargo la plasticidad, no siempre es adaptativa y puede llevarnos al desarrollo de sensaciones y percepciones patológicas. Así, el conocimiento de los mecanismos celulares y moleculares que subyacen a los cambios plásticos pudiera permitirnos no solamente tener una mejor comprensión sobre la relación estructura-función en el cerebro, sino al desarrollo de terapias farmacológicas que permitan modular las respuestas plásticas.

Hipótesis

La serotonina facilita los cambios estructurales en S1 consecutivos a la cauterización selectiva de vibrisas faciales.

Objetivos

Objetivo General

Evaluar el papel de la serotonina en la plasticidad cortical en un modelo de plasticidad intramodal somatosensorial.

Objetivos Específicos

Objetivo específico 1

Determinar las áreas de los barriles correspondientes a la líneas A,B,C,D y E de las vibrisas faciales en animales control a los once días de edad, utilizando técnicas de histoquímica para la enzima citocromo oxidasa, de microscopia de luz y análisis digital de imágenes.

Objetivo específico 2

Determinar las áreas de los barriles correspondientes a la líneas A,B,C,D y E de las vibrisas faciales en animales (once días de edad) cuyas vibrisas (líneas C o D) fueron cauterizadas al nacimiento, utilizando técnicas de histoquímica para la enzima citocromo oxidasa, de microscopia de luz y análisis digital de imágenes.

Objetivo específico 3

Determinar las áreas de los barriles correspondientes a la líneas A,B,C,D y E de las vibrisas faciales en animales (once días de edad) cuyas vibrisas (líneas C o D) fueron cauterizadas al nacimiento y fueron tratados con PCPA intraperitoneal, mediante el uso de técnicas de histoquímica para la enzima citocromo oxidasa, de microscopia de luz y análisis digital de imágenes.

Objetivo específico 4

Determinar la concentración de serotonina en la S1 de animales control de once días de edad, utilizando técnicas de cromatografía líquida (HPLC)

Objetivo específico 5

Determinar la concentración de serotonina en la S1 de animales (once días de edad) cuyas vibrisas (líneas C o D) fueron cauterizadas al nacimiento, utilizando técnicas de cromatografía líquida (HPLC)

Objetivo específico 6

Determinar la concentración de serotonina en la S1 de animales (once días de edad) cuyas vibrisas (líneas C o D) fueron cauterizadas al nacimiento y que fueron tratadas con PCPA intraperitoneal, utilizando técnicas de cromatografía líquida (HPLC)

Materiales y Métodos

Animales

Se utilizaron crías de rata de la cepa Wistar para todos los experimentos. En cada camada el número de animales se ajustó a nueve crías después del nacimiento para disminuir los efectos del tamaño de la camada y la competencia por el alimento, así como las variaciones entre camadas. Los animales tuvieron libre acceso a comida y agua y se les mantuvo en un cuarto con temperatura y luz controlada.

Para el procedimiento quirúrgico, todas las crías control ($n = 6$) y experimentales ($n = 14$) de entre 10 y 15 horas de nacidas se anestesiaron por hipotermia. Después las vibrisas faciales correspondientes a las líneas C o D fueron cauterizadas en los animales privados utilizando una corriente anódica, de acuerdo a los protocolos descritos por Gutiérrez-Ospina (1998). Al término de la cirugía, los animales se colocaron en un cojín termoeléctrico hasta que recuperaron su color, movimiento y temperatura, momento en el cual fueron regresados con sus madres. Un subgrupo de animales experimentales ($n = 8$) fue inyectado intraperitonealmente con PCPA (300 mg/Kg de peso corporal) después de la cirugía y reinyectado a los 5 días de edad. Con este tratamiento se ha demostrado disminución de hasta en un 93.4% la concentración de la serotonina cortical en animales en desarrollo (Persico y cols. 2000; Gutiérrez-Ospina y cols. 2002).

Evaluación del área de los barriles

Para la medición del área de los barriles, los animales se sacrificaron al día posnatal once (PN11) con una sobredosis de pentobarbital sódico (45 mg./Kg. de peso corporal) y se decapitaron. Se extrajeron los cerebros y se separaron las cortezas. Éstas se colocaron en una solución de paraformaldehído al 4% en amortiguador de fosfatos (PB 0.1M, pH 7.4) por dos horas y posteriormente se lavaron dos veces con PB 0.1M. Los hemisferios se aplanaron entre dos portaobjetos y congelaron en 4-metilbutano (Riddle *y cols.* 1992). Se obtuvieron rebanadas de 50 μ m de grosor en un criostato a -12°C , y se colocaron en PB 0.1M para eliminar los restos de fijador. Posteriormente las rebanadas se colocaron en la solución de incubación utilizada para revelar la actividad histoquímica de la enzima citocromo oxidasa (Wong-Riley *y cols.* 1989; Riddle *y cols.* 1992). La incubación se realizó a 37°C durante toda la noche en agitación constante. Concluida la reacción, los cortes se lavaron en PB, se fijaron a portaobjetos con gelatina y se montaron con cubreobjetos y Cytoseal (figura 5).

Para elaborar los mapas corporales bidimensionales en los hemisferios de los animales control (n=6 hemisferios) privados (n=6 hemisferios) y privados tratados con PCPA (n=8 hemisferios), se desecharon los cortes de las primeras capas de la corteza y se seleccionaron aquellos cortes en los que aparecía la capa IV con el PMBSF teñido claramente para citocromo oxidasa (8 cortes en promedio para cada hemisferio).

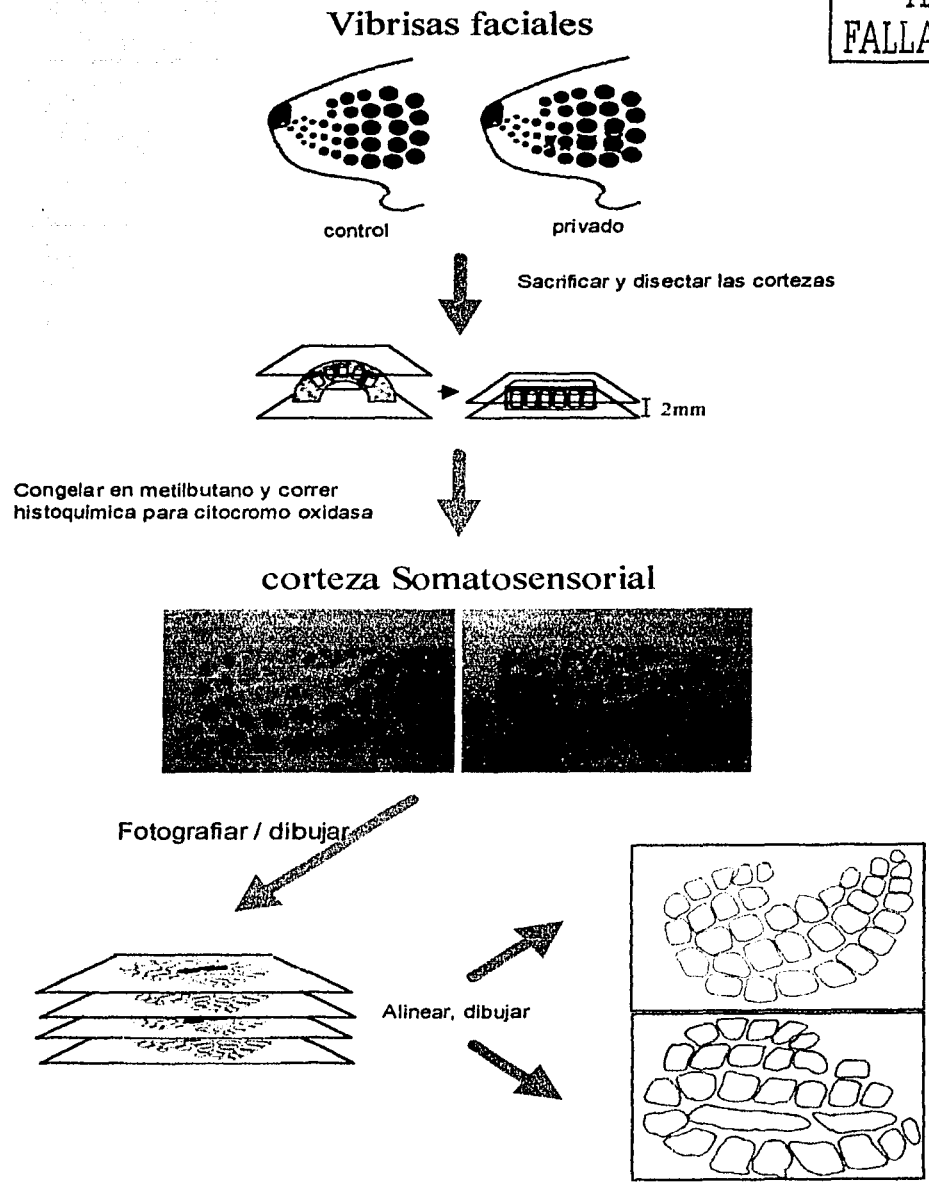


Figura 5. Esquema que ilustra el procedimiento que se siguió para obtener las reconstrucciones bidimensionales del PMBSF de los animales control (n=6) y experimentales (n=14)

En algunos casos, los mapas se elaboraron dibujando los barriles del PMBSF a través de los distintos cortes, con ayuda de una cámara lúcida (Riddle y cols. 1992). En otros casos, las imágenes de los cortes en los que aparecía el PMBSF fueron capturados y digitalizados, y los mapas bidimensionales se obtuvieron delineando los barriles con base a las imágenes impresas. Para obtener las reconstrucciones bidimensionales del PMBSF, en ambos casos, se alinearon los distintos cortes/planos tomando como referencia los vasos sanguíneos (figura 6), para posteriormente delinear el perímetro total de los barriles. Las reconstrucciones finales son la sumatoria de las imágenes de los cortes en los que aparecía el PMBSF. Estas reconstrucciones fueron digitalizadas y las áreas de los barriles estimadas con la ayuda del sistema de análisis de imágenes Scion Image.

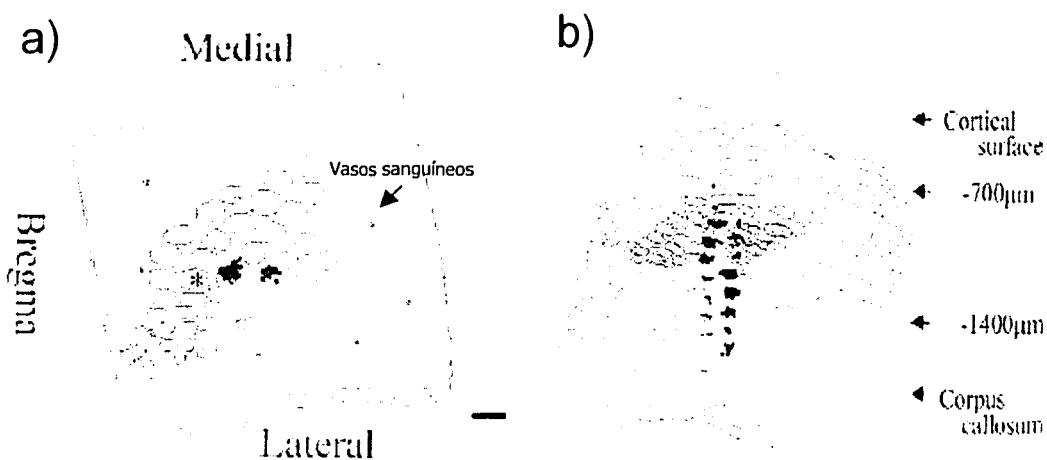


Figura 6: Esquema que muestra la disposición de los barriles en los cortes tangenciales de corteza de rata (a) y la disposición de estos barriles en el plano vertical (b). Se ilustra la manera en que se alinean los cortes para formar la reconstrucción bidimensional.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Determinación de serotonina por HPLC

Para la determinación de serotonina todas las crías se anestesiaron por hipotermia (control n=6, privados n=7 y privados /tratados con PCPA n=5) y perfundieron transcárdialmente con sol. Salina (NaCl 0.8%) y fijador (paraformaldehído 4%, en PB pH 7.4). Los cerebros se extrajeron y se separaron las cortezas. Para disectar la parte de la corteza que corresponde a S1 se utilizó un sacabocados de vidrio de 3mm de diámetro. El tejido nervioso fue desproteínizado con una solución de HClO₄ 0.1N, más metabisulfito de sodio 4 mM en una relación 1:3 peso/volumen (p/v) y fue homogenizado con un sonicador ultrasonic processor. Después se centrifugo a 15000g por 15 min. El sobrenadante fue separado y filtrado en una membrana de nylon de 0.45 μm de diámetro de poro. Posteriormente se tomaron 20 μl de este sobrenadante y fueron inyectados al HPLC, utilizando una columna de simetría C₁₈ de fase reversa y 5 μm de tamaño de partícula y 3.9 x 15 mm de longitud. Se uso un sistema binario de una solución de Fosfato de Potasio monobásico 2mM pH 3.3 más ácido heptanosulfónico 1g/l de solución y una mezcla de metanol agua en relación 3:2 (v/v) a razón de 1 ml por minuto. La detección se realizo por medio de un detector fluorométrico con una excitación de 290nm y 330 nm de emisión. La respuesta fue obtenida mediante un sistema análogo millenium 2020

Resultados

Peso corporal y cerebral en animales control, privados y privados tratados con PCPA.

Debido a que la serotonina regula el desarrollo postnatal, así como el apetito y el sueño, decidimos evaluar la ganancia de peso corporal y cerebral de los animales control, privados y privados tratados con PCPA. Como se muestra en la Figura 4, no se encontraron diferencias estadísticas en la ganancia de peso corporal ni en el peso cerebral a la fecha de sacrificio entre los distintos grupos de animales.

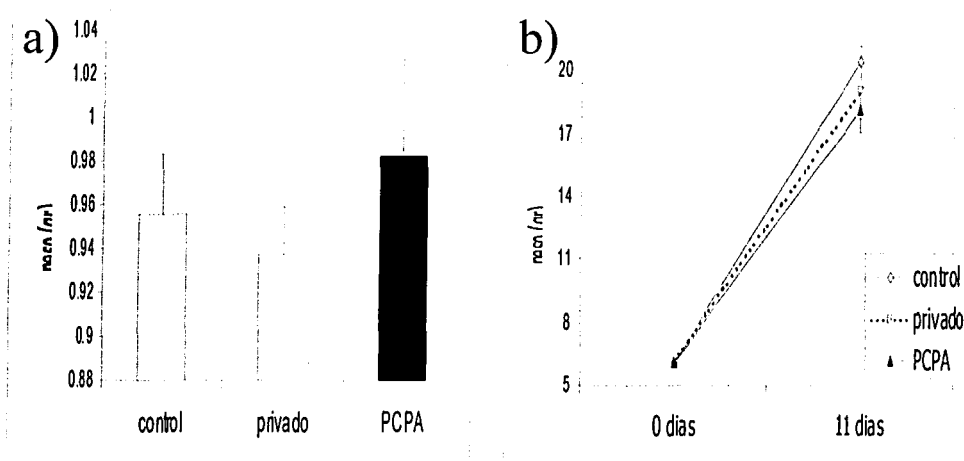


Figura 7. Gráficas que ilustran el peso del cerebro (a) al día sacrificio y el comportamiento de la ganancia del peso corporal (b) desde al nacimiento hasta el día de sacrificio, en los animales control (n=6), privados (n=6) y privados tratados con PCPA (n= 8)

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Efectos del tratamiento con PCPA sobre la concentración de serotonina en la S1

Con el fin de determinar si el PCPA inyectado intraperitonealmente al nacimiento efectivamente disminuía los niveles de serotonina cortical, decidimos evaluar la concentración de serotonina en la S1 de animales control (n=6), privados (n=7) y privados /tratados con PCPA (n=5). Como se muestra en la figura 8, el tratamiento con PCPA disminuyó la concentración de serotonina cortical en un 91.4% ($p < 0.01$) a los once días de edad.

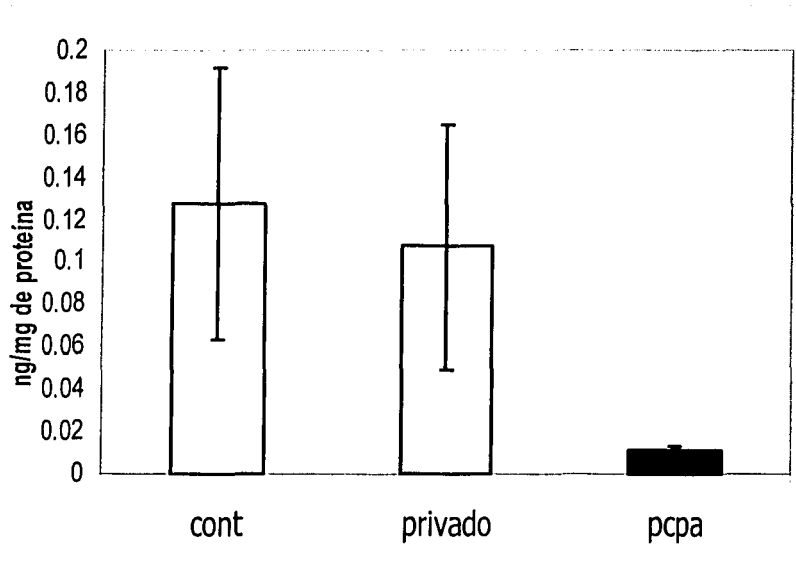


Figura 8: Gráfica que muestra la concentración de serotonina en la S1 de animales control (n=6), privados (n=7) y privados tratados con PCPA (n=5). (prom \pm E.S. T-student, * $p < 0.01$)

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Efectos de la eliminación de las vibrisas faciales sobre el tamaño, disposición anatómica y geometría de los barriles de PMBSF.

Con el propósito de determinar si la serotonina tiene un papel modulador de la plasticidad cortical en S1, decidimos evaluar el grado de expansión de los barriles del PMBSF en los grupos experimentales con respecto al grupo control. Para esto se realizaron reconstrucciones bidimensionales del PMBSF a partir de rebanadas tangenciales de la corteza de las ratas teñidas para citocromo oxidasa. En las Figuras 9 a y b se muestra la disposición anatómica y geometría de los barriles del PMBSF en un individuo control de once días de edad. Nótese que los barriles constituyen entidades individuales separadas por septos. En contraste, en los animales privados, se observa una fusión de los barriles correspondientes a los bigotes cauterizados (Figura 9 c y d) tanto en los animales privados como en aquellos privados y tratados con PCPA. Éstos resultados indican que la disminución de la concentración de serotonina cortical no impide el desarrollo de la plasticidad en S1, en respuesta a la privación temprana de la vibrisas.

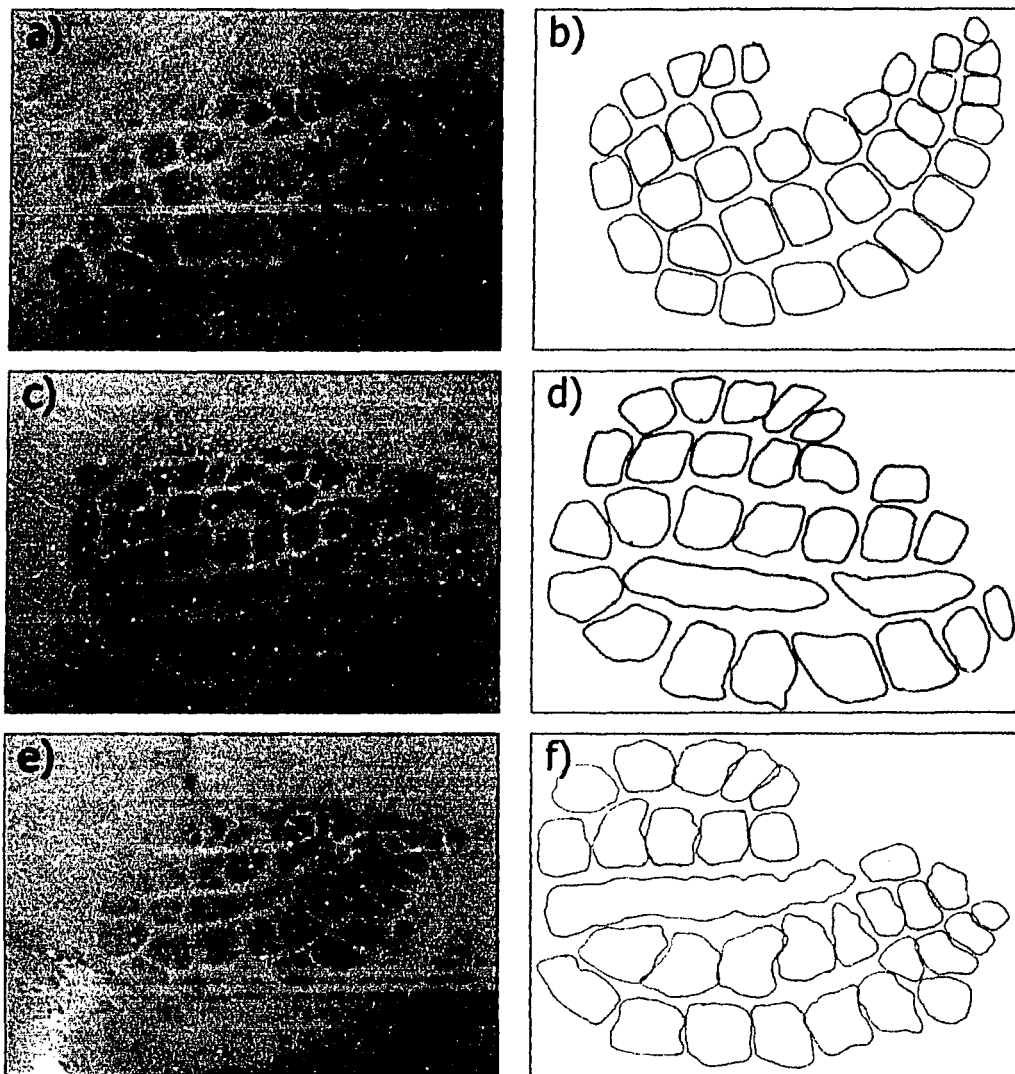


Figura 9. Fotomicrografías representativas que muestran cortes tangenciales a través de la capa IV de S1 teñidos histoquímicamente para la enzima citocromo oxidasa. Se observa la representación de las vibrisas faciales en ratas control (a), privadas de las vibrisas de la línea D (c) y privadas de las vibrisas de la línea C tratadas con PCPA (e) de once días de edad. En b, d y f se muestran la reconstrucciones bidimensionales correspondientes a ratas control, privadas y privadas con PCPA respectivamente.

Modulación de la respuesta plástica de S1 por la disminución de la concentración de serotonina cortical.

En la Figura 6 se muestra el área ocupada por barriles en el PMBSF de animales control, privados y privados/tratados con PCPA de once días de edad. No obstante las anomalías anatómicas causadas por la privación, el tamaño del PMBSF es similar al compararse animales de los tres grupos. Esto sugiere que la disminución de la concentración de serotonina cortical no altera el crecimiento de ésta sub-representación cortical, y que la respuesta plástica representa una reorganización interna en S1 que no involucra a toda la corteza

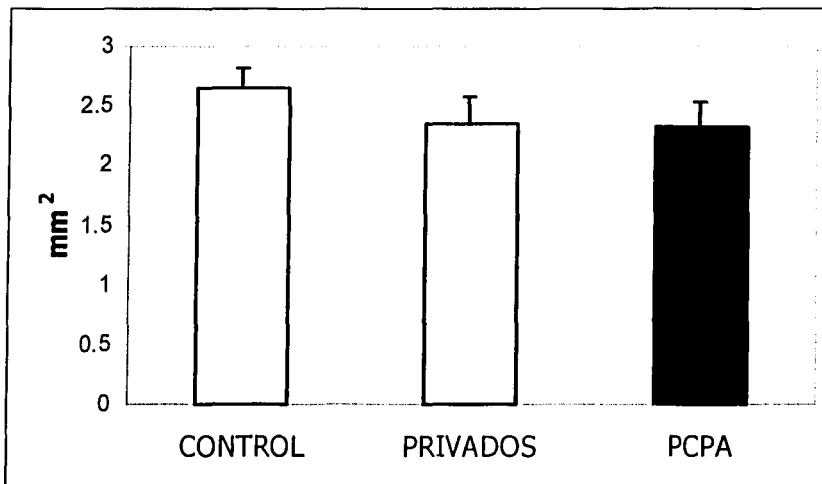


Figura 6. Gráfica que muestra el área total del PMBSF ocupada por barriles en animales control, privados y privados/tratados con PCPA a los once días de edad.

A pesar de la aparente falta de efecto de la disminución de serotonina cortical sobre el crecimiento global de PMBSF y el desarrollo de la respuesta plástica, un análisis de distribución de frecuencias del porcentaje de expansión mostró que la

mayor parte de la población de los barriles expandidos en los animales privados tratados con PCPA, se encuentra distribuida entre los rangos de valores más bajos (Figura 10). En contraste, los valores de de expansión de los barriles en los animales privados se distribuyen más homogéneamente sobre la curva de frecuencia (Figura 10). Esto indica que la disminución de la concentración de serotonina cortical bloquea parcialmente la respuesta plástica de expansión.

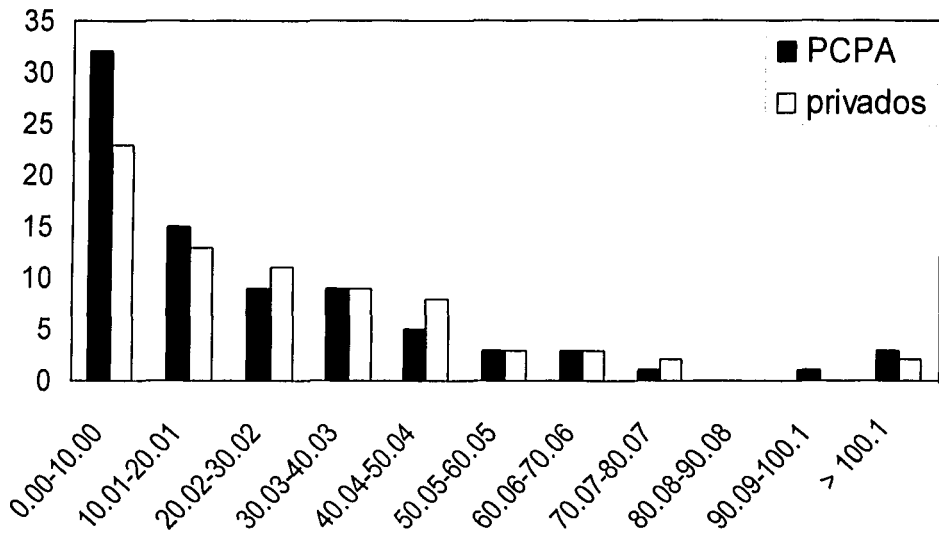


Figura 10. Histograma de frecuencias que muestra los rangos de expansión en los barriles del PMBSF en animales de animales privados y privados/tratados con PCPA a los once días de edad.

Estudios previos han mostrado que en animales privados de una línea de vibras los barriles adyacentes a la banda se expanden (Killackey y Belford, 1979). Por otro lado, existen reportes que indican que la expansión de los barriles puede ser

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

heterogénea dependiendo de su posición relativa en el mapa cortical(Iwasato y cols. 2000, McCasland et al 1988). Por estas razones pensamos importante el realizar una evaluación descriptiva sobre del porcentaje de barriles que se expandieron en todo el PMBSF (Figura 10) y sobre el porcentaje de expansión de los barriles adyacentes (Figura 12a) y no adyacentes (Figura 12b) a la zona cortical privada. Para lo cual llamamos barriles adyacentes a aquellos que se encuentran contiguos a la banda fusionada y como no adyacentes al resto del mapa. Nuestros resultados muestran que el 47.13% y 47.36% de los barriles del PMBSF en los animales privados y privados / tratados con PCPA, respectivamente, se expandieron (Figura 11). De estos porcentajes, solamente el 21.65% y 19.88% de los barriles en los animales privados y privados tratados con PCPA, respectivamente, fueron adyacentes (Figura 11).

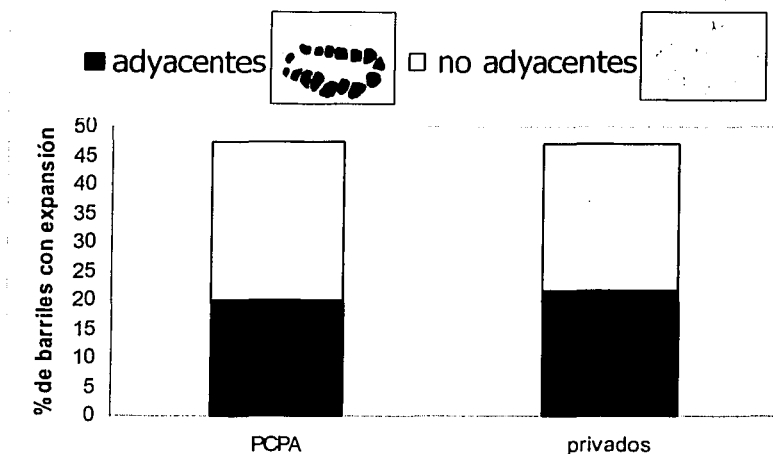


Figura 11. Gráfica que ilustra el porcentaje del total de barriles que muestran expansión en el PMBSF de animales privados (n=6) y privados tratados con PCPA (n=8) a los once días de edad

Nuestros resultados confirman que la expansión de los barriles del PMBSF en respuesta a la privación es heterogénea, afectando tanto a los barriles adyacentes como a los no adyacentes a la zona cortical privada (figura 11). Esta respuesta heterogénea no se ve afectada por la disminución de la concentración de serotonina cortical, puesto que los porcentajes de los barriles expandidos no difiere entre los animales privados y privados / tratados con PCPA (figura 11).

No obstante estos resultados, el porcentaje de expansión de los barriles adyacentes a la zona cortical privada en los animales privados / tratados con PCPA es 10.92% ($p < 0.007$) menor que en los animales privados (Figura 12a).

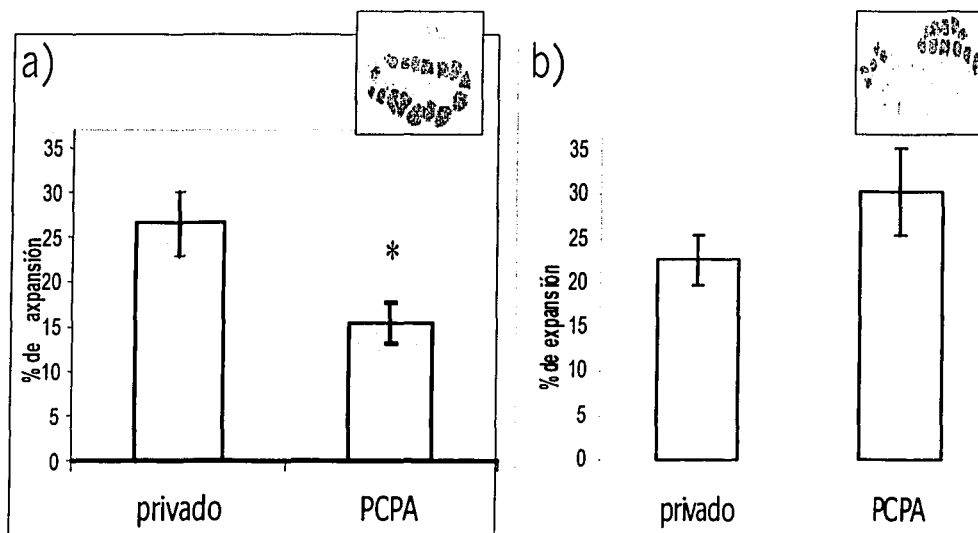


Figura 12. Gráficas que muestran el porcentaje de expansión (promedio \pm E.S. t-Student) de los barriles adyacentes (a) y no adyacentes (b) a la zona cortical privada en animales privados ($n=6$) y privados tratados con PCPA ($n=8$) de once días de edad. En el recuadro se muestra un esquema del mapa de S1 ilustrando los barriles que consideramos como adyacentes (a) y no adyacentes (b) marcados en color gris. (* $P < 0.007$ t-Student)

Sorprendentemente, en los animales privados / tratados con PCPA, el porcentaje de expansión de los barriles no adyacentes es 7.67% ($p < 0.01$) mayor que en los animales privados (Figura 12b).

Discusión

La plasticidad neuronal es una capacidad que permite al cerebro modificar su estructura y función en respuesta a cambios en su ambiente exterior o interior. Los mecanismos por los cuales se llevan a cabo estas modificaciones aún no son del todo claros. Se ha propuesto que neurotransmisores como la serotonina pudieran modular las respuestas plásticas neuronales. Existen, al menos, tres elementos de las respuestas plásticas que pudieran ser regulados por la serotonina. El primero de ellos, es la modificación de los tiempos y la duración de los eventos del desarrollo neuronal (Jonson y cols. 1983 y Mower y cols. 1991). El segundo, corresponde a la modificación de los patrones citoarquitectónicos, a través de la modulación directa o indirecta de interacciones tróficas (Gutierrez-Ospina y cols. 2002, Bennett-Clarke y cols. 1994). Y el tercero, es la modificación de las propiedades fisiológicas neurales (Bennett-Clarke y cols.).

En estudios recientes se ha demostrado que la disminución de la concentración de serotonina cortical no modifica el tiempo de inicio de la formación de los barriles en animales control y desnutridos tratados con PCPA (Gutierrez-Ospina y cols. 2002), o controles tratados con un fármaco que elimina la serotonina, la fenfloramina (Bennett-Clarke y cols. 1995). Debido a que en los animales desnutridos se retrasa la formación de barriles, estas observaciones sugieren que la serotonina no participa como regulador de la temporalidad de la respuesta plástica.

Si bien la serotonina parece no participar en la regulación en la temporalidad de la plasticidad, aún no es claro su papel como factor modulador de la citoarquitectura cortical durante las respuestas plásticas. En los cerebros de animales privados de todas las vibrisas con excepción de aquellas correspondientes a la línea C, ocurre una expansión de los barriles correspondientes a las vibrisas intactas (Turlejski y cols. 1997). Debido a que esta expansión no es bloqueada por la depleción de serotonina que resulta de la destrucción de las fibras serotoninérgicas por el tratamiento con 5,7 -Dihidroxitriptamina (5,7-DHT), Turlejski y colaboradores afirman que la serotonina no participa como factor regulador de la plasticidad citoarquitectónica del cerebro en desarrollo. En contra de esta postura, nuestros resultados muestran que la disminución en la concentración de serotonina cortical por el tratamiento con PCPA bloquea parcialmente la expansión de los barriles adyacentes a la zona privada, además de que el número de barriles que muestran una expansión menor al 10% es mayor en animales privados / tratados con PCPA contra aquellos privados no tratados. La modulación de la respuesta plástica por la serotonina no se debe a un efecto general e inespecífico, ya que el área ocupada por barriles del PMBSF, así como el número de barriles que presentan expansión, no se ve afectado por la depleción de este neurotransmisor.

La discrepancia entre nuestros resultados y los obtenidos por Turlejski y cols. (1997) y los nuestros pueden deberse a que la eliminación de las fibras serotoninérgicas por 5,7 DHT pudiera tener otros efectos biológicos además de la disminución de la concentración de serotonina cortical, como lo es el rebrote

compensatorio de aferentes diferentes a las tálamo-corticales (e.g., horizontales) que también alcanzan a S1. Además, se sabe que existe un desfase de los límites anatómicos y funcionales (fox, 2002) del mapa corporal en S1 de los roedores.

A pesar de lo reportado comúnmente después de privar selectivamente de vibrissas faciales a roedores en desarrollo, en nuestro estudio observamos que no solamente los barriles adyacentes a la zona cortical privada presentan expansión, sino también aquellos no adyacentes a dicha zona. Coincidentemente, se ha observado que en gatos, la lesión fotoquímica de la corteza visual conduce a una expansión de las columnas de preferencia de orientación no adyacentes a la zona cortical cicatrizada (Zepeda y cols. 2002). Así, ambos estudios sugieren que las respuestas plásticas intramodales son heterogéneas entre los compartimentos que constituyen cada sub-representación cortical, independientemente de su vecindad con las zonas corticales privadas o lesionadas. En apoyo a esta sugerencia, estudios previos en S1 de animales ciegos (Rauschecker y cols. 1992) y privados selectivamente de vibrissas faciales (McCasland y Woolsey, y cols. 1988) mostraron que el grado de plasticidad de los barriles del PMBSF difiere entre ellos de manera independiente, hasta cierto punto, de la posición relativa que estos ocupen con relación al mapa en su conjunto y al sitio de privación.

En el presente trabajo mostramos que la disminución en la concentración de serotonina cortical, por un lado, bloquea parcialmente la expansión de los barriles adyacentes, y por otro, aumenta la expansión de los barriles no adyacentes a la

zona cortical privada consecutiva a la privación selectiva de vibrisas faciales en animales en desarrollo. La razón por la cual se presenta éste efecto bimodal es desconocida. Se ha propuesto, sin embargo, que el crecimiento de las aferentes glutamatérgicas (Geovannini y cols. en preparación) y de las espinas dendríticas (Segal y cols. 2000) es modulado por glutamato de manera tal que, cuando éste neurotransmisor esta presente en concentraciones bajas facilita la ramificación axónica y el crecimiento de espinas. Por el contrario, cuando el glutamato esta presente en concentraciones mayores, inhibe el crecimiento axonal y espinal. Así, una depleción heterogénea de serotonina en el PMBSF de los animales privados / tratados con PCPA podría explicar el efecto bimodal arriba referido. Finalmente, que la respuesta plástica de los barriles adyacentes y no adyacentes sea contraria y aparentemente independiente una de la otra no es extraño, pues estudios realizados por Schlaggar y O'Leary (1993) utilizando un modelo experimental equivalente, han mostrado que la plasticidad observada en la zona privada es independiente de aquella que ocurre en los barriles adyacentes a dicha zona.

La posibilidad de que la serotonina pudiera regular el crecimiento de las aferentes talamocorticales durante el desarrollo normal ha sido documentada tanto en modelos *in vivo*, empleando animales carentes del gen que codifica para la Monoamino Oxidasa A (Cases y cols. 1996), como en modelos *in vitro* utilizando cultivos de neuronas tálamicas somatosensoriales. En ambos casos tanto el número de procesos neuronales como su longitud total aumentan en presencia de concentraciones elevadas de serotonina. Dicha respuesta pudiera ser mediada por

los receptores $5HT_{1B}$, debido a que este receptor se encuentra presente en las aferentes tálamo-corticales durante el periodo de especificación de S1. Nuestras observaciones sobre el bloqueo parcial de la expansión de los barriles adyacentes y la potenciación de la expansión de los barriles no adyacentes a la zona privada, además de apoyar estas observaciones, sugieren que la serotonina también regula el crecimiento axonal durante las respuestas plásticas corticales, al menos en la capa IV de la S1 durante el desarrollo; recordemos que los barriles teñidos con la histoquímica para citocromo oxidasa reflejan indirecta y parcialmente, el territorio de distribución de las aferentes tálamo-corticales (Riddle y cols. 1993).

Otro posible efecto de la serotonina como factor regulador de la plasticidad es a través de la modulación de la actividad neuronal. Se sabe que la serotonina disminuye la actividad neuronal. Desafortunadamente, nuestros resultados no aportan evidencia que ayude a resolver esta posibilidad. Sin embargo, los trabajos de Boylan y colaboradores muestran que el tratamiento con un inhibidor de la MAO A, la clorgilina, da como resultado una representación corporal no segmentada en barriles al P6. Este efecto, se revierte al P10 si se suspende la administración de clorgilina en P6 y la reversión no es bloqueada por la aplicación de un antagonista de los receptores NMDA o por la transección del nervio infraorbitario. De esta forma, los resultados discutidos sugieren que los efectos de la serotonina sobre la formación y plasticidad de los barriles en S1 son independientes de la actividad neuronal intrínseca o asociada al uso.

Finalmente, se ha propuesto que las alteraciones en el patrón de barriles debido al tratamiento con PCPA se deben a un efecto del fármaco sobre el desarrollo y no a la ausencia de serotonina por si sola (Persico y cols. 2000). En el presente trabajo, hemos mostrado que el tratamiento con PCPA no altera significativamente la ganancia de peso de las crías ni el peso del cerebro al sacrificio, por lo que podemos afirmar que los efectos observados sobre la plasticidad se deben a la disminución en la concentración de serotonina cortical, y no a un fenómeno de desnutrición asociado con el tratamiento.

Conclusiones

- 1) La plasticidad intramodal es heterogénea e involucra territorios adyacentes y no adyacentes a las áreas corticales desprovistas de sus aferentes principales.
- 2) La serotonina modula las respuestas plásticas intramodales en S1 impidiendo o facilitando parcialmente la expansión de los barriles adyacentes y no adyacentes, respectivamente, a la zona cortical privada de sus aferentes principales.
- 3) Los efectos de la serotonina sobre las respuestas plásticas intramodales parecen llevarse a cabo a través de la regulación del proceso de crecimiento axonal.
- 4) Los efectos de la depleción de serotonina inducida por PCPA sobre las respuestas plásticas intramodales son independientes de posibles alteraciones nutricionales causadas por el PCPA.

Bibliografía

- Bennett-Clarke CA, Chiaia NL, Rhoades RW. Contributions of raphe-cortical and thalamocortical axons to the transient somatotopic pattern of serotonin immunoreactivity in rat cortex *Somatosens Mot Res.* 1997;14(1):27-33.
- Bennett-Clarke C.B, Chiaia N.L, Rhoades R.W, Thalamocortical afferents in rat transiently express high affinity serotonin uptake, *Brain Res.* 733 (1996) 301–306.
- Bennett-Clarke, C.B. Leslie M.J, Chiaia N.L, Rhoades R.W, Serotonin receptors in the developing somatosensory and visual cortices are located on thalamocortical axons, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90 (1993) 153–157.
- Benton J, Huber R, Ruchhoeft M, Helluy S, Beltz B. Serotonin depletion by 5,7-dihydroxytryptamine alters deutocerebral development in the lobster, *Homarus americanus.* *J Neurobiol.* 1997 Oct;33(4):357-73.
- Blue, ME, Molliver, ME. 6-Hydroxydopamine induces serotonergic axon sprouting in cerebral cortex of newborn rat. *Brain Res.* 1987 Apr;429(2):255-69.
- Boylan C. Kesterson K,. Bennett-Clarke C.A,. Chiaia N.L, Rhoades R.W. Neither peripheral nerve input nor cortical NMDA receptor activity are necessary for recovery of a disrupted barrel pattern in rat somatosensory cortex, *Dev. Brain Res.* 129 (2001) 95-106
- Boylan CB, Bennett-Clarke CA, Chiaia NL, Rhoades RW. Time course of expression and function of the serotonin transporter in the neonatal rat's primary somatosensory cortex. *Somatosens Mot Res.* 2000;17(1):52-60.
- Boylan CB, Bennett-Clarke CA, Crissman RS, Mooney RD, Rhoades RW. Clorgyline treatment elevates cortical serotonin and temporarily disrupts the vibrissae-related pattern in rat somatosensory cortex. *J Comp Neurol.* 2000 Nov 6;427(1):139-49.
- Brezun JM, Daszuta A. Depletion in serotonin decreases neurogenesis in the dentate gyrus and the subventricular zone of adult rats. *Neuroscience.* 1999; 89(4):999-1002
- Cases O, Vitalis T, Seif I, De Maeyer E, Sotelo C, Gaspar P Lack of barrels in the somatosensory cortex of monoamine oxidase A-deficient mice: role of a serotonin excess during the critical period. *Neuron* 1996. 16: 297-307
- Cohen-Cory S, Escandon E, Fraser SE. The cellular patterns of BDNF and trkB expression suggest multiple roles for BDNF during *Xenopus* visual system development *Dev Biol.* 1996 Oct 10;179(1):102-15.
- D'Amato R, Blue M, Largent L, Lynch D, Ledbetter D, Molliver M, and S. Snyder Snyder, Ontogeny of the serotonergic projection to rat neocortex: transient expression of a dense innervation to 3 primary sensory areas. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1987. 84: 4322-4326
- Datwani A, Iwasato T, Itohara S, Erzurumlu RS. Lesion-induced thalamocortical axonal plasticity in the S1 cortex is independent of NMDA

- receptor function in excitatory cortical neurons. *J Neurosci.* 2002 Nov 1;22(21):9171-5.
- Fujimiya M, Kimura H, Maeda T. Postnatal development of serotonin nerve fibers in the somatosensory cortex of mice studied by immunohistochemistry. *J Comp Neurol.* 1986 Apr 8;246(2):191-201
 - Fox K. Anatomical pathways and molecular mechanisms for plasticity in the barrel cortex. *Neurosci.* 2002 111(4):799-814.
 - Gavazzi I, Kumar RD, McMahon SB, Cohen J. Growth responses of different subpopulations of adult sensory neurons to neurotrophic factors in vitro. *Eur J Neurosci.* 1999 Oct;once(10):3405-14
 - Gerlai R. Eph receptors and neural plasticity. *Nat Rev Neurosci.* 2001 Mar;2(3):205-9.
 - Goodman CS, Shatz CJ. Developmental mechanisms that generate precise patterns of neuronal connectivity. *Cell.* 1993 Jan;72 Suppl:77-98
 - Gutiérrez-Ospina G, Manjarrez-Gutiérrez G, González C, López S, Herrera R, Medina I and. Hernández-R J. Neither increased nor decreased availability of cortical serotonin disturbs barrel field formation in isocaloric undernourished rat pups. *Int. J. Dev Neurosci.* (2002) 20(6): 497
 - Hohmann CF, Berger-Sweeney J. Cholinergic regulation of cortical development and plasticity. New twists to an old story. *Perspect Dev Neurobiol.* 1998; 5(4):401-25
 - Hohmann CF, Brooks AR, Coyle JT Neonatal lesions of the basal forebrain cholinergic neurons result in abnormal cortical development. *Brain Res.* 1988 Aug 1;470(2):253-64.
 - Holschneider DP, Scremin OU, Huynh L, Chen K, Seif I, Shih JC. Regional cerebral cortical activation in monoamine oxidase A-deficient mice: differential effects of chronic versus acute elevations in serotonin and norepinephrine. *Neuroscience.* 2000;101(4):869-77.
 - Iwasato T, Datwani A, Wolf AM, Nishiyama H, Taguchi Y, Tonegawa S, Knopfel T, Erzurumlu RS, Itohara S. Cortex-restricted disruption of NMDAR1 impairs neuronal patterns in the barrel cortex. *Nature.* 2000 Aug 17;406(6797):726-31.
 - Jablonska B, Gierdalski M, Siucinska E, Skangiel-Kramska J, Kossut M, Partial blocking of NMDA receptors restricts plastic changes in adult mouse barrel cortex, *Behav. Brain Res.* 66 (1995) 207–216.
 - Kandel ER, Schwartz JH and Jessell TM. Principles of neural science. 4th Edition. McGraw-Hill. 2000
 - Katz LC, Shatz CJ. Synaptic activity and the construction of cortical circuits. *Science.* 1996 Nov 15; 274(5290):once33-8.
 - Kirifides M.L, Simpson K.L, Lin R.C, Waterhouse B.D, Topographic organization and neurochemical identity of dorsal raphe neurons that project to the trigeminal somatosensory pathway in the rat. *J Comp Neurol.* 2001 Jul 2;435(3):325-40.

- Lauder JM, Schambra UB. Morphogenetic roles of acetylcholine. *Environ Health Perspect.* 1999 Feb;107 Suppl 1:65-9
- Lauder JM, Ontogeny of the serotonergic system in the rat:serotonin as a developmental signal. *Ann N Y Acad Sci.* 1990;600:297-313; discussion 314
- Lavdas.A.A, Blue M.E, Lincoln J. and Parnavelas J. G., Serotonin promotes the differentiation of glutamate neurons in organotypic slice cultures of the developing cerebral cortex. *J. of Neurosci.* (1997) 17(20):7872-7880
- Lebrand C, Cases. O, Adelbrecht, C. Doye, A. Alvarez C, El Mestikawy S, Seif I. Gaspar P. Transient uptake and storage of. serotonin in developing thalamic neurons, *Neuron* 17 (1996) 823–
- Leslie M.J, Bennett-Clarke C.A, Rhoades R.W, Serotonin-1B receptors for a transient vibrissa-related pattern in the primary somatosensory cortex of the developing rat, *Dev. Brain. Res.* 69 (1992) 143–148.
- Lieske V, Bennett-Clarke CA, Rhoades RW. Effects of serotonin on neurite outgrowth from thalamic neurons in vitro. *Neuroscience.* 1999 Mar;90(3):967-74.
- Lyckman AW, Jhaveri S, Feldheim DA, Vanderhaeghen P, Flanagan JG, Sur M. Enhanced plasticity of retinothalamic projections in an ephrin-A2/A5 double mutant. *J Neurosci.* 2001 Oct 1;21(19):7684-90.
- Mann F, Peuckert C, Dehner F, Zhou R, Bolz J. Ephrins regulate the formation of terminal axonal arbors during the development of thalamocortical projections. *Development.* 2002 Aug;129(16):3945-55
- Mansour-Robaey S, Mechawar N, Radja F, Beaulieu C, Descarries L, Quantified distribution of serotonin transporter and receptors during the postnatal development of the rat barrel field *Dev. Brain Res.* 107 (1998) 159–163.
- McCasland JS, Woolsey TA. High-resolution 2-deoxyglucose mapping of functional cortical columns in mouse barrel cortex. *J Comp Neurol.* 1988 Dec 22;278(4):555-69
- Paxinos G. The rat nervous system. 2nd edition. Academic Press. USA (1995)
- Persico AM, Altamura C, Calia E, Puglisi-Allegra S, Ventura R, Lucchese F, Keller F. Serotonin depletion and barrel cortex development: impact of growth impairment vs. serotonin effects on thalamocortical endings. *Cereb Cortex.* 2000 Feb;10(2):181-91
- Rauschecker JP, Tian B, Korte M, Egert U. Crossmodal changes in the somatosensory vibrissa/barrel system of visually deprived animals. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1992 Jun 1;89(once):5063-7.
- Rice FL, Van der Loos H. Development of the barrels and barrel field in the somatosensory cortex of the mouse. *J Comp Neurol.* 1977 Feb 15;171(4):545-60.
- Riddle D, Richards A, Zsuppan F, Purves D. (1992) Growth of the rat somatic sensory cortex and its constituent parts during postnatal development. *J. Neurosci.* 12: 3509-3524.

- Salichon N, Gaspar P, Upton AL, Picaud S, Hanoun N, Hamon M, De Maeyer E, Murphy DL, Mossner R, Lesch KP, Hen R, Seif I. 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*. 2001 Feb 1;21(3):884-96.
 - Schlaggar BL, Fox K, O'Leary DD. Postsynaptic control of plasticity in developing somatosensory cortex. *Nature*. 1993 Aug 12;364(6438):623-6
 - Segal I, Korkotian I, Murphy DD. Dendritic spine formation and pruning: common cellular mechanisms? *Trends Neurosci*. 2000 Feb;23(2):53-7.
 - Shatz CJ. Impulse activity and the patterning of connections during CNS development. *Neuron*. 1990 Dec;5(6):745-56
 - Sieber-Blum M, Ito K, Richardson MK, Langtimmm CJ, Duff RS. Distribution of pluripotent neural crest cells in the embryo and the role of brain-derived neurotrophic factor in the commitment to the primary sensory neuron lineage *J Neurobiol*. 1993 Feb;24(2):173-84
 - Turlejski K, Djavadian RL, Kossut M. Neonatal serotonin depletion modifies development but not plasticity in rat barrel cortex. *Neuroreport*. 1997 May 27;8(8):1823-8
 - Vitalis T, Cases O, Callebert J, Launay J, Price J, Seif I, Gaspar P, Effect of monoamine oxidase A inhibition on barrel formation in the mouse somatosensory cortex: determination of a sensitive period, *J. Comp. Neurol*. 393 (1998) 169–184.
 - Woolsey TA, Welker C, Schwartz RH. Anatomical studies of the SmL face cortex with special reference to the occurrence of "barrels" in layer IV. *J Comp Neurol*. 1975 Nov 1;164(1):79-94
 - Young-Davies C.L, Bennett-Clarke C.A, Lane R.D, Rhoades R.W, Neonatal administration of clorgyline elevates cortical serotonin levels and alters the size of vibrissae-related thalamocortical afferents, *Soc. Neurosci. Abst.* 24 (1998) 1533.
 - Young-Davies CL, Bennett-Clarke CA, Lane RD, Rhoades RW. Selective facilitation of the serotonin(1B) receptor causes disorganization of thalamic afferents and barrels in somatosensory cortex of rat. *J Comp Neurol*. 2000 Sep once;425(1):130-8.
 - Yuste R, Sur M Development and plasticity of the cerebral cortex: from molecules to maps. *J Neurobiol*. 1999 Oct;41(1):1-6
- Bennett-Clarke CA, Leslie MJ, Chiaia NL, Rhoades Serotonin 1B receptors in the developing somatosensory and visual cortices are located on thalamocortical axons. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1993 Jan 1;90(1):153-7.
- Zepeda A., Vaca L., Arias C. and Sengpiel F. (2002) Reorganization of visual cortical maps after focal ischemic lesions. *J Cer Blood Flow and Metab* (aceptado).