

ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA



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.



LICENCIATURA EN INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA BÁSICA
Coordinación

Dr. José Narro Robles
Director de la Facultad de Medicina. UNAM
Presente

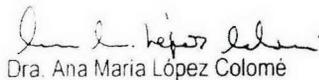
Por este conducto le informamos que la tesis " Reorganización axonal en la plasticidad de la corteza somatosensorial en respuesta a la pérdida visual ", que presenta la alumna: **Jessica Alejandra Guzmán López**, reúne ampliamente los requisitos de una tesis de la Licenciatura en Investigación Biomédica Básica. Por lo tanto los suscritos miembros del Jurado otorgamos nuestro voto aprobatorio para que sea presentada en examen oral.



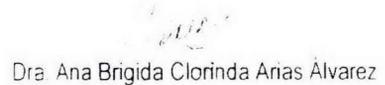
Dr. Alfonso Escobar Izquierdo.



Dr. Gabriel Gutiérrez Ospina



Dra. Ana Maria López Colomé



Dra. Ana Brigida Clorinda Arias Álvarez



Dr. Julid Eduardo Morán Andrade

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo recepcional.

NOMBRE: JESSICA ALEJANDRA
GUZMÁN LÓPEZ

FECHA: 23 JUNIO 2004

FIRMA: 

Esta tesis fue realizada bajo la dirección del Dr. Gabriel Gutiérrez Ospina, en el Instituto de Investigaciones Biomédicas de la Universidad Autónoma de México, con el apoyo financiero de los donativos del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (38615N y J28035N) y el Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (IX232604)

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México

Al Instituto de Investigaciones Biomédicas, Instituto de Fisiología Celular y Facultad de Medicina

Al Dr. Gabriel Gutiérrez Ospina por la transmisión de su conocimiento y por todo el aprendizaje proporcionado en su grupo de investigación.

A los integrantes de mi Jurado por la lectura y comentarios de este trabajo:

Dr. Alfonso Escobar Izquierdo
Dra. Ana María López Colomé
Dr. Gabriel Gutiérrez Ospina
Dra. Ana Clorinda Arias
Dr. Julio Morán Andrade.

A mis tutores durante la carrera y a sus grupos de investigación por la enseñanza personal y académica: Dr. Luis Vaca Domínguez, Dr. Antonio Peña, Dr. Jorge Ramírez Salcedo, Dra. Imelda López y Dr. Gabriel Gutiérrez Ospina.

Al personal de la biblioteca del Instituto de Investigaciones Biomédicas, Marta Carriño y Rebeca Ramírez; de manera especial a María Petra Muñoz García por todo el apoyo bibliográfico.

Al personal del Departamento de Biología Celular y Fisiología, en especial a Isabel Reyes Hernández por la inigualable ayuda proporcionada en todo momento.

Al personal del bioterio del Instituto de Investigaciones Biomédicas, Adolfo Herrera Juárez y Gerardo Arrellin por el valioso apoyo en el cuidado de los animales de experimentación.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México

Al Instituto de Investigaciones Biomédicas, Instituto de Fisiología Celular y Facultad de Medicina

Al Dr. Gabriel Gutiérrez Ospina por la transmisión de su conocimiento y por todo el aprendizaje proporcionado en su grupo de investigación.

A los integrantes de mi Jurado por la lectura y comentarios de este trabajo:

Dr. Alfonso Escobar Izquierdo
Dra. Ana María López Colomé
Dr. Gabriel Gutiérrez Ospina
Dra. Ana Clorinda Arias
Dr. Julio Morán Andrade.

A mis tutores durante la carrera y a sus grupos de investigación por la enseñanza personal y académica: Dr. Luis Vaca Domínguez, Dr. Antonio Peña, Dr. Jorge Ramírez Salcedo, Dra. Imelda López y Dr. Gabriel Gutiérrez Ospina.

Al personal de la biblioteca del Instituto de Investigaciones Biomédicas, Marta Carriño y Rebeca Ramírez por el apoyo bibliográfico.

Al personal del Departamento de Biología Celular y Fisiología, en especial a Isabel Reyes Hernández por la inigualable ayuda proporcionada en todo momento.

Al personal del bioterio del Instituto de Investigaciones Biomédicas, Adolfo Herrera Juárez y Gerardo Arrellín por el valioso apoyo en el cuidado de los animales de experimentación.

AGRADECIMIENTOS

A mis padres Alejandra y Javier por seguir con su búsqueda incansable y por la herencia de vida que me han proporcionado.

A mis hermanos Julio César y Carlos Javier por existir en mi vida.

A mis amigas Miriam Bazán, Yetzi Robles y Citlali Rodríguez. Gracias por su lealtad incondicional y por todos aquellos momentos en los que descubrimos a la vida juntas.

A las NEUROCIENCIAS por que me han proporcionado una forma diferente de entender a la vida y a la evolución del hombre.

A mis compañeros de laboratorio: Paty Padilla, Norma, Pancho, Miguel, Eduardo, Naima, Ivette, Abril, Eileen, Brenda, Luis y Julieta.

INDICE GENERAL

RESUMEN	4
INTRODUCCIÓN	
I. Plasticidad Neuronal	6
II. Generalidades sobre la organización de la vía somatosensorial del nervio del trigémino en los roedores	7
III. Plasticidad Sensoriomodal	11
IV. Proteínas relacionadas al crecimiento axonal (Neurofilamentos-150KDa y GAP-43)	13
JUSTIFICACIÓN	16
HIPOTESIS	16
OBJETIVO	16
MATERIALES Y MÉTODOS	
<i>Animales y Procesamiento de Muestras</i>	17
<i>Enucleación</i>	18
<i>Histoquímica de la enzima Acetilcolinesterasa</i>	18
<i>Expresión de neurofilamentos, GAP-43 y sinaptofisina</i>	19
<i>Marcaje de aferentes tálamo-corticales</i>	19
<i>Número de terminales nerviosas marcadas <u>in vivo</u></i>	20

RESULTADOS

<i>Las aferentes tálamo-corticales ocupan una mayor área cortical en las ratas ciegas.</i>	21
--	----

<i>Las aferentes tálamo-corticales incrementan su complejidad en las ratas ciegas.</i>	21
--	----

<i>El contenido de neurofilamentos-150kDa y GAP-43 aumenta en S1 de las ratas enucleadas.</i>	24
---	----

<i>El contenido de sinaptofisina y el número de terminales disminuye en S1 de ratas ciegas durante el proceso de reorganización axonal.</i>	24
---	----

DISCUSIÓN

<i>Limitaciones del trabajo.</i>	30
--	----

<i>Cambios en el crecimiento axonal y la sinaptogénesis en ratas ciegas.</i>	30
--	----

<i>Participación de las aferentes tálamo-corticales en la plasticidad sensorimodal de S1.</i>	32
---	----

<i>La expansión de los barriles procede a través de mecanismos "constructivistas".</i>	33
--	----

<i>Heterogeneidad de la respuesta plástica de los barriles del PMBSF.</i>	34
---	----

<i>La reorganización axonal podría explicar la distribución diferencial del espacio cortical de las áreas corticales durante la evolución cerebral</i>	34
--	----

CONCLUSIONES.	36
--------------------------------	----

BIBLIOGRAFÍA	37
-------------------------------	----

ABREVIATURAS

Di	1,1'-dioctadecyl-3,3,3''-tetramethylindocarcocyanina perclorato
DP	Días Posnatales
FM1-43	<i>N</i> -(3-triethylammoniumpropyl)-4-(<i>p</i> -dibutylaminostyryl)pyridinium dibromuro
GAP-43	Growth Associated Protein-43 / Proteína Asociada al Crecimiento-43
kDa	KiloDaltones
PMBSF	Posteromedial Barrel Subfield / Subcampo de Barriles Posteromedial
S1	Corteza Somatosensorial Primaria

RESUMEN

En los mamíferos, la pérdida de la visión durante el desarrollo temprano conduce a una reorganización anatómico-funcional (i.e., plasticidad sensoriomodal) de las diferentes áreas sensoriales primarias que constituyen a la corteza cerebral. Como resultado de esta reorganización, por un lado, las neuronas localizadas en el área cortical, anteriormente dedicada a procesar información visual, adquieren la capacidad de responder a estímulos táctiles y auditivos. Por otro lado, las áreas somatosensorial (S1) y auditiva primarias que reciben información desde los órganos sensoriales intactos, tienden a expandirse funcionalmente. Hasta el momento, se desconoce el substrato anatómico que conduce a la expansión de las áreas S1 y auditiva en animales ciegos desde el nacimiento.

No obstante, se ha reportado que las neuronas piramidales localizadas en la corteza auditiva poseen un mayor número de espinas dendríticas en ratas adultas enucleadas desde el nacimiento, al ser comparadas con las de ratas controles de la misma edad (Ryugo et al., 1975). Esto sugiere que la expansión de las cortezas S1 y auditiva primarias en ratas ciegas podría reflejar, al menos en parte, el crecimiento exacerbado de los procesos axonales y dendríticos en los animales ciegos. En apoyo a esta posibilidad, en el presente trabajo encontramos que el área de distribución de los axones tálamo-corticales somatosensoriales, estimada con la ayuda de la reacción histoquímica para la enzima acetilcolinesterasa, es mayor en ratas enucleadas desde el nacimiento que en ratas control hacia los 10 días de vida postnatal. En coincidencia con lo anterior, las reconstrucciones de axones individuales teñidos con Dil mostraron un aumento significativo en el área y longitud totales de los axones tálamo-corticales somatosensoriales en las ratas enucleadas.

Además, encontramos que, el contenido de GAP-43 y neurofilamentos-150kDa, ambas proteínas asociadas al crecimiento axonal, tiende a incrementar en la región S1 de las ratas ciegas durante la primera semana de vida. En contraste, tanto el contenido de sinaptofisina como el número de terminales nerviosas marcadas *in vivo* con FM1-43, mostraron un decremento en S1 de las ratas ciegas durante los primeros días de vida posnatal.

En conjunto estos resultados sugieren: **1)** que la expansión de S1 observada en ratas ciegas desde el nacimiento, es en parte, el resultado de un proceso de crecimiento exacerbado de las aferentes tálamo-corticales durante los 10 primeros días de vida posnatal; **y 2)** que hay un retraso en el proceso de sinaptogénesis en S1 de las ratas ciegas, probablemente debida a un aumento en la duración del período de crecimiento axonal.

ANTECEDENTES

I. Plasticidad Neuronal

En años recientes se ha mostrado que la neocorteza de los mamíferos contiene una red conformada por innumerables procesos nerviosos y conexiones que continuamente se reorganizan estructural-, espacial- y funcionalmente. Se cree que esta capacidad de reorganización, también referida como plasticidad, subyace a fenómenos complejos tales como el aprendizaje, la memoria, la regeneración neuronal y la compensación funcional neuronal que ocurre en respuesta a lesiones nerviosas (Merzenich et al., 1984; Buonomano y Merzenich, 1998; Purves y Lichtman, 1983).

No obstante la abundante evidencia que documenta y sugiere algunos mecanismos de plasticidad neuronal, aún carecemos de modelos generales, con capacidad de predicción, que establezcan las interacciones precisas entre los distintos niveles de organización durante una respuesta plástica cerebral. En este contexto, pensamos que modelos experimentales que se asocian a la reorganización cortical masiva en respuesta a la denervación cutánea selectiva, a la amputación de extremidades y/o dígitos, o a la pérdida temprana de un órgano de los sentidos pudieran ser de gran utilidad en la búsqueda de factores e interacciones que permitan establecer los mecanismos que modulan a la plasticidad neuronal.

El presente trabajo constituye un esfuerzo hacia la elaboración de un modelo general que explique la plasticidad cortical en el cerebro de los mamíferos. Utilizando ratas encefalicadas al nacimiento, mostramos que el crecimiento de los axones tálamo-corticales está acelerado y al parecer exacerbado durante la primera semana de vida. Esto nos sugiere que el proceso de plasticidad cortical en individuos ciegos es producto, en cierto grado, de modificaciones en los procesos de crecimiento axonal.

Si bien este hecho podría considerarse poco novedoso, las observaciones presentadas a lo largo de la tesis, en combinación con otros hallazgos de nuestro y otros laboratorios, sugieren que la modificación del crecimiento axonal observada en las ratas ciegas no es atribuible al incremento en los niveles de actividad neuronal asociada al uso de los mecanorreceptores intactos. Esto constituye un punto distintivo de nuestro trabajo puesto que, durante mucho tiempo se ha sostenido que la experiencia sensorial promueve la elaboración de los circuitos neuronales y el crecimiento cortical (Bronchti *et al.*, 1992; Rauschecker *et al.*, 1992; Pascual-Leone *et al.*, 1999; Rauschecker, 1995, 1999, 2001; Zheng y Purves, 1995; Sathian, 2000; Kujala *et al.*, 2000; Bavelier y Neville, 2002). En la siguiente parte presentaremos información pertinente que permitirá al lector tener una idea más clara a cerca del proyecto desarrollado en la presente tesis.

II. Generalidades sobre la organización de la vía somatosensorial del nervio del trigémino en los roedores

La corteza somatosensorial primaria (S1), que recibe la información conducida por la vía del nervio del trigémino en los roedores, ha sido utilizada frecuentemente como modelo para evaluar la respuesta plástica en el sistema nervioso de los mamíferos. Esto se debe a que en la capa IV de S1 existe una representación del cuerpo organizada en módulos denominados barriles (Woolsey y Van der Loos, 1970). Cada uno de estos barriles representan colecciones discretas de mecanorreceptores distribuidos bajo la piel (**Fig. 1**).

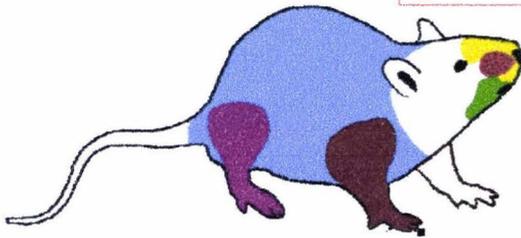
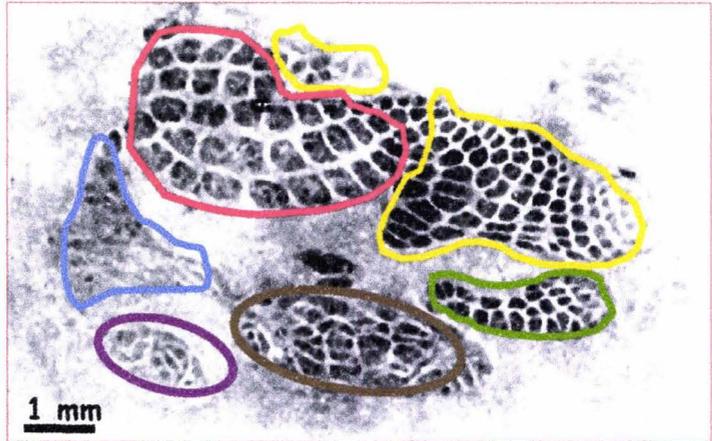
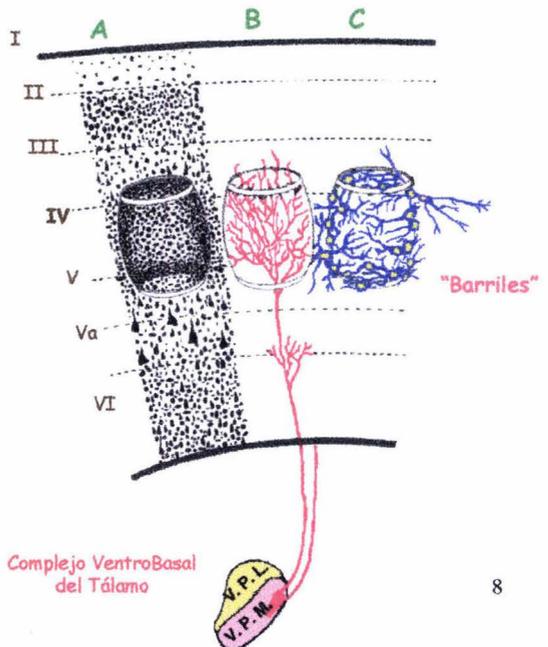


Fig. 1 Corteza Somatosensorial Primaria en roedores. Los grupos de mecanorreceptores distribuidos en las diferentes partes del cuerpo en la rata, mantienen una representación modular de "barriles" a través de la corteza somatosensorial primaria. Los barriles que se delinean en **morado** representan a los mecanorreceptores de la pata posterior; los delineados en **café** a los de la pata anterior; en **verde** se representan a los de la mandíbula inferior; en **amarillo** a los de la mandíbula superior; y en **rojo** se representa a los mecanorreceptores localizados en las vibrissas faciales de la rata. (Modificado de Woosley y Van der Loos, 1970)

Fig. 2 Arquitectura de lámina IV de la Corteza Somatosensorial Primaria. Los barriles poseen una mayor densidad celular en lámina IV (A), y se encuentran conformados principalmente por axones provenientes del complejo ventrobasal del tálamo (B) y por agregados de neuronas estelares espinosas (C). Los cuerpos celulares de las neuronas estelares espinosas delimitan los bordes de cada barril al orientar sus dendritas al centro de los mismos. Estas dendritas contactan con múltiples axones provenientes de los núcleos que constituyen al complejo ventrobasal del tálamo. (Modificado de Paxinos, 1995)



Los barriles se encuentran conformados por agregados de células estelares espinosas, aferentes tálamo-corticales provenientes de los núcleos del complejo ventrobasal y por un número reducido de interneuronas, células gliales y vasos sanguíneos (Paxinos, 1995). En general, los cuerpos celulares de las neuronas estelares espinosas definen las paredes de cada barril y orientan sus dendritas al centro de los mismos. Estas dendritas contactan múltiples axones provenientes del núcleo ventroposteromedial del tálamo (**Fig. 2**).

Alrededor de 200 barriles constituyen la representación completa del cuerpo en S1. De entre ellos, los barriles que ocupan el mayor porcentaje del área de S1 son los que representan a los mecanorreceptores localizados en la base de las vibrisas faciales (Riddle et al., 1992). Estos barriles se localizan en la región más posterior de la parte media en S1 por lo que se denominan barriles del subcampo posteromedial (PMBSF por sus siglas en inglés; Woolsey y Van der Loos, 1970). Su organización refleja exactamente el arreglo anatómico que las vibrisas faciales. Así, existen cinco hileras de barriles denominadas A, B, C, D, y E, las cuales a su vez, son enumeradas en filas de 4 a 7 barriles cada una. Esta distribución permite ubicar exactamente a barriles específicos dentro de la organización del PMBSF y correlacionarlos con la vibrisa a la que representan en el belfo de la rata (**Fig. 3**).

Finalmente, cabe mencionar que la organización modular en esta vía nerviosa no es exclusiva de S1, dicha organización se observa también a nivel del tallo cerebral en los núcleos del nervio trigémino en donde los módulos se denominan barreletas y en el núcleo ventroposteromedial del tálamo en donde se les refiere como barreloides (**Fig. 4**). Es a través de esta vía que los roedores definen las características físicas de los estímulos táctiles aplicados o detectados en las vibrisas faciales (O'Leary, 1994; Petersen y Sakmann, 2001).

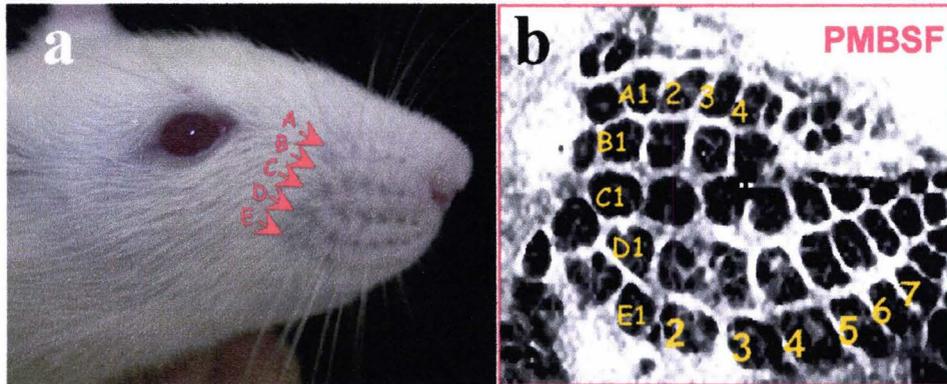


Fig. 3 Distribución anatómica de las vibrisas faciales y su relación con su representación cortical en lámina IV de la Corteza Somatosensorial. (a) Fotografía que muestra a las vibrisas en el belfo de la rata. Note las cinco hileras denominadas A, B, C, D y E. **(b)** La representación de las vibrisas faciales en la corteza somatosensorial primaria esta formada por módulos celulares denominados barriles. Los barriles se organizan de acuerdo a la distribución anatómica de los bigotes faciales distribuyéndose así en cinco hileras denominadas A, B, C, D, y E. Cada vibrisa-barril se enumera en filas comenzando en la región más posterior del PMBSF o Subcampo de Barriles Posteromedial. (Modificado Martínez, 2004)

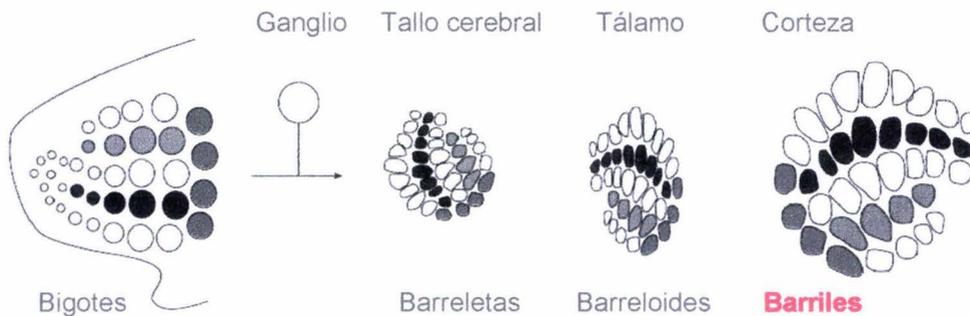


Fig. 4 Esquema que ilustra la vía somatosensorial del nervio del trigémino. Las vibrisas en el belfo de la rata son inervadas por neuronas pseudounipolares localizadas en el ganglio del nervio del trigémino. Los bigotes son representados a lo largo de la vía del trigémino por módulos neuronales que conservan la misma distribución anatómica que se observa en el belfo de la rata. Las neuronas del ganglio hacen sinapsis con neuronas localizadas en los módulos (barreletas) en el tallo cerebral. Las neuronas del tallo contactan a núcleos específicos (barreloides) en el tálamo. La capa IV de la corteza somatosensorial es inervada por las aferentes tálamo-corticales, dando lugar a los **barriles**. (Modificado de O'Leary DM, 1994)

III. Plasticidad Sensoriomodal

La pérdida de la visión durante el desarrollo temprano, e incluso en la vida adulta, conduce a una reorganización anatómico-funcional de la corteza cerebral conocida con el nombre de *plasticidad sensoriomodal* (Fig. 5). Como resultado de este proceso de reorganización, las neuronas localizadas en el área cortical, anteriormente dedicada a procesar información visual, adquieren la capacidad de responder a estímulos táctiles y auditivos. Además, S1 y la corteza auditiva primaria que reciben información desde los órganos sensoriales presumiblemente intactos se expanden (Bavelier 2002). Trabajos previos han reportado que, en promedio, la expansión de los barriles del PMBSF en animales ciegos adultos que fueron cegados desde el nacimiento alcanza un 16% (Fig. 6) (Bronchti et al., 1992; Rauschecker et al., 1992; Zheng y Purves, 1995; Toldi et al., 1994; Geovannini, 2001). No obstante estos resultados, los mecanismos celulares que subyacen a la expansión de los barriles en S1 no son del todo claros.

Se ha sugerido, sin embargo, que la expansión es el resultado del incremento en el tamaño de las neuronas corticales, y en la densidad del neuropilo de los barriles (Rauschecker et al., 1992). Hasta el momento no existe evidencia experimental que sustente alguna de estas ideas. Debido a que un porcentaje significativo del neuropilo de los barriles lo constituyen las sinapsis que se establecen entre los axones tálamo-corticales y las dendritas de las neuronas estelares espinosas, en el presente trabajo decidimos evaluar si alteraciones del crecimiento de los axones talámicos pudieran subyacer a la expansión de los barriles de S1 en respuesta a la pérdida de la visión al nacimiento.

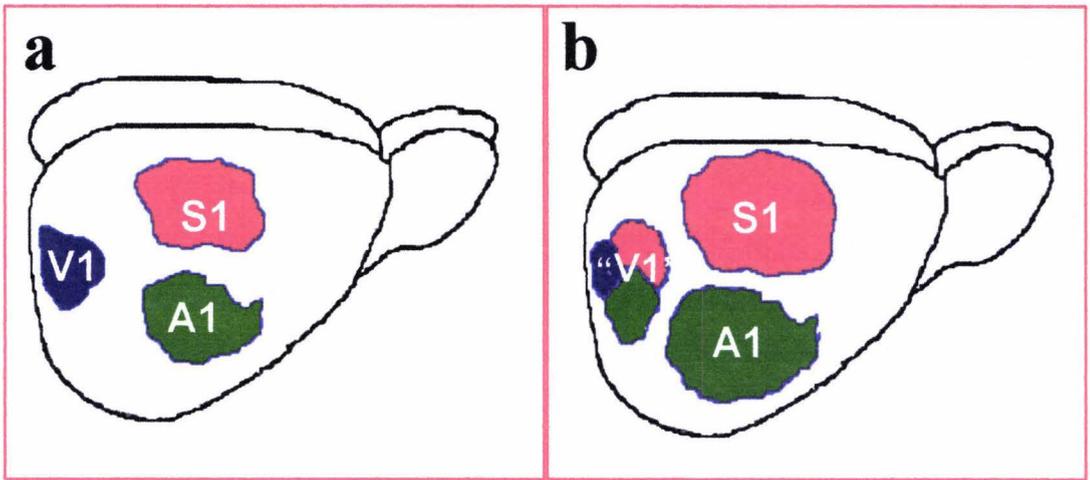


Fig. 5 Plasticidad Sensoriomodal. Esquemas que ilustran la reorganización de las áreas sensoriales primarias somatosensorial (S1), auditiva (A1) y visual (V1) en cerebros de ratas control (a) y enceguecidas al nacimiento (b). La pérdida de la visión conduce a una expansión de S1 y A1, acompañada de una reactivación del área “V1” por aferentes neuronales asociadas a las vías somatosensorial y auditiva. Los mecanismos celulares y moleculares que son los responsables de promover y modular estos cambios plásticos son aún poco claros.

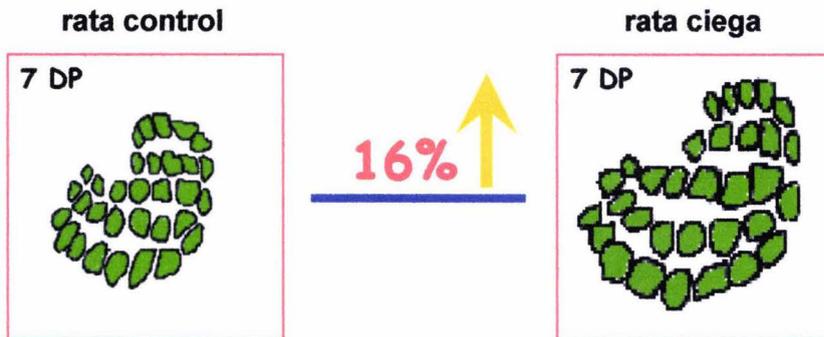


Fig. 6 Expansión en el PMBSF en ratas ciegas. Esquema que ilustra la expansión de los barriles en la corteza somatosensorial en los cerebros de ratas ciegas a los 7 días de vida posnatal. La expansión en el mapa somatosensorial llega a ser del 16% al comparar el área promedio de los barriles a través del PMBSF de ratas control y ciegas.

Así mismo, debido a que en trabajos previos realizados en el laboratorio se mostró que estos cambios ocurren durante el periodo de formación de los barriles que transcurre durante los primeros siete días de vida, y no son el resultado de la expansión progresiva a lo largo del desarrollo postnatal, nuestro estudio se concentró en los primeros diez días que siguen al nacimiento (Geovannini, 2001).

Además, en contra de la concepción tradicional (Bronchi *et al.*, 1992; Rauschecker *et al.*, 1992; Pacual-Leone *et al.*, 1999; Rauschecker, 1995, 1999, 2001; Zheng y Purves, 1995; Sathian, 2000; Kujala *et al.*, 2000; Bavelier y Neville, 2002), hemos mostrado que la expansión de los barriles ocurre de manera independiente de los niveles de la actividad neuronal que se asocia al uso de los mecanorreceptores (Geovannini, 2001)

IV. Proteínas relacionadas al crecimiento axonal

Neurofilamentos 150kDa. Los neurofilamentos son proteínas del citoesqueleto neuronal que constituyen a los denominados filamentos intermedios. Estas proteínas filamentosas tienen un diámetro de entre 8 a 10nm y se anclan a una red submembranal de actina y a los microtúbulos. Los neurofilamentos representan a una familia de heteropolímeros de proteínas conformados por la subunidad ligera de 69kDa, la subunidad mediana de 150kDa y la subunidad pesada de 200kDa. Estas subunidades se estabilizan por anclajes formados por las proteínas periferina e internexina. Se ha propuesto que los neurofilamentos, y en general los filamentos intermedios, proveen a las neuronas de estabilidad estructural, además de servir de rieles que guían el transporte de organelos a través del citoplasma somático, dendrítico y axonal (Thomas, 2001).

Durante el desarrollo temprano, las neuronas requieren de un citoesqueleto dinámico que les permita crecer, migrar y extender procesos de manera activa. Estas propiedades dependen, en parte, de la presencia de neurofilamentos de 69kDa y 150kDa. Una vez que la neurona ha alcanzado su forma adulta, los neurofilamentos de 69kDa y 150kDa son substituidos por aquellos de 200kDa (Philip, 2000). Los neurofilamentos de 150kDa se sintetizan en el soma y son transportados preferentemente a los axones en desarrollo (Jean-Pierre, 2003). Esta isoforma de neurofilamentos de 150kDa contribuye de manera importante a la elongación, regeneración y reorganización axonal durante el desarrollo normal y en respuesta a procesos que desencadenan eventos de plasticidad en los circuitos neuronales (King, 2001). Finalmente, alteraciones en la fosforilación y consecuente agregación de los neurofilamentos se han observado en diversas patologías neurodegenerativas (Takahiro, 2000).

Proteína asociada al crecimiento – 43 (GAP-43). La proteína GAP-43 (también denominada FI, B-50, pp46, p57 o neuromodulina) es una proteína de membrana, localizada principalmente en los conos de crecimiento axonal. Se cree que GAP-43 puede estimular el intercambio GDP-GTP de la subunidad alfa de proteínas triméricas Go o Gi y transducir a través de este mecanismo intracelular los estímulos extracelulares que modulan la organización del citoesqueleto de las terminales nerviosas (Benowitz, 1997). La expresión de GAP-43 aumenta a lo largo del desarrollo hasta el término del proceso de sinaptogénesis. Niveles elevados en la expresión de esta proteína se asocian con un mayor crecimiento y elongación de los procesos axonales durante el desarrollo normal (Benowitz, 1997). Aunque la expresión de GAP-43 declina drásticamente en la edad adulta en la mayoría de las regiones cerebrales, aquellas regiones que se mantienen plásticas como son la corteza de asociación, el bulbo olfatorio y el hipocampo mantienen niveles elevados de expresión de GAP-43. También se ha mostrado que la expresión de

GAP-43 se incrementa drásticamente durante procesos de regeneración axonal en el sistema nervioso central y periférico (Li, 1996).

En la corteza somatosensorial primaria de roedores se ha documentado la existencia de niveles elevados de expresión de GAP-43 en los conos de crecimiento axonales durante la primera semana de vida postnatal (Kay, 2002). La delección genómica de GAP-43 altera la segregación normal de las aferentes tálamo-corticales en la corteza somatosensorial (Maier et al., 1999), y además GAP-43 participa en los procesos de reorganización cortical consecutiva a lesiones de las vibrisas faciales en la rata adulta (Dunn-Meynell et al., 1992).

JUSTIFICACIÓN

Entender los mecanismos que subyacen a la reorganización cortical observada en los sujetos ciegos puede ayudarnos a proponer nuevas alternativas terapéuticas que faciliten la restauración funcional de la visión utilizando prótesis neurales o fisioterapias encaminadas a la substitución sensorial.

Por otro lado, uno de los elementos que caracterizan a la organización cortical durante el proceso de evolución del cerebro es la redistribución del espacio cortical entre las áreas sensoriales primarias. Pensamos que el modelo animal experimental aquí utilizado podría brindarnos información sobre los posibles mecanismos que pueden haber conducido a la redistribución de las áreas corticales durante la evolución de la neocorteza de los mamíferos.

HIPÓTESIS

La expansión en el mapa somatosensorial resulta por el crecimiento exacerbado de las aferentes tálamo-corticales.

OBJETIVO GENERAL

Evaluar distintos parámetros indicadores de crecimiento axonal en S1 durante la fase de reorganización cortical en ratas ciegas.

Objetivos específicos:

1. Determinar el área de los barriles del PMBSF en los cerebros de ratas control y ratas ciegas a los 10 días de vida postnatal, utilizando técnicas de histoquímica para la enzima acetilcolinesterasa, de reconstrucción bidimensional y análisis digital de imágenes.

2. Determinar el contenido de las proteínas GAP-43, neurofilamentos-150KDa y sinaptofisina en S1 de ratas control y ciegas durante los primeros 10 días de vida mediante ensayos de Western-blot y análisis densitométricos.

3. Determinar la longitud total y el área de arborización de las aferentes tálamo-corticales en barriles del PMBSF en ratas control y ciegas a los 7 días de vida, utilizando técnicas de trazado con Dil, microscopía de fluorescencia, reconstrucción bidimensional y análisis digital de imágenes.

4. Determinar el número y tamaño de las terminales sinápticas localizadas en barriles del PMBSF en rebanadas de corteza cerebral obtenidas de ratas de 7 y 10 días de vida, utilizando FM1-43, microscopía confocal y análisis digital de imágenes.

MATERIALES Y MÉTODOS

Animales y procesamiento de muestras.

Los experimentos se realizaron en ratas Wistar de 2, 5, 7, 10, y 60 días de edad postnatal (DP). El número de crías se ajustó a 4 hembras y 4 machos por camada. De éstas, la mitad de las crías hembra y macho fueron consideradas como animales control y la otra mitad como animales experimentales. El ajuste del número de crías por camada disminuye los efectos del tamaño de la camada y el cuidado maternal diferencial sobre el desarrollo cerebral (Liu et. al., 2000). Todos los animales tuvieron libre acceso a alimentación y agua, y se mantuvieron en cuartos con temperatura e iluminación (ciclo de 12/12) controladas. Las ratas que fueron sacrificadas después de PD30 se destetaron hacia el día 21 postnatal. Para la recolección y procesamiento de muestras, las ratas ciegas y control de diversas edades postnatales fueron anestesiadas con una dosis letal de pentobarbital sódico y se decapitaron. Los cerebros fueron inmediatamente extraídos y en algunos casos S1 disecada. Algunas de las muestras fueron fijadas con paraformaldehído al 4% y otras fueron congeladas en metilbutano a -45°C para su procesamiento posterior.

Enucleación.

La remoción quirúrgica de los ojos se realizó siguiendo los lineamientos de los protocolos descritos por Bronchti *et al.* (1992) y Zheng y Purves (1995). Brevemente, los animales recién nacidos (entre las ocho y diez horas que siguen al nacimiento) se anestesiaron por hipotermia. Se hizo una incisión fina sobre la incisura palpebral superior y, utilizando una pinza fina se removió totalmente el tejido ocular incluyendo a la glándula lacrimal. Después de realizada la enucleación bilateral, los animales se colocaron en una cobija termoregulada a 37°C, y se controló el sangrado producto de la cirugía. Una vez recuperada la temperatura, el color y el movimiento, las crías fueron devueltas a sus madres. Los animales control fueron tratados de la misma manera que los animales experimentales aunque se obvió la cirugía. Este procedimiento quirúrgico se asocia con un porcentaje muy bajo de mortalidad e infecciones.

Histoquímica de la enzima Acetilcolinesterasa.

Hemisferios cerebrales de ratas control y ciegas de 10 días postnatales fueron cortados tangencialmente (50µm) en un criostato a -15°C. Posteriormente, las rebanadas se incubaron toda la noche a temperatura ambiente con una solución que contenía 50mM CH₃COONa₃H₂O, 4mM CuSO₄, 16mM Glicina, 4mM s-Ioduro de Acetilcolina, 85.9nM Etopropacina, utilizada para detectar la actividad de la enzima acetilcolinesterasa. La reacción enzimática fue revelada utilizando una solución al 1% Na₂S₉H₂O durante 5 minutos intensificada durante 3 minutos en una solución de HAuCl₃H₂O al 0.01%. Los cortes que contenían a los barriles del PMBSF fueron colocados en portaobjetos, secados a temperatura ambiente y montados con Cytoseal 60. Posteriormente los cortes seleccionados se fotografiaron en un microscopio estereoscópico equipado con una cámara digital. A partir de las imágenes digitales se realizó la reconstrucción bidimensional de S1 de ratas control y ciegas. Se estimó el área promedio de barriles en ambos grupos experimentales utilizando el programa Scion Image. Las diferencias estadísticas fueron evaluadas utilizando la prueba de t de Student de doble cola con un nivel de significancia de p < 0.05.

Expresión de neurofilamentos 150kDa, GAP-43 y sinaptofisina.

Ratas control y engeguados al nacimiento de 2, 5, 7, 10 y 60 DP fueron anestesiadas y perfundidas con una solución salina isotónica y posteriormente decapitadas. El cerebro fue removido inmediatamente, las cortezas se aplanaron y S1 fue disecada con un

sacabocados y congelada en 2-metilbutano. Las muestras fueron sonicadas en la solución de lisis (100mM NaCl, 10Mm Tris.Cl pH=8, 1Mm PMSF, 1% Tritón, 1 tableta Mini-Free EDTA (Roche) por cada 10ml). Los homogenados se centrifugaron a 14,000 rpm a 4°C 15 minutos, el sobrenadante se recuperó y se cuantificó la proteína. 20µg de proteína total se separaron electroforéticamente en geles SDS-PAGE Tris/glicina y se electrotransfirieron a una membrana de nitrocelulosa a 200mA durante la noche. Las membranas fueron incubadas durante 15hrs en solución de bloqueo y posteriormente se incubaron 3hrs a temperatura ambiente con anticuerpos primarios dirigidos contra GAP-43 (monoclonal IgG-ratón 1:1000), neurofilamentos-150kDa (policlonal IgG-conejo 1:2500), y sinaptofisina (policlonal IgG-conejo 1:2500). Los anticuerpos primarios se visualizaron utilizando anticuerpos secundarios acoplados a biotina utilizando las técnicas de revelado con DAB (Vector) o quimioluminiscencia (Amersham) de acuerdo a las instrucciones de los proveedores. Las membranas reveladas fueron escaneadas y los análisis densitométricos se realizaron en el programa Scion Image. Los valores de densidad óptica de GAP-43, neurofilamentos-150kDa y sinaptofisina se expresan como porcentaje de diferencia con relación a aquella obtenida en las muestras de 60 días. Las diferencias fueron evaluadas utilizando la prueba t de Student de doble cola con un nivel de significancia de $p < .05$.

Marcaje de aferentes tálamo-corticales.

A través de coordenadas estereotáxicas se realizaron inyecciones de 1µl de 1,1'-dioctadecyl-3,3,3'-tetramethylindocarcocyanina perclorato (Dil) al 0.25% en el núcleo ventroposteromedial del tálamo en los cerebros de ratas control y ciegas de 7DP, fijados en 4% paraformaldehído. Previamente se realizaron las inyecciones, siguiendo las coordenadas estereotáxicas en relación de la parte posterior de los bulbos olfatorios, las cuales fueron 6.6mm antero-posterior, 2.5mm lateral y 5.0mm de profundidad. Posteriormente y después de 3 meses de difusión anterógrada a 37°C y en oscuridad total, los cerebros fueron cortados coronalmente en rebanadas de 100µm. Posteriormente, las rebanadas se montaron en portaobjetos y se visualizaron en un microscopio de epifluorescencia Nikon (Ex500nm-Em540nm). Los axones individuales tálamo-corticales que se distribuyen en los barriles del PMBSF fueron seleccionados, dibujados y reconstruidos con ayuda de una cámara lúcida. A partir de las imágenes bidimensionales se cuantificó la longitud total y el área de arborización de los axones en el programa Scion Image. Las diferencias estadísticas fueron evaluadas utilizando la prueba de t de Student de doble cola con un nivel de significancia de $p < .05$.

Número de terminales nerviosas marcadas in vivo

Las ratas control y ciegas de 7DP y 10DP se anestesiaron por hipotermia. Los cerebros fueron extraídos rápidamente y se cortaron coronalmente en un vibratomo en rebanadas de $300\mu\text{m}$. Las rebanadas se incubaron, para fines de estabilización, durante 20 min en líquido cerebroespinal oxigenado (2.5MNaCl, 60mM KCl, 20mM MgCl_2 , 0.5mM NaHCO_3 , 100mM CaCl_2 , 10mM glucosa, 0.5mM tioruea, 0.2mM ácido ascórbico) y luego se incubaron por 5 min. con el marcador de reciclaje vesicular FM1-43 (*N*-(3-triethylammoniumpropyl)-4-(*p*-dibutylaminostyryl)pyridinium dibromuro) en una concentración de $5\mu\text{M}$. Posteriormente, las rebanadas se lavaron en líquido cerebroespinal oxigenado durante 10min, se fijaron en 4% paraformaldehído toda la noche a temperatura ambiente y se montaron en portaobjetos para ser visualizadas en un microscopio confocal Carl Zeiss. Las imágenes fueron capturadas utilizando valores fijos de contraste y ganancia. Estas imágenes fueron utilizadas para determinar el número, tamaño y densidad óptica de las terminales sinápticas a través de segmentar las imágenes con base al tamaño de los elementos histológicos teñidos. El rango considerado fue de entre 0.2 a $1.5\mu\text{m}^2$ de área, lo que corresponde al tamaño de las terminales de S1 determinada en estudios de microscopía electrónica (Sadaka Y, et al., 2003). La cuantificación del número de terminales se realizó en un área de $100\mu\text{m}^2$. Los valores de los parámetros evaluados fueron promediados por experimento, por grupo y por manipulación experimental. Las diferencias fueron analizadas utilizando la prueba de t de Student de doble cola con un nivel de significancia de $p < .05$.

RESULTADOS

Las aferentes tálamo-corticales ocupan una mayor área cortical en las ratas ciegas. La histoquímica para la enzima acetilcolinesterasa es ampliamente utilizada como un marcador de los árboles terminales de los axones tálamo-corticales en S1 (Schlaggar y O'Leary, 1994). Utilizando esta técnica, se estimaron las áreas de los barriles del PMBSF en animales control y enucleados a los 10 DP. Las áreas de los barriles del PMBSF de animales enucleados fueron, en promedio, 35% mayores que aquellas correspondientes en las ratas control (**Fig.7**). La expansión, sin embargo, es heterogénea como se puede observar en la gráfica que se muestra en la **Fig. 8**. Mientras que existen barriles que se expanden significativamente, particularmente aquellos localizados en filas anteriores y posteriores, en otras filas de barriles la magnitud de expansión es menor. Estos resultados sugieren que la expansión de los barriles del PMBSF en el mapa somatosensorial resulta, en parte, de un crecimiento mayor de las aferentes tálamo-corticales. Además nuestras observaciones muestran que no todo los grupos de aferentes tálamo-corticales responden de manera similar durante el proceso de reorganización cortical.

Las aferentes tálamo-corticales incrementan su complejidad en las ratas ciegas. Con el objeto de evaluar posibles cambios en el patrón de crecimiento de las aferentes tálamo-corticales, se analizó la morfología de los árboles terminales de axones individuales en los barriles del PMBSF trazados con Dil. La longitud total de las aferentes tálamo-corticales en ratas ciegas incrementó 77% al ser comparadas con sus contrapartes control (**Fig. 9**). De igual manera, el área ocupada por las aferentes tálamo-corticales en ratas ciegas aumentó 89% (**Fig. 9**). Estos resultados sugieren que los árboles terminales de los axones tálamo-corticales son más elaborados, y ocupan una área mayor, en las ratas enucleadas al nacimiento.

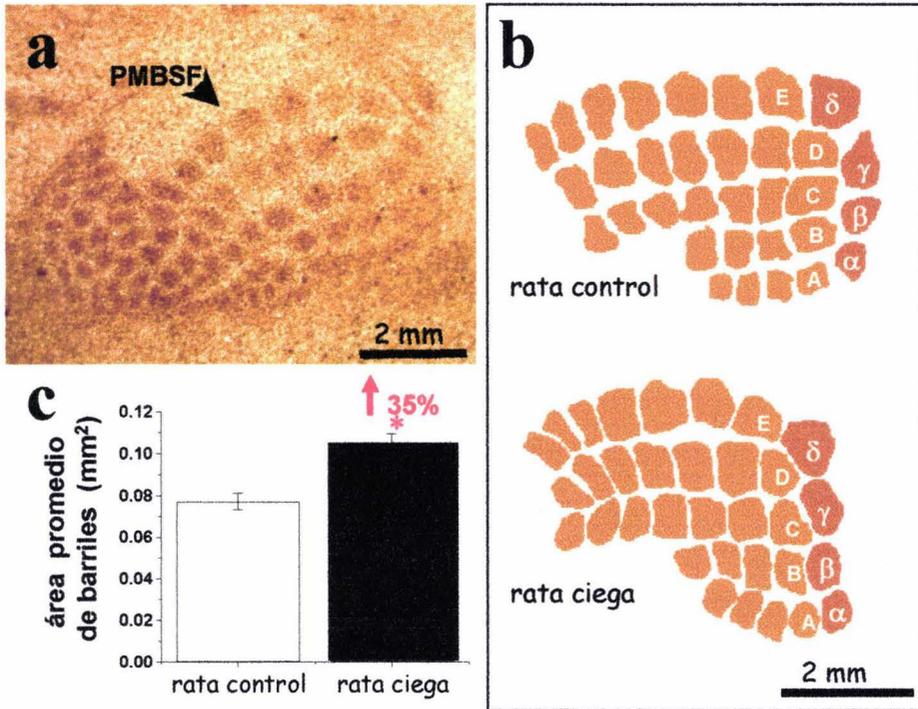


Fig. 7 Evaluación del área de distribución axonal en la región del PMBSF de la corteza somatosneoesorial primaria de ratas control y ciegas. (a) Corte tangencial de 100µm que muestra la topografía axonal de la representación de los barriles faciales que constituyen al PMBSF mediante la histoquímica de la enzima acetilcolinesterasa. (b) Dibujos que representan reconstrucciones bidimensionales completas a través del PMBSF en cerebros de ratas control y ciegas de 10DP. (c) Gráfica en donde se muestra el incremento en el área promedio de los barriles en S1 en cerebros de ratas ciegas en relación a las ratas control. Prueba student t-Test *p<0.05).

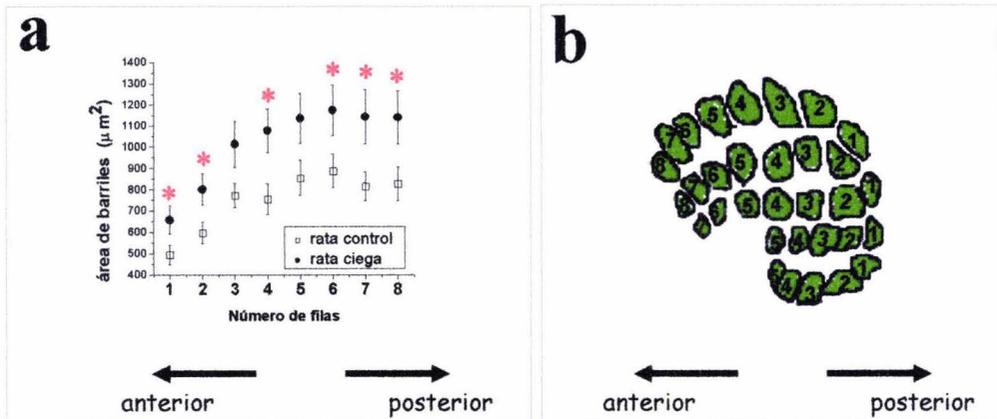


Fig. 8 Evaluación del grado de expansión de los barriles anteriores y posteriores del PMBSF. (a) En la gráfica se presenta el área promedio de los barriles en las filas anteriores y posteriores del PMBSF en ratas control y ciegas. El dibujo en (b) ilustra la distribución en filas de los barriles que fue considerada para la elaboración de la gráfica. Nótese que la magnitud de la expansión de los barriles en las ratas ciegas difiere de acuerdo a la fila que ocupan. Los barriles que se localizan en las filas más anteriores y posteriores muestran un mayor grado de expansión. Prueba student t-Test *p<0.05.

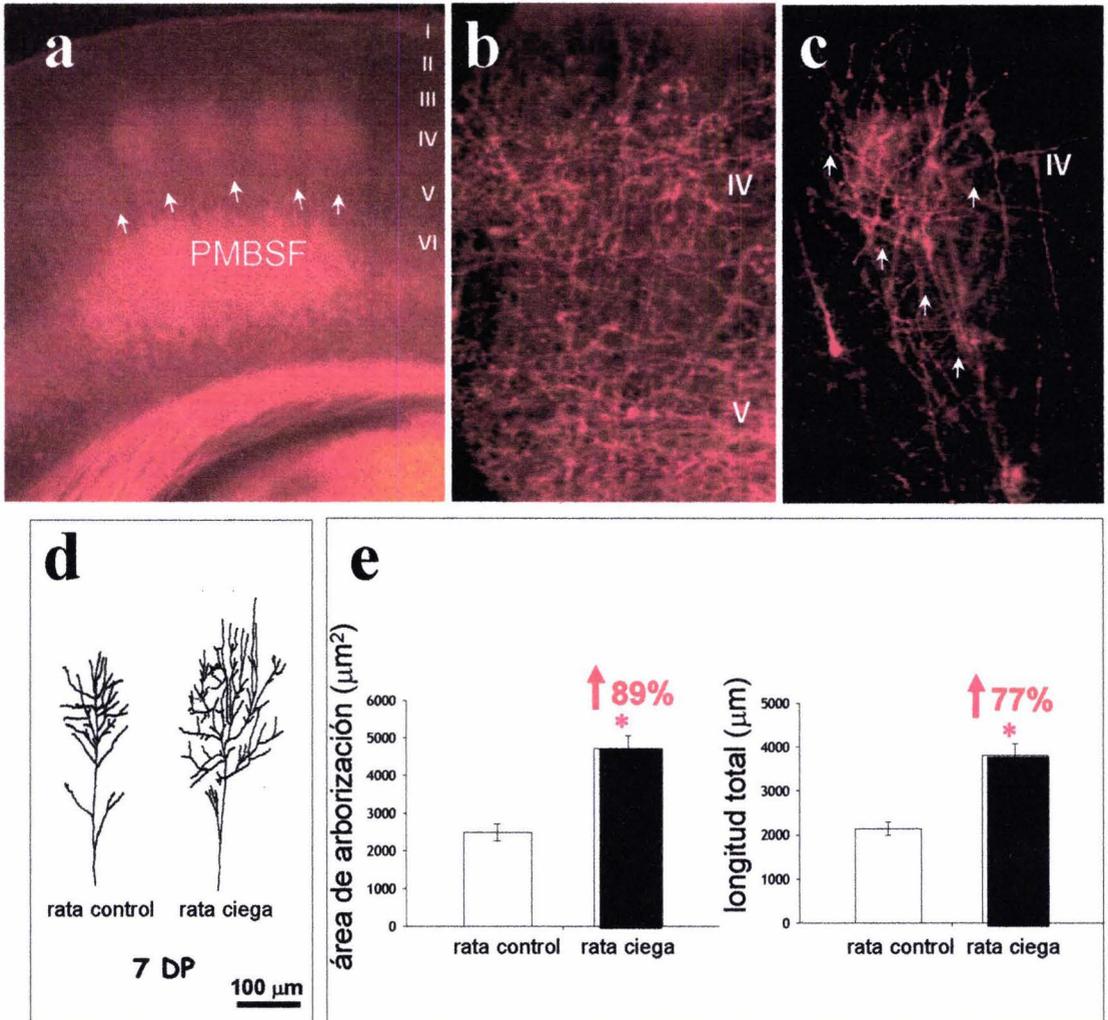


Figura 9. Evaluación de la morfología individual de axones tálamo-corticales en cerebros de ratas control y ciegas mediante el uso del trazador anterógrado Dil. (a) Microfotografía de un corte coronal (grosor de 100 μ m) que ilustra la vía tálamo-cortical y la segregación de las aferentes tálamo-corticales en los barriles en la región del PMBSF (ver flechas). (b) Microfotografía en donde se muestra la arborización de los axones tálamo-corticales en lámina IV distribuidos en la región del PMBSF. (c) Microfotografía de un ejemplo representativo de un axón utilizado para realizar la reconstrucción bidimensional (ver flechas). (d) Dibujos en cámara lucida de axones individuales en los barriles del PMBSF en lámina IV de ratas control y ciegas de 7DP. (e) Gráficas que muestran el incremento en la longitud total y en el área de arborización de las aferentes de ratas ciegas. Prueba Student t-test * $p < 0.00007$.

El contenido de neurofilamentos-150kDa y GAP-43 aumenta en S1 de las ratas enucleadas. Para aportar más evidencia que apoyara que la expansión de los barriles de PMBSF era el resultado de cambios en el proceso de crecimiento axonal, evaluamos las posibles modificaciones en el contenido de GAP-43 y neurofilamentos 150-kDa en S1 de animales control y ciegos de las mismas edades. Como se ilustra en la **Fig. 10**, observamos que el contenido de ambas proteínas tiende a ser mayor en ratas enucleadas con relación a las ratas control. Esta diferencia alcanzó significancia estadística solamente a los siete días de edad para GAP-43. A los 60 días de edad, estas diferencias no se detectaron por lo que los cambios en el contenido de GAP-43 y neurofilamentos-150kDa están restringidos a los primeros días de edad, durante la formación de mapa corporal en S1 (Jensen, et. al. 1987; Criar MC, 1999; Maier et al, 1999; Datwani A, 2002).

El contenido de sinaptofisina y el número de terminales disminuye en S1 de ratas ciegas durante el proceso de reorganización axonal. Con el fin de documentar posibles cambios en el proceso de sinaptogénesis durante la expansión de los barriles en S1, evaluamos el contenido de sinaptofisina en S1 y estimamos el número de terminales en los barriles de PMBSF. En contraste a lo observado con relación al contenido de neurofilamentos-150kDa y GAP-43, el contenido de sinaptofisina en S1 de animales ciegos mostró una tendencia a disminuir al compararse con las ratas control de la misma edad (**Fig. 11**). Esta diferencia alcanzó significancia estadística hacia el día 7 de vida. Sin embargo, la tendencia referida no es permanente pues no existieron diferencias en el contenido de sinaptofisina entre las ratas adultas control y enucleadas a los 60DP.

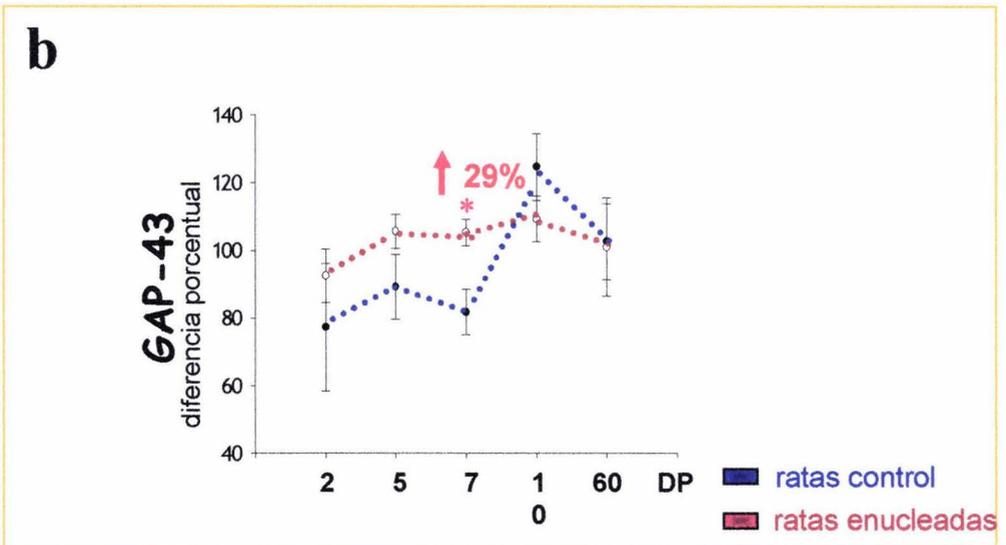
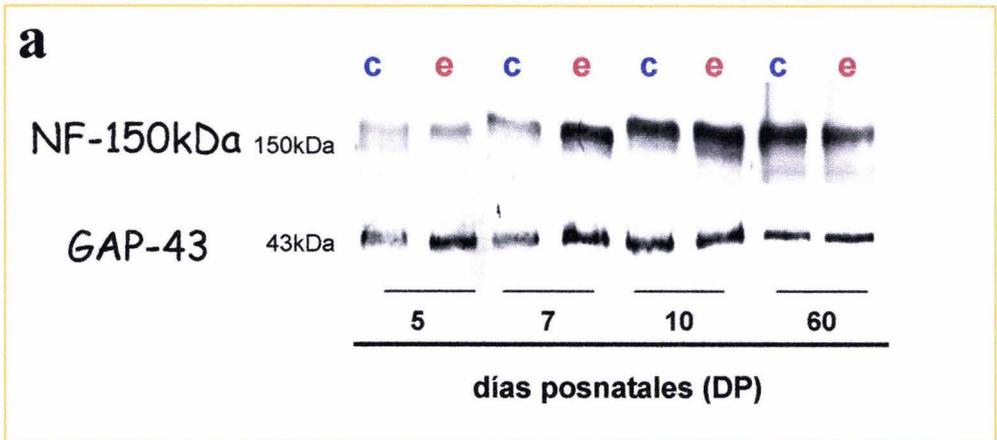


Figura 10. Expresión de GAP-43 y Neurofilamentos-150KDa en la corteza somatosensorial primaria de ratas control y ratas enceguecidas al nacimiento. (a) Las inmunotransferencias muestran que los niveles de expresión de proteínas asociadas al crecimiento axonal como GAP-43 y Neurofilamentos-150KDa se incrementan transitoriamente en S1 de ratas ciegas durante los primeros 10DP. (b) En la gráfica se presenta el valor porcentual-promedio de la diferencia porcentual del valor densitométrico de GAP-43 en S1 a distintas edades normalizadas con respecto a los 60DP de rata control. El contenido de GAP-43 se incrementa significativamente a los 7DP. Prueba student t-Test * $p < 0.021$.

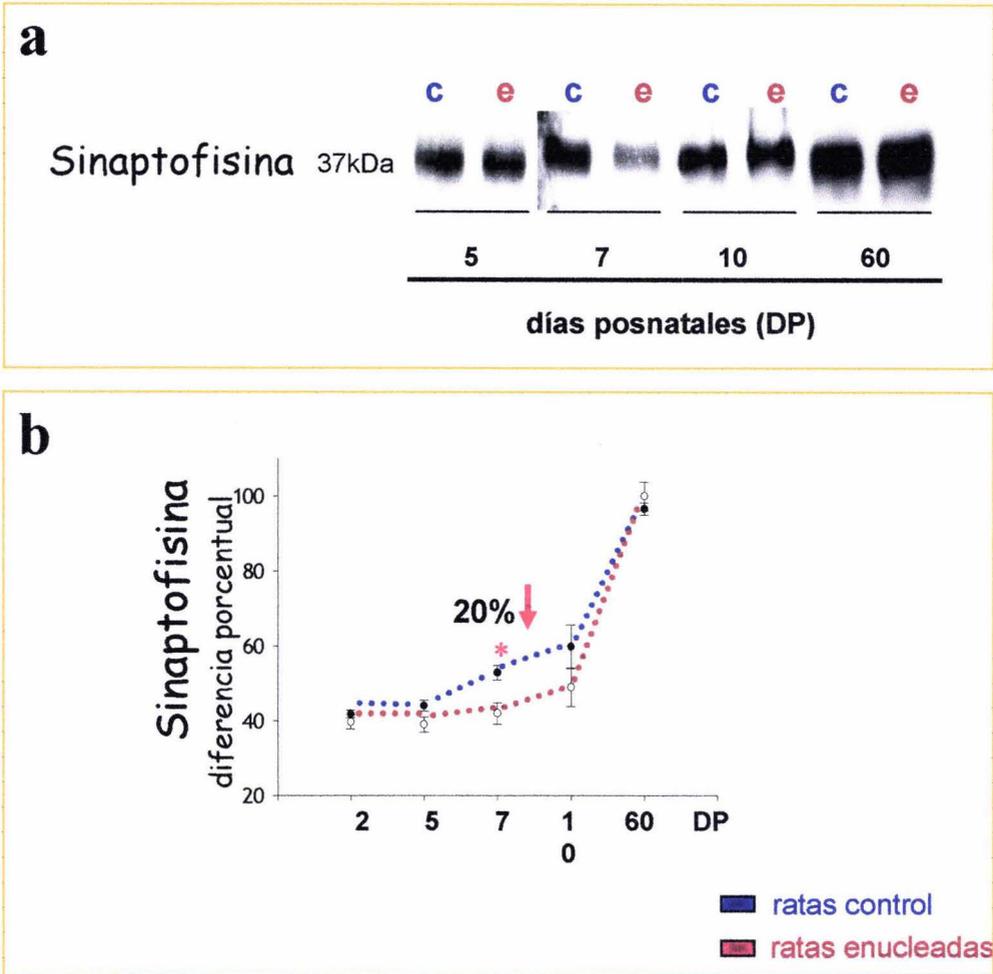


Figura 11. Expresión de Sinaptofisina en la corteza somatosensorial primaria de ratas control y ratas enceguecidas al nacimiento. (a) Las inmunotransferencias muestran la disminución en el contenido de Sinaptofisina, una proteína asociada a vesículas sinápticas. **(b)** En la gráfica se presenta el valor porcentual-promedio de la diferencia porcentual del valor densitométrico de Sinaptofisina en S1 a distintas edades normalizadas con respecto a los 60DP de rata control. La expresión de Sinaptofisina es significativamente menor a los 7DP (* $p < 0.017$) en el cerebro de ratas ciegas.

En concordancia, el número de terminales sinápticas marcadas con FM1-43 en barriles del PMBSF observadas en rebanadas de animales de 7 días de vida, fue menor en el grupo de ratas enucleadas al compararse con el grupo de ratas control (**Fig. 12**). Esta diferencia desaparece a los 10 días de edad. En conjunto los resultados sugieren que existe un retardo, seguido de una aceleración, en el proceso de formación de sinapsis en las ratas ciegas. Es interesante que el retardo parece coincidir con la fase de mayor crecimiento axonal, al menos evaluado por los ensayos de inmunotransferencias.

Por otro lado, debido a que la intensidad promedio de la marca fluorescente con FM1-43 por terminal fue similar al compararse entre ratas control y enucleadas de la misma edad (**Fig. 12**), nuestras observaciones sugieren que aunque menor en número, las terminales nerviosas en los animales enucleados no tienen defectos en sus mecanismos de liberación. La disminución en el contenido de sinaptofisina observada a los PD7, por tanto, debe resultar de la disminución en el número de terminales.

Finalmente, a través de un histograma de frecuencias nos percatamos que la distribución en el área de las terminales en el rango de tamaño de 0.2 a $1.5\mu\text{m}^2$ marcadas con FM1-43 no llega a ser diferente al compararse entre ratas control y ciegas a los 7DP y 10DP (**Fig. 13**). No obstante, es a la edad de 7DP cuando se observa una disminución en el número de las terminales en S1 que presentan un tamaño específico determinado en el rango de 0.2 a $1.5\mu\text{m}^2$ en los cerebros de ratas ciegas al compararse con sus contrapartes control de la misma edad.

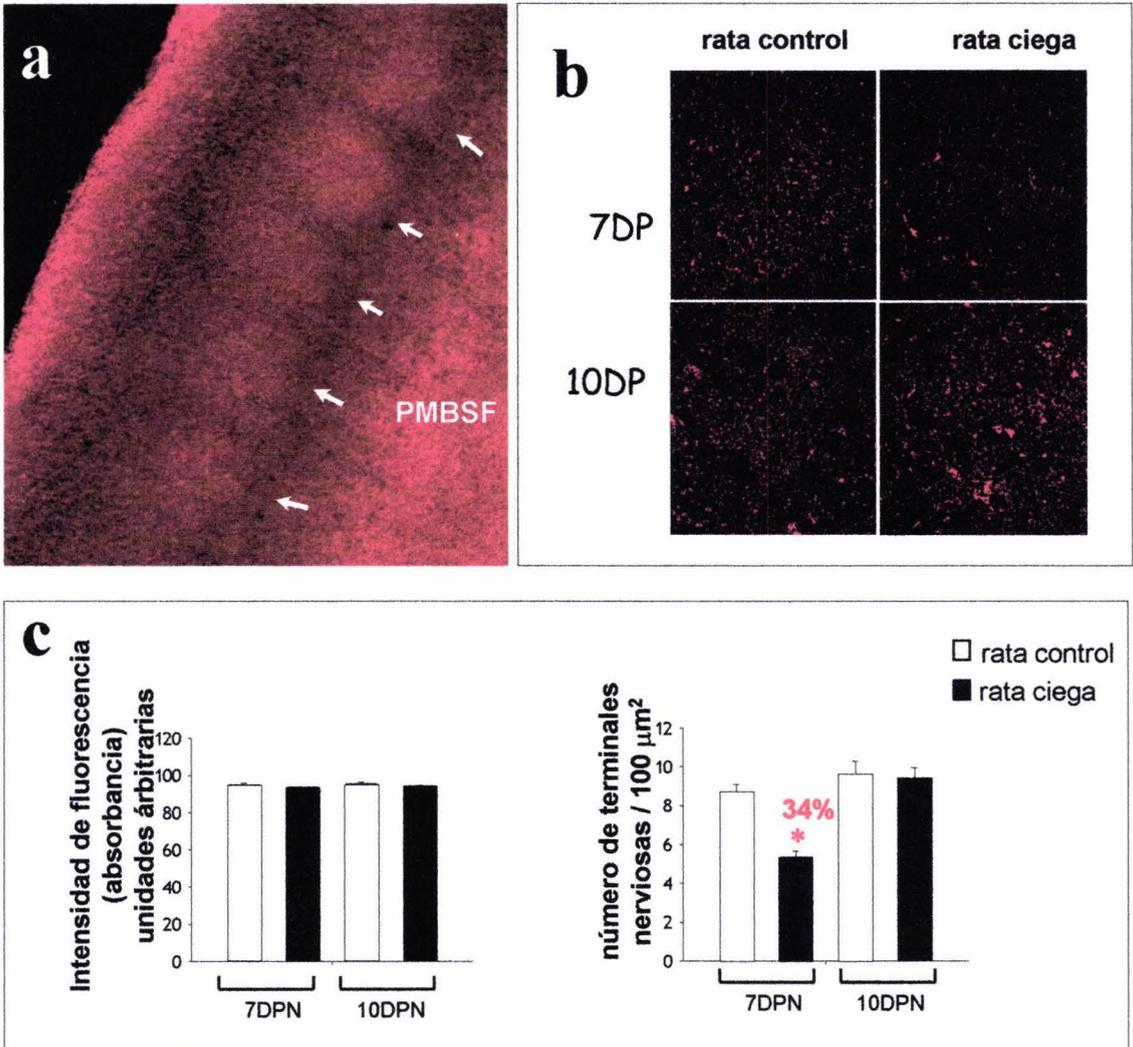


Fig. 12. Evaluación del número de terminales nerviosas en barriles del PMBSF de cerebros de ratas control y ciegas de 10DP. (a) Los experimentos realizados en cortes coronales de rebanadas vivas incubadas con el marcador de reciclaje vesicular FM1-43, permitieron evaluar el número y la intensidad de fluorescencia de las terminales sinápticas en los barriles faciales que constituyen el PMBSF (ver flechas) (b) Microfotografías representativas de microscopía confocal de terminales sinápticas teñidas con FM1-43 en ratas control y ciegas a los 7 y 10DP (c) Gráficas que muestran la intensidad de fluorescencia y el número total de las terminales nerviosas de ratas control y ciegas de 7 y 10DP. Prueba Student t-test * $p < 0.00021$.

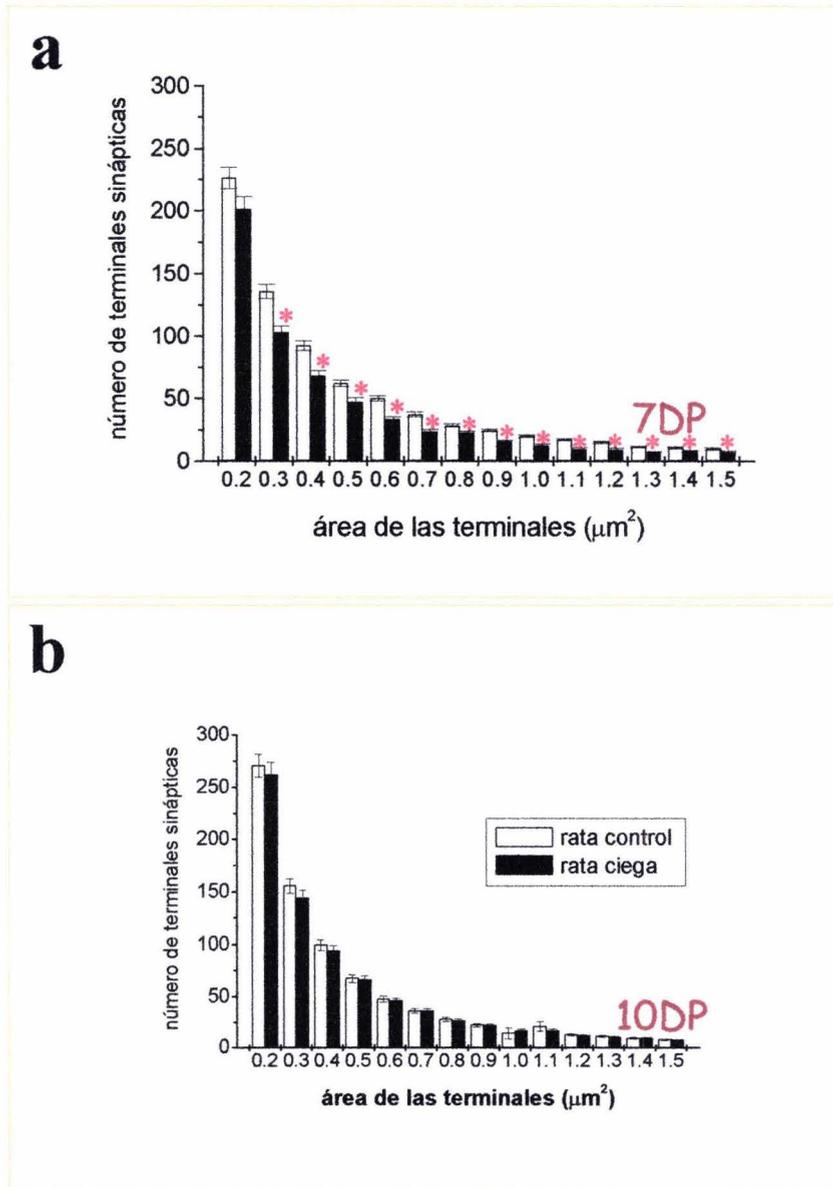


Figura 13 Histograma de frecuencias que muestran la distribución en el número de terminales sinápticas que presentan un tamaño específico en el PMBSF de ratas control y ciegas. **(a)** a la edad de 7DP. **(b)** a la edad de 10DP. No existen diferencias en la distribución del tamaño de las terminales nerviosas en relación a su tamaño a la edad de 7DP y 10DP en ratas control y ciegas; sin embargo, a edad de 7DP se observa una tendencia a la disminución en el número de terminales por rango de tamaño en los cerebros de ratas ciegas en comparación con sus contrapartes control. Prueba Student t-test * $p < 0.003$.

DISCUSIÓN

Limitaciones del trabajo.

Una limitación importante cuando se interpretan los resultados presentados en este trabajo tiene que ver con el uso de extractos de tejido que contienen las seis láminas corticales de S1 para realizar los análisis de Western-blot. Debido a que S1, y en particular la lámina IV, recibe aferentes de una variedad de regiones cerebrales (Thomson y Bannister, 2003), es muy probable que los cambios en el contenido de GAP-43, sinaptofisina y neurofilamentos-150kDa observados en las muestras utilizadas de S1 reflejen cambios en el patrón de crecimiento no solo de las aferentes tálamo-corticales sino además de otras vías axonales. Sin embargo, a nuestro favor podemos decir, que: **1)** las aferentes tálamo-corticales también se ramifican en las láminas corticales superiores e inferiores a la lámina IV; **2)** se apoya además por diversos estudios que la inmunoreactividad para sinaptofisina y GAP-43 se concentra en lámina IV de los barriles de S1 durante la primera semana de vida postnatal (Erzurumlu et al., 1990; Kay et al., 2002; Uribe-Querol et al., 2004); **3)** resulta ser además que el desarrollo de los circuitos locales e interhemisféricos ocurre después de la primera semana de vida posnatal hacia el 8DP (Bernardo et al., 1990).

Cambios en el crecimiento axonal y la sinaptogénesis en ratas ciegas.

En los roedores, la remoción quirúrgica de los ojos al nacimiento conduce, en promedio, a una expansión de los barriles localizados en la lámina IV de S1 (Bronchti et al., 1992; Rauschecker et al., 1992; Zheng y Purves, 1995; Toldi et al., 1994; Geovannini, 2001). Aunque los mecanismos que subyacen a esta expansión son aún poco claros, los resultados de este trabajo indican que el crecimiento de los axones tálamo-corticales está aumentado en los animales enucleados. Esta conclusión es apoyada por los datos que muestran **1)** un incremento en el área de sección de los barriles marcados para la acetilcolinesterasa, **2)** el incremento en el área de distribución y en la longitud total de los axones tálamo-corticales

teñidos con Dil, y **3)** la tendencia a incrementar el contenido de GAP-43, neurofilamentos-150kDa y a disminuir el de sinaptofisina en S1 de ratas enucleadas, al ser comparadas con sus contrapartes control.

En la corteza en desarrollo, la aparición de sinaptofisina en los conos de crecimiento y la adquisición de la habilidad para regular la liberación de los neurotransmisores alrededor del día postnatal siete, marca la transición entre las etapas de crecimiento axonal y formación/consolidación sinápticas (Igarashi et al., 1997; Becher et al., 1999). Teniendo esto en mente, además de que sinaptofisina ha sido considerada un buen marcador de terminales sinápticas (Stroemer et al., 1995); y los datos presentados a lo largo de esta tesis que documentan la tendencia a incrementar el contenido de proteínas asociadas al crecimiento axonal y la disminución de sinaptofisina durante los primeros siete días de vida, sugieren que la fase de crecimiento axonal esta extendida, y el inicio de la formación/consolidación sináptica se encuentra retrasada en S1, como resultado de la enucleación. Esta idea se apoya aún más, debido a que la disminución del número de terminales nerviosas marcadas con FM1-43 resulta ser a los 7DP pero no a los 10DP en ratas ciegas, al ser comparadas con las ratas control de la misma edad.

Además, debido a que las sinapsis silentes desaparecen de S1 alrededor de los nueve días de vida postnatal (Isaac, 1997), es probable que exista un retardo en la transición de sinapsis silentes ha sinapsis maduras en los animales enucleados. Si bien estudios electrofisiológicos son necesarios para evaluar esta interesante posibilidad, hemos obtenido evidencia preliminar que muestra un incremento en la expresión de la subunidad R1 de receptor tipo NMDA para glutamato en animales ciegos. Esta observación apoya el retardo en la transición de sinapsis silentes a sinapsis maduras en los animales ciegos, dado que, en condiciones normales, el decremento de la subunidad R1 del receptor tipo NMDA acompaña

la transición de sinapsis silentes hacia la conversión a sinapsis maduras funcionales (Isaac, 2003; Liao et al., 1999; Itami et al., 2000). Finalmente, una inferencia interesante derivada de nuestras observaciones es que la disminución del número de sinapsis pudiera conducir a un descenso en la actividad sináptica en S1 de los animales ciegos durante la fase de plasticidad. Aunque estudios electrofisiológicos también son necesarios para evaluar esta posibilidad, resulta interesante que el bloqueo de la actividad neuronal y sináptica incrementa la producción de GAP-43 y se asocia al desarrollo de árboles axónicos más elaborados, mientras que el aumento de la actividad neuronal disminuye la disponibilidad de GAP-43 y detiene el crecimiento axonal (Brown, 1977; Sretavan et al., 1988; Antonini, 1993; Sharp et al., 2003).

Participación de las aferentes tálamo-corticales en la plasticidad sensorimodal de S1.

Trabajos previos han mostrado que en algunos modelos de plasticidad sensoriomodal la reorganización de los circuitos corticales involucra el rebrote de ramas de las aferentes callosas y de las conexiones horizontales (Rhoades, 1980; Gao y Pallas, 1999; Pallas, 1999). En el presente trabajo mostramos evidencia que muestra que las aferentes tálamo-corticales que proyectan a los barriles incrementan su área de distribución y su longitud total en respuesta a la enucleación neonatal. Así, los cambios en la complejidad de los axones tálamo-corticales, junto con aquellos en la densidad vascular (Zheng y Purves, 1995) y en el tamaño de los cuerpos neuronales (Rauschecker, 1992) muy probablemente explican la expansión de los barriles de S1 en animales ciegos. Se cree además que las aferentes tálamo-corticales también participan en los procesos de reorganización cortical (Merzenich et al., 1984; Catalano et al., 1995) durante fases tempranas del desarrollo (Trachtenberg y Stryker 2001) lo cual sugiere que la plasticidad anatómica de las conexiones horizontales

precede a la reorganización de las aferentes tálamo-corticales durante la reorganización de los circuitos de las columnas de dominancia ocular.

En S1 de los roedores, las conexiones horizontales empiezan a desarrollarse después del día 10 de vida postnatal (Bernardo et al., 1990). Así, en S1 de los animales ciegos, es muy probable que la reorganización de la vía tálamo-cortical preceda a aquella de las conexiones horizontales debido a que las primeras muestran cambios plásticos antes del día postnatal 10.

La expansión de los barriles procede a través de mecanismos “constructivistas”.

Durante largo tiempo se ha pensado que la reorganización de los circuitos corticales de los mamíferos jóvenes es el resultado de la retención de conexiones que serían normalmente eliminadas durante el desarrollo neuronal. Sin embargo, los procesos de crecimiento de las aferentes tálamo-corticales y la elaboración de neuropilo en el interior de los barriles son procesos precisos y aditivos que no involucran la eliminación de elementos neuronales (Killackey y Belford, 1979; Agmon et al., 1993, 1996; Catalana et al., 1995 y 1996; Schlaggar y O'Leary, 1994; Riddle et al., 1992; Gutiérrez-Ospina et al., 1996; Micheva y Beaulieu, 1995; White y Peters, 1993; Rebsam et al., 2002). Es posible, por tanto, que la expansión de los barriles en ratas enucleadas sea la consecuencia de eventos “constructivistas” en el que, al menos los axones tálamo-corticales, adicione elementos neuronales al neuropilo de los barriles. Si bien los eventos de eliminación podrían ocurrir después del periodo evaluado en el presente trabajo, los hechos de que el área de sección de los barriles permanezca incrementada en animales adultos enucleados al nacimiento (Bronchti et al., 1992; Rauschecker et al., 1992; Zheng y Purves, 1995; Geovannini, 2001), y que el crecimiento de los barriles se escale durante el desarrollo postnatal en animales control y enucleados apoya aún más un mecanismo constructivista.

Heterogeneidad de la respuesta plástica de los barriles del PMBSF.

Uno de los hallazgos interesantes del presente trabajo es que los barriles del PMBSF se expanden en una magnitud diferente dependiendo de su localización. Nuestras observaciones son enteramente consistentes con aquellas que muestran que la reorganización anatómico-funcional del mapa de barriles, en paradigmas de privación intramodal o sensoriomodal, es en verdad heterogénea (McCasland, 1991; Rauschecker et al., 1992; Zheng y Purves, 1995; Lajud, 2003). Aunque nuestros resultados no permiten deducir el posible mecanismo, algunas observaciones han demostrado que las distintas subrepresentaciones del mapa corporal crecen de manera heterogénea (Riddle, 1992; Rauschecker, 1992) quizás siguiendo un gradiente de desarrollo (Dori, 1996; Zsarnovszky, 2001). Estos datos pudieran aplicarse al presente modelo, específicamente, si las direcciones de los gradientes y/o los tiempos en los que transcurren se modificaran como resultado de las manipulaciones experimentales, es muy probable que los procesos de crecimiento neuronal se vieran afectados. Así, es necesario explorar si la enucleación modifica la expresión de morfógenos tales como efrinas, que han sido implicadas en el establecimiento de bordes entre distintas áreas corticales (Prakash et al., 2000).

La reorganización axonal podría explicar la distribución diferencial del espacio cortical de las áreas corticales a la evolución cerebral.

Uno de los elementos que caracterizan a la organización cortical durante el proceso de evolución del cerebro es la redistribución del espacio cortical entre las áreas sensoriales primarias, dependiendo del nicho ecológico ocupado por el individuo. Así, en aquellos mamíferos (e.g. rata) que dependen más de información táctil para conducirse en su ambiente, la S1 ocupa una fracción importante de la corteza cerebral. En correspondencia, en los linajes de animales más "visuales" (e.g., monos) o "auditivos" (e.g., murciélagos), las

cortezas sensoriales primarias que predominan son la visual y la auditiva, respectivamente (Kaas, 1987)

Aunque es probable que diversos mecanismos definan el porcentaje de área cortical que será destinada a las distintas modalidades sensoriales, el hecho de que las proporciones relativas de los barriles del PMBSF cambien en los animales enucleados, y que dichos cambios se asocien a modificaciones en los patrones de crecimiento axonal, sugieren que los mecanismos que regulan el crecimiento axonal podrían haberse modificado durante la evolución cerebral. En otras palabras, los mecanismos de crecimiento axonal han sido sujeto de presión evolutiva. Aunque reconocemos que esto es una especulación difícil de abordar experimentalmente, es interesante que en modelos de ratones transgénicos que sobre-expresan a IGF-I , y que han sido utilizados para explorar posibles mecanismos de evolución cerebral, han revelado que la expansión diferencial de la corteza cerebral resulta del crecimiento también diferencial de los tactos nerviosos (Gutiérrez-Ospina et al., 1996).

CONCLUSIONES

Reorganización axonal

- La expansión cortical en la corteza somatosensorial primaria se asocia al crecimiento exacerbado en la topografía axonal de las aferentes tálamo-corticales.
- El contenido de proteínas asociadas al crecimiento axonal (GAP-43 y neurofilamentos-150KDa) se incrementan a los 7DP en los cerebros de ratas ciegas.
- La morfología axonal y la dinámica de crecimiento de las aferentes tálamo-corticales se modifica durante el período crítico de plasticidad del mapa somatosensorial.
- Estos resultados apoyan la existencia de un crecimiento axonal exacerbado de las aferentes tálamo-corticales durante el período crítico de plasticidad en S1.

Reorganización en el número de terminales sinápticas

- El aumento en el contenido de sinaptofisina se retarda durante el periodo crítico de plasticidad y se reestablece en la edad adulta.
- El número de terminales funcionales decrementa transitoriamente durante el periodo crítico de plasticidad y se reestablece en la maduración del mapa somatosensorial.
- Los resultados sugieren un retardo funcional en el desarrollo en las terminales sinápticas en el mapa somatosensorial en los cerebros de ratas ciegas.

Reorganización axonal y del número de terminales sinápticas

- Es probable que el mecanismo estructural que resulta de manera inicial en la expansión en la del mapa somatosensorial, a la edad de 7DP, sea el crecimiento axonal exacerbado de las aferentes tálamocorticales modulado por un decremento transitorio en el número de terminales sinápticas.
- Posteriormente en el desarrollo, a la edad de 10DP, se consolidan los cambios plásticos en S1, manteniendo la dinámica en el crecimiento axonal y reestableciendo el número de terminales sinápticas durante el período en la formación y consolidación del mapa somatosensorial.

BIBLIOGRAFIA

- Antonini A, Stryker MP. (1993) Development of individual geniculocortical arbors in cat striate cortex and effects of binocular impulse blockade. *The Journal Neuroscience*. August 13(8):3549-3573.
- Agmon, A., Hollrigel, G., and O'Dowd, D. K. (1996) Functional GABAergic synaptic connection in neonatal mouse barrel cortex. *J Neurosci* 16, 4684-4695.
- Agmon, A., Yang, L. T., O'Dowd, D. K., and Jones, E. G. (1993) Organized growth of thalamocortical axons from the deep tier of terminations into layer IV of developing mouse barrel cortex. *J Neurosci* 13, 5365-5382.
- Bavelier D, Neville HJ. (2002) Cross-modal plasticity: Where and How?. *Nat Rev* 3:443-452.
- Bavelier D, Neville HJ. (2002) Cross-modal plasticity: Where and How?. *Nat Rev* 3:443-452.
- Becher A, Drenckhahn A, Pahner I, Margittai M, Jahn R, Ahnert-Hilger G. (1999) The synaptophysin-synaptobrevin complex: a hallmark of synaptic vesicle maturation. *J Neurosci*. Mar 15;19(6):1922-31.
- Belford GR, Killackey HP. (1980) The sensitive period in the development of the trigeminal system of the neonatal rat. *J Comp Neurol* 193:335-350.
- Benowitz LI, Routtenberg A (1997) GAP-43: an intrinsic determinant of neuronal development and plasticity. *Trends Neurosci* 20:84-91.
- Bernardo KL, McCasland JS, Woolsey TA, Strominger RN. (1990) Local intra- and interlaminar connections in mouse barrel cortex. *J Comp Neurol*. Jan 8;291(2):231-55.
- Bronchti G, Schonenberger N, Welker E, Van der Loos H. (1992) Barrelfield expansion after neonatal eye removal in mice. *NeuroReport* 3:489-492.
- Brown MC, Ironton R. (1977) Motor neuron sprouting induced by prolonged tetrodotoxin block of nerve action potentials. *Nature* 265:459-461.
- Buonomano DV y Merzenich MM. (1998) Cortical plasticity from synapses to maps. *Annu Rev Neurosciences*. 21:149-86. Review.
- Catalano SM, Robertson RT, Killackey HP. (1995) Rapid alteration of thalamocortical axon morphology follows peripheral damage in the neonatal rat. *Proc Natl Acad Sci USA* 92:2549-2559.
- Catalano SM, Robertson RT, Killackey HP. (1996) Individual axon morphology and thalamocortical topography in developing rat somatosensory cortex.
- Chiaia NL, Fish SE, Bauer WR, Bennett-Clarke CA, Rhoades RW. (1992) Postnatal blockade of cortical activity by tetrodotoxin does not disrupt the formation of vibrissa-related patterns in the rat's somatosensory cortex. *Dev Brain Res* 66:244-250.
- Chiaia NL, Fish SE, Bauer WR, Figley BA, Eck M, Bennett-Clarke CA, Rhoades RW (1994) Effects of postnatal blockade of cortical activity with tetrodotoxin upon the development and plasticity of vibrissa-related patterns in the somatosensory cortex of hamsters. *Somatosens Motor Res* 11:219-228.
- Crair MC (1999) Neuronal activity during development: permissive or instructive? *Curr Opin Neurobiol* 9:88-93

Datwani A, Iwasato T, Itohara S, Erzurumlu RS.(2002) Lesion-induced thalamocortical axonal plasticity in the S1 cortex is independent of NMDA receptor function in excitatory cortical neurons. *J Neurosci*.Nov1;22(21):9171-5.

Dori, I., Dinopoulos, A., Blue, M. E., and Parnavelas, J. G. (1996). Regional differences in the ontogeny of the serotonergic projection to the cerebral cortex. *Exp Neurol* 138, 1-14.

Dunn-Meynell AA, Benowitz LI, Levin BE (1992) Vibrissectomy induced changes in GAP-43 immunoreactivity in the adult rat barrel cortex. *J Comp Neurol* 315:160-170

Edward L, White, Liza Weinfeld y Dmitri L. Lev. (1997) A survey of morphogenesis during the early postnatal period in PMBSF barrels of mouse Sml cortex with emphasis on barrel D4. *Somatosensory and Motor Research*; 14(1):34-55.

Edward G. Jones (2000) Cortical and Subcortical Contributions to Activity-Dependent Plasticity in Primate Somatosensory Cortex. *Annu Rev Neurosci*. 2000;23:1-37. Review.

Elbert T, Sterr A, Candia C, Rockstroh B, Knecht S, Pantev C, Wienbruch C, Taub E. (1997) Input-increase and input-decrease types of cortical reorganization after upper limb extremity amputation in humans. *Exp Brain Res* 117:161-164.

Erzurumlu RS, Jhaveri S, Benowitz LI. (1990) Transient patterns of GAP-43 expression during the formation of barrels in the rat somatosensory cortex. *J Comp Neurol*. Feb 15;292(3):443-56

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

Florence SL, Taub HB, Kaas JH. (1998) Large-scale sprouting of cortical connections after peripheral injury in adult macaque monkeys. *Science* 282:1117-1121.

Gao WJ, Pallas SL. (1999) Cross-modal reorganization of horizontal connectivity in auditory cortex without altering thalamocortical projections. *J Neurosci*. Sep 15;19(18):7940-50.

Geovannini H, (2001) Re-evaluación del papel de la actividad neuronal asociada con el uso y de la densidad de inervación periférica en la plasticidad sensoriomodal de la neocorteza de la rata. México, Universidad Nacional Autónoma de México

Gutierrez-Ospina, G., Calikoglu, A. S., Ye, P., and D'Ercole, A. J. (1996). In vivo effects of insulin-like growth factor-I on the development of sensory pathways: analysis of the primary somatic sensory cortex (S1) of transgenic mice. *Endocrinology* 137, 5484-5492.

Hanganu IL, Kilb W, Luhmann HJ (2001) Spontaneous synaptic activity of subplate neurons in neonatal rat somatosensory cortex. *Cereb Cortex* 11:400-410.

Igarashi M, Tagaya M, Komiya Y. (1997) The soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attached protein receptor complex in growth cones: molecular aspects of the axon terminal development. *J Neurosci*. Feb 15;17(4):1460-70.

Isaac JT (2003) Postsynaptic silent synapses: evidence and mechanisms. *Neuropharmacology* Sep;45(4):450-60

Isaac JT, Crair MC, Nicoll RA, Malenka RC. (1997) Silent synapses during development of thalamocortical inputs. *Neuron*. 1997 Feb;18(2):269-80.

Itami C, Mizuno K, Kohno T, Nakamura S. (2000) Brain-derived neurotrophic factor requirement for activity-dependent maturation of glutamatergic synapse in developing mouse somatosensory cortex. *Brain Res.* Feb 28;857(1-2):141-50.

Kaas HJ. (1987) The Organization and Evolution of Neocortex. Chapter Fourteen. Higher Brain Functions. Recent Explorations of the Brain's Emergent Properties. National Institute of Mental Health Bethesda, Maryland.

Kay L, Kesterson, Richard D, Lane, Robert W, Rhoades. (2002) Effects of elevated serotonin levels on patterns of GAP-43 expression during barrel development in rat somatosensory cortex. *Development Brain Research.* 139167-174.

King, A. J. Canty and J. C. Vickers (2001) Alterations in neurofilaments associated with reactive brain changes and axonal sprouting following acute physical injury to the rat neocortex. *Neuropathology and Applied Neurobiology*, 27, 115±126

Roxanne C. Lariviere, Jean-Pierre Julien (2003) Functions of Intermediate Filaments in Neuronal Development and Disease Wiley Periodicals, Inc. *J Neurobiol* 58: 131–148.

Jensen KF, Killackey HP. (1987) Terminal arbors of axons projecting to the somatosensory cortex of the adult rat. II. The altered morphology of thalamocortical afferents following neonatal infraorbital nerve cut. *J Neurosci.* Nov;7(11):3544-53.

Jenkins WM, Merzenich MM, Ochs MT, Allard T, Guic-Robles E. (1990) Functional reorganization of primary somatosensory cortex in adult owl monkey after behaviorally controlled tactile stimulation. *J Neurophysiol* 63:82-104.

Kesterson KL, Lane RD, Rhoades RW. (2002) Effects of elevated serotonin levels on patterns of GAP-43 expression during barrel development in rat somatosensory cortex. *Development Brain Research.* 139167-174.

Killackey HP, Dawson DR. (1989) Expansion of the central hindpaw representation following fetal forelimb removal in the rat. *Eur J Neurosci* 1:210-221.

Killackey, H. P., and Belford, G. R. (1979). The formation of afferent patterns in the somatosensory cortex of the neonatal rat. *J Comp Neurol* 183, 285-303.

Kujala T, Alho K, Naatanen R. (2000) Cross-modal reorganization of human cortical functions. *TINS* 23:115-119.

Kujala T, Huottilainen M, Sinkkonen J, Ahonen AI, Alho K, Hamalainen MS, Ilmoniemi RJ, Kajola M, Knuutila JET, Lavikainen J, Salonen O, Simola J, Standertskjold-Nordenstam C-G, Tiitinen H, Tissari SO, Naatanen R. (1995) Visual cortex activation in blind humans during sound discrimination. *Neurosci Lett* 183 143-146.

Li GL, Farooque M, Holtz A, Olsson Y. (1996) Increased expression of growth-associated protein 43 immunoreactivity in axons following compression trauma to rat spinal cord. *Acta Neuropathol (Berl)* Jul;92(1):19-26

Larry I, Benowitz, Paul J, Apostolides, Nora Perrone-Bizzozero, Seth P, Finkestein, Henk Zwiera. (1988) Anatomical Distribution of the Growth-Associated Protein GAP-43/B-50 in the Adult Rat Brain. *The Journal of Neuroscience*, January 8(1): 339-352.

Liao D, Zhang X, O'Brien R, Ehlers MD, Hugarir RL. (1999) Regulation of morphological postsynaptic silent synapses in developing hippocampal neurons. *Nat Neurosci.* Jan;2(1):37-43.

Merzenich, M. M., Nelson, R. J., Stryker, M. P., Cynader, M. S., Schoppmann, A., and Zook, J. M. (1984). Somatosensory cortical map changes following digit amputation in adult monkeys. *J Comp Neurol* 224, 591-605.

Maier DL, Mani S, Donovan SL, Soppet D, Tessarollo L, McCasland JS, Meiri KF (1999) Disrupted cortical map and absence of cortical barrels in growth-associated protein (GAP)-43 knockout mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:9397-9402.

McCasland, J. S., Carvell, G. E., Simons, D. J., and Woolsey, T. A. (1991). Functional asymmetries in the rodent barrel cortex. *Somatosens Mot Res* 8, 111-116.

Micheva, K. D., and Beaulieu, C. (1995) An anatomical substrate for experience-dependent plasticity of the rat barrel field cortex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 11834-11838.

Molnar Z, Lopez-Bendito G, Small J, Partridge LD, Blakemore C, Wilson MC (2002) Normal development of embryonic thalamocortical connectivity in the absence of evoked synaptic activity. *J Neurosci* 22:10313-10323.

Négyessy L, Gál V, Farkas T, Toldi J. (2000) Cross-modal plasticity of the corticothalamic circuits in rats enucleated on the first postnatal day. *Eur J Neurosci* 12: 1654-1668.

O'Leary DD, Ruff NL, Dyck RH. (1994) Development, critical period plasticity, and adult reorganizations of mammalian somatosensory systems. *Curr Opin Neurobiol.* Aug;4(4):535-44. Review.

Pallas SL, Littman T, Moore DR. (1999) Cross-modal reorganization of callosal connectivity without altering thalamocortical projections. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Jul 20;96(15):8751-6.

Pascual-Leone A, Hamilton R, Tormos JM, Keenan JP, Catalá MD. (1999) Neuroplasticity in the adjustment to blindness. In: Grafman J, Christen Y. editors. *Neuronal plasticity: Building a bridge from the laboratory to the clinic.* Berlin: Springer-Verlag. p 93-108.

Paxinos G. (1995) *The Rat Nervous System.* Academic Press. Second Edition.

Prakash, N., Vanderhaeghen, P., Cohen-Cory, S., Frisen, J., Flanagan, J. G., and Frostig, R. D. (2000). Malformation of the functional organization of somatosensory cortex in adult ephrin-A5 knock-out mice revealed by in vivo functional imaging. *J Neurosci* 20, 5841-5847.

Petersen CC and Sakmann B. (2001) Functionally independent columns of rat somatosensory barrel cortex revealed with voltage-sensitive dye imaging. *J Neurosci* Nov 1;21(21):8435-46.

Philip Grant y Harish C. Pant (2000) Neurofilament protein synthesis and phosphorylation

Purves D y Lichtman JW. (1983) Specific connections between nerve cells. *Annu Rev Physiol* 45:553-65.

Purves D (1988) *Body and Brain: A trophic theory of neural connections.* Cambridge: Harvard University Press

Rebsam, A., Seif, I., and 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.

- Rauschecker JP, Tian B, Korte M, Egert W. (1992) Crossmodal changes in the somatosensory vibrissa/barrel system of visually deprived animals. *Proc Natl Acad Sci USA* 89:5063-5067.
- Rauschecker JP. (1995) Compensatory plasticity and sensory substitution in the cerebral cortex. *TINS* 18:36-43.
- Rauschecker JP. (1999) Auditory cortical plasticity: a comparison with other sensory systems. *TINS* 22:74-80.
- Rauschecker JP. (2001) Cortical plasticity and music. *Ann New York Acad Sci* 930:330-336.
- Rhoades RW, Dellacroce DD. Neonatal enucleation induces an asymmetric pattern of visual callosal connections in hamsters. (1980) *Brain Res. Nov 24;202(1):189-95.*
- Riddle D, Gutiérrez-Ospina G, Zheng D, White LE, Richards A, Purves D. (1993) Differential metabolic and electrical activity in the somatic sensory cortex of juvenile and adult rats. *J Neurosci* 13:4193-4231.
- 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.
- Ronald M. (1990) Phantom limbs and the concept of a neuromatrix. *TINS*, Vol. 13, No. 3, 89-92
- Ryugo, D. K., Ryugo, R., Globus, A., and Killackey, H. P. (1975). Increased spine density in auditory cortex following visual or somatic deafferentation. *Brain Res* 90, 143-146.
- Sathian K. (2000) Practice makes perfect. *Neurology* 54:2203-2204.
- Schikorski T, Stevens CF (2001) Morphological correlates of functionally defined synaptic vesicle populations. *Nat Neurosci* 4:391-39
- Schlaggar BL, O'Leary DD (1994) Early development of the somatotopic map and barrel patterning in rat somatosensory cortex. *J Comp Neurol* 346:80-96
- Sharp PS, Dekkers J, Dick JR, Greensmith L. (2003) Manipulating transmitter release at the neuromuscular junction of neonatal rats alters the expression of ChAT and GAP-43 in motoneurons. *Brain Res Dev Brain Res*. Dec 19,146(1-2):29-38.
- Sretavan DW, Shatz CJ, Stryker MP. (1988) Modification of retinal ganglion cell axon morphology by prenatal infusion of tetrodotoxin. *Nature* 336:468-471.
- Stettler O, Tavitian B, Moya KL (1996) Differential synaptic vesicle protein expression in the barrel field of developing cortex. *J Comp Neurol* 375:321-332
- Stroemer RP, Kent TA, Hulsebosch CE. (1995) Neocortical neural sprouting, synaptogenesis, and behavioral recovery after neocortical infarction in rats. *Stroke*. 1995 Nov;26(11):2135-44.
- Trachtenberg JT, Stryker MP. (2001) Rapid anatomical plasticity of horizontal connections in the developing visual cortex. *J Neurosci* May 15,21(10):3476-82
- Такаэиго Gotow (2000) Neurofilaments in health and disease *Med Electron Microsc* 33 173-199 © The Clinical Electron Microscopy Society of Japan 2000
- Thomas B. Shea and Lisa A. Flanagan (2001) Kinesin, dynein and neurofilament transport *TRENDS in Neurosciences* Vol 24 No 11 November

- Thomson AM, Bannister AP. (2003) Interlaminar connections in the neocortex. *Cereb Cortex*. Jan;13(1):5-14. Review.
- Toldi J, Rojik I, Fehér O. (1994) Neonatal monocular enucleation-induced cross-modal effects observed in the cortex of adult rat. *Neuroscience* 62:105-114.
- White, E. L., and Peters, A. (1993). Cortical modules in the posteromedial barrel subfield (Sml) of the mouse. *J Comp Neurol* 334, 86-96.
- Wong-Riley MT (1989) Cytochrome oxidase: an endogenous metabolic marker for neuronal activity. *Trends Neurosci* 12:94-101.
- Woolsey TA, Van der Loos H. (1970) The structural organization of layer IV in the somatosensory region (S1) of the mouse cerebral cortex. The description of a cortical field composed of discrete cytoarchitectonic units. *Brain Res* 17:205-242.
- Woolsey TA, Wann JR. (1976) Areal changes in mouse cortical barrels following vibrissal damage at different postnatal ages. *J Comp Neurol* 170:53-66.
- Yuste R, Sur M (1999) Developmental plasticity in neocortex. *J Neurobiol*, New York: Wiley Interscience.
- Zsarnovszky, A., and Belcher, S. M. (2001) Identification of a developmental gradient of estrogen receptor expression and cellular localization in the developing and adult female rat primary somatosensory cortex. *Brain Res Dev Brain Res* 129, 39-46.
- Zheng D y Purves D. (1995) Effects of increased neural activity on brain growth. *Proc Natl Acad Sci USA* 92:1802-1806.