

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID
FACULTAD DE MEDICINA**

**Variabilidad en los cambios estructurales de
las células calretinina positivas
supragranulares de la corteza somestésica de
la rata tras modificación de la entrada
sensorial**

TESIS DOCTORAL

**Jorge Castro García
Octubre, 2007**

Plasticidad: Antecedentes históricos y definición

Las teorías sobre la plasticidad cerebral han ido evolucionando con el paso del tiempo. Aunque ya los antiguos filósofos griegos habían considerado la mente como una tabla sobre la que se grababan las experiencias del ser humano no es hasta el final del siglo XIX, momento en que se comienzan a establecer las primeras teorías sobre cómo se comunican unas células nerviosas con otras, desveladas con la reciente técnica de tinción de Golgi.

Se asistió al debate de la posibilidad o no del cambio en el, por aquel entonces, poco conocido cerebro. El cerebro ya era considerado como la estructura dónde residía las funciones superiores y la personalidad del individuo por lo que una corriente del pensamiento filosófico-científico dudaba que existiera mutabilidad dado que este fenómeno implicaría también cambios radicales en la psique de la persona. Frente a esta corriente se oponía un grupo que afirmaba la plasticidad precisamente apoyándose en la necesidad de un sustrato biológico que explicara la memoria o la imaginación. El sistema nervioso no sería un sistema aislado e inmutable y sólo se lo podría comprender completamente al estudiarlo en su interacción con el entorno.

La plasticidad estructural resultó ser la primera explicación a los cambios del cerebro. Duval ya consideró que los cambios de estado en la consciencia, como por ejemplo los inducidos por estimulantes o anestésicos, se debían a retracciones y expansiones (o la ausencia de ellos) de las células nerviosas. Cajal, convencido que la arquitectura cortical no era inmutable y que los cambios histológicos observados eran fruto de los procesos mentales, también pensó en que la morfología celular podía verse modificada por el “ejercicio cerebral”.

Actualmente, con el empleo de nuevas técnicas, nuestro conocimiento sobre los cambios en el sistema nervioso ha aumentado de tal manera que la plasticidad no puede entenderse sino como una grandísima variedad de fenómenos y procesos desencadenantes distintos. Por tanto toda definición de la misma debe ser lo suficientemente general para abarcar un concepto tan amplio. Así, se ha sugerido que la

En el presente trabajo hemos tratado de determinar la plasticidad estructural de una población concreta de interneuronas situada en las capas supragranulares del sistema somestésico de la rata tras someterlas a paradigmas que alteraban la entrada de información ya fuese aboliéndola completa o parcialmente o aumentándola con respecto a las condiciones de estabulamiento comunes para un animal de laboratorio. Hemos podido constatar que las células estudiadas sufren cambios estructurales y que éstos se producen tanto tras modificaciones “negativas” como “positivas” en la entrada sensorial. Además, a pesar de que estas modificaciones se ejerzan sólo en un lado del cuerpo, los cambios estructurales –en sentidos diversos- afectan a ambos.

De esta forma los hemisferios que sufrieron la abolición de todo tipo de tacto (sección del nervio infraorbitario), acortarían sus segmentos terminales de órdenes inferiores, acompañando esta retracción con un ligero aumento de los segmentos terminales de orden superior. Este mecanismo compensatorio se reproduciría en aquellos hemisferios con una entrada sensorial disminuida por la eliminación del tacto activo (caso de los animales con bigotes recortados). En los hemisferios intactos de los grupos con recorte de vibrisas, los animales mostraron un proceso inverso en el que las dendritas de órdenes inferiores aumentarían su tamaño. Este fenómeno no sucedió en el hemisferio que representa el lado con vibrisas intactas del grupo IO.

Los animales que estuvieron en contacto periódico con un ambiente rico en estímulos distintos, tratando de asemejar las condiciones de un espacio abierto para fomentar los comportamientos naturales de exploración y socialización de las ratas, acompañaron la elongación de segmentos terminales de órdenes superiores del lado con sensibilidad reducida e inferiores del lado con bigotes intactos con un aumento de los segmentos de órdenes superiores de este mismo hemisferio.

Consideraciones sobre el modelo y los métodos de estudio

Pasaremos a discutir diversos aspectos sobre los protocolos empleados y los fundamentos que hemos considerado para nuestras elecciones, así como los posibles caveats presentes en nuestro diseño experimental.

Elección del modelo de estudio

A pesar de que existe cierto conocimiento sobre la plasticidad en la corteza visual de las ratas y que ésta presenta una correlación anatómico-funcional muy atractiva para los experimentadores (Zilles 1992; Cruikshank and Weinberger 1996), es la capacidad de discriminación con sus vibrisas principales (bigotes) el sentido que el roedor ha desarrollado de modo preferente. La retina de la rata dispone de un bajo porcentaje de conos (La Vail 1976) y bastones poco eficientes (Grant et al. 2001), así como una agudeza visual muy inferior a la humana (Prusky et al. 2000; Prusky et al. 2002). Las ratas albinas (el tipo de animales empleados en nuestro estudio) además, presentan serias dificultades para evitar el deslumbramiento y un patrón de conexiones aberrantes debido a la ausencia de melanina (Silver and Sapiro 1981; Creel et al. 1990). Por tanto, la experiencia perceptiva procedente del tacto con los bigotes de la rata debe considerarse mucho más rica. Como se ha introducido previamente el sistema de vibrisas permite una amplia variedad de manipulaciones, mayor que el sistema visual, pudiendo eliminarse selectivamente distintas modalidades, y en particular puede diferenciarse el tacto activo (el derivado de la búsqueda del entorno mediante el movimiento dirigido de vibrisas) frente al pasivo (derivado de la estimulación mecánica o térmica involuntaria de la región de las vibrisas).

Dentro de la zona que comprende la corteza somestésica, las capas II y III muestran varias características que las hacen interesantes objetivos de estudio. Existen evidencias que muestran que es en estas capas donde se produce cambios más pronunciados (Fox 1992; Diamond et al. 1994; Machin et al. 2006). Además, dada su extensa interconectividad y su papel de zona más relevante de proyección local intracortical tras la recepción de la información en capa IV procedente del tálamo, su capacidad como integrador de información es elevadísima, destacando asimismo la interconexión homotópica con la corteza contralateral que las convierte en un punto clave de encuentro de la información horizontal y ascendente desde el otro hemisferio y los núcleos subcorticales respectivamente.

Las interneuronas calretinina positivas (CR+) como población a estudiar

La proteína quelante de calcio CR ha sido elegida como marcador por su capacidad de marcar una población mayoritaria, que estuviese segregada de otros marcadores característicos de interneuronas como calbindina o parvalbúmina. De hecho es considerada como una de las grandes familias presentes en las capas II/III de la corteza de ratas (Kubota et al. 1994; Kawaguchi and Kubota 1997; Gonchar and Burkhalter 1997). Esta proteína se expresa en una variedad reducida de tipos morfológicos celulares y se ha detectado su coexpresión con el marcador canónico de interneuronas GABA así como VIP y colecistoquinina (Kubota et al. 1994; Kawaguchi and Kubota 1997).

Aunque existen estudios que indican una escasa coexpresión de CR con GABA (un 25%) (Rogers 1992), lo que lo convertiría en un marcador poco conveniente para intentar discriminar interneuronas, estos datos discreparían con datos posteriores de colocalización donde los porcentajes se acercan al 100% (Gonchar and Burkhalter 1997; Kubota et al. 1994). Además, hay constancia de que células marcadas para CR forman sinapsis asimétricas, propias de células excitatorias, por lo que se las postularía como células inmunopositivas para CR e inmunonegativas para ácido γ -aminobutírico. Estas discrepancias pueden atribuirse a varios factores. Un marcado de GABA poco intenso podría disminuir ostensiblemente la colocalización entre estas dos moléculas. De hecho este mismo grupo (Rogers 1992) registra una colocalización de GABA con calbindina que apenas llega al 50 %, muy por debajo de los datos aportados por otros grupos (Gonchar and Burkhalter 1997; De Felipe 1993). Por otro lado, las variaciones interespecíficas en la expresión de los distintos marcadores son frecuentes. La mayor parte de los datos que registran este tipo de colocalización proceden de primates y no roedores y las eferencias de esta clase celular hacen dudar de la posibilidad de comparación entre ellos. Así en la corteza humana las células CR+ no inervarían otras células inmunopositivas para GABA sino piramidales y gran cantidad de las sinapsis serían asimétricas (Del Rio and De Felipe 1997; De Felipe 1997; Melchitzky et al. 2005) y de hecho, existirían células CR+ con morfología piramidal tanto en humanos (Leuba and Saini 1997) como en perro (Hof et al. 1996). aunque el porcentaje de estas células variaría dependiendo de la capa (Melchitzky et al. 2005). Aún así no se puede descartar que algunas células CR+ de la rata presenten una función excitatoria dado que colocalizan con el marcador VIP conocido por estar presente en células excitatorias. Esta posibilidad y sus posibles implicaciones se tratarán más adelante.

Consideraciones sobre los animales de experimentación

Varios estudios han mostrado las diferencias en los cambios producidos tras someter a ratas de distintos sexos a condiciones o paradigmas inductores de plasticidad. Este dimorfismo sexual en la respuesta se ha podido observar en paradigmas de enriquecimiento y diversas variables (Juraska et al. 1985; Diamond 1988; Pena et al. 2006), y parece estar relacionado con las hormonas sexuales, principalmente los estrógenos. Al elegir una población exclusivamente formada por machos reducimos los problemas de interpretación de los datos por la influencia del ciclo estral de las hembras. Por otro lado, para evitar los cambios de comportamiento debidos a la presencia de hembras en los períodos receptivos decidimos estabular sólo machos en la habitación donde se llevó a cabo el experimento.

Las ratas machos de cada nueva camada eran separadas y marcadas, impidiendo que una misma hembra diese más de dos camadas para todos los experimentos realizados con el objeto de eliminar un posible fondo común genético. Aunque desconocemos cómo podría haber afectado en nuestro caso el fondo genético en la magnitud de los cambios inducidos, dado que las ratas empleadas no son producto de un intenso entrecruzamiento buscando cepas aisladas, convenimos que era mejor estar seguro que nuestra población representa una variedad heterogénea del pool genético y evitar utilizar ratas que mostrasen comportamientos o capacidades que favoreciesen o impidiesen la plasticidad.

En el momento del comienzo del experimento las ratas tenían 60 días de edad por lo que se las considera adultas-jóvenes. A pesar de que los cambios producidos en los cerebros de ratas recién nacidas son muy superiores el cerebro adulto sigue siendo sensible a las modificaciones en la entrada sensorial. Los datos aportados por diversos grupos investigadores han mostrado que la corteza de la rata adulta es susceptible de variar independientemente de que la modificación sensorial sea “negativa” o “positiva” (Black et al. 1991; Pearson et al. 2000; Nguyen et al. 2000; Lebedev et al. 2000; Machin et al. 2004).

Consideraciones sobre la metodología de estudio

Trazado con CR

Aparte de ser un marcador claro de una población de interneuronas muy importante por su número y función en las capas supragranulares de la rata, la CR presenta otras ventajas destacables que la hacen idónea para nuestro estudio.

La utilización de una tinción inmunohistoquímica para la reconstrucción de células es un método no exento de problemas. Aunque la tendencia es a utilizar métodos de relleno celular ya sea por inyección o expresión constitutiva de una proteína inmunofluorescente o inmunogénica para una posterior precipitación de cromógeno (Wouterlood et al. 2002) el mismo interés que genera la población a estudiar nos impedía seguir este procedimiento. Dado que la población de interés no está lo suficientemente aislada para caracterizarla y producir una cepa con expresión alterada de CR que pudiera ser fluorescente (con el obligatorio cambio añadido de que tendría que ser un estudio en ratón) la única opción que podíamos barajar era la inmunotinción directa de este tipo de interneurona. Aunque no existe literatura específica sobre trazado de células CR+ sí que existen artículos previos sobre reconstrucciones parciales en los que se llega a describir conectividad perfectamente marcada para axones y dendritas (Gulyas et al. 1996; Gonchar and Burkhalter 1999). Para disminuir los problemas de trazado por falta de contraste entre fondo y marcado primario, consecuencia de un exceso de reacción necesario en cortes gruesos, limitamos el grosor de las secciones para limitar el uso de detergentes de membrana. Por eso tuvimos que llegar a un equilibrio en el tamaño de nuestras secciones entre un número manejable para una reconstrucción en varios cortes que contuviera la interneurona y una profundidad adecuada para una correcta inmunotinción. Secciones más gruesas dificultarían su tinción completa y trazado mientras que un mayor número de secciones de menor grosor dificultaría sobremanera el proceso de alineamiento y continuación de la reconstrucción. Los problemas de trazado nos llevaron a descartar otras poblaciones de

gran interés que se habían planteado también para su estudio como es el caso de las interneuronas marcadas por calbindina.

Herramienta de reconstrucción

Para la cuantificación de los cambios producidos hemos empleado el paquete de programas informático de reconstrucción y análisis NeuroLucida 5.04.3. Este paquete informático, compuesto de un programa de trazado y otro de cuantificación, es el estándar en los trabajos dirigidos a estudiar las características morfológicas celulares. Si bien es cierto que este tipo de herramientas informáticas han constituido un gran avance en esta clase de estudios y que este programa en concreto se considera la herramienta estándar de reconstrucción neuronal, existen diversas limitaciones que han de ser tenidas en cuenta.

El software informático empleado no permite hacer reconstrucciones “volumétricas” del soma al carecer de la extensión *3d solid view* (que permite dotar de volumen a los objetos reconstruidos recubriéndolos y añadiendo sombras y opacidad). Es decir, la reconstrucción que representa al soma celular, no es un ovoide formado por las distintas superficies que forman los planos de enfoque, sino que es la superficie que forma la unión de los puntos de máximo enfoque del perímetro neuronal. Por lo anteriormente expuesto sobre la tinción, el hecho de disponer de ese módulo adicional sería de escasa utilidad ya que resultaba casi imposible encontrar diferencias de tinción al variar el plano por lo que la reconstrucción realizada no deja de ser una sobreproyección del soma. En general el tamaño de soma no es una variable muy fiable con estas herramientas de trazado y reconstrucción precisamente por la dificultad en su correcta medición por los problemas de sobreproyección y solapamiento (Avendaño 2006).

Otro dato que puede registrar y utilizar este programa en la descripción morfométrica de las neuritas es su grosor. Se ha propuesto utilizar el grosor como variable inicial para modelizar el desarrollo estructural y las propiedades eléctricas de las neuronas, así como generar poblaciones “virtuales” de neuronas para el estudio de sus posibles interrelaciones en una red neuronal (Van Pelt et al. 2001; Ascoli 2002; Donohue and Ascoli 2005; Ascoli et al. 2001). Las neuritas no son cilíndricas y en concreto las dendritas de nuestro estudio presentan varicosidades cuya representación visual en los

objetivos o la pantalla dependen de la posición relativa de la misma con respecto al plano de foco pudiéndose estimar erróneamente sus valores. A esto hay que añadir que el propio sistema de NeuroLucida dispone de valores discretos de grosor, no continuos, que seleccionamos hasta solapar por aproximación el grosor visto con el grosor dibujado, aumentando aún más los errores que se cometen. Aún así, llevamos un registro de los grosores de los procesos dendríticos porque, si bien su escasa precisión invalida la utilización de estos datos a nivel cuantitativo, a nivel cualitativo era de gran ayuda para el proceso de reconstrucción.

Un problema de limitación técnica similar tuvimos con la apreciación de espinas y axones. Las interneuronas bipenachadas y bipolares han sido descritas como lisas o poco espinosas (Peters and Kimerer 1981; Gonchar and Burkhalter 1999). Hemos observado apéndices pseudoespinosos, de muy corta longitud. Aunque nuestra reconstrucción se realizó con un objetivo 100x que permite distinguir un apéndice de una posible mancha o precipitado, los apéndices que observamos en general carecían de la morfología característica de las espinas con una cabeza y tallo de unión a la dendrita. Por eso, seguimos el convenio de considerarlas dendritas de corto tamaño cuando su proyección en la imagen de la pantalla (cuando el tamaño es tan corto es complicado determinar la longitud lineal real al no poder distinguir diferencias en planos de foco tan cercanos) era superior a las 3 micras y espinas cuando era menor. Dado el escaso número encontrado, la dificultad en su identificación a nivel óptico y la imposibilidad de una confirmación segura de la estructura mediante microscopía electrónica decidimos no tener en cuenta estas especializaciones estructurales dendríticas para nuestro estudio.

En cuanto al axón, aunque la tinción utilizada los marcaba, su reconstrucción era imposible al mostrar discontinuidades y entrecruzamientos tan tupidos que impedían distinguir el plano en donde se encontraba cada segmento y, por tanto, diferenciar el cruce de dos procesos de un punto de bifurcación. Hay que tener en cuenta que los axones eran de una delgadez extrema, en el límite de la resolución del objetivo del microscopio.

Junto a los problemas técnicos expuestos anteriormente, el programa de cálculo Neuroexplorer debe ser tratado aparte, considerando las limitaciones y posibles

problemas en la interpretación de los resultados que pueden obtenerse de la amplia variedad de análisis que es capaz de llevar a cabo. El número de representaciones gráficas y tabulación de datos, aunque muy diversa, en muchos casos es de escaso valor dado la redundancia por la dependencia entre algunas variables (ver (Benavides-Piccione et al. 2006) o la dificultad de correlacionar cambios en el análisis espacial con cambios estructurales (convex hull analysis y Wedge analysis).

El análisis por histogramas polares comenzó a emplearse para buscar posibles “direccionalidades” o asimetrías en las proyecciones de las neuronas (dendritas o axones) (McMullen et al. 1984; Glaser and McMullen 1984), actualmente sigue empleándose en algunos estudios e incluso se han desarrollado implementaciones recientes (Jin et al. 2001). Aunque en un primer momento sopesamos la inclusión de este tipo de análisis (ver paneles en Resultados), dada la influencia que ejerce la orientación intrínseca de la neurona en el cálculo del histograma, nuestra imposibilidad de poder haber fijado un plano común de corte y reconstrucción a todas las neuronas de nuestro estudio y la amplia variabilidad morfológica en la disposición de las dendritas (dentro de la aparente uniformidad de que sean todas interneuronas con dendritas orientadas verticalmente) consideramos este tipo de análisis poco útil para nuestros propósitos y por tanto fue descartado.

Otra herramienta disponible que sí hemos utilizado es el análisis de Sholl. La herramienta de análisis proporcionada por Neuroexplorer es una modificación del análisis de Sholl clásico (Sholl 1953) que no sólo analiza la proyección de las neuritas sobre unos anillos concéntricos sino que toma en consideración las tres dimensiones, por lo que podríamos decir que es un análisis sobre esferas concéntricas mucho más realista que el análisis original. Sin embargo, es importante destacar que el punto de origen del sistema de coordenadas que impone el programa para trazar las esferas dentro de las cuales se contienen los procesos dendríticos para cuantificarlos lo determina el propio programa dependiendo de la forma del soma. Aunque los somas suelen presentar un aspecto ovoidal con un eje mayor y otro menor, las diversas morfologías, con lados facetados (figura 1 resultados) y el hecho de que el soma trazado no deja de ser una representación del plano de máxima proyección, provocan que el centroide generado quede desplazado con respecto del trazado. Esto genera dificultades a la hora de interpretar los datos de las esferas concéntricas más próximas, llegándose a incluir

partes del soma si la división inicial es lo suficientemente pequeña o el soma tiene alguna protrusión somática. Un problema adicional en este análisis es la inclusión de todos los tipos de segmentos, independientemente de su origen (segmentos intermedios y terminales) y orden que minimiza la potencia de los cambios cuando estos se encuentran muy localizados.

Finalmente, el procesamiento del tejido inevitablemente provoca un encogimiento no constante que llega a ser en muchos casos mayor del 50% sobre el grosor original. Para solventar este problema a la hora de generar datos comparables NeuroLucida viene dotado con una herramienta de corrección de encogimiento que multiplica por un factor introducido por el usuario las distancias de los puntos. El encogimiento del tejido no es una variable constante ni siquiera dentro de cada corte. Las variaciones de profundidad que se observan al realizar las medidas dentro del plano xy (plano de corte o montaje sobre el portaobjetos) pueden ser del orden del 20% incluso en medidas próximas entre sí en el espacio. Al introducir un único valor de multiplicación (calculado mediante el cociente entre el valor medio real obtenido por varias mediciones en los distintos cortes y el nominal marcado por el paso del microtomo) limitamos la calidad de la conversión puesto que todos los puntos contribuían de igual manera en la media independientemente de la posición (donde hubiese más tejido reconstruido o menos). Además, la multiplicación provocaba que pequeñas variaciones en la profundidad registradas por desplazamientos del tornillo micrométrico pudieran generar trazados con zonas características de “dientes de sierra” que añaden longitud ficticia. Estos desplazamientos son inherentes a la sensibilidad del sistema utilizado y al propio usuario durante el proceso de trazado pero pueden llegar a provocar variaciones en valores morfométricos aunque dado que este problema es de tipo aleatorio y los resultados se obtuvieron con el mismo equipo y usuario las diferencias son ínfimas a la hora de comparar los datos de esta tesis entre sí (Horcholle-Bossavit et al. 2000; Scorcioni et al. 2004).

Análisis estadístico

Al abordar un estudio de cuantificación es imperativo comprender, elegir y aplicar las correctas herramientas estadísticas. Al analizar los datos obtenidos durante la realización de esta tesis hemos encontrado diversas circunstancias que dificultaron el

empleo de tests de alta sensibilidad para la cuantificación de los cambios, derivados de las peculiares características intrínsecas de la población a estudiar. La mayor parte de las variables morfométricas examinadas han mostrado comportamientos que las separaban de las esperadas distribuciones normales típicas de las variables biológicas. El hecho de que no cumplieran con la condición de normalidad nos ha forzado a utilizar tests no paramétricos de menor sensibilidad en la detección de cambios. Además, la naturaleza de nuestros experimentos, cuyas mediciones son posteriores al evento modificador, junto con un abordaje conservador con respecto a las posibles asimetrías inherentes e interconexión hemisférica en el fenómeno de la plasticidad nos ha impedido el uso de herramientas estadísticas basadas en el emparejamiento de los datos (que habrían sido interesantes de aplicar si pudiéramos haber estudiado una determinada interneurona antes y después del evento modificador). Es evidente que la falta de sensibilidad de los tests disponibles por ausencia de normalidad junto con la amplísima variabilidad inherente de las poblaciones no ayudó en la obtención de datos relevantes demostrables desde un punto estadístico. Sin embargo al agrupar en conjuntos contiguos los órdenes diversos, las diferencias salen a la luz, demostrando que un análisis dendrita a dendrita, dado las características de la población a estudiar, no es el abordaje más acertado a este problema.

El principal problema metodológico de este análisis por agrupaciones es determinar donde deberemos situar el/los límite/s. Nuevamente, un estudio detallado de las gráficas, cambiando el tipo de representación a uno de línea continua nos aclara rápidamente que parece que existe un único punto o población sobre la que pivotan los cambios y que consideramos como orden "límite". Este punto de inflexión donde las tendencias de cada grupo varían se encuentra en la población de orden cuatro. Una vez localizado el punto sólo resta decidir en cuál de los dos grupos debía incluirse este orden para el cómputo final. Al carecer de ningún estudio anatómico o funcional que destacase de alguna manera la importancia de este orden y su posible función dentro del entramado dendrítico decidimos seguir criterios de tipo estadísticos. Las mayores poblaciones de segmentos son aquellas de órdenes 3 y 4, decreciendo su número a medida que aumentamos el orden. Por tanto la agrupación de los segmentos 1 a 4 implicaría la inclusión de más del 75% de los segmentos totales por lo que un gran cambio en unas pocas dendritas de un orden elevado (>4) provocaría diferencias de elevada significación en las comparaciones del grupo. Teniendo en cuenta la

variabilidad intrínseca de estas poblaciones de alto grado y el relativamente escaso número de segmentos en ellas, es más recomendable incluir el orden 4 junto con el resto de órdenes superiores, restringiendo los órdenes “bajos” a aquellos comprendidos entre 1 y 3.

Comentarios sobre los cambios dendríticos observados

En un nivel descriptivo general la literatura sobre la morfología de estas interneuronas es más bien escasa. Normalmente los estudios que realizan reconstrucciones profundizan más en las interrelaciones físicas (conectividad) o propiedades eléctricas para caracterizar la interneurona (Kawaguchi and Kubota 1996; Tamas et al. 1998). Los valores de variables como el orden de ramificación que hemos obtenido son ligeramente inferiores sobre los valores propuestos por Markram aunque las longitudes totales son semejantes (Markram et al. 2004). En este caso hay que tener en cuenta que los datos están obtenidos en rodajas de animales con edades entre P14-P16 por lo que la rata podría sufrir todavía ciertas remodelaciones (*pruning*, crecimiento posterior de las ramas) (Parnavelas and Uylings 1980). De hecho, la prevalencia de espinas dendríticas era muy superior (aproximadamente el 50% de las interneuronas presentaban de 4 a 10 espinas por cada 10 μm) a las observadas por nosotros y otros autores en ratas adultas (Peters and Kimerer 1981; Gonchar and Burkhalter 1999). En reconstrucciones con células de ratas que expresaban constitutivamente la proteína GAD67-GFP se aportan datos totales sobre una población general de interneuronas bipenechadas con células multipolares y los valores de longitud dendrítica total y número de terminales se encuentran en el rango de entre las 1000-2000 micras para el primero y 10-20 terminales dendríticos, valores muy similares a los nuestros aunque con ciertos casos extremos con 4000 micras y hasta 55 terminales. Nuevamente, el hecho de que sean poblaciones mezcladas de tipos anatómicos (aunque en nuestro caso también tenemos células que serían consideradas como multipolares por este grupo) dificulta la comparación exacta de los datos (Jin et al. 2001).

¿Existe asimetría en la población de interneuronas CR+?

Los datos que aportamos sobre la comparación de interneuronas muestran que no existen diferencias significativas de ningún tipo entre ambos lados excepto por el análisis de Sholl de la primera esfera que podría atribuirse a los problemas intrínsecos del propio análisis expuestos arriba.

Las asimetrías en el sistema nervioso central de mamíferos no primates es un antiguo tema de estudio que se centra en buscar diferencias de lado en la estructura y fisiología de especies inferiores en la escala evolutiva con respecto a los primates, donde existe una mayor especialización hemisférica. Existen estudios recientes que muestran variaciones de diversa consideración, con ligeros cambios a nivel poblacional en las distribuciones celulares, representación de mapas o grosores del campo de barriles (Machin et al. 2004; Tobet et al. 2005; Chen-Bee and Frostig 1996; Riddle and Purves 1995). Se sabe mucho menos sobre si variaciones similares pudieran ocurrir a nivel de la estructura celular, aunque se ha demostrado que las neuronas sensoriales primarias del ganglio trigémino muestran una asimetría consistente en que los cuerpos celulares de las neuronas tipo A (mecanosensitivas de mayor tamaño) son un 20% más voluminosas en el ganglio derecho que en el izquierdo (Lagares and Avendaño 2000; Negrodo 2007). Igualmente, y en estudios muy recientes, se han demostrado notables asimetrías métricas y topológicas en las neuronas trigémino-talámicas del núcleo principal del trigémino (Lagares and Avendaño 2000; Negrodo 2007). Sin embargo, desconocemos que existan estudios específicos sobre diferencias estructurales interhemisféricas a nivel celular en la corteza somestésica de la rata por lo que consideramos que nuestros datos, aunque negativos, aportan una interesante información para el conocimiento de la organización del sistema somatosensorial trigeminal.

¿Qué significan los limitados cambios estructurales consiguientes a las distintas modificaciones en la entrada sensorial?

El cambio estructural más llamativo observado se produjo tras la pérdida de todo tipo de entrada sensorial en el hemisferio izquierdo por la sección completa del nervio infraorbitario derecho, y consistió en la disminución general de la longitud de los segmentos terminales de órdenes inferiores con respecto a los valores obtenidos en el hemisferio contralateral y los demás hemisferios ipsilaterales del resto de grupos. Junto

a este fenómeno se observó además, como si de un mecanismo compensatorio se tratara, un aumento en la longitud de los segmentos terminales de órdenes superiores. Las diferencias en el caso del lado desaferentizado por sección son tan elevadas que las mismas distribuciones de las poblaciones son significativamente distintas incluso cuando se compara el grupo de sección del nervio con los de recorte de bigotes. En general estos datos vienen acompañados de leves descensos en el número de intersecciones y longitudes de segmentos totales en el lado desaferentizado.

La literatura muestra que al perder la aferencia por lesión en animales adultos la actividad disminuye e incluso la propia expresión de la enzima GAD y su producto GABA (Waite 1984; Rice and Van der Loos H. 1977; Welker et al. 1989b; Micheva and Beaulieu 1995), esto explicaría la lógica disminución de los segmentos de órdenes inferiores al disminuir la aferencia general ya que, al producirse la sección se desencadenaría toda una serie de procesos de degeneración que probablemente afectarían los segmentos del árbol dendrítico más influyentes en la actividad de las interneuronas. Es preciso destacar que el fenómeno de plasticidad estructural diferencial en el espacio, con elongaciones y retracciones circunscritas a posiciones determinadas dentro del árbol dendrítico, es de una importancia funcional extrema. Dado que las dendritas pueden intervenir activamente y no como simples “cables” en la transmisión del impulso modificando el voltaje que llega al soma dependiendo de las posiciones en donde se recibe la entrada excitatoria (Segev and London 2000; Hausser et al. 2000; Goldberg and Yuste 2005).

Además observamos un proceso sutil, podría decirse que compensatorio, aumentaría el tamaño de las dendritas de mayor orden. Este mecanismo regulador ya ha sido previamente descrito en células de la corteza, estén bajo la influencia de una injerencia sensorial o no (Lee et al. 2006; Samsonovich and Ascoli 2006).

Estos cambios parecen indicar que la pérdida completa de aferentes periféricos desde el hemicuerpo contrario (dominante) se traduce en una tendencia a la disminución de las longitudes dendríticas de las interneuronas CR+, que afecta de forma particularmente marcada a los segmentos terminales de árboles poco complejos –de grado bajo-. Serían estos por tanto los más “plásticos” en cuanto a la respuesta negativa a la pérdida de entradas sensoriales. No obstante, los árboles más complejos –de alto grado-

responderían con elongaciones de sus segmentos dendríticos de alto grado. Aún sin alcanzar una compensación completa de la longitud dendrítica total, este proceso antagónico podría representar un mecanismo de balance 'homeostático' del árbol en su totalidad, asimilable, a nivel de árbol, a las 'fluctuaciones homeostáticas' del tamaño dendrítico en árboles diversos de la misma neurona, recientemente propuestas como mecanismos normales del desarrollo dirigidos a conseguir una 'homeostasis morfológica neuronal' en las pirámides corticales (Samsonovich y Ascoli, 2006).

Es muy destacable que el aumento de dendritas de órdenes superiores de los hemisferios izquierdos de los restantes grupos con recorte de bigotes se vean afectados de la misma manera que el de la lesión. Debido a que no se produce una retracción semejante en los órdenes inferiores en ninguno de los grupos podría parecer que la teoría del mecanismo compensatorio del grupo IO debería ser descartada pero hay que destacar que las variaciones en las medianas son menores (disminuye la significación en ambos grupos hasta $p=0,11$) por lo que entendemos que quizá este crecimiento sea una consecuencia de la pérdida de tacto activo exacerbado, en el caso del grupo IO, con la pérdida de tamaño en las dendritas de órdenes inferiores. Aunque parece chocante este aumento generalizado de las longitudes al perder aferencia (sea del tipo que sea) la correlación función-estructura es compleja, y hay datos que nos permiten afirmar que tras recorte de bigotes pueden producirse casos de desinhición mediados por interneuronas, aunque estos resultados se generen con paradigmas de plasticidad diferentes (recorte de vibrisas principales parciales) (Kelly et al. 1999; Maier et al. 2003).

En el hemisferio contralateral a la lesión del nervio (IO-D) no hemos observado ninguna alteración que sí hemos comprobado que se produce tras el recorte de bigotes (BR-D y E-D). Este dato coincidiría con una posible disminución en la actividad en el hemisferio contralateral en ratas adultas tras la lesión de la corteza o abolición completa y total de actividad por un análogo de GABA. En este caso el hemisferio contralateral tanto de células FS como LTS (que podrían ser de nuestro tipo aunque los autores las caracterizan exclusivamente como piramidales) disminuye la actividad (Rema and Ebner 2003; Li et al. 2005). En cambio en los experimentos en dónde se ha producido la eliminación de tacto activo por recorte de bigotes se ha observado que la actividad en el lado contralateral a la lesión aumenta (Glazewski et al. 2007) lo que achacan a la

disminución de actividad de las células GABAérgicas y no al uso preponderante del lado intacto. Sin embargo, hay estudios histológicos y anatómicos que han mostrado un aumento en el número de sinapsis GABAérgicas en el lado contralateral después de la eliminación de varias filas de bigotes (Vees et al. 1998). Esto explicaría porque no se reproduce la ausencia de cambios de IO. La eliminación únicamente del componente activo del tacto, sin lesión por sección, sería lo suficiente suave para provocar la desinhibición del hemisferio contralateral, quedando por explicar si este proceso se debe a un mayor empleo del lateral no intervenido, cosa que no podemos aseverar por la ausencia de datos comportamentales.

Con un ambiente adecuado para aumentar la riqueza de la entrada sensorial y favorecer la estimulación táctil de un lado de la rata, junto con la disminución sensorial por recorte de bigotes del otro lado, los fenómenos de plasticidad estructural registrados en el grupo al que sólo recortamos los bigotes de un lado, se reproducen. Además aparece un fenómeno añadido consistente en la elongación de los segmentos terminales de mayor orden.

La capacidad que tiene un ambiente enriquecido para revertir y modificar a distintos niveles (funcional, estructural, genético) el sistema nervioso central está ampliamente descrito en la literatura (Rampon et al. 2000; Coq and Xerri 1998; Welker et al. 1989a) y en nuestro caso, someter a los animales a un ambiente enriquecido de una manera que evitásemos una habituación del animal pero durante un período prolongado en el tiempo, además de los cambios observados anteriormente, propios de la atenuación de entrada sensorial del hemisferio contralateral compartidos con el grupo al que sólo se le recortó los bigotes, hizo surgir un nuevo fenómeno emergente consistente en la elongación de los segmentos terminales de mayor orden y la acentuación del crecimiento en los órdenes inferiores como demuestra el aumento de la significación en la comparación con su hemisferio contralateral.

El análisis de Sholl aplicado en el estudio del número de intersecciones y longitud de los segmentos contenidos también arroja datos de interés. Exceptuando algún caso aislado, todos los resultados estadísticamente significativos guardan continuidad tanto en las tendencias como en su localización espacial. Por tanto, las variaciones no deben entenderse como hechos aislados sino que deben guardar cierta unión entre ellas.

Parece que la mayor parte de diferencias se producen en el hemisferio no afectado por ninguna manipulación directa. En concreto, serían los grupos que han sufrido el recorte de bigotes los que mostrarían mayor densidad de procesos junto con variaciones en la longitud de segmentos contenidos en las esferas más distantes. Esta aseveración se comprueba al comparar E-D y BR-D con los grupos del mismo lado y sus respectivos lados contralaterales. Tanto E-D como BR-D muestran más intersecciones en las esferas más distantes al soma sobre todo cuando se comparan los valores con el grupo control ipsilateral. Esta variación es exclusiva de estos grupos porque la comparación con sus lados contralaterales, si bien de menor magnitud muestran las mismas tendencias y localización. No existen diferencias destacables en la comparación entre sí de BR-D con E-D.

Sin embargo, al comparar las longitudes de los segmentos encontramos algunas discrepancias. Dado que un mayor número de intersecciones implica una red de segmentos más tupida sería esperable cambios congruentes en la longitud de segmentos contenidos, cosa que sucede excepto con la comparación con el control que no muestra una total continuidad espacial en la disminución de la longitud dendrítica. Esto podría deberse a cierto aumento de tortuosidad que desgraciadamente no hemos podido constatar en el análisis de la tortuosidad. Como hemos comentado previamente el análisis de Sholl adolece de ciertas limitaciones en el propio cálculo de los valores ya que incluye todo tipo de segmentos (terminales e intermedios) y no puede analizar las tortuosidades puntuales de cada esfera lo que sería muy interesante para poder confirmar o desechar esta aseveración. Al analizar la tortuosidad sólo podemos agruparla por segmentos (y no por la localización de estos segmentos en el espacio). Por tanto en el análisis negativo, sin aparentes diferencias en la tortuosidad de todos los segmentos de un caso y otro no incluimos su relación con la posición más próxima o alejada con respecto al soma. Tampoco podríamos realizar un análisis diferencial por órdenes ya que, aunque es plausible considerar los segmentos de orden mayor como más alejados del soma, no podemos separar una población de segmentos intermedios de los terminales y relacionarlos a una localización específica por lo que análisis llevado a cabo no deja de ser poco sensible. Esto se pone de manifiesto en el grupo de bigotes recortados, donde los segmentos terminales de elevado orden del hemisferio derecho

tienen unos valores comparables a los controles pero su distribución espacial muestra diferencias justo en las posiciones más alejadas.

Los árboles dendríticos y su capacidad de información: consideraciones sobre la entropía de las interneuronas CR+

Como se indicó en la exposición de los métodos, en esta Tesis se ha incorporado un novedoso análisis a la estructura de la interneuronas CR+ y los cambios en la misma, derivado de la Teoría de la Información aplicada al estudio de la forma de los árboles dendríticos (Villacorta 2007). De forma resumida se puede concluir que nuestras interneuronas CR+ de las capas supragranulares del campo de barriles no experimentan cambios en su capacidad de información tras las manipulaciones de las entradas sensoriales. A la vista de estos resultados, tal ausencia de cambios podría parecer un poco decepcionante, por sugerir una supuesta falta de plasticidad o adaptabilidad estructural a cambios marcados en el entorno. Sin embargo si se analiza la situación en profundidad se puede inferir que es la conclusión más lógica en base al tipo de neurona investigado, y, paralelamente, divergen de los resultados obtenidos de la aplicación del análisis entrópico a las neuronas del núcleo principal del trigémino en similares condiciones experimentales (Negredo 2007; Villacorta 2007). Los cálculos de entropías a nivel topológico y morfométrico asocian la cuantificación de la entropía a las características estructurales del árbol dendrítico en conjunto, por lo que las alteraciones en la capacidad del procesamiento son un reflejo funcional de la plasticidad anatómica y en consecuencia la ausencia de cambios registrada es un indicativo de una gran estabilidad general frente a entornos de estimulación variables. Teniendo en cuenta pues la complejidad de la corteza y la alta conectividad que exhibe parece natural que aunque se den cambios importantes sobre la información sensorial recibida del exterior apenas se manifiesten en alteraciones anatómicas sobre los propios árboles. El caso contrario, la presencia de alteraciones estructurales relevantes y significativas, probablemente serviría de sustrato a variaciones funcionales a mucha mayor escala, por ejemplo sobre los circuitos a los que pertenece o incluso a nivel de la propia corteza.

Por lo anteriormente expuesto, tanto en nuestros resultados como la literatura citada, existen cambios estructurales en las dendritas y de hecho, se podría decir que lo que

existe es una “inestabilidad controlada” de los árboles dendríticos (Lee et al. 2006). Sin embargo, en nuestro caso, es poco probable que esos cambios a nivel estructural modificasen de una manera tan profunda a la neurona para que alterasen la propia capacidad de procesamiento de la interneurona. Los cambios estructurales a nivel dendrítico necesarios para fenómenos cognitivos como la atención, discriminación, memorización o incluso consciencia, requieren de variaciones en muchos casos rápidos y lo suficientemente lábiles para retornar a la posición anterior por lo que reordenamientos masivos supondrían un gasto prohibitivo para la célula y de ahí que estos podrían verse sustituidos por cambios más sutiles de tipo funcional (Yao et al. 2007).

Por el contrario y siguiendo ese razonamiento, sería esperable que los mismos paradigmas de estimulación táctil empleados en esta tesis sí se manifiesten en forma de cambios estructurales más o menos significativos, en estaciones de relevo con una conectividad mucho menos compleja a nivel neuroanatómico como es el caso del núcleo principal del trigémino. Esto se puede observar en otro trabajo que analizaba el potencial de codificación de información en las neuronas reconstruidas de proyección del trigémino siguiendo los mismos paradigmas de alteración sensorial (datos no publicados pertenecientes a la tesis (Negredo 2007)).

Consideraciones finales

Que la plasticidad adulta tras cambios de la entrada sensorial se refleje en remodelaciones estructurales en las dendritas es una cuestión largamente debatida. Los detractores afirman que la reestructuración del árbol dendrítico es demasiado radical para un sistema que debe variar constantemente, a pesar de esto, los últimos datos aportados por algunos grupos han llegado a afirmar que las modificaciones son posibles e incluso continuas en ausencia de modificaciones de la entrada sensorial.

Las modificaciones podrían ser de dos tipos: crecimiento y retracción y como consecuencia de ambos, un reposicionamiento espacial de las dendritas que se obtendría mediante una retracción y crecimiento posterior. En conjunto, estos dos procesos

provocarían cambios sin que se aumentase la longitud dendrítica total del árbol neuronal. Esto sucede en las dendritas basales de las pirámides en capa II/III cuya arborización dendrítica está orientada hacia los barriles, las cuales, tras desfarentización, pierden su orientación preferente por reestructuración de las dendritas o, en el caso de las interneuronas sin que haya algún tipo de interferencia en la recepción de la señal (Tailby et al. 2005; Hickmott and Steen 2005; Lee et al. 2006).

Ahora bien, la direccionalidad de estos procesos y su implicación funcional es complicada de determinar. Parece que se sigue la tendencia de que tras el aumento de la señal, su riqueza o variedad los cambios se dirigen hacia el aumento de la complejidad estructural producida por un crecimiento de las dendritas en número y extensión, aumento de estructuras especializadas en la recepción (número de espinas) y densidad (Jones et al. 1996; Kolb et al. 2003).

Una vez analizados los datos, queda claro que los cambios estructurales generados por nuestros paradigmas de alteración sensorial sólo se producen en los segmentos terminales, sin variaciones de ningún tipo en los intermedios ni en las variables topológicas más frecuentes. Este fenómeno implicaría que las únicas estructuras permisivas al cambio deben modificar su tamaño con un mecanismo común que necesita tener un extremo libre para su elongación o retracción. Independientemente de los resultados, condición experimental de generación de cambios, o población estudiada, los artículos sobre morfometría celular coinciden en encontrar variaciones de tamaño exclusivamente en las dendritas terminales (Uylings et al. 1978; Connor et al. 1982; Connor et al. 1981). La modificación estructural requeriría de la activación de un complejo sistema de genes que modificasen el citoesqueleto del árbol dendrítico. Estos genes deberían ser del tipo tardío, como la MAP-2, cuya activación necesitaría de la expresión de una primera clase de genes de respuesta inmediata (Keyvani and Schallert 2002; Bury and Jones 2002). Parece además que este crecimiento, de alguna forma, está compartimentalizado, con grupos de dendritas de distintos órdenes contiguos produciendo ligeras variaciones que sólo pueden detectarse mediante un análisis conjunto y nunca mediante comparaciones directas excepto en los grupos y hemisferios cuyos paradigmas de alteración sensorial fueron más extremos (IO-I y E-D).

Como hemos comprobado con la utilización de sensibles cálculos matemáticos para medir la entropía o potencial de procesamiento de información, los cambios estructurales registrados no son tan drásticos como para variar la capacidad de la interneurona en el manejo de la información. Como señalamos los cambios estructurales son mayoritariamente morfométricos ya que no hemos podido observar que ninguna característica topológica variase, salvo en el caso del número de intersecciones por esfera concéntrica del análisis de Sholl pero en este caso estamos ante una variable topológica a la que se le confiere dimensionalidad al relacionarla con un espacio. Una variación topológica que pudieramos registrar con el cálculo de la entropía morfométrica y coincidiera con nuestros valores invariantes de número de segmento, etc, necesitaría de una retracción y pérdida de segmentos para crear y alongar otros segmentos en distintos puntos. Aunque parece que estos procesos de elongación y retracción suceden naturalmente en la neurona, son aislados y no suelen terminar en la poda de dendritas total (Lee et al. 2006).

Parece por tanto que las interneuronas CR+ que participan en redes electrotónicas entre ellas (Gonchar and Burkhalter 1999; Gulyas et al. 1996) podrían intervenir en la formación de redes desinhibitorias y aunque se sabe poco de sus funciones en los microcircuitos corticales, nuestros resultados sugieren la posibilidad de que la privación de la entrada sensorial a la corteza de un lado genera alteraciones bilaterales que se podría traducir en una actividad general aumentada de nuestras interneuronas ya fuese por actividad directa (como se puede observar en el grupo enriquecido) o indirecta, a través de circuitos homotípicos calretinina positiva.

Reference List

- Ascoli, G. A. (2002). "Neuroanatomical algorithms for dendritic modelling." *Network.*, 13, 247-260.
- Ascoli, G. A., Krichmar, J. L., Scorcioni, R., Nasuto, S. J., and Senft, S. L. (2001). "Computer generation and quantitative morphometric analysis of virtual neurons." *Anat. Embryol. (Berl.)*, 204, 283-301.
- Avendaño, C. (2006). "Stereology of neural connections. An overview." *Neuroanatomical Tract Tracing: Molecules, Neurons & Systems*, L. Zaborszky, F. G. Wouterlood, and J. L. Lanciego, eds., Springer Science & Business Media, 477-529.
- Benavides-Piccione, R., Hamzei-Sichani, F., Ballesteros-Yanez, I., DeFelipe, J., and Yuste, R. (2006). "Dendritic size of pyramidal neurons differs among mouse cortical regions." *Cereb. Cortex*, 16(7), 990-1001.
- Black, J., Zelazny, A., and Greenough, W. T. (1991). "Capillary and mitochondrial support of neural plasticity in adult rat visual cortex." *Exp Neurol*, 111, 204-209.
- Bury, S. D., and Jones, T. A. (2002). "Unilateral sensorimotor cortex lesions in adult rats facilitate motor skill learning with the "unaffected" forelimb and training-

- induced dendritic structural plasticity in the motor cortex." *Journal of Neuroscience*, 22(19), 8597-8606.
- Chen-Bee, C. H., and Frostig, R. D. (1996). "Variability and interhemispheric asymmetry of single-whisker functional representations in rat barrel cortex." *J Neurophysiol*, 76(2), 884-894.
- Connor, J. R., Melone, J. H., Yuen, A. R., and Diamond, M. C. (1981). "Dendritic length in aged rats' occipital cortex: an environmentally induced response." *Exp Neurol*, 73, 827-830.
- Connor, J. R., Wang, H., and Diamond, M. C. (1982). "Increased length of terminal dendritic segments in old adult rats somatosensory cortex: An environmentally induced response." *Exp Neurol*, 78, 466-470.
- Coq, J. O., and Xerri, C. (1998). "Environmental enrichment alters organizational features of the forepaw representation in the primary somatosensory cortex of adult rats." *Exp Brain Res*, 121, 191-204.
- Creel, D. J., Summers, C. G., and King, R. A. (1990). "Visual anomalies associated with albinism." *Ophthalmic Paediatr. Genet.*, 11(3), 193-200.
- Cruikshank, S., and Weinberger, N. (1996). "Evidence for the Hebbian hypothesis in experience-dependent physiological plasticity of neocortex: A critical review." *Brain Research reviews*, 22(3), 191-228.
- De Felipe, J. (1993). "Neocortical neuronal diversity: chemical heterogeneity revealed by colocalization studies of classic neurotransmitters, neuropeptides, calcium-binding proteins, and cell surface molecules." *Cerebral Cortex*, 3, 273-289.

- De Felipe, J. (1997). "Types of neurons, synaptic connections and chemical characteristics of cells immunoreactive for calbindin-D28K, parvalbumin and calretinin in the neocortex." *Journal of Chemical Neuroanatomy*, 14(1), 1-19.
- Del Rio, M., and De Felipe, J. (1997). "Synaptic connections of calretinin-immunoreactive neurons in the human neocortex." *Journal of Neuroscience*, 17(13), 5143-5154.
- Diamond, M. C. (1988). "Enrichment and impoverishment over the lifespan." *Enriching heredity*, Free Press, New York, 91-114.
- Diamond, M. E., Huang, W., and Ebner, F. F. (1994). "Laminar comparison of somatosensory cortical plasticity." *Science*, 265(5180), 1885-1888.
- Donohue, D., and Ascoli, G. A. (2005). "Local diameter fully constrains dendritic size in basal but not apical trees of CA1 pyramidal neurons." *Journal of Computational Neuroscience*, 19(2), 223-238.
- Fox, K. (1992). "A critical period for experience-dependent synaptic plasticity in rat barrel cortex." *Journal of Neuroscience*, 12, 1826-1838.
- Glaser, E., and McMullen, N. (1984). "The fan-in projection method for analyzing dendrite and axon systems." *Journal of Neuroscience Methods*, 12, 37-42.
- Glazewski, S., Benedetti, B. L., and Barth, A. L. (2007). "Ipsilateral whiskers suppress experience-dependent plasticity in the barrel cortex." *J Neurosci.*, 27(14), 3910-3920.

- Goldberg, J., and Yuste, R. (2005). "Space matters: local and global dendritic Ca²⁺ compartmentalization in cortical interneurons." *Trends in Neuroscience*, 28, 158-167.
- Gonchar, Y., and Burkhalter, A. (1997). "Three distinct families of GABAergic neurons in rat visual cortex." *Cerebral Cortex*, 7, 347-358.
- Gonchar, Y., and Burkhalter, A. (1999). "Connectivity of GABAergic calretinin-immunoreactive neurons in rat primary visual cortex." *Cerebral Cortex*, 9(7), 683-696.
- Grant, S., Patel, N. N., Philp, A. R., Grey, C. N., Lucas, R. D., Foster, R. G., Bowmaker, J. K., and Jeffery, G. (2001). "Rod photopigment deficits in albinos are specific to mammals and arise during retinal development." *Vis. Neurosci*, 18(2), 245-251.
- Gulyas, A. I., Hajos, F., and Freund, T. F. (1996). "Interneurons containing calretinin are specialized to control other interneurons in the rat hippocampus." *Journal of Neuroscience*, 16, 3397-3411.
- Hausser, M., Spruston, N., and Stuart, G. J. (2000). "Diversity and dynamics of dendritic signaling." *Science*, 290(5492), 739-744.
- Hickmott, P., and Steen, P. (2005). "Large-scale changes in dendritic structure during reorganization of adult somatosensory cortex." *Nature Neuroscience*, 8, 140-142.
- Hof, P. R., Bogaert, Y. E., Rosenthal, R. E., and Fiskum, G. (1996). "Distribution of neuronal populations containing neurofilament protein and calcium-binding

proteins in the canine neocortex: regional analysis and cell typology." *J Chem. Neuroanat.*, 11(2), 81-98.

Horcholle-Bossavit, G., Gogan, P., Ivanov, Y., Korogod, S., and Tyc-Dumont, S. (2000). "The problem of the morphological noise in reconstructed dendritic arborizations." *Journal of Neuroscience Methods*, 95, 83-93.

Jin, X., Mathers, P. H., Szabo, G., Katarova, Z., and Agmon, A. (2001). "Vertical bias in dendritic trees of non-pyramidal neocortical neurons expressing GAD67-GFP in vitro." *Cerebral Cortex*, 11, 666-678.

Jones, T. A., Kleim, J. A., and Greenough, W. T. (1996). "Synaptogenesis and dendritic growth in the cortex opposite unilateral sensorimotor cortex damage in adult rats: a quantitative electron microscopic examination." *Brain Res.*, 733(1), 142-148.

Juraska, J. M., Fitch, J. M., Henderson, C., and Rivers, N. (1985). "Sex differences in the dendritic branching of dentate granule cells following differential experience." *Brain Res.*, 333(1), 73-80.

Kawaguchi, Y., and Kubota, Y. (1996). "Physiological and morphological identification of somatostatin- or vasoactive intestinal polypeptide-containing cells among GABAergic cell subtypes in rat frontal cortex." *J Neurosci.*, 16(8), 2701-2715.

Kawaguchi, Y., and Kubota, Y. (1997). "GABAergic cell subtypes and their synaptic connections in rat frontal cortex." *Cereb. Cortex.*, 7(6), 476-486.

- Kelly, M. K., Carvell, G. E., Kodger, J. M., and Simons, D. J. (1999). "Sensory loss by selected whisker removal produces immediate disinhibition in the somatosensory cortex of behaving rats." *J Neurosci*, 19, 9117-9125.
- Keyvani, K., and Schallert, T. (2002). "Plasticity-associated molecular and structural events in the injured brain." *J Neuropathol Exp Neurol*, 61, 831-840.
- Kolb, B., Gorny, G., Soderpalm, A. H., and Robinson, T. E. (2003). "Environmental complexity has different effects on the structure of neurons in the prefrontal cortex versus the parietal cortex or nucleus accumbens." *Synapse*, 48, 149-153.
- Kubota, Y., Hattori, R., and Yui, Y. (1994). "Three distinct subpopulations of GABAergic neurons in rat frontal agranular cortex." *Brain Res.*, 649, 159-173.
- La Vail, M. M. (1976). "Survival of some photoreceptor cells in albino rats following long-term exposure to continuous light." *Invest Ophthalmol.*, 15(1), 64-70.
- Lagares, A., and Avendaño, C. (2000). "Lateral asymmetries in the trigeminal ganglion of the male rat." *Brain Research*, 865, 202-210.
- Lebedev, M., Mirabella, G., Erchova, I., and Diamond, M. E. (2000). "Experience-dependent plasticity of rat barrel cortex: redistribution of activity across barrel-columns." *Cerebral Cortex*, 10, 23-31.
- Lee, W. C., Huang, H., Feng, G., Sanes, J. R., Brown, E. N., So, P. T., and Nedivi, E. (2006). "Dynamic Remodeling of Dendritic Arbors in GABAergic Interneurons of Adult Visual Cortex." *PLoS Biol*, 4, e29.

- Leuba, G., and Saini, K. (1997). "Colocalization of parvalbumin, calretinin and calbindin D-28k in human cortical and subcortical visual structures." *J Chem. Neuroanat.*, 13(1), 41-52.
- Li, L., Rema, V., and Ebner, F. F. (2005). "Chronic suppression of activity in barrel field cortex downregulates sensory responses in contralateral barrel field cortex." *Journal of Neurophysiology*, 94, 3342-3356.
- Machin, R., Blasco, B., Bjugn, R., and Avendaño, C. (2004). "The size of the whisker barrel field in adult rats: minimal nondirectional asymmetry and limited modifiability by chronic changes of the sensory input." *Cerebral Cortex*, 1025, 130-138.
- Machin, R., Perez-Cejuela, C., Bjugn, R., and Avendaño, C. (2006). "Effects of long-term sensory deprivation on asymmetric synapses in the whisker barrel field of the adult rat." *Brain Research*, 1107, 104-110.
- Maier, D. L., Grieb, G. M., Stelzner, D. J., and McCasland, J. S. (2003). "Large-scale plasticity in barrel cortex following repeated whisker trimming in young adult hamsters." *Exp Neurol*, 184, 737-745.
- Markram, H., Toledo-Rodriguez, M., Wang, Y., Gupta, A., Silberberg, G., and Wu, C. Z. (2004). "Interneurons of the neocortical inhibitory system." *Nature Reviews Neuroscience*, 5(10), 793-807.
- McMullen, N., Glaser, E., and Tagamets, M. (1984). "Morphometry of spine-free nonpyramidal neurons in rabbit auditory cortex." *J Comp Neurol*, 222, 383-395.

- Melchitzky, D. S., Eggen, S. M., and Lewis, D. A. (2005). "Synaptic targets of calretinin-containing axon terminals in macaque monkey prefrontal cortex." *Neuroscience*, 130(1), 185-195.
- 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(25), 11834-11838.
- Negredo, P. (2007). "Plasticidad neuronal en cerebro adulto: Cambios estructurales en el núcleo principal del trigémino inducidos por variaciones en las entradas sensoriales." Ph.D. dissertation, Departamento Anatomía, UAM.
- Nguyen, T., Yamamoto, T., Stevens, R., and Hodge, C. (2000). "Reorganization of adult rat barrel cortex intrinsic signals following kainic acid induced central lesion." *Neuroscience letters*, 288, 5-8.
- Parnavelas, J., and Uylings, H. (1980). "The growth of non-pyramidal neurons in the visual cortex of the rat: a morphometric study." *Brain Research*, 193, 373-382.
- Pearson, P., Arnold, P., Oladehin, A., Li, C., and Waters, R. (2000). "Large-scale cortical reorganization following forelimb deafferentation in rat does not involve plasticity of intracortical connections." *Exp Brain Res*.
- Pena, Y., Prunell, M., Dimitsantos, V., Nadal, R., and Escorihuela, R. M. (2006). "Environmental enrichment effects in social investigation in rats are gender dependent." *Behav. Brain Res.*, 174(1), 181-187.

- Peters, A., and Kimerer, L. M. (1981). "Bipolar Neurons in Rat Visual-Cortex - A Combined Golgi-Electron Microscope Study." *Journal of Neurocytology*, 10(6), 921-946.
- Prusky, G. T., Harker, K. T., Douglas, R. M., and Whishaw, I. Q. (2002). "Variation in visual acuity within pigmented, and between pigmented and albino rat strains." *Behav. Brain Res.*, 136(2), 339-348.
- Prusky, G. T., West, P. W., and Douglas, R. M. (2000). "Behavioral assessment of visual acuity in mice and rats." *Vision Res.*, 40(16), 2201-2209.
- Rampon, C., Jiang, C., Dong, H., Tang, Y., Lockhart, D., Schultz, P., Tsien, J., and Hu, Y. (2000). "Effects of environmental enrichment on gene expression in the brain." *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 97, 12880-12884.
- Rema, V., and Ebner, F. F. (2003). "Lesions of mature barrel field cortex interfere with sensory processing and plasticity in connected areas of the contralateral hemisphere." *Journal of Neuroscience*, 23, 10378-10387.
- Rice, F. L., and Van der Loos H. (1977). "Development of the barrels and barrel field in the somatosensory cortex of the mouse." *J Comp Neurol*, 171, 545-560.
- Riddle, D., and Purves, D. (1995). "Individual variation and lateral asymmetry of the rat primary somatosensory cortex." *Journal of Neuroscience*, 15, 4184-4195.
- Rogers, J. H. (1992). "Immunohistochemical markers in rat cortex: co-localization of calretinin and calbindin-D28k with neuropeptides and GABA." *Brain Res.*, 587, 147-157.

- Samsonovich, A. V., and Ascoli, G. A. (2006). "Morphological homeostasis in cortical dendrites." *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103, 1569-1574.
- Scorcioni, R., Lazarewicz, M., and Ascoli, G. A. (2004). "Quantitative morphometry of hippocampal pyramidal cells: differences between anatomical classes and reconstructing laboratories." *J Comp Neurol*, 473, 177-193.
- Segev, I., and London, M. (2000). "Untangling dendrites with quantitative models." *Science*, 290(5492), 744-750.
- Sholl, D. A. (1953). "Dendritic organization in the neurons of the visual and motor cortices of the cat." *J Anat.*, 87(4), 387-406.
- Silver, J., and Sapiro, J. (1981). "Axonal guidance during development of the optic nerve: the role of pigmented epithelia and other extrinsic factors." *J Comp Neurol*, 202(4), 521-538.
- Tailby, C., Wright, L. L., Metha, A. B., and Calford, M. B. (2005). "Activity-dependent maintenance and growth of dendrites in adult cortex." *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A*, 102, 4631-4636.
- Tamas, G., Somogyi, P., and Buhl, E. H. (1998). "Differentially interconnected networks of GABAergic interneurons in the visual cortex of the cat." *Journal of Neuroscience*, 18, 4255-4270.
- Tobet, S. A., Roca, A. L., and Crandall, J. E. (2005). "Cellular organization in rat somatosensory cortex: effects of sex and laterality." *Exp Neurol*, 121, 65-76.

- Uylings, H. B. M., Kuypers, K., Diamond, M. C., and Veltman, W. A. (1978). "Effects of differential environments on plasticity of dendrites of cortical pyramidal neurons in adult rats." *Exp Neurol*, 62, 658-677.
- Van Pelt, J., Van Ooyen, A., and Uylings, H. (2001). "The need for integrating neuronal morphology databases and computational environments in exploring neuronal structure and function." *Anatomy and Embryology*, 204(4), 255-265.
- Vees, A. M., Micheva, K. D., Beaulieu, C., and Descarries, L. (1998). "Increased number and size of dendritic spines in ipsilateral barrel field cortex following unilateral whisker trimming in postnatal rat." *J Comp Neurol*, 400(1), 110-124.
- Villacorta, J. A. (2007). "Medidas de entropía para la caracterización de árboles dendríticos."
- Waite, P. M. (1984). "Rearrangement of neuronal responses in the trigeminal system of the rat following peripheral nerve section." *J Physiol*, 352, 425-445.
- Welker, C., Soriano, E., Dorfl, J., and Van der Loos, H. (1989a). "Plasticity in the barrel cortex of the adult mouse: transient increase of GAD-immunoreactivity following sensory stimulation." *Exp Brain Res*, 78, 659-664.
- Welker, E., Soriano, E., and Van der, L. H. (1989b). "Plasticity in the barrel cortex of the adult mouse: effects of peripheral deprivation on GAD-immunoreactivity." *Exp. Brain Res.*, 74(3), 441-452.
- Wouterlood, F. G., Vinkenoog, M., and van den Oever, M. C. (2002). "Tracing tools to resolve neural circuits." *Network*, 13, 327-342.

Yao, H., Shi, L., Han, F., Gao, H., and Dan, Y. (2007). "Rapid learning in cortical coding of visual scenes." *Nat Neurosci*, 10(6), 772-778.

Zilles, K. (1992). "Neuronal plasticity as an adaptive property of the central nervous system." *Ann. Anat.*, 174(5), 383-391.

Samsonovich AV, Ascoli GA. Morphological homeostasis in cortical dendrites. Proc Natl Acad Sci U S A. 2006, 103:1569-1574.

plasticidad podría ser “la transformación funcional permanente en determinados sistemas de neuronas como resultado de estímulos apropiados o combinaciones de los mismos” (Jerzy Konorski citado en (Kandel et al. 2000)).

Plasticidad desencadenada por...

Como se puede inferir de esta definición, los fenómenos de plasticidad pueden desencadenarse de diversas maneras, ya sea por la disminución o la eliminación de la entrada sensorial que es lo que se ha denominado una “modificación negativa” del entorno. Este tipo de manipulación se lleva a cabo eliminando la entrada de información a través de la interrupción de la vía aferente (lo que implica una lesión del sistema), o, de forma menos invasiva, eliminando (o cambiando) la información sensorial (total o parcialmente), pero respetando la integridad de la vía sensorial.

MODIFICACIONES NEGATIVAS

Históricamente, las primeras demostraciones experimentalmente buscadas de fenómenos de plasticidad producidos por ausencia de entrada sensorial o “modificaciones negativas” son los trabajos de Liu y Chambers de mediados del pasado siglo. Estos autores encontraron que tras denervaciones parciales del asta dorsal de la médula espinal de gatos, los axones que quedaban intactos incrementaban notablemente su extensión (Liu and Chambers 1958). Posteriores estudios se centraron en modificaciones no tan severas, en las que diferentes vías de entrada de información no se veían lesionadas, pero que llegaron a producir modificaciones en el sistema nervioso tanto funcionales, en particular respecto a la organización de campos receptores y de mapas representacionales (Wiesel and Hubel 1963), como anatómicas (Valverde 1967; Ruiz-Marcos and Valverde 1969; van der Loos and Woolsey 1973). Estos trabajos se llevaron a cabo durante los períodos de desarrollo de los animales, estableciendo una etapa del desarrollo (el llamado “período crítico”) en el que una falta de entrada sensorial sin lesión de la vía producía cambios irreversibles en la estructura como por ejemplo un menor número de espinas en las dendritas apicales de las células piramidales de capa V de la corteza visual (Valverde 1967; Ruiz-Marcos and Valverde

1969) o alteración en la formación de los *barriles* corticales (Van der Loos and Woolsey 1973).

Sin embargo, también en el cerebro adulto se registran cambios plásticos por lesión directa sobre la vía o receptor o por ausencia de entradas de estímulos comparables a los “naturales”. La sección nerviosa, la amputación de dedos o la unión de dos dedos en monos adultos, o las lesiones de la cóclea producen cambios en los mapas corticales (Merzenich et al. 1983; Merzenich et al. 1984; Jenkins et al. 1990; Rajan et al. 1993). En la vía somestésica se han descrito igualmente reorganizaciones a largo plazo de los campos receptores por desaferentización en las estaciones de relevo subcorticales de esta vía, como el tálamo (Shin et al. 1995), la médula y los núcleos del cordón posterior

Detrás de todos estos cambios se encuentran una amplia variedad de mecanismos como cambios celulares a nivel sináptico debidos a la dependencia de la actividad, cambios en las propiedades eléctricas de las neuronas (excitabilidad de las membranas), cese o reducción de la inhibición y procesos que llevan al desenmascaramiento funcional de conexiones preexistentes (Nudo 1999; Sadaka et al. 2003; Rema and Ebner 2003; Voronin and Cherubini 2004).

A nivel electrofisiológico, los resultados de estas modificaciones en la entrada también han sido investigados en profundidad. Estos trabajos coincide en aceptar que la privación de una entrada a través de las fibras aferentes primarias desencadena una desinhibición cortical general producida por una disminución en la expresión de neurotransmisores inhibitorios como el GABA y que se traduce en una expansión de los mapas representacionales (Woolsey and Wann 1976; Dietrich et al. 1981; Kossut and Juliano 1999). Además se ha demostrado que la inducción de plasticidad cortical por privación selectiva de algunos bigotes produce depresiones sinápticas duraderas de tipo LTD en sinapsis excitatorias intracorticales de las neuronas piramidales de las capas IV y II/III. Esta depresión sináptica bloquea otras LTD, facilitando así las potenciaciones duraderas, o LTP; además es específica de cada columna y se produce en parte debido a la competencia entre vibrisas activas e inactivas (Allen et al. 2003).

Las perturbaciones desencadenantes de cambios pueden ser producidas no sólo por manipulaciones sensoriales directas, sino que también abarcan alteraciones

farmacológicas o variaciones en la expresión de genes (tempranos y constitutivos) y en el fenotipo molecular de diversos componentes celulares del sistema.

Se ha descrito que el bloqueo de los receptores NMDA minimiza los cambios inducidos por recorte de vibrisas, en paradigmas de ‘vibrisa intacta’, que previamente se habían demostrado y que consisten en mantener unas pocas vibrisas rodeadas por una amplia zona en la que las otras se han eliminado (Wall 1977; Rema et al. 1998). La aparición de nuevas técnicas en biología molecular como los knock-outs, knock-in o el empleo de silenciadores de la traducción con oligonucleótidos antisentido, han llegado a generar respuestas semejantes en algunos casos a las producidas por lesiones (Gerlai 2000; Pinaud et al. 2002; Rebsam et al. 2005). Así, una molécula implicada en los cambios producidos en la corteza por modificación en la entrada sensorial es la Calcio-Calmodulina Kinasa II (CaMKII). Cuando la CaMKII postsináptica se activa por la unión calcio-calmodulina se autofosforila, por lo que no necesita del calcio para mantenerse activa y prolonga el tiempo en el que está funcional. Ratones mutantes que carecen del gen funcional de esta proteína, a los que se han recortado todas las vibrisas menos una, no muestran potenciación de la respuesta a esta vibrisa en neuronas de las capas II/III (Glazewski et al. 1996). Mutaciones en el punto de autofosforilación de la proteína (treonina 286) también inhiben la plasticidad dependiente de la experiencia en la corteza de *barriles* (Glazewski et al. 2000). La inhibición de esta proteína o de su autofosforilación también evita la producción de LTP en la neocorteza (Kirkwood et al. 1997).

Tras enumerar de manera somera los fenómenos de plasticidad desencadenados por “modificaciones negativas”, ya fuese eliminando la vía de transmisión o impidiendo una correcta recepción de la información sensorial, incluso con bloqueos farmacológicos o alteraciones a nivel genético, resulta necesario destacar que estos paradigmas de privación sensorial pueden actuar a diversos niveles. Las lesiones generadas por sección del nervio encargado de recoger y transmitir la información acarrearán respuestas ‘negativas’ de degeneración nerviosa, y pueden además desencadenar otras ‘positivas’, como serían las derivadas de la aparición de dolor (cascadas bioquímicas, cambios en comportamiento) que no pueden aislarse del fenómeno de la plasticidad. Además, en general suprimen cualquier modalidad

sensitiva desde un determinado territorio corporal, por lo que resultan experimentos más “agresivos”. La modificación de la entrada sensorial como por ejemplo en el recorte de los bigotes de la rata elimina sólo ciertos aspectos de la experiencia sensitiva aunque mantiene la vía intacta, no lesionada y en perfecto estado para transmitir otras modalidades de información.

Dado que es el sentido del tacto en ratas a través de sus vibrisas, el sistema que vamos a estudiar, es conveniente destacar que éstas, al igual que los dedos en la mano de primates pueden realizar exploraciones activas. En esta modalidad es el entorno el que se siente más que los eventos que tienen lugar en la superficie sensitiva o, usando la terminología de Gibson la distinción entre tocar y ser tocado, estando el primero compuesto por dos componentes de estimulación uno específicamente exterior y otro específicamente propio (Gibson 1962; Bolanowski et al. 1999). Por ende, la eliminación de las vibrisas eliminará parte de la experiencia háptica, o de tacto activo, pero no la capacidad de sentir estímulos de manera pasiva.

Pero la plasticidad no es un fenómeno limitado a responder a injerencias que buscan la abolición del funcionamiento del sistema. Una vez brevemente descritas las “modificaciones negativas”, pasaremos a comentar los cambios producidos por “modificaciones positivas”.

Modificaciones positivas

Hay que recordar que las condiciones ambientales en las que viven los animales de laboratorio tienen un claro déficit en la entrada sensorial; por esto, numerosos estudios se han dirigido a estudiar los cambios producidos en la estructura cerebral por una “manipulación positiva” de la entrada sensorial. Tal estimulación podría realizarse de modo activo por parte del experimentador como la que se observa en estudios que analizan cambios diversos tras un estímulo directo sobre el receptor que transduce la señal o inducido mediante fármacos como la apomorfina o la estimulación eléctrica epileptogénica.

La estimulación generada artificialmente de una vibrisa durante 24 horas en un ratón despierto y activo produjo un incremento en la densidad de espinas que recibían sinapsis tanto inhibitorias como excitatorias, en el *barril* cortical correspondiente a la vibrisa estimulada (Knott et al. 2002). No obstante, el sistema revertía, reduciéndose el número a los pocos días del cese de la estimulación.

La inducción del movimiento de las vibrisas con apomorfina, agonista de los receptores D1 y D2 de la dopamina, ha demostrado aumentos en los niveles de los genes de estimulación tempranos c-fos y zif268. Este efecto era totalmente dependiente de la capacidad del bigote para recibir información entrante ya que la administración de este producto en ratas con bigotes cortados no desencadenaba ningún cambio significativo en la expresión de estos genes (Steiner and Gerfen 1994; Filipkowski et al. 2000; Filipkowski et al. 2001). Por otro lado el uso de estimulación por crisis convulsivas ha demostrado la inducción de la expresión de genes de respuesta temprana NGFI-A, NGFI-B (Mack et al. 1995).

Sin embargo este tipo de estimulación presenta evidentes problemas prácticos cuando se trata de estudios crónicos. La alternativa ha sido exponer al animal a entornos de mucha mayor capacidad estimuladora que los comunes encontrados en el estabulamiento estándar de las ratas, es decir entornos más complejos o ‘enriquecidos’ (*enriched enviroment*).

En 1947, Hebb observó como las ratas que vivían libres por su casa, resolvían las pruebas de laberinto a las que se las sometía más fácilmente que aquellas que habían permanecido en el laboratorio. Posteriormente (1953), dos psicólogos, David Krech y Mark Rosenzweig, se unieron a un bioquímico, Edward Bennet, para estudiar las relaciones entre la química cerebral y la conducta animal considerada como inteligente. Como comprobaron posteriormente, estos cambios no sólo afectaron a la bioquímica sino también a la propia anatomía del cerebro. Este descubrimiento les llevó a incorporar a la anatomista Marian Diamond y a volver a sopesar la validez de una antigua proposición frenológica que se podría resumir así:

“Debemos observar a un individuo cuando ejercita y cuando no ejercita su cerebro, o al menos observar a varias personas que lo hacen y a varias otras que no lo hacen abarcando todos los períodos de la vida” (Spurzheim 1815)

Estos mismos investigadores decidieron adoptar, a comienzo de los años 60, el paradigma del “ambiente complejo” para demostrar la teoría propuesta por Spurzheim o Darwin en el siglo XIX por la cual se consideraba que el cerebro de los animales adultos mostraría cambios en su volumen a resultas del aprendizaje o la experiencia. De esta forma el cerebro, como los músculos, aumentaría de tamaño “debido a que la sangre es transportada en mayor medida a las partes de más actividad y la nutrición es llevada a cabo por la sangre” (Spurzheim 1815). Darwin comparó los volúmenes de los cerebros de conejos silvestres y domesticados hallando diferencias a favor de los conejos silvestres (Darwin 1874). Otro ejemplo en que se muestra la capacidad del ambiente para provocar cambios en la arquitectura cerebral es la del pescado ciego *Amblyopsis spelae* y su familiar evolutivo más cercano *Chologaster agassizi*. El primero puebla cuevas marinas mientras que el segundo habita aguas terrestres como marismas y corrientes. *A. spelae* dispone de un pequeño tectum óptico mientras que su tracto olfatorio y telencéfalo relacionado es mayor, así como su cerebelo (Romero and Bennis 1998).

Para demostrar esta teoría, el grupo de Krech, Rosenzweig y Bennet emplearon grupos de 12 ratas por caja con objetos de estimulación, comparándolas con ratas estabuladas en cajas de almacenamiento estándar diversas variables. Las ratas en cajas con objetos mostraban un aumento en la actividad de la enzima acetilcolinesterasa (enzima que puede servir como indicador de la actividad cerebral a través del neurotransmisor acetilcolina). Pero además, observaron cambios en la morfología cortical: incrementos significativos en la profundidad de la corteza cerebral, peso cortical, en el número de células de glia y en el tamaño de las neuronas (Rosenzweig et al. 1962; Diamond et al. 1966; Rosenzweig et al. 1967).

A raíz de estos experimentos comenzaron a emplear con mayor profusión las jaulas de ambiente enriquecido (*Enrichment Cage*), sobre todo en estudios de plasticidad inducida por la experiencia. Además de los estudios pioneros antes mencionados cabe destacar los descubrimientos de William Greenough que demostró que la plasticidad

cerebral no sólo se circunscribía a las neuronas y células de la glia, ya que encontró que, dentro del sistema sanguíneo, había cambios en la vascularización (Black et al. 1987; Black et al. 1991).

La plasticidad generada por un ambiente enriquecido no sólo se circunscribe a las áreas sensitivas o motoras primarias de la corteza. En estructuras no pertenecientes a la neocorteza se han descrito diferencias sustanciales tanto a nivel morfológico o como bioquímico. Diamond observó un aumento en el grosor de la corteza entorrinal (punto de entrada de las conexiones corticales al hipocampo) de los animales enriquecidos frente a los animales en ambiente ausente de estímulos. Aparte de los cambios previamente mencionados en CA1 y giro dentado, en otras zonas del hipocampo (CA3) se ha observado aumento en el área total de los contactos sinápticos, que podría deberse a un aumento tanto del número como del tamaño de las sinapsis preexistentes (Altschuler 1979). A nivel bioquímico también se observaron mayores niveles de NGF y su receptor (Pham et al. 1999) en la corteza entorrinal así como del factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) en hipocampo (Falkenberg et al. 1992). En el estriado dorsolateral las ratas que habían vivido en un ambiente complejo durante 30 días mostraron un 30% más de densidad de espinas y un 60% más de espinas múltiples (Comery et al. 1995; Comery et al. 1996). Pinaud también descubrió un aumento en NGFI-A, un regulador de la transcripción que está implicado en el crecimiento de las neuritas y maduración de la sinapsis, en el estriado tras someter a las ratas durante 21 días a un ambiente enriquecido (Pinaud et al. 2002).

En qué consiste un “Ambiente enriquecido” en condiciones controladas de laboratorio

En general estos ambientes consisten en jaulas o dispositivos de almacenamiento de mayor tamaño, en donde se alojan grupos numerosos que permiten una interacción social compleja, con objetos como guaridas, túneles y juguetes que estimulen el comportamiento natural de los animales como la búsqueda de alimentos y la actividad física voluntaria. Aún así hay autores que prefieren utilizar el término “entorno complejo” ya que opinan que el entorno no está enriquecido si se compara con el ambiente natural de donde proceden los animales silvestres, no existiendo estudios

Sexo

Existen variados estudios que han cuantificado las diferencias en los cambios producidos por un ambiente complejo dependiendo del sexo. Este dimorfismo sexual en la respuesta a los paradigmas de enriquecimiento parece ser que está íntimamente relacionado con las hormonas sexuales, principalmente los estrógenos, y engloba diferencias en la morfología general (tamaño del campo dendrítico de las células granulares del giro dentado: (Juraska et al. 1985), en la fisiología (espinogénesis producida por el aumento de estradiol a través de receptores NMDA): (Romeo et al. 2005) o en los patrones de exploración para la discriminación social (Pena et al. 2006). Todos estos estudios coinciden en atribuir una gran importancia al ciclo estral de las hembras que debe de tenerse en cuenta en el diseño experimental de un protocolo de enriquecimiento sensorial.

Edad

Existen estudios que han demostrado que el enriquecimiento provoca cambios incluso a edades avanzadas (hasta 630 días). Ratas adultas que se mantuvieron durante 30 días en ambiente enriquecido sufrieron mayores variaciones en lo que respecta a variable de la longitud de segmentos dendríticos. Por otra parte, la edad puede que intervenga en la variación de la densidad dendrítica basilar de células piramidales. El número medio de segmentos por neurona decrece con la edad de las ratas en el rango entre 90 y 414 días para luego, mediante un mecanismo compensatorio propuesto por los autores, aumentar hasta los niveles obtenidos a los 90 días. Por tanto, la influencia de la edad en la magnitud y dirección del cambio no se trataría de una sencilla función inversamente proporcional a la edad sino que se rige por mecanismos más complejos (Connor et al. 1981a; Connor et al. 1981b). Junto a estas consideraciones cabe destacar que parece que el enriquecimiento podría influir en la longevidad de las ratas a tenor de los resultados obtenidos por el grupo de Diamond (Diamond 1988).

Componente genético

La propia genética del animal puede llegar a afectar a la capacidad de generar plasticidad. Ya en un primer momento, los experimentos del equipo formado por Rosenzweig, Bennet y Diamond consideraron las diferencias genéticas al elegir una cepa

específica de ratas conocida por su capacidad para resolver laberintos. Esta cepa, llamada Berkeley S1, era entrecruzada entre sí y todos los individuos empleados en sus experimentos presentaban un pedigrí común que evitaba que las diferencias en los resultados se debieran a variación genética. Desde un punto de vista más específico se conocen ciertos genes cuya actividad es esencial para un correcto procesamiento en funciones cognitivas como el aprendizaje y memoria. Así, los ratones KO condicionales para el receptor R1 de NMDA en la zona CA1 del hipocampo muestran deficiencias en la memoria espacial (Tsien et al. 1996), aunque puede revertirse gracias a un ambiente enriquecido (Rampon et al. 2000b; Li et al. 2007).

Entorno

La posibilidad de que la estimulación desencadenante de la plasticidad procediera del ambiente físico, en lugar de una estimulación sensorial clásica de un ambiente enriquecido, ha llevado a los investigadores a modificar variables generales del ambiente. Cabe destacar los experimentos de exposición de ratas en ambientes enriquecidos o estándar a altas concentraciones de iones negativos en el aire. Las pruebas se centraron en el efecto de los iones negativos en la serotonina, el AMP-c y el GMP-c en la corteza cerebral. Tanto serotonina como AMP-c disminuyeron los altos niveles alcanzados con un ambiente enriquecido al exponerle a una alta concentración de iones negativos por lo que es probable que un ambiente ionizado revierta los efectos del enriquecimiento (Diamond et al. 1980).

Además, la hipercapnia (niveles de CO₂ superiores a un 3%), puede afectar de manera adversa en el enriquecimiento dado que generan sopor y cambios fisiológicos. Por tanto, hay que tener en cuenta la ventilación de la zona de estabulación para no sobrepasar la capacidad de aireación de la misma (Krohn et al. 2003).

Duración

La duración de la exposición a un ambiente enriquecido es una clara variable dependiente. Períodos cortos de pocas horas desencadenan cambios en la expresión de genes que podrían asociarse a la plasticidad por enriquecimiento como por ejemplo sintetizadores de ADN/ARN o señales y moléculas de crecimiento neuronal. Estos

cambios a nivel genético se mantendrían con el tiempo (varios días de exposición al ambiente enriquecido) influyendo en diversos genes tardíos como PSD-95 (Rampon et al. 2000a).

Existen experimentos de larga duración en los que se ha demostrado que exposiciones de ratas jóvenes adultas de 30 días a un entorno enriquecido producían un incremento en el grosor de las cortezas frontal, parietal y occipital. Sin embargo, el aumento de la exposición hasta 80 días no sólo no produjo mayor incremento sino que a menudo producía disminución (Bennett et al. 1974). Estudios posteriores han mostrado que los períodos prolongados de enriquecimiento aumentan los cambios en diversas categorías como habilidades espaciales (cognitivas) o nivel de expresión de la sinaptofisina (glicoproteína asociada a la unión entre las membranas presinápticas y las vesículas con neurotransmisor), siempre que la exposición al ambiente no sea continua (Bennett et al. 2006). Por tanto se apunta a la hipótesis de que es la novedad del entorno lo que provocaría los cambios plásticos y no el entorno en sí.

Estrés

La presencia o ausencia de estrés es otra de las variables a tener en cuenta a la hora de diseñar un experimento de entorno enriquecido. Los estudios sobre estrés crónico demuestran que se produce un exceso de glucocorticoides, que son neurotóxicos, especialmente en el hipocampo. Las ratas viejas son más susceptibles a este estrés continuo, aunque también existe evidencia de que el amansamiento (“*handling*”) o los entornos enriquecidos ayudan a disminuir este daño (Meaney et al. 1988a; Meaney et al. 1988b).

Entre las fuentes de estrés destacan la masificación en el estabulamiento y la presencia de estímulos fuertes (ruidos, olores de otros animales) o cambiantes. Por esta última razón un cambio continuo de los juguetes y su disposición en el entorno enriquecido puede llegar a minimizar los efectos positivos del ambiente (Diamond 2001).

Actividad física

Es necesario ponderar la influencia de esta variable en la generación de plasticidad positiva por enriquecimiento, para aislar la injerencia de la actividad exploratoria en este tipo de fenómenos. Además es común entre los juguetes de ambientes enriquecidos, aquellos que propician la actividad física voluntaria (ruedas, rampas, plataformas aisladas).

Inevitablemente, la actividad física es un factor inseparable del ambiente enriquecido puesto que la exploración activa implica la locomoción en el interior de la jaula junto con la interacción con objetos y juguetes novedosos. Se han estudiado los efectos beneficiosos en la actividad cerebral del ejercicio no forzado, mediante el empleo de ruedas para correr, observándose aumentos tanto en la capacidad metabólica general de la corteza motora y el estriado (no así el hipocampo y la corteza somestésica) y en el número de células del giro dentado, mejorando la orientación espacial y potenciación a largo plazo (LTP) (Van Praag H. et al. 1999; McCloskey et al. 2001).

Aún así, hasta lo que conocemos, los modelos empleados implican el desarrollo de una actividad física más intensa que la simple exploración por una caja. por lo que es probable que la actividad física no sea el desencadenante exclusivo de la plasticidad en un ambiente enriquecido (Faherty et al. 2003).

La plasticidad estructural: Sinapsis y dendritas, nodo central del cambio

Como se menciona anteriormente la plasticidad es un fenómeno de gran diversidad tanto en su generación como en los mecanismos subyacentes, ya que provoca cambios tanto bioquímicos como estructurales. En este apartado nos centraremos en dos lugares dónde se produce el cambio estructural: la sinapsis y la dendrita, sobre los que se hablará más adelante tanto en los resultados como en la discusión.

La sinapsis, nodo de encuentro entre la célula transmisora y receptora de información ya sea por un contacto axo-dendrítico o axo-espinal, ha sido considerada como la delimitación anatómica en dónde se localiza la plasticidad. Las primeras hipótesis de Tanzi y Ramón y Cajal, situaban a las sinapsis como nodo central de la plasticidad y

aprendizaje. Aunque el mecanismo propuesto por ambos investigadores era distinto son claramente complementarios. Tanzi enfatizó en el aspecto cualitativo de las sinapsis (fortalecimiento de las sinapsis durante el aprendizaje) mientras que Ramón y Cajal destacó en un principio la cantidad de las mismas, sugiriendo que el número aumentaba con el aprendizaje.

Así, tras una lesión unilateral de la corteza sensorimotora se registra un aumento en la densidad sináptica, volumen y área de de sinapsis en el hemisferio contralateral (Jones et al. 1996). Es obligatorio indicar que en estos estudios es capital ponderar estos números por el volumen de la capa o zona de estudio ya que ésta puede variar el tamaño a su vez. Además las modificaciones de estas variables dependen de la capa y tipo de sinapsis. De tal manera que, el recorte de los bigotes en roedores provoca un aumento de la densidad de superficie y densidad sináptica en sinapsis asimétricas de la capa I (Machin et al. 2006) de la corteza de barriles que representa el área deprivada junto con un decremento de la densidad del número de sinapsis simétricas y aferencia talamocortical en capa IV (Sadaka et al. 2003). Los cambios morfológicos pueden reconfigurar la estructura de la sinapsis y de esa manera explicar cómo un ambiente complejo induce un aumento del número de sinapsis perforadas en la corteza visual (Greenough et al. 1978). Este tipo de sinapsis parece que tienen un papel importante en los fenómenos de de aprendizaje, potenciación duradera y plasticidad (Geinisman 1993; Geinisman et al. 2001).

Las espinas dendríticas, aunque no serán objeto de estudio en esta tesis por su práctica ausencia en las neuronas de nuestro interés, dado su elevado número y función como la más común estructura postsináptica especializada en la recepción del mensaje presináptico, merecen una mención aparte. Existe una extensa literatura que muestra a la espina dendrítica como una estructura lábil que puede variar su tamaño y forma hasta su desaparición y cuya extensión o retracción está asociada a la formación de sinapsis (Harris 1999; Hering and Sheng 2001; Nimchinsky et al. 2002). Entre los primeros experimentos que confirmaron la plasticidad de las espinas dendríticas, cabe resaltar los realizados en la década de los 60 del siglo pasado que estudiaron estas estructuras postsinápticas en células piramidales en la corteza visual de ratas estabuladas en condiciones de absoluta oscuridad. En ellos se pudo observar cómo las espinas se veían afectadas tanto en número como localización, llegándose a proponer modelos

matemáticos sobre estas redistribuciones desde un punto de vista espacial como temporal (Valverde 1967; Valverde and Ruiz-Marcos 1969; Ruiz-Marcos and Valverde 1969). Posteriores estudios confirmaron que los protocolos que modifican la entrada sensorial afectan a diversas características como la vida media de la espina o las características morfológicas de la misma. La vida media de cada espina es variable y al menos la mitad sobrevive 1 mes, sin embargo la otra mitad son sinapsis de vida corta. Los protocolos de privación por recorte de vibrisas en roedores adultos disminuyen la vida media de las espinas en la zona afectada, aumentando la tasa de recambio de las mismas (aunque no su densidad lineal –número frente longitud dendrítica-) (Trachtenberg et al. 2002) o el volumen de las espinas y la superficie de la densidad postsináptica (Vees et al. 1998).

Los estudios de Volkmar y Greenough (Volkmar and Greenough 1972; Greenough and Volkmar 1972) en corteza visual de ratas criadas en ambientes enriquecidos, estándar y empobrecidos describieron un aumento en el número de ramificaciones de las dendritas de orden mayor a 3 en las ratas procedentes de un ambiente enriquecido, aunque no así en la longitud de las dendritas. Estos resultados difieren parcialmente a los obtenidos por Uylings y Connor en células reconstruidas en capas II y III de corteza visual (Uylings et al. 1978; Connor et al. 1981a; Connor et al. 1981b). Las dendritas basales de las células piramidales de ratas alojadas en ambiente enriquecido mostraban cambios significativos en la longitud y en las ramificaciones en los segmentos terminales (últimos órdenes, generalmente superiores a 3). Estos últimos resultados también se obtuvieron en la corteza somatosensorial (Connor et al. 1982a; Connor et al. 1982b).

Por tanto, aunque existían ciertas evidencias de que la corteza era capaz de responder a manipulaciones externas, particularmente en las capas más superficiales, tal plasticidad estructural en las dendritas de animales adultos se ha considerado menor y no exenta de contradicciones en muchos casos.

Además, los cambios que produce la exposición a un entorno enriquecido, no afectan de igual forma al patrón dendrítico en todas las regiones cerebrales. Kolb y sus colaboradores han descrito un aumento en la longitud y arborización dendrítica así como la densidad de las espinas, en las neuronas espinosas del núcleo accumbens y en las piramidales de la corteza somatosensorial de ratas alojadas durante tres meses y

medio en un ambiente enriquecido. Sin embargo, en la región medial de la corteza prefrontal, aunque la densidad de las espinas también aumentó, no se observaron cambios significativos en la longitud (Kolb and Whishaw 1998). Además casi todos los estudios se han centrado en la plasticidad estructural de células piramidales independientemente de la región o capa estudiada.

Recientes experimentos con técnicas de imagen basadas en microscopia de dos fotones *in vivo* en la corteza visual de ratas adultas, han mostrado que no sólo existen variaciones estructurales en las longitudes dendríticas, sino que este es un fenómeno continuo en células (principalmente interneuronas) sin necesidad de que existan estímulos manipuladores de las entradas sensoriales. Por tanto, las interneuronas estarían en un proceso de continua remodelación estructural, siguiendo un equilibrio neto en el que el crecimiento de algunos procesos se vería contrarrestado por la retracción de otros (Lee et al. 2006).

Nuestra área de estudio

En la corteza cerebral de la rata se pueden delimitar dos regiones somatosensoriales principales: el área primaria (SI) y la secundaria (SII). Tanto en SI como en SII se encuentran representados la cara y el cuerpo de la rata, aunque a diferencia de lo que sucede en los primates en los que cada área citoarquitectónica de SI (3a, 3b,1 y 2) está asociada al menos a una representación somestésica independiente, en la rata sólo hay una representación en SI. Además, SI presenta cierto solapamiento con la corteza motora. En esta zona de solapamiento, que afecta especialmente a la representación de la pata trasera, la actividad puede desencadenarse mediante una estimulación eléctrica de baja intensidad y en ella las neuronas responden a la estimulación cutánea (Chapin and Lin 1984; Neafsey et al. 1986). Esta zona es reconocida anatómicamente porque recibe aferentes talamocorticales desde el VPL y el VL (Donoghue et al. 1979).

En la representación somatotópica en SI se puede apreciar que la mayor área se encuentra ocupada por la representación de la cabeza de la rata y en menor medida el miembro delantero (FL) y trasero (HL). La representación de los miembros es medial mientras que la de las vibrisas es caudolateral y la mandíbula rostralateral. Cada vibrisa

está representada por un barril que están dispuestos en fila de manera similar a como se encuentran en la almohadilla facial contralateral. Las vibrisas faciales largas, se organizan topográficamente y están segregadas en el subcampo de barriles posteromedial (PMBSF) (Brett-Green et al. 2001).

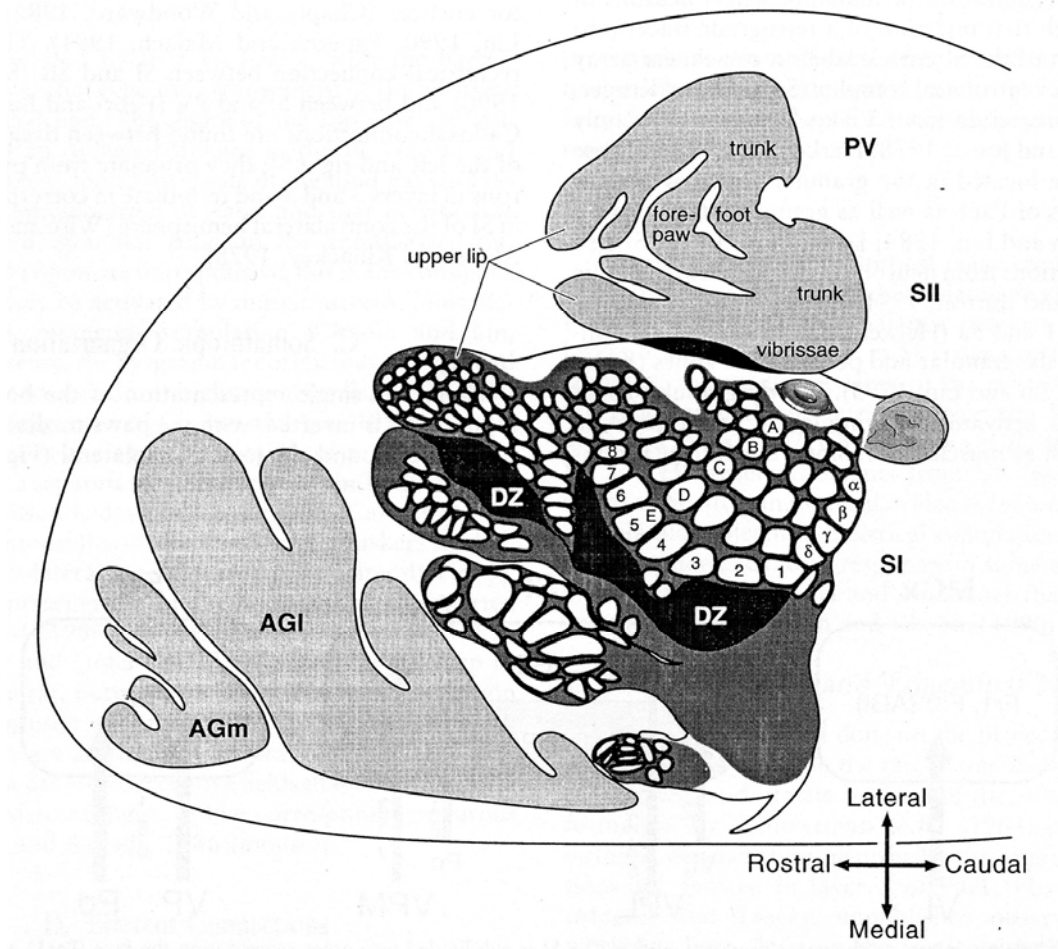


Figura 2: Organización somatotópica de SI. Las zonas granulares están ocupadas por barriles. Aquellos que representan vibrisas principales del morro están dispuestas en las filas (A-E). Los barriles están rodeados por la corteza perigranular. Entre la representación de la cabeza y las patas se localiza la zona disgranular (DZ). AGl es la corteza agranular lateral representativa del área motora primaria. AGm es la corteza agranular medial que corresponde al área suplementaria motora. Tomado de (Tracey and Waite 1995)

A nivel citoarquitectónico, aunque en la zona SI existen agregados celulares fuera de la zona de vibrisas, como por ejemplo en el FL y HL (Dawson and Killackey 1987), nos centraremos en el PMBSF o área de representación de las vibrisas mistaciales. El

PMBSF de la rata presenta la disposición común del neocortex con seis capas. Las capas II/III son de difícil delimitación entre sí y están pobladas de células diversas. En cuanto a la capa IV, muy rica en células granulares, es donde se sitúa el barril propiamente dicho que consiste en una agregación de estas células formando una estructura cilíndrica (con una suave extensión hacia la parte profunda de la capa III). A diferencia de lo descrito en el ratón, los barriles de la rata carecen de una estructura “hueca” sino que sólo presentan una zona central con una menor densidad de células granulares (Welker and Woolsey 1974). Las neuronas que conforman el barril son principalmente células estrelladas espinosas y lisas aunque también encontramos piramidales y células en cesto. Las células estrelladas lisas (aproximadamente un 15%) expresan GABA y junto con las células en cesto componen la población de las células inhibitorias de esta región (Kisvarday et al. 1985; Chmielowska et al. 1986; Beaulieu 1993). Estas estructuras pueden observarse con varias técnicas histoquímicas como la tinción de Nissl, la succinil deshidrogenasa o la citocromo oxidasa siendo característico que presentan cierta relación lineal entre su tamaño (número de neuronas) y el número de fibras mielínicas y tamaño de la vibrisa (Lee and Woolsey 1975). Por otro lado, las zonas que separan los barriles entre sí se conocen como *septa* y se caracterizan por tener una menor densidad neuronal.

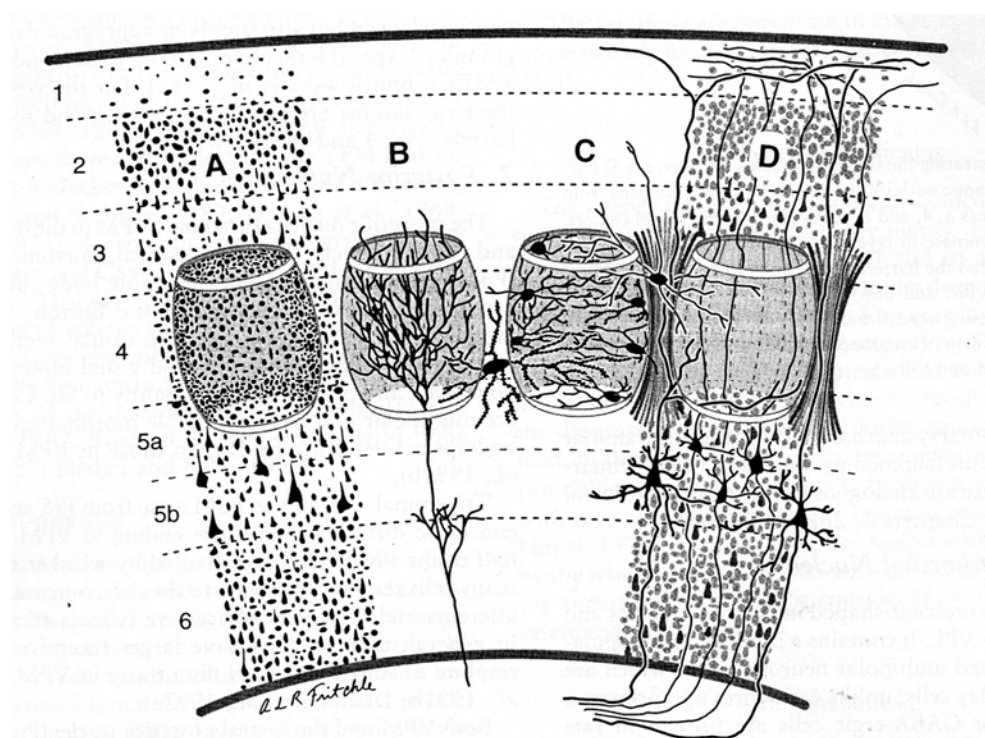
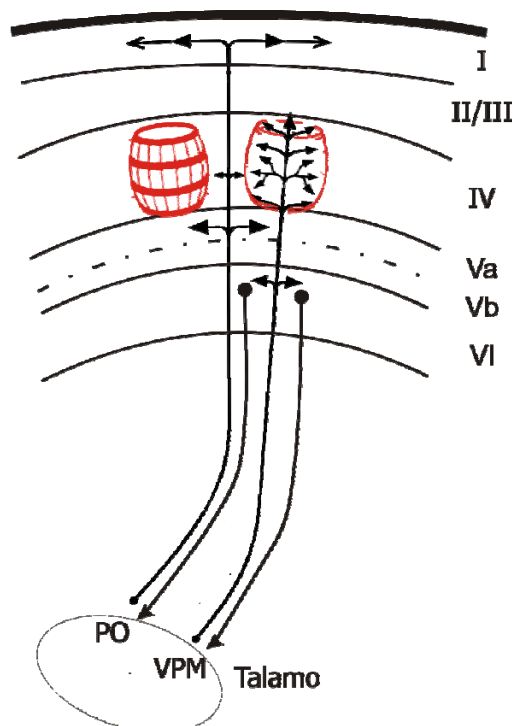


Figura 3: Componentes corticales de un barril de la corteza.

A) Distribución de los somas neuronales como se observan con una tinción de Nissl, mostrando la elevada densidad de células estrelladas en la capa IV.
 B) Un aferente procedente del VPM que contacta principalmente con el centro del barril aunque también manda colaterales al límite entre la capa Vb y VI. C) Morfología de las células del barril, con un número semejante de células estrelladas espinosas y lisas con dendritas proyectando asimétricas dentro del barril y, en algunos casos, extendiéndose a barriles adyacentes.
 D) Dendritas apicales de células infragranulares (principalmente de capa V) que pasan preferentemente por los laterales de los barriles. Tomado de (Waite and Tracey 1995)

Existen evidencias morfológicas para afirmar que los barriles reciben aferencias del núcleo talámico ventral posteromedial (VPM) mientras que la zona septal estaría inervada por axones procedentes del núcleo posterior del tálamo (PO) (Koralek et al. 1988). Los aferentes procedentes del VPM terminan en el centro del barril tanto en interneuronas estrelladas lisas como en dendritas apicales de neuronas piramidales que pasan por el barril. Alineadas con la periferia de los barriles estarían las células piramidales de capa V junto con una gran profusión de dendritas y fibras que cruzarían por los *septa* (Ito 1992). Las escasas neuronas de los *septa* muestran una respuesta más débil que la de los barriles a la estimulación cutánea de la vibrisa principal que inervan (Armstrong-James and Fox 1987).

Figura 4: En este esquema se ilustran las interconexiones entre los barriles corticales de SI y los núcleos talámicos ventral posteromedial y posterior. Las entradas desde el VPM terminan en las capas III, IV (en especial en el centro del barril) y VI,



Mediante pequeñas inyecciones de biocitina se ha demostrado que desde los barriles y los septa surgen distintos circuitos intrínsecos y corticocorticales. Las proyecciones intracorticales en SI que se originan desde las columnas de barriles tienen una extensión bastante corta, terminando en su mayoría en las columnas de barriles inmediatamente adyacentes, mientras que las proyecciones corticocorticales llegan a SII. Las proyecciones intrínsecas que surgen desde las columnas septales se extienden hasta una distancia de dos o tres barriles, dando lugar preferentemente a terminales en otras columnas septales. Las proyecciones corticocorticales septales terminan en la corteza motora MI, en la corteza disgranular, anterior a los barriles de la fila E, en la zona posteromedial de Par 1 y en SII (Kim and Ebner 1999; Chakrabarti and Alloway 2006). A su vez la zona de barriles envía proyecciones desde las capas infragranulares a los núcleos talámicos ventral posteromedial, posteromedial y reticular, al colículo superior, al estriado y a todos los núcleos sensoriales trigeminales del tronco del encéfalo (Killackey et al. 1989).

Por otra parte, las capas II/III reciben aferencias procedentes de todas las capas de la corteza (Burkhalter 1989; Douglas and Martin 2004) y, aunque en menor medida, incluso directamente desde el tálamo (Miller et al. 1993). Sus eferencias extralaminares llegan a capa V y VI (Burkhalter 1989) o a través del cuerpo calloso a la corteza homotópica contralateral (Olavarria et al. 1984). Por tanto las neuronas de capas II y III tendrían una función muy destacada como integradores de la información ascendente de núcleos subcorticales (a través del tálamo y capa IV) y contralateral (capas II/III del otro hemisferio) y de procesamiento para, por ejemplo, controlar capas infragranulares.

Interneuronas

A grandes rasgos, la corteza de los mamíferos podría decirse que es una estructura híbrida constituida por dos tipos básicos de neuronas. Un grupo mayoritario de células de proyección cuyo axón atraviesa largas distancias y que, mediante el concurso de

neurotransmisores como el glutamato, transmiten señales excitatorias y otro grupo compuesto por células de acción más local que transmiten señales inhibitorias mediante el ácido γ -aminobutírico (GABA). Las primeras presentan una forma, común a todas ellas, de pirámide por lo que se las conoce como células piramidales, mientras que las segundas carecen de una morfología típica única y se conocen como interneuronas (Somogyi et al. 1998; Valverde 2002) .

Junto con la ausencia de una morfología característica, las interneuronas son excepcionalmente diversas en sus propiedades electrofisiológicas y químicas (Kawaguchi and Kubota 1997; Gupta et al. 2000) lo que dificulta encontrar un criterio único y unívoco para su clasificación. Por tanto, a pesar de los esfuerzos para buscar criterios de unificación, actualmente no hay ninguna clasificación universalmente aceptada de interneuronas corticales (Parra et al. 1998; Markram et al. 2004; Stevens 1998), ver también www.columbia.edu/cu/biology/faculty/yuste/petilla/index.html.

Las clasificaciones anatómicas basadas en la morfología dendrítica son incompletas dado que éstas presentan muchas disposiciones espaciales intermedias que imposibilitan una separación clara. Sin embargo, atendiendo a la disposición e inervación del axón y dendritas, podemos ayudarnos para subdividir a un nivel morfológico este heterogéneo grupo, centrándonos en las células preponderantes en la capa II/III.

Células en cesto: Son las interneuronas más abundante ya que representan más del 50% del total. Inervan los somas y dendritas proximales de células piramidales e interneuronas. Estas terminaciones “envuelven” los somas de las células piramidales formando “cestos” a su alrededor. Se subdividen en tres clases: Grandes, pequeñas y con nidos pericelulares (*nest basket cell*) ya que su axón sólo envuelve por la parte inferior al soma (Valverde 2002), siendo esta última la más común en las capas II/III. Se les considera esenciales en el control de la ganancia de la respuesta sináptica tras su integración (Wang et al. 2002).

Células en candelabro: Su nombre, dado por Cajal, se debe a la característica morfología de su axón que se bifurca formando agregaciones alrededor de los axones de células piramidales (las “velas” o “candelas”). Son las únicas interneuronas que

sinaptan sobre axones (en concreto sobre el segmento inicial de éstos), por lo que podrían tener un poderoso control “inhibitorio” sobre el resultado final de la integración de la información, no interviniendo directamente en el procesamiento de la información ascendente sino que se reservarían para prevenir a la red neuronal de una actividad excitatoria excesiva. Es por eso que se las considera unas neuronas claves en la posible causa de la epilepsia (De Felipe 1999). Sus dendritas pueden ser multipolares o bipenachadas y se distribuyen por todas las capas cerebrales.

Células de doble bouquet: Originalmente descritas por Ramón y Cajal, englobaban distintas neuronas con una característica común: todas ellas presentan una organización dendrítica bipenachada, orientada radialmente y perpendicular a la corteza. Sus axones presentan colaterales translaminares (II-V) .La disposición de su axón la hace muy interesante ya que distribuirían la información a través de diversas capas pero dentro de la misma columna.

Debido a que la morfología de su árbol dendrítico es común a otro tipo de neuronas se ha buscado una definición más precisa. El término *células de doble bouquet* se aplica a las neuronas con un soma en las capas II/III que tienen un axón atravesando las capas II-V, normalmente en un ovillo compacto con varicosidades y colaterales radialmente dispuestas. La ramificación del axón suele producirse a lo largo de 50-80 μm a unas 100 μm de distancia del soma (Somogyi and Cowey 1981; De Felipe and Jones 1992).

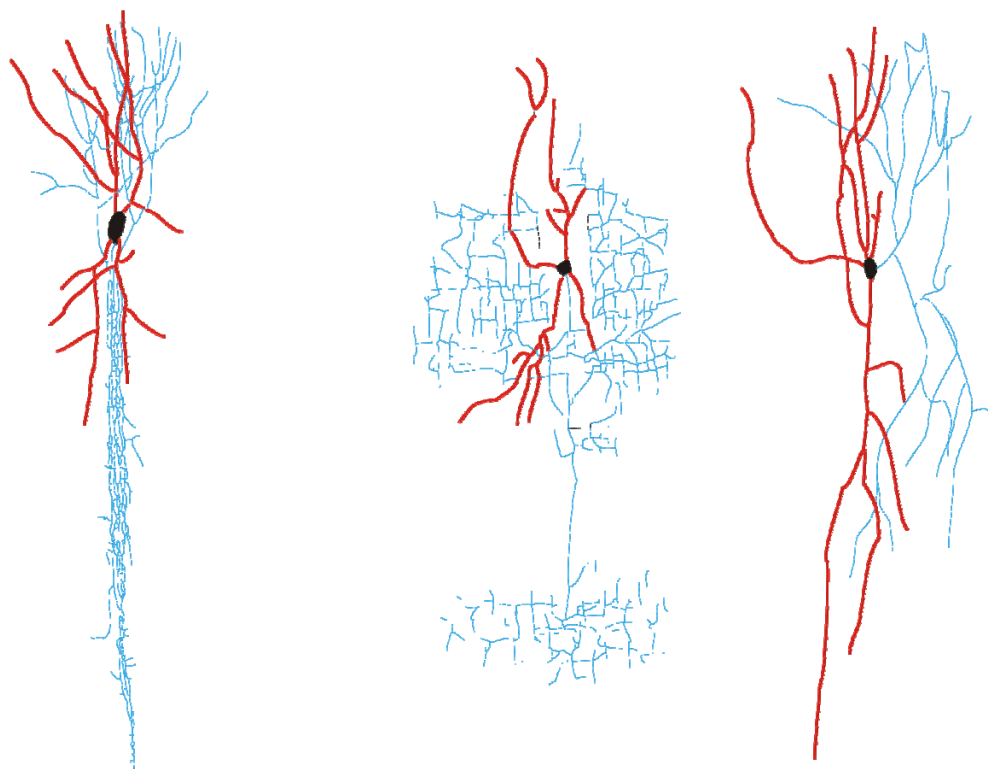


Figura 5: Distintos tipos anatómicos de interneuronas. Célula de doble bouquet (izquierda), célula de candelabro (centro) y célula bipolar (derecha). En azul se dibuja el axón y en rojo las dendritas.

Células de Martinotti: Sus axones proyectan y se expanden por la capa I donde inhiben los penachos dendríticos de las células piramidales de su misma columna o las próximas. Son la única fuente de inhibición intercolumnar a través de la capa I desde las capas inferiores. Los axones de las células de Martinotti inervan tanto dendritas distales como proximales así como somas. Sus dendritas guardan una disposición vertical, perpendiculares a la superficie pial (Wang et al. 2004).

Células Bipolares: Son células de pequeño tamaño con una disposición dendrítica vertical, perpendicular a la pia, formada por dos dendritas raíz colocadas opuestamente, aunque en algunos casos tienen más de dos y pueden, por tanto, asemejarse a las células de doble bouquet o bipenachadas. El axón parte de una dendrita principal y forma una estrecha banda (<math>< 50 \mu\text{m}</math>) que cruza todas las capas sinaptando en pocas neuronas, generalmente las dendritas basales de células piramidales. La morfología de su axón sirve para distinguirla del resto de células con dendritas verticalmente dirigidas.

Células bipenachadas: Son similares a las células de doble bouquet y bipolares ya que tienen dendritas raíz que parten de posiciones opuestas para formar dos penachos situados en lados opuestos de la célula. Sin embargo su axón, a diferencia de las células bipolares o de doble bouquet, tiene una distribución más extendida en la horizontal llegando a contactar otras columnas corticales.

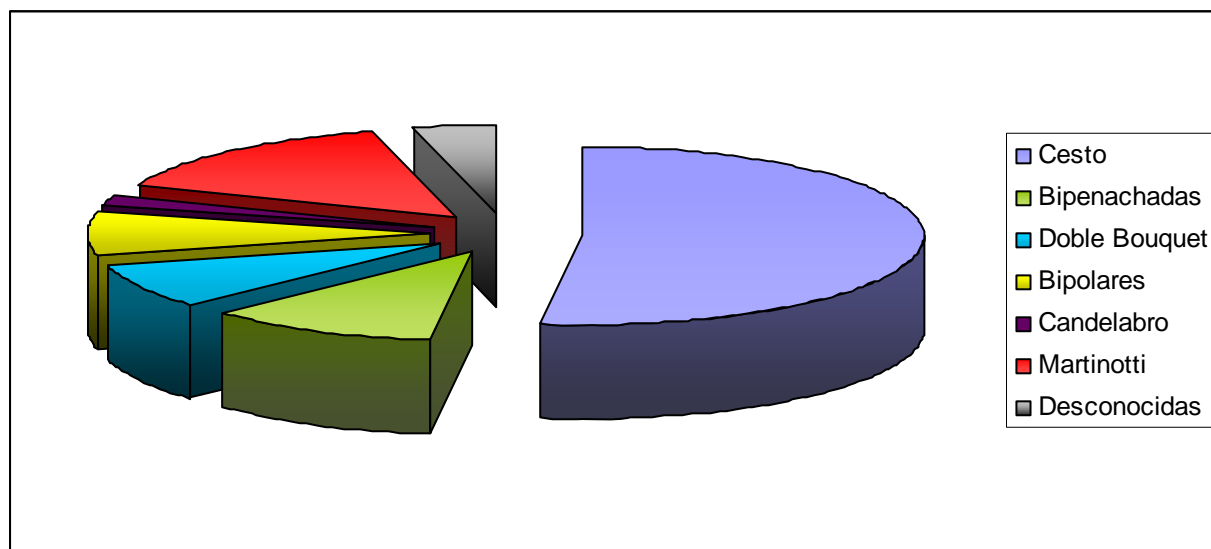


Figura 6: Porcentajes aproximados de los distintos tipos de interneuronas en las capas II/III. Datos de (Markram et al. 2004)

No solo las diferencias se encuentran en la morfología sino que también la expresión de ciertas moléculas o sus propiedades electrofisiológicas han sido propuestas como atributos clasificadores.

Existen dos grandes grupos de moléculas clasificadoras de población. Las proteínas quelantes de calcio calbindina (CB), parvalbúmina (PV) y calretinina (CR) y ciertos neuropéptidos como el neuropéptido Y (NPY), somatostatina (SOM), colecistoquinina (CCK) y péptido intestinal vasoactivo (VIP).

Las proteínas quelantes de calcio en la corteza cerebral son prácticamente exclusivas de las interneuronas y tienen la función de unirse al calcio mediante un enlace quelante de coordinación. Para unirse al calcio liberado durante la transmisión de impulsos, la

calretinina tiene motivos de mano-EF. Dada la citotoxicidad del calcio, la presencia de una proteína tamponadora de la concentración de calcio intracelular es por tanto esencial. Los neuropéptidos son moléculas que actúan como neurotransmisores accesorios a los principales de gran polivalencia. Todos ellos están presentes en las capas II/III y muestran solapamientos entre sí (ver figura 7), con células expresando varios marcadores a la vez (Cauli et al. 1997; Kawaguchi and Kubota 1997; Kawaguchi and Kondo 2002).

Nuestras interneuronas de interés son aquellas que expresan la proteína calretinina. Ésta se expresa en células GABAérgicas con una coexpresión próxima al 100% (Kubota et al. 1994; Gonchar and Burkhalter 1997). Además puede definirse como un marcador segregante ya que sólo se ha descrito que colocaliza con el péptido intestinal vasoactivo (VIP) (Rogers 1992; Kubota et al. 1994) y con la colecistoquinina (Kawaguchi and Kubota 1997).

Morfológicamente, al tratarse de células GABA+, su aspecto es no piramidal aunque la disposición de sus dendritas puede variar. Las de mayor preponderancia en las capas superiores son de orientación vertical (bipolares y bipenachadas). Este tipo se caracteriza por una tinción débil frente al anticuerpo anti-GABA, mientras que las de marcado fuerte para GABA tienen aspectos multipolares y se encuentran en mayor medida en capas más inferiores (Gonchar and Burkhalter 1997).

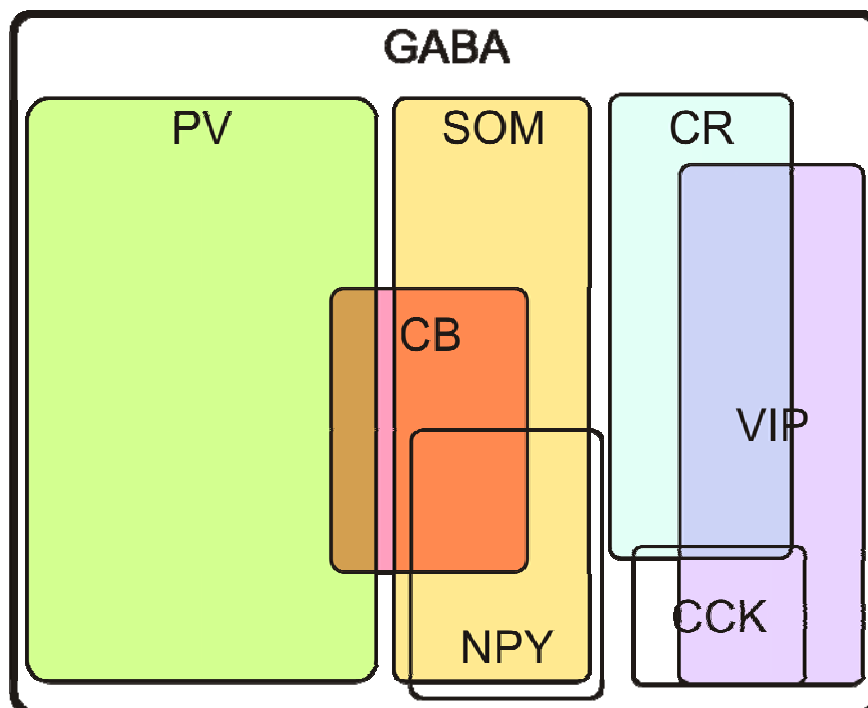


Figura 7: Esquema de colocalización química de las células de capa II/III. CB=Calbindina; PV=Parvalbumina; CR=Calretinina; NPY= Neuropéptido Y; VIP= Péptido intestinal vasoactivo; SOM=Somatostatina; CCK=Colecistoquinina. Modificado de Kawaguchi y Kubota 1997.

A nivel electrofisiológico, las interneuronas se han intentado clasificar de diversas maneras. Atendiendo a su patrón de descarga las interneuronas se han clasificado en: *fast spiking* (FS) con una respuesta que no se adapta tras un pulso de larga duración y espigas de alta frecuencia, *late spiking* (LS) con una rampa de despolarización lenta, *irregular spiking* (IS) con un pequeño grupo de potenciales seguidos de potenciales de manera irregular en respuesta a pulsos de corriente, *burst spiking non pyramidal* (BSNP) que disparan un pequeño tren de disparos pero que se adaptan y *regular spiking non pyramidal* (RSNP) (Kawaguchi and Kubota 1996; Kawaguchi and Kubota 1997; Cauli et al. 1997; Porter et al. 1998). Posteriores clasificaciones se han basado en dos parámetros. El tipo de inicio de respuesta tras la inyección de una corriente (*onset*) y el comportamiento en su estado de reposo (*steady-state*) (Gupta et al. 2000).

Tratando de buscar cierta correlación entre estos dos tipos de clasificación podríamos incluir dentro de las FS a cualquier tipo de célula no adaptativa tras el comienzo del disparo (NAC). Las LS con espigas tardías tras la estimulación podrían reclasificarse

como d-AC o d-STUT ya que presentarían en todos los casos un comportamiento de respuesta retardada no adaptativo. Por otro lado las BSNP con respuesta adaptativa pero en espiga serían b-AC, b-STUT o BST mientras que las RSNP podrían encuadrarse en las c-AC. Las IS mantienen su categoría aparte en cuanto a su estado de reposo pero añadirían la descripción de su forma de descarga que sería en ráfaga (b-IS) (Markram et al. 2004).

El comportamiento eléctrico de las células que expresan calretinina está escasamente delimitado y podría abarcar diversos grupos dependiendo qué autor realiza la clasificación. Con la clasificación de Kawaguchi podrían tratarse de neuronas BSNP o RSNP (Kawaguchi and Kubota 1996). Por los datos aportados por este grupo la población estaría igualmente repartida entre BSNP y RSNP, siguiendo patrones de disparos y morfología (células bipolares y doble bouquet) parecidos a la población compuesta por células VIP positivas. La clasificación propuesta por Cauli y colaboradores que merced a la combinación de las técnicas de RT-PCR unicelular junto con registro intracelular pudo establecer ciertas correlaciones entre patrón de descarga y expresión de neuropéptidos y proteínas quelantes de calcio colocándolas entre el grupo de RSNP que expresarían calretinina y las de descarga irregular (IS) (Cauli et al. 1997). Markram y colaboradores admiten dos comportamientos eléctricos para las células calretinina positiva que coinciden con el grupo de Cauli: b-AC e IS (Markram et al. 2004). Aunque la primera población podría relacionarse o asemejarse a la BSNP, la segunda es una población separada que no tiene correlato con ninguna de las propuestas por el grupo de Kawaguchi.

Tras esta descripción de los criterios clasificadores empleados, es necesario trazar un esquema indicando cómo se relacionan éstos entre sí. El principal problema es la dificultad en encontrar poblaciones únicas que sólo expresen un marcador exclusivo (De Felipe 1993) o una actividad eléctrica que pueda ser característica. Por tanto al unir expresión de proteínas junto con morfología neuronal encontramos varios solapamientos (Figura 8).

Con todas estas propiedades que intentan clasificar a la interneurona se busca un conocimiento más extenso de su relación con otras células y su cometido dentro del entramado cerebral. El funcionamiento de la corteza precisa de una organización que se

plasma en la formación de circuitos. Las conexiones no son aleatorias sino que interviene un plan director que provoca la selectividad en las conexiones a todos los niveles espaciales ya sea una especificidad en la posición de las sinapsis dentro del conjunto axón-dendrita o, a un nivel más elevado, con determinadas conexiones entre capas o áreas de la corteza.

Las neuronas GABAérgicas que forman circuitos locales modulan la respuesta final de las células excitatorias ya sea a través de contactos directos sobre ellas o mediante el control disináptico. Controlan la retropropagación de potenciales de acción (Buzsaki et al. 1996), la generación de espigas de calcio (Miles et al. 1996) y la sincronización de la actividad poblacional (Bush and Sejnowski 1996). Las propias interneuronas corticales están a su vez bajo control GABAérgico con aferencias tanto de otras interneuronas gabaérgicas de la corteza, como de núcleos subcorticales, siendo el prosencéfalo basal la principal fuente de esta inervación inhibitoria externa a la corteza (Freund and Meskenaite 1992; Gritti et al. 2003).

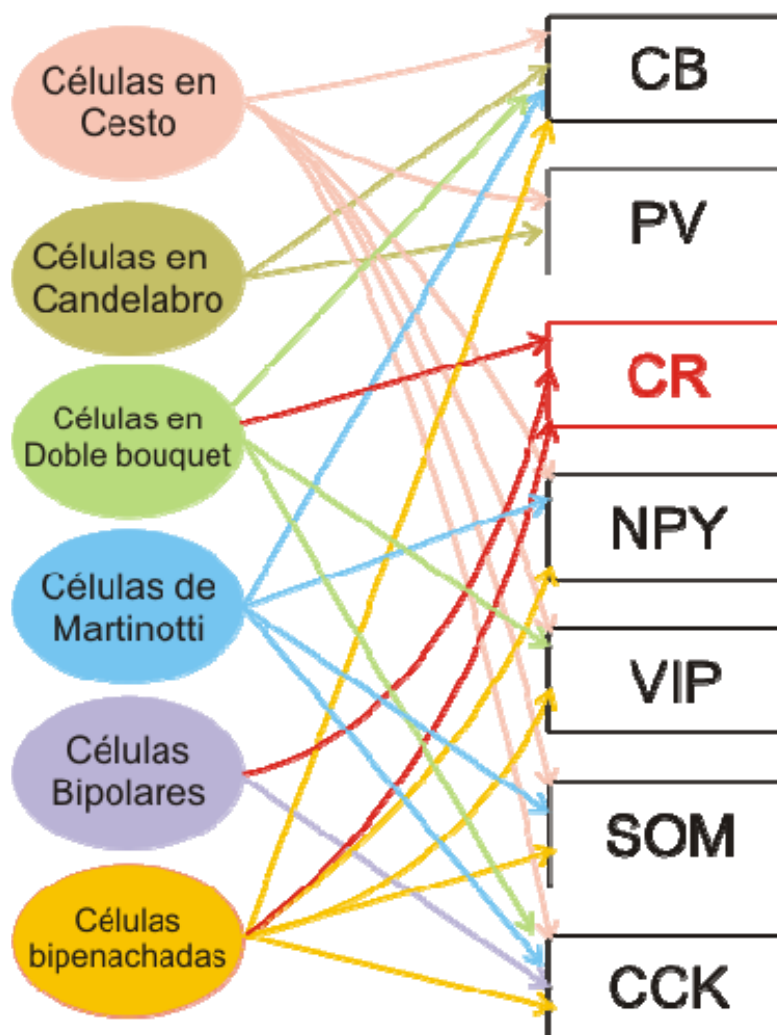


Figura 8: Esquema de colocación anatómica y química. En rojo se señalan los tipos morfológicos característicos de la expresión de calretinina. CB=Calbindina; PV=Parvalbumina; CR=Calretinina; NPY= Neuropeptido Y; VIP= Péptido intestinal vasoactivo; SOM=Somatostatina; CCK=Colecistoquinina. Modificado de Markram 2004.

Dada la gran variabilidad de tipos neuronales presentes en la capa II/III es esperable un número elevado de circuitos distintos que implican conexiones intra- y extralaminares. Estudios funcionales y anatómicos han mostrado que la entrada de información subcortical procedente del tálamo llega a los barriles de capa IV contactando directamente con células espinosas (piramidales y estrelladas) y células en cesto FS que a su vez podrían contactar con las células espinosas (excitatorias) de la misma capa o con otras células inhibitorias de su mismo tipo u otro (LTS de configuración dendrítica

vertical), cerrando un circuito de inhibición *feedforward* (Keller and White 1987; Staiger et al. 1996a; Beierlein et al. 2000; Sun et al. 2006). Sin embargo la entrada no sólo sería exclusiva en capa IV sino que se ha demostrado que puede existir una entrada secundaria en zonas supragranulares directamente sobre interneuronas (Staiger et al. 1996a; Staiger et al. 1996b). Dantzker y Callaway emplearon la técnica de fotoestimulación para trazar un mapa de las fuentes de entrada a las neuronas piramidales e interneuronas de las capas II/III en la corteza visual de la rata (Dantzker and Callaway 2000). Basándose en el solapamiento anatómico de los axones y las dendritas, las neuronas de las capas II/III reciben aferencias de los árboles axonales de las neuronas excitatorias procedente de todas las capas corticales. Sin embargo estas entradas se ven segregadas dependiendo del tipo electrofisiológico al que pertenecen. Las células piramidales y no piramidales inhibitorias del tipo FS reciben una entrada excitante procedente de las capas inferiores (IV, V, VI). La convergencia en la capa II/III de impulsos procedentes de las capas inferiores (principalmente IV y Va) permitiría la integración de la información lemniscal y paralemniscal que a su vez se genera en los núcleos ventral posterior y posterior respectivamente (Callaway 2002; Bureau et al. 2006). Por otra parte, las interneuronas que muestran una adaptación de la respuesta durante la inyección de pulsos de larga duración (que abarcarían tanto BSNP como RSNP) recibirían o una entrada mayoritaria desde la capa Va y menor en II/III o una entrada casi exclusiva de II/III (con algo de estimulación procedente de V). Desgraciadamente no pudieron encontrar un patrón de descarga o característica que permitiese diferenciar esta población de interneuronas que se adapta tras la estimulación según la procedencia de su entrada, estando además el número de neuronas repartido equitativamente entre ambos grupos.

Las propiedades eléctricas de las interneuronas también determinan su afinidad para unirse con otras interneuronas formando circuitos específicos. De tal forma que, células con un patrón de disparo semejante tendrán más tendencia a constituir redes entre ellas (Kisvarday et al. 1993; Tamas et al. 1998; Gibson et al. 1999). Estas redes interconectadas de interneuronas en corteza podrían estar implicadas en las oscilaciones gamma corticales, las cuales se asocian a distintos comportamientos como percepción, atención o coordinación sensitiva. Para producir estas oscilaciones sería necesario un impulso excitador junto con una interacción entre los distintos grupos para generar sincronía. Existen diversos modelos que postulan la necesidad de una red

interconectada de células inhibitorias, que sólo necesitarían una entrada excitatoria tónica y cuya frecuencia dependería de las constantes temporales de los potenciales inhibitorios postsinápticos (Jefferys et al. 1996). Además, se ha propuesto que una pequeña red de células inhibitorias interconectadas podrían actuar como detectores de coincidencia (Hestrin and Galarreta 2005; Di Garbo et al. 2006).

La interconectividad requerida por estas neuronas inhibitorias podría no sólo estar mediada por sinapsis químicas sino también eléctricas, como se demuestra en experimentos en los que tras la estimulación tetánica de circuitos locales físicamente conectados se producen oscilaciones incluso tras la abolición de las sinapsis químicas (Beierlein et al. 2000). En los últimos años se ha llevado a cabo un esfuerzo considerable para desentrañar las características y posible funcionalidad de este tipo de sinapsis que interconecta físicamente a través de unas estructuras conocidas como uniones comunicantes, *nexos*, o *gap junctions*. Estas uniones, al ser observadas al microscopio electrónico, muestran poros de entre 2-4 nm de diámetro que permitirían el paso de iones inorgánicos y otras pequeñas moléculas hidrosolubles (aminoácidos, nucleótidos, azúcares y vitaminas) cuyos pesos moleculares no sobrepasan 1000 daltons, acoplando química y eléctricamente células adyacentes (Alberts et al. 1996).

Todos estos trabajos coinciden en que las sinapsis eléctricas conectan exclusivamente células GABAérgicas, con un comportamiento eléctrico común entre las células del circuito (Gibson et al. 1999; Beierlein et al. 2000; Tamas et al. 2000; Gibson et al. 2005). Se han llegado a describir hasta cinco tipos distintos de interconexiones entre interneuronas (Hestrin and Galarreta 2005) aunque los dos más estudiados son los que se producen entre células con disparo de espigas en ráfaga (*Fast spiking* –FS-) y las LTS antes mencionadas.

Además de por sus características eléctricas se ha postulado que las interneuronas forman circuitos específicos según su tipo anatómico y expresión de proteínas marcadoras. En general hay coincidencia en afirmar que las dendritas y somas tanto de células GABAérgicas como piramidales (y en algunos casos los axones de éstas) se encuentran invadidas por terminales inmunopositivos a GABA cuya población también expresa las proteínas parvalbúmina, calbindina y calretinina. Ya en los primeros puntos de entrada sensorial procedente del núcleo ventroposteromedial del tálamo los axones

de proyección producen aferencias sobre interneuronas con expresión de parvalbúmina y VIP. Aunque se trata de una inervación mucho menos densa que la que se produce sobre las células excitatorias de la capa IV, el grupo de Staiger demostró mediante experimentos de trazado e inmunomarcado, que las células con expresión de parvalbúmina que se encontraban en la capa IV, así como células VIPérgicas de las capas IV y III recibían aferencias excitatorias de núcleos talámicos, lo que las implicaría en los períodos iniciales del procesamiento sensorial cortical (Staiger et al. 1996a; Staiger et al. 1996b).

Las células en cesto y en especial aquellas que constituyen la mayor parte de la población en capa II/III (un 73% del total de las células en cesto), conocidas como células en cesto con nidos pericelulares, son la mayor fuente de inhibición para las células piramidales de capas supragranulares. Pueden ser confundidas con células en cesto pequeñas debido al aspecto similar de las dendritas y soma, pero el axón de las células en cesto pequeñas tienen un axón que rodea por completo el soma sobre el que sinapta y son inmunopositivas para VIP pero no para parvalbúmina. La primera es una molécula exclusiva de las células en cesto pequeñas y la segunda se expresa en los otros dos subtipos de células en cesto (Wang et al. 2002). Las células en cesto en nido expresan diversas moléculas siendo la más abundante la parvalbúmina, aunque también pueden presentar reactividad a la calbindina, colecistoquinina, somatostatina y neuropéptido Y. Aunque tienen conexiones con interneuronas, sobre todo bipolares y bipenachadas, su objetivo principal son las de tipo excitatorio (Gupta et al. 2000), contactando sobre zonas perisomáticas y dendritas próximas al soma (Somogyi et al. 1983; Kisvarday et al. 1985). Una gran fracción de las sinapsis que reciben las células piramidales procede de este tipo celular por lo que las convierte en el principal controlador directo de las células excitatorias. Cada célula en cesto con nido pericelular puede contactar con unas 150-170 células piramidales y 25-35 interneuronas de varios tipos, siendo muchas de estas conexiones recíprocas con células piramidales próximas, puesto que se estima que recibe información presinápticamente de unas 200 células piramidales. La proximidad entre estas dos neuronas se traduciría en bajas latencias y el tiempo de transmisión disináptico entre dos células piramidales (a través de la célula en cesto) sería tan corto como la transmisión directa desde una piramidal a la otra, sin embargo el resultado final de esta integración temporal de una impulso excitador y otro

inhibidor (o ausente) puede ser muy variado (Markram et al. 1997; Markram et al. 1998). También recibiría entre 15-30 contactos presinápticos desde interneuronas.

Las células inmunomarcadas con calretinina (CR^+) tienen una orientación dendrítica vertical y sus axones inervarían principalmente (68% del total de sus sinapsis en la capa II/III de la corteza visual de la rata) a otras células GABAérgicas, entre ellas bastantes células CR^+ y en menor cuantía células excitatorias piramidales. Las sinapsis, comprobadas mediante microscopía electrónica, serían simétricas o de tipo II, características de una función inhibitoria. Esta preferencia de inervación se ha observado en las capas supragranulares tanto en la corteza visual de rata como en la de mono así como en el hipocampo de rata (Gulyas et al. 1996; Meskenaite 1997; Gonchar and Burkhalter 1999a). La densa interconectividad con células GABAérgicas es característica de la población CR^+ presentando valores 5 veces superiores a los de las células PV^+ (Gonchar and Burkhalter 1999b).

Por el contrario, en capas profundas la inervación CR^+ contacta mayoritariamente (60%) con células piramidales de las capas V y VI. Cabe destacar que los somas inervados por los botones CR^+ se encontraban más a menudo en las capas Vb y VI y que las proyecciones que terminan en Va lo hacen sobre dendritas y no sobre los somas de células piramidales. El origen de las dendritas sobre las que se produce este contacto podría ser diverso dado que en la capa Va coexisten las dendritas basales de células piramidales de Va con las dendritas apicales procedentes de VI, cuyos somas también están profusamente inervados. Dependiendo de las células piramidales que inervasen, las interneuronas CR^+ de capa II/III establecerían un circuito de retroinhibición disináptico con los núcleos talámicos, a través de las proyecciones de células piramidales de capa VI o una retroinhibición directa con las de capa Va dado que las células de esta subcapa tienen una proyección excitatoria sobre las capas II/III (Gonchar and Burkhalter 1999a; Meskenaite 1997; Melchitzky et al. 2005).

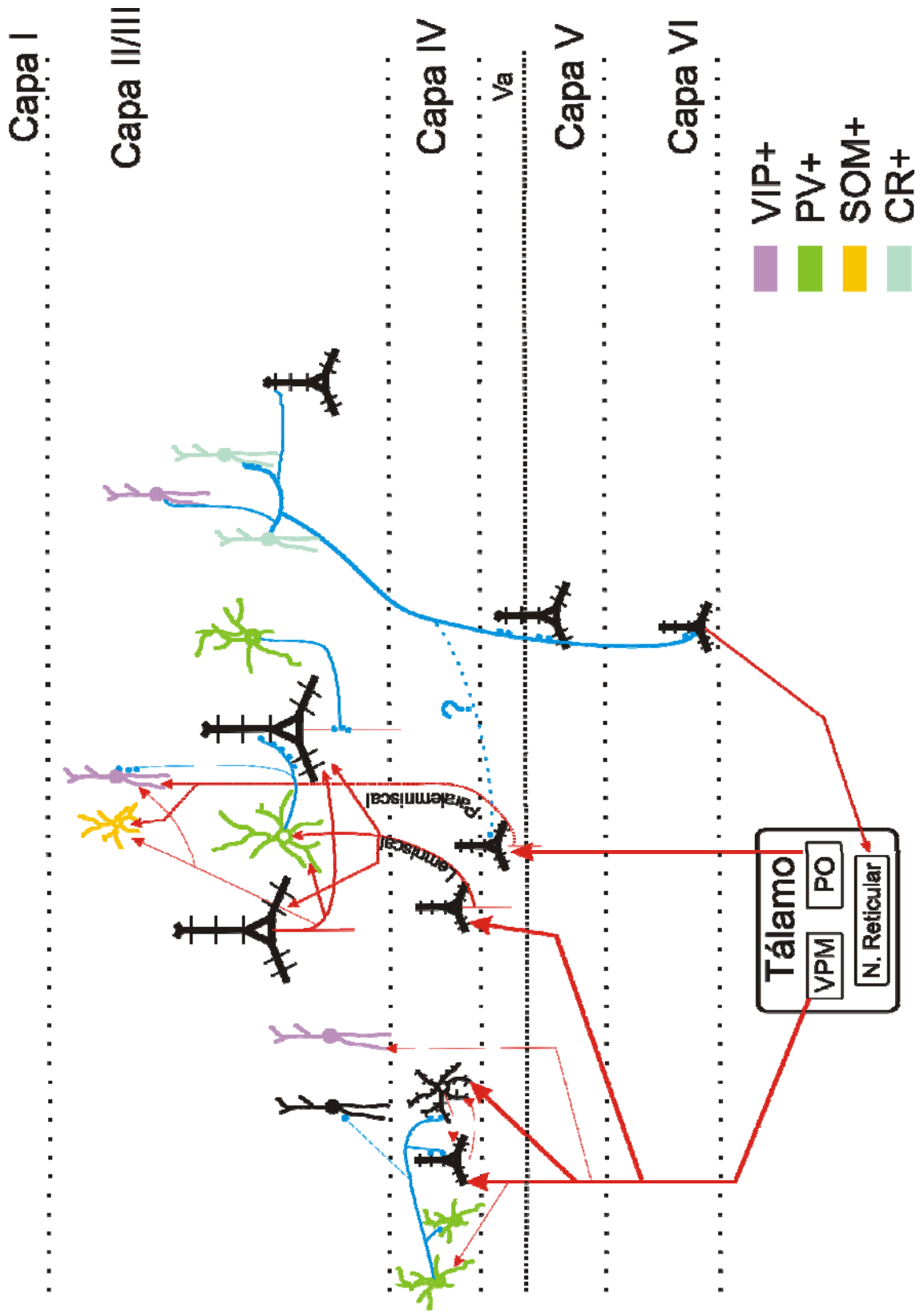
Las células $CR^+/GABA^+$ en las capas II/III recibirían aferencias de otras células $CR^+/GABA^+$ de la misma capa intralaminares, dado que, aparte de menor en número, los axones de interneuronas del resto células $CR^+/GABA^+$ dispersos en las otras capas, son de tipo local (Hestrin and Armstrong 1996; Gonchar and Burkhalter 1997). Existen evidencias para afirmar que las células $PV^+/GABA^+$, como las células en cesto anteriormente comentadas, inervan células VIPérgicas con gran profusión y teniendo en

cuenta la colocalización del neuropéptido VIP con la proteína CR (Kubota et al. 1994; Gonchar and Burkhalter 1997) es probable que la otra fuente de inervación desde células GABAérgicas procediese de células en cesto (Staiger et al. 1997). De hecho los terminales CR-/GABA+ que hacían contacto sobre somas CR+ parecían ser PV+ atendiendo a su morfología (Wouterlood et al. 1995; Czeiger and White 1997; Gonchar and Burkhalter 1999b).

Junto a esta inervación desde células inhibitorias, las células CR+/GABA reciben aferencias desde las células excitatorias GABA-. Los datos anatómicos recogidos a través de experimentos de trazado ayudan a localizar el origen de esta inervación que procedería de todas las capas de la corteza y proyecciones corticocorticales desde áreas equivalentes en capas II/III (Innocenti 1986; White and Czeiger 1991; Czeiger and White 1993). Sin embargo, tomando los datos de actividad desencadenada con fotoestimulación es esperable que la inervación, desde un punto de vista funcional, fuese mayoritaria de láminas II/III o V (Dantzker and Callaway 2000).

Dada la fuerte interconectividad entre las interneuronas CR+ consigo mismas y con otras células inhibitorias se puede considerar que las interneuronas de nuestro estudio jugarían un papel crucial formando redes de desinhibición sobre células piramidales de la capa II y III e inhibiendo a las zonas infragranulares, pudiendo además intervenir en la generación de los patrones de actividad sincrónica necesaria para procesos de atención e integración perceptiva (Cobb et al. 1995; Gulyas et al. 1996; De Felipe 1997; Gabbott et al. 1997; Fricker and Miles 2001). Aunque formen redes de desinhibición mediante sinapsis químicas y en otras zonas se hayan descrito la conexión mediante sinapsis eléctricas (Gulyas et al. 1996), todavía queda por demostrar si específicamente este tipo de interneurona establece conexiones eléctricas que ayudasen a la formación de redes para producir una señal coherente ya fuese de tipo inhibitor o excitador en la corteza somestésica.

Figura 9 (página siguiente): Esquema representativo de alguno de los circuitos descritos descritos en el texto. Se distinguen distintos tipos celulares y de expresión molecular aunque éstas no son unívocos (por coexpresiones). La transmisión de tipo excitador viene señalado en rojo mientras que la inhibitoria aparece en azul.



La capacidad plástica del sistema nervioso adulto es uno de los temas de mayor interés en los estudios neurocientíficos actuales, dada sus posibles aplicaciones.

Los cambios del sistema nervioso pueden ser de diversa índole, abarcando la genética, comportamiento eléctrico, estructura. Nuestro estudio se centrará en este último tipo de cambios, tras la alteración de la entrada sensorial, a través de las vibrisas, fuente primordial de información del entorno de la rata.

Mediante esta manipulación de la entrada sensorial a través de una lesión en la vía aferente primaria y/o de la eliminación la entrada sensorial activa sin dañar la vía, o de variar la entrada sensorial con de un entorno enriquecido, exploraremos los cambios morfológicos y topológicos en una población concreta de interneuronas situada en las capas II y III de la corteza en el área de barriles, zona que conserva la somatotopía de los bigotes de la rata.

Los objetivos específicos de este trabajo se dirigen a conocer:

- Los parámetros métricos y topológicos más relevantes que permitan definir en términos cuantitativos las interneuronas calretinina positivas en las capas II y III de la corteza de barriles en ratas adultas estabuladas en condiciones estándar de laboratorio, comprobando las posibles asimetrías interhemisféricas existentes.
- Los cambios morfométricos producidos en estas neuronas por la sección del nervio infraorbitario derecho ipsi- y/o contralateralmente a la lesión durante la edad adulta.
- Los cambios morfométricos producidos en las interneuronas calretinina positivas por la falta de aferencia háptica inducida por el recorte de las vibrisas. Se estudiarán los cambios en los hemisferios ipsi- y contralaterales a la manipulación.
- El efecto de un “entorno enriquecido” en los cambios morfométricos producidos en las neuronas calretinina positivas por la falta de aferencia háptica, así como la influencia de este entorno en las neuronas contralaterales a las que carecen de esta aferencia.

Animales experimentales, estabulación y grupos

Los experimentos se llevaron a cabo en un total de 50 ratas Sprague-Dawley machos. Los animales se estabularon en el Servicio de Animalario de la UAM (Nº Registro EX021-U), de acuerdo con la normativa referida a animales de experimentación (R.D 1201/2005) en una habitación de 3 x 3 x 3,5 metros con controles independientes de la instalación para luz y temperatura, así como ventilación independiente. Como se indicaba en la introducción, hay que tener en cuenta que, aparte del estrés y la menor movilidad producida por un espacio reducido, la ventilación es otra variable fundamental.

Las ratas se almacenaron en grupos de 4 de acuerdo con la Federation of Animal Sciences Society (www.ahc.umn.edu/rar/cagespace.html) en cajas de 28x48x28 cm, sobrepasando las necesidades mínimas de espacio de 5500 cm² por cada rata de hasta 300 gr y una altura mínima de 17 cm (**condiciones estándar**).

Se monitorizó la estirpe de las ratas impidiendo que una misma madre proporcionara más de dos camadas para nuestro experimentos y separando las ratas hermanas entre los experimentadores. De esta forma se evitó en lo posible los sesgos producidos por un fondo genético común. Para la identificación de las ratas se utilizó un código de perforaciones en las orejas.

De cada grupo almacenado en condiciones estándar se tomaron exclusivamente dos individuos no emparentados, dejando los otros dos para los experimentos de otro investigador llevados a cabo para la obtención del título de doctor (Pilar Negrodo, Abril 2007). El curso temporal y condiciones experimentales se encuentran resumidos en la figura 1.

La parte experimental no comenzó hasta que los animales alcanzasen el estadio de adultos jóvenes (≥ 60 días de edad). Tras el destete (día 21 de vida), se transfirieron las crías a la habitación experimental con temperatura controlada y ciclo luz /oscuridad invertido. Durante el período comprendido entre el destete y el comienzo del experimento, los

animales se acostumbraron al nuevo ciclo circadiano y a la estancia. Los animales dispusieron de comida seca prensada¹ y agua “ad libitum” hasta el momento del sacrificio. Además, todos los grupos (excepto los controles) complementaron su comida con recompensas en forma de cereales (copos de trigo o arroz inflado), fruta seca y pasta de cacao.

Grupos

Se establecieron 4 grupos experimentales con diferentes procedimientos. Entre paréntesis se indica el código del grupo y el n° final de animales que resultaron útiles para el estudio. En ellos no se incluyen los animales descartados para reconstrucción óptica por diversos motivos (regeneración parcial del nervio infraorbitario en grupo IO, problemas en la reconstrucción) ni los empleados para microscopía electrónica (datos no mostrados en la tesis).

1. **Grupo Control (C, n= 5):** Animales mantenidos en **condiciones estándar** de laboratorio hasta el final del experimento.
2. **Grupo con sección completa del nervio *InfraOrbitario* (Io, n= 5):** A los 60 días de edad se les somete a una sección completa de nervio infraorbitario derecho con dos ligaduras (una en cada cabo) para prevenir la regeneración del mismo. Tras 48 h de postoperatorio en cajas individuales, los animales pasan a condiciones estándar durante las siguientes 8 semanas.
3. **Grupo con *Bigotes Recortados* (BR, n= 5):** A los 60 días de edad, tras una semana de amansamiento, se les recortan los bigotes del lado derecho tres veces por semana durante 8 semanas. Las ratas se estabularon en condiciones estándar.
4. **Grupo de “ambiente *Enriquecido*” (E, n= 5):** A los 60 días de edad, tras una semana de amansamiento, se les recortan los bigotes del lado derecho (tres veces por semana durante 7 semanas) y se alternan condiciones estándar con períodos de tres horas al día, durante 5 días a la semana en una jaula de enriquecimiento (**condiciones enriquecimiento**), a lo largo de 8 semanas.

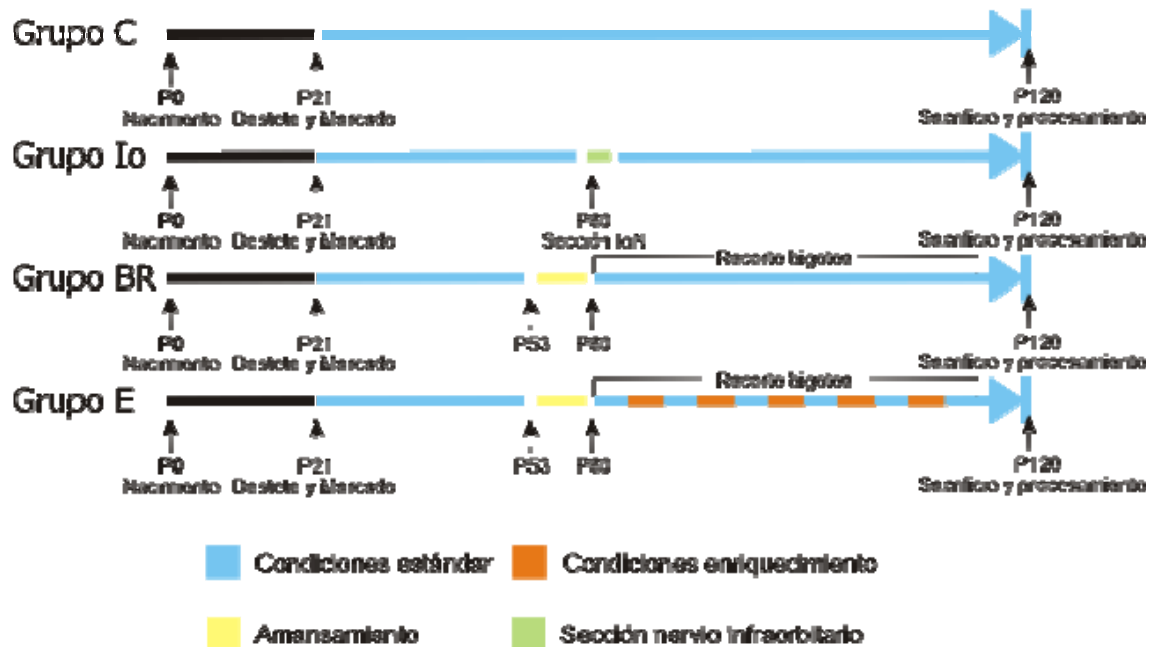


Figura 1: Secuencia temporal de las condiciones experimentales dependiendo del grupo

Procedimientos durante la estabulación

Amansamiento (*Handling*) de los animales (Grupos E, BR)

La semana anterior al comienzo del recorte de bigotes se sometía a los animales a un periodo diario de manejo por parte del experimentador. Durante este período se acostumbraba a los animales a ser inmovilizados, cogidos y mantenidos en las manos del experimentador que posteriormente les realizaría el recorte de bigotes. La inmovilización repetida de los animales ayudaba a tranquilizarles mientras se familiarizaban con los cuidadores.

Los animales eran elevados sujetándolos por detrás de las patas delanteras y se les realizaba un leve movimiento circular que ayudaba a mantenerlos relajados (Figura 2), en ese momento, se les permitía explorar la tijera que luego se usaría para recortar los bigotes.

Los animales de los grupos C e Io sólo fueron manipulados para la limpieza de las jaulas y la alimentación, ya que su protocolo experimental no suponía un manejo continuo por parte del experimentador ni, por tanto, un estrés potencial.



Figura 2: Diversos movimientos de manipulación. A la izquierda se muestra la inmovilización previa al recorte de bigotes. A la derecha el amansamiento y aclimatación de la semana previa al recorte de bigotes

Recorte de bigotes (Grupos E y BR)

La semana en la que los animales cumplían 60 días de edad se comenzaba a recortarles los bigotes del lado derecho. Este recorte se realizaba en el fotoperíodo de mínima actividad de la rata (condiciones diurnas). El amansamiento realizado durante la semana anterior ayudaba a evitar el estrés que pudiera suponer para los animales su manipulación así como herir al animal durante el recorte por movimientos bruscos de huida.

Para recortar los bigotes se inmoviliza a los animales con la mano izquierda haciendo una leve presión contra el suelo de la jaula. Una vez el animal estaba relajado, se le levantaba lentamente sujetándolo por debajo de las patas delanteras. Se recortaban todos los bigotes del lado derecho, no dejando en ningún caso bigotes más largos de 1 a 2 mm (Figura 3). En todo momento el animal debía estar relajado, de forma que si un animal no estaba tranquilo se le dejaba en la jaula y, pasado un tiempo, se repetía el proceso de inmovilización, relajación y recorte.

Los bigotes se recortaron tres días alternos a la semana al comienzo del ciclo de luz. Al terminar esta operación se les ofrecían recompensas.



Figura 3: Recorte de bigotes (izquierda) y estado de los mismos tras el recorte (derecha)

Ambiente enriquecido (Grupo E)

El ambiente enriquecido consistía en una jaula de metacrilato de 100 x 80 x 60 cm con tapa de rejilla metálica y fondo recubierto con lecho de viruta. La jaula de enriquecimiento tenía la posibilidad de disponer plataformas y rampas a distintas alturas, y contenía diversos juguetes con diferentes texturas: tubos, cajas, plataformas y rampas como elementos “no naturales” y, piñas, piedras, palitos y bateas con agua como elementos “naturales” (Figura 4).

Todos los días se colocaban recompensas en distintos sitios de la jaula y dos veces por semana se cambiaba tanto la posición de plataformas y rampas como los juguetes. Los animales estaban en esta jaula 3 horas al día, 5 días a la semana durante el ciclo de máxima actividad (oscuridad).

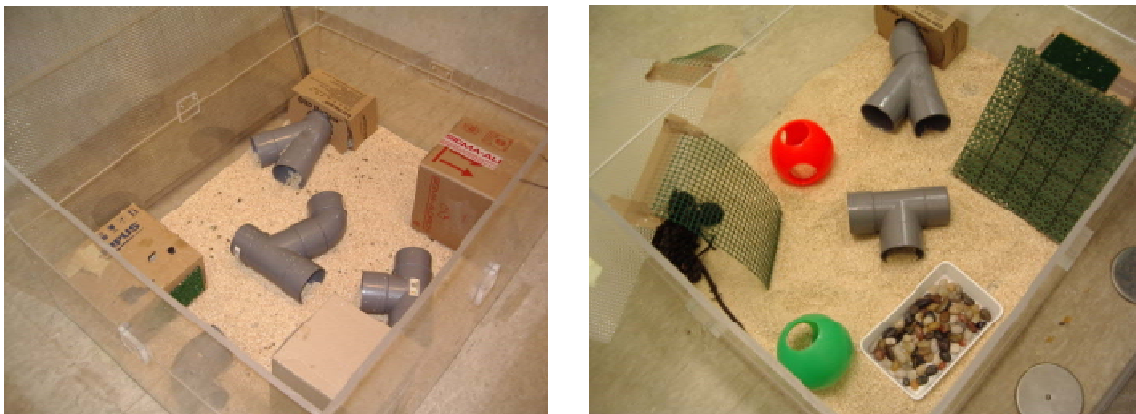


Figura 4: Distintas vistas de la jaula de enriquecimiento

El manejo de los animales durante este período se realizó con luz de emisión dentro del rojo lejano (700 nm) que permitía la visión a los experimentadores pero no interfería en la actividad de las ratas al ser éstas ciegas para ese color.

Transección del nervio infraorbitario (Grupo I)

A los 60 días de edad los animales son anestesiados con una inyección intramuscular de 0,2 ml/100 g de peso de una mezcla de ketamina², xilacina³ y atropina⁴ en proporciones 3:2:0,5.

Toda la cirugía se realizó bajo un microscopio quirúrgico (Tipo II de Zeiss-Jena), e inmovilización del animal en un equipo estereotáxico (David Kopf). Para exponer el nervio se llevó a cabo una incisión en forma de L invertida por debajo del ojo, que rodea los bigotes derechos del animal, separándose cuidadosamente la piel y retrayendo los

músculos zigomático y masetero profundo hasta ver el orificio por donde emerge el nervio infraorbitario.

Se disecaba el nervio para localizar los dos troncos en los que se bifurca a la salida del agujero zigomático y para separarlo completamente del resto del tejido. Pasábamos dos hilos de sutura de seda de 5/0⁵ alrededor del nervio y los movíamos distal y proximalmente hasta asegurarnos de que habíamos aislado todo el nervio. Una vez estábamos seguros de que lo habíamos rodeado completamente, hacíamos una ligadura distal y otra proximal, con la mayor separación entre ambas como nos fuese posible. Las ligaduras se hacían con un nudo doble y entre ellos se realizaba una sección completa del nervio infraorbitario (IoN) con la ayuda de tijeras microquirúrgicas, eliminando de 2 a 3 mm de nervio. Para prevenir con más seguridad aún la regeneración, colocábamos un pequeño trozo de Parafilm⁶® entre ambos extremos como barrera física.

Finalmente se suturaba la piel, se rociaba con cloranfenicol⁷ pulverizado la zona de incisión para prevenir infecciones y administrábamos una inyección intraperitoneal de suero fisiológico⁸.



Figura 5: Estado del nervio tras el sacrificio de la rata. Se puede apreciar el cabo distal (área discontinua) y el punto (flecha negra) del nervio infraorbitario, así

como la lámina de parafilm interpuesta (flecha blanca) y el cabo proximal bajo ésta.

Tras 48 h de período postoperatorio en el que se administró Tiloxina⁹ disuelta en agua, los animales pasan a jaulas con condición estándar durante las siguientes 7 semanas.

Después del sacrificio de los animales, y antes de que éstos fueran incluidos en el estudio se comprobó que la sección del nervio infraorbitario había sido completa y que no había habido regeneración (Figura 5).

Sacrificio de los animales

Una vez terminado el período experimental, los animales se anestesiaron profundamente con pentobarbital sódico¹⁰ a una concentración de 66 mg/ 100g de peso del animal y se perfundieron a través de una cánula insertada en la aorta ascendente.

Las ratas se perfundieron a través de la aorta ascendente con 150 ml de suero salino (NaCl¹¹ 0,9 %) y a continuación con paraformaldehído¹² al 4% en tampón fosfato sódico 0,1 M pH 7,4 (PB-**Apéndice A**). Se extrajo el cerebro y se bloqueó con una cuchilla tomando la comisura blanca anterior como referencia rostral y un plano coronal aproximadamente 4 mm rostrales al polo occipital como referencia posterior. El bloque se postfijó en paraformaldehído al 4% a 4°C, manteniéndose en agitación toda la noche. Al día siguiente se crioprotegió en sacarosa al 30% en PB 0,1 M durante dos días. Tras la crioprotección fue congelado, cortado en criotomo de deslizamiento y procesado para microscopía óptica.

Procesamiento del tejido

Los bloques del encéfalo de la rata se cortaron con un microtomo de congelación (SM2400 de Leica Microsystems), a grosores de 60 y 80 micras y se recogieron en PB 0,1M frío de manera seriada. Para mantener el orden y orientación se realizaron unas marcas con la ayuda de una aguja fabricada ex profeso (550 μm \varnothing externo). Como punto de inicio de recogida de los cortes se tomó la comisura blanca anterior como referencia. Cuando se presentaba esta comisura de modo completo en la línea media se comenzaba a recoger, tomando 18 cortes seguidos, descartando 8 y recogiendo a continuación otros 18 (Figura 6). De esta manera nos asegurábamos la recolección de un área representativa suficiente para poder reconstruir árboles dendríticos de la corteza somestésica de barriles. De cada grupo de 18 cortes procesábamos 9 cortes para el anticuerpo calretinina (ver abajo) y otros 9 para el anticuerpo calbindina (datos no incluidos en la tesis).

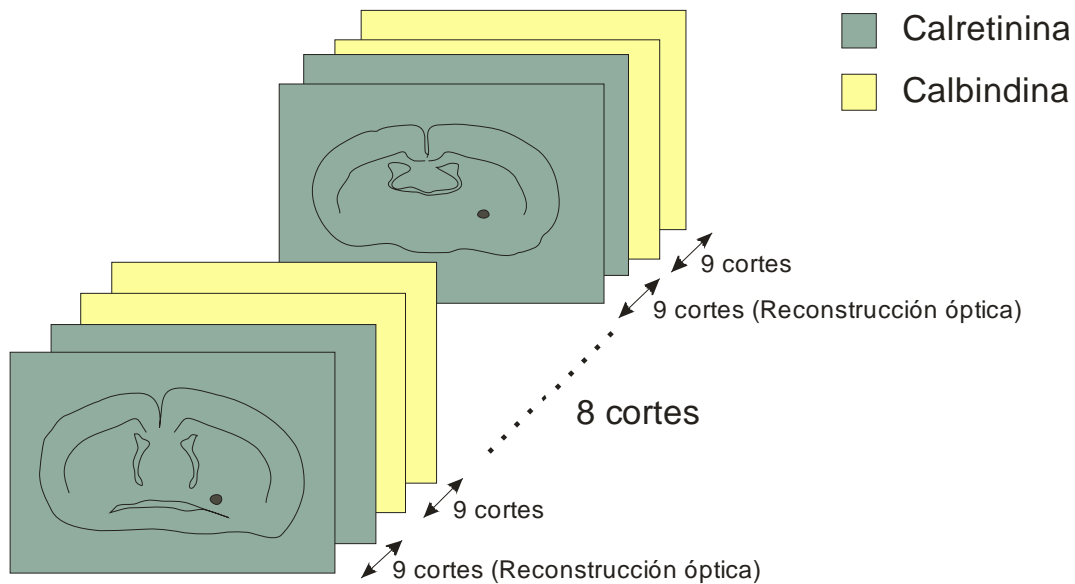


Figura 6: Protocolo de recolección y procesamiento inmunohistoquímico de los cortes de microscopía óptica. El punto oscuro indica la posición donde se practicaba la marca de orientación.

Todos los pasos siguientes se realizaron en agitación y a temperatura ambiente si no se indica lo contrario. Se comenzó inactivando la actividad peroxidasa endógena de los cortes con agua oxigenada en exceso mediante 2 lavados de 10 minutos con H_2O_2 ¹³ al 2% disuelto en PB 0,1M. Tras otros dos lavados en PB 0,1M se pasaban los cortes a KPBS (**Apéndice B**) durante 5 minutos para luego preincubar en una mezcla de 5% BSA¹⁴, 10% de suero de caballo¹⁵ y 0,3% de Tritón¹⁶ (TX) en KPBS durante 90 minutos.

Tras la preincubación, transferíamos los cortes a una disolución de 1:4000 del anticuerpo primario contra calretinina¹⁷ monoclonal en una mezcla igual a la de preincubación. Se sonicaba a lo largo de una hora a temperatura ambiente en un baño de ultrasonidos, cambiando el agua del baño para evitar un sobrecalentamiento del líquido. Después de esto continuábamos la incubación en anticuerpo primario en un frigorífico a 4°C durante toda la noche.

Al día siguiente se sacaban los cortes del frigorífico, permitiendo que se atemperasen durante 1 hora para luego lavar en KPBS varias veces a lo largo de 15 minutos. Acto seguido se preincubaron los cortes en una mezcla con 2% de BSA, 5% de NHS y 0,3% TX-100 en KPBS durante 15 minutos para luego incubarlos en la misma mezcla con 1:200 de anticuerpo secundario biotinilado contra las fracciones H y L de IgG de ratón¹⁸ durante 90 minutos.

Tras varios lavados en KPBS los cortes se transferían a una solución de ABC Elite-Standard¹⁹ durante 90 minutos y se lavaban en KPBS dos veces durante 20 minutos y en tampón acetato 0,1 M (AcB- **Apéndice C**) a pH=6 otros 10 minutos. Mientras tanto se preparaban los líquidos para el revelado mediante el protocolo de la glucosa oxidasa (**Apéndice D**). Tras preparar los líquidos, los cortes se incubaban durante 8 a 10 minutos tratando de encontrar el equilibrio entre el marcado fuerte neuronal y un fondo lo más suave posible.

Una vez revelados los cortes se montaban conservando el orden y orientación en portas gelatinizados (**Apéndice E**), se deshidrataban en alcoholes seriados (10 minutos en 5

pases) y se desengrasaban en xiloles (60 minutos a lo largo de 6 pases) para finalizar cubriendo las muestras con DePEX²⁰.

Reconstrucción de neuronas

Las interneuronas de la corteza somatosensorial en las capas II/III que expresaban calretinina fueron reconstruidas con el software informático Neurolucida v.5.04.3 (Microbrightfield inc.) en un ordenador Pentium V acoplado a un equipo compuesto por microscopio Nikon Labophot-2 con platina motorizada Bio Point XYZ (Ludl Electronic products) y cámara digital DEI-470 (Optronics Engineering). Las neuronas se reconstruyeron usando objetivos de diversas magnificaciones (Nikon x40-0,65 y x100-1,25).

Hicimos una selección de las neuronas para su inclusión en este trabajo, siguiendo estos dos criterios:

Localización de las neuronas marcadas:

Las neuronas debían encontrarse en las capas II-III del *área de barriles* en la representación trigeminal de la corteza somatosensorial primaria. Para esto tuvimos en cuenta su posición en la corteza comparándola con el atlas estereotáxico de Paxinos (Paxinos y Watson 1998).

Criterios técnicos:

Nos aseguramos de que la reconstrucción era completa, para lo cual, sólo escogimos neuronas completamente teñidas, aquellas en las que las terminaciones de los procesos eran claras. Sólo incluimos en el estudio aquellas neuronas que habíamos podido separar claramente de las neuronas colindantes.

Antes de comenzar la reconstrucción de la neurona, comprobamos los cortes adyacentes al que contiene el soma para ver si es posible distinguir el árbol dendrítico de la neurona que

queremos reconstruir del resto de neuronas teñidas, así como si la neurona está teñida en su totalidad.

Para hacer la reconstrucción neuronal, lo primero es señalar, a bajos aumentos, un punto de la neurona a reconstruir. Normalmente se elegían neuronas con aspecto completo, siendo este con ciertas ramificaciones, al menos dos ramas raíz y cierto ordenamiento longitudinal, perpendiculares a la corteza. El soma se marcaba con el punto de referencia (punto 0,0,0 para el ordenador).

A bajos aumentos (4x y 10x) se dibuja la corteza, delimitando la corteza de barriles, los ventrículos, el caudado y el hipocampo, utilizando las herramientas de trazado de áreas. La delimitación de la corteza de barriles se llevaba a cabo de acuerdo con lo indicado por el atlas estereotáxico de Paxinos.

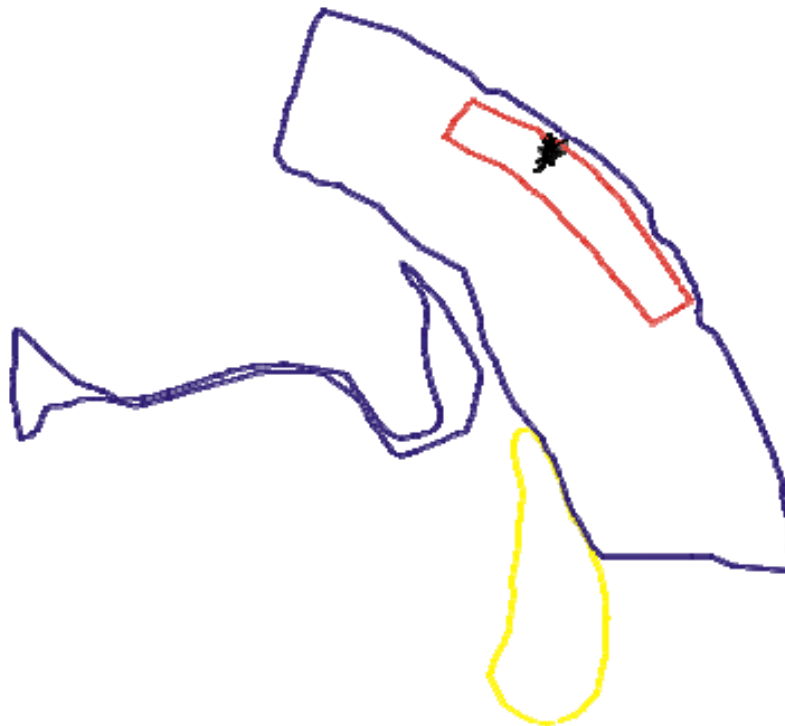


Figura 7: Aspecto de una reconstrucción a bajos aumentos (superior) y a elevados aumentos junto con la imagen real superpuesta (inferior).

A continuación, cambiábamos de aumentos hasta 100x (N.A. 1,25) y pasábamos en el programa a reconstrucción neuronal. Con este modo podíamos indicar al programa la estructura que vamos a reconstruir (soma, dendritas apicales, dendritas o axón).

Lo primero que se reconstruía era el perfil máximo del soma de la neurona. A continuación indicábamos que íbamos a reconstruir una dendrita, enfocando el principio de la dendrita y comenzábamos a dibujarla. Para esto, íbamos variando el foco y marcando puntos sucesivos, que se transforman en pequeños segmentos que representan el recorrido de ese segmento dendrítico en 3 dimensiones.

En los lugares donde se producían bifurcaciones colocábamos nodos de ramificación. Automáticamente el programa cambiaba el orden de las ramificaciones subsiguientes (“ramas hijas”) y al finalizarla volvía automáticamente al punto X, Y, Z donde se puso el punto de bifurcación para que se reconstruya la otra “rama hija”. Si la primera “rama hija” tiene otra bifurcación, hay que terminar de reconstruir todos los procesos que salen de la primera rama antes de poder reconstruir la segunda.

El porcentaje de área de trazado permitido incluido en la pantalla lo situamos aproximadamente en el 80% del área total de pantalla. Cuando salíamos de esa área el programa automáticamente desplazaba la platina en la dirección adecuada. De esta forma nos asegurábamos que siempre teníamos parte del trazado previo a la vista para continuar.

Este movimiento de la platina no ajustaba perfectamente la reconstrucción hecha con el corte, así que debíamos realinear la reconstrucción y el corte antes de seguir dibujando la neurona. Para esto, el programa, tiene una opción que nos permite alinear la reconstrucción y el corte.

El árbol dendrítico no solía estar en un solo corte, así que según terminaban las ramas indicábamos si la rama terminaba en la superficie de arriba o de abajo del corte (*High* o *low ending*, respectivamente) para continuar reconstruyéndola en los cortes adyacentes.

Una vez reconstruidos todos los procesos dentro de un mismo corte pasábamos a localizar las continuaciones en los cortes adyacentes. Para ello es importante hacer coincidir perfectamente la parte de la neurona reconstruida con los procesos que vamos a seguir reconstruyendo. Los cortes adyacentes no están normalmente montados exactamente igual así que hay que ajustar el contorno dibujado del corte anterior con el del nuevo. El programa dispone de varias herramientas de alineamiento. Empleamos la alineación por puntos con hasta 4 puntos de referencia y la rotación del dibujo con el que hacíamos coincidir el trazado de las áreas del corte previamente dibujado con la imagen del corte adyacente. Dado que el punto de rotación estaba marcado por nuestro punto de referencia (al comienzo del trazado, el soma de la neurona de interés) y este es inamovible, copiábamos todo el trazado y creábamos un nuevo punto de referencia para luego pegar y recolocar el trazado. Así teníamos el mismo dibujo con un nuevo punto de referencia y por tanto un nuevo punto de giro para un mejor alineamiento con los cortes adyacentes. Una vez alineados los contornos de los dos cortes, aumentábamos la magnificación.

Los criterios de continuación eran variados. Primero estaba la posición de la continuación de los procesos. Además de que todos los procesos que continuaban en un mismo corte estuviesen próximos en XY, la posición en Z tenía que ser acorde con el origen del proceso. Por tanto, si teníamos una terminación superior (*high ending*) su continuación debía estar situada en la parte más baja del corte siguiente además de coincidir en la posición dentro del plano XY. Segundo estaba la orientación y tamaño del proceso a continuar, no admitiendo que el proceso cambiara de orientación o grosor bruscamente tras el paso de un corte a otro.

Cuando se había ajustado la posición idónea para continuar la reconstrucción debíamos enfocar el proceso neuronal que íbamos a seguir trazando y elegíamos la opción de trazado continuo. Al marcar que estamos en el otro corte, el programa ajustaba el valor XYZ del nuevo punto automáticamente.

Debido a la morfología compleja junto con los problemas técnicos de teñir y reconstruir los axones, en el análisis no hemos utilizado el axón, haciendo reconstrucciones solo parciales, próximas al soma.

Para corregir el encogimiento inherente a todo tejido procesado hicimos varias medidas del grosor de los cortes que contenían la neurona y aplicamos una media aritmética. El cociente entre el valor medio real obtenido y el nominal marcado por el paso del microtomo de congelación se utilizó como índice corrector del encogimiento (*shrinkage correction*) que viene incluido en el software de NeuroLucida. El valor medio del grosor de las secciones que contenían una neurona reconstruida se llevó a cabo mediante varias mediciones en distintos cortes y puntos del área que contenía la reconstrucción. Esta corrección sólo se llevó a cabo en el eje Z ya que el encogimiento en los ejes X e Y resultó ser despreciable. Por último, las reconstrucciones fueron analizadas con el software Neuroexplorer (MicroBrightfield, Neuroexplorer ver. 4.01.1).

Análisis estadístico

Los datos obtenidos se sometieron a diversos test estadísticos dependiendo diversos criterios y características de las variables. Para los tests estadísticos se empleó el software Statgraphics Plus for Windows 4.0 o la ampliación de análisis de datos del programa Excel 2003. Las representaciones se llevaron a cabo con los programas Excel 2003, SigmaPlot 8.0 y en algunos casos se retocaron con CorelDraw 12.0.

Para las comparaciones de las áreas de los somas, longitud total dendrítica utilizamos un test de Student no emparejado de comparación de medias suponiendo varianzas desiguales. Para comprobar esto último empleamos un test F de Snedecor (con un intervalo de confianza del 95%).

En el caso del número de árboles por neurona y número de terminales por neurona, utilizamos un test de Student no emparejado de comparación de medias suponiendo varianzas iguales tras la comprobación con test F de Snedecor.

Para las comparaciones entre las variables topológicas número de segmentos terminales por orden, número de árboles de cada grado y grado medio por árbol utilizamos un test no paramétrico de comparación de medianas no emparejadas (Mann-Whitney).

Asimismo, el test U de Mann-Whitney (M-W) se llevó a cabo en las comparaciones de las longitudes terminales de los segmentos terminales e intermedios. Dado los resultados mostrados se decidió agrupar los segmentos terminales e intermedios en conjuntos que englobasen los segmentos terminales de orden 1 a 3 y 5 a 8 por un lado y los órdenes 1 a 2 y 4 a 7 para los segmentos intermedios. Las comparaciones de los grupos resultantes entre las diversas poblaciones también se llevaron a cabo con el test U de Mann-Whitney.

Para la comparación de las variables morfométricas comentadas arriba se llevó a cabo un exhaustivo estudio de los valores *outliers*. Definimos un valor *outlier* suave como aquel que se encuentra por debajo del primer cuantil o por encima del tercer cuantil, 1.5 veces la distancia intercuantil (definida como la distancia entre el primer y tercer cuantil) y un *outlier* extremo como 3 veces la distancia intercuantil. En estos casos se hizo un estudio de valores, comprobándose que la eliminación de los *outliers* no afectaba a las comparaciones demasiado. Se decidió suprimir este abordaje (ver Discusión).

En la comparación de la distribución de las poblaciones (mediante la distribución de sus probabilidades) de segmentos terminales (agrupadas o no) utilizamos el test de Kolmogorov-Smirnov (K-S).

Para el análisis de Sholl también se utilizó el test de M-W separando la primera esfera del centroide y las subsiguientes esferas por 30 micras.

Para todos los casos hemos considerado que los valores de P son altamente significativos cuando $p \leq 0,01$, significativos cuando $0,01 < p \leq 0,05$ y que marcaban una tendencia estadística cuando $0,05 < p \leq 0,10$.

Apéndices

Apéndice A

TAMPÓN FOSFATO (PB) 0,1M, pH 7,4

Solución A
27,6 g de NaH ₂ PO ₄
Enrasar a 1 litro con H ₂ O Destilada

Solución B
35,6 g de Na ₂ HPO ₄
Enrasar a 1 litro con H ₂ O Destilada

Para 1 litro:

Mezclar 115 ml de Solución A con 385 ml de Solución B y enrasar a 1 litro con H₂O destilada

Titular (pH=7,4) con ácido acético o sosa, según convenga.

Producto	Indicaciones
Sodio di-hidrógeno Fosfato 1-hidrato (NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O) PA PANREAC 131679	
Di-sodio hidrógeno Fosfato anhidro (Na ₂ HPO ₄) PA PANREAC 131965	
Ácido Acético Glacial Purísimo PANREAC 141008	Corrosivo
Hidróxido Sódico (5N) SV PANREAC 182159	Corrosivo

Apéndice B

TAMPÓN FOSFATO POTÁSICO (KPB) 0,05M, pH 7,5

Solución A
4,35 g de KH ₂ PO ₄
Enrasar a 50 ml con H ₂ O Destilada

Solución B
5,44 g de K_2HPO_4
Enrasar a 200 ml con H_2O Destilada

Para 1 litro:

Mezclar 28 ml de Solución A con 180 ml de Solución B y enrasar a 1 litro con H_2O destilada

Titular (pH=7,5) con ácido acético o potasa, según convenga.

Producto	Indicaciones
Dihidrógenofosfato potásico (KH_2PO_4) PA MERCK 48873.0250	
Dipotasio- hidrógeno fosfato anhidro (K_2HPO_4) PA PANREAC 131512	
Ácido Acético Glacial Purísimo PANREAC 141008	Corrosivo
Hidróxido Potásico (0,1N) SV PANREAC 181521	Irritante

Apéndice C

TAMPÓN ACETATO (AcB) 0,1M, pH 6Para 1 litro:

Disolver en 1 litro de agua destilada 8,2 gr de Acetato sódico anhidro.
Ajustar el pH=6 con ácido acético o sosa

Producto	Indicaciones
Acetato sódico anhidro PRS PANREAC 141633	
Ácido Acético Glacial Purísimo PANREAC 141008	Corrosivo
Hidróxido Sódico (5N) SV PANREAC 182159	Corrosivo

Apéndice D

INTENSIFICACIÓN GLUCOSA OXIDASA

Solución A
10 c.c Tampón acetato 0,2 M pH 6
0,483 g Ni amm-sulf.
40 mg D-Glucosa
8 mg cloruro amónico

Solución B
9,6 c.c DH ₂ O
6 mg DAB (0,4 ml de los viales)

Para 20 ml:

Prepararlo todo en frío y mantenerlo sobre hielo picado
 Mezclar los productos de la solución A y de la B por orden.
 Mezclar A+B. Filtrar la mezcla con filtro de pliegues
 Añadir 0,533 mg de Glucosa oxidasa JUSTO antes de utilizarse.

Producto	Indicaciones
D-Glucosa BDH 10117	Estereoespecífica (sólo D-Glucosa)
Cloruro amónico SIGMA A4515	
Glucosa oxidasa SIGMA G2133	
3'3'-Diaminobenzidina- Tetrahidroclorada (DAB) 97% pureza-TLC SIGMA D5637	Tóxico
Sulfato de Amonio y Niquel (II) hexahidratado GPR BDH 271894F	
Acetato sódico anhidro PRS PANREAC 141633	

Apéndice E

SOLUCIÓN DE GELATINA PARA RECUBRIR PORTAOBJETOS

Solución A
20 g de Gelatina en polvo
450 ml H ₂ O Destilada

Solución B
0,5 g de Sulfato de cromo y potasio
50 ml H ₂ O Destilada

Preparación de la gelatina

Calentar 450 ml de agua destilada hasta (50-60°C) y añadir lentamente 20g de gelatina en polvo. Por otro lado añadir 0,5 g de sulfato crómico potásico a 50 ml de agua destilada. Mezclar la solución A y la B, dejar enfriar y filtrar con filtro de papel de pliegues.

Producto	Indicaciones
Gelatina 80-100 Blooms PRS PANREAC 142060	
Sulfato de cromo (III) y potasio CrK(SO ₄) ₂ PA MERCK 1036	

¹ **Pienso rico en soja** Pienso de mantenimiento A03-Rafe

² **Ketolar** (50 mg/ml)-Parke-Davis 776211.9

³ **Rompún** (2%)- Bayer 7532

⁴ **Atropina** (1 mg/ml)- Braun 436112

⁵ **Seda trenzada negra, punta curva 5/0 USP** – Lorca Marín 55344

⁶ **Parafilm**

⁷ **Veterintenicol**- Intervet 0319

⁸ **Suero fisiológico**- Grifols 825083

⁹ **Tiloxina**

¹⁰ **Dolethal** (20g/100ml)- Ventoquinol 3007763

¹¹ **Sodio Cloruro** (PA)- PANREAC 131659

¹² **Paraformaldehído** (PRS)- PANREAC 141451

¹³ **Peróxido de hidrógeno** (PRS)- PANREAC 141077

¹⁴ **Bovine Serum Albumin** (98% Pureza)- SIGMA A7906

¹⁵ **Normal horse serum**- PAA B11033

- ¹⁶ **Tritón X100**- SIGMA X100
- ¹⁷ **Mouse-a-Calretinin**- SWANT 6B3
- ¹⁸ **Horse-a- mouse**- VECTOR BA2000
- ¹⁹ **ABC Elite** (Standard)- VECTOR PK6100
- ²⁰ **DePEX**

En este capítulo se presentan primero los resultados obtenidos con la tinción del anticuerpo contra calretinina en las capas II y III de la corteza somatosensorial de la rata, mostrando algunos ejemplos representativos de las neuronas marcadas que pretenden ilustrar la morfología de las neuronas de nuestro estudio. En algunos casos se ha combinado imágenes de las muestras con una representación de las neuronas marcadas y la posición que guardaban con respecto a la corteza.

El empleo de un software informático tiene la enorme ventaja del acceso inmediato a los datos morfológicos de las neuronas. Parte de los datos que se pueden obtener son numéricos y se desarrollan a lo largo de todo el capítulo. Además existe información gráfica (dendrograma, histograma polar, *convex hull...*) que ayuda a comprender la morfología de una manera visual rápida pero basada en parámetros morfométricos y que también hemos representado. De esta forma, en la descripción de las neuronas de cada grupo incluimos tanto datos numéricos como imágenes.

A lo largo de todo el capítulo de resultados manejaremos extensamente una serie de términos que definimos a continuación.

- **Dendrita primaria:** procesos que nacen directamente del soma. Se considera orden 1 el segmento inicial de una dendrita primaria.
- **Nodo:** punto de bifurcación de una dendrita.
- **Segmento intermedio:** proceso entre el soma y el nodo más próximo o entre dos nodos consecutivos (segmento intermedio).
- **Segmento Terminal:** segmento final de una dendrita.
- **Orden:** número de segmentos entre el segmento considerado y el soma.
- **Grado:** número de segmentos terminales de un árbol dendrítico.
- **Distancia euclídea:** longitud del segmento de recta que une dos puntos.
- **Tortuosidad:** cociente entre la longitud curva o real, y la distancia euclídea.

Marcado con el anticuerpo calretinina

La inmunoreactividad de la calretinina se localizó en los somas neuronales, dendritas y en menor medida en los axones. Los somas solían ser de aspecto ovoide, con el eje mayor orientado perpendicularmente a la superficie pial y muy densamente teñidos lo que impedía su reconstrucción tridimensional por sobreexposición delimitándose únicamente su máxima proyección. Aunque los somas estaban ampliamente distribuidos, por debajo de las capas II/III su densidad era menor. Al igual que los somas, el neuropilo era más denso en las capas superiores. Todas las neuronas observadas tenían una morfología no piramidal, con dos o más dendritas que solían partir siguiendo una disposición paralela al eje mayor de la célula. Sin embargo, no era extraño encontrar células con dendritas horizontales que discurrían paralelas a la superficie pial.

Las dendritas de orientación vertical partían de troncos primarios gruesos y a medida que avanzaban en orden disminuían su sección. En muchos casos tenían ciertos engrosamientos periódicos o formaciones arrosariadas. Eran dendritas lisas aunque en algunos casos se pudieron observar apéndices pseudoespinosos (Figura 3). De forma limitada se pudieron observar posibles contactos dendrodendríticos (Figura 3). Por su patrón dendrítico se podría clasificar morfológicamente como neuronas bipolares y bipeñachadas.

Los axones eran muy finos (diámetros $\leq 1 \mu\text{m}$) y partían tanto del soma como de dendritas de bajo orden (1 ó 2).

Reconstrucción de neuronas inhibitorias que expresan calretinina en capas II/III

En los paneles siguientes (Panel resumen páginas 64-71) están representados ejemplos de neuronas reconstruidas de cada hemisferio de los diferentes grupos. En la reconstrucción en el plano xy sólo se representan las dendritas con un código de colores para discriminar

los órdenes. Mientras, en la representación del plano yz, se muestra la profundidad de los procesos dendríticos neuronales (una vez corregido el encogimiento inherente al procesamiento de las muestras) sin códigos de colores. Ambos dibujos se complementan con sus correspondientes histogramas polares. Además se representan los dendrogramas de las dendritas para cada interneurona esquematizada. Posteriormente se han añadido resúmenes de las características principales de cada grupo. En éstos se describen variables tales como longitud dendrítica (en μm) de los segmentos terminales e intermedios, número medio de segmentos terminales por neurona, longitud total media, área del soma media, número de árboles o dendritas primarias media por neurona y las distribuciones del grado y orden según el grupo.

C-I

Longitud segmentos terminales														
Orden /m	1	2	3	4	5	6	7	8						
Media	103,4	99,1	82,0	57,3	71,2	65,8	55,2	77,2						
SD	18,9	63,3	56,0	41,5	49,8	54,3	36,8	46,2						
SEM	9,5	10,0	6,0	4,8	6,0	11,8	10,6	22,6						
n	4	40	87	81	68	21	12	4						
Longitud segmentos intermedios														
Orden /m	1	2	3	4	5	6	7	8						
Media	28,5	31,3	44,6	40,6	45,8	34,0	15,7							
SD	34,0	32,5	39,7	35,4	29,4	26,4	6,9							
SEM	4,5	3,8	5,1	5,5	7,9	10,0	6,3							
n	57	74	61	41	14	7	2							
Long Segmt Term														
Media	75,2	1824,3		115,6		3,4		17,6						
SD	14,6	326,6		14,4		1,1		3,2						
SEM	3,4	77,5		3,4		0,3		0,7						
n	18	18		18		18		18						
Arboles/Neur														
Media	0,22	0,44	0,39	0,50	0,44	0,39	0,33	0,17	0,06	0,11	0,06	0,06		
SD	0,43	0,70	0,61	0,71	0,62	0,50	0,49	0,39	0,24	0,32	0,24	0,24		
SEM	0,10	0,17	0,14	0,17	0,15	0,12	0,11	0,09	0,06	0,08	0,06	0,06		
n	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
Area Soma														
Media	0,22	0,40	0,87	0,81	0,68	0,21	0,12	0,04						
SD	0,22	2,22	4,93	4,50	3,78	1,17	0,67	0,22						
SEM	0,43	1,80	2,07	2,33	2,44	1,65	1,19	0,94						
n	0,10	0,42	0,49	0,55	0,57	0,39	0,28	0,22						
Segmt term/Neur														
Media	0,22	0,44	0,39	0,50	0,44	0,39	0,33	0,17	0,06	0,11	0,06	0,06	0,06	
SD	0,43	0,70	0,61	0,71	0,62	0,50	0,49	0,39	0,24	0,32	0,24	0,24	0,24	
SEM	0,10	0,17	0,14	0,17	0,15	0,12	0,11	0,09	0,06	0,08	0,06	0,06	0,06	
n	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
Grado promedio arboles del grupo														
Media	0,22	0,40	0,87	0,81	0,68	0,21	0,12	0,04						
SD	0,22	2,22	4,93	4,50	3,78	1,17	0,67	0,22						
SEM	0,43	1,80	2,07	2,33	2,44	1,65	1,19	0,94						
n	0,10	0,42	0,49	0,55	0,57	0,39	0,28	0,22						

C-D

Longitud segmentos terminales									
Orden ym	1	2	3	4	5	6	7	8	Total
Media	94,4	94,0	81,7	82,7	85,7	89,5	87,7	84,8	
SD	32,5	55,6	52,2	52,2	56,6	37,5	38,3	0,1	
SEM	23,0	8,0	8,0	8,9	8,8	7,5	12,8	0,1	309
n	2	48	76	78	69	25	9	2	
Longitud segmentos intermedios									
Orden ym	1	2	3	4	5	6	7	8	Total
Media	22,3	37,4	46,5	47,2	44,6	41,3	14,5		
SD	17,2	31,3	43,8	42,3	36,3	31,0			
SEM	2,3	3,8	5,7	6,5	6,4	13,9	1		249
n	58	68	60	42	15	5	1		
Long Segmt Term									
Media	74,2	1901,8							
SD	13,8	522,9							
SEM	3,3	126,8							
n	17	17							
Area Soma									
Media	125,2	3,5							
SD	24,9	0,8							
SEM	6,0	0,2							
n	17	17							
Arboles/Neur									
Media	18,2	0,18							
SD	3,7	0,39							
SEM	0,9	0,11							
n	17	17							
Segmt term/Neur									
Media	0,12	0,59	0,53	0,41	0,53	0,35	0,29	0,18	0,29
SD	0,33	0,71	0,62	0,51	0,51	0,49	0,59	0,39	0,47
SEM	0,08	0,17	0,15	0,12	0,12	0,12	0,14	0,10	0,11
n	1	2	3	4	5	6	7	8	9
	10	11	12	13	14				
Grado Arb									
Media	0,12	0,59	0,53	0,41	0,53	0,35	0,29	0,18	0,29
SD	0,33	0,71	0,62	0,51	0,51	0,49	0,59	0,39	0,47
SEM	0,08	0,17	0,15	0,12	0,12	0,12	0,14	0,10	0,11
n	1	2	3	4	5	6	7	8	9
	10	11	12	13	14				
Grado promedio arboles del grupo									
Media	5,26								
SD	3,05								
SEM	0,39								

IO-I

Longitud segmentos terminales										
Orden ltm	1	2	3	4	5	6	7	8		
Media	86,5	69,7	64,7	68,0	63,7	68,6	69,8			
SD	56,9	45,1	40,6	41,9	44,0	54,0	26,7			
SEM	27,6	6,1	4,4	4,2	5,1	9,6	9,5			
n	5	54	88	66	74	32	8		Total 359	
Longitud segmentos intermedios										
Orden ltm	1	2	3	4	5	6	7	8		
Media	25,5	37,4	43,4	35,6	34,4	22,6				
SD	23,0	37,7	40,5	28,9	26,2	12,3				
SEM	2,6	4,2	4,8	4,3	6,7	6,1				
n	67	80	72	46	16	4			Total 287	
Long Segmt Term										
Media	67,4									17,1
SD	15,5									2,2
SEM	3,4									0,5
n	21									21
Area Soma										
Media	116,0									3,5
SD	21,6									1,1
SEM	4,7									0,2
n	21									21
Long Total										
Media	1670,5									17,1
SD	248,3									2,2
SEM	53,7									0,5
n	21									21
Arboles/Neur										
Media	0,24									0,19
SD	0,44									0,40
SEM	0,10									0,11
n	14									14
Area Soma										
Media	0,52									0,38
SD	0,68									0,59
SEM	0,15									0,13
n	14									14
Segmt term/Neur										
Media	0,43									0,19
SD	0,60									0,40
SEM	0,13									0,08
n	14									14
Arboles/Neur										
Media	0,29									0,14
SD	0,46									0,36
SEM	0,10									0,08
n	14									14
Area Soma										
Media	0,43									0,19
SD	0,60									0,40
SEM	0,13									0,08
n	14									14
Longitud segmentos terminales										
Orden Arb	1	2	3	4	5	6	7	8		
Media	0,24	0,43	0,57	0,52	0,43	0,38	0,29	0,19		
SD	0,44	0,60	0,81	0,68	0,60	0,59	0,46	0,40		
SEM	0,10	0,13	0,18	0,15	0,13	0,13	0,10	0,08		
n	1	2	3	4	5	6	7	8		
Total	6	54	88	66	74	32	8			
Media	0,29	2,57	4,19	4,57	3,52	1,52	0,38			
SD	0,46	1,63	1,91	2,38	1,69	1,47	0,60			
SEM	0,10	0,38	0,42	0,52	0,41	0,32	0,18			
Grado promedio arboles del grupo										
Media									4,95	
SD									2,72	
SEM									0,32	

IO-D

Longitud segmentos terminales

Orden	m	1	2	3	4	5	6	7	8
Media		105,2	97,0	85,3	63,2	54,2	61,7	47,8	16,0
SD		77,9	62,7	52,5	46,9	31,5	39,5	46,1	18,9
SEM		34,8	8,9	5,3	4,7	4,0	8,8	17,4	13,4
n		5	50	97	101	63	34	7	2
Total 359									

Longitud segmentos intermedios

Orden	m	1	2	3	4	5	6	7	8
Media		25,0	33,4	44,2	37,4	40,3	21,3	74,8	
SD		23,0	25,5	42,5	27,9	39,7	21,2		
SEM		2,8	2,8	5,0	4,4	8,1	10,6		
n		67	84	71	41	19	4	1	
Total 287									

	Long Segmt Term	Long Total	Area Soma	Arboles/Neur	Segmt term/Neur
Media	74,2	1608,7	126,6	3,6	17,9
SD	19,8	359,1	40,9	1,0	2,6
SEM	4,4	80,1	9,2	0,2	0,6
n	20	20	20	20	20

Grado Arb	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
Media	0,17	0,44	0,56	0,33	0,72	0,28	0,22	0,39	0,22	0,11	0,06			
SD	0,38	0,62	0,82	0,49	0,63	0,46	0,43	0,61	0,43	0,32	0,24			
SEM	0,09	0,15	0,22	0,11	0,19	0,11	0,10	0,14	0,10	0,08	0,06			

Sgmt Orden	1	2	3	4	5	6	7	8
Total	4	44	85	90	57	28	3	2
Media	0,22	2,44	4,72	5,00	3,17	1,58	0,17	0,11
SD	0,43	1,65	2,37	2,47	1,76	1,65	0,51	0,47
SEM	0,21	0,25	0,28	0,26	0,23	0,31	0,30	0,33

Grado promedio arboles del grupo

Media	5,06
SD	2,52
SEM	0,32

BR-I

Longitud segmentos terminales									
Orden m	1	2	3	4	5	6	7	8	
Media	101,8	93,2	86,4	71,1	78,2	66,1	43,1		
SD	30,2	31,7	34,7	52,3	47,5	46,3			
SEM	21,4	10,0	6,5	5,9	6,8	0,8	23,1		
n	2	38	70	80	59	24	4		Total 277
Longitud segmentos intermedios									
Orden m	1	2	3	4	5	6	7	8	
Media	18,7	33,4	35,6	40,0	31,4	57,0			
SD	19,9	28,4	27,5	33,6	27,2	30,3			
SEM	2,8	3,5	3,6	5,6	7,5	21,5			
n	51	84	58	38	13	2			Total 224
Long Segmt Term									
Media	78,2		1688,8		125,9		3,1		16,3
SD	14,7		282,0		14,0		0,7		2,9
SEM	3,6		70,8		3,4		0,2		0,7
n	17		17		17		17		17
Area Soma									
Media	0,12	0,41	0,35	0,47	0,41	0,41	0,29	0,35	0,12
SD	0,33	0,51	0,70	0,80	0,62	0,51	0,47	0,61	0,33
SEM	0,08	0,12	0,17	0,19	0,15	0,12	0,11	0,15	0,08
n	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Grado Arb									
Media	0,12	0,41	0,35	0,47	0,41	0,41	0,29	0,35	0,12
SD	0,33	0,51	0,70	0,80	0,62	0,51	0,47	0,61	0,33
SEM	0,08	0,12	0,17	0,19	0,15	0,12	0,11	0,15	0,08
n	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Grado promedio arboles del grupo									
Media	0,12	0,41	0,35	0,47	0,41	0,41	0,29	0,35	0,12
SD	0,33	0,51	0,70	0,80	0,62	0,51	0,47	0,61	0,33
SEM	0,08	0,12	0,17	0,19	0,15	0,12	0,11	0,15	0,08
n	1	2	3	4	5	6	7	8	9

BR-D

Longitud segmentos terminales

Orden m	1	2	3	4	5	6	7	8
Media	112,0	114,0	66,1	66,1	67,0	48,4	32,0	61,8
SD	53,0	66,8	66,0	46,8	46,8	30,0	24,4	50,6
SEM	23,7	10,2	7,5	5,6	6,1	5,0	6,3	35,8
n	5	47	59	70	63	26	15	2
Total								267

Longitud segmentos intermedios

Orden m	1	2	3	4	5	6	7	8
Media	25,3	30,5	35,7	43,7	48,0	33,0	20,2	
SD	26,6	25,6	30,8	36,7	34,0	22,4		
SEM	3,7	3,4	4,1	5,8	6,3	7,9		
n	52	57	55	40	17	8	1	
Total								230

Long Segmt Term

	Long Total	Area Soma	Arboles/Neur	Segmt term/Neur
Media	77,0	126,7	3,4	16,9
SD	19,0	19,0	1,1	3,1
SEM	4,6	4,6	0,3	0,7
n	17	17	17	17

Grado Arb

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
Media	0,29	0,41	0,41	0,47	0,41	0,41	0,35	0,24	0,12	0,06	0,06	0,06	0,06	0,06
SD	0,47	0,80	0,71	0,62	0,62	0,71	0,49	0,44	0,33	0,24	0,24	0,24	0,24	0,24
SEM	0,11	0,19	0,17	0,15	0,15	0,17	0,12	0,11	0,08	0,06	0,06	0,06	0,06	0,06

Segmt Orden

	1	2	3	4	5	6	7	8
Total	5	47	59	70	63	26	15	2
Media	0,29	2,76	3,47	4,12	3,71	1,53	0,69	0,12
SD	0,47	1,60	1,74	1,69	2,47	1,26	1,22	0,49
SEM	0,21	0,23	0,23	0,20	0,31	0,25	0,31	0,34

Grado promedio arboles del grupo

Media	5,04
SD	2,64
SEM	0,96

E-I

Longitud segmentos terminales									
Orden μ m	1	2	3	4	5	6	7	8	Total
Media	87,6	101,2	80,1	74,1	75,0	50,7	88,7	31,8	
SD	70,9	88,0	51,3	47,5	51,7	41,4	38,3	10,5	
SEM	26,8	10,3	5,2	4,9	6,5	8,3	17,1	7,4	
n	7	45	69	65	64	25	5	2	342
Longitud segmentos intermedios									
Orden μ m	1	2	3	4	5	6	7	8	Total
Media	21,5	30,8	31,8	41,4	41,4	55,3	14,4		
SD	20,9	30,8	38,3	43,4	45,9	58,7	20,4		
SEM	2,6	3,4	4,4	7,0	12,3	32,8	20,4		
n	84	83	87	39	14	3	1		271
Long Segmt Term									
Media	78,1		1773,6		124,9		3,6		17,1
SD	15,8		387,1		21,9		1,0		2,7
SEM	3,5		88,8		4,9		0,2		0,6
n	20		20		20		20		20
Area Soma									
Media	0,40	0,45	0,60	0,60	0,40	0,35	0,25	0,35	0,20
SD	0,60	0,60	0,51	0,68	0,68	0,50	0,55	0,49	0,41
SEM	0,15	0,15	0,12	0,17	0,17	0,14	0,13	0,12	0,10
n	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Arboles/Neur									
Media	0,40	0,45	0,60	0,60	0,40	0,35	0,25	0,35	0,20
SD	0,60	0,60	0,51	0,68	0,68	0,50	0,55	0,49	0,41
SEM	0,15	0,15	0,12	0,17	0,17	0,14	0,13	0,12	0,10
n	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Segmt term/Neur									
Media	0,40	0,45	0,60	0,60	0,40	0,35	0,25	0,35	0,20
SD	0,60	0,60	0,51	0,68	0,68	0,50	0,55	0,49	0,41
SEM	0,15	0,15	0,12	0,17	0,17	0,14	0,13	0,12	0,10
n	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Grado Arb									
Media	0,40	0,45	0,60	0,60	0,40	0,35	0,25	0,35	0,20
SD	0,60	0,60	0,51	0,68	0,68	0,50	0,55	0,49	0,41
SEM	0,15	0,15	0,12	0,17	0,17	0,14	0,13	0,12	0,10
n	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Grado promedio arboles del grupo									
Media	0,40	0,45	0,60	0,60	0,40	0,35	0,25	0,35	0,20
SD	0,60	0,60	0,51	0,68	0,68	0,50	0,55	0,49	0,41
SEM	0,15	0,15	0,12	0,17	0,17	0,14	0,13	0,12	0,10
n	1	2	3	4	5	6	7	8	9

E-D

Longitud segmentos terminales									
Orden m	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Media	188,8	103,4	83,8	80,8	67,4	66,2	62,5	64,8	64,8
SD	116,1	57,8	54,9	53,2	51,6	50,5	35,9	39,7	39,7
SEM	67,0	8,3	5,5	5,4	5,7	8,4	10,8	28,1	28,1
n	3	48	86	97	81	36	11	0	2
Longitud segmentos intermedios									
Orden m	1	2	3	4	5	6	7	8	
Media	25,6	28,8	38,8	48,4	33,8	29,8	12,1	23,1	
SD	28,9	27,5	32,7	45,7	29,7	19,0		27,0115	
SEM	3,7	3,0	3,8	6,4	6,5	7,8		19,1	
n	67	88	74	51	21	6	1	2	
Long Segmt Term									
Media	83,4		1828,1		123,0		3,2		18,0
SD	15,9		480,0		28,8		1,1		3,4
SEM	3,5		100,4		5,8		0,2		0,7
n	21		21		21		21		21
Area Soma									
Media	0,19	0,24	0,52	0,62	0,43	0,29	0,52	0,14	0,14
SD	0,40	0,44	0,60	1,02	0,51	0,46	0,60	0,36	0,36
SEM	0,08	0,10	0,14	0,24	0,12	0,11	0,14	0,08	0,08
n	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Arboles/Neur									
Media	0,19	0,24	0,52	0,62	0,43	0,29	0,52	0,14	0,14
SD	0,40	0,44	0,60	1,02	0,51	0,46	0,60	0,36	0,36
SEM	0,08	0,10	0,14	0,24	0,12	0,11	0,14	0,08	0,08
n	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Segmt term/Neur									
Media	0,19	0,24	0,52	0,62	0,43	0,29	0,52	0,14	0,14
SD	0,40	0,44	0,60	1,02	0,51	0,46	0,60	0,36	0,36
SEM	0,08	0,10	0,14	0,24	0,12	0,11	0,14	0,08	0,08
n	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Grado Arbo									
Media	0,19	0,24	0,52	0,62	0,43	0,29	0,52	0,14	0,14
SD	0,40	0,44	0,60	1,02	0,51	0,46	0,60	0,36	0,36
SEM	0,08	0,10	0,14	0,24	0,12	0,11	0,14	0,08	0,08
n	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Grado promedio arboles del grupo									
Total	4	48	86	97	81	36	11	0	4
Media	0,19	0,24	0,52	0,62	0,43	0,29	0,52	0,14	0,14
SD	0,40	0,44	0,60	1,02	0,51	0,46	0,60	0,36	0,36
SEM	0,08	0,10	0,14	0,24	0,12	0,11	0,14	0,08	0,08
n	1	2	3	4	5	6	7	8	9

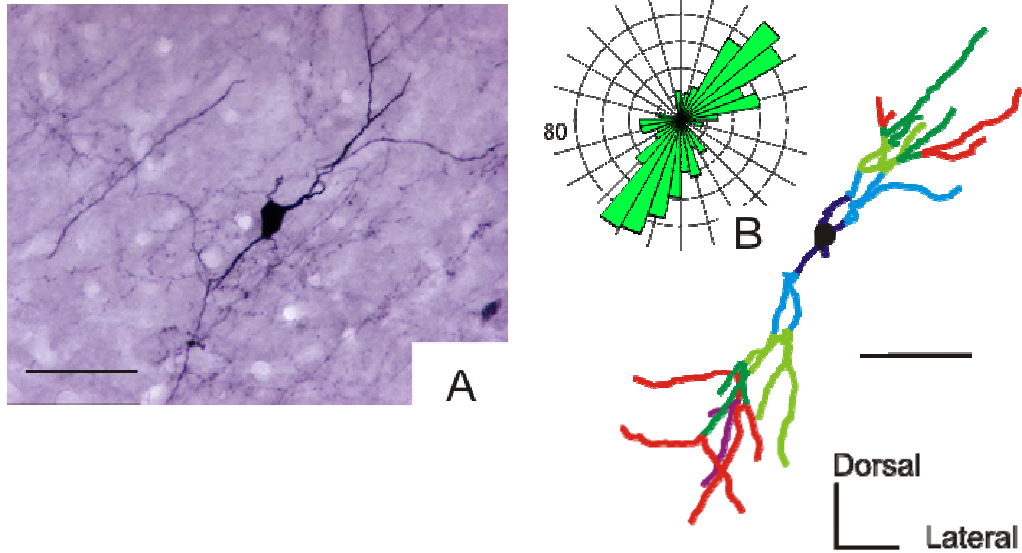
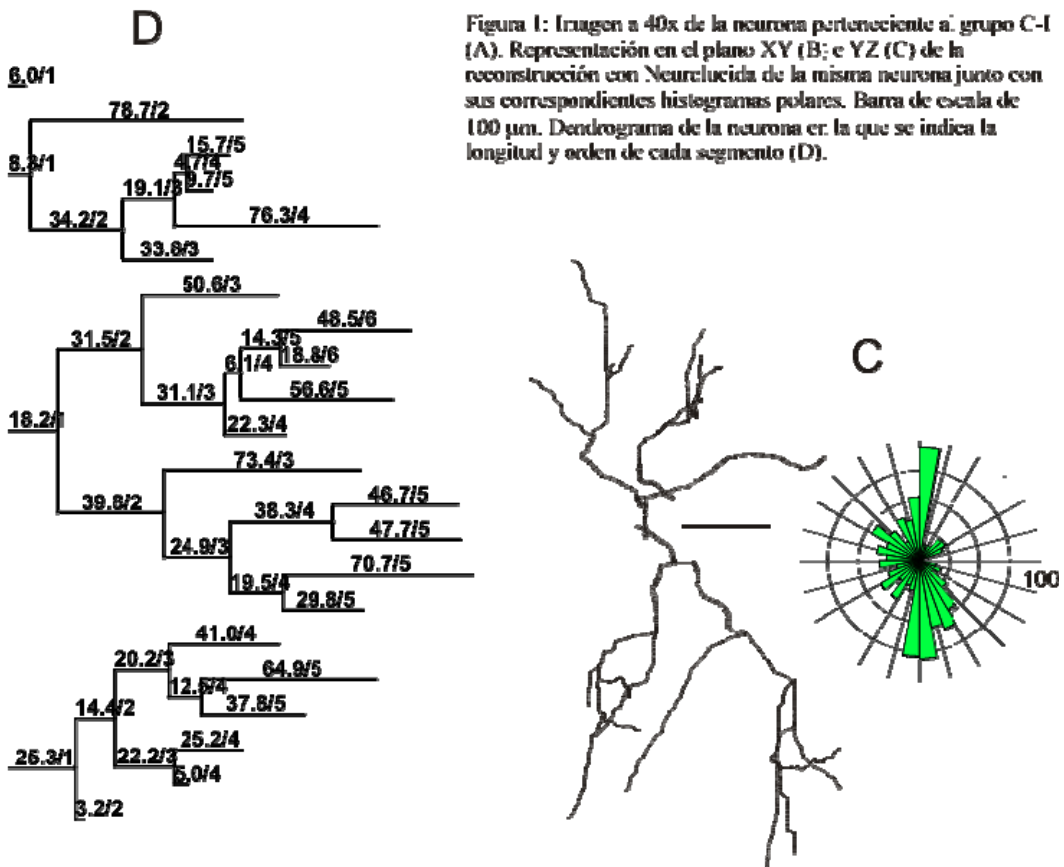


Figura 1: Imagen a 40x de la neurona perteneciente al grupo C-I (A). Representación en el plano XY (B); e YZ (C) de la reconstrucción con NeuroLucida de la misma neurona junto con sus correspondientes histogramas polares. Barra de escala de 100 μ m. Dendrograma de la neurona en la que se indica la longitud y orden de cada segmento (D).



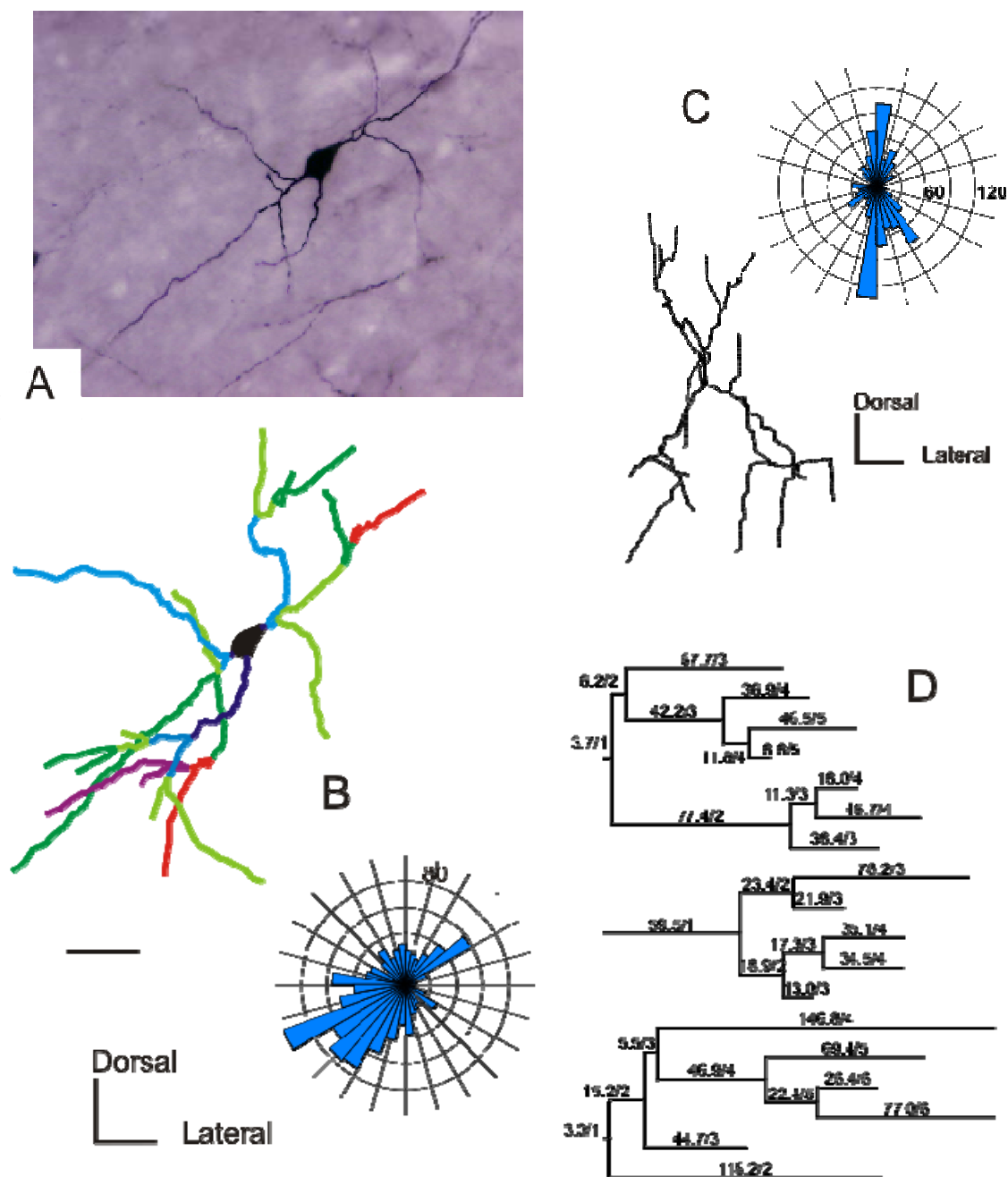


Figura 2- Imagen a 40x de la neurona perteneciente al grupo IO-I (A) Representación en el plano XY (B) e YZ (C) de la reconstrucción con NeuroLucida de la misma neurona junto con sus correspondientes histogramas polares. Barra de escala de 100 μm . Dendrograma de la neurona en la que se indica la longitud y orden de cada segmento (D).

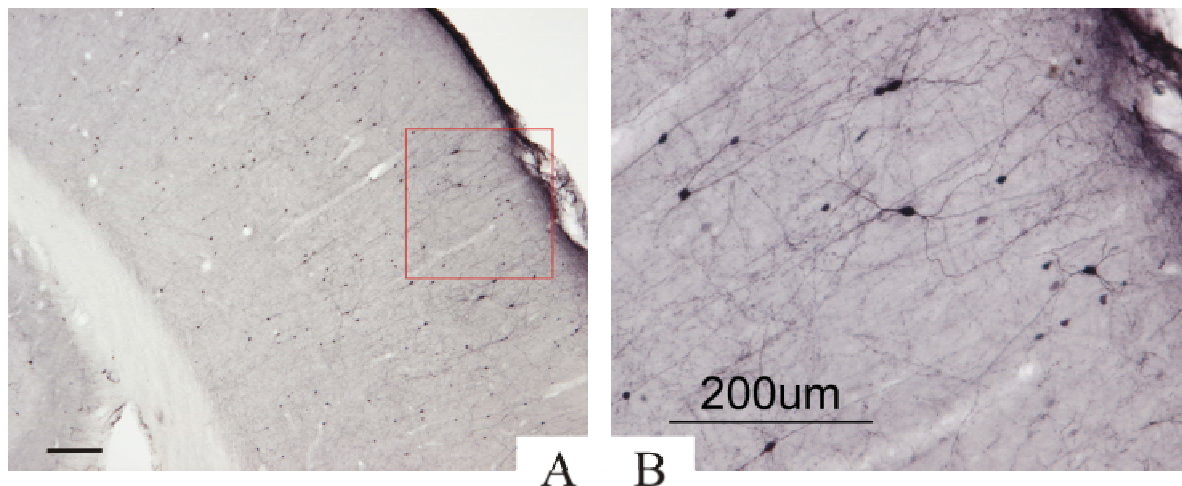
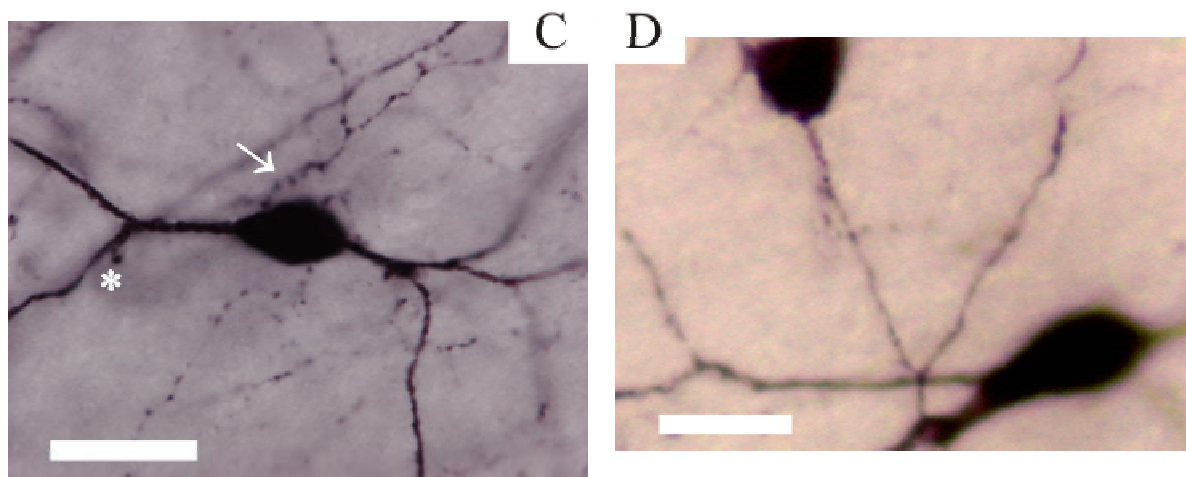


Figura 3: Tinción inmunohistoquímica para calretinina Panorámica a 4 x de la zona de barriles de la rata (A) y aumento a 10x del mismo área del recuadro a la derecha (B). Posible contacto dendrodendrítico en (C) y prolongación pseudoespinosa a 100x * (D). Con una flecha blanca se muestra un axón de origen somático Barras 200 (A) y 20 μ m (C y D)



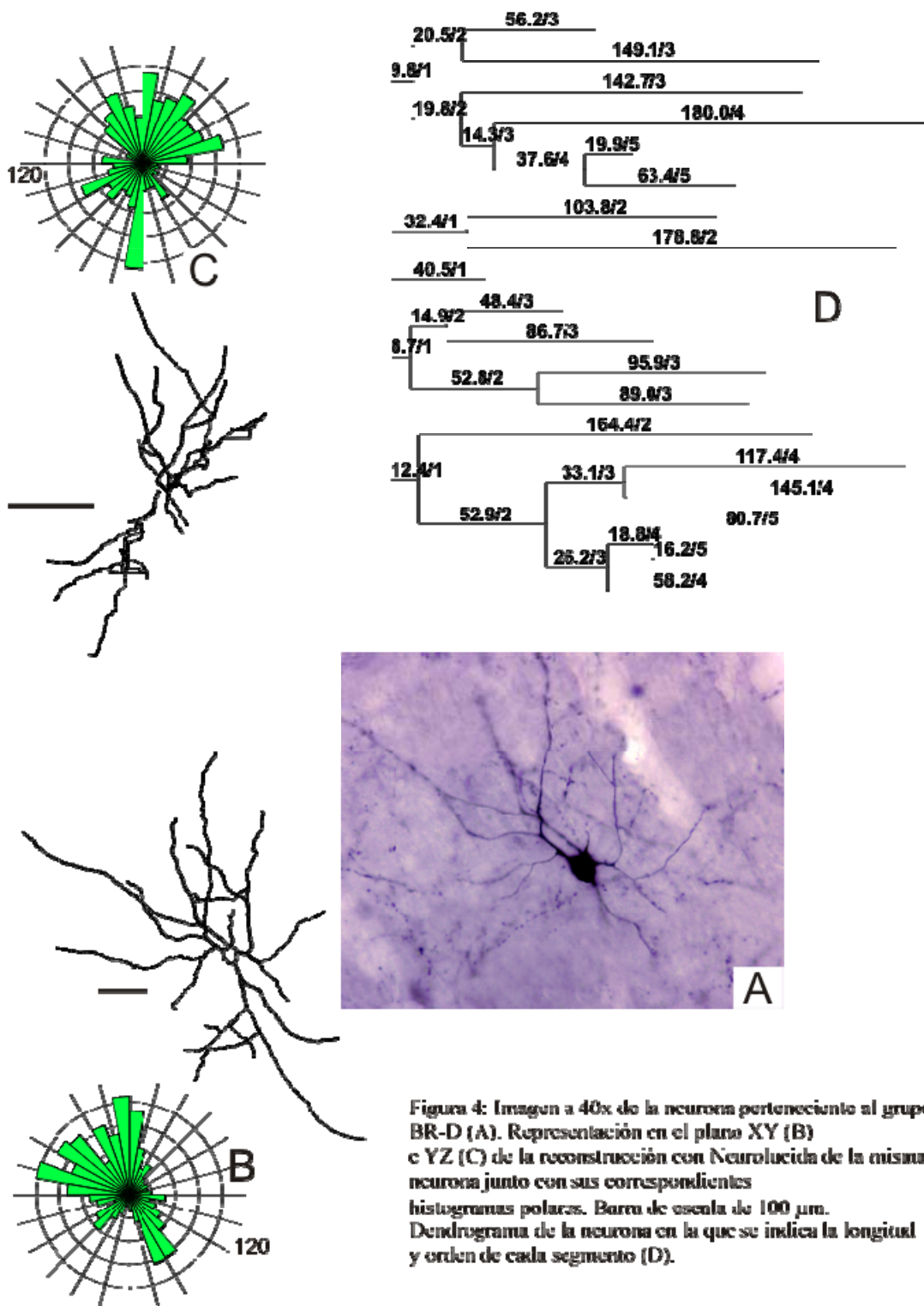


Figura 4: Imagen a 40x de la neurona perteneciente al grupo BR-D (A). Representación en el plano XY (B) e YZ (C) de la reconstrucción con NeuroLucida de la misma neurona junto con sus correspondientes histogramas polares. Barra de escala de 100 μ m. Dendrograma de la neurona en la que se indica la longitud y orden de cada segmento (D).

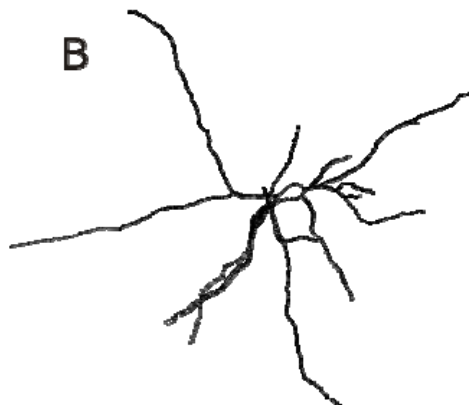
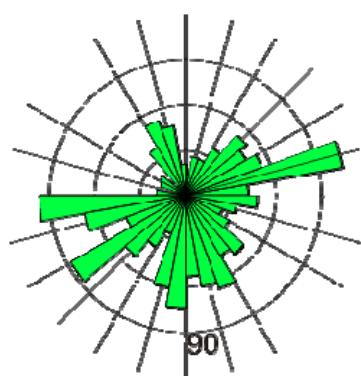
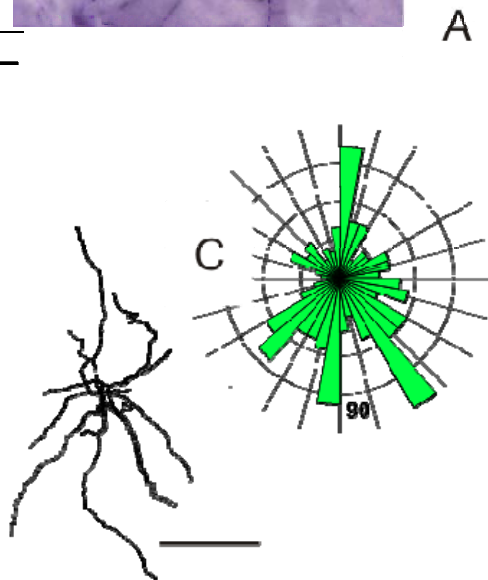
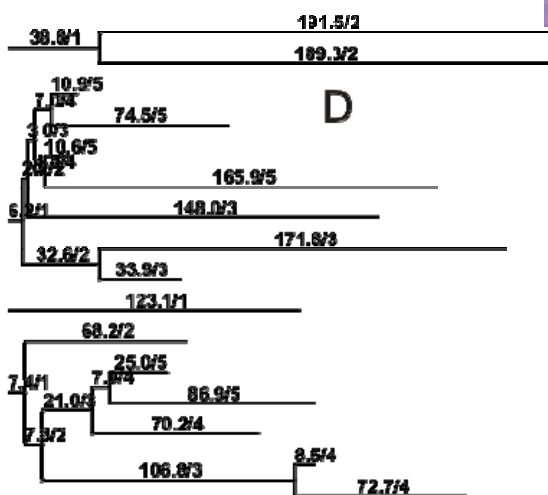
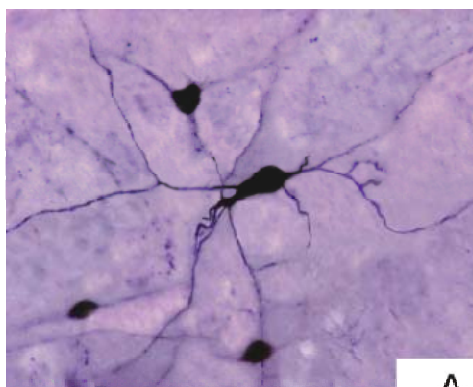


Figura 5. Imagen a 40x de la neurona perteneciente al grupo BR-1 (A). Representación en el plano XY (B) e YZ (C) de la reconstrucción con NeuroLucide de la misma neurona junto con sus correspondientes histogramas polares. Barra de escala de 100 μ m. Dendrograma de la neurona en la que se indica la longitud y orden de cada segmento (D).



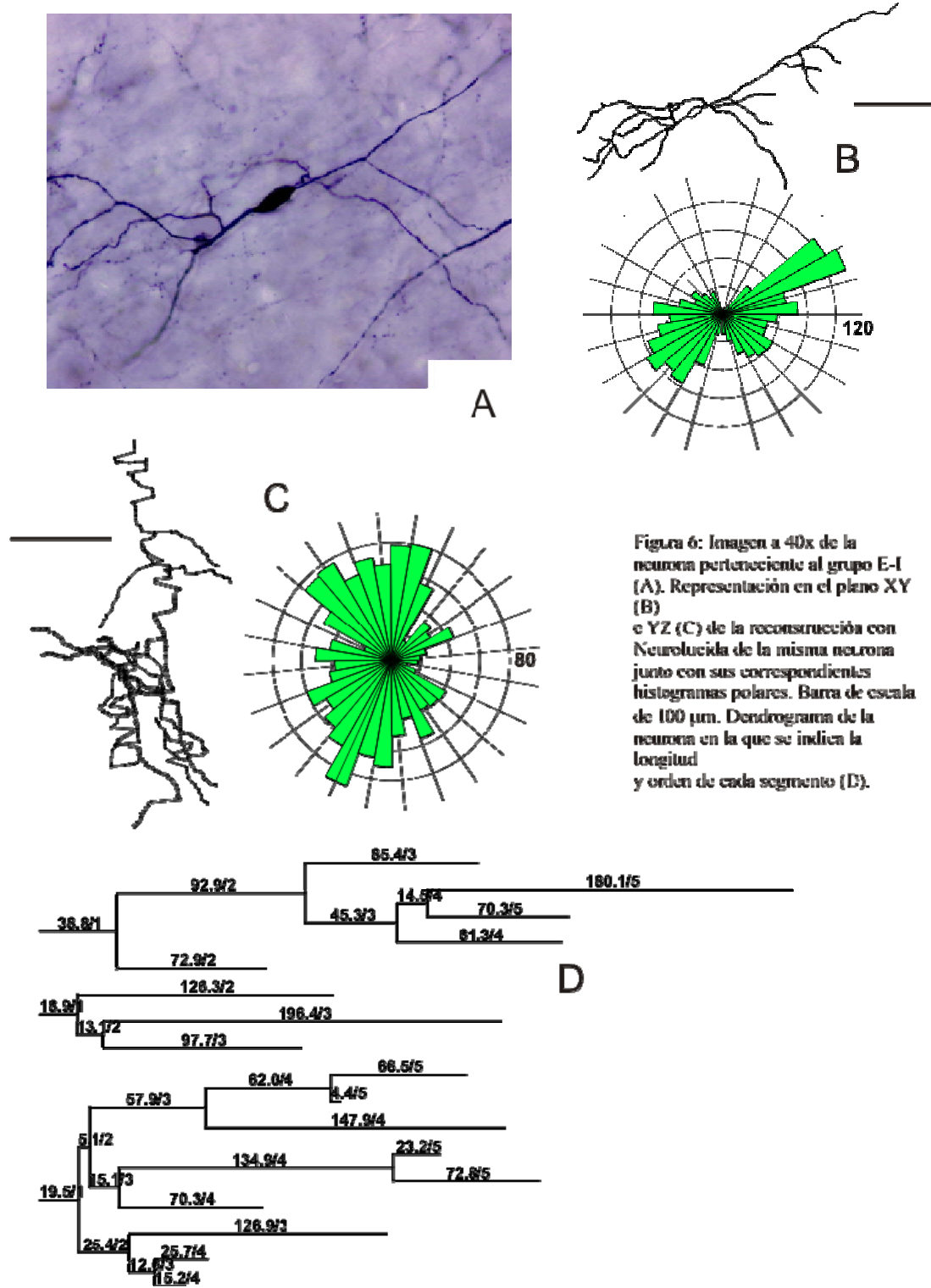
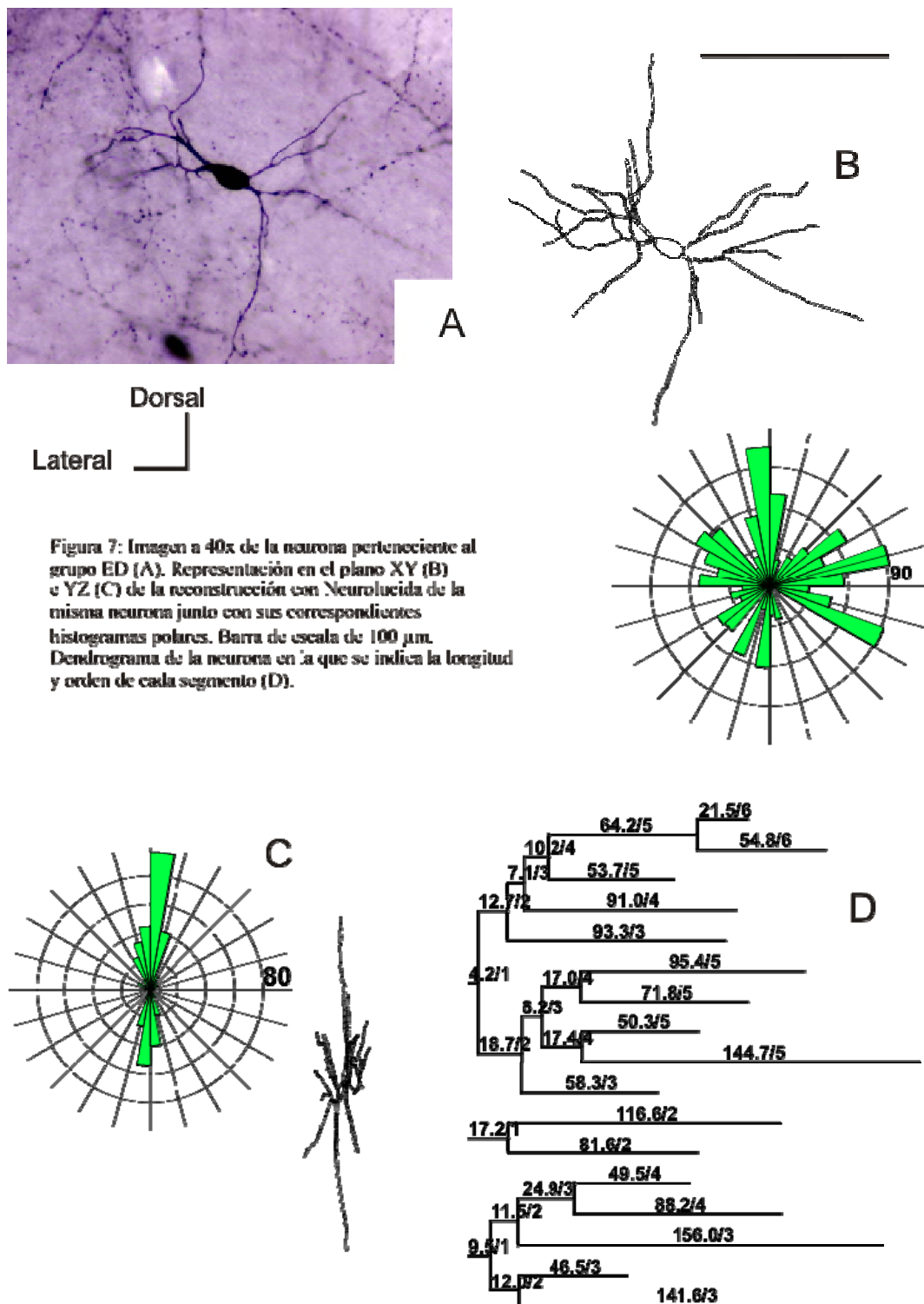


Figura 6: Imagen a 40x de la neurona perteneciente al grupo E-I (A). Representación en el plano XY (B) e YZ (C) de la reconstrucción con NeuroLucida de la misma neurona junto con sus correspondientes histogramas polares. Barra de escala de 100 μ m. Dendrograma de la neurona en la que se indica la longitud y orden de cada segmento (D).



Resumen de casos y parámetros morfológicos más generales

En la Tabla 1 se muestran los casos utilizados en este trabajo y los valores medios de los parámetros morfológicos con los que se define una neurona.

	Nº casos	Nº neuronas	Área Soma (μm^2)	Dendritas primarias	Nº Terminales	Longitud total (μm)
C-D	5	17	125,2±24,9	3,53±0,80	18,2±3,68	1901,8±522,9
C-I	5	18	117,8±13,0	3,39±1,09	17,6±3,22	1824,3±328,6
Io-D	5	20	126,6±40,9	3,60±0,99	17,9±2,58	1808,7±358,1
Io-I	5	21	116,0±21,6	3,48±1,12	17,1±2,19	1665,4±222,4
BR-D	5	17	125,7±19,0	3,35±1,11	16,9±3,06	1698,1±361,7
BR-I	5	17	125,9±14,0	3,12±0,70	16,3±2,87	1688,8±292,0
E-D	5	21	123,5±26,6	3,24±1,14	18,0±3,42	1929,1±449,2
E-I	5	20	124,9±21,9	3,60±1,05	17,1±2,65	1774,9±345,4

Tabla 1: Resumen de los parámetros morfológicos. Media±SD

Como se observa en la tabla y la figura 8 no existen diferencias significativas en las variables generales morfométricas, esto es, que engloban la totalidad de la neurona, ya sea la longitud de todos los segmentos o el área somática (No mostrado).

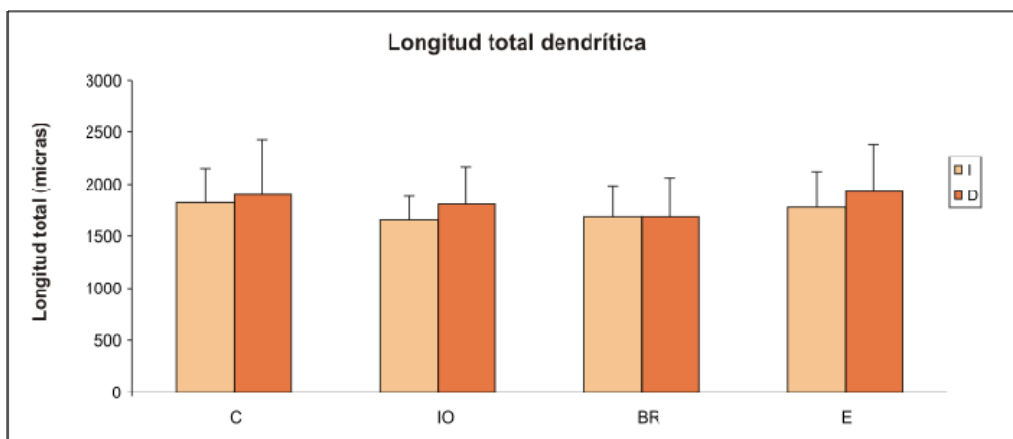


Figura 8: Representación de las longitudes totales dendríticas de cada neurona dependiendo del grupo y lado (valor medio±SD).

La longitud total dendrítica sólo muestra tendencias en comparaciones entre Io-I (hemisferio contralateral a la transección) y los controles (C-D $p=0,07$ y C-I $p=0,09$), siendo Io-I más pequeña.

En cuanto al área somática sólo existen tendencias en las comparaciones entre BR-I y C-I ($p=0,09$). El número de dendritas primarias (árboles) por célula (Figura 9a y 9b) y número de segmentos terminales por célula (Figura 10) sólo registran tendencias en la comparación entre BR-I e Io-D ($p=0,10$ para el número de árboles y $p=0,09$ para el número de segmentos).

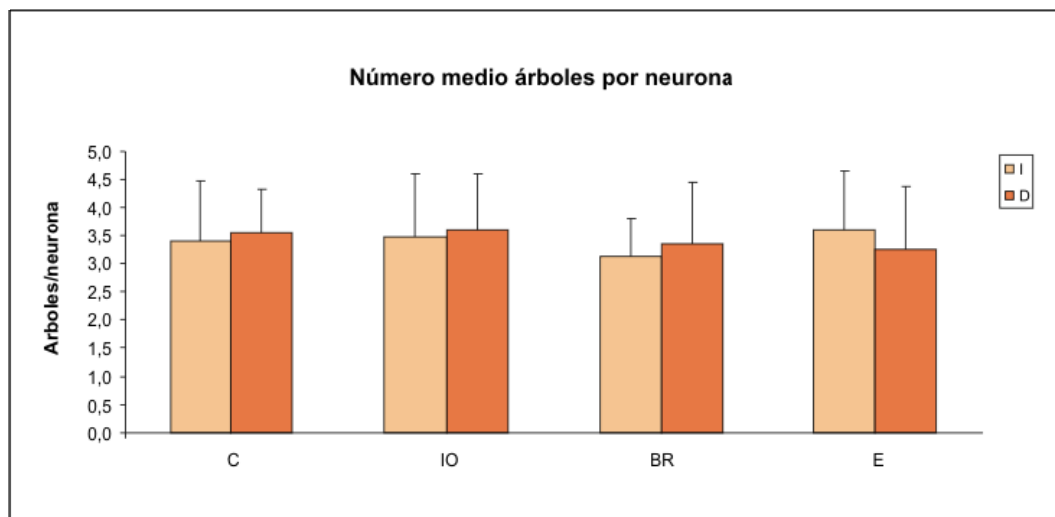


Figura 9a: Representación de las variable generale: **número medio de árboles (dendritas primarias) por neurona** (valor medio \pm SD)

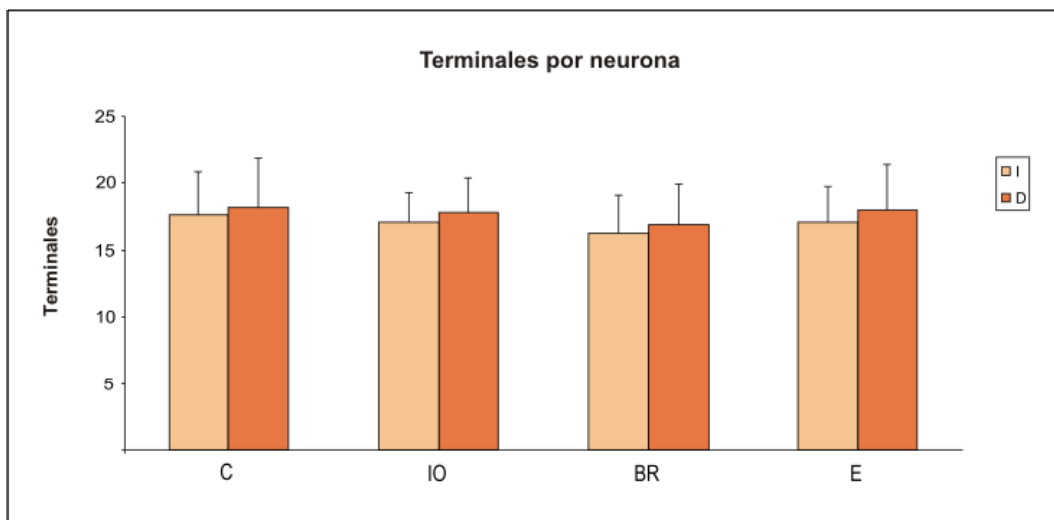


Figura 9b: Representación de las variable generale: **número medio de segmentos terminales por neurona**, según el grupo y hemisferio (valor medio±SD).

A nivel topológico, IO-I y BR-I son los únicos grupos que carecen de segmentos de orden 8 mientras que E-D es el único que presenta segmentos de orden 9.

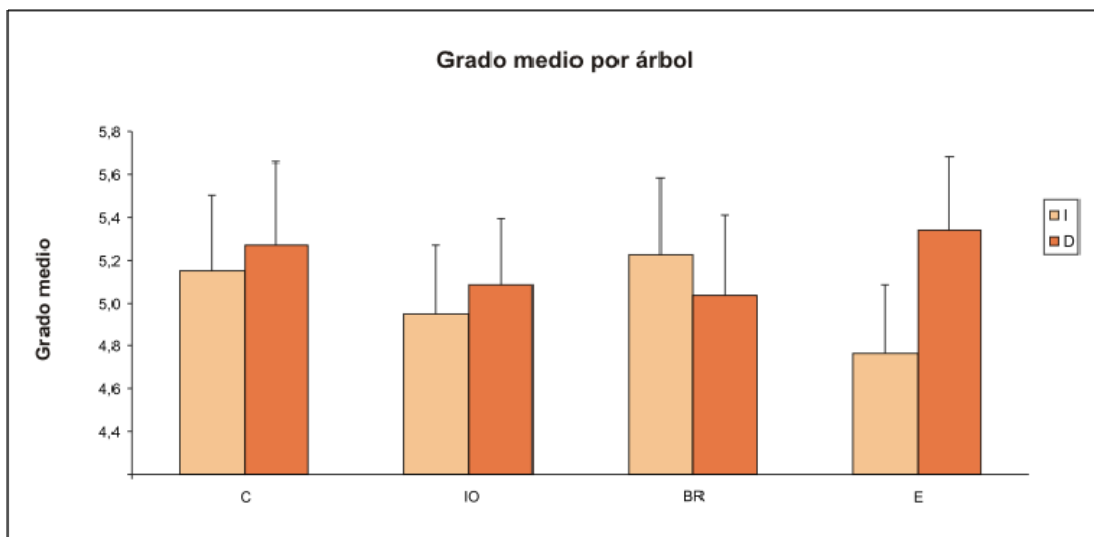


Figura 10: Representación de la variable general topológica **grado medio por árbol** clasificado por grupo y hemisferio (valor medio±SD).

El resto de variables topológicas generales, como el número de árboles o segmentos terminales por neurona, o el de grado medio (número de segmentos terminales por cada árbol), representado en la figura 11 no muestran diferencias.

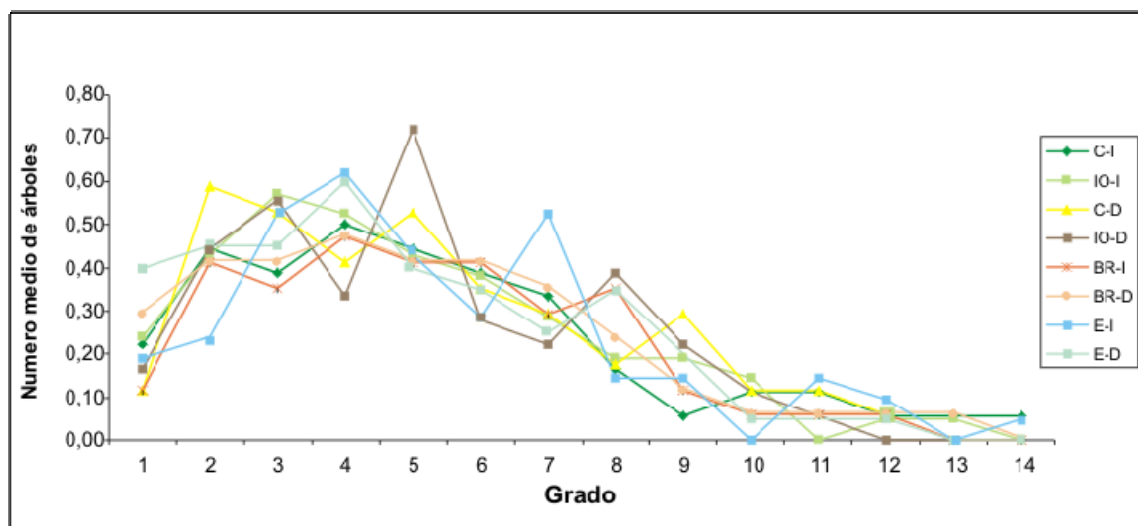


Figura 11: Representación de la variable general topológica: **número de árboles medio por neurona según el grado** dependiendo del grupo. Se han suprimido las barras de error para una mayor claridad

Comparación de lado intragrupo

Grupo control (C-I y C-D)

No hay diferencias en longitud de los segmentos terminales (figura 12) ni intermedios independientemente del orden.

Topológicamente muestran variaciones en el número de árboles de grado 9, menos numerosos en C-I (p=0,07).

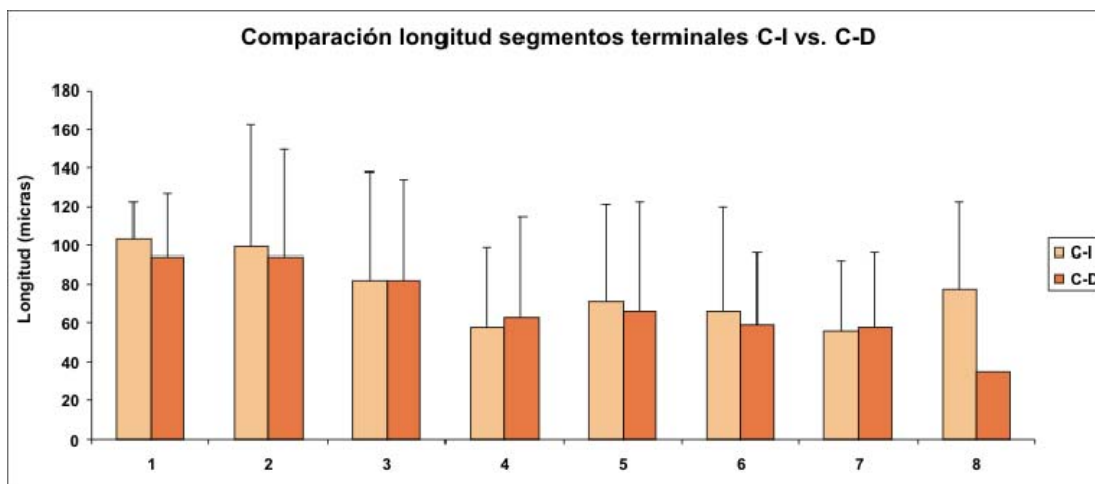


Figura 12: Representación de las longitudes medias de los segmentos terminales clasificados por orden del grupo control izquierdo frente al control derecho (valor medio±SD).

En el análisis de Sholl sólo hay una diferencia significativa ($p=0,03$) con C-I menor que C-D, en el sumatorio de las longitudes de los segmentos que se encuentran en el primer radio (0-30 micras).

Grupo con sección de nervio infraorbitario derecho (IO-I y IO-D)

Diferencias en la distribución de las longitudes de los segmentos terminales de órdenes 2 y 3 ($p=0,04$) y en sus medianas ($p=0,003$ y $p=0,006$ respectivamente), siendo más bajos los valores de IO-I (Figura 13).

Si agrupamos los segmentos terminales de los órdenes 2 al 3 y del 4 a 8 obtenemos que en el análisis de K-S existen diferencias en 2 al 3 ($p=0,006$) y al comparar las medianas diferencias altamente significativas en ordenes 2 al 3 ($p=0,007$) para decrecimiento de IO-I y tendencia 4 al 8 ($p=0,08$) para crecimiento de IO-I.

Atendiendo a la distribución espacial observamos que tanto en el número de intersecciones, como por su longitud incluida, en las primeras esferas (rangos 30 a 90 micras) existen diferencias significativas (Figura 14).

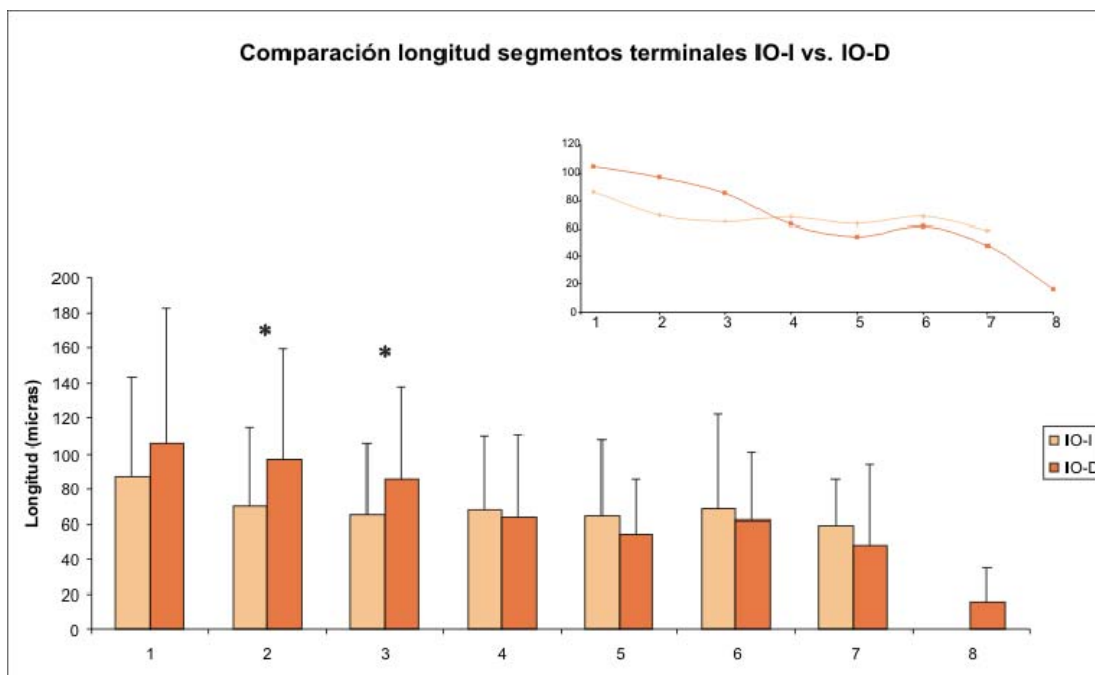


Figura 13: Representación de las longitudes medias de los segmentos terminales, clasificados por orden, del grupo infraorbitario izquierdo frente al derecho (valor medio±SD). Los asteriscos representan significación en la comparación de las medianas mediante un test no paramétrico de Mann-Whitney.

En la zona superior derecha se representa la longitud media de los segmentos terminales con un diagrama de puntos para poder apreciar las tendencias de tamaño de los segmentos terminales.

El resto de variables no presentan ningún tipo de variación adicional ni topológica ni morfométrica.

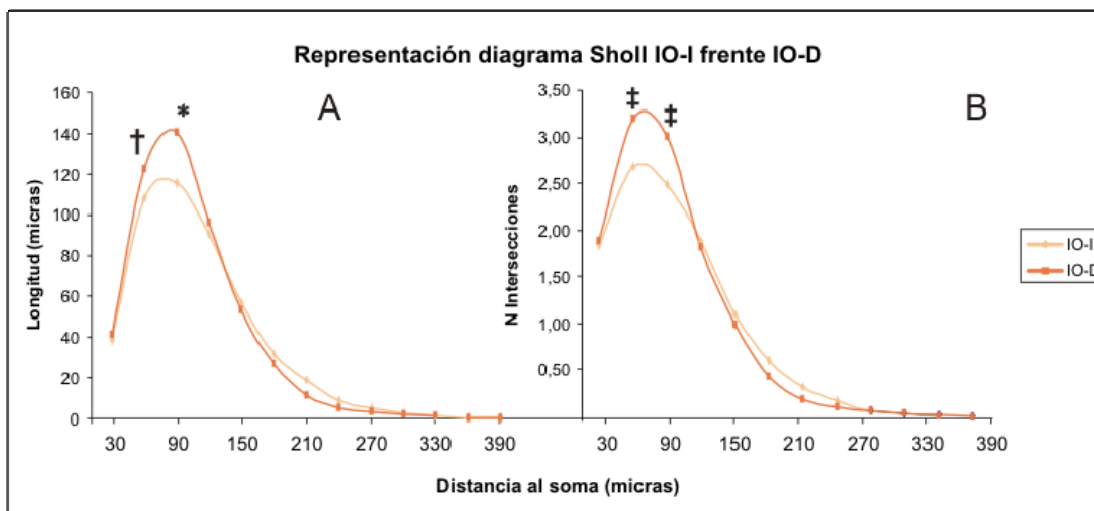


Figura 14: Análisis de Sholl de las longitudes dendríticas (A) y número de intersecciones (B) contenidas en esferas concéntricas separadas por 30 μm y con centro en el soma. *(p=0,03), †(p=0,10), ‡ (p=0,05)

Grupo con recorte de bigotes del lado derecho (BR-I y BR-D)

Existen variaciones en la longitud de los segmentos terminales de órdenes superiores. Los segmentos de orden 5 y 6 muestran significación en las diferencias entre sus distribuciones (orden 5 $p=0,02$) y en BR-I las medianas son significativas mayores (orden 5 $p=0,02$ y orden 6 $p=0,12$).

Al agrupar los segmentos terminales observamos significación en las distribuciones y las medianas, siendo los segmentos que abarcan los órdenes superiores mayores en BR-I ($p=0,009$ M-W) y de distinta distribución ($p=0,02$) y los de órdenes inferiores menores en BR-I ($p=0,08$).

En el análisis de Sholl el número de intersecciones de BR-I es inferior en los anillos que van de 150 a 180 μm ($p=0,01$) y 210 a 240 μm ($p=0,01$).

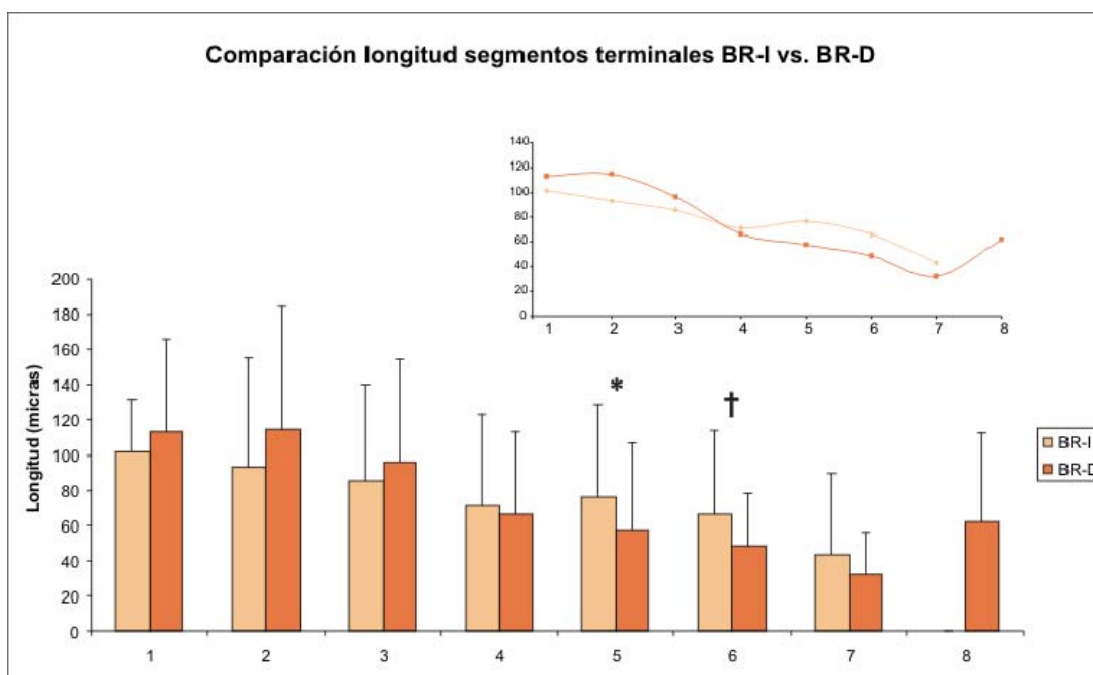


Figura 15: Representación de las longitudes medias de los segmentos terminales, clasificados por orden, del grupo recorte de bigotes izquierdo frente al derecho (valor medio±SD). El asterisco y la cruz indican respectivamente significación o tendencia estadística en la comparación de las medianas. En la zona superior derecha se representa la longitud media de los segmentos terminales con un diagrama de puntos para poder apreciar las tendencias de tamaño de los segmentos terminales.

Grupo con recorte de bigotes del lado derecho y entorno enriquecido (E-I y E-D)

No existen variaciones en las longitudes de los segmentos terminales si realizamos las comparaciones orden a orden. Al agruparlas se aprecian cambios en las medianas de los ordenes inferiores (p=0,02) con decrecimiento de E-I.

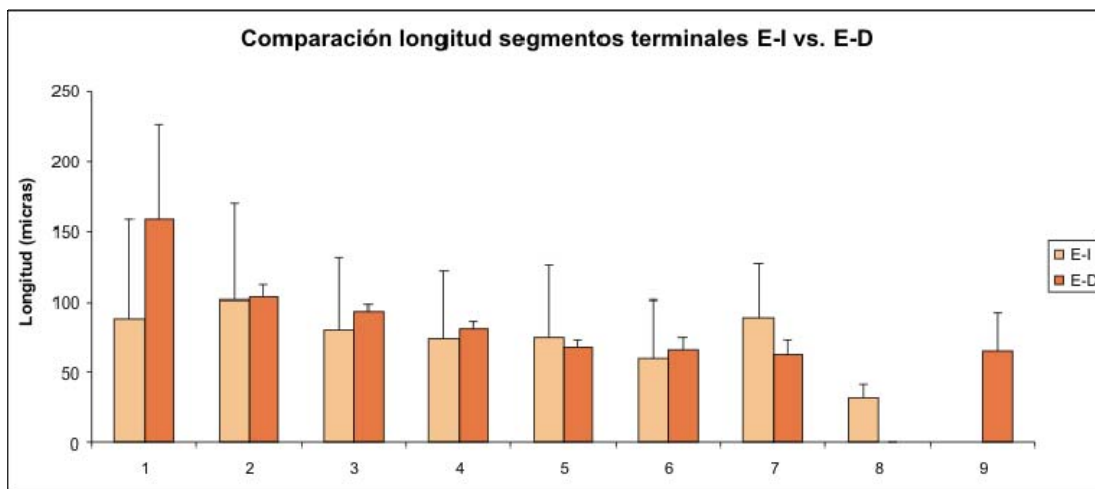


Figura 16: Longitudes medias de los segmentos terminales clasificados por orden del grupo enriquecido izquierdo frente al enriquecido derecho (valor medio±SD).

Además, existe cierta tendencia ($p=0,09$) a encontrar más frecuentemente árboles de grado 7 en la población E-D que en la E-I.

El análisis de Sholl reveló diferencias no estadísticamente significativas (principalmente tendencias) en la distribución espacial de los árboles dendríticos de estos dos grupos. Existe una tendencia a que E-D presente un número superior de intersecciones en las esferas que comprenden el espacio de 60 a 150 μm ($p= 0,06$ de 60 a 90 μm ; $p=0,08$ de 90 a 120 μm y $p=0,07$ de 120 a 150 μm). Esto va acompañado de diferencias en la longitud de segmentos en este grupo ($p= 0,02$ de 60 a 90 μm ; $p=0,13$ de 90 a 120 μm y $p=0,09$ de 120 a 150 μm).

Comparación entre grupos

Grupo control frente a grupo con sección de nervio infraorbitario

Grupo C-D – Grupo IO-D

No existen diferencias de ningún tipo

Grupo C-I – Grupo IO-I

Existen diferencias en la longitud de los segmentos terminales tanto en la distribución como en las medianas de estas poblaciones, representativas de los efectos de la desafrentización total.

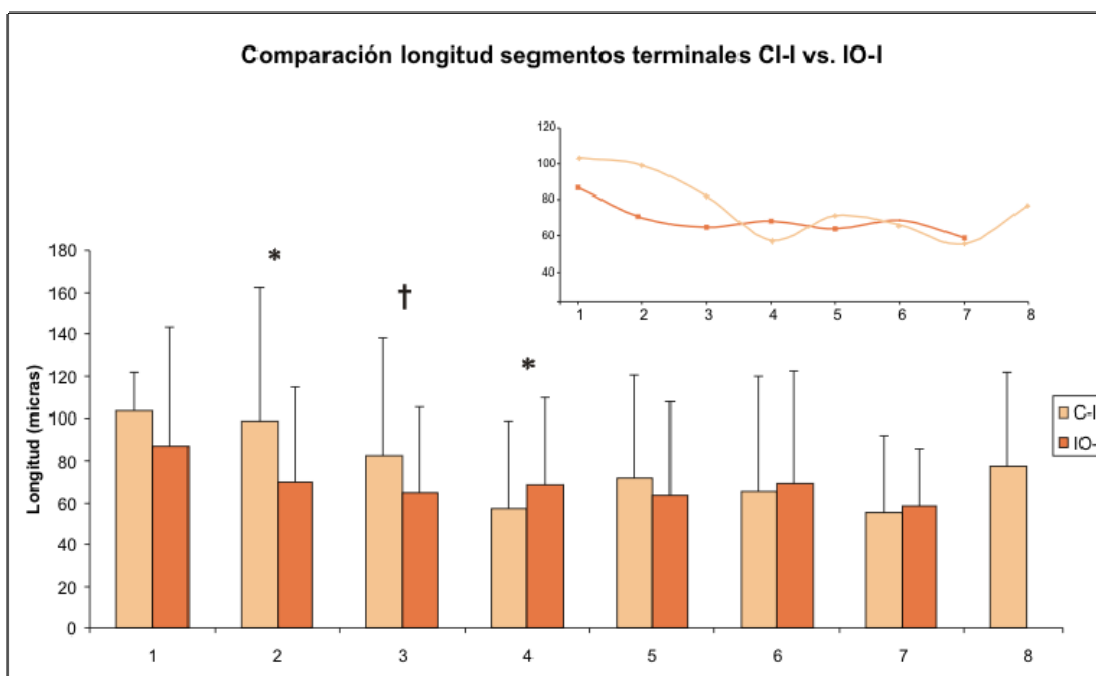


Figura 17: Representación de las longitudes medias de los segmentos terminales, clasificados por orden, comparando grupo control izquierdo con infraorbitario izquierdo (valor medio±SD). El asterisco y la cruz indican respectivamente significación ($p=0,02$ orden 2 y $p=0,01$ orden 4) o tendencia estadística ($p=0,08$ orden 3) en la comparación de las medianas. En la zona superior derecha se representa la longitud media de los segmentos terminales con un diagrama de puntos para poder apreciar las tendencias de tamaño de los segmentos terminales.

Las distribuciones muestran diferencias en los órdenes 2 y 4 ($p=0,02$ y $p=0,009$). En cuanto a las medianas existen diferencias en los órdenes 2, 3 y 4 ($p=0,02$ orden 2, $p=0,08$ orden 3 y $p=0,01$ orden 4). Las medianas son menores en IO-I en los órdenes 2 y 3 pero mayores en 4. Si agrupamos los órdenes observamos que los órdenes inferiores tienen una distribución ($p=0,008$) y medianas ($p=0,003$; IO-I inferior) significativamente distintas. Los órdenes superiores muestran, en cambio, una tendencia a aumentar ($p=0,06$) la mediana de IO-I.

Con el análisis de Sholl sólo se detecta una ligera variación ($p=0,08$) en el número de intersecciones desde 30 hasta 60 micras, siendo menos numerosas en IO-I.

Grupo control frente a grupo con recorte de bigotes

Grupo C-D – Grupo BR-D

No existen diferencias destacables en las longitudes de los segmentos terminales excepto por una tendencia a que los segmentos de órdenes inferiores de BR-D sean mayores y diferentemente distribuidos ($p=0,10$ en ambos casos).

Sin embargo, el análisis de Sholl muestra amplias diferencias en las regiones situadas entre los 91 y 240 μm , en particular en el número de intersecciones (Figura 18) aunque la longitud de los procesos en varias acotaciones, en concreto entre 121-180 para ambos ($p=0,05$) y 210-240 μm también mostraron diferencias ($p=0,02$).

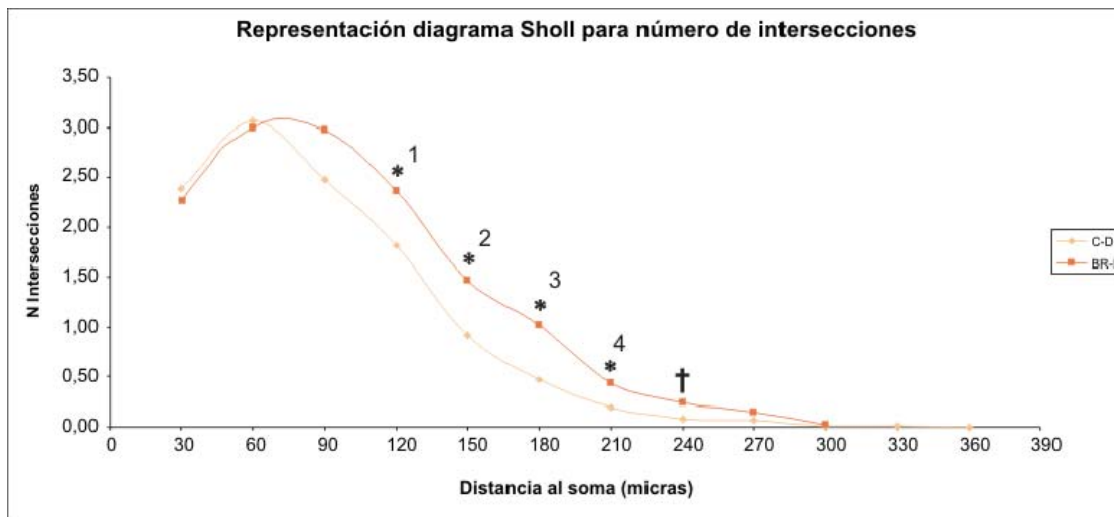


Figura 18: Análisis de Sholl del número de intersecciones dependiendo de la distancia al soma. Los asteriscos representan significación estadística (*1 p=0,04; *2 p=0,03; *3 p=0,002; *4 p=0,003; † p=0,07)

Grupo C-I – Grupo BR-I

No existen diferencias destacables en las longitudes de los segmentos terminales excepto por una cierta tendencia a que los segmentos de órdenes superiores de BR-I sean mayores y diferentemente distribuidos (p=0,11 en ambos casos).

El análisis de Sholl tampoco mostró ninguna diferencia significativa entre el lado sin tacto háptico (BR-I) y el lado control correspondiente.

Grupo control frente a grupo con recorte de bigotes y entorno enriquecido

Grupo C-D – Grupo E-D

Las longitudes de los segmentos terminales no presentaban cambios significativos de ningún tipo al comparar orden a orden las distribuciones y medianas.

Sin embargo, al agruparlos, el conjunto formado por segmentos de órdenes superiores mostraba cambios sobre todo en la comparación de las medianas ($p=0,03$), con los segmentos de E-D de mayor tamaño. En órdenes inferiores, los segmentos presentaban cierta tendencia a distribuirse de manera diferente ($p=0,12$) y a cierta enlongación ($p=0,16$) en el caso de E-D

Comentario [JC1]: No es tendencia como indicabas en los materiales y métodos pero es que está muy próxima y por lo menos indica algo

Las longitudes de los segmentos intermedios de orden 2 se distribuyen de manera distinta ($p=0,02$) y son más pequeños en el grupo enriquecido E-D ($p=0,002$).

Además, existe una tendencia ($p=0,10$) a encontrar más frecuentemente árboles de grado 2 en la población C-D que en la E-D.

El análisis de Sholl muestra amplias diferencias en las regiones situadas entre los 61 y 240 μm , en particular en el número de intersecciones aunque también se vio un aumento en la longitud de los segmentos comprendidos entre 91-180 (Figura 20)

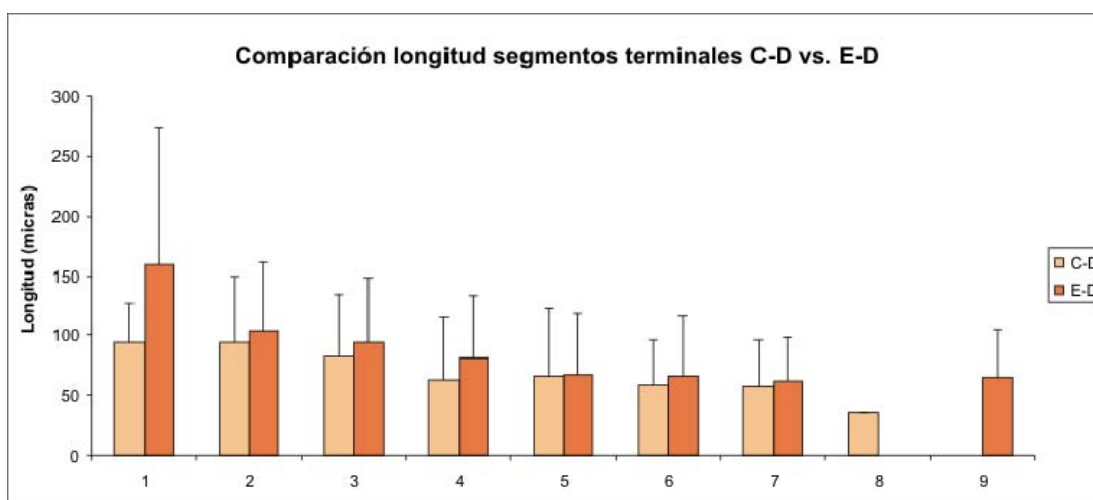


Figura 19: Longitudes medias de los segmentos terminales clasificados por orden del grupo control derecho frente al enriquecido derecho (valor medio \pm SD).

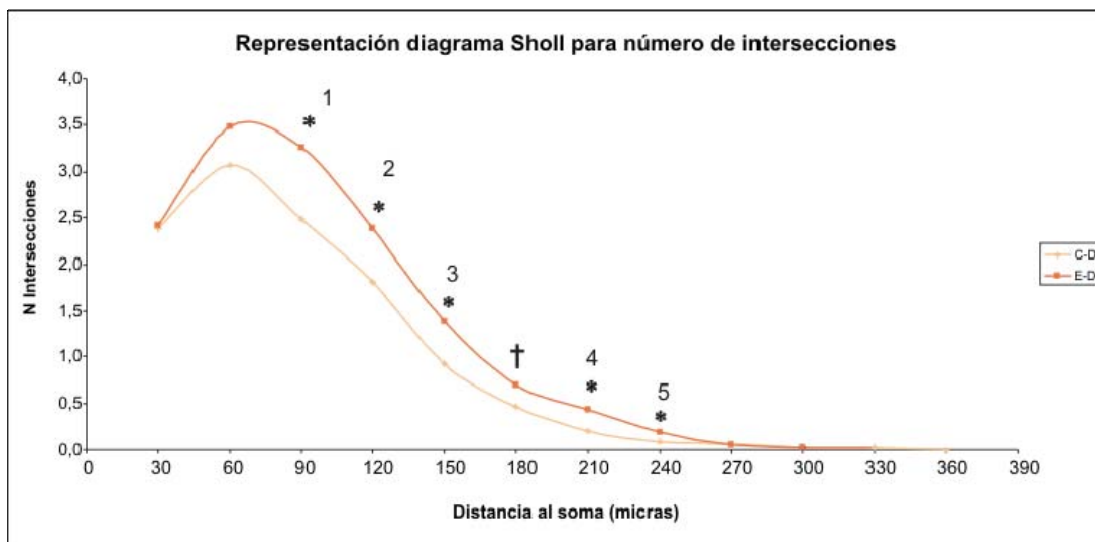


Figura 20: Análisis de Sholl del número de intersecciones dependiendo de la distancia al soma. Los asteriscos representan significación estadística (*1 p=0,01; *2 p=0,0001; *3 p=0,003; *4 p=0,009; *5 p=0,05; † p=0,10)

Grupo C-I – Grupo E-I

Analizando las poblaciones de longitudes de los segmentos terminales orden a orden se aprecian cambios significativos en los órdenes 4 y 7. En estos órdenes C-I muestra una población distinta y de menor tamaño que E-I (p=0,01 K-S y p=0,03 M-W para orden 4 y 0,05 K-S y p=0,08 M-W en orden 7). Al agrupar las poblaciones se mantienen las diferencias en la población que agrupa los segmentos de mayor orden (p=0,05 K-S), aunque las medianas no sean significativamente distintas (p=0,11)

Existe una tendencia a la diferenciación de las poblaciones de los segmentos intermedios de orden 3 (p=0,07 K-S) y la disminución de tamaño de estos segmentos en C-I (p=0,03).

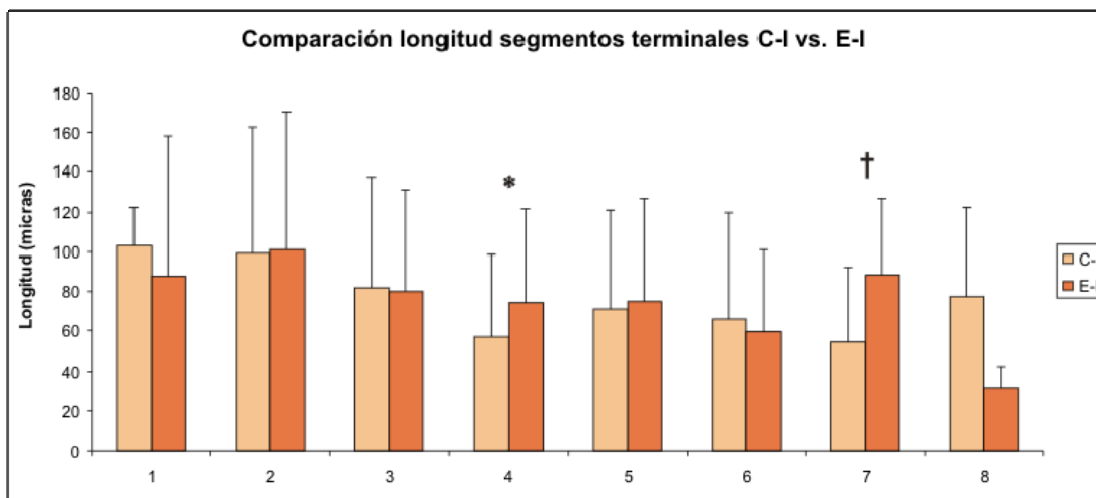


Figura 21: Longitudes medias de los segmentos terminales clasificados por orden del grupo control izquierdo frente al enriquecido izquierdo (valor medio±SD). Los asteriscos indican significación estadística.

El análisis sobre la distribución espacial de los segmentos no muestra variaciones destacables.

Grupo con recorte de bigotes frente a grupo con sección de nervio infraorbitario

Grupo BR-D – Grupo IO-D

Se han registrado diferencias en las distribuciones de Sholl tanto en la longitud de los segmentos como en el número de intersecciones (Figura 22).

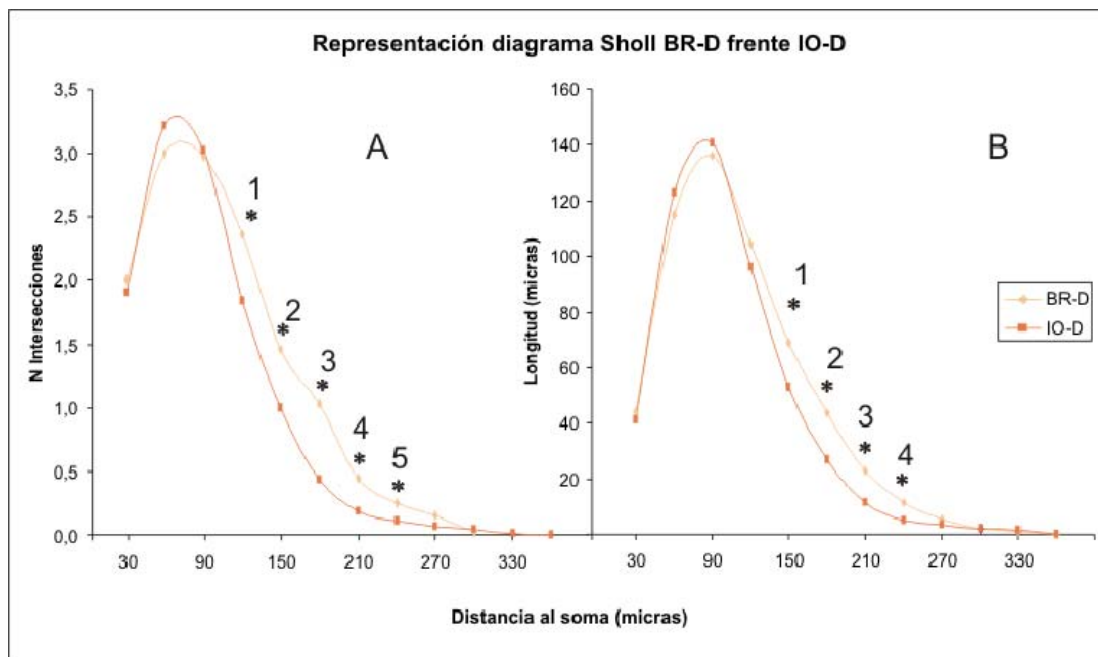


Figura 22: Análisis de Sholl del número de intersecciones (**A**) y las longitudes dendríticas (**B**) contenidas en esferas concéntricas separadas por 30 μm y con centro en el soma. Leyendas en A (*1 $p=0,02$; *2 $p=0,001$; *3 $p=0,0003$; *4 $p=0,0006$; *5 $p=0,007$). Leyendas en B (*1 $p=0,02$; *2 $p=0,001$; *3 $p=0,0001$; *4 $p=0,01$)

Grupo BR-I Grupo IO-I

Existen diferencias en la distribución de las poblaciones de segmentos terminales de órdenes inferiores sólo cuando se agrupan ($p=0,02$). En cuanto a sus medianas, los órdenes inferiores tanto separada ($p=0,05$ para orden 2 y $p=0,03$ para orden 3) como en conjunto ($p=0,002$) del grupo BR-I son mayores.

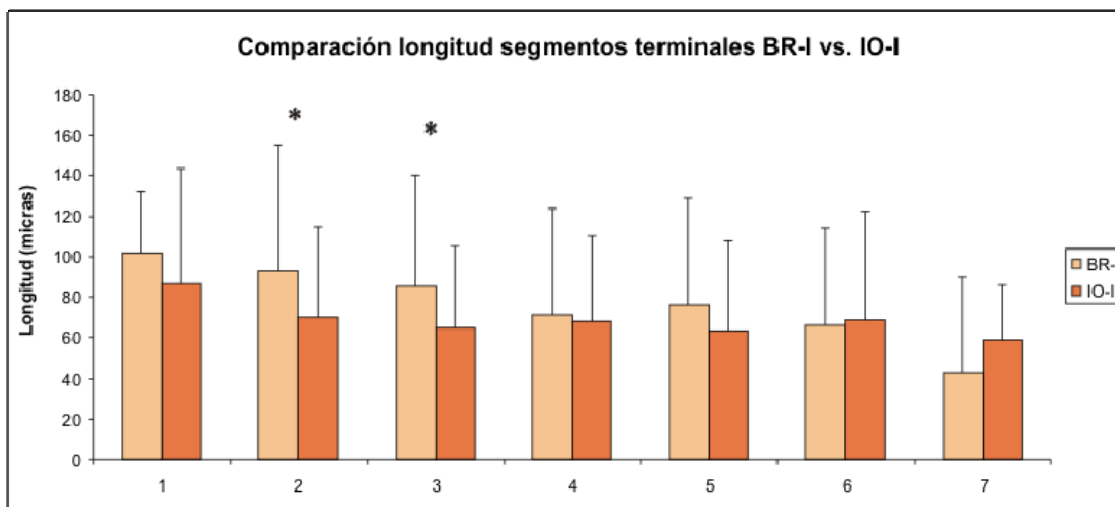


Figura 23: Longitudes medias de los segmentos terminales clasificados por orden del grupo con bigotes recortados izquierdo frente al infraorbitario izquierdo (valor medio±SD). Los asteriscos indican significación estadística.

Grupo con recorte de bigotes frente a grupo con recorte de bigotes y entorno enriquecido

Grupo BR-D – Grupo E-D

En cuanto a las longitudes de segmentos terminales y atendiendo a órdenes separados (figura 24), no existen diferencias salvo en orden 7 que registra una tendencia a la variación en la comparación de poblaciones ($p=0,07$) y diferencias significativas en sus medianas ($p=0,04$), teniendo mayor longitud el lado del grupo enriquecido.

Sin embargo al agrupar las poblaciones, se ponen de manifiesto diferencias en el conjunto que engloba los órdenes superiores. Tanto la distribución de la población ($p=0,01$) como la mediana ($p=0,0009$) muestran diferencias altamente significativas, siendo el grupo E-D el de mayor longitud.

El análisis de Sholl muestra diferencias significativas en el número de intersecciones en esferas espacialmente dispersas. En concreto hay un mayor número de intersecciones en el grupo BR-D para los esferas desde 150-180 μm ($p=0,03$) y de 240 a 270 μm ($p=0,07$).

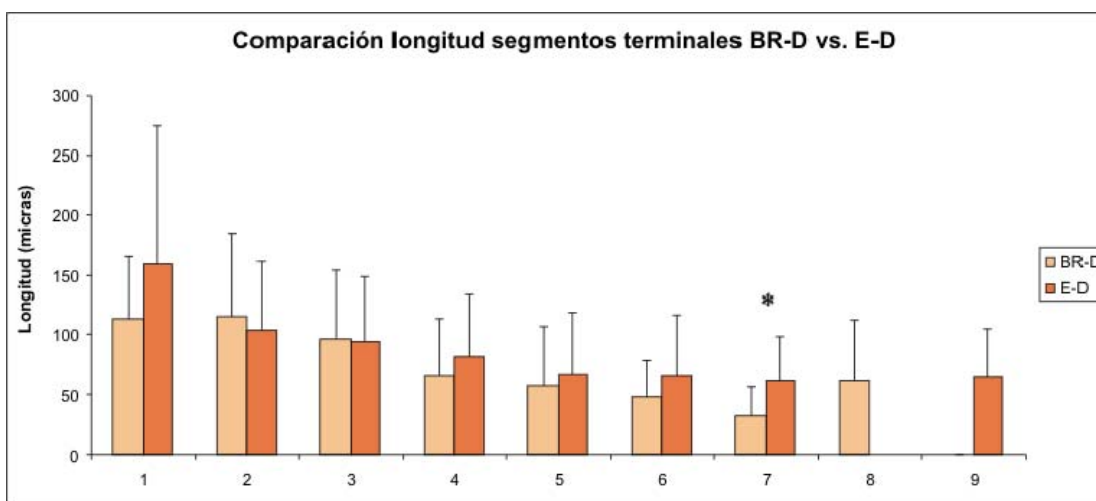


Figura 24: Longitudes medias de los segmentos terminales clasificados por orden (valor medio \pm SD). El asterisco indica significación estadística.

Cabe destacar que existen variaciones topológicas en el número de segmentos (Figura 18). Se registran diferencias significativas con respecto al número de segmentos terminales de orden 3 ($p=0,05$ test de Student con datos no emparejados y asumiendo varianzas semejantes) y segmentos intermedios de orden 2 ($p=0,02$ test estadístico igual al aplicado para segmentos terminales).

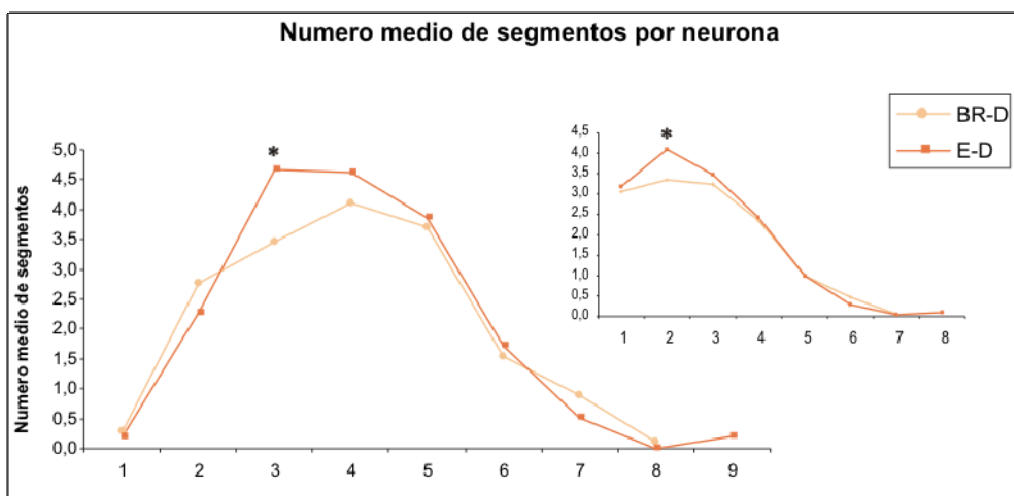


Figura 25: Representación del número medio de segmentos que se encuentra en cada neurona, clasificándola por el orden. Los segmentos terminales se representan en la gráfica principal mientras que los segmentos intermedios se han situado en la gráfica inserta. Las barras de desviación estándar se han suprimido para una mayor claridad.

Grupo BR-I – Grupo E-I

No se registran diferencias significativas aunque parece que las longitudes de los segmentos intermedios de orden 3 están distribuidos de manera diferente ($p=0,09$) y son ligeramente mayores en el lado que sólo sufrió el recorte de bigotes sin enriquecimiento ($p=0,11$).

Grupo con recorte de bigotes y entorno enriquecido frente a grupo con sección de nervio infraorbitario

Grupo E-D – Grupo IO-D

Por órdenes dendríticos, sólo el orden 4 muestra diferencias al analizar la longitud de los segmentos terminales ($p=0,08$ K-S y $p=0,04$ M-W siendo mayor E-D). Al agruparse, se registra una diferencia en la población formada por los órdenes superiores con los segmentos desigualmente distribuidos ($p=0,03$) y mayores para E-D ($p=0,02$).

En cuanto al análisis de Sholl, éste muestra ciertas diferencias en las variables de longitud de segmentos entre 150 y 240 micras ($p=0,09$ para 120-150 y 150-180; $p=0,03$ para 180-210; $p=0,05$ 210-240) así como en el número de intersecciones ($p=0,05$ para 150-180; $p=0,03$ para 180-210), en todos los casos para valores superiores en E-D.

Además se ha detectado una tendencia a la mayor abundancia de árboles de grado 7 en el grupo enriquecido.

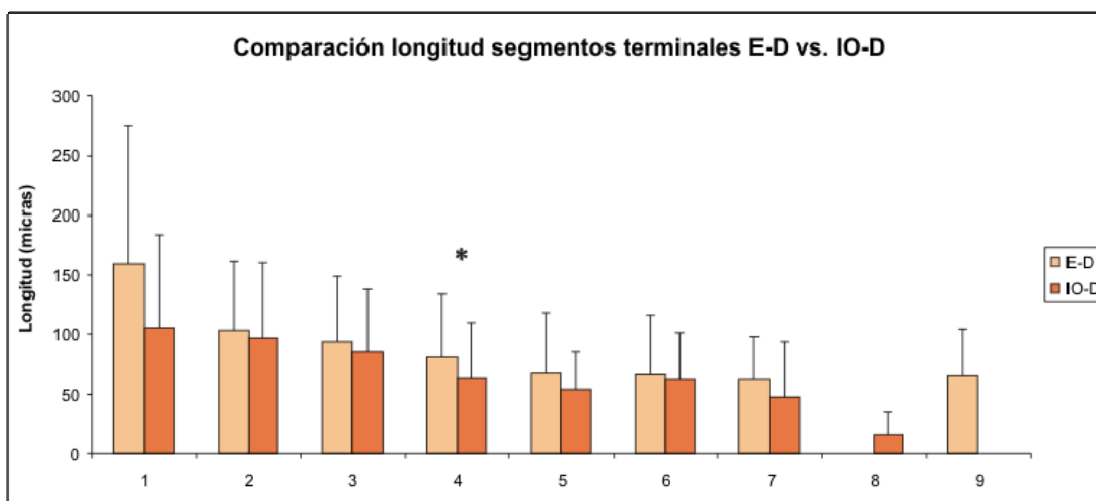


Figura 26: Longitudes medias de los segmentos terminales clasificados por orden (valor medio \pm SD). El asterisco indica significación estadística.

Grupo E-I – Grupo IO-I

Las longitudes de los segmentos terminales de orden 2 y 3 muestran diferencias en sus distribuciones ($p=0,01$ para orden 2 y $p=0,12$ para orden 3) así como una mediana inferior en el grupo desaferentizado para los mismos órdenes ($p=0,01$ y $p=0,08$, figura 20). Al agruparse, los valores de los órdenes inferiores mantienen estas diferencias tanto en la distribución ($p=0,02$) como en mediana menor de IO ($p=0,005$).

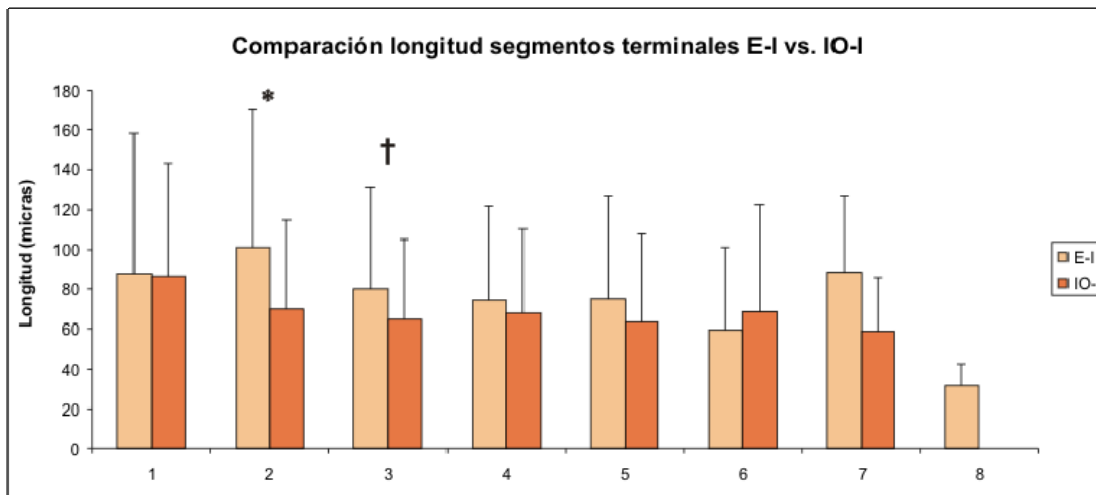


Figura 27: Longitudes medias de los segmentos terminales clasificados por orden (valor medio±SD). El asterisco indica significación estadística mientras que la cruz señala tendencia.

Parámetros más relevantes: diferencia de lado y/o grupo

En este apartado, se compararán las variables que hemos considerado más destacables una vez mostrados los datos grupo por grupo tratando de resumir, mediante tablas, las variaciones más destacables.

Comparación longitud segmentos terminales por agrupaciones

A continuación se esquematiza los resultados más destacables previamente expuestos en los apartados anteriores sobre las diferencias de longitudes de los segmentos terminales cuando se les agrupa en conjuntos que engloban los segmentos de órdenes 1 a 3 y 4 a 8.

C-D								
C-I	---							
IO-D	---							
IO-I		↓↑	↓↑					
BR-D	↑—		---					
BR-I		—↑		↑—	↓↑			
E-D	—↑		—↑		—↑			
E-I		—↑		↑—		---	↓—	
	C-D	C-I	IO-D	IO-I	BR-D	BR-I	E-D	E-I

Tabla 2: Comparación de las longitudes de los segmentos terminales en agrupaciones de órdenes inferiores (espacio izquierdo) y superiores (espacio derecho). Las flechas indican aumento o disminución, según apunte la flecha hacia arriba o abajo respectivamente, del parámetro medido del grupo de una fila con respecto al de la columna. Las flechas gruesas en rojo (↑) indican diferencia altamente significativa mientras que las flechas gruesas (↑) señalan diferencias estadísticamente significativa. Por último las flechas delgadas (↑) indican tendencia. (ej. Los segmentos de órdenes superiores de E-D son mayores de manera estadísticamente significativa con respecto a C-D y altamente significativos con respecto a BR-D)

Comparación de la distribución poblacional de los segmentos terminales por agrupaciones

C-D								
C-I	---							
IO-D	---							
IO-I		** —	** —					
BR-D	†—		---					
BR-I		—†		* —	—*			
E-D	---		—*		—**			
E-I		—*		* —		---	---	
	C-D	C-I	IO-D	IO-I	BR-D	BR-I	E-D	E-I

Tabla 3: Comparación de las poblaciones de los segmentos terminales en agrupaciones de órdenes inferiores (espacio izquierdo) y superiores (espacio derecho). Los símbolos **, * y † indican respectivamente: diferencias altamente significativa, diferencias estadísticamente significativa y tendencia.

Análisis de Sholl

Mostraremos mediante esquemas los resultados, especialmente agrupados.

Análisis del número de intersecciones

C-D								
C-I	---							
IO-D	---							
IO-I		↓	↓					
BR-D	↑↑↑↑↑		↑↑↑↑↑					
BR-I		---		---	↓			
E-D	↑		↑↑↑		↓			
E-I		---		---		↓	↓	
	C-D	C-I	IO-D	IO-I	BR-D	BR-I	E-D	E-I

Análisis de la longitud de segmentos total

C-D								
C-I	↑--							
IO-D	---							
IO-I		---	↓					
BR-D	↑↑↑↑↑		↑↑↑↑↑					
BR-I		---		---	---			
E-D	↑↑↑↑--		↑↑↑↑↑		---			
E-I		---		---		↓	↓	
	C-D	C-I	IO-D	IO-I	BR-D	BR-I	E-D	E-I

Análisis de la Entropía

Tras un análisis de distintos parámetros topológicos y morfométricos destinados a caracterizar los árboles dendríticos con ayuda de herramientas de reconstrucción neuronal, pasaremos a explicarlos desde otro punto de vista más funcional.

Para ello emplearemos un enfoque novedoso basado en una medida que busca la descripción de las estructuras dendríticas en base a su capacidad de procesar y posteriormente, generar información. Esta medida se basa en el concepto matemático de entropía, central en la teoría de la información (Shannon and Weaver 1949), que cuantifica la capacidad que tiene un sistema para producir información en función de la variedad de estados distintos que puede adoptar. Así, una mayor variabilidad o más cantidad de estados diferentes implica una mayor capacidad como fuente de información.

En nuestro caso, la aplicación de la entropía a la caracterización de los árboles dendríticos se basa en la consideración de las posibles configuraciones sinápticas, dependientes a su vez de los parámetros previamente estudiados como grado, longitud, etc, y en la relación de estas con las señales generadas. En este sentido se ha contemplado dos niveles descriptivos: topológico, en el que se considera el patrón conectivo a través de variables como orden, grado y asimetría, y el morfométrico que aúna el primer nivel con la dimensión morfológica (longitud, área...)

Para estos dos niveles se han diseñado dos medidas complementarias que han sido aplicadas sobre las poblaciones experimentales para obtener una cuantificación de la capacidad de sus árboles dendríticos para procesar información.

Tanto en la entropía topológica como en la morfométrica, los resultados muestran una gran robustez en la capacidad de procesamiento de las interneuronas de estudio al someterlas a condiciones de recepción sensorial muy variadas.

En concreto cuando se mide la entropía topológica la mayoría de los valores de significación obtenidos al comparar los diversos grupos experimentales entre sí están por

encima del 60%, tanto cuando se estudian los árboles por separado como agrupados por neurona; en este último caso aparece una tendencia aislada, entre los grupos ER y EL ($P = 0.1$ ó 10% de significación). La aplicación posterior de la entropía morfométrica entre los distintos paradigmas experimentales confirma la robustez de los resultados obtenidos con el primer nivel descriptivo.

En el presente trabajo hemos tratado de determinar la plasticidad estructural de una población concreta de interneuronas situada en las capas supragranulares del sistema somestésico de la rata tras someterlas a paradigmas que alteraban la entrada de información ya fuese aboliéndola completa o parcialmente o aumentándola con respecto a las condiciones de estabulamiento comunes para un animal de laboratorio. Hemos podido constatar que las células estudiadas sufren cambios estructurales y que éstos se producen tanto tras modificaciones “negativas” como “positivas” en la entrada sensorial. Además, a pesar de que estas modificaciones se ejerzan sólo en un lado del cuerpo, los cambios estructurales –en sentidos diversos- afectan a ambos.

De esta forma los hemisferios que sufrieron la abolición de todo tipo de tacto (sección del nervio infraorbitario), acortarían sus segmentos terminales de órdenes inferiores, acompañando esta retracción con un ligero aumento de los segmentos terminales de orden superior. Este mecanismo compensatorio se reproduciría en aquellos hemisferios con una entrada sensorial disminuida por la eliminación del tacto activo (caso de los animales con bigotes recortados). En los hemisferios intactos de los grupos con recorte de vibrisas, los animales mostraron un proceso inverso en el que las dendritas de órdenes inferiores aumentarían su tamaño. Este fenómeno no sucedió en el hemisferio que representa el lado con vibrisas intactas del grupo IO.

Los animales que estuvieron en contacto periódico con un ambiente rico en estímulos distintos, tratando de asemejar las condiciones de un espacio abierto para fomentar los comportamientos naturales de exploración y socialización de las ratas, acompañaron la elongación de segmentos terminales de órdenes superiores del lado con sensibilidad reducida e inferiores del lado con bigotes intactos con un aumento de los segmentos de órdenes superiores de este mismo hemisferio.

Consideraciones sobre el modelo y los métodos de estudio

Pasaremos a discutir diversos aspectos sobre los protocolos empleados y los fundamentos que hemos considerado para nuestras elecciones, así como los posibles caveats presentes en nuestro diseño experimental.

Elección del modelo de estudio

A pesar de que existe cierto conocimiento sobre la plasticidad en la corteza visual de las ratas y que ésta presenta una correlación anatómico-funcional muy atractiva para los experimentadores (Zilles 1992; Cruikshank and Weinberger 1996), es la capacidad de discriminación con sus vibrisas principales (bigotes) el sentido que el roedor ha desarrollado de modo preferente. La retina de la rata dispone de un bajo porcentaje de conos (La Vail 1976) y bastones poco eficientes (Grant et al. 2001), así como una agudeza visual muy inferior a la humana (Prusky et al. 2000; Prusky et al. 2002). Las ratas albinas (el tipo de animales empleados en nuestro estudio) además, presentan serias dificultades para evitar el deslumbramiento y un patrón de conexiones aberrantes debido a la ausencia de melanina (Silver and Sapiro 1981; Creel et al. 1990). Por tanto, la experiencia perceptiva procedente del tacto con los bigotes de la rata debe considerarse mucho más rica. Como se ha introducido previamente el sistema de vibrisas permite una amplia variedad de manipulaciones, mayor que el sistema visual, pudiendo eliminarse selectivamente distintas modalidades, y en particular puede diferenciarse el tacto activo (el derivado de la búsqueda del entorno mediante el movimiento dirigido de vibrisas) frente al pasivo (derivado de la estimulación mecánica o térmica involuntaria de la región de las vibrisas).

Dentro de la zona que comprende la corteza somestésica, las capas II y III muestran varias características que las hacen interesantes objetivos de estudio. Existen evidencias que muestran que es en estas capas donde se produce cambios más pronunciados (Fox 1992; Diamond et al. 1994; Machin et al. 2006). Además, dada su extensa interconectividad y su papel de zona más relevante de proyección local intracortical tras la recepción de la información en capa IV procedente del tálamo, su capacidad como integrador de información es elevadísima, destacando asimismo la interconexión homotópica con la corteza contralateral que las convierte en un punto clave de encuentro de la información horizontal y ascendente desde el otro hemisferio y los núcleos subcorticales respectivamente.

Las interneuronas calretinina positivas (CR+) como población a estudiar

La proteína quelante de calcio CR ha sido elegida como marcador por su capacidad de marcar una población mayoritaria, que estuviese segregada de otros marcadores característicos de interneuronas como calbindina o parvalbúmina. De hecho es considerada como una de las grandes familias presentes en las capas II/III de la corteza de ratas (Kubota et al. 1994; Kawaguchi and Kubota 1997; Gonchar and Burkhalter 1997). Esta proteína se expresa en una variedad reducida de tipos morfológicos celulares y se ha detectado su coexpresión con el marcador canónico de interneuronas GABA así como VIP y colecistoquinina (Kubota et al. 1994; Kawaguchi and Kubota 1997).

Aunque existen estudios que indican una escasa coexpresión de CR con GABA (un 25%) (Rogers 1992), lo que lo convertiría en un marcador poco conveniente para intentar discriminar interneuronas, estos datos discreparían con datos posteriores de colocalización donde los porcentajes se acercan al 100% (Gonchar and Burkhalter 1997; Kubota et al. 1994). Además, hay constancia de que células marcadas para CR forman sinapsis asimétricas, propias de células excitatorias, por lo que se las postularía como células inmunopositivas para CR e inmunonegativas para ácido γ -aminobutírico. Estas discrepancias pueden atribuirse a varios factores. Un marcado de GABA poco intenso podría disminuir ostensiblemente la colocalización entre estas dos moléculas. De hecho este mismo grupo (Rogers 1992) registra una colocalización de GABA con calbindina que apenas llega al 50 %, muy por debajo de los datos aportados por otros grupos (Gonchar and Burkhalter 1997; De Felipe 1993). Por otro lado, las variaciones interespecíficas en la expresión de los distintos marcadores son frecuentes. La mayor parte de los datos que registran este tipo de colocalización proceden de primates y no roedores y las eferencias de esta clase celular hacen dudar de la posibilidad de comparación entre ellos. Así en la corteza humana las células CR+ no inervarían otras células inmunopositivas para GABA sino piramidales y gran cantidad de las sinapsis serían asimétricas (Del Rio and De Felipe 1997; De Felipe 1997; Melchitzky et al. 2005) y de hecho, existirían células CR+ con morfología piramidal tanto en humanos (Leuba and Saini 1997) como en perro (Hof et al. 1996). aunque el porcentaje de estas células variaría dependiendo de la capa (Melchitzky et al. 2005). Aún así no se puede descartar que algunas células CR+ de la rata presenten una función excitatoria dado que colocalizan con el marcador VIP conocido por estar presente en células excitatorias. Esta posibilidad y sus posibles implicaciones se tratarán más adelante.

Consideraciones sobre los animales de experimentación

Varios estudios han mostrado las diferencias en los cambios producidos tras someter a ratas de distintos sexos a condiciones o paradigmas inductores de plasticidad. Este dimorfismo sexual en la respuesta se ha podido observar en paradigmas de enriquecimiento y diversas variables (Juraska et al. 1985; Diamond 1988; Pena et al. 2006), y parece estar relacionado con las hormonas sexuales, principalmente los estrógenos. Al elegir una población exclusivamente formada por machos reducimos los problemas de interpretación de los datos por la influencia del ciclo estral de las hembras. Por otro lado, para evitar los cambios de comportamiento debidos a la presencia de hembras en los períodos receptivos decidimos estabular sólo machos en la habitación donde se llevó a cabo el experimento.

Las ratas machos de cada nueva camada eran separadas y marcadas, impidiendo que una misma hembra diese más de dos camadas para todos los experimentos realizados con el objeto de eliminar un posible fondo común genético. Aunque desconocemos cómo podría haber afectado en nuestro caso el fondo genético en la magnitud de los cambios inducidos, dado que las ratas empleadas no son producto de un intenso entrecruzamiento buscando cepas aisladas, convenimos que era mejor estar seguro que nuestra población representa una variedad heterogénea del pool genético y evitar utilizar ratas que mostrasen comportamientos o capacidades que favoreciesen o impidiesen la plasticidad.

En el momento del comienzo del experimento las ratas tenían 60 días de edad por lo que se las considera adultas-jóvenes. A pesar de que los cambios producidos en los cerebros de ratas recién nacidas son muy superiores el cerebro adulto sigue siendo sensible a las modificaciones en la entrada sensorial. Los datos aportados por diversos grupos investigadores han mostrado que la corteza de la rata adulta es susceptible de variar independientemente de que la modificación sensorial sea “negativa” o “positiva” (Black et al. 1991; Pearson et al. 2000; Nguyen et al. 2000; Lebedev et al. 2000; Machin et al. 2004).

Consideraciones sobre la metodología de estudio

Trazado con CR

Aparte de ser un marcador claro de una población de interneuronas muy importante por su número y función en las capas supragranulares de la rata, la CR presenta otras ventajas destacables que la hacen idónea para nuestro estudio.

La utilización de una tinción inmunohistoquímica para la reconstrucción de células es un método no exento de problemas. Aunque la tendencia es a utilizar métodos de relleno celular ya sea por inyección o expresión constitutiva de una proteína inmunofluorescente o inmunogénica para una posterior precipitación de cromógeno (Wouterlood et al. 2002) el mismo interés que genera la población a estudiar nos impedía seguir este procedimiento. Dado que la población de interés no está lo suficientemente aislada para caracterizarla y producir una cepa con expresión alterada de CR que pudiera ser fluorescente (con el obligatorio cambio añadido de que tendría que ser un estudio en ratón) la única opción que podíamos barajar era la inmunotinción directa de este tipo de interneurona. Aunque no existe literatura específica sobre trazado de células CR+ sí que existen artículos previos sobre reconstrucciones parciales en los que se llega a describir conectividad perfectamente marcada para axones y dendritas (Gulyas et al. 1996; Gonchar and Burkhalter 1999). Para disminuir los problemas de trazado por falta de contraste entre fondo y marcado primario, consecuencia de un exceso de reacción necesario en cortes gruesos, limitamos el grosor de las secciones para limitar el uso de detergentes de membrana. Por eso tuvimos que llegar a un equilibrio en el tamaño de nuestras secciones entre un número manejable para una reconstrucción en varios cortes que contuviera la interneurona y una profundidad adecuada para una correcta inmunotinción. Secciones más gruesas dificultarían su tinción completa y trazado mientras que un mayor número de secciones de menor grosor dificultaría sobremanera el proceso de alineamiento y continuación de la reconstrucción. Los problemas de trazado nos llevaron a descartar otras poblaciones de

gran interés que se habían planteado también para su estudio como es el caso de las interneuronas marcadas por calbindina.

Herramienta de reconstrucción

Para la cuantificación de los cambios producidos hemos empleado el paquete de programas informático de reconstrucción y análisis NeuroLucida 5.04.3. Este paquete informático, compuesto de un programa de trazado y otro de cuantificación, es el estándar en los trabajos dirigidos a estudiar las características morfológicas celulares. Si bien es cierto que este tipo de herramientas informáticas han constituido un gran avance en esta clase de estudios y que este programa en concreto se considera la herramienta estándar de reconstrucción neuronal, existen diversas limitaciones que han de ser tenidas en cuenta.

El software informático empleado no permite hacer reconstrucciones “volumétricas” del soma al carecer de la extensión *3d solid view* (que permite dotar de volumen a los objetos reconstruidos recubriéndolos y añadiendo sombras y opacidad). Es decir, la reconstrucción que representa al soma celular, no es un ovoide formado por las distintas superficies que forman los planos de enfoque, sino que es la superficie que forma la unión de los puntos de máximo enfoque del perímetro neuronal. Por lo anteriormente expuesto sobre la tinción, el hecho de disponer de ese módulo adicional sería de escasa utilidad ya que resultaba casi imposible encontrar diferencias de tinción al variar el plano por lo que la reconstrucción realizada no deja de ser una sobreproyección del soma. En general el tamaño de soma no es una variable muy fiable con estas herramientas de trazado y reconstrucción precisamente por la dificultad en su correcta medición por los problemas de sobreproyección y solapamiento (Avendaño 2006).

Otro dato que puede registrar y utilizar este programa en la descripción morfométrica de las neuritas es su grosor. Se ha propuesto utilizar el grosor como variable inicial para modelizar el desarrollo estructural y las propiedades eléctricas de las neuronas, así como generar poblaciones “virtuales” de neuronas para el estudio de sus posibles interrelaciones en una red neuronal (Van Pelt et al. 2001; Ascoli 2002; Donohue and Ascoli 2005; Ascoli et al. 2001). Las neuritas no son cilíndricas y en concreto las dendritas de nuestro estudio presentan varicosidades cuya representación visual en los

objetivos o la pantalla dependen de la posición relativa de la misma con respecto al plano de foco pudiéndose estimar erróneamente sus valores. A esto hay que añadir que el propio sistema de NeuroLucida dispone de valores discretos de grosor, no continuos, que seleccionamos hasta solapar por aproximación el grosor visto con el grosor dibujado, aumentando aún más los errores que se cometen. Aún así, llevamos un registro de los grosores de los procesos dendríticos porque, si bien su escasa precisión invalida la utilización de estos datos a nivel cuantitativo, a nivel cualitativo era de gran ayuda para el proceso de reconstrucción.

Un problema de limitación técnica similar tuvimos con la apreciación de espinas y axones. Las interneuronas bipenachadas y bipolares han sido descritas como lisas o poco espinosas (Peters and Kimerer 1981; Gonchar and Burkhalter 1999). Hemos observado apéndices pseudoespinosos, de muy corta longitud. Aunque nuestra reconstrucción se realizó con un objetivo 100x que permite distinguir un apéndice de una posible mancha o precipitado, los apéndices que observamos en general carecían de la morfología característica de las espinas con una cabeza y tallo de unión a la dendrita. Por eso, seguimos el convenio de considerarlas dendritas de corto tamaño cuando su proyección en la imagen de la pantalla (cuando el tamaño es tan corto es complicado determinar la longitud lineal real al no poder distinguir diferencias en planos de foco tan cercanos) era superior a las 3 micras y espinas cuando era menor. Dado el escaso número encontrado, la dificultad en su identificación a nivel óptico y la imposibilidad de una confirmación segura de la estructura mediante microscopía electrónica decidimos no tener en cuenta estas especializaciones estructurales dendríticas para nuestro estudio.

En cuanto al axón, aunque la tinción utilizada los marcaba, su reconstrucción era imposible al mostrar discontinuidades y entrecruzamientos tan tupidos que impedían distinguir el plano en donde se encontraba cada segmento y, por tanto, diferenciar el cruce de dos procesos de un punto de bifurcación. Hay que tener en cuenta que los axones eran de una delgadez extrema, en el límite de la resolución del objetivo del microscopio.

Junto a los problemas técnicos expuestos anteriormente, el programa de cálculo Neuroexplorer debe ser tratado aparte, considerando las limitaciones y posibles

problemas en la interpretación de los resultados que pueden obtenerse de la amplia variedad de análisis que es capaz de llevar a cabo. El número de representaciones gráficas y tabulación de datos, aunque muy diversa, en muchos casos es de escaso valor dado la redundancia por la dependencia entre algunas variables (ver (Benavides-Piccione et al. 2006) o la dificultad de correlacionar cambios en el análisis espacial con cambios estructurales (convex hull analysis y Wedge analysis).

El análisis por histogramas polares comenzó a emplearse para buscar posibles “direccionalidades” o asimetrías en las proyecciones de las neuronas (dendritas o axones) (McMullen et al. 1984; Glaser and McMullen 1984), actualmente sigue empleándose en algunos estudios e incluso se han desarrollado implementaciones recientes (Jin et al. 2001). Aunque en un primer momento sopesamos la inclusión de este tipo de análisis (ver paneles en Resultados), dada la influencia que ejerce la orientación intrínseca de la neurona en el cálculo del histograma, nuestra imposibilidad de poder haber fijado un plano común de corte y reconstrucción a todas las neuronas de nuestro estudio y la amplia variabilidad morfológica en la disposición de las dendritas (dentro de la aparente uniformidad de que sean todas interneuronas con dendritas orientadas verticalmente) consideramos este tipo de análisis poco útil para nuestros propósitos y por tanto fue descartado.

Otra herramienta disponible que sí hemos utilizado es el análisis de Sholl. La herramienta de análisis proporcionada por Neuroexplorer es una modificación del análisis de Sholl clásico (Sholl 1953) que no sólo analiza la proyección de las neuritas sobre unos anillos concéntricos sino que toma en consideración las tres dimensiones, por lo que podríamos decir que es un análisis sobre esferas concéntricas mucho más realista que el análisis original. Sin embargo, es importante destacar que el punto de origen del sistema de coordenadas que impone el programa para trazar las esferas dentro de las cuales se contienen los procesos dendríticos para cuantificarlos lo determina el propio programa dependiendo de la forma del soma. Aunque los somas suelen presentar un aspecto ovoidal con un eje mayor y otro menor, las diversas morfologías, con lados facetados (figura 1 resultados) y el hecho de que el soma trazado no deja de ser una representación del plano de máxima proyección, provocan que el centroide generado quede desplazado con respecto del trazado. Esto genera dificultades a la hora de interpretar los datos de las esferas concéntricas más próximas, llegándose a incluir

partes del soma si la división inicial es lo suficientemente pequeña o el soma tiene alguna protrusión somática. Un problema adicional en este análisis es la inclusión de todos los tipos de segmentos, independientemente de su origen (segmentos intermedios y terminales) y orden que minimiza la potencia de los cambios cuando estos se encuentran muy localizados.

Finalmente, el procesamiento del tejido inevitablemente provoca un encogimiento no constante que llega a ser en muchos casos mayor del 50% sobre el grosor original. Para solventar este problema a la hora de generar datos comparables NeuroLucida viene dotado con una herramienta de corrección de encogimiento que multiplica por un factor introducido por el usuario las distancias de los puntos. El encogimiento del tejido no es una variable constante ni siquiera dentro de cada corte. Las variaciones de profundidad que se observan al realizar las medidas dentro del plano xy (plano de corte o montaje sobre el portaobjetos) pueden ser del orden del 20% incluso en medidas próximas entre sí en el espacio. Al introducir un único valor de multiplicación (calculado mediante el cociente entre el valor medio real obtenido por varias mediciones en los distintos cortes y el nominal marcado por el paso del microtomo) limitamos la calidad de la conversión puesto que todos los puntos contribuían de igual manera en la media independientemente de la posición (donde hubiese más tejido reconstruido o menos). Además, la multiplicación provocaba que pequeñas variaciones en la profundidad registradas por desplazamientos del tornillo micrométrico pudieran generar trazados con zonas características de “dientes de sierra” que añaden longitud ficticia. Estos desplazamientos son inherentes a la sensibilidad del sistema utilizado y al propio usuario durante el proceso de trazado pero pueden llegar a provocar variaciones en valores morfométricos aunque dado que este problema es de tipo aleatorio y los resultados se obtuvieron con el mismo equipo y usuario las diferencias son ínfimas a la hora de comparar los datos de esta tesis entre sí (Horcholle-Bossavit et al. 2000; Scorcioni et al. 2004).

Análisis estadístico

Al abordar un estudio de cuantificación es imperativo comprender, elegir y aplicar las correctas herramientas estadísticas. Al analizar los datos obtenidos durante la realización de esta tesis hemos encontrado diversas circunstancias que dificultaron el

empleo de tests de alta sensibilidad para la cuantificación de los cambios, derivados de las peculiares características intrínsecas de la población a estudiar. La mayor parte de las variables morfométricas examinadas han mostrado comportamientos que las separaban de las esperadas distribuciones normales típicas de las variables biológicas. El hecho de que no cumplieran con la condición de normalidad nos ha forzado a utilizar tests no paramétricos de menor sensibilidad en la detección de cambios. Además, la naturaleza de nuestros experimentos, cuyas mediciones son posteriores al evento modificador, junto con un abordaje conservador con respecto a las posibles asimetrías inherentes e interconexión hemisférica en el fenómeno de la plasticidad nos ha impedido el uso de herramientas estadísticas basadas en el emparejamiento de los datos (que habrían sido interesantes de aplicar si pudiéramos haber estudiado una determinada interneurona antes y después del evento modificador). Es evidente que la falta de sensibilidad de los tests disponibles por ausencia de normalidad junto con la amplísima variabilidad inherente de las poblaciones no ayudó en la obtención de datos relevantes demostrables desde un punto estadístico. Sin embargo al agrupar en conjuntos contiguos los órdenes diversos, las diferencias salen a la luz, demostrando que un análisis dendrita a dendrita, dado las características de la población a estudiar, no es el abordaje más acertado a este problema.

El principal problema metodológico de este análisis por agrupaciones es determinar donde deberemos situar el/los límite/s. Nuevamente, un estudio detallado de las gráficas, cambiando el tipo de representación a uno de línea continua nos aclara rápidamente que parece que existe un único punto o población sobre la que pivotan los cambios y que consideramos como orden "límite". Este punto de inflexión donde las tendencias de cada grupo varían se encuentra en la población de orden cuatro. Una vez localizado el punto sólo resta decidir en cuál de los dos grupos debía incluirse este orden para el cómputo final. Al carecer de ningún estudio anatómico o funcional que destacase de alguna manera la importancia de este orden y su posible función dentro del entramado dendrítico decidimos seguir criterios de tipo estadísticos. Las mayores poblaciones de segmentos son aquellas de órdenes 3 y 4, decreciendo su número a medida que aumentamos el orden. Por tanto la agrupación de los segmentos 1 a 4 implicaría la inclusión de más del 75% de los segmentos totales por lo que un gran cambio en unas pocas dendritas de un orden elevado (>4) provocaría diferencias de elevada significación en las comparaciones del grupo. Teniendo en cuenta la

variabilidad intrínseca de estas poblaciones de alto grado y el relativamente escaso número de segmentos en ellas, es más recomendable incluir el orden 4 junto con el resto de órdenes superiores, restringiendo los órdenes “bajos” a aquellos comprendidos entre 1 y 3.

Comentarios sobre los cambios dendríticos observados

En un nivel descriptivo general la literatura sobre la morfología de estas interneuronas es más bien escasa. Normalmente los estudios que realizan reconstrucciones profundizan más en las interrelaciones físicas (conectividad) o propiedades eléctricas para caracterizar la interneurona (Kawaguchi and Kubota 1996; Tamas et al. 1998). Los valores de variables como el orden de ramificación que hemos obtenido son ligeramente inferiores sobre los valores propuestos por Markram aunque las longitudes totales son semejantes (Markram et al. 2004). En este caso hay que tener en cuenta que los datos están obtenidos en rodajas de animales con edades entre P14-P16 por lo que la rata podría sufrir todavía ciertas remodelaciones (*pruning*, crecimiento posterior de las ramas) (Parnavelas and Uylings 1980). De hecho, la prevalencia de espinas dendríticas era muy superior (aproximadamente el 50% de las interneuronas presentaban de 4 a 10 espinas por cada 10 μm) a las observadas por nosotros y otros autores en ratas adultas (Peters and Kimerer 1981; Gonchar and Burkhalter 1999). En reconstrucciones con células de ratas que expresaban constitutivamente la proteína GAD67-GFP se aportan datos totales sobre una población general de interneuronas bipenechadas con células multipolares y los valores de longitud dendrítica total y número de terminales se encuentran en el rango de entre las 1000-2000 micras para el primero y 10-20 terminales dendríticos, valores muy similares a los nuestros aunque con ciertos casos extremos con 4000 micras y hasta 55 terminales. Nuevamente, el hecho de que sean poblaciones mezcladas de tipos anatómicos (aunque en nuestro caso también tenemos células que serían consideradas como multipolares por este grupo) dificulta la comparación exacta de los datos (Jin et al. 2001).

¿Existe asimetría en la población de interneuronas CR+?

Los datos que aportamos sobre la comparación de interneuronas muestran que no existen diferencias significativas de ningún tipo entre ambos lados excepto por el análisis de Sholl de la primera esfera que podría atribuirse a los problemas intrínsecos del propio análisis expuestos arriba.

Las asimetrías en el sistema nervioso central de mamíferos no primates es un antiguo tema de estudio que se centra en buscar diferencias de lado en la estructura y fisiología de especies inferiores en la escala evolutiva con respecto a los primates, donde existe una mayor especialización hemisférica. Existen estudios recientes que muestran variaciones de diversa consideración, con ligeros cambios a nivel poblacional en las distribuciones celulares, representación de mapas o grosores del campo de barriles (Machin et al. 2004; Tobet et al. 2005; Chen-Bee and Frostig 1996; Riddle and Purves 1995). Se sabe mucho menos sobre si variaciones similares pudieran ocurrir a nivel de la estructura celular, aunque se ha demostrado que las neuronas sensoriales primarias del ganglio trigémino muestran una asimetría consistente en que los cuerpos celulares de las neuronas tipo A (mecanosensitivas de mayor tamaño) son un 20% más voluminosas en el ganglio derecho que en el izquierdo (Lagares and Avendaño 2000; Negrodo 2007). Igualmente, y en estudios muy recientes, se han demostrado notables asimetrías métricas y topológicas en las neuronas trigémino-talámicas del núcleo principal del trigémino (Lagares and Avendaño 2000; Negrodo 2007). Sin embargo, desconocemos que existan estudios específicos sobre diferencias estructurales interhemisféricas a nivel celular en la corteza somestésica de la rata por lo que consideramos que nuestros datos, aunque negativos, aportan una interesante información para el conocimiento de la organización del sistema somatosensorial trigeminal.

¿Qué significan los limitados cambios estructurales consiguientes a las distintas modificaciones en la entrada sensorial?

El cambio estructural más llamativo observado se produjo tras la pérdida de todo tipo de entrada sensorial en el hemisferio izquierdo por la sección completa del nervio infraorbitario derecho, y consistió en la disminución general de la longitud de los segmentos terminales de órdenes inferiores con respecto a los valores obtenidos en el hemisferio contralateral y los demás hemisferios ipsilaterales del resto de grupos. Junto

a este fenómeno se observó además, como si de un mecanismo compensatorio se tratara, un aumento en la longitud de los segmentos terminales de órdenes superiores. Las diferencias en el caso del lado desaferentizado por sección son tan elevadas que las mismas distribuciones de las poblaciones son significativamente distintas incluso cuando se compara el grupo de sección del nervio con los de recorte de bigotes. En general estos datos vienen acompañados de leves descensos en el número de intersecciones y longitudes de segmentos totales en el lado desaferentizado.

La literatura muestra que al perder la aferencia por lesión en animales adultos la actividad disminuye e incluso la propia expresión de la enzima GAD y su producto GABA (Waite 1984; Rice and Van der Loos H. 1977; Welker et al. 1989b; Micheva and Beaulieu 1995), esto explicaría la lógica disminución de los segmentos de órdenes inferiores al disminuir la aferencia general ya que, al producirse la sección se desencadenaría toda una serie de procesos de degeneración que probablemente afectarían los segmentos del árbol dendrítico más influyentes en la actividad de las interneuronas. Es preciso destacar que el fenómeno de plasticidad estructural diferencial en el espacio, con elongaciones y retracciones circunscritas a posiciones determinadas dentro del árbol dendrítico, es de una importancia funcional extrema. Dado que las dendritas pueden intervenir activamente y no como simples “cables” en la transmisión del impulso modificando el voltaje que llega al soma dependiendo de las posiciones en donde se recibe la entrada excitatoria (Segev and London 2000; Hausser et al. 2000; Goldberg and Yuste 2005).

Además observamos un proceso sutil, podría decirse que compensatorio, aumentaría el tamaño de las dendritas de mayor orden. Este mecanismo regulador ya ha sido previamente descrito en células de la corteza, estén bajo la influencia de una injerencia sensorial o no (Lee et al. 2006; Samsonovich and Ascoli 2006).

Estos cambios parecen indicar que la pérdida completa de aferentes periféricos desde el hemisferio contrario (dominante) se traduce en una tendencia a la disminución de las longitudes dendríticas de las interneuronas CR+, que afecta de forma particularmente marcada a los segmentos terminales de árboles poco complejos –de grado bajo-. Serían estos por tanto los más “plásticos” en cuanto a la respuesta negativa a la pérdida de entradas sensoriales. No obstante, los árboles más complejos –de alto grado-

responderían con elongaciones de sus segmentos dendríticos de alto grado. Aún sin alcanzar una compensación completa de la longitud dendrítica total, este proceso antagónico podría representar un mecanismo de balance 'homeostático' del árbol en su totalidad, asimilable, a nivel de árbol, a las 'fluctuaciones homeostáticas' del tamaño dendrítico en árboles diversos de la misma neurona, recientemente propuestas como mecanismos normales del desarrollo dirigidos a conseguir una 'homeostasis morfológica neuronal' en las pirámides corticales (Samsonovich y Ascoli, 2006).

Es muy destacable que el aumento de dendritas de órdenes superiores de los hemisferios izquierdos de los restantes grupos con recorte de bigotes se vean afectados de la misma manera que el de la lesión. Debido a que no se produce una retracción semejante en los órdenes inferiores en ninguno de los grupos podría parecer que la teoría del mecanismo compensatorio del grupo IO debería ser descartada pero hay que destacar que las variaciones en las medianas son menores (disminuye la significación en ambos grupos hasta $p=0,11$) por lo que entendemos que quizá este crecimiento sea una consecuencia de la pérdida de tacto activo exacerbado, en el caso del grupo IO, con la pérdida de tamaño en las dendritas de órdenes inferiores. Aunque parece chocante este aumento generalizado de las longitudes al perder aferencia (sea del tipo que sea) la correlación función-estructura es compleja, y hay datos que nos permiten afirmar que tras recorte de bigotes pueden producirse casos de desinhición mediados por interneuronas, aunque estos resultados se generen con paradigmas de plasticidad diferentes (recorte de vibrisas principales parciales) (Kelly et al. 1999; Maier et al. 2003).

En el hemisferio contralateral a la lesión del nervio (IO-D) no hemos observado ninguna alteración que sí hemos comprobado que se produce tras el recorte de bigotes (BR-D y E-D). Este dato coincidiría con una posible disminución en la actividad en el hemisferio contralateral en ratas adultas tras la lesión de la corteza o abolición completa y total de actividad por un análogo de GABA. En este caso el hemisferio contralateral tanto de células FS como LTS (que podrían ser de nuestro tipo aunque los autores las caracterizan exclusivamente como piramidales) disminuye la actividad (Rema and Ebner 2003; Li et al. 2005). En cambio en los experimentos en dónde se ha producido la eliminación de tacto activo por recorte de bigotes se ha observado que la actividad en el lado contralateral a la lesión aumenta (Glazewski et al. 2007) lo que achacan a la

disminución de actividad de las células GABAérgicas y no al uso preponderante del lado intacto. Sin embargo, hay estudios histológicos y anatómicos que han mostrado un aumento en el número de sinapsis GABAérgicas en el lado contralateral después de la eliminación de varias filas de bigotes (Vees et al. 1998). Esto explicaría porque no se reproduce la ausencia de cambios de IO. La eliminación únicamente del componente activo del tacto, sin lesión por sección, sería lo suficiente suave para provocar la desinhibición del hemisferio contralateral, quedando por explicar si este proceso se debe a un mayor empleo del lateral no intervenido, cosa que no podemos aseverar por la ausencia de datos comportamentales.

Con un ambiente adecuado para aumentar la riqueza de la entrada sensorial y favorecer la estimulación táctil de un lado de la rata, junto con la disminución sensorial por recorte de bigotes del otro lado, los fenómenos de plasticidad estructural registrados en el grupo al que sólo recortamos los bigotes de un lado, se reproducen. Además aparece un fenómeno añadido consistente en la elongación de los segmentos terminales de mayor orden.

La capacidad que tiene un ambiente enriquecido para revertir y modificar a distintos niveles (funcional, estructural, genético) el sistema nervioso central está ampliamente descrito en la literatura (Rampon et al. 2000; Coq and Xerri 1998; Welker et al. 1989a) y en nuestro caso, someter a los animales a un ambiente enriquecido de una manera que evitásemos una habituación del animal pero durante un período prolongado en el tiempo, además de los cambios observados anteriormente, propios de la atenuación de entrada sensorial del hemisferio contralateral compartidos con el grupo al que sólo se le recortó los bigotes, hizo surgir un nuevo fenómeno emergente consistente en la elongación de los segmentos terminales de mayor orden y la acentuación del crecimiento en los órdenes inferiores como demuestra el aumento de la significación en la comparación con su hemisferio contralateral.

El análisis de Sholl aplicado en el estudio del número de intersecciones y longitud de los segmentos contenidos también arroja datos de interés. Exceptuando algún caso aislado, todos los resultados estadísticamente significativos guardan continuidad tanto en las tendencias como en su localización espacial. Por tanto, las variaciones no deben entenderse como hechos aislados sino que deben guardar cierta unión entre ellas.

Parece que la mayor parte de diferencias se producen en el hemisferio no afectado por ninguna manipulación directa. En concreto, serían los grupos que han sufrido el recorte de bigotes los que mostrarían mayor densidad de procesos junto con variaciones en la longitud de segmentos contenidos en las esferas más distantes. Esta aseveración se comprueba al comparar E-D y BR-D con los grupos del mismo lado y sus respectivos lados contralaterales. Tanto E-D como BR-D muestran más intersecciones en las esferas más distantes al soma sobre todo cuando se comparan los valores con el grupo control ipsilateral. Esta variación es exclusiva de estos grupos porque la comparación con sus lados contralaterales, si bien de menor magnitud muestran las mismas tendencias y localización. No existen diferencias destacables en la comparación entre sí de BR-D con E-D.

Sin embargo, al comparar las longitudes de los segmentos encontramos algunas discrepancias. Dado que un mayor número de intersecciones implica una red de segmentos más tupida sería esperable cambios congruentes en la longitud de segmentos contenidos, cosa que sucede excepto con la comparación con el control que no muestra una total continuidad espacial en la disminución de la longitud dendrítica. Esto podría deberse a cierto aumento de tortuosidad que desgraciadamente no hemos podido constatar en el análisis de la tortuosidad. Como hemos comentado previamente el análisis de Sholl adolece de ciertas limitaciones en el propio cálculo de los valores ya que incluye todo tipo de segmentos (terminales e intermedios) y no puede analizar las tortuosidades puntuales de cada esfera lo que sería muy interesante para poder confirmar o desechar esta aseveración. Al analizar la tortuosidad sólo podemos agruparla por segmentos (y no por la localización de estos segmentos en el espacio). Por tanto en el análisis negativo, sin aparentes diferencias en la tortuosidad de todos los segmentos de un caso y otro no incluimos su relación con la posición más próxima o alejada con respecto al soma. Tampoco podríamos realizar un análisis diferencial por órdenes ya que, aunque es plausible considerar los segmentos de orden mayor como más alejados del soma, no podemos separar una población de segmentos intermedios de los terminales y relacionarlos a una localización específica por lo que análisis llevado a cabo no deja de ser poco sensible. Esto se pone de manifiesto en el grupo de bigotes recortados, donde los segmentos terminales de elevado orden del hemisferio derecho

tienen unos valores comparables a los controles pero su distribución espacial muestra diferencias justo en las posiciones más alejadas.

Los árboles dendríticos y su capacidad de información: consideraciones sobre la entropía de las interneuronas CR+

Como se indicó en la exposición de los métodos, en esta Tesis se ha incorporado un novedoso análisis a la estructura de la interneuronas CR+ y los cambios en la misma, derivado de la Teoría de la Información aplicada al estudio de la forma de los árboles dendríticos (Villacorta 2007). De forma resumida se puede concluir que nuestras interneuronas CR+ de las capas supragranulares del campo de barriles no experimentan cambios en su capacidad de información tras las manipulaciones de las entradas sensoriales. A la vista de estos resultados, tal ausencia de cambios podría parecer un poco decepcionante, por sugerir una supuesta falta de plasticidad o adaptabilidad estructural a cambios marcados en el entorno. Sin embargo si se analiza la situación en profundidad se puede inferir que es la conclusión más lógica en base al tipo de neurona investigado, y, paralelamente, divergen de los resultados obtenidos de la aplicación del análisis entrópico a las neuronas del núcleo principal del trigémino en similares condiciones experimentales (Negredo 2007; Villacorta 2007). Los cálculos de entropías a nivel topológico y morfométrico asocian la cuantificación de la entropía a las características estructurales del árbol dendrítico en conjunto, por lo que las alteraciones en la capacidad del procesamiento son un reflejo funcional de la plasticidad anatómica y en consecuencia la ausencia de cambios registrada es un indicativo de una gran estabilidad general frente a entornos de estimulación variables. Teniendo en cuenta pues la complejidad de la corteza y la alta conectividad que exhibe parece natural que aunque se den cambios importantes sobre la información sensorial recibida del exterior apenas se manifiesten en alteraciones anatómicas sobre los propios árboles. El caso contrario, la presencia de alteraciones estructurales relevantes y significativas, probablemente serviría de sustrato a variaciones funcionales a mucha mayor escala, por ejemplo sobre los circuitos a los que pertenece o incluso a nivel de la propia corteza.

Por lo anteriormente expuesto, tanto en nuestros resultados como la literatura citada, existen cambios estructurales en las dendritas y de hecho, se podría decir que lo que

existe es una “inestabilidad controlada” de los árboles dendríticos (Lee et al. 2006). Sin embargo, en nuestro caso, es poco probable que esos cambios a nivel estructural modificasen de una manera tan profunda a la neurona para que alterasen la propia capacidad de procesamiento de la interneurona. Los cambios estructurales a nivel dendrítico necesarios para fenómenos cognitivos como la atención, discriminación, memorización o incluso consciencia, requieren de variaciones en muchos casos rápidos y lo suficientemente lábiles para retornar a la posición anterior por lo que reordenamientos masivos supondrían un gasto prohibitivo para la célula y de ahí que estos podrían verse sustituidos por cambios más sutiles de tipo funcional (Yao et al. 2007).

Por el contrario y siguiendo ese razonamiento, sería esperable que los mismos paradigmas de estimulación táctil empleados en esta tesis sí se manifiesten en forma de cambios estructurales más o menos significativos, en estaciones de relevo con una conectividad mucho menos compleja a nivel neuroanatómico como es el caso del núcleo principal del trigémino. Esto se puede observar en otro trabajo que analizaba el potencial de codificación de información en las neuronas reconstruidas de proyección del trigémino siguiendo los mismos paradigmas de alteración sensorial (datos no publicados pertenecientes a la tesis (Negredo 2007)).

Consideraciones finales

Que la plasticidad adulta tras cambios de la entrada sensorial se refleje en remodelaciones estructurales en las dendritas es una cuestión largamente debatida. Los detractores afirman que la reestructuración del árbol dendrítico es demasiado radical para un sistema que debe variar constantemente, a pesar de esto, los últimos datos aportados por algunos grupos han llegado a afirmar que las modificaciones son posibles e incluso continuas en ausencia de modificaciones de la entrada sensorial.

Las modificaciones podrían ser de dos tipos: crecimiento y retracción y como consecuencia de ambos, un reposicionamiento espacial de las dendritas que se obtendría mediante una retracción y crecimiento posterior. En conjunto, estos dos procesos

provocarían cambios sin que se aumentase la longitud dendrítica total del árbol neuronal. Esto sucede en las dendritas basales de las pirámides en capa II/III cuya arborización dendrítica está orientada hacia los barriles, las cuales, tras desfarentización, pierden su orientación preferente por reestructuración de las dendritas o, en el caso de las interneuronas sin que haya algún tipo de interferencia en la recepción de la señal (Tailby et al. 2005; Hickmott and Steen 2005; Lee et al. 2006).

Ahora bien, la direccionalidad de estos procesos y su implicación funcional es complicada de determinar. Parece que se sigue la tendencia de que tras el aumento de la señal, su riqueza o variedad los cambios se dirigen hacia el aumento de la complejidad estructural producida por un crecimiento de las dendritas en número y extensión, aumento de estructuras especializadas en la recepción (número de espinas) y densidad (Jones et al. 1996; Kolb et al. 2003).

Una vez analizados los datos, queda claro que los cambios estructurales generados por nuestros paradigmas de alteración sensorial sólo se producen en los segmentos terminales, sin variaciones de ningún tipo en los intermedios ni en las variables topológicas más frecuentes. Este fenómeno implicaría que las únicas estructuras permisivas al cambio deben modificar su tamaño con un mecanismo común que necesita tener un extremo libre para su elongación o retracción. Independientemente de los resultados, condición experimental de generación de cambios, o población estudiada, los artículos sobre morfometría celular coinciden en encontrar variaciones de tamaño exclusivamente en las dendritas terminales (Uylings et al. 1978; Connor et al. 1982; Connor et al. 1981). La modificación estructural requeriría de la activación de un complejo sistema de genes que modificasen el citoesqueleto del árbol dendrítico. Estos genes deberían ser del tipo tardío, como la MAP-2, cuya activación necesitaría de la expresión de una primera clase de genes de respuesta inmediata (Keyvani and Schallert 2002; Bury and Jones 2002). Parece además que este crecimiento, de alguna forma, está compartimentalizado, con grupos de dendritas de distintos órdenes contiguos produciendo ligeras variaciones que sólo pueden detectarse mediante un análisis conjunto y nunca mediante comparaciones directas excepto en los grupos y hemisferios cuyos paradigmas de alteración sensorial fueron más extremos (IO-I y E-D).

Como hemos comprobado con la utilización de sensibles cálculos matemáticos para medir la entropía o potencial de procesamiento de información, los cambios estructurales registrados no son tan drásticos como para variar la capacidad de la interneurona en el manejo de la información. Como señalamos los cambios estructurales son mayoritariamente morfométricos ya que no hemos podido observar que ninguna característica topológica variase, salvo en el caso del número de intersecciones por esfera concéntrica del análisis de Sholl pero en este caso estamos ante una variable topológica a la que se le confiere dimensionalidad al relacionarla con un espacio. Una variación topológica que pudieramos registrar con el cálculo de la entropía morfométrica y coincidiera con nuestros valores invariantes de número de segmento, etc, necesitaría de una retracción y pérdida de segmentos para crear y alongar otros segmentos en distintos puntos. Aunque parece que estos procesos de elongación y retracción suceden naturalmente en la neurona, son aislados y no suelen terminar en la poda de dendritas total (Lee et al. 2006).

Parece por tanto que las interneuronas CR+ que participan en redes electrotónicas entre ellas (Gonchar and Burkhalter 1999; Gulyas et al. 1996) podrían intervenir en la formación de redes desinhibitorias y aunque se sabe poco de sus funciones en los microcircuitos corticales, nuestros resultados sugieren la posibilidad de que la privación de la entrada sensorial a la corteza de un lado genera alteraciones bilaterales que se podría traducir en una actividad general aumentada de nuestras interneuronas ya fuese por actividad directa (como se puede observar en el grupo enriquecido) o indirecta, a través de circuitos homotípicos calretinina positiva.

Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., and Watson, J. D. (1996).

"Adhesión celular, uniones celulares y matriz extracelular." *Biología Molecular de la Célula*, Omega, Barcelona, 1017-1081.

Allen, C. B., Celikel, T., and Feldman, D. E. (2003). "Long-term depression induced by sensory deprivation during cortical map plasticity in vivo." *Nat Neurosci*, 6(3), 291-299.

Altschuler, R. A. (1979). "Morphometry of the effect of increased experience and training on synaptic density in area CA3 of the rat hippocampus." *J Histochem Cytochem*, 27, 1548-1550.

Armstrong-James, M., and Fox, K. (1987). "Spatiotemporal convergence and divergence in the rat S1 "barrel" cortex." *J Comp Neurol*, 263(2), 265-281.

Ascoli, G. A. (2002). "Neuroanatomical algorithms for dendritic modelling." *Network.*, 13, 247-260.

Ascoli, G. A., Krichmar, J. L., Scorcioni, R., Nasuto, S. J., and Senft, S. L. (2001). "Computer generation and quantitative morphometric analysis of virtual neurons." *Anat. Embryol. (Berl.)*, 204, 283-301.

Avendaño, C. (2006). "Stereology of neural connections. An overview." *Neuroanatomical Tract Tracing: Molecules, Neurons & Systems*, L. Zaborszky, F. G. Wouterlood, and J. L. Lanciego, eds., Springer Science & Business Media, 477-529.

- Beaulieu, C. (1993). "Numerical Data on Neocortical Neurons in Adult-Rat, with Special Reference to the Gaba Population." *Brain Research*, 609(1-2), 284-292.
- Beierlein, M., Gibson, J. R., and Connors, B. W. (2000). "A network of electrically coupled interneurons drives synchronized inhibition in neocortex." *Nature Neuroscience*, 3, 904-910.
- Benavides-Piccione, R., Hamzei-Sichani, F., Ballesteros-Yanez, I., DeFelipe, J., and Yuste, R. (2006). "Dendritic size of pyramidal neurons differs among mouse cortical regions." *Cereb. Cortex*, 16(7), 990-1001.
- Bennett, E. L., Rosenzweig, M. R., Diamond, M. C., Morimoto, H., and Hebert, M. (1974). "Effects of successive environments on brain measures." *Physiol Behav.*, 12, 621-631.
- Bennett, J. C., McRae, P. A., Levy, L. J., and Frick, K. M. (2006). "Long-term continuous, but not daily, environmental enrichment reduces spatial memory decline in aged male mice." *Neurobiol. Learn. Mem.*, 85(2), 139-152.
- Black, J., Sirevaag, A., and Greenough, W. T. (1987). "Complex experience promotes capillary formation in young rat visual cortex." *Neuroscience letters*, 83, 351-355.
- Black, J., Zelazny, A., and Greenough, W. T. (1991). "Capillary and mitochondrial support of neural plasticity in adult rat visual cortex." *Exp Neurol*, 111, 204-209.
- Bolanowski, S. J., Verrillo, R. T., and McGlone, F. (1999). "Passive, active and intra-active (self) touch." *Somatosens. Mot. Res.*, 16(4), 304-311.

- Brett-Green, B. A., Chen-Bee, C. H., and Frostig, R. D. (2001). "Comparing the functional representations of central and border whiskers in rat primary somatosensory cortex." *J Neurosci.*, 21(24), 9944-9954.
- Bureau, I., von Saint, P. F., and Svoboda, K. (2006). "Interdigitated paralemniscal and lemniscal pathways in the mouse barrel cortex." *PLoS. Biol.*, 4(12), e382.
- Burkhalter, A. (1989). "Intrinsic connections of rat primary visual cortex: laminar organization of axonal projections." *J Comp Neurol*, 279(2), 171-186.
- Bury, S. D., and Jones, T. A. (2002). "Unilateral sensorimotor cortex lesions in adult rats facilitate motor skill learning with the "unaffected" forelimb and training-induced dendritic structural plasticity in the motor cortex." *Journal of Neuroscience*, 22(19), 8597-8606.
- Bush, P., and Sejnowski, T. (1996). "Inhibition synchronizes sparsely connected cortical neurons within and between columns in realistic network models." *J Comput. Neurosci.*, 3(2), 91-110.
- Buzsaki, G., Penttonen, M., Nadasdy, Z., and Bragin, A. (1996). "Pattern and inhibition-dependent invasion of pyramidal cell dendrites by fast spikes in the hippocampus in vivo." *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 93(18), 9921-9925.
- Callaway, E. M. (2002). "Cell type specificity of local cortical connections." *Journal of Neurocytology*, 31(3-5), 231-237.
- Cauli, B., Audinat, E., Lambolez, B., Angulo, M. C., Ropert, N., Tsuzuki, K., Hestrin, S., and Rossier, J. (1997). "Molecular and physiological diversity of cortical nonpyramidal cells." *J Neurosci.*, 17(10), 3894-3906.

Chakrabarti, S., and Alloway, K. D. (2006). "Differential origin of projections from SI barrel cortex to the whisker representations in SII and MI." *J Comp Neurol*, 498(5), 624-636.

Chapin, J. K., and Lin, C. S. (1984). "Mapping the body representation in the SI cortex of anesthetized and awake rats." *J Comp Neurol*, 229(2), 199-213.

Chen-Bee, C. H., and Frostig, R. D. (1996). "Variability and interhemispheric asymmetry of single-whisker functional representations in rat barrel cortex." *J Neurophysiol*, 76(2), 884-894.

Chmielowska, J., Stewart, M. G., Bourne, R. C., and Hamori, J. (1986). "gamma-Aminobutyric acid immunoreactivity in mouse barrel field: a light microscopical study." *Brain Res.*, 368(2), 371-374.

Cobb, S. R., Buhl, E. H., Halasy, K., Paulsen, O., and Somogyi, P. (1995). "Synchronization of neuronal activity in hippocampus by individual GABAergic interneurons." *Nature*, 378(6552), 75-78.

Comery, T. A., Shah, R., and Greenough, W. T. (1995). "Differential rearing alters spine density on medium-sized spiny neurons in the rat corpus striatum: evidence for association of morphological plasticity with early response gene expression." *Neurobiol. Learn. Mem.*, 63(3), 217-219.

Comery, T. A., Stamoudis, C., Irwin, S., and Greenough, W. T. (1996). "Increased density of multiple-head dendritic spines on medium-sized spiny neurons of the striatum in rats reared in a complex environment." *Neurobiol Learn Mem*, 66, 93-96.

Connor, J. R., Beban, S. E., Hopper, P. A., Hansen, B., and Diamond, M. C. (1982a).

"A Golgi study of the superficial pyramidal cells in the somatosensory cortex of socially reared old adult rats." *Exp Neurol*, 76, 35-45.

Connor, J. R., Diamond, M. C., Connor, J. A., and Johnson, R. E. (1981a). "A Golgi

study of dendritic morphology in the occipital cortex of socially reared aged rats." *Exp Neurol*, 73, 525-533.

Connor, J. R., Melone, J. H., Yuen, A. R., and Diamond, M. C. (1981b). "Dendritic

length in aged rats' occipital cortex: an environmentally induced response." *Exp Neurol*, 73, 827-830.

Connor, J. R., Wang, H., and Diamond, M. C. (1982b). "Increased length of terminal

dendritic segments in old adult rats somatosensory cortex: An environmentally induced response." *Exp Neurol*, 78, 466-470.

Coq, J. O., and Xerri, C. (1998). "Environmental enrichment alters organizational

features of the forepaw representation in the primary somatosensory cortex of adult rats." *Exp Brain Res*, 121, 191-204.

Creel, D. J., Summers, C. G., and King, R. A. (1990). "Visual anomalies associated

with albinism." *Ophthalmic Paediatr. Genet.*, 11(3), 193-200.

Cruikshank, S., and Weinberger, N. (1996). "Evidence for the Hebbian hypothesis in

experience-dependent physiological plasticity of neocortex: A critical review." *Brain Research reviews*, 22(3), 191-228.

- Czeiger, D., and White, E. L. (1993). "Synapses of extrinsic and intrinsic origin made by callosal projection neurons in mouse visual cortex." *J Comp Neurol*, 330(4), 502-513.
- Czeiger, D., and White, E. L. (1997). "Comparison of the distribution of parvalbumin-immunoreactive and other synapses onto the somata of callosal projection neurons in mouse visual and somatosensory cortex." *J Comp Neurol*, 379(2), 198-210.
- Dantzker, J. L., and Callaway, E. M. (2000). "Laminar sources of synaptic input to cortical inhibitory interneurons and pyramidal neurons." *Nat. Neurosci.*, 3(7), 701-707.
- Darwin, C. (1874). "On the manner of development of man from some lower form." *Descent of Man*, Murray Ed., London.
- Dawson, D. R., and Killackey, H. P. (1987). "The organization and mutability of the forepaw and hindpaw representations in the somatosensory cortex of the neonatal rat." *J Comp Neurol*, 256(2), 246-256.
- De Felipe, J. (1993). "Neocortical neuronal diversity: chemical heterogeneity revealed by colocalization studies of classic neurotransmitters, neuropeptides, calcium-binding proteins, and cell surface molecules." *Cerebral Cortex*, 3, 273-289.
- De Felipe, J. (1997). "Types of neurons, synaptic connections and chemical characteristics of cells immunoreactive for calbindin-D28K, parvalbumin and calretinin in the neocortex." *Journal of Chemical Neuroanatomy*, 14(1), 1-19.

- De Felipe, J. (1999). "Chandelier cells and their possible implication in epilepsy."
Brain, 122, 1807-1822.
- De Felipe, J., and Jones, E. G. (1992). "High-Resolution Light and Electron
Microscopic Immunocytochemistry of Colocalized GABA and Calbindin D-28k
in Somata and Double Bouquet Cell Axons of Monkey Somatosensory Cortex."
European Journal of Neuroscience, 4, 46-60.
- Del Rio, M., and De Felipe, J. (1997). "Synaptic connections of calretinin-
immunoreactive neurons in the human neocortex." *Journal of Neuroscience*,
17(13), 5143-5154.
- Di Garbo, A., Barbi, M., and Chillemi, S. (2006). "Signal processing properties of fast
spiking interneurons." *Biosystems*, 86, 27-37.
- Diamond, M. C. (1988). "Enrichment and impoverishment over the lifespan."
Enriching heredity, Free Press, New York, 91-114.
- Diamond, M. C. (2001). "Response of the brain to enrichment." *An. Acad. Bras. Cienc.*,
73, 211-220.
- Diamond, M. C., Connor, J. R., Orenberg, E. K., Bissell, M., Yost, M., and Krueger, A.
(1980). "Environmental influences on serotonin and cyclic nucleotides in rat
cerebral cortex." *Science*, 210, 652-654.
- Diamond, M. C., Law, F., Rhodes, H., Lindner, B., Rosenzweig, M. R., Krech, D., and
Bennett, E. L. (1966). "Increases in cortical depth and glia numbers in rats
subjected to enriched environment." *J Comp Neurol*, 128(1), 117-126.

- Diamond, M. E., Huang, W., and Ebner, F. F. (1994). "Laminar comparison of somatosensory cortical plasticity." *Science*, 265(5180), 1885-1888.
- Dietrich, W., Durham, D., Lowry, O., and Woolsey, T. A. (1981). "Quantitative histochemical effects of whisker damage on single identified cortical barrels in the adult mouse." *Journal of Neuroscience*, 1, 929-935.
- Donoghue, J. P., Kerman, K. L., and Ebner, F. F. (1979). "Evidence for two organizational plans within the somatic sensory-motor cortex of the rat." *J Comp Neurol*, 183(3), 647-663.
- Donohue, D., and Ascoli, G. A. (2005). "Local diameter fully constrains dendritic size in basal but not apical trees of CA1 pyramidal neurons." *Journal of Computational Neuroscience*, 19(2), 223-238.
- Douglas, R. J., and Martin, K. A. C. (2004). "Neuronal circuits of the neocortex." *Annual Review of Neuroscience*, 27, 419-451.
- Faherty, C. J., Kerley, D., and Smeyne, R. J. (2003). "A Golgi-Cox morphological analysis of neuronal changes induced by environmental enrichment." *Brain Res. Dev. Brain Res.*, 141(1-2), 55-61.
- Falkenberg, T., Mohammed, A., Henriksson, B., Persson, H., Winblad, B., and Lindfors, N. (1992). "Increased expression of brain-derived neurotrophic factor mRNA in rat hippocampus is associated with improved spatial memory and enriched environment." *Neuroscience letters*, 13, 153-156.

- Filipkowski, R. K., Rydz, M., and Kaczmarek, L. (2001). "Expression of c-Fos, Fos B, Jun B, and Zif268 transcription factor proteins in rat barrel cortex following apomorphine-evoked whisking behavior." *Neuroscience*, 106, 679-688.
- Filipkowski, R. K., Rydz, M., Berdel, B., Morys, J., and Kaczmarek, L. (2000). "Tactile experience induces c-fos expression in rat barrel cortex." *Learning and memory*, 7, 116-122.
- Fox, K. (1992). "A critical period for experience-dependent synaptic plasticity in rat barrel cortex." *Journal of Neuroscience*, 12, 1826-1838.
- Freund, T. F., and Meskenaite, V. (1992). "Gamma-Aminobutyric acid-containing basal forebrain neurons innervate inhibitory interneurons in the neocortex." *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 89(2), 738-742.
- Fricker, D., and Miles, R. (2001). "Interneurons, spike timing, and perception." *Neuron*, 32, 771-774.
- Gabbott, P. L., Dickie, B. G., Vaid, R. R., Headlam, A. J., and Bacon, S. J. (1997). "Local-circuit neurones in the medial prefrontal cortex (areas 25, 32 and 24b) in the rat: morphology and quantitative distribution." *J Comp Neurol*, 377(4), 465-499.
- Geinisman, Y. (1993). "Perforated axospinous synapses with multiple, completely partitioned transmission zones: probable structural intermediates in synaptic plasticity." *Hippocampus*, 3, 417-434.

- Geinisman, Y., Berry, R. W., Disterhoft, J. F., Power, J. M., and Van der Zee, E. A. (2001). "Associative learning elicits the formation of multiple-synapse boutons." *J Neurosci.*, 21(15), 5568-5573.
- Gerlai, R. (2000). "Targeting genes and proteins in the analysis of learning and memory: caveats and future directions." *Rev. Neurosci.*, 11(1), 15-26.
- Gibson, J. J. (1962). "Observations on active touch." *Psychol. Rev.*, 69, 477-491.
- Gibson, J. R., Beierlein, M., and Connors, B. W. (1999). "Two networks of electrically coupled inhibitory neurons in neocortex." *Science*, 402, 75-79.
- Gibson, J. R., Beierlein, M., and Connors, B. W. (2005). "Functional properties of electrical synapses between inhibitory interneurons of neocortical layer 4." *Journal of Neurophysiology*, 93(1), 467-480.
- Glaser, E., and McMullen, N. (1984). "The fan-in projection method for analyzing dendrite and axon systems." *Journal of Neuroscience Methods*, 12, 37-42.
- Glazewski, S., Benedetti, B. L., and Barth, A. L. (2007). "Ipsilateral whiskers suppress experience-dependent plasticity in the barrel cortex." *J Neurosci.*, 27(14), 3910-3920.
- Glazewski, S., Chen, C. M., Silva, A., and Fox, K. (1996). "Requirement for alpha-CaMKII in experience-dependent plasticity of the barrel cortex." *Science*, 272(5260), 421-423.
- Glazewski, S., Giese, K., Silva, A., and Fox, K. (2000). "The role of alpha-CaMKII autophosphorylation in neocortical experience-dependent plasticity." *Nature Neuroscience*, 3, 911-918.

- Goldberg, J., and Yuste, R. (2005). "Space matters: local and global dendritic Ca²⁺ compartmentalization in cortical interneurons." *Trends in Neuroscience*, 28, 158-167.
- Gonchar, Y., and Burkhalter, A. (1997). "Three distinct families of GABAergic neurons in rat visual cortex." *Cerebral Cortex*, 7, 347-358.
- Gonchar, Y., and Burkhalter, A. (1999a). "Connectivity of GABAergic calretinin-immunoreactive neurons in rat primary visual cortex." *Cerebral Cortex*, 9(7), 683-696.
- Gonchar, Y., and Burkhalter, A. (1999b). "Differential subcellular localization of forward and feedback interareal inputs to parvalbumin expressing GABAergic neurons in rat visual cortex." *J Comp Neurol*, 406(3), 346-360.
- Grant, S., Patel, N. N., Philp, A. R., Grey, C. N., Lucas, R. D., Foster, R. G., Bowmaker, J. K., and Jeffery, G. (2001). "Rod photopigment deficits in albinos are specific to mammals and arise during retinal development." *Vis. Neurosci*, 18(2), 245-251.
- Greenough, W. T., and Volkmar, F. R. (1972). "Pattern of dendritic branching in occipital cortex of rats reared in complex environments." *Exp Neurol*, 40, 491-504.
- Greenough, W. T., West, R. W., and DeVogd, T. J. (1978). "Subsynaptic plate perforations: changes with age and experience in the rat." *Science*, 202(4372), 1096-1098.

- Gritti, I., Manns, I. D., Mainville, L., and Jones, B. E. (2003). "Parvalbumin, calbindin, or calretinin in cortically projecting and GABAergic, cholinergic, or glutamatergic basal forebrain neurons of the rat." *J Comp Neurol*, 458(1), 11-31.
- Grossman, A. W., Churchill, J. D., Bates, K. E., Kleim, J. A., and Greenough, W. T. (2002). "A brain adaptation view of plasticity: is synaptic plasticity an overly limited concept?" *Prog. Brain Res.*, 138, 91-108.
- Gulyas, A. I., Hajos, F., and Freund, T. F. (1996). "Interneurons containing calretinin are specialized to control other interneurons in the rat hippocampus." *Journal of Neuroscience*, 16, 3397-3411.
- Gupta, A., Wang, Y., and Markram, H. (2000). "Organizing principles for a diversity of GABAergic interneurons and synapses in the neocortex." *Science*, 287, 273-278.
- Harris, K. M. (1999). "Structure, development, and plasticity of dendritic spines." *Curr. Opin. Neurobiol.*, 9(3), 343-348.
- Hausser, M., Spruston, N., and Stuart, G. J. (2000). "Diversity and dynamics of dendritic signaling." *Science*, 290(5492), 739-744.
- Hering, H., and Sheng, M. (2001). "Dendritic spines: structure, dynamics and regulation." *Nat. Rev. Neurosci.*, 2(12), 880-888.
- Hestrin, S., and Armstrong, W. E. (1996). "Morphology and physiology of cortical neurons in layer I." *J Neurosci*, 16(17), 5290-5300.

- Hestrin, S., and Galarreta, M. (2005). "Electrical synapses define networks of neocortical GABAergic neurons." *Trends in Neurosciences*, 28(6), 304-309.
- Hickmott, P., and Steen, P. (2005). "Large-scale changes in dendritic structure during reorganization of adult somatosensory cortex." *Nature Neuroscience*, 8, 140-142.
- Hof, P. R., Bogaert, Y. E., Rosenthal, R. E., and Fiskum, G. (1996). "Distribution of neuronal populations containing neurofilament protein and calcium-binding proteins in the canine neocortex: regional analysis and cell typology." *J Chem. Neuroanat.*, 11(2), 81-98.
- Horcholle-Bossavit, G., Gogan, P., Ivanov, Y., Korogod, S., and Tyc-Dumont, S. (2000). "The problem of the morphological noise in reconstructed dendritic arborizations." *Journal of Neuroscience Methods*, 95, 83-93.
- Innocenti, G. M. (1986). "General organization of callosal connections in the cerebral cortex." *Sensory-motor areas and aspects of cortical connectivity*, E. G. Jones, and A. Peters, eds., Plenum Press, New York.
- Ito, M. (1992). "Simultaneous visualization of cortical barrels and horseradish peroxidase-injected layer 5b vibrissa neurones in the rat." *J Physiol*, 454, 247-265.
- Jefferys, J. G., Traub, R. D., and Whittington, M. A. (1996). "Neuronal networks for induced '40 Hz' rhythms." *Trends Neurosci.*, 19(5), 202-208.

- Jenkins, W. M., Merzenich, M. M., and Recanzone, G. (1990). "Neocortical representational dynamics in adult primates: implications for neuropsychology." *Neuropsychologia*, 28(6), 573-584.
- Jin, X., Mathers, P. H., Szabo, G., Katarova, Z., and Agmon, A. (2001). "Vertical bias in dendritic trees of non-pyramidal neocortical neurons expressing GAD67-GFP in vitro." *Cerebral Cortex*, 11, 666-678.
- Jones, T. A., Kleim, J. A., and Greenough, W. T. (1996). "Synaptogenesis and dendritic growth in the cortex opposite unilateral sensorimotor cortex damage in adult rats: a quantitative electron microscopic examination." *Brain Res.*, 733(1), 142-148.
- Juraska, J. M., Fitch, J. M., Henderson, C., and Rivers, N. (1985). "Sex differences in the dendritic branching of dentate granule cells following differential experience." *Brain Res.*, 333(1), 73-80.
- Kandel, E. R., Schwartz, J. H., and Jessell, T. M. (2000). "Nerve cells and behaviour." *Principles of Neuroscience*, McGraw-Hill Professional, 34.
- Kawaguchi, Y., and Kondo, S. (2002). "Parvalbumin, somatostatin and cholecystokinin as chemical markers for specific GABAergic interneuron types in the rat frontal cortex." *J Neurocytol*, 31, 277-287.
- Kawaguchi, Y., and Kubota, Y. (1996). "Physiological and morphological identification of somatostatin- or vasoactive intestinal polypeptide-containing cells among GABAergic cell subtypes in rat frontal cortex." *J Neurosci.*, 16(8), 2701-2715.

- Kawaguchi, Y., and Kubota, Y. (1997). "GABAergic cell subtypes and their synaptic connections in rat frontal cortex." *Cereb. Cortex.*, 7(6), 476-486.
- Keller, A., and White, E. L. (1987). "Synaptic organization of GABAergic neurons in the mouse SmI cortex." *J Comp Neurol*, 262(1), 1-12.
- Kelly, M. K., Carvell, G. E., Kodger, J. M., and Simons, D. J. (1999). "Sensory loss by selected whisker removal produces immediate disinhibition in the somatosensory cortex of behaving rats." *J Neurosci*, 19, 9117-9125.
- Keyvani, K., and Schallert, T. (2002). "Plasticity-associated molecular and structural events in the injured brain." *J Neuropathol Exp Neurol*, 61, 831-840.
- Killackey, H. P., Koralek, K. A., Chiaia, N. L., and Rhodes, R. W. (1989). "Laminar and areal differences in the origin of the subcortical projection neurons of the rat somatosensory cortex." *J Comp Neurol*, 282(3), 428-445.
- Kim, U., and Ebner, F. F. (1999). "Barrels and septa: separate circuits in rat barrels field cortex." *J Comp Neurol*, 408(4), 489-505.
- Kirkwood, A., Silva, A., and Bear, M. F. (1997). "Age-dependent decrease of synaptic plasticity in the neocortex of alphaCaMKII mutant mice." *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94(7), 3380-3383.
- Kisvarday, Z. F., Beaulieu, C., and Eysel, U. T. (1993). "Network of GABAergic large basket cells in cat visual cortex (area 18): implication for lateral disinhibition." *J Comp Neurol*, 327(3), 398-415.

- Kisvarday, Z. F., Martin, K. A., Whitteridge, D., and Somogyi, P. (1985). "Synaptic connections of intracellularly filled clutch cells: a type of small basket cell in the visual cortex of the cat." *J Comp Neurol*, 241(2), 111-137.
- Knott, G. W., Quairiaux, C., Genoud, C., and Welker, C. (2002). "Formation of dendritic spines with GABAergic synapses induced by whisker stimulation in adult mice." *Neuron*, 34, 265-273.
- Kolb, B., Gorny, G., Soderpalm, A. H., and Robinson, T. E. (2003). "Environmental complexity has different effects on the structure of neurons in the prefrontal cortex versus the parietal cortex or nucleus accumbens." *Synapse*, 48, 149-153.
- Kolb, B., and Whishaw, I. Q. (1998). "Brain plasticity and behavior." *Annu. Rev. Psychol.*, 49:43-64., 43-64.
- Koralek, K. A., Jensen, K. F., and Killackey, H. P. (1988). "Evidence for two complementary patterns of thalamic input to the rat somatosensory cortex." *Brain Research*, 463, 346-351.
- Kossut, M., and Juliano, S. L. (1999). "Anatomical correlates of representational map reorganization induced by partial vibrissotomy in the barrel cortex of adult mice." *Neuroscience*, 92(3), 807-817.
- Krohn, T. C., Hansen, A. K., and Dragsted, N. (2003). "The impact of low levels of carbon dioxide on rats." *Lab Anim.*, 37, 94-99.
- Kubota, Y., Hattori, R., and Yui, Y. (1994). "Three distinct subpopulations of GABAergic neurons in rat frontal agranular cortex." *Brain Res.*, 649, 159-173.

- La Vail, M. M. (1976). "Survival of some photoreceptor cells in albino rats following long-term exposure to continuous light." *Invest Ophthalmol.*, 15(1), 64-70.
- Lagares, A., and Avendaño, C. (2000). "Lateral asymmetries in the trigeminal ganglion of the male rat." *Brain Research*, 865, 202-210.
- Lebedev, M., Mirabella, G., Erchova, I., and Diamond, M. E. (2000). "Experience-dependent plasticity of rat barrel cortex: redistribution of activity across barrel-columns." *Cerebral Cortex*, 10, 23-31.
- Lee, K. J., and Woolsey, T. A. (1975). "A proportional relationship between peripheral innervation density and cortical neuron number in the somatosensory system of the mouse." *Brain Res.*, 99(2), 349-353.
- Lee, W. C., Huang, H., Feng, G., Sanes, J. R., Brown, E. N., So, P. T., and Nedivi, E. (2006). "Dynamic Remodeling of Dendritic Arbors in GABAergic Interneurons of Adult Visual Cortex." *PLoS Biol.*, 4, e29.
- Leuba, G., and Saini, K. (1997). "Colocalization of parvalbumin, calretinin and calbindin D-28k in human cortical and subcortical visual structures." *J Chem. Neuroanat.*, 13(1), 41-52.
- Li, C., Niu, W., Jiang, C. H., and Hu, Y. (2007). "Effects of enriched environment on gene expression and signal pathways in cortex of hippocampal CA1 specific NMDAR1 knockout mice." *Brain Res. Bull.*, 71(6), 568-577.
- Li, L., Rema, V., and Ebner, F. F. (2005). "Chronic suppression of activity in barrel field cortex downregulates sensory responses in contralateral barrel field cortex." *Journal of Neurophysiology*, 94, 3342-3356.

- Liu, C., and Chambers, W. (1958). "Intraspinal sprouting of dorsal root axons; development of new collaterals and preterminals following partial denervation of the spinal cord in the cat." *AMA. Arch Neurol. Psychiatry*, 79(1), 46-61.
- Machin, R., Blasco, B., Bjugn, R., and Avendaño, C. (2004). "The size of the whisker barrel field in adult rats: minimal nondirectional asymmetry and limited modifiability by chronic changes of the sensory input." *Cerebral Cortex*, 1025, 130-138.
- Machin, R., Perez-Cejuela, C., Bjugn, R., and Avendaño, C. (2006). "Effects of long-term sensory deprivation on asymmetric synapses in the whisker barrel field of the adult rat." *Brain Research*, 1107, 104-110.
- Mack, K. J., Yi, S. D., Chang, S., Millan, N., and Mack, P. (1995). "NGFI-C expression is affected by physiological stimulation and seizures in the somatosensory cortex." *Brain Res Mol Brain Res*, 29, 140-146.
- Maier, D. L., Grieb, G. M., Stelzner, D. J., and McCasland, J. S. (2003). "Large-scale plasticity in barrel cortex following repeated whisker trimming in young adult hamsters." *Exp Neurol*, 184, 737-745.
- Markram, H., Lubke, J., Frotscher, M., Roth, A., and Sakmann, B. (1997). "Physiology and anatomy of synaptic connections between thick tufted pyramidal neurones in the developing rat neocortex." *J Physiol*, 500 (Pt 2), 409-440.
- Markram, H., Toledo-Rodriguez, M., Wang, Y., Gupta, A., Silberberg, G., and Wu, C. Z. (2004). "Interneurons of the neocortical inhibitory system." *Nature Reviews Neuroscience*, 5(10), 793-807.

- Markram, H., Wang, Y., and Tsodyks, M. (1998). "Differential signaling via the same axon of neocortical pyramidal neurons." *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95(9), 5323-5328.
- McCloskey, D. P., Adamo, D. S., and Anderson, B. J. (2001). "Exercise increases metabolic capacity in the motor cortex and striatum, but not in the hippocampus." *Brain Res.*, 891(1-2), 168-175.
- McMullen, N., Glaser, E., and Tagamets, M. (1984). "Morphometry of spine-free nonpyramidal neurons in rabbit auditory cortex." *J Comp Neurol*, 222, 383-395.
- Meaney, M. J., Aitken, D. H., van, B. C., Bhatnagar, S., and Sapolsky, R. M. (1988a). "Effect of neonatal handling on age-related impairments associated with the hippocampus." *Science.*, 239, 766-768.
- Meaney, M. J., Viau, V., Aitken, D. H., and Bhatnagar, S. (1988b). "Stress-induced occupancy and translocation of hippocampal glucocorticoid receptors." *Brain Res.*, 445, 198-203.
- Melchitzky, D. S., Eggan, S. M., and Lewis, D. A. (2005). "Synaptic targets of calretinin-containing axon terminals in macaque monkey prefrontal cortex." *Neuroscience*, 130(1), 185-195.
- Merzenich, M. M., Kaas, J. H., Wall, J., Nelson, R. J., Sur, M., and Felleman, D. (1983). "Topographic reorganization of somatosensory cortical areas 3b and 1 in adult monkeys following restricted deafferentation." *Neuroscience*, 8(1), 33-55.

- 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(4), 591-605.
- Meskenaite, V. (1997). "Calretinin-immunoreactive local circuit neurons in area 17 of the cynomolgus monkey, *Macaca fascicularis*." *J Comp Neurol*, 379(1), 113-132.
- 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(25), 11834-11838.
- Miles, R., Toth, K., Gulyas, A. I., Hajos, N., and Freund, T. F. (1996). "Differences between somatic and dendritic inhibition in the hippocampus." *Neuron*, 16(4), 815-823.
- Miller, B., Chou, L., and Finlay, B. L. (1993). "The early development of thalamocortical and corticothalamic projections." *J Comp Neurol*, 335(1), 16-41.
- Neafsey, E. J., Bold, E. L., Haas, G., Hurley-Gius, K. M., Quirk, G., Sievert, C. F., and Terreberry, R. R. (1986). "The organization of the rat motor cortex: a microstimulation mapping study." *Brain Res.*, 396(1), 77-96.
- Negredo, P. (2007). "Plasticidad neuronal en cerebro adulto: Cambios estructurales en el núcleo principal del trigémino inducidos por variaciones en las entradas sensoriales." Ph.D. dissertation, Departamento Anatomía, UAM.

- Nguyen, T., Yamamoto, T., Stevens, R., and Hodge, C. (2000). "Reorganization of adult rat barrel cortex intrinsic signals following kainic acid induced central lesion." *Neuroscience letters*, 288, 5-8.
- Nimchinsky, E. A., Sabatini, B. L., and Svoboda, K. (2002). "Structure and function of dendritic spines." *Annu. Rev. Physiol*, 64, 313-353.
- Nudo, R. (1999). "Recovery after damage to motor cortical areas." *Curr Opin Neurobiol*, 9, 740-747.
- Olavarria, J., Van Sluyters, R. C., and Killackey, H. P. (1984). "Evidence for the complementary organization of callosal and thalamic connections within rat somatosensory cortex." *Brain Res.*, 291(2), 364-368.
- Parnavelas, J., and Uylings, H. (1980). "The growth of non-pyramidal neurons in the visual cortex of the rat: a morphometric study." *Brain Research*, 193, 373-382.
- Parra, P., Gulyas, A. I., and Miles, R. (1998). "How many subtypes of inhibitory cells in the hippocampus?" *Neuron*, 20, 983-993.
- Pearson, P., Arnold, P., Oladehin, A., Li, C., and Waters, R. (2000). "Large-scale cortical reorganization following forelimb deafferentation in rat does not involve plasticity of intracortical connections." *Exp Brain Res*.
- Pena, Y., Prunell, M., Dimitsantos, V., Nadal, R., and Escorihuela, R. M. (2006). "Environmental enrichment effects in social investigation in rats are gender dependent." *Behav. Brain Res.*, 174(1), 181-187.

- Peters, A., and Kimerer, L. M. (1981). "Bipolar Neurons in Rat Visual-Cortex - A Combined Golgi-Electron Microscope Study." *Journal of Neurocytology*, 10(6), 921-946.
- Pham, T. M., Ickes, B., Albeck, D., Soderstrom, S., Granholm, A. C., and Mohammed, A. H. (1999). "Changes in brain nerve growth factor levels and nerve growth factor receptors in rats exposed to environmental enrichment for one year." *Neuroscience*, 94, 279-286.
- Pinaud, R., Tremere, L. A., Penner, M. R., Hess, F. F., Robertson, H. A., and Currie, R. W. (2002). "Complexity of sensory environment drives the expression of candidate-plasticity gene, nerve growth factor induced-A." *Neuroscience*, 112, 573-582.
- Porter, J. T., Cauli, B., Staiger, J. F., Lambolez, B., Rossier, J., and Audinat, E. (1998). "Properties of bipolar VIPergic interneurons and their excitation by pyramidal neurons in the rat neocortex." *Eur. J Neurosci.*, 10(12), 3617-3628.
- Prusky, G. T., Harker, K. T., Douglas, R. M., and Wishaw, I. Q. (2002). "Variation in visual acuity within pigmented, and between pigmented and albino rat strains." *Behav. Brain Res.*, 136(2), 339-348.
- Prusky, G. T., West, P. W., and Douglas, R. M. (2000). "Behavioral assessment of visual acuity in mice and rats." *Vision Res.*, 40(16), 2201-2209.
- Rajan, R., Irvine, D. R., Wise, L. Z., and Heil, P. (1993). "Effect of unilateral partial cochlear lesions in adult cats on the representation of lesioned and unlesioned cochleas in primary auditory cortex." *J Comp Neurol*, 338(1), 17-49.

- Rampon, C., Jiang, C., Dong, H., Tang, Y., Lockhart, D., Schultz, P., Tsien, J., and Hu, Y. (2000a). "Effects of environmental enrichment on gene expression in the brain." *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 97, 12880-12884.
- Rampon, C., Tang, Y., Goodhouse, J., Shimizu, E., Kyin, M., and Tsien, J. (2000b). "Enrichment induces structural changes and recovery from nonspatial memory deficits in CA1 NMDAR1-knockout mice." *Nature Neuroscience*, 3, 205-206.
- Rebsam, A., Seif, I., and Gaspar, P. (2005). "Dissociating barrel development and lesion-induced plasticity in the mouse somatosensory cortex." *Journal of Neuroscience*, 25, 706-710.
- Rema, V., and Ebner, F. F. (2003). "Lesions of mature barrel field cortex interfere with sensory processing and plasticity in connected areas of the contralateral hemisphere." *Journal of Neuroscience*, 23, 10378-10387.
- Rema, V., Armstrong-James, M., and Ebner, F. F. (1998). "Experience-dependent plasticity of adult rat S1 cortex requires local NMDA receptor activation." *J Neurosci*, 18(23), 10196-10206.
- Rice, F. L., and Van der Loos H. (1977). "Development of the barrels and barrel field in the somatosensory cortex of the mouse." *J Comp Neurol*, 171, 545-560.
- Riddle, D., and Purves, D. (1995). "Individual variation and lateral asymmetry of the rat primary somatosensory cortex." *Journal of Neuroscience*, 15, 4184-4195.
- Rogers, J. H. (1992). "Immunohistochemical markers in rat cortex: co-localization of calretinin and calbindin-D28k with neuropeptides and GABA." *Brain Res.*, 587, 147-157.

- Romeo, R., McCarthy, J., Wang, A., Milner, T., and McEwen, B. (2005). "Sex differences in hippocampal estradiol-induced N-methyl-D-aspartic acid binding and ultrastructural localization of estrogen receptor-alpha." *Neuroendocrinology.*, 81(6), 391-399.
- Romero, A., and Bennis, L. (1998). "Threatened fishes of the world: Amblyopsis spelaea." *Environ. Biol. Fish.*, 51, 420-427.
- Rosenzweig, M. R., Bennett, E. L., and Diamond, M. C. (1967). "Effects of differential environments on brain anatomy and brain chemistry." *Proc. Annu. Meet. Am. Psychopathol. Assoc.*, 56:45-56., 45-56.
- Rosenzweig, M. R., Krech, D., Bennett, E. L., and Diamond, M. C. (1962). "Effects of environmental complexity and training on brain chemistry and anatomy: a replication and extension." *J Comp Physiol Psychol.*, 55:429-37., 429-437.
- Ruiz-Marcos, A., and Valverde, F. (1969). "The temporal evolution of the distribution of dendritic spines in the visual cortex of normal and dark raised mice." *Exp. Brain Res.*, 8(3), 284-294.
- Sadaka, Y., Weinfeld, E., Lev, D. L., and White, E. L. (2003). "Changes in mouse barrel synapses consequent to sensory deprivation from birth." *J Comp Neurol*, 457, 75-86.
- Samsonovich, A. V., and Ascoli, G. A. (2006). "Morphological homeostasis in cortical dendrites." *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103, 1569-1574.

- Scorcioni, R., Lazarewicz, M., and Ascoli, G. A. (2004). "Quantitative morphometry of hippocampal pyramidal cells: differences between anatomical classes and reconstructing laboratories." *J Comp Neurol*, 473, 177-193.
- Segev, I., and London, M. (2000). "Untangling dendrites with quantitative models." *Science*, 290(5492), 744-750.
- Shin, H. C., Park, S., Son, J., and Sohn, J. H. (1995). "Responses from new receptive fields of VPL neurones following deafferentation." *Neuroreport*, 7(1), 33-36.
- Sholl, D. A. (1953). "Dendritic organization in the neurons of the visual and motor cortices of the cat." *J Anat.*, 87(4), 387-406.
- Silver, J., and Sapiro, J. (1981). "Axonal guidance during development of the optic nerve: the role of pigmented epithelia and other extrinsic factors." *J Comp Neurol*, 202(4), 521-538.
- Somogyi, P., and Cowey, A. (1981). "Combined Golgi and Electron-Microscopic Study on the Synapses Formed by Double Bouquet Cells in the Visual-Cortex of the Cat and Monkey." *J Comp Neurol*, 195(4), 547-566.
- Somogyi, P., Kisvarday, Z. F., Martin, K. A., and Whitteridge, D. (1983). "Synaptic connections of morphologically identified and physiologically characterized large basket cells in the striate cortex of cat." *Neuroscience*, 10(2), 261-294.
- Somogyi, P., Tamas, G., Lujan, R., and Buhl, E. H. (1998). "Salient features of synaptic organisation in the cerebral cortex." *Brain Res. Brain Res. Rev.*, 26(2-3), 113-135.

Spurzheim, J. G. (1815). "The Physiognomical System of Drs. Gall and Spurzheim."
Baldwin, Cradock and Joy, London.

Staiger, J. F., Freund, T. F., and Zilles, K. (1997). "Interneurons immunoreactive for vasoactive intestinal polypeptide (VIP) are extensively innervated by parvalbumin-containing boutons in rat primary somatosensory cortex." *Eur. J Neurosci*, 9(11), 2259-2268.

Staiger, J. F., Zilles, K., and Freund, T. F. (1996a). "Distribution of GABAergic elements postsynaptic to ventroposteromedial thalamic projections in layer IV of rat barrel cortex." *Eur. J Neurosci.*, 8(11), 2273-2285.

Staiger, J. F., Zilles, K., and Freund, T. F. (1996b). "Innervation of VIP-immunoreactive neurons by the ventroposteromedial thalamic nucleus in the barrel cortex of the rat." *J Comp Neurol*, 367, 194-204.

Steiner, H., and Gerfen, C. (1994). "Tactile sensory input regulates basal and apomorphine-induced immediate-early gene expression in rat barrel cortex." *J Comp Neurol*, 344, 297-304.

Stevens, C. F. (1998). "Neuronal diversity: too many cell types for comfort?" *Curr. Biol.*, 8, R708-R710.

Sun, Q. Q., Huguenard, J., and Prince, D. (2006). "Barrel cortex microcircuits: Thalamocortical feedforward inhibition in spiny stellate cells is mediated by a small number of fast-spiking interneurons." *Journal of Neuroscience*, 26(4), 1219-1230.

- Tailby, C., Wright, L. L., Metha, A. B., and Calford, M. B. (2005). "Activity-dependent maintenance and growth of dendrites in adult cortex." *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 102, 4631-4636.
- Tamas, G., Buhl, E. H., Lorincz, A., and Somogyi, P. (2000). "Proximally targeted GABAergic synapses and gap junctions synchronize cortical interneurons." *Nature Neuroscience*, 3(4), 366-371.
- Tamas, G., Somogyi, P., and Buhl, E. H. (1998). "Differentially interconnected networks of GABAergic interneurons in the visual cortex of the cat." *Journal of Neuroscience*, 18, 4255-4270.
- Tobet, S. A., Roca, A. L., and Crandall, J. E. (2005). "Cellular organization in rat somatosensory cortex: effects of sex and laterality." *Exp Neurol*, 121, 65-76.
- Tracey, D., and Waite, P. M. (1995). "Somatosensory System." *The rat Nervous System*, G. Paxinos, ed., Academic Press, 689-704.
- Trachtenberg, J. T., Chen, B. E., Knott, G. W., Feng, G., Sanes, J. R., Welker, E., and Svoboda, K. (2002). "Long-term in vivo imaging of experience-dependent synaptic plasticity in adult cortex." *Nature*, 420(6917), 788-794.
- Tsien, J. Z., Huerta, P. T., and Tonegawa, S. (1996). "The essential role of hippocampal CA1 NMDA receptor-dependent synaptic plasticity in spatial memory." *Cell*, 87(7), 1327-1338.
- Uylings, H. B. M., Kuypers, K., Diamond, M. C., and Veltman, W. A. (1978). "Effects of differential environments on plasticity of dendrites of cortical pyramidal neurons in adult rats." *Exp Neurol*, 62, 658-677.

- Valverde, F. (1967). "Apical dendritic spines of the visual cortex and light deprivation in the mouse." *Exp. Brain Res.*, 3(4), 337-352.
- Valverde, F. (2002). "Structure of the cerebral cortex. Intrinsic organization and comparative analysis of the neocortex." *Revista Neurológica*, 34, 758-780.
- Valverde, F., and Ruiz-Marcos, A. (1969). "Dendritic spines in the visual cortex of the mouse: introduction to a mathematical model." *Exp. Brain Res.*, 8(3), 269-283.
- van der Loos, H., and Woolsey, T. (1973). "Somatosensory cortex: structural alterations following early injury to sense organs." *Science*, 179(71), 395-398.
- Van der Loos, H., and Woolsey, T. A. (1973). "Somatosensory cortex: structural alterations following early injury to sense organs." *Science*, 179(71), 395-398.
- Van Pelt, J., Van Ooyen, A., and Uylings, H. (2001). "The need for integrating neuronal morphology databases and computational environments in exploring neuronal structure and function." *Anatomy and Embryology*, 204(4), 255-265.
- Van Praag H., Christie, B. R., Sejnowski, T. J., and Gage, F. H. (1999). "Running enhances neurogenesis, learning, and long-term potentiation in mice." *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A*, 96(23), 13427-13431.
- Vees, A. M., Micheva, K. D., Beaulieu, C., and Descarries, L. (1998). "Increased number and size of dendritic spines in ipsilateral barrel field cortex following unilateral whisker trimming in postnatal rat." *J Comp Neurol*, 400(1), 110-124.
- Villacorta, J. A. (2007). "Medidas de entropía para la caracterización de árboles dendríticos."

- Volkmar, F. R., and Greenough, W. T. (1972). "Rearing complexity affects branching of dendrites in the visual cortex of the rat." *Science*, 176, 1445-1447.
- Voronin, L., and Cherubini, E. (2004). "'Deaf, mute and whispering' silent synapses: their role in synaptic plasticity." *Journal of Physiology*, 557, 3-12.
- Waite, P. M. (1984). "Rearrangement of neuronal responses in the trigeminal system of the rat following peripheral nerve section." *J Physiol*, 352, 425-445.
- Waite, P. M., and Tracey, D. (1995). "Trigeminal Sensory System." *The Rat Nervous System*, G. Paxinos, ed., Academic Press, 705-717.
- Wall, P. D. (1977). "The presence of ineffective synapses and the circumstances which unmask them." *Philos. Trans. R. Soc. Lond B Biol. Sci*, 278(961), 361-372.
- Wang, Y., Gupta, A., Toledo-Rodriguez, M., Wu, C. Z., and Markram, H. (2002). "Anatomical, physiological, molecular and circuit properties of nest basket cells in the developing somatosensory cortex." *Cerebral Cortex*, 12, 395-410.
- Wang, Y., Toledo-Rodriguez, M., Gupta, A., Wu, C., Silberberg, G., Luo, J., and Markram, H. (2004). "Anatomical, physiological and molecular properties of Martinotti cells in the somatosensory cortex of the juvenile rat." *J Physiol.*, 561, 65-90.
- Welker, C., Soriano, E., Dorfl, J., and Van der Loos, H. (1989a). "Plasticity in the barrel cortex of the adult mouse: transient increase of GAD-immunoreactivity following sensory stimulation." *Exp Brain Res*, 78, 659-664.

- Welker, C., and Woolsey, T. A. (1974). "Structure of layer IV in the somatosensory neocortex of the rat: description and comparison with the mouse." *J Comp Neurol*, 158(4), 437-453.
- Welker, E., Soriano, E., and Van der, L. H. (1989b). "Plasticity in the barrel cortex of the adult mouse: effects of peripheral deprivation on GAD-immunoreactivity." *Exp. Brain Res.*, 74(3), 441-452.
- White, E. L., and Czeiger, D. (1991). "Synapses made by axons of callosal projection neurons in mouse somatosensory cortex: emphasis on intrinsic connections." *J Comp Neurol*, 303(2), 233-244.
- Wiesel, T. N., and Hubel, D. H. (1963). "Single-Cell responses in striate cortex of kittens deprived of vision in one eye." *J Neurophysiol*, 26, 1003-1017.
- Woolsey, T. A., and Wann, J. R. (1976). "Areal changes in mouse cortical barrels following vibrissal damage at different postnatal ages." *J Comp Neurol*, 170(1), 53-66.
- Wouterlood, F. G., Hartig, W., Bruckner, G., and Witter, M. P. (1995). "Parvalbumin-immunoreactive neurons in the entorhinal cortex of the rat: localization, morphology, connectivity and ultrastructure." *J Neurocytol.*, 24(2), 135-153.
- Wouterlood, F. G., Vinkenoog, M., and van den Oever, M. C. (2002). "Tracing tools to resolve neural circuits." *Network*, 13, 327-342.
- Yao, H., Shi, L., Han, F., Gao, H., and Dan, Y. (2007). "Rapid learning in cortical coding of visual scenes." *Nat Neurosci*, 10(6), 772-778.

Zilles, K. (1992). "Neuronal plasticity as an adaptive property of the central nervous system." *Ann. Anat.*, 174(5), 383-391.