

# Reglas Jerárquicas en el Establecimiento de Conexiones Neuronales en el Sistema Nervioso Central

## Hierarchical Rules in the Specification of Neural Connections in the Central Nervous System

Jaime F. Olavarría  
University of Washington

El cerebro es el asiento biológico de los procesos mentales y conductuales, y para que éstos sean adaptativos es necesario que el cerebro se desarrolle normalmente. ¿Cuáles son los mecanismos que guían el establecimiento de precisas conexiones nerviosas entre millones de neuronas? Usando la conexión interhemisférica a través del cuerpo calloso como modelo experimental, hemos obtenido evidencia de que la actividad retiniana, aún aquella que ocurre espontáneamente antes de que se abran los ojos, juega un papel esencial en el desarrollo normal de la conexión interhemisférica de la corteza visual. En forma sorprendente, también encontramos que si se elimina la actividad retiniana, la conexión interhemisférica se establece, pero en forma anormal. Estos resultados sugieren que hay varios mecanismos capaces de especificar patrones diferentes de conexiones nerviosas, y que estos mecanismos están ordenados jerárquicamente. Así, en la ausencia de actividad retiniana, un patrón anormal de conexiones interhemisféricas se desarrolla probablemente bajo la influencia de gradientes de sustancias químicas. Sin embargo, en la presencia de actividad retiniana, ésta se sobrepondría a estas influencias químicas para imponer un patrón de conexiones normales. Estas ideas sugieren que la alteración o eliminación de mecanismos que actúan a distintos niveles jerárquicos podría conducir al desarrollo anómalo del sistema nervioso.

The brain embodies the biological bases of mental and behavioral phenomena, and for these to have adaptive value, it is necessary that the development of the brain proceeds normally. What are the mechanisms guiding the establishment of precise nervous connections among millions of neurons? Using the interhemispheric connection through the corpus callosum as an experimental model, evidence was obtained that retinal activity, even that generated spontaneously before eye opening, plays a major role in the normal development of the visual interhemispheric connection. Surprisingly, it was also found that if retinal activity is abolished, interhemispheric linkages are able to form, but according to an abnormal plan. These results suggest that there are several mechanisms capable of specifying different patterns of nervous connections, and that these mechanisms are hierarchically organized. Thus, in the absence of retinal activity, an abnormal pattern of interhemispheric connections develops probably under the guidance of gradients of chemical substances. However, if retinal activity is present, it would supersede the chemical influences and impose the establishment of a normal pattern of interhemispheric connections. These ideas suggest that abolishing or altering mechanisms operating at different hierarchical levels may cause the development of anomalies in the nervous system.

Los procesos conductuales y mentales tienen una base biológica compleja: el procesamiento de información por una red neuronal en la que millones de células nerviosas forman billones de conexiones a través de finas prolongaciones del cuerpo celular llamadas axones. Tal vez una de las preguntas más fascinantes de la Biología se relaciona con los procesos que guían el desarrollo de un órgano tan complejo como el cerebro. A medida que se multiplica el número de neuronas, éstas tienen que migrar hasta sus lugares de destino, y desde allí establecer conexiones sinápticas con un grupo muy

específico de neuronas ubicadas a veces en lugares muy distantes. ¿Cómo saben las neuronas hacia donde deben enviar las nacientes prolongaciones axónicas? Y luego allí ¿cómo reconoce el axón exploratorio a las neuronas que constituyen los blancos apropiados?

Nuestro grupo de investigación ha escogido a la conexión que existe entre los dos hemisferios cerebrales como modelo para estudiar los mecanismos que guían el establecimiento de conexiones neuronales. Células ubicadas en un hemisferio cerebral deben enviar sus axones a través de la línea media y penetrar en el hemisferio opuesto. Una vez allí, deben establecer contacto sináptico con blancos neuronales apropiados. El conjunto de axones que cruza la línea media se llama cuerpo calloso, el cual es uno de los "nervios" (i.e., fascículos de axones) más grandes del sistema nervioso, comparable a la médula espinal en el número de axones que contiene. Por su gran tamaño y ubicación, la conexión callosa ha despertado mucho interés. Tal vez una de las

---

Jaime Olavarría, Department of Psychology.

Este proyecto fue financiado por el grant NIH EY09343. James W. Lewis y Chi-Pei Li participaron en partes de este estudio. August Zitzka ayudó con los procedimientos histológicos y con las ilustraciones.

La correspondencia relativa a este artículo debe ser dirigida a Jaime F. Olavarría, Department of Psychology, University of Washington, Box 351525, Seattle, Washington 98195-1525. U.S.A. E-mail: jaime@u.washington.edu

principales hipótesis acerca del cuerpo calloso es que éste permite la coordinación funcional de los dos hemisferios cerebrales, ya que cada hemisferio controla principalmente la mitad opuesta del cuerpo. A nosotros nos preocupa especialmente la parte de la conexión callosa que une aquellas áreas corticales que son parte del sistema visual. Las áreas corticales visuales están ubicadas en el lóbulo occipital, en el polo posterior de los hemisferios cerebrales. Entre las áreas corticales visuales se distinguen el área visual primaria (V1, área 17) y las áreas no primarias (V2, V3, etc). Una de las propiedades de las áreas visuales es que cada una de ellas contiene una representación de la mitad opuesta del campo visual. Así por ejemplo, las áreas visuales del hemisferio izquierdo representan la mitad derecha del campo visual. Las mitades derecha e izquierda del campo visual se separan por una línea vertical en el campo visual llamada meridiano vertical.

Estudios anatómicos anteriores (e.g., Olavarría & Montero, 1984) han demostrado que, en mamíferos adultos, sólo regiones específicas de las áreas visuales envían conexiones al hemisferio opuesto. Estas mismas regiones son también las únicas que reciben la llegada de axones transcallosos. Estas regiones representan el meridiano vertical del campo visual y coinciden con el borde de las áreas visuales. El hecho que las conexiones callosas se ubiquen precisamente en regiones que representan el meridiano vertical ha sugerido que una de las funciones del cuerpo calloso es permitir la fusión perceptual de las dos mitades del campo visual (Hubel & Wiesel, 1967; Blakemore, Diao, Pu, Wang, & Xiao, 1983). Es decir, las conexiones callosas visuales permitirían que el campo visual funcione como una sola unidad perceptual a pesar de que cada mitad esté representada en hemisferios distintos. Si uno fija la mirada en un pino por ejemplo, la mitad izquierda será representada en las áreas visuales del hemisferio derecho, mientras que la mitad derecha lo será en las áreas visuales del hemisferio izquierdo, y la unidad perceptual del pino sería facilitada por la conexión callosa.

El hallazgo en relación a que las conexiones callosas no están distribuidas difusamente en toda la corteza sino sólo en regiones específicas plantea de nuevo la pregunta de cómo se establecen estas conexiones durante el desarrollo. Más aún, se sabe que en mamíferos recién nacidos, las conexiones callosas son muy distintas a las del adulto (Olavarría & Van Sluyters, 1985). En el recién nacido, las conexiones son difusas, es decir, células que envían

axones al otro hemisferio se encuentran en todas las regiones corticales y no sólo en regiones específicas como en el adulto. Asimismo, todas las regiones corticales reciben axones de neuronas callosas. En forma progresiva, ramas axonales que conectan con regiones erróneas son eliminadas y así, poco a poco, se esculpe el patrón de conexiones maduras a partir de una distribución inmadura difusa. ¿Cómo saben las neuronas que el blanco apropiado para las conexiones transcallosas está en los bordes de las áreas visuales, donde se representa el meridiano vertical del campo visual? Y ¿cuáles son los procesos por medios de los cuales se "ratifica" una conexión correcta y se elimina una incorrecta? Los resultados del presente trabajo sugieren que hay varios mecanismos capaces de guiar el establecimiento de conexiones nerviosas durante el desarrollo. Más aún, estos mecanismos parecen estar ordenados jerárquicamente ya que los efectos de algunos de ellos depende de la presencia de mecanismos ubicados a niveles más altos en la jerarquía. Como se discute más abajo, uno de los mecanismos que guía el desarrollo de conexiones nerviosas normales deriva de patrones de actividad neuronal a nivel de la retina. Cuando esta actividad está ausente, hemos encontrado que los patrones de conexiones nerviosas que se desarrollan son anormales, establecidos probablemente por mecanismos más bajos en la jerarquía.

Berlucchi (1981) propuso que los estímulos visuales captados por ambos ojos producirían actividad neuronal que sería sincrónica entre algunas neuronas en los dos hemisferios (las que serían ratificadas en su conexión callosa) mientras que otras neuronas no tendrían actividad correlacionada o sincrónica, las que perderían sus conexiones interhemisféricas. El ejemplo anterior de la vista fijada en un pino sirve para ilustrar esta hipótesis. Si el lado derecho del pino es muy similar al lado izquierdo (por ejemplo, con el mismo número de puntas dispuestas simétricamente), entonces es fácil imaginar que haya células en ambos hemisferios que tienen el mismo patrón de actividad neuronal (células con actividad sincrónica o correlacionada), ya que éstas estarían respondiendo a partes del pino que son idénticas sin ser las mismas. En general, todos los objetos visuales simétricos inducirían actividad correlacionada entre los dos hemisferios en regiones que representan el meridiano vertical. De acuerdo a esta teoría, si la neurona que envía el axón transcalloso tiene el mismo patrón de actividad que la neurona contactada por el axón, se establecerá

una conexión sináptica entre las dos neuronas. Si el patrón de actividad no es el mismo, la conexión no se establecerá.

Esta teoría impone ciertas condiciones y permite ciertas predicciones. Por una parte, es necesario que los párpados del animal estén abiertos y que éste explore el mundo visual con los dos ojos antes que la conexión callosa madure. Por otra parte, esta teoría predice que las conexiones callosas sólo existen en regiones que representan el meridiano vertical, ya que en otros lugares no habría actividad neuronal correlacionada entre los hemisferios. Además, esta teoría predice que las conexiones callosas son simétricas con respecto a la línea media. Es decir, la distancia del sitio de origen de una conexión callosa a la línea media del cerebro es la misma que la distancia de la línea media a la zona donde termina la conexión callosa en el otro hemisferio (imágenes en espejo con respecto a la línea media).

Hay varias observaciones que amenazan la validez de las predicciones derivadas de la teoría de Berlucchi. Estudios anatómicos más recientes en roedores han descrito que en algunas áreas visuales las conexiones callosas no están restringidas a regiones que representan el meridiano vertical (Olavarría & Van Sluyters, 1983). Más importante aún, se ha determinado que la conexión callosa visual en algunos animales madura *antes* de que se abran los ojos, sugiriendo que la estimulación visual binocular no es la fuente principal de correlación neuronal entre los dos hemisferios (Olavarría & Van Sluyters, 1985).

En el presente trabajo, hemos examinado la predicción de la teoría de Berlucchi de que las conexiones callosas son simétricas con respecto a la línea media. Con el objeto de establecer el papel de la estimulación visual binocular en el desarrollo de las conexiones callosas, en un primer grupo de experimentos en ratas y gatos normales hemos examinado la simetría de las conexiones callosas en la corteza visual de la rata, especie en la que la conexión callosa madura *antes* de que se abran los ojos (estos se abren a los 13 días de vida), y en el gato, en el que la conexión callosa madura *después* de que se abran los ojos. Si la estimulación visual binocular tiene un papel importante en el desarrollo de la conexión callosa, esperaríamos resultados distintos en estas dos especies. Por ejemplo, los gatos podrían tener conexiones callosas simétricas, mientras que las ratas podrían tener un patrón distinto de conexiones callosas.

También es necesario considerar que la

estimulación visual no es la única manera de activar las células ganglionares de la retina. Estas células pueden activarse espontáneamente aún antes de que se abran los párpados (Galli & Maffei, 1988; Maffei & Galli-Resta, 1990). Por esta razón, en un segundo grupo de experimentos hemos estudiado la simetría de las conexiones callosas en ratas crecidas sin actividad retiniana espontánea. El propósito de estos experimentos es determinar si la actividad retiniana espontánea tiene un rol instructivo en el desarrollo de conexiones interhemisféricas en animales en los cuales la conexión callosa madura antes de que se abran los ojos.

## Método

Para examinar la simetría de las conexiones callosas, hemos inyectado pequeñas cantidades de trazadores anatómicos fluorescentes a distintas distancias de la línea media. Estos trazadores son captados por las terminaciones axónicas y transportados retrógradamente hasta el cuerpo celular, en el otro hemisferio. Dado que los diversos trazadores son de distinto color, es posible determinar si el sitio de inyección de un determinado trazador es o no simétrico con el foco opuesto de cuerpos celulares marcados retrógradamente por la inyección. Una región callosa que ha sido muy estudiada anteriormente es aquella que se encuentra entre las áreas V1 (área 17) y V2, y es la que hemos elegido para este estudio.

En el primer grupo de experimentos se utilizaron 51 ratas normales adultas (más de un mes de edad) y 7 gatos normales adultos (más de 3 meses de edad). De las ratas usadas, 46 eran ratas pigmentadas Long-Evans, y 5 eran ratas albinas Sprague-Dawley o Fisher. Las inyecciones de trazadores fueron hechas bajo anestesia inducida por Ketaset (0.05 mg/kg) y Nembutal (0.05 mg/kg), y mantenida con Halotano (2-4%) en O<sub>2</sub>. Pequeños volúmenes (0.05-0.1 µl) de trazadores fueron inyectados ya sea en la región lateral de la corteza visual primaria (aprox. 3.5-4.6 mm de la línea media), donde las células callosas se encuentran tanto en capas corticales supragranulares (capas 2-3) como infragranulares (capas 5-6), o en regiones más mediales de la corteza primaria, donde las células callosas se concentran principalmente en capas infragranulares (ver Olavarría & Van Sluyters, 1985, y Figura 1A). Los trazadores fueron inyectados bajo presión a través de micropipetas de vidrio (50-100 µm de diámetro en la punta). Los trazadores fluorescentes usados incluyeron Fast-Blue (FB, Sigma Co., 5% en dH<sub>2</sub>O) y Rodamina y Green-beads (RB y GB, respectivamente, LumaFluor Inc., solución stock concentrada), Diamidino Yellow (DY, Sigma Co., 3% in dH<sub>2</sub>O). Una inyección, o una serie mediolateral de varias inyecciones pequeñas se hicieron en el área visual primaria, 0.3-3 mm por delante de la sutura ósea lambda. Además de las inyecciones pequeñas, múltiples inyecciones de mayor tamaño (aprox. 0.6-1.0 µl de volumen total) de Fluoro-Gold (FG, Sigma Co., 4% en dH<sub>2</sub>O) o bisBenzimida (BB, Sigma Co., 10% en dH<sub>2</sub>O) se hicieron en regiones vecinas de la corteza visual primaria (ver Fig. 1B) para demostrar el patrón global de conexiones callosas.

Después de un periodo de sobrevivencia de 3 a 5 días, las ratas fueron anestesiadas profundamente y perfundidas a través del corazón con solución salina 0.9%, y enseguida con paraformaldehído 4% en buffer fosfato 0.1 M. Los cerebros fueron removidos del cráneo y dejados toda la noche en sacarosa al 30% en buffer fosfato 0.1

M. Los resultados fueron analizados en secciones histológicas de 60  $\mu\text{m}$  de espesor, las que fueron cortadas ya sea en el plano coronal, o tangencial a la superficie de la corteza previamente aplanada (Olavarría & Montero, 1984). Esencialmente los mismos procedimientos usados en ratas normales se utilizaron en el segundo estudio, en el cual se analizaron las conexiones callosas en 24 ratas adultas Long Evans en las que la actividad retiniana había sido eliminada al nacer. Todos los procedimientos quirúrgicos fueron hechos de acuerdo a protocolos aprobados por la U.W.

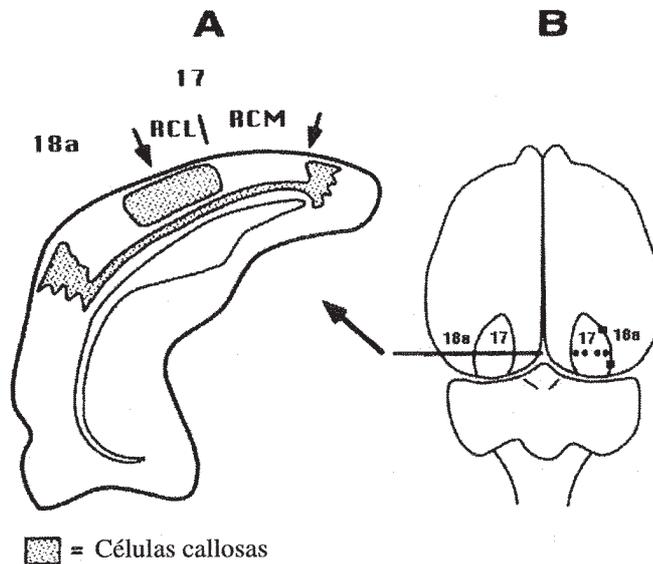
La distribución de células marcadas retrógradamente por las inyecciones pequeñas de trazadores fue analizada con referencia al patrón global demostrado con las inyecciones grandes de FG o BB, así como con referencia a los bordes del área 17 determinados de acuerdo a criterios arquitectónicos en secciones histológicas teñidas ya sea para demostrar la distribución de mielina o la substancia de Nissl (ver e.g., Olavarría & Van Sluyters, 1985). Para optimizar la correlación entre los patrones de marcaje celular y la arquitectura cerebral, las secciones teñidas para la substancia de Nissl eran a menudo las mismas que habían sido analizadas para determinar la distribución de células marcadas con trazadores fluorescentes.

El análisis de las secciones histológicas se efectuó con un microscopio equipado con plataforma motorizada (Stahl Research) controlada por un computador IBM PC-XT. Registramos cuidadosamente la posición de células marcadas por los distintos trazadores, los que podían diferenciarse fácilmente ya que eran de distinto color. Múltiples secciones fueron reconstruidas usando ya sea un computador Iris 2400 (Silicon Graphics), o el sistema gráfico Neurolucida (MicroBrightField). Se usaron métodos cuantitativos para determinar la distribución de la densidad de células marcadas en el área 17 y para comparar las poblaciones de células marcadas producidas por los distintos trazadores.

## Resultados

### *Regiones callosas medial y lateral en la corteza visual primaria*

En el área visual primaria de todos los mamíferos estudiados hasta ahora, las conexiones callosas se acumulan en el borde lateral, donde se encuentra la representación del meridiano vertical del campo visual. En esta localidad, las células y terminaciones axónicas de esta conexión se distribuyen densamente en las capas corticales 2,3, 5 y menos densamente en las otras capas. En la rata, células y terminaciones callosas también se encuentran en el resto del área 17, donde forman una delgada lámina de distribución situada en el borde de la capas 5 y 6 (Olavarría & Van Sluyters, 1983). Para facilitar la descripción de los resultados, hemos diferenciado estas dos zonas de conexiones callosas. Como se ilustra en la Figura 1, la zona lateral se identifica como región callosa lateral (RCL), mientras que la distribución en el resto del área 17 se identifica como región callosa medial (RCM). Como veremos más abajo, estas dos zonas se diferencian en la forma como las conexiones callosas se distribuyen en relación con la línea media del cerebro. El gato solo tiene región callosa lateral.



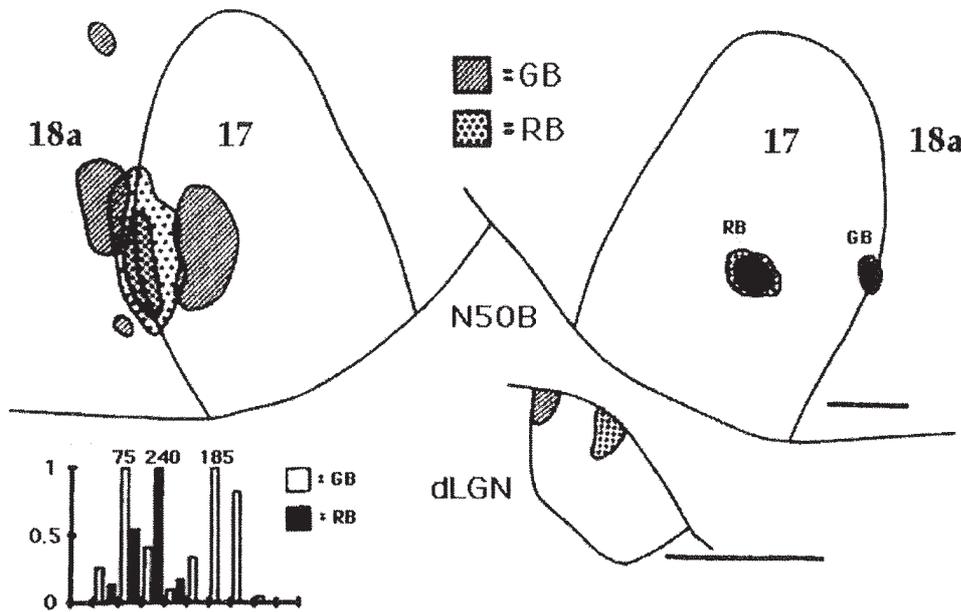
**Figura 1.** A. Regiones callosas medial y lateral. Diagrama de la distribución global de conexiones callosas en la corteza visual de la rata. Áreas achuradas corresponden a regiones corticales que contienen acumulaciones densas de conexiones callosas (cuerpos celulares y terminaciones axónicas). Los bordes de la corteza visual primaria (área 17) están indicados por las flechas. Dos regiones callosas se identifican en el área 17: la región callosa medial (RCM) y la región callosa lateral (RCL). B. Diagrama del cerebro de rata indicando la ubicación del área 17 en la corteza occipital, los sitios de inyección en el hemisferio derecho, y el nivel coronal donde fue obtenida la sección que se muestra en A. Los cuadrados negros indican el sitio aproximado de inyecciones grandes de trazadores fluorescentes, generalmente FG o BB, que se usaron para marcar el patrón global de conexiones callosas. Los puntos negros dentro del área 17 en el hemisferio derecho indican la posición aproximada de las inyecciones restringidas de trazadores fluorescentes.

*Organización de la región callosa lateral en el área 17*

Nuestros resultados muestran que la organización de conexiones callosas en la región lateral del área 17 es muy similar en la rata y en el gato. Más aún, en ambas especies el patrón de conexiones callosas no es simétrico con respecto a la línea media, contrario a la predicción derivada de la teoría de Berlucchi. Así, inyecciones justo en el borde del área 17 no producían células marcadas en el borde del área 17 del lado opuesto, sino que en una región dentro del área 17, ubicada más cerca de la línea media que el sitio de inyección. En forma recíproca, una inyección dentro del área 17 producía células marcadas no en la región simétrica sino más lateralmente, en el borde del área 17. Resultados consistentes han sido obtenidos independiente del número y tipo de trazadores fluorescentes usados. Estos hallazgos se ilustran con resultados representativos obtenidos de una rata (Figura 2) y un gato (Figura 4).

La Figura 2 muestra los resultados de un experimento en una rata en el cual los resultados fueron analizados en el plano tangencial a la

superficie aplanada del cerebro. En este caso, el trazador GB fué inyectado en el borde del área 17 mientras que el trazador RB fué inyectado 1300 µm más medial. La inyección de GB produjo un campo de células marcadas localizado dentro del área 17 y otros campos en el área vecina 18a, pero ninguno de los campos de marcaje estaba localizado en el borde del área 17, lo que ocurriría si la conexión fuese simétrica con respecto a la línea media. La distribución de células marcadas por GB (ver histograma en la Figura 2) mostró dos puntos máximos de densidad celular separados por 1.2 mm. En forma contrastante, la inyección de RB localizada dentro del área 17 produjo un solo campo de marcaje centrado en el borde del área 17. Como se aprecia en el diagrama y el histograma de la Figura 2, la distribución de células marcadas por el trazador RB tenía un centro denso (representado por el achurado denso) y un entorno menos denso (representado por el achurado menos denso). Análisis de varianza (ANOVA) de la distribución de células marcadas indicó que las poblaciones de células marcadas por GB y RB eran significativamente distintas ( $F = 2,798.9, p < 0.01$ ).



*Figura 2.* Organización de conexiones callosas en la región callosa lateral de la rata. Esta Figura muestra resultados obtenidos del caso N50B que recibió una inyección de GB en el borde del área 17 en el hemisferio derecho y una segunda inyección de RB ubicada 1300 µm más medialmente. En el hemisferio izquierdo, el campo de células marcadas retrógradamente por la inyección de RB tiene un núcleo denso (achurado denso) rodeado por un área de menos densidad (achurado liviano). El histograma muestra distribuciones normalizadas de células marcadas por GB y RB. Para cada trazador, los números en el histograma indican el número de células marcadas que se contaron en la partición que contenía el mayor número de células marcadas. El marcaje en el núcleo talámico geniculado dorsal y lateral (dLGN) se muestra en el diagrama en el extremo inferior derecho de la Figura. Barras de calibración = 1.0 mm.

Resultados similares fueron obtenidos en la región callosa lateral del gato. La Figura 4 muestra los resultados de un experimento en el cual los resultados fueron analizados en el plano coronal. En este caso, una inyección de GB fué administrada aproximadamente 2000  $\mu\text{m}$  medial al borde lateral del área 17 en el hemisferio izquierdo. En el hemisferio opuesto, las células marcadas retrógradamente por la inyección de GB se acumularon justo en el borde lateral del área 17, en una zona conocida como la zona de transición (TZ) entre el área 17 y el área vecina (área 18). Si la conexión callosa hubiese sido simétrica, las células marcadas se habrían encontrado en la región indicada por la mano que apunta con el índice (ver Figura 4).

#### Organización de la región callosa medial en el área 17 de la rata

En agudo contraste con los resultados obtenidos en la región callosa lateral, hemos encontrado que

las conexiones interhemisféricas en la región callosa medial están organizadas en forma simétrica con respecto a la línea media. Estos resultados son ilustrados en la Figura 3, en la que se muestra un caso seccionado en el plano tangencial a la superficie aplanada del cerebro.

La Figura 3 muestra resultados obtenidos de una rata que recibió inyecciones de GB y RB en la región medial del área 17 en el hemisferio derecho. En el hemisferio izquierdo, aunque las células marcadas por las dos inyecciones ocupaban áreas relativamente grandes, las células marcadas por GB y RB formaban dos poblaciones (ver histograma) que eran significativamente diferentes entre ellas ( $t = 10.5, p < 0.01$ ). Más aún, los puntos de densidad máxima para ambos trazadores están organizados en forma *simétrica* con respecto a la línea media. Nuestros resultados en las regiones callosas lateral y medial en ratas normales están esquematizados en la Figura 6A.

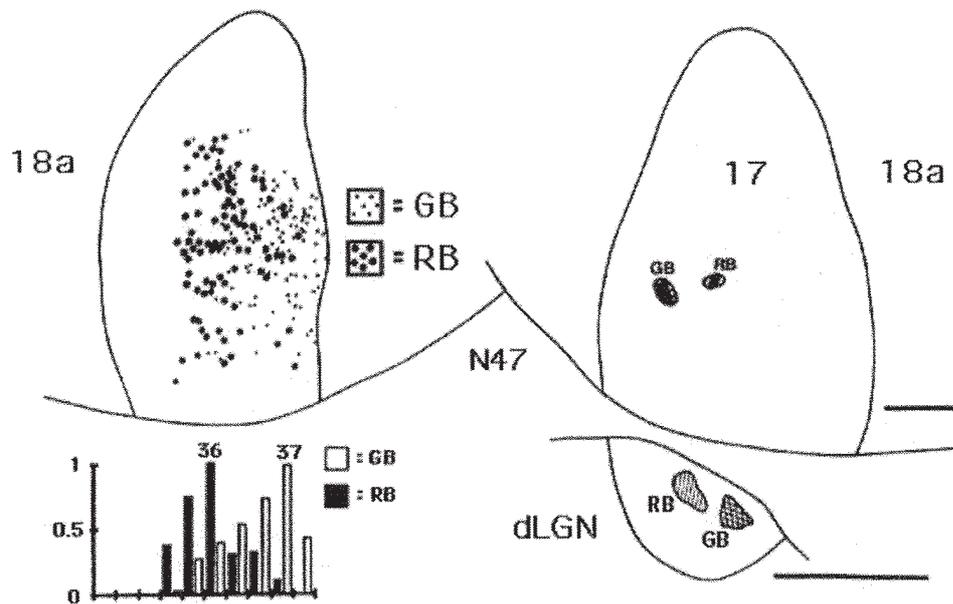


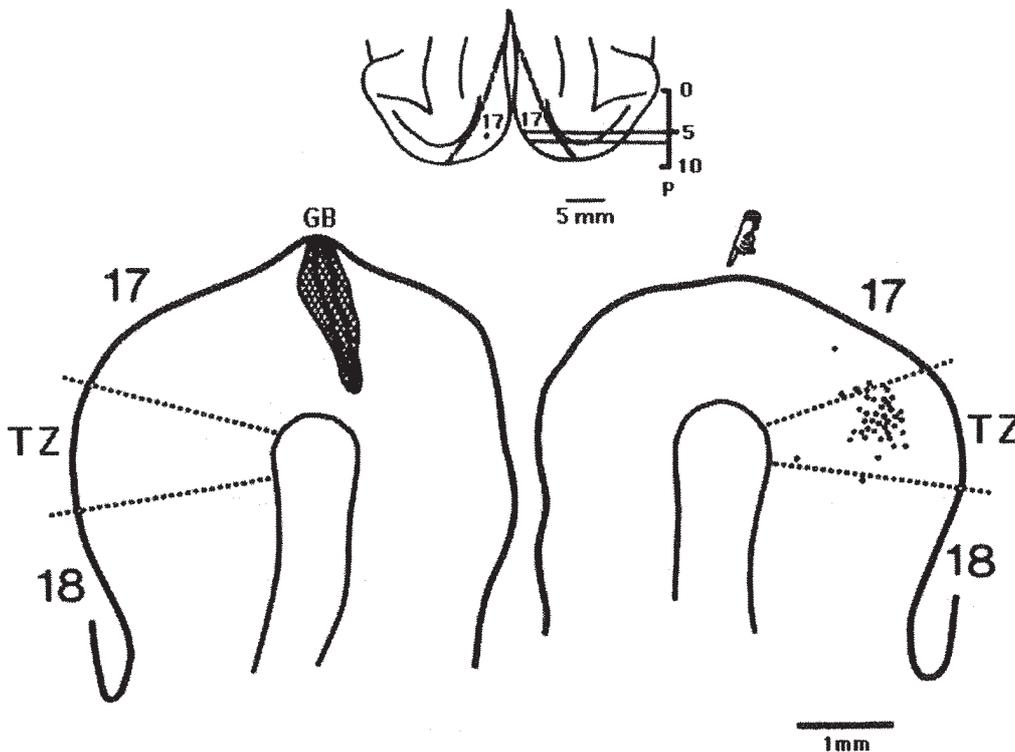
Figura 3. Organización de las conexiones callosas en la región callosa medial de la rata. Resultados del caso N47 que recibió inyecciones de GB y RB en la región medial del área 17. La distancia de las inyecciones de GB Y RB del borde lateral del área 17 fue de 2700 y 1900  $\mu\text{m}$ , respectivamente. Los puntos en el hemisferio izquierdo representan la distribución de células marcadas por RB (puntos grandes) y GB (puntos pequeños). Cada punto corresponde a una célula marcada. Otras convenciones como en la Figura 2. Barras de calibración = 1.0 mm.

*Efecto de la ausencia de actividad retiniana en el desarrollo de conexiones callosas en la rata.*

Nuestros resultados indican que el patrón de conexiones callosas en la región callosa *medial* del área 17 de ratas sin actividad retiniana no difiere del patrón encontrado en la región callosa medial en ratas normales. En cambio, hemos encontrado profundas diferencias en la región callosa lateral del área 17 en ratas sin actividad retiniana. A diferencia de ratas normales que poseen un patrón no simétrico de conexiones callosas en la región callosa lateral, el patrón en ratas sin actividad retiniana es *simétrico* con respecto a la línea media. Excepto por el hecho de que células marcadas en la región callosa medial se acumulan preferentemente en capas infragranulares (capas 5,6), no encontramos diferencias obvias entre las regiones mediales y laterales del área 17 en ratas

sin actividad retiniana. En ambas áreas las conexiones callosas son simétricas. Estos hallazgos son ilustrados con resultados de un caso estudiado en el plano tangencial a la corteza aplanada del cerebro.

La Figura 5 muestra resultados de una rata que recibió una inyección relativamente grande de RB en el borde del área 17, junto con inyecciones de GB y BB ubicadas aproximadamente 800 y 1900  $\mu\text{m}$  más medialmente, respectivamente. Como se aprecia en esta Figura, para cada trazador usado, los campos de células marcadas y los sitios respectivos de inyección están ubicados simétricamente con respecto a la línea media. Los resultados de ratas sin actividad retiniana están esquematizados en la Figura 6B. Comparación de las Figuras 6A y 6B enfatiza las diferencias encontradas en las ratas sin actividad retiniana.



*Figura 4.* Organización de las conexiones callosas en la región callosa lateral del gato. Este diagrama muestra los resultados de un caso (C12) inyectado con GB en una región localizada 2000  $\mu\text{m}$  medial al borde lateral del área 17 en el hemisferio izquierdo. El centro de la inyección y el entorno de difusión están indicados por las líneas internas y externas, respectivamente. En el hemisferio derecho, la mano que apunta con el índice indica el lugar simétrico al sitio de inyección. Como se aprecia en esta Figura, las células marcadas retrógradamente se acumulan más lateralmente al sitio indicado por la mano, justo en el borde del área 17, en una zona llamada zona de transición (TZ) entre el área 17 y la vecina área 18. La zona de transición está enmarcada por las líneas punteadas. Cada punto corresponde a una célula marcada. El diagrama en la parte superior de la figura muestra un esquema de la mitad posterior del cerebro del gato. Este esquema muestra el borde lateral del área 17 (líneas segmentadas), el sitio de inyección en el hemisferio izquierdo (punto), y la región de la cual fueron obtenidas las secciones histológicas coronales para analizar el patrón de marcaje en el hemisferio derecho.

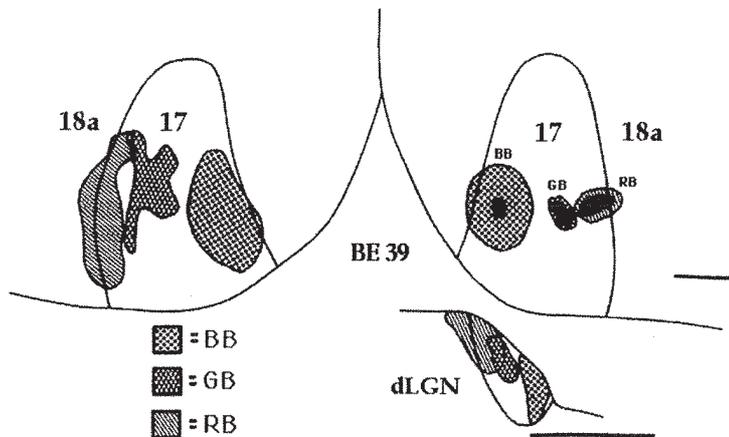


Figura 5. Organización de las conexiones callosas en las regiones callosas medial y lateral en ratas que han crecido sin actividad retiniana. La Figura muestra resultados del caso BE39 que recibió una inyección de RB en el borde del área 17, e inyecciones de GB y BB localizadas 800 y 1900  $\mu\text{m}$  más medial dentro del área 17, respectivamente. El patrón de marcaje en el hemisferio izquierdo muestra que las conexiones callosas son simétricas con respecto a la línea media del cerebro en ratas que han crecido sin actividad retiniana. Barras de calibración = 1.0 mm.

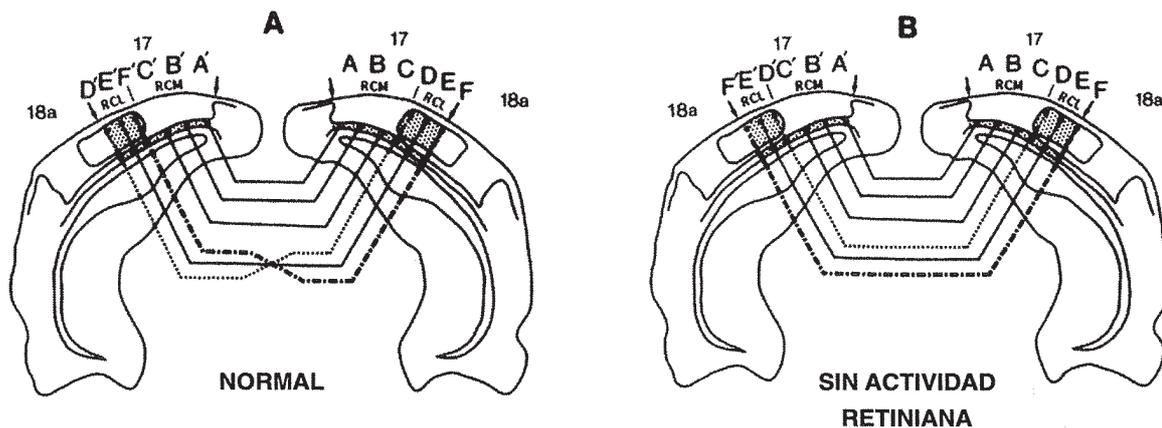


Figura 6. Diagramas esquemáticos de la organización de conexiones callosas en el área visual primaria de ratas normales (panel A) y de ratas crecidas sin actividad retiniana (panel B). En paneles A y B, las conexiones entre los puntos designados A,B,C y A',B',C' ilustran patrones simétricos de conexión callosas en la región callosa medial de ratas normales y ratas sin actividad retiniana. En la región callosa lateral, el patrón callosal no simétrico entre los puntos designados D,E,F y D',E',F' que existe en ratas normales (panel A) es reemplazado por un patrón simétrico en ratas sin actividad retiniana (panel B). Otras convenciones como en la Figura 1.

## Discusión

*Papel de la estimulación visual binocular.* La similitud de los resultados en la región callosa lateral en la rata y en el gato sugieren que los mecanismos que determinan el patrón de conexiones callosas durante el desarrollo son similares en ambas especies. Como la rata tiene los ojos cerrados durante el periodo en que madura la conexión callosa, nuestros resultados sugieren que estos mecanismos no dependen necesariamente de la estimulación derivada de la exploración visual activa del mundo con ambos ojos.

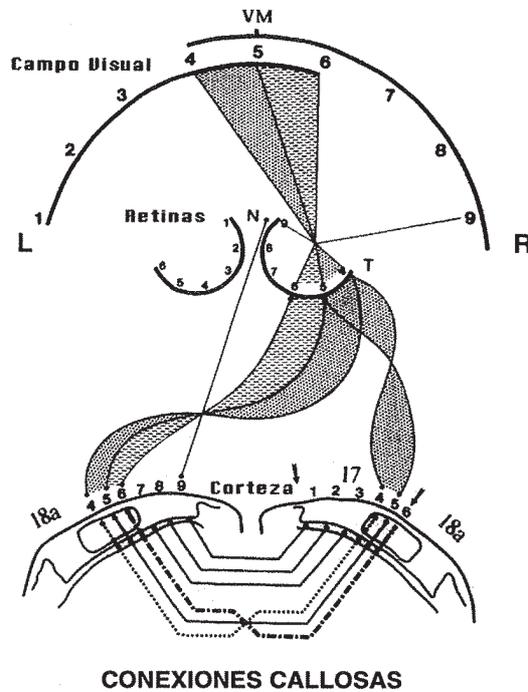
Cualquiera sean los mecanismos que guían la formación de conexiones callosas no simétricas en la rata, éstos tienen que existir aún en ausencia de estimulación visual. Los mecanismos independientes de la estimulación visual binocular que deben actuar en la rata pueden también jugar un papel importante en el desarrollo de la conexión callosa en el gato. Sin embargo, dado que en esta especie los párpados se abren antes que la conexión callosa madure, no se puede descartar la posibilidad de que la estimulación visual binocular juegue un papel importante en la especificación de la conexión callosa en el gato. En

una serie reciente de experimentos, hemos obtenido evidencia que la estimulación visual binocular parece no jugar un papel importante en el desarrollo de conexiones callosas en el gato (Olavarría, 1996).

*Conexiones no simétricas.* Según el patrón de conexiones simétricas que se deriva de la teoría de Berlucchi, las fibras callosas conectarían regiones corticales que representan puntos del campo visual localizados a ambos lados del meridiano vertical. Es decir, las fibras callosas conectarían puntos que no son idénticos o correspondientes espacialmente.

Contrariamente a esta idea, en la región lateral del área 17 en ratas y gatos hemos encontrado que las conexiones callosas están organizadas en forma no simétrica. Una consecuencia de esta organización no simétrica es que las fibras callosas conectan regiones

de los dos hemisferios que representan el *mismo* punto del campo visual. Esta relación entre las conexiones callosas y la representación del campo visual en la corteza se ilustra en la Figura 7. Como se aprecia en esta Figura, cada hemisferio cerebral representa no sólo la mitad opuesta del campo visual sino también una pequeña parte del campo visual *del mismo lado*. Esto hace que una parte central del campo visual (los puntos 4,5,6 en la Figura 7) se representen en *ambos* hemisferios. Las conexiones callosas no simétricas conectarían la representación de los mismos puntos del campo visual en ambos hemisferios (Figura 7). La exigencia de que las conexiones callosas entre puntos corticales que representan la misma región del campo visual sean no simétricas deriva de la topografía del mapa visual en ambos hemisferios (ver Figura 7).



CONEXIONES CALLOSAS

Figura 7. El diagrama en esta Figura muestra nuestra interpretación de la relación que existe entre el campo visual y los patrones de conexiones callosas en las regiones callosas medial y lateral en ratas normales. Para simplificar la Figura, el núcleo talámico dLGN no está representado. El campo visual está representado por los semicírculos ubicados en la parte superior de la Figura, y los números del 1 al 9 indican lugares dispuestos en forma regular en el campo visual. Así, los números 1 y 9 representan los lugares más periféricos que son visibles por el ojo izquierdo y derecho, respectivamente. El meridiano vertical del campo visual está representado por el número 5 (VM). El semicírculo 1-6 está representado en la retina izquierda y en la corteza visual derecha, mientras que el semicírculo 4-9 está representado en la retina derecha y en la corteza visual izquierda. El segmento del campo visual entre los puntos 4-6 está representado en ambos hemisferios. Áreas achuradas con segmentos de líneas siguen la representación sucesiva del segmento 5-6 del campo visual en la retina nasal (N) derecha y en el segmento 5-6 en la corteza visual izquierda. Las áreas achuradas con puntos siguen la representación del segmento 4-5 del campo visual a la retina temporal (T) derecha. Desde aquí, y gracias a la proyección bilateral de la retina temporal, la representación del segmento 4-5 de campo visual es llevada a *ambos* hemisferios. Esta vía retiniana que proyecta bilateralmente es la que impondría patrones sincronizados de actividad neuronal en puntos corticales de ambos hemisferios que representan el mismo lugar del campo visual. Las proyecciones de la retina izquierda no están representadas para simplificar la Figura. En el área visual primaria (esquemática en la parte inferior de la Figura), las partes periféricas del campo visual están representadas medialmente, mientras que las partes centrales del campo visual están representadas lateralmente. Las conexiones callosas están indicadas por líneas continuas, segmentadas, o punteadas.

*Proyecciones retinianas bilaterales.* Pero ¿cómo se establece durante el desarrollo esta conexión entre las representaciones hemisféricas de los mismos puntos del campo visual si, al menos en la rata, la estimulación visual no juega un papel importante como fuente de actividad neuronal correlacionada? Es posible distinguir una fuente alternativa de actividad correlacionada si uno considera que la mitad temporal de la retina envía conexiones visuales no sólo al hemisferio del mismo lado sino también al hemisferio opuesto. Como ilustra la Figura 7, es la existencia de la proyección de la retina temporal al hemisferio opuesto lo que produce la representación de una parte del campo visual en el hemisferio del mismo lado. Si regiones de la retina temporal envían conexiones divergentes a ambos hemisferios, entonces cualquier foco de actividad en cada retina temporal sería transmitido como actividad correlacionada (sincrónica) a ambos hemisferios. Esto sería posible aún con actividad retiniana espontánea, es decir, aquella no generada por estimulación visual.

*Actividad retiniana espontánea.* En efecto, estudios en otros laboratorios han establecido que las células ganglionares de la retina muestran actividad espontánea aún antes del parto (Galli & Maffei, 1988; Maffei & Galli-Resta, 1990). Esta actividad espontánea se propaga en olas a través de la superficie retiniana (Meister, Wong, Baylor, & Shatz, 1991). El esquema de la Figura 7 entonces sugiere que, durante el desarrollo, el sistema de proyecciones bilaterales de la retina temporal induce actividad neuronal sincrónica entre regiones corticales que representan los mismos puntos del campo visual. Esta actividad sincrónica produciría la estabilización de conexiones callosas no simétricas entre estas regiones corticales.

Basados en nuestros resultados podemos entonces reemplazar la hipótesis de Berlucchi que requiere estimulación visual binocular por otra nueva en la que la actividad correlacionada cortical deriva de actividad retiniana de origen *monocular*. Esta actividad retiniana puede ser de naturaleza espontánea.

*Diferencias entre las regiones callosas lateral y medial del área 17.* Recordemos que en la región callosa medial de ratas normales existe un patrón de conexiones simétricas, y aquí las fibras callosas conectarían sitios corticales que representan regiones del campo visual ubicadas a ambos lados del meridiano vertical. Al respecto es importante notar que la proyección contralateral de la retina temporal

sólo afecta la región callosa lateral del área 17 (ver Figura 7). Esto significa que la actividad sincrónica impuesta por la actividad de la retina temporal, juega un papel importante sólo en el desarrollo de la conexión callosa en la región lateral del área 17, y no en la región medial de esta área. El desarrollo de la conexión callosa simétrica de la región medial estaría bajo la influencia de otro mecanismo que no depende de actividad retiniana, sino tal vez de gradientes de sustancias químicas.

*Desarrollo de conexiones callosas en ausencia de actividad retiniana.* Nuestra hipótesis indica que el desarrollo de conexiones no simétricas depende de actividad retiniana de origen monocular, la que en el caso de la rata sería espontánea. Para probar esta hipótesis, hemos estudiado el patrón de conexiones callosas en ratas adultas en las que se había eliminado completamente la actividad retiniana al nacer (en la rata, las conexiones callosas maduran durante las dos primeras semanas de vida). Si el desarrollo de conexiones no simétricas no depende de actividad retiniana, habríamos observado el mismo patrón de conexiones callosas en ratas con o sin actividad retiniana. En apoyo a nuestra hipótesis, observamos que el patrón de conexiones callosas en la región callosa lateral en ratas sin actividad retiniana es muy diferente al patrón presente en ratas normales en la misma región del área 17. En vez de ser no simétrico como en ratas normales, hemos encontrado que el patrón de conexiones callosas en ratas sin actividad retiniana es *simétrico* (Figura 6B).

*Reglas jerárquicas en el desarrollo de conexiones neurales.* Nuestros resultados en ratas sin actividad retiniana apoyan nuestra hipótesis de que el sistema retiniano de proyecciones bilaterales es necesario para el desarrollo normal de conexiones callosas no simétricas en la región callosa lateral del área 17. Además, estos hallazgos sugieren que hay mecanismos dependientes y no dependientes de actividad retiniana que son capaces de especificar patrones diferentes de conexiones callosas, y que estos mecanismos son jerárquicos. Así, en la ausencia de actividad retiniana, un patrón simétrico de conexiones callosas se formaría probablemente bajo la influencia de gradientes de sustancias químicas. Esta situación ocurriría normalmente en la región medial del área 17, la cual está fuera del alcance de la influencia retiniana. Sin embargo, en la presencia de actividad retiniana, ésta se sobrepondría a las influencias de gradientes químicos para imponer un patrón de conexiones no simétricas en la región lateral del área 17. La

fortaleza relativa de los mecanismos dependientes y no dependientes de actividad retiniana capaces de guiar el desarrollo de conexiones callosas puede deberse a diferencias en los procesos celulares íntimos que especifican las conexiones sinápticas bajo la influencia de cada clase de mecanismo. Las conexiones callosas pueden ser entonces un modelo útil no sólo para entender la naturaleza de los distintos mecanismos que pueden guiar la formación de conexiones callosas, sino también para estudiar cómo estos mecanismos interactúan entre sí durante el desarrollo.

Los resultados del presente estudio abren la posibilidad de que células localizadas en regiones que permanecerán conectadas a través del cuerpo caloso en el adulto tienen la capacidad de establecer contactos sinápticos ya sea simétricos o no simétricos con blancos neuronales en el hemisferio opuesto. Una secuencia de sucesos posibles durante el desarrollo es aquella en la que axones callosos cruzan la línea media y comienzan a explorar un territorio relativamente amplio, tal vez con la ayuda de ramas axónicas laterales. Si existe actividad neuronal sincrónica entre los dos hemisferios inducida por actividad retiniana, entonces se formarían conexiones con blancos neuronales no simétricos. Las regiones conectadas representarían el mismo punto del campo visual. Si no hay actividad retiniana, se establecerían conexiones con blancos simétricos, y las regiones conectadas no representarían las mismas coordenadas espaciales. Esta condición ocurriría en la región medial del área 17 en ratas normales, y en las regiones medial y lateral en ratas sin actividad retiniana. En cualquier situación, las ramas axonales que no estabilizan sus conexiones serían eliminadas.

*Función de reglas jerárquicas en el desarrollo.* Es posible que el mecanismo que guía el desarrollo de conexiones callosas simétricas en ratas sin actividad retiniana sea un mecanismo evolutivamente antiguo sin mucha importancia en el desarrollo de conexiones nerviosas en los mamíferos. Alternativamente, este mecanismo podría ser esencial y formar parte de un conjunto de mecanismos que actúan sucesivamente para producir una conexión nerviosa precisa. El mecanismo que genera conexiones simétricas puede depender de gradientes químicos que guían a los axones en forma aproximada al lugar donde está el blanco apropiado, y sería la función de mecanismos dependientes de actividad retiniana los que permitirían que el axón encuentre el blanco exacto. Así, las reglas jerárquicas

podrían formar un sistema en el que las reglas actúan en forma sucesiva y con grados de precisión cada vez mayor. Todas las reglas en el sistema serían igualmente importantes ya que si cualquiera de ellas se deteriora o elimina, la conexión nerviosa que se formaría sería probablemente con blancos anormales.

*Desarrollo patológico.* El conocimiento de las fuentes de información que guían el desarrollo de conexiones nerviosas es también importante para el entendimiento de condiciones patológicas en el desarrollo y para la formulación de terapias específicas. Nuestro estudio sugiere que la actividad retiniana espontánea juega un papel importante en la especificación de conexiones interhemisféricas. Dada la similitud de las conexiones interhemisféricas con las conexiones cortico-corticales en el mismo hemisferio, es posible que el papel de la actividad retiniana sea también importante en el desarrollo de otras vías nerviosas. Asimismo, la actividad espontánea de otras estructuras nerviosas, y no sólo la de la retina, puede ser importante en el desarrollo cerebral. Cualquier condición que altere o suprima la actividad espontánea de neuronas puede entonces tener graves consecuencias en el desarrollo normal de conexiones nerviosas. Por ejemplo, hay clara evidencia que ciertas drogas que deprimen la actividad nerviosa, como el alcohol, tienen efectos devastadores en el desarrollo del sistema nervioso central (Druse, 1992a, 1992b). Recién nacidos de madres que han bebido cantidades importantes de alcohol durante el embarazo desarrollan un cuadro clínico, llamado Síndrome Alcohólico Fetal, caracterizado por malformaciones en la morfología cerebral, retardo mental, hiperactividad, deficiencias perceptuales de atención y otras anomalías conductuales (Aronson, Kyllerman, Sabel, Sandin, & Olegard, 1985; Conry, 1990; Clarren, Alvord, Sumi, Streissgyth, & Smith, 1978). Es posible que algunas de las anomalías nerviosas, retardo mental y otras deficiencias puedan deberse, al menos en parte, al efecto que el alcohol puede tener, ya sea directa o indirectamente (Druse, 1992a), sobre la actividad nerviosa espontánea durante el desarrollo. Como vimos más arriba, la falta de actividad nerviosa espontánea no evita necesariamente que se formen conexiones, sino que éstas se establecerían guiadas por mecanismos jerárquicos más bajos, los que pueden especificar conexiones nerviosas anormales.

La estrategia de usar un sistema jerárquico de mecanismos que guían las conexiones nerviosas tiene

similitud con estrategias utilizadas en otros sistemas. Por ejemplo, las necesidades de un cerebro en desarrollo pueden compararse a las necesidades de organización que se generan cuando pueblitos de pocas casas se convierten en enormes metrópolis. ¿Cómo servir las necesidades de agua, telecomunicación, tránsito, correo, etc, en poblaciones gigantescas? Por ejemplo, ¿cuáles son los procesos que permiten que una carta que viene del extranjero llegue a su destino en una gran ciudad? En este caso también habrían mecanismos que sucesivamente indicarían blancos de mayor precisión, por ejemplo, país, ciudad, barrio y finalmente destinatario. Cada etapa estaría a cargo de distintos mecanismos de distribución, con distintos funcionarios. Así como en el cerebro, en el servicio de correos cada eslabón del sistema jerárquico de información es esencial porque permite que los mecanismos más altos en la jerarquía funcionen eficientemente, con grados sucesivamente más altos de precisión.

### Referencias

- Aronson, M., Kyllerman, M., Sabel, K.-G., Sandin, B., & Olegard, R. (1985). Children of alcoholic mothers: development, perceptual and behavioral characteristics as compared to matched controls. *Acta Paediatrica de Escandinavia*, 74, 27-35.
- Berlucchi, G. (1981). Recent advances in the analysis of the neural substrates of interhemispheric communication. En O. Pompeiano, & C.A. Marsan (Eds), *Brain mechanisms and perceptual awareness* (pp. 133-152). New York: Raven Press.
- Blakemore, C., Diao, Y., Pu, M., Wang, Y., & Xiao, Y. (1983). Possible functions of the interhemispheric connexions between visual cortical areas in the cat. *The Journal of Physiology*, 337, 334-349.
- Claren, S.K., Alvord, E.C.Jr., Sumi, S.M., Streissgyth, A.P., & Smith, D.W. (1978). Brain malformations related to prenatal exposure to ethanol. *Journal of Pediatrics*, 92, 64-67.
- Conry, J. (1990). Neuropsychological deficits in fetal alcohol syndrome and fetal alcohol effects. *Alcohol Clinical Experimental Research*, 14, 650-655.
- Druse, M.J. (1992a). Effects of in utero ethanol exposure on the development of CNS neurotransmitter systems. En M.W. Miller (Ed.), *Development of the Central Nervous System. Effects of Alcohol and Opiates* (pp.139-167). New York: Wiley-Liss.
- Druse, M.J. (1992b). Effects of maternal alcohol consumption on the developing nervous system. En R.R. Watson (Ed.), *Alcohol and Neurobiology. Brain development and Hormone Regulation* (pp.1-30). New York: CRC Press.
- Galli, L., & Maffei, L.(1988). Spontaneous impulse activity of rat retinal ganglion cells in prenatal life. *Science*, 242, 90-91.
- Hubel D.H., & Wiesel, T.N. (1967). Cortical and callosal connections concerned with the vertical meridian of visual fields in the cat. *Journal of Neurophysiology*, 30, 1561-1573.
- Maffei, L., & Galli-Resta, L. (1990). Correlation in the discharges of neighboring rat retinal ganglion cells during prenatal life. *Proceedings of the National Academy of Science*, 87, 2861-2864.
- Meister, M., Wong, R.O.L., Baylor, D.A., & Shatz, C.J. (1991). Synchronous bursts of action potentials in ganglion cells of the developing mammalian retina. *Science*, 252, 939-943.
- Olavarría, J.F. (1996). Visual callosal fibers link cortical columns dominated by the same eye in the cat. *Society for Neurosciences Abstract*, 22, 491.
- Olavarría, J., & Montero, V.M. (1984). Relation of callosal and striate-extrastriate cortical connections in the rat: Morphological definition of extrastriate visual areas. *Experimental Brain Research*, 54, 240-252.
- Olavarría, J., & Van Sluyters R.C. (1983). Widespread callosal connections in infragranular visual cortex of the rat. *Brain Research*, 279, 233-237.
- Olavarría, J., & Van Sluyters R.C. (1985). Organization and postnatal development of callosal connections in the visual cortex of the rat. *The Journal of Comparative Neurology*, 239, 1-26.