
SINAPTOGÉNESIS Y DESARROLLO DE LA MORFOLOGÍA DENDRÍTICA DE NEURONAS PIRAMIDALES EN LA NEOCORTEZA DEL CHIMPANCÉ PARECIDOS A LOS DE LOS HUMANOS

SERENA BIANCHI^a, CHERYL D. STIMPSON^a
TETYANA DUKA^a, MICHAEL D. LARSEN^b
WILLIAM G. M. JANSSEN^c, ZACHARY COLLINS^a
AMY L. BAUERNFEIND^a, STEVEN J. SCHAPIRO^d
WALLACE B. BAZE^d, MARK J. MCARTHUR^d
WILLIAM D. HOPKINS^{e,f}, DEREK E. WILDMAN^g
LEONARD LIPOVICH^g, CHRISTOPHER W. KUZAWA^h
BOB JACOBSⁱ, PATRICK R. HOF^{c,j}
CHET C. SHERWOOD^a

ABSTRACT. Neocortical development in humans is characterized by an extended period of synaptic proliferation that peaks in mid-childhood, with subsequent pruning through early adulthood, as well as relatively delayed maturation of neuronal arborization in the prefrontal cortex compared with sensorimotor areas. In macaque monkeys, cortical synaptogenesis peaks during early infancy and developmental changes in synapse density and dendritic spines occur synchronously across cortical regions. Thus, relatively prolonged synapse and neuronal maturation in humans might contribute to enhancement of social learning during development and transmission of cultural practices, including language. However, because macaques, which share a last common ancestor with humans ~25 million years ago, have served as the predominant comparative primate model in neurodevelopmental research, the paucity of data from more closely related great apes leaves unresolved when these evolutionary changes in the timing of cortical development became established in the human lineage. To address this question, we used immunohistochemistry, electron microscopy, and Golgi staining to characterize synaptic density and dendritic morphology of pyramidal neurons in primary somatosensory (area 3b), primary motor (area 4), prestriate visual (area 18), and prefrontal (area 10) cortices of developing chimpanzees (*Pan troglodytes*). We found that synaptogenesis occurs synchronously across cortical areas, with a peak of synapse density during the juvenile period (3-5 y). Moreover, similar to findings in humans, dendrites of prefrontal pyramidal neurons developed later than sensorimotor areas. These results suggest that evolutionary changes to neocortical development promoting greater neuronal plasticity early in postnatal life preceded the divergence of the human and chimpanzee lineages.

KEYWORDS. Evolution, Golgi stain, brain, ontogeny.

^aDepartment of Anthropology, The George Washington University, Washington, DC; ^bDepartment of Statistics and Biostatistics Center, The George Washington University, Rockville, MD; ^cFishberg Department of Neuroscience y Friedman Brain Institute, Icahn School of Medicine at Mount Sinai, Nueva York, NY; ^dDepartment of Veterinary Sciences, The University of Texas MD Anderson Cancer Center, Bastrop, TX; ^eNeuroscience Institute y Language Research Center, Georgia State University, Atlanta, GA; ^fDivision of Developmental and Cognitive Neuroscience, Yerkes National Primate Research Center, Atlanta; ^gCenter for Molecular Medicine and Genetics, Wayne State University, Detroit, MI; ^hDepartment of Anthropology, Northwestern University, Evanston, IL; ⁱDepartment of Psychology, Colorado College, Colorado Springs, CO; and ^jNew York Consortium in Evolutionary Primatology, Nueva York. / sbianchi@gwmail.gwu.edu / sherwood@gwu.edu. / SB, DEW, LL, CWK, BJ, PRH y CC diseñaron la investigación; SB, CDS, TD, WGMJ, ZC y ALB realizaron la investigación; SJA, WBB, MJM, WDH, BJ y PRH contribuyeron con nuevas herramientas analíticas; SB, CDS, MDL y CCS analizaron los datos; y SB, CDS, TD, ALB, SJS, WDH, DEW, LL, CWK, BJ, PRH y CCS escribieron el artículo. / Este artículo contiene información suplementaria en: www.pnas.org/lookup/suppl/doi:10.1073/pnas.1301210110/-/DCSupplemental.

Entre los primates, los seres humanos se caracterizan por un periodo especialmente prolongado en el desarrollo postnatal del cerebro durante el cual se adquieren las tradiciones y prácticas culturales, incluyendo el lenguaje. Debido a que la cultura juega un papel fundamental en el complejo de adaptación humano (Boyd, Richerson y Henrich 2011), el examen comparativo del desarrollo neuronal resulta importante para entender los orígenes de las especializaciones sociocognitivas humanas. En comparación con otros primates, en los seres humanos una proporción relativamente grande del crecimiento del tamaño cerebral toma lugar en el periodo postnatal, permitiendo que los factores sociales y ambientales tengan un impacto de gran alcance en el establecimiento de la conectividad neuronal (Sacher y Staffeldt 1974). Mientras que los monos macacos, las especies de primates que se han estudiado más ampliamente como un modelo comparativo del neurodesarrollo, nacen con cerebros ya con ~70 por ciento de la masa del cerebro adulto, y la masa del cerebro neonatal en los grandes simios oscila del 36 al 56 por ciento del tamaño adulto (McFarlin, et al. 2012; DeSilva 2011), en los seres humanos sólo se dispone del ~25 por ciento de la masa de adultos al nacer (Robson y Wood 2008). Concomitante, el refinamiento postnatal de la microestructura cortical en los humanos progresa a lo largo de un esquema más prolongado en comparación con los macacos. En los macacos, el proceso de sinaptogénesis, por el que se forman nuevas sinapsis, alcanza su punto máximo durante la infancia alrededor de los 3 meses de edad, y se completa la reducción de los excesos de sinapsis al final de la adolescencia (Liu, *et al.* 2012; Rakic, Bourgeois, Eckenhoff, Zecevic y Goldman-Rakic 1986). Por el contrario, en los seres humanos, la densidad de sinapsis pico ocurre en la niñez media alrededor de los 5 años de edad (Huttenlocher y Dabholkar, 1997; Liu, *et al.* 2012), con reducción de sinapsis que se extiende en la tercera década de vida (Petanjek, *et al.* 2011).

También se han reportado las diferencias interespecíficas del desarrollo neurológico entre macacos y humanos en el periodo de maduración entre diferentes regiones corticales. Mientras que la sinaptogénesis ocurre de manera simultánea a través de la corteza cerebral entera en los macacos (Rakic, *et al.* 1986), aparece retrasada en la región prefrontal en los seres humanos (Huttenlocher y Dabholkar 1997). Además, en los macacos las densidades de espinas en las dendritas de las neuronas piramidales prefrontales son superiores en comparación con otras áreas desde el momento del nacimiento y durante el desarrollo postnatal (Elston, Oga y Fujita 2009). En los humanos, sin embargo, las ramificaciones dendríticas de las neuronas piramidales en la corteza prefrontal alcanzan complejidad morfológica adulta y densidad espinal más adelante en el desarrollo, en contraste con las ramificaciones dendríticas en 1 cortezas sensoriales y motoras (Travis Ford y Jacobs 2005). Por medio de técnicas de imagen que

evalúan cambios longitudinales en la actividad metabólica (Chugani, Phelps y Mazziotta 1987), el crecimiento de materia gris (Gogtay, et al. 2004) y el grosor cortical (Shaw, et al. 2008) se ha documentado también un desarrollo temporal escalonado o heterócrono de la corteza cerebral humana, con regiones de asociación que maduran más tardíamente que las cortezas sensoriomotoras.

El desarrollo relativamente lento de la conectividad neocortical podría contribuir al surgimiento de las capacidades cognitivas exclusivamente humanas. Esta interpretación está respaldada con pruebas de que las regiones corticales que se desarrollan más tarde en la ontogenia humana también experimentaron la mayor expansión durante la evolución del cerebro humano (Hill, et al. 2010; Sherwood, Bauernfeind, Bianchi, Raghanti y Hof 2012), lo que sugiere que la selección evolutiva para ampliar estas regiones se acompañó por una prolongación de su desarrollo. También se ha reportado que entre estas regiones, la corteza prefrontal, que muestra una maduración particularmente extendida en los humanos con relación a los macacos, exhibe especializaciones neuroanatómicas y moleculares exclusivamente humanas (Cáceres, et al. 2007; Deacon 1997; Elston, Benavides-Piccione y DeFelipe 2001; Fu, et al. 2011; Semendeferi, et al. 2001; Spocter, M. A., et al. (2012)). Sin embargo, en virtud de que los macacos y los humanos comparten un antepasado común de hace ~25 millones años, actualmente no está claro si las características que distinguen el desarrollo cortical humano (es decir, periodo ampliado de sinaptogénesis y retardo de la maduración de las neuronas piramidales prefrontales) son exclusivas de nuestro linaje, o si evolucionaron antes de la divergencia de los seres humanos modernos y más estrechamente relacionadas con especies de grandes simios, como los chimpancés.

Comparados con los macacos, los chimpancés muestran mayores similitudes en el comportamiento con los seres humanos, incluyendo el desarrollo postnatal lento durante el cual se adquieren las conductas socialmente aprendidas y transmitidas "culturalmente", como el uso de herramientas (Lonsford 2006; Lonsdorf y Bonnie 2010). Aunque los chimpancés proporcionan uno de los mejores modelos animales para comparación con los que investigar especializaciones únicas en los humanos, hacen falta estudios del desarrollo cortical en esta especie debido a las barreras éticas y prácticas, y la rara disponibilidad de tejido cerebral post mortem de los infantes y juveniles. Hasta la fecha, sólo unos pocos estudios comparativos de desarrollo cerebral han incluido datos de chimpancés. Al examinar los cambios ontogénicos mediante IRM longitudinal, se ha demostrado que, similar a los humanos, la maduración del volumen de la materia blanca en chimpancés no es completa en la pubertad temprana (6 años); en los macacos, no obstante, alcanza valores de adultos durante el desarrollo juvenil temprano (Sakai, et al. 2011). Comparado con los chimpancés, el

desarrollo del cerebro humano se caracteriza por la adición más rápida del volumen de materia blanca durante el primer año de vida (Sakai, et al. 2011, 2013). Se ha demostrado que el crecimiento de la materia blanca difiere entre los seres humanos y los chimpancés mediante análisis histológicos que muestran que la mielinización dentro de la corteza cerebral continúa más allá de la adolescencia en los seres humanos, mientras que ésta se completa por la madurez sexual en los chimpancés (Miller, et al. 2012).

Con respecto a la sinaptogénesis, son extremadamente limitados los datos actuales de los chimpancés (Liu, et al. 2012). Por lo tanto, el presente estudio examinó dos marcadores del desarrollo en los chimpancés, en la sinaptogénesis y en el crecimiento dendrítico de las neuronas piramidales, en cuatro regiones, incluyendo la región prestriada visual (zona 18), la motora primaria (zona 4), la somatosensorial primaria (área 3b) y las cortezas prefrontales (zona 10). Estudios anteriores de la morfología de las neuronas en primates adultos han demostrado que estas áreas forman una jerarquía funcional, por el que las cortezas de asociación (es decir, zona 10) que integran la entrada de otras áreas muestran mayor potencial para la conectividad de corticocortical, más que las regiones sensoriales y motoras unimodales (zonas 4, 3b y 18) (Bianchi, et al. 2012; Elston, Benavides-Piccione y DeFelipe, 2001; Jacobs, et al. 2001). Predijimos que si el desarrollo cortical de los chimpancés es más parecido a de los seres humanos que al de los macacos, la sinaptogénesis y la maduración de la ramificaciones dendríticas de las neuronas piramidales se extendería en el periodo juvenil y mostraría una trayectoria más prolongada en la corteza prefrontal en relación con otras regiones.

RESULTADOS

Sinaptogénesis

Utilizamos inmunohistoquímica contra sinaptofisina, una proteína que se localiza en las vesículas presinápticas, para etiquetar la densidad de sinapsis en muestras neocorticales del chimpancé (Fig. 1). Para evaluar el efecto de la edad en la densidad de sinapsis durante el desarrollo postnatal, se ajustó un modelo de regresión cúbica a densidades puncta sinaptofisina-inmuno-reactivas en cada una de las cuatro regiones neocorticales. Las curvas de regresión polinomial cúbica individuales fueron significativas para la mayoría de las áreas cortical (Tabla 1), indicando la presencia de cambios de desarrollo en la densidad de la sinapsis. Se observó un fuerte aumento en la vida postnatal temprana en todas las regiones, seguidas por un pico en aproximadamente 3 años, que se mantuvo hasta la edad de 5 años. Las densidades de sinapsis luego disminuyeron gradualmente a través de la última vida juvenil y se acercaban a los niveles del adulto alrededor de la pubertad (~10 años de edad) (Fig. 1).

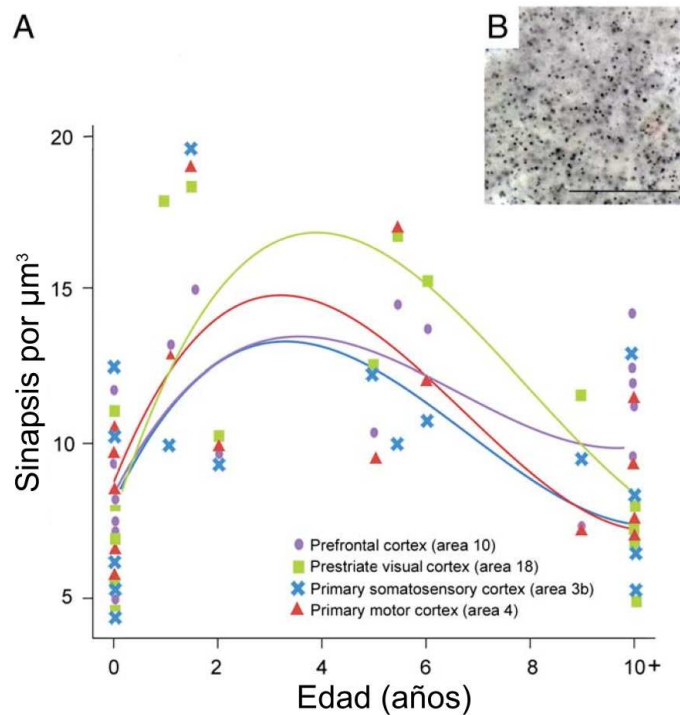


FIGURA 1. (A) Curvas de regresión polinomial cúbica individuales se ajustan a cuentas de densidades punta sinaptofisina-inmunorreactivas para las áreas 3b, 4, 18 y 10. (B) Microfotografía de punta sinaptofisina-inmunorreactiva de la corteza prefrontal de un chimpancé de 11 años de edad. (Barra de escala, 25 μm .)

Para probar las similitudes en el ajuste polinomial cúbico entre las diferentes regiones corticales, utilizamos un modelo de mínimos cuadrados generalizados. Este modelo confirmó una regresión polinomial cúbica significativa basada solamente en la edad y mostró un mejor valor de criterio de información de Akaike que un modelo como el polinomio cúbico basado tanto en la edad como en un término para las diferencias de región cortical. El modelo con diferencias por región cortical no se ajustó significativamente mejor según una prueba de razón de verosimilitud; los valores P fueron 0.55 y 0.48 para un modelo no estructurado y para un modelo de simetría compuesto, respectivamente. Estos resultados sugieren que hay una trayectoria del desarrollo similar de la sinaptogénesis en todas las regiones corticales y además se confirmaron mediante un modelo cúbico incluyendo edad con efectos aleatorios por los sujetos.

Aunque los patrones de desarrollo sináptico fueron similares a través de las áreas corticales, encontramos que surgen diferencias de región entre los recién nacidos y adultos en la densidad de sinapsis (Fig. 1). Las medidas repetidas de ANOVA de la densidad de sinapsis indicaron que no hubo

diferencias significativas en las áreas corticales en los recién nacidos ($n = 6$, 0- a 1 mes de edad; $F_{3,15} = 0.580$, $P = 0.637$). Sin embargo, hacia la edad adulta surgieron diferencias regionales en la densidad de sinapsis ($n = 5$, 10+ años; $F_{3,12} = 5.974$, $P = 0.010$; después de corregir por esfericidad que no se suponía: $P = 0.061$), con la corteza prefrontal mostrando una mayor densidad de sinapsis que la corteza visual preestriada ($P = 0.022$).

El examen de sinaptogénesis por microscopia electrónica (ME) (Fig. 2A) en las mismas regiones de cuatro de los cerebros de chimpancé que también habían sido procesados por sinaptofisina-immunohistoquímica corroboraron estos hallazgos. El acuerdo entre las cuentas de densidad puncta sinaptofisina-inmunorreactiva y de densidad de sinapsis por SE ME demostró por una relación positiva y significativa entre ambas medidas (Fig. 2B) ($r = 0,63$, $P = 0,009$, $n = 16$). Los resultados de cuentas de densidad de sinapsis por ME mostraron un incremento pronunciado del desarrollo en la corteza prefrontal, que se puede atribuir principalmente a cambios postnatales en la densidad de subtipos de sinapsis excitatorias asimétricos (Fig. S1).

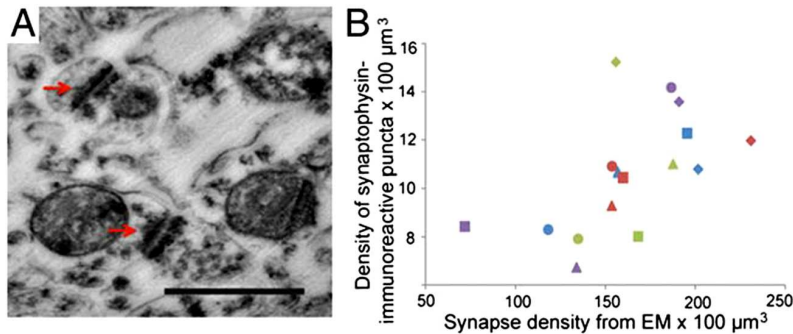


FIGURA 2. (A) Microfotografía de sinapsis como se observa bajo ME. Las flechas indican las uniones sinápticas. (Barra de escala, 0,5 μm.) (B) Parcela bivariada entre densidades puncta sinaptofisina-inmunorreactivas y densidades sinápticas a partir de datos de ME. Los cuadrados representan edad de 0 años, los triángulos 2 años, los diamantes 6 años y los círculos 11 años. Esquema de color para áreas como en la Figura 1.

TABLA 1. Modelos de regresión para las cortezas somatosensorial primaria (área 3b), motora primaria (área 4), visual prestriada (área 18) y prefrontal (área 10).

| Región | Intercepto | Edad | Edad ² | Edad ³ | r ² | Raíz del MSE | Regresión global del valor de p |
|---------|------------|-------|-------------------|-------------------|----------------|--------------|---------------------------------|
| Área 3b | 94.3 | -11.5 | -56.5 | 48.7 | 0.26 | 33.6 | 0.22 |
| Área 4 | 100.5 | -25.6 | 66.2* | 59.7+ | 0.42 | 29.3 | 0.05 |
| Área 18 | 99.5 | -30.0 | -135.4*** | 53.0 | 0.62 | 30.9 | 0.003 |
| Área 10 | 106.3 | 41.1 | -41.7 | 44.3+ | 0.38 | 24.6 | 0.07 |

Se muestran los efectos lineales (Edad), cuadráticos (Edad²) y cúbicos (Edad³) de la edad. ***P<0.001, *P<0.05, +P<0.10.

Desarrollo de la morfología dendrítica de neurona piramidal

Analizamos la morfología de las neuronas piramidales de siete cerebros de chimpancés infantiles y juveniles que se utilizaron en la inmunohistoquímica y en los estudios ME de densidades de sinapsis descritas anteriormente. Los resultados indicaron diferencias regionales significativas en la estructura dendrítica de neuronas piramidales en las áreas de la neocorteza de chimpancés infantes ($n = 4$, 0 a 24 meses de edad), según lo evaluado por seis medidas de complejidad morfológica, incluyendo: tamaño del cuerpo de la célula: $F_{12, 144} = 1,86, P = 0,04$; longitud dendrítica total (LDT): $F_{12, 144} = 3,64, P < 0.001$; longitud del segmento media (LSM): $F_{12, 144} = 5.34, P = 0.001$; cuenta de segmento dendrítico (CSD): $F_{12, 144} = 2.09, P = 0.021$; número de espina dendrítica (NED): $F_{12, 144} = 10,65, P < 0.001$; y densidad de espina dendrítica (DED): $F_{12, 144} = 21.373, P < 0.001$ (Tabla 2). Comparaciones pares revelaron que las dendritas en la corteza prefrontal (zona 10) eran significativamente más cortas que en las áreas 3b ($P = 0.022$) y 4 ($P = 0,037$). Las neuronas piramidales en el área prefrontal 10 también tenían una longitud más corta de segmento medio que en el área 3b ($P < 0.001$) y la zona 4 ($P = 0.002$), así como menos espinas (área 3b, $P < 0.001$; zona 4, $P = 0,005$; zona 18, $P = 0.005$) y baja densidad espinal (área 3b, $P < 0.001$; zona 4, $P < 0.001$; zona 18, $P < 0.001$) que en otras regiones. En promedio, las neuronas prefrontales en chimpancés infantiles tenían dendritas que eran 22 por ciento menores, tenían 44 por ciento menos espinas y 30 por ciento menor densidad espinal que la media de las neuronas de las áreas 3b, 4 y 18. No se encontraron diferencias en el número de segmentos dendríticos ($P = 1.000$) a través de áreas corticales (véase, por ejemplo, Fig. 4).

Debido a que la morfología de neurona piramidal en chimpancés infantiles se analizó con la misma metodología utilizada en un estudio previo con chimpancés adultos (Bianchi, et al. 2012), pudimos comparar la variación regional en complejidad dendrítica en estos dos grupos de

edad (Figs. 3 y 4 y Tabla 2). Cabe señalar que, similar a los reportes en los infantes humanos (Travis, Ford y Jacobs 2005), en los chimpancés jóvenes, la técnica de Golgi rápida tiñó neuronas de manera predominante en la capa V, mientras que las neuronas en la capa III típicamente se tiñeron mejor en adultos. Por esta razón, sólo se puede interpretar el patrón de diferencias relativas en la complejidad dendrítica en todas las regiones entre los chimpancés infantiles y adultos. Se proporcionan ilustraciones de variación regional por edad en la Figura 4. Las neuronas piramidales de la corteza prefrontal continúan siendo las menos elaboradas entre las áreas corticales examinadas de acuerdo con la mayoría de las medidas de complejidad dendrítica a través del desarrollo infantil y juvenil (edades 5-6) y sólo comienzan a aumentar en el periodo juvenil más adelante (9 años), convirtiéndose en última instancia en las neuronas más complejas en la edad adulta (Bianchi, et al. 2012).

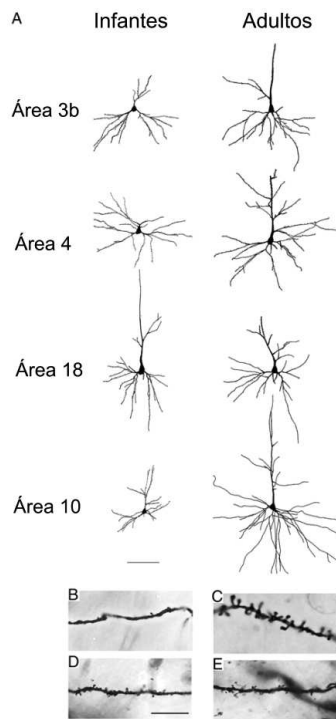


FIGURA 3. (A) Trazo de neuronas piramidales de tinción de Golgi en las áreas corticales 3b, 4, 18 y 10 en chimpancés infantiles y adultos. (Barra de escala, 100 μ m.) Abajo del trazo, microfotografías de primer plano representan árboles dendríticos de neuronas piramidales en (B) área 10 de un chimpancé de 1 año (C) área 10 de un chimpancé adulto, (D) área 3b de un chimpancé de 1 año y (E) área 3b de un chimpancé adulto. (Barra de escala, 25 μ m.)

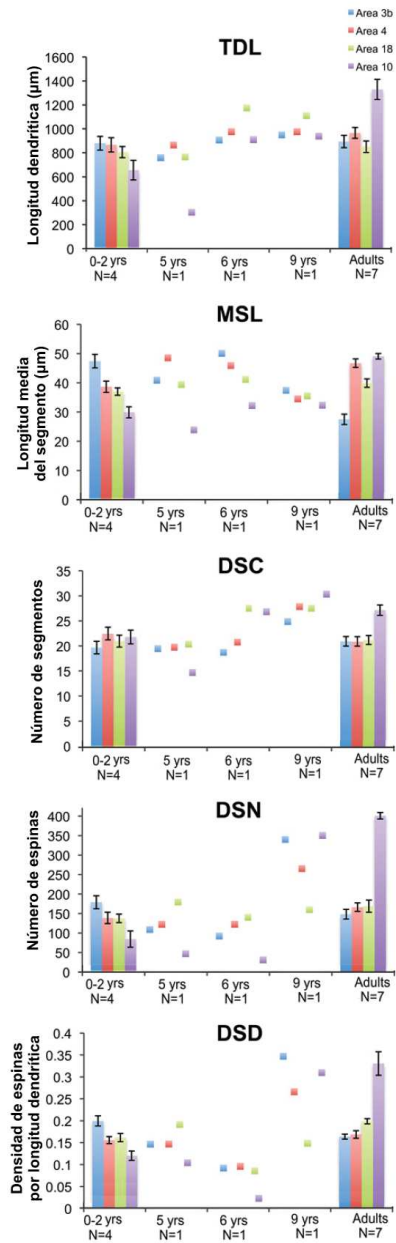


FIGURA 4. Diferencias regionales en medidas morfológicas de la complejidad de las dendritas basales para todas las regiones corticales de interés entre los chimpancés adultos e infantiles, incluyendo LDT, LSM, CSD, NED y DED. Datos de juveniles (5-9 años), para que un individuo por grupo de edad estaba disponible, se ilustran como puntos de datos individuales. Las barras de error representan el error estándar de la media (EEM)

DISCUSIÓN

De forma similar a los seres humanos, los chimpancés tienen una vida relativamente larga y un periodo prolongado de dependencia durante el cual se adquieren de sus congéneres “tradiciones culturales” (p. ej., uso de herramientas, posturas de acicalamiento) (Lonsford 2006; Lonsdorf y Bonnie 2010). Así como la experiencia postnatal forma el desarrollo cognitivo y social, los cambios en el periodo de maduración cortical pueden ser importantes para entender la evolución de las diferencias de especies en el comportamiento. De hecho, muchas de las diferencias genéticas entre los humanos y otros primates afectan los procesos implicados en el desarrollo cerebral (Dennis, et al. 2012; Derrien, et al. 2012; Pollard, et al. 2006). Hasta hace no mucho, sin embargo, poco se sabía sobre la naturaleza de los cambios microestructurales durante la ontogenia neuronal en la corteza cerebral de primates no humanos que no fueran macacos, lo que hace difícil evaluar cómo la trayectoria del desarrollo del cerebro humano puede ser único (Miller, et al. 2012). Los análisis actuales demuestran que similar a los humanos, la proliferación sináptica en los chimpancés se prolonga durante el periodo juvenil medio, y el desarrollo de neuronas piramidales en la corteza prefrontal se retrasa con relación a otras áreas corticales.

Sinaptogénesis prolongada

Como los seres humanos (Huttenlocher y Dabholkar 1997; Petanjek, et al. 2011), los chimpancés exhiben un pico sustancialmente posterior en la densidad de sinapsis (entre los 3 y los 5 años) en comparación con los macacos (3 meses) (Rakic, et al. 1986) y una fase prolongada de reducción (*pruning*) de sinapsis, que se extiende en el último periodo juvenil (alrededor de 10 años). La evidencia para un periodo prolongado de refinamiento sináptico en chimpancés es consistente con hallazgos previos, indicando que el desarrollo de la materia blanca prefrontal se prolonga hasta por lo menos el periodo juvenil medio en esta especie (Sakai, et al. 2011). Este hallazgo contrasta con un reciente informe de Liu, et al. que sugiere que una expresión génica relativamente mayor asociada a las sinapsis en la corteza prefrontal continúa hasta los 5 años de edad sólo en los humanos, pero en los chimpancés y macacos la expresión génica sináptica alcanza su punto máximo dentro del primer año de vida. Sin embargo, debido a que el análisis de Liu, et al. incluía sólo tres cerebros de chimpancé entre 1 año de edad y la edad adulta, las diferencias en los tamaños de muestra en estos dos estudios podría contribuir a hallazgos divergentes, en especial porque se acentúa la variación interindividual. Además, todavía poco se sabe sobre cómo la expresión génica regula los cambios anatómicos en las densidades sinápticas durante el desarrollo (Goyal y Raichle 2013).

La sinaptogénesis prolongada en los chimpancés es coherente con la evidencia conductual que indica que el periodo juvenil es crítico para el aprendizaje social de comportamientos específicos de grupo adquiridos de sus congéneres. El uso de herramientas en los chimpancés muestra variación regional en una medida que supera a otros animales no humanos, incluyendo técnicas tan variadas como el martilleo con piedras para obtener nueces, meter o cavar con palos para obtener hormigas o termitas y acuchillar pequeños vertebrados con lanzas (Whiten, et al. 1999). Los chimpancés jóvenes necesitan al menos 5 años de desarrollo postnatal antes de ser capaces de dominar el uso de herramientas y la adquisición de competencias en estas habilidades depende de variables ambientales, tales como el tiempo con la madre y su aptitud (Lonsford 2006). Así, puede resultar importante un largo periodo de sinaptogénesis en los chimpancés a lo largo de su vida juvenil para mejorar la plasticidad neuronal utilizada en el comportamiento, que depende de la experiencia y que surge tras la exposición social y el aprender con sus congéneres.

TABLA 2. Medidas de complejidad y posición morfológica de neuronas piramidales (profundidad de la superficie pial) en las cortezas somatosensorial (área 3b), motora primaria (área 4), visual prestriada (área 18) y prefrontal (área 10) (media \pm SD).

| Medida morfológica | Área 3b | Área 4 | Área 18 | Área 10 |
|---|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| Recién nacidos e infantes (n = 4) | | | | |
| Área del soma de la célula (μm^2) | 185 \pm 88 | 17 \pm 45 | 152 \pm 68 | 189 \pm 46 |
| Profundidad del soma de la célula (μm) | 1,314 \pm 733 | 1,040 \pm 548 | 1,062 \pm 468 | 1,151 \pm 603 |
| LDT (μm) | 879 \pm 361 | 866 \pm 376 | 805 \pm 516 | 655 \pm 293 |
| LSM (μm) | 47 \pm 15 | 38 \pm 12 | 37 \pm 12 | 30 \pm 8 |
| CSD (μm) | 20 \pm 8 | 22 \pm 8 | 21 \pm 7 | 22 \pm 8 |
| NED (μm) | 179 \pm 105 | 139 \pm 91 | 138 \pm 132 | 84 \pm 68 |
| DED (μm) | 0.20 \pm 0.07 | 0.15 \pm 0.05 | 0.16 \pm 0.07 | 0.12 \pm 0.06 |
| Adultos (n = 7) | | | | |
| Área del soma de la célula (μm^2) | 183 \pm 88 | 185 \pm 62 | 167 \pm 75 | 190 \pm 63 |
| Profundidad del soma de la célula (μm) | 796 \pm 209 | 707 \pm 247 | 692 \pm 241 | 733 \pm 224 |
| LDT (μm) | 894 \pm 429 | 966 \pm 377 | 851 \pm 406 | 1,329 \pm 705 |
| LSM (μm) | 27 \pm 8 | 47 \pm 11 | 40 \pm 11 | 49 \pm 16 |
| CSD (μm) | 21 \pm 8 | 21 \pm 6 | 21 \pm 7 | 27 \pm 10 |
| NED (μm) | 148 \pm 78 | 166 \pm 101 | 169 \pm 84 | 401 \pm 203 |
| DED (μm) | 0.16 \pm 0.04 | 0.17 \pm 0.07 | 0.19 \pm 0.04 | 0.33 \pm 0.22 |

LDT, longitud dendrítica total; LSM, longitud del segmento media; CSD, cuenta de segmento dendrítico; NED, número de espina dendrítica; DED, densidad de espina dendrítica.

No encontramos diferencias en el tiempo de densidad de sinapsis pico en las diferentes regiones de la neocorteza del chimpancé. Estos hallazgos parecen estar en contraste con los reportes en los seres humanos que indican que la corteza prefrontal madura más tarde en comparación con otras áreas corticales, como se refleja en la tasa metabólica, el grosor cortical y la densidad de sinapsis pico (Chugani, Phelps y Mazziotta 1987; Giedd, et al. 1999; Huttenlocher y Dabholkar 1997; Liu, et al. 2012; Shaw, et al. 2008). No obstante, cabe señalar que datos anteriores que sugieren un retraso relativo de la sinaptogénesis en la corteza prefrontal humana se basan en un solo estudio de una muestra modesta que carecía de análisis estadístico (Huttenlocher y Dabholkar 1997). Así, la evidencia del desarrollo heterocrónico en la neocorteza humano según se midió mediante la actividad metabólica y grosor cortical puede reflejar el efecto combinado de múltiples cambios microestructurales, incluyendo el crecimiento neuronal de ramificación dendrítica (Travis, Ford y Jacobs, 2005), densidad de sinapsis, números de células gliales y otros factores.

Crecimiento dendrítico retardado en la corteza prefrontal

Además de la sinaptogénesis, examinamos cambios regionales en el desarrollo de ramificaciones dendríticas de las neuronas piramidales. En los primates adultos, se ha reportado una variación notable en la morfología y complejidad de las neuronas piramidales (Bianchi, et al. 2012; Elston, Benavides-Piccione y DeFelipe 2001; Giedd, et al. 1999; Jacobs, et al. 2001). En concreto, se ha mostrado que las neuronas piramidales de la corteza prefrontal se caracterizan por árboles dendríticos más elaboradas que otras áreas corticales, para apoyar una mayor conectividad de integración de diversas entradas corticocorticales y para orquestar comportamientos cognitivamente complejos (Bianchi, et al. 2012; Elston, Benavides-Piccione y DeFelipe 2001; Jacobs, et al. 2001; Semendeferi, et al. 2011). Aunque las ramificaciones dendríticas son más extensas en la corteza prefrontal con relación a otras regiones corticales en los humanos adultos (Jacobs, et al. 2001), en los chimpancés (Bianchi, et al. 2012) y en los macacos (Elston, Benavides-Piccione y DeFelipe 2001) el tiempo de desarrollo de estas especializaciones neuronales parece ser específico de cada especie (Elston, Oga y Fujita 2009; Travis, Ford y Jacobs 2005).

Al demostrar que la arborización dendrítica y la densidad espinal en la corteza prefrontal de chimpancés infantiles no es tan extensa como en otras áreas corticales, nuestros datos indican un retraso en la maduración de las neuronas piramidales en esta región, un patrón que comparte muchas similitudes con el desarrollo dendrítico en humanos (Travis, Ford y Jacobs 2005) en comparación con los macacos (Elston, Oga y Fujita 2009). Las dendritas regulan la integración de las entradas y proporcionan sitios de sinapsis en las espinas (Spruston 2008; Yuste y Tank 1996). Como tales,

son estructuras muy plásticas que experimentan cambios en respuesta a la experiencia, lo cual es especialmente evidente durante el desarrollo (Anderson, et al. 1995; Bose, et al. 2010; Bloss, et al. 2011; Grutzendler, Kasthuri y Gan 2002; Kabaso, et al. 2009; Koenderink y Uylings 1995; Jacobs, Driscoll y Schall 1997; Jacobs y Scheibel 1993; Moser, Trommald y Andersen 1994; Petanjek, et al. 2011; Radley, et al. 2006; Sin, et al. 2002; van Praag, Kempermann y Gage 2000; Yadav, et al. 2012; Yang, Pan y Gan 2009). Por esta razón, un retardo en la formación de árboles dendríticos en la corteza prefrontal puede ser importante para procesar e integrar la gran carga de información que los humanos y chimpancés adquieren durante el desarrollo y para el mantenimiento de la plasticidad de las funciones ejecutivas. Aunque el presente estudio se centró en la corteza prefrontal rostral en consonancia con las investigaciones previas en chimpancés adultos y humanos, es posible que el retardo en la maduración de las neuronas piramidales también caracterice a las cortezas de asociación en otras regiones frontales, parietales y temporales.

A pesar de compartir estas similitudes en el neurodesarrollo, es importante observar que la ontogenia cognitiva en los chimpancés difiere de los seres humanos en varios aspectos. Estudios conductuales sugieren que los diferentes contextos sociales y ambientales en los que se desarrollan los humanos y chimpancés pudieron haber sido también importantes en la evolución de las capacidades sociocognitivas específicamente humanas (Burkart, Hrdy y Van Schaik 2009). Por ejemplo, mientras que los chimpancés jóvenes no destetan hasta los 4-5 años de edad y permanecen estrechamente unidos a sus madres durante los primeros años de su desarrollo, los infantes humanos a menudo interactúan con múltiples cuidadores y se involucran en una atención conjunta (Carpenter y Tomasello 2006). Los experimentos con grandes simios enculturados demuestran el efecto modulador del entorno social sobre la cognición; criados en contacto humano en un ambiente enriquecido se asocia con un mejor desempeño en tareas sociocognitivas y uso de herramientas (Buttelmann, et al. 2007; Furlong, Boose y Boysen 2008; Lyn, Russell y Hopkins 2010; Russell, et al. 2011).

Futuros estudios que investiguen si la progresión del desarrollo cortical en el chimpancé caracteriza también a otros grandes simios (bonobos, gorilas y orangutanes) ayudaría a identificar con mayor precisión la aparición evolutiva de estos rasgos. En este sentido, las secuencias del genoma y conjuntos de datos del transcriptoma cerebral de varios grandes simios pueden ser útiles en la identificación de la secuencia de gen específico o en los cambios regulatorios que contribuyen a la variación filogenética en el momento de desarrollo neocortical. El estudio de otras especies duraderas y de grandes cerebros, como los cetáceos y los elefantes, también

podría arrojar luz sobre los mecanismos evolutivos y las limitaciones del desarrollo de un cerebro de plástico y “cultural”.

En conjunto, nuestros resultados indican que el desarrollo del cerebro en los seres humanos y en los chimpancés se caracteriza por un largo periodo de sinaptogénesis cortical y un retardo en la maduración de ramificaciones dendríticas en las neuronas piramidales de la corteza prefrontal. Estos resultados sugieren que varias características claves de la ontogenia del cerebro humano para el mejoramiento de la plasticidad en el desarrollo surgieron antes de la divergencia del chimpancé y los linajes humanos. Además de estas similitudes compartidas del desarrollo postnatal temprano, fases posteriores de maduración neocortical humana parecen estar más evolutivamente modificadas y ser distintas que en los chimpancés, lo que implica una mielinización prolongada que continúa hasta la edad adulta temprana (Miller, et al. 2012). Cuando se combina con cambios en la organización social humana, la plasticidad del desarrollo prolongada y el cambio hacia el retardo en el desarrollo de la corteza prefrontal presente en antepasados homínidos, pudo haber incrementado un potencial de aprendizaje para las funciones de orden superior socio-cognitivas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Especímenes. Se obtuvieron muestras de cerebro fijados en formalina del hemisferio izquierdo de 17 chimpancés comunes (*Pan troglodytes*) (gama de edad: 0–41 años) y un caso donde sólo estuvo disponible el hemisferio derecho (5.3 años de edad). Los chimpancés fueron ubicados según las pautas de Cuidado Animal y del Comité de Uso de cada institución y murieron por razones ajenas a este estudio. Dentro de las 14 horas a partir de la muerte de cada individuo, se retiró el cerebro y se sumergió en 10% de formalina (vol/vol). Tras un periodo variable de fijación, se transfirieron los cerebros a 0.1 M PBS con solución de 0.1 por ciento de azida de sodio y se almacenaron a 4 °C. Se disecaron bloques de tejido de las cortezas prefrontal (área 10), motora primaria (área 4) y somatosensorial primaria (área 3b) y de la superficie lateral de la corteza preestriada (área 18) y se utilizaron para inmunohistoquímica contra proteína sinaptofisina, impregnación rápida de Golgi y cuantificación de sinapsis usando microscopía electrónica. Se eligieron estas regiones para que fueran consistentes con estudios previos en chimpancés adultos y seres humanos. En la tabla S1 se resume un desglose de las edades y tamaños de muestra utilizados en cada procedimiento. Debido a que los chimpancés alcanzan la madurez sexual alrededor de 10 a 13 años (hembras) y 12-15 años (varones), se consideraron como subadultos a los individuos que llegaban a la edad de 10 años, como juveniles a los de 5 años y como infantiles a los de 0 a 2 años.

Inmunohistoquímica para sinaptofisina y cuantificación estereológica. Se usaron todos los 18 individuos para análisis de inmunohistoquímica (gama de edad: 0-41 años). Se tiñeron secciones flotantes de las regiones de interés con anticuerpos

policlonales de conejo IgG₁ contra sinaptofisina, la cual es una glicoproteína de membrana integral homo-oligomérica ácida aislada de las vesículas presinápticas (dilución 1:100, A0010; DakoCytomation). Previamente a la inmunotinción, se enjuagaron secciones en PBS y se pretrataron para recuperación de antígeno mediante incubación en 10 mM de tampón de citrato de sodio (pH 3.5) a 37 °C en un horno durante 30 minutos. Se enjuagaron las secciones y se sumergieron en una solución de peróxido de hidrógeno de 0.75% en 75% de metanol para eliminar la actividad de la peroxidasa endógena, luego se incubaron en antisuero primario diluido en PBS con suero normal de cabra de 2% y 0.1% de Triton X-100 por ~24 hrs. en un rotador a 4 °C. Después de enjuagarse en PBS, las secciones se incubaron en biotilado anti-conejo IgG (dilución 1:200, BA-2000; Vector Laboratories) y se procesaron con el método avidina-biotina-peroxidasa usando un kit de Vectastain Elite ABC (pk-6100; Vector Laboratories). Las secciones se enjuagaron otra vez en PBS, seguido de un enjuague en tampón de acetato de sodio. Se reveló la inmunorreactividad con 3,3'-diaminobenzidina y mejora de níquel según una modificación de los métodos descritos anteriormente (Shu, Ju y Fan, 1988; Van der Gucht, Vandesande y Arckens, 2001). Se confirmó la especificidad de la reacción mediante el procesamiento de secciones de control negativas como se describe, excluyendo el anticuerpo primario. No se observó inmunotinción en las secciones de control. Se llevó a cabo la cuantificación de la densidad numérica de puntos sinaptofisina-inmunorreactiva usando el software StereoInvestigator (v9; MBF Bioscience). Comenzando en un punto de partida al azar, se eligieron tres secciones separadas es espacio equidistante para análisis estereológico. Para cuantificar la densidad de puntos sinaptofisina-inmunorreactiva, se perfiló el área que comprende la corteza, que abarca las capas I a VI de cada región de interés en una ampliación baja y se segmentó mediante un conjunto de marcos óptico disectores (3 x 3 µm) con un tamaño de la cuadrícula de cuadrados de exploración que oscilan entre los 400 x 400 µm y 700 x 700 µm. El análisis de disector se realizó bajo iluminación Koehler usando un objetivo de aceite de 100 (Zeiss Plan-Apochromat, N.A. 1.4). El grosor del disector óptico se estableció en 1 µm, con un 1-µm de zona de protección en la parte superior de la sección. Todas las densidades numéricas de puntos sinápticos que se derivaron de estas cuentas disectoras ópticas se corrigieron mediante el grosor promedio ponderado por el número de la sección como se describió anteriormente (Sherwood, et al. 2007). Todos los conteos de las sinapsis se llevaron a cabo de forma ciega para la región de interés y edad del espécimen. Se analizaron los datos ajustando los modelos de regresión cúbicos a las cuentas de sinapsis de cada una de las cuatro regiones por separado usando polinomios estandarizados en el software R (R Development Core Team, 2010). Se logró una prueba de similitudes en el polinomio cúbico a las regiones de interés utilizando un modelo de mínimos cuadrados generalizados y un modelo lineal mixto. Los resultados se confrontaron con la edad (0–10 años), donde los individuos mayores de 11 años se agruparon junto con adultos con el fin de enfatizar los cambios durante el crecimiento (Fig. 1).

Cuentas ME de densidad sináptica. Se postfijaron secciones de cuatro individuos (0 años, $n = 1$; 2 años, $n = 1$, 6 años, $n = 1$; edad 11, $n = 1$) que contenía las regiones de interés (1% OsO₄) y se tiñeron con 1% de acetato de uranilo. Después de incrustarse en Epon, se recogieron las secciones ultrafinas en las rejillas de malla de cobre. Luego se midió la cuantificación de la densidad de sinapsis en imágenes digitales obtenidas en una transmisión ME de 1200EX JEOL JEM con un aumento de 40,000X. Se eligieron campos de muestreo mediante el método de muestreo al azar y se calculó el número de sinapsis por unidad de volumen a través de la siguiente fórmula: $N_V = N_A/d$, donde N_V es el número de sinapsis por unidad de volumen, N_A es el número de uniones sinápticas por unidad de superficie de un micrográfico de electrón, y d es la longitud media de las densidades de las uniones sinápticas (Colonnier y Beaulieu, 1985). Se analizaron cien imágenes de cada área cortical. Se obtuvieron también las medidas de longitud de sinapsis de las 50 a 130 sinapsis elegidas al azar en cada conjunto de micrográficos para una región cortical individual. Los criterios para la identificación de sinapsis incluían la presencia de una densidad postsináptica, vesículas sinápticas en las membranas presinápticas terminales y membranas de oposición entre las terminales pre- y postsinápticas. Una sinapsis se marcaba sólo si la unión sináptica era evidente, y por lo menos dos vesículas sinápticas se podían ver en el componente presináptico de la sinapsis. Para las medidas de interreliabilidad ver el *Texto IA*.

Tinción rápida de Golgi. Se tiñeron bloques adyacentes (3 a 5 mm de espesor) de 14 individuos con una técnica de Golgi rápida modificada (Scheibel y Scheibel, 1978) para cuantificación de la morfología neuronal. Sin embargo, sólo siete (rango 0-9 años de edad) rindieron una tinción completa de neurona que cumplieron con los criterios de rastreo y cuantificación (véase abajo). Los bloques se seccionaron en un Vibratome a 120 μm , se montaron, cubrieron y conservaron a 4°C. Se realizaron análisis morfológicos de complejidad dendrítica en 10 neuronas por región ($n = 280$). Los criterios para selección de neurona requerían que las neuronas fueran relativamente aisladas y sin obstrucciones, situadas en el centro de la sección y completas como fuera posible. Se tomaron muestras de las neuronas de la capa V, a una profundidad similar en todas las regiones: zona 3b, $1,314 \pm 733 \mu\text{m}$; zona 4, $1,040 \pm 548 \mu\text{m}$; zona 18, $1,062 \pm 468 \mu\text{m}$; y zona 10 $\pm 1,151 \text{ } 603 \mu\text{m}$.

Las neuronas que cumplieron con los criterios se rastrearon utilizando un fotomicroscopio Zeiss Axioplan 2 (Zeiss) equipado con una platina motorizada Ludl XY (Ludl Electronics), un codificador de eje-z Heidenhain y una cámara de video de color Optronics MicroFire (Optronics) acoplada a una estación de trabajo Dell PC ejecutando el software Neurolucida (MBF Bioscience). Se realizaron los rastreos bajo iluminación Koehler usando un objetivo seco de 40X (Zeiss Plan-Apochromat, N.A. 0.75) e implicó seguir dendritas en toda su longitud en el plano z y marcar manualmente las espinas visibles. Una vez que el rastreo se completó, se cuantificó la morfología neuronal en NeuroExplorer (MBF Bioscience), según las siguientes medidas de morfología dendrítica, obtenidas de la Ref. 31: (i) LDT, la suma de las longitudes individuales de todos los segmentos dendríticos; (ii) CSD, el número de todos los segmentos dendrí-

ticos; (iii) LSM, que es esencialmente LDT/CSD; (iv) NED, el número de todas las espinas marcadas en el árbol dendrítico; y (v) DED, el número de espinas por micrómetro de longitud dendrítica. También se registró la superficie transversal del cuerpo de la célula. Para cada variable de morfología dendrítica se tomaron medidas para las dendritas basilares y apicales. Sin embargo, debido a que las dendritas apicales eran a menudo incompletas por seccionamiento, las comparaciones cuantitativas de longitud dendrítica y número de la columna vertebral a través de regiones corticales se limitaron a las dendritas basilares. Todos los rastreos se realizaron de forma ciega para las regiones de interés por C.D.S. y S.B., quienes fueron normalizadas con otro evaluador (A.L.B.) y revisado por C.C.S. La confiabilidad intra- e inter-evaluador de las medidas se determinó en buena concordancia (véase el *Texto IA* para más detalles).

Debido al pequeño tamaño en la categoría juvenil y subadulto, los análisis estadísticos se realizaron solamente en el grupo que incluye a los recién nacidos y los infantes; los datos de los juveniles y subadultos se ilustran como puntos individuales (Fig. 4). Para analizar las diferencias regionales en complejidad dendrítica, utilizamos un diseño ANOVA anidado (IBM SPSS 18.0), en el que cada neurona se anidaba dentro de la región (áreas 3b, 4, 10, 18), que era anidada dentro de cerebros individuales. Los datos para cada variable de interés (zona de soma, LDT, CSD, LSM, NED, DED) se analizaron por separado. Luego se realizaron contrastes pares mediante una corrección de Bonferroni para comparaciones múltiples. Los datos para las comparaciones con los chimpancés adultos, como se muestra en la Fig. 4, se tomaron de un estudio anterior que utilizó el mismo procedimiento metodológico, e incluía siete individuos de 35 años.

AGRADECIMIENTOS. Agradecemos al Dr. Anastas Popratiloff, director del centro de microscopía y análisis de imagen en The George Washington University, por su asesoramiento y apoyo en la recolección de datos. Este trabajo fue financiado por la National Science Foundation Grants BCS-0515484, BCS-0549117, BCS-0824531 y DGE-0801634; la National Institutes of Health Grants NS-42867 y la James S. McDonnell Foundation Grants 22002078 y 220020293. Traducción de Israel Grande-García.

BIBLIOGRAFÍA

- Anderson, S. A., Classey, J. D., Condé, F., Lund, J. S. y Lewis, D. A. (1995), "Synchronous development of pyramidal neuron dendritic spines and parvalbumin-immunoreactive chandelier neuron axon terminals in layer III of monkey prefrontal cortex", *Neuroscience* 67(1): 7–22.
- Barton, R. A. y Capellini, I. (2011), "Maternal investment, life histories, and the costs of brain growth in mammals", *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 108(15): 6169–6174.
- Bianchi, S., et al. (2012), "Dendritic morphology of pyramidal neurons in the chimpanzee neocortex: Regional specializations and comparison to humans", *Cerebral Cortex* 10.1093/cercor/bhs239.
- Bloss, E. B., et al. (2011), "Evidence for reduced experience-dependent dendritic spine plasticity in the aging prefrontal cortex", *Journal of Neuroscience* 31(21): 7831–7839.
- Bose, M., et al. (2010), "Effect of the environment on the dendritic morphology of the rat auditory cortex", *Synapse* 64(2): 97–110.
- Boyd, R., Richerson, P. J. y Henrich, J. (2011), "The cultural niche: Why social learning is essential for human adaptation", *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 108(Supl. 2): 10918–10925.
- Burkart, J. M., Hrdy, S. B. y Van Schaik, C. P. (2009), "Cooperative breeding and human cognitive evolution", *Evolutionary Anthropology* 18(5): 175–186.
- Buttelmann, D., Carpenter, M., Call, J. y Tomasello, M. (2007), "Enculturated chimpanzees imitate rationally", *Developmental Science* 10(4): F31–F38.
- Cáceres, M., Suwyn, C., Maddox, M., Thomas, J. W. y Preuss, T. M. (2007), "Increased cortical expression of two synaptogenic thrombospondins in human brain evolution", *Cerebral Cortex* 17(10): 2312–2321.
- Carpenter, M. y Tomasello, M. (2006), "Joint attention and imitative learning in children, chimpanzees, and enculturated chimpanzees", *Social Development* 4(3): 217–237.
- Chugani, H. T., Phelps, M. E. y Mazziotta, J. C. (1987), "Positron emission tomography study of human brain functional development", *Annals of Neurology* 22(4): 487–497.
- Colonnier, M. y Beaulieu, C. (1985), "An empirical assessment of stereological formulae applied to the counting of synaptic disks in the cerebral cortex", *Journal of Comparative Neurology* 231(2): 175–179.
- Deacon, T. W. (1997), *The Symbolic Species: The Coevolution of Language and the Brain*. Nueva York: WW Norton & Company.
- Dennis, M. Y., et al. (2012), "Evolution of human-specific neural SRGAP2 genes by incomplete segmental duplication", *Cell* 149(4): 912–922.
- Derrien, T., et al. (2012), "The GENCODE v7 catalog of human long noncoding RNAs: Analysis of their gene structure, evolution, and expression", *Genome Research* 22(9): 1775–1789.
- DeSilva, J. M. (2011), "A shift toward birthing relatively large infants early in human evolution", *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 108(3): 1022–1027.
- DeSilva, J. M. y Lesnik, J. J. (2008), "Brain size at birth throughout human evolution: A new method for estimating neonatal brain size in hominins", *Journal of Human Evolution* 55(6): 1064–1074.
- Diamond, M. C. y Connor, J. R. J., Jr. (1982), "Plasticity of the aging cerebral cortex", *Experimental Brain Research* (Supl. 5): 36–44.

- Elston, G. N., Benavides-Piccione, R. y DeFelipe, J. (2001), "The pyramidal cell in cognition: A comparative study in human and monkey", *Journal of Neuroscience* 21(17): RC163.
- Elston, G. N., Oga, T. y Fujita, I. (2009), "Spinogenesis and pruning scales across functional hierarchies", *Journal of Neuroscience* 29(10): 3271–3275.
- Fu X, et al. (2011), "Rapid metabolic evolution in human prefrontal cortex", *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 108(15): 6181–6186.
- Furlong, E. E., Boose, K. J. y Boysen, S. T. (2008), "Raking it in: The impact of enculturation on chimpanzee tool use", *Animal Cognition* 11(1): 83–97.
- Giedd, J. N., et al. (1999), "Brain development during childhood and adolescence: A longitudinal MRI study", *Nature Neuroscience* 2(10): 861–863.
- Gogtay, N., et al. (2004), "Dynamic mapping of human cortical development during childhood through early adulthood", *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 101(21): 8174–8179.
- Goyal, M. S. y Raichle, M. E. (2013), "Gene expression-based modeling of human cortical synaptic density", *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 110(16): 6571–6576.
- Grutzendler, J., Kasthuri, N. y Gan, W.-B. (2002), "Long-term dendritic spine stability in the adult cortex", *Nature* 420(6917): 812–816.
- Hill, J., et al. (2010), "Similar patterns of cortical expansion during human development and evolution", *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 107(29): 13135–13140.
- Huttenlocher, P. R. y Dabholkar, A. S. (1997), "Regional differences in synaptogenesis in human cerebral cortex", *Journal of Comparative Neurology* 387(2): 167–178.
- Jacobs, B. y Scheibel, A. B. (1993), "A quantitative dendritic analysis of Wernicke's area in humans. I. Lifespan changes". *Journal of Comparative Neurology* 327(1): 83–96.
- Jacobs, B., Driscoll, L. y Schall, M. (1997), "Life-span dendritic and spine changes in areas 10 and 18 of human cortex: A quantitative Golgi study", *Journal of Comparative Neurology* 386(4): 661–680.
- Jacobs, B., et al. (2001), "Regional dendritic and spine variation in human cerebral cortex: A quantitative Golgi study", *Cerebral Cortex* 11(6): 558–571.
- Kabaso, D., Coskren, P. J., Henry, B. L., Hof, P. R. y Wearne, S. L. (2009), "The electrotonic structure of pyramidal neurons contributing to prefrontal cortical circuits in macaque monkeys is significantly altered in aging", *Cerebral Cortex* 19(10): 2248–2268.
- Koenderink, M. J. y Uylings, H. B. (1995), "Post-natal maturation of layer V pyramidal neurons in the human prefrontal cortex. A quantitative Golgi analysis", *Brain Research* 678(1–2): 233–243.
- Leigh, S. R. (2004), "Brain growth, life history, and cognition in primate and human evolution", *American Journal of Primatology* 62(3): 139–164.
- Liu, X., et al. (2012), "Extension of cortical synaptic development distinguishes humans from chimpanzees and macaques", *Genome Research* 22(4): 611–622.
- Lonsdorf, E. V. (2006), "What is the role of mothers in the acquisition of termite-fishing behaviors in wild chimpanzees (*Pan troglodytes schweinfurthii*)?", *Animal Cognition* 9(1): 36–46.
- Lonsdorf, E. V. y Bonnie, K. E. (2010), "Opportunities and constraints when studying social learning: Developmental approaches and social factors", *Learning and Behavior* 38(3): 195–205.

- Lonsford, E. V. (2006), "What is the role of mothers in the acquisition of termite-fishing behaviors in wild chimpanzees (*Pan troglodytes schweinfurthii*)?", *Animal Cognition* 9(1): 36–46.
- Lyn, H., Russell, J. L. y Hopkins, W. D. (2010), "The impact of environment on the comprehension of declarative communication in apes", *Psychological Science* 21(3): 360–365.
- McFarlin, S. C., et al. (2012), "Early brain growth cessation in wild virunga mountain gorillas (*Gorilla beringei beringei*)", *American Journal of Primatology* 75(5): 450–463.
- Miller, D. J., et al. (2012), "Prolonged myelination in human neocortical evolution", *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 109(41): 16480–16485.
- Moser, M. B., Trommald, M. y Andersen, P. (1994), "An increase in dendritic spine density on hippocampal CA1 pyramidal cells following spatial learning in adult rats suggests the formation of new synapses", *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 91(26): 12673–12675.
- Petanjek, Z., et al. (2011), "Extraordinary neoteny of synaptic spines in the human prefrontal cortex", *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 108(32): 13281–13286.
- Pollard, K. S., et al. (2006), "An RNA gene expressed during cortical development evolved rapidly in humans", *Nature* 443(7108): 167–172.
- R Development Core Team (2010), *R: A Language and Environment for Statistical Computing*. Vienna: R Foundation for Statistical Computing.
- Radley, J. J., et al. (2006), "Repeated stress induces dendritic spine loss in the rat medial prefrontal cortex", *Cerebral Cortex* 16(3): 313–320.
- Rakic, P., Bourgeois, J. P., Eckenhoff, M. F., Zecevic, N. y Goldman-Rakic, P. S. (1986), "Concurrent overproduction of synapses in diverse regions of the primate cerebral cortex", *Science* 232(4747): 232–235.
- Robson, S. L. y Wood, B. (2008), "Hominin life history: Reconstruction and evolution", *Journal of Anatomy* 212(4): 394–425.
- Russell, J. L., Lyn, H., Schaeffer, J. A. y Hopkins, W. D. (2011), "The role of socio-communicative rearing environments in the development of social and physical cognition in apes" *Developmental Science* 14(6): 1459–1470.
- Sacher, G. A. y Staffeldt, E. F. (1974), "Relation of gestation time to brain weight for placental mammals: Implications for the theory of vertebrate growth. *The American Naturalist* 108(963): 593–615.
- Sakai, T., et al. (2011), "Differential prefrontal white matter development in chimpanzees and humans", *Current Biology* 21(16): 1397–1402.
- Sakai, T., et al. (2013), "Developmental patterns of chimpanzee cerebral tissues provide important clues for understanding the remarkable enlargement of the human brain", *Proceeding of the Royal Society B: Biological Sciences* 280(1753): 20122398.
- Scheibel, M. E. y Scheibel, A. B. (1978), "The method of Golgi", in R. T. Robertson (ed.), *Neuroanatomical Research Techniques*. Nueva York: Academic, pp 89–114.
- Semendeferi, K., Armstrong, E., Schleicher, A., Zilles, K. y Van Hoesen, G. W. (2001), "Prefrontal cortex in humans and apes: A comparative study of area 10", *American Journal of Physical Anthropology* 114(3): 224–241.
- Semendeferi, K., et al. (2011), "Spatial organization of neurons in the frontal pole sets humans apart from great apes", *Cerebral Cortex* 21(7): 1485–1497.
- Shaw, P., et al. (2008), "Neurodevelopmental trajectories of the human cerebral cortex", *Journal of Neuroscience* 28(14):3586–3594.

- Sherwood, C. C., Bauernfeind, A. L., Bianchi, S., Raghanti, M. A. y Hof, P. R. (2012), "Human brain evolution writ large and small", in M. A. Hofman y D. Falk (eds.), *Progress in Brain Research*. Amsterdam: Elsevier, pp 237–254.
- Sherwood, C. C., Wahl, E., Erwin, J. M., Hof, P. R. y Hopkins, W. D. (2007), "Histological asymmetries of primary motor cortex predict handedness in chimpanzees (*Pan troglodytes*)", *Journal of Comparative Neurology* 503(4):525–537.
- Shu, S. Y., Ju, G. y Fan, L. Z. (1988), "The glucose oxidase-DAB-nickel method in peroxidase histochemistry of the nervous system", *Neuroscience Letters* 85(2): 169–171.
- Sin, W. C., Haas, K., Ruthazer, E. S. y Cline, H. T. (2002), "Dendrite growth increased by visual activity requires NMDA receptor and Rho GTPases", *Nature* 419(6906): 475–480.
- Spocter, M. A., et al. (2012), "Neuropil distribution in the cerebral cortex differs between humans and chimpanzees", *Journal of Comparative Neurology* 520(13): 2917–2929.
- Spruston, N. (2008), "Pyramidal neurons: Dendritic structure and synaptic integration", *Nature Reviews Neuroscience* 9(3): 206–221.
- Travis, K., Ford, K. y Jacobs, B. (2005), "Regional dendritic variation in neonatal human cortex: A quantitative Golgi study", *Developmental Neuroscience* 27(5): 277–287.
- Van der Gucht, E., Vandesande, F. y Arckens, L. (2001), "Neurofilament protein: A selective marker for the architectonic parcellation of the visual cortex in adult cat brain", *Journal of Comparative Neurology* 441(4): 345–368.
- van Praag, H., Kempermann, G. y Gage, F. H. (2000), "Neural consequences of environmental enrichment", *Nature Reviews Neuroscience* 1(3): 191–198.
- Whiten, A., et al. (1999), "Cultures in chimpanzees", *Nature* 399(6737): 682–685.
- Yadav, A., et al. (2012), "Morphologic evidence for spatially clustered spines in apical dendrites of monkey neocortical pyramidal cells". *Journal of Comparative Neurology* 520(13): 2888–2902.
- Yang, G., Pan, F. y Gan, W. B. (2009), "Stably maintained dendritic spines are associated with lifelong memories", *Nature* 462(7275): 920–924.
- Yuste, R. y Tank, D. W. (1996), "Dendritic integration in mammalian neurons, a century after Cajal", *Neuron* 16(4): 701–716.