



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Instituto de Investigaciones Biomédicas
Facultad de Medicina

EVALUACIÓN DE LA PLASTICIDAD PERIFÉRICA EN RATAS CIEGAS

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
Licenciado en Investigación Biomédica Básica
P R E S E N T A
Eduardo Martínez Martínez

Director de Tesis: Dr. Gabriel Gutiérrez Ospina



Ciudad Universitaria, México, D.F.

Mayo de 2004



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Esta tesis se realizó bajo la dirección del Dr. Gabriel Gutiérrez Ospina en el laboratorio A-107 del Departamento de Biología Celular y Fisiología del Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM:

Para Alejandro Zentella

“... Two years passed in this manner, during which I paid no visit to Geneva, but was engaged, heart and soul, in the pursuit of some discoveries which I hoped to make. *None but those who have experienced them can conceive of the enticements of science.* In other studies you go as far as others have gone before you, and there is nothing more to know; but in a scientific pursuit there is continual food for discovery and wonder.”

Mary Shelly, *Frankenstein*, capítulo 4

Índice

Resumen	
Summary	
Introducción	6
Antecedentes	
1. Reorganización de la corteza somatosensorial primaria inducida por la pérdida temprana de la visión características y posibles mecanismos	7
1.1 Actividad neuronal y reorganización cortical	7
1.2 Densidad de inervación periférica y reorganización cortical	10
2. Vía somatosensorial del nervio del trigémino	11
2.1 Vibrisas	12
2.2 Ganglio del trigémino	15
2.3 Relevos centrales de la vía somatosensorial del nervio del trigémino	15
Justificación	17
Hipótesis	17
Objetivos	
Objetivos Generales	17
Objetivos Particulares	18
Materiales y Métodos	
Animales	19
Enucleación	
Determinación de la longitud de las vibrisas	19
Evaluación de la tasa de crecimiento de los bigotes	20
Estimación de la actividad de la enzima citocromo oxidasa en neuronas del ganglio del trigémino	21
Cuantificación del número de células de Merkel	22
Semicuantificación del contenido de neurotrofina-3	23
Evaluación cualitativa de la histología de la piel	24

Resultados

No existen diferencias significativas en el peso corporal entre ratas control y ciegas a lo largo del desarrollo	25
La expansión cortical en ratas albinas enceguecidas al nacimiento no se acompaña de cambios en la dinámica de crecimiento del bigote	25
La actividad metabólica de las neuronas del ganglio del trigémino fue similar entre ratas control y enceguecidas al nacimiento	30
La densidad de inervación decrece en ratas ciegas durante la primera semana de vida, pero aumenta hacia la edad adulta	32
El contenido de neurotrofina-3 en los cachetes de ratas ciegas disminuye durante los primeros días de vida, pero aumenta en la etapa adulta.	36
La epidermis del cachete es más gruesa en ratas ciegas	39

Discusión

La expansión de la representación corporal de S1 en ratas ciegas procede independientemente de factores periféricos	41
En las ratas ciegas se modifican las relaciones tróficas periféricas	43
Dimorfismo sexual en la reorganización periférica tras la remoción de los ojos	45
Consideraciones sobre la reorganización periférica en la ceguera	47

Agradecimientos	49
-----------------	----

Bibliografía	49
--------------	----

Resumen

En los mamíferos, la pérdida de la visión conduce a una reorganización anatómica y funcional de la corteza cerebral conocida con el nombre de plasticidad sensoriomodal. Durante esta reorganización, la corteza visual es reactivada por estímulos táctiles y la corteza somatosensorial primaria (S1) expande su área relativa. Los mecanismos que subyacen a éste tipo de plasticidad aún son poco claros. Se ha propuesto, sin embargo, que el aumento del uso de los receptores táctiles y de la densidad de inervación periférica promueven la organización y plasticidad cerebral. En el presente trabajo encontramos que la expansión cortical en ratas albinas y ciegas no se acompaña ni de vibrisas más largas ni de un aumento en la actividad relativa de la citocromo oxidasa, ambos parámetros considerados como marcadores de actividad neuronal asociada al uso. Por otro lado, evaluar la densidad de inervación periférica es importante porque se ha sugerido que los ciegos son mejores en tareas de discriminación táctil y auditiva, pero nunca se han documentado cambios periféricos que expliquen esta supuesta mejoría. En este sentido, encontramos que el contenido de neurotrofina-3 en el cachete de ratas ciegas disminuye en los primeros días de vida y permanece alto durante la vida adulta. Estas variaciones del contenido de NT-3 correlacionan con un engrosamiento de la epidermis del cachete; así como, un menor número de células de Merkel, marcador indirecto de la densidad de inervación, durante la primera semana de vida y un mayor número de estas células hacia la edad adulta. En general las modificaciones de las interacciones tróficas descritas en este trabajo pueden constituir la base neurobiológica formal de las diferencias en discriminación táctil que tan frecuentemente son referidas.

Summary

In mammals, blindness of early onset induces a reorganization of the primary sensory areas of the cerebral cortex that is called cross-modal plasticity. On one hand, the area formerly devoted to process visual information gains the ability to respond to tactile and auditory stimuli. On the other, cortical areas processing tactile and auditory information expand. A very illustrative example of the later sort of changes occurs in the primary somatosensory cortex (S1) of neonatally enucleated rats. Previous studies have shown that cortical barrels increase their cross-sectional area following eye removal at birth. The mechanisms by which such an expansion occurs are yet to be defined. However it has been proposed that the amount of cortical territory a sensory system assumes is highly dependent on the use of sensory receptor arrays and peripheral innervation. In this work we found that barrel expansion is not accompanied by neither large vibrissae nor increased activity levels of cytochrome oxidase, both indexes of neuronal activity. It has been long claimed that blind individuals possess enhanced tactile discrimination. Besides modifications in the anatomy and physiology of cortical circuitry, it is unknown if enhancement of tactile discrimination abilities in the blind might also result from changes in the structure and/or biophysics of the peripheral mechanosensory apparatus. In this regard, we found that neurotrophin-3 levels were diminished during the first week of life and augmented during adulthood. These changes of NT-3 correlate with a thickening of epidermis as well as a reduced number of Merkel cells in the vibrissae of enucleated rats during the first postnatal week. In contrast, an increased number of Merkel cells was found in the vibrissae of adult enucleated rats. Overall, the modifications of trophic interactions may take part in the enhancement of tactile abilities in blind.

Introducción

En los últimos años se ha mostrado que el sistema nervioso es capaz de reorganizarse, a lo largo de la vida, en respuesta a modificaciones del flujo de información derivado de los cambios internos del organismo y de su interacción con el medio externo. Esta reorganización, también denominada plasticidad, involucra desde eventos moleculares hasta modificaciones del estado funcional de las redes neuronales. Tal es el caso de la reorganización del cerebro de los mamíferos tras la pérdida del sentido de la vista. En los cerebros de individuos ciegos, la corteza visual reduce su tamaño relativo y es reactivada por estímulos somestésicos¹⁻⁸. Además, las áreas cerebrales que procesan información auditiva y somestésica (i.e. táctil) abarcan mayor área cortical.

Si bien no hay duda acerca de la naturaleza dinámica de la estructura y función del sistema nervioso, no existe un consenso sobre los factores que determinan la reorganización cortical durante los procesos plásticos. Se ha propuesto, sin embargo, que: 1) los elementos celulares de la periferia corporal proveen de factores moduladores que participan en la organización y promueven la reorganización cerebral^{9,10}; 2) la densidad de inervación periférica determina el tamaño de las representaciones corporales centrales; y 3) estos cambios pudieran resultar de un aumento en la actividad neuronal asociada al uso¹¹⁻¹³. Para el caso de los individuos ciegos aún no se ha esclarecido si estos elementos participan durante la reorganización cortical. Por esta razón, en este trabajo evaluamos algunos parámetros periféricos, tanto anatómicos como bioquímicos, que podrían ser, por un lado, factores inductores de la expansión de la corteza somatosensorial en las ratas ciegas; y por otro, el sustrato de las habilidades diferentes en los ciegos.

Antecedentes

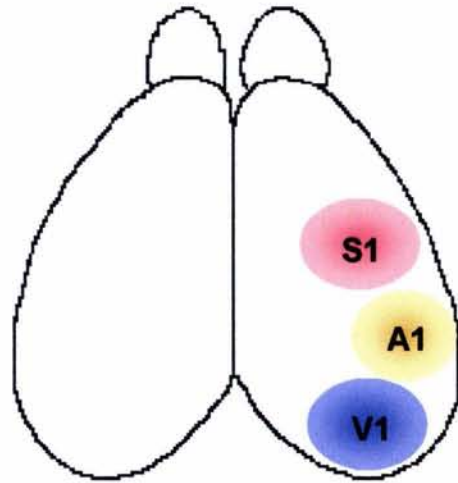
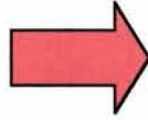
Reorganización de la corteza somatosensorial primaria inducida por la pérdida temprana de la visión: características y posibles mecanismos

En los mamíferos, la pérdida de la visión conduce a una reorganización anatómica y funcional de la corteza cerebral conocida con el nombre de plasticidad sensoriomodal (fig. 1). Durante esta reorganización, la corteza visual es reactivada por estímulos táctiles y la corteza somatosensorial primaria (S1) expande su área relativa^{1-8,11-14}. Entre los factores que se han mencionado como inductores de la plasticidad intramodal en S1 están el aumento de la actividad neuronal asociada al uso y/o el aumento de la densidad de inervación en la periferia sensorial^{12,13,15}.

Actividad neuronal y reorganización cortical

Por años, se ha sostenido que la actividad neuronal asociada al uso promueve el aumento del número de conexiones neuronales y a la plasticidad cerebral. Con base en esta idea y con la noción, mayoritariamente anecdótica, de que los individuos ciegos desarrollan obligadamente habilidades táctiles y auditivas superiores, se ha propuesto que el incremento del uso relativo del sentido del tacto induce el reacomodo anatómico y funcional de S1 en individuos ciegos^{5-8,11-13,16-21}. A pesar de la aparente congruencia de este argumento, evidencia obtenida en modelos de plasticidad intramodal en respuesta a la privación parcial de la vista y de algunos mecanorreceptores, sugiere que la participación de la actividad neuronal asociada al uso como factor promotor de los procesos de reorganización cortical es limitada (ver la compilación editada por Yuste y Sur (1999)²²; además, para consideraciones referentes a la plasticidad uso-dependiente en los animales adultos ver²³⁻²⁹). Con el objeto de ilustrar este punto, en el sistema somatosensorial de los roedores se ha mostrado que la amputación intrauterina de la extremidad anterior en fetos de rata conduce a una expansión de la representación cortical de la extremidad posterior, sólo si la amputación se realiza antes del día 17 de

a



b

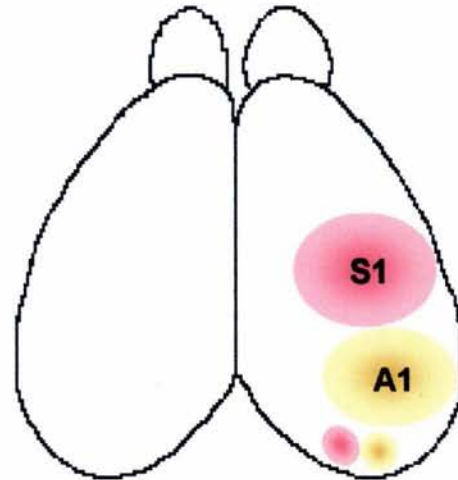


Figura 1. Reorganización de la corteza cerebral en ratas ciegas. Esquemas que ilustran la organización de las áreas sensoriales primarias somatosensorial (S1), auditiva (A1) y visual (V1) en cerebros de ratas control (a) y enceguecidas al nacimiento (b). La pérdida de la visión conduce a una expansión de S1 y A1, acompañada de una reactivación del área "visual" por aferentes neuronales asociadas a las vías somatosensorial y auditiva. Los mecanismos celulares y moleculares que son responsables de promover y modular estos cambios son aún poco claros.

gestación³⁰. Esta observación argumenta contra la posibilidad de que la expansión de la representación cortical de la extremidad posterior resulte del incremento del uso de la misma por los fetos amputados. De manera similar, la cauterización selectiva de vibrisas sólo antes del día 6 posnatal resulta en la expansión de las áreas corticales que representan a las vibrisas intactas vecinas de aquellas cauterizadas³¹. Debido a que esta expansión ocurre durante los primeros días de vida, tiempo antes de que se presenten los movimientos voluntarios de las vibrisas³²⁻³⁴, y de que S1 sea activada de manera consistente en respuesta a la estimulación periférica^{35,36}, es improbable que los cambios en la organización cortical de los animales privados sean el resultado del uso incrementado de vibrisas intactas. Además, en el caso particular de las ratas enceguecidas al nacimiento se ha documentado que el grado de expansión de S1 a los 10 días posnatales (16%) es prácticamente idéntico al observado en ratas adultas (18%)³⁷. Lo anterior sugiere que la expansión de S1 se presenta dentro del periodo de formación del mapa corporal en S1 y antes de que el sistema sea activado sensorialmente³²⁻³⁶. Adicionalmente, se ha mostrado que tanto la actividad de la enzima citocromo oxidasa como la captura de glucosa radioactiva, ambos índices de actividad neuronal asociada con el uso de órganos sensoriales, son similares en S1 de las ratas control y ciegas, ya sean neonatas o adultas³⁸. Todos estos resultados sugieren que al menos a nivel central la actividad metabólica, y por inferencia la actividad eléctrica, de las neuronas no está promoviendo la expansión de la corteza somatosensorial primaria de las ratas ciegas.

A pesar de que las vibrisas son funcionales antes de que la corteza acabe de desarrollarse³⁵ y de que existe un gradiente de desarrollo en la vía del trigémino de la periferia al centro³⁹, no se ha evaluado el estado metabólico de las neuronas periféricas que inervan directamente a las vibrisas de ratas ciegas. Por eso, para saber si la actividad de neuronas periféricas asociada al uso promueve la reorganización cortical en ratas ciegas, decidimos evaluar dos parámetros periféricos relacionados con el uso de la vía del trigémino. Por un lado, exploramos si la longitud o el crecimiento de las vibrisas se alteran en ratas albinas y ciegas, puesto que se ha sugerido que el aumento en longitud de las vibrisas refleja que los

roedores ciegos las usan más^{5,12}. Por otro lado, estimamos la actividad de las neuronas del ganglio del trigémino mediante la técnica histoquímica para revelar la actividad de la enzima oxidativa citocromo oxidasa.

Densidad de inervación periférica y reorganización cortical

Algunos estudios sobre la organización de S1 han mostrado que existe una correlación entre la densidad de inervación de un segmento corporal y el tamaño de su correspondiente representación en S1⁴⁰⁻⁴³. En roedores, por ejemplo, las vibrisas con mayor densidad de inervación poseen las representaciones corticales más grandes⁴². En este sentido, dado que la representación cortical en roedores enceguecidos al nacimiento es de mayor tamaño que la misma representación en roedores control¹¹⁻¹⁴, cabe la posibilidad que dicha expansión resulte de un aumento de la densidad de inervación periférica (fig.2). Por consiguiente, se intentó documentar las posibles diferencias en la densidad de inervación en las vibrisas de ratas ciegas que pudieran explicar la expansión observada en S1, mediante la cuantificación del número de células de Merkel (ver Materiales y Métodos).

En los últimos veinticinco años, se ha documentado que la reorganización del sistema nervioso tanto a nivel central como periférico depende de la presencia de distintos factores. Entre estos, cabe destacar a una familia de proteínas denominadas neurotrofinas. Estas proteínas constituyen una familia conformada por el factor de crecimiento neuronal (NGF), la neurotrofina-3 (NT-3), el factor neuronal derivado del cerebro (BDNF) y la neurotrofina-4 (NT-4). Las neurotrofinas ejercen su efecto a través de la activación de una familia de receptores, denominados *trk*, que poseen un dominio intracelular que fosforila residuos de tirosina⁴⁴⁻⁴⁶. En la vía del nervio del trigémino las neurotrofinas, especialmente la NT-3, promueven la supervivencia de las neuronas sensoriales y el desarrollo de mecanorreceptores, y determinan el fenotipo sensorial de las neuronas ganglionares^{9,44,47-50}. Además, la densidad de inervación en las vibrisas y en la piel y el pelaje aledaños disminuye o aumenta, respectivamente, con la ausencia o el exceso de expresión de alguna de las neurotrofinas^{49,51-58}. Así, evaluamos el contenido de NT-3 en el cachete de ratas control y ciegas durante el desarrollo.

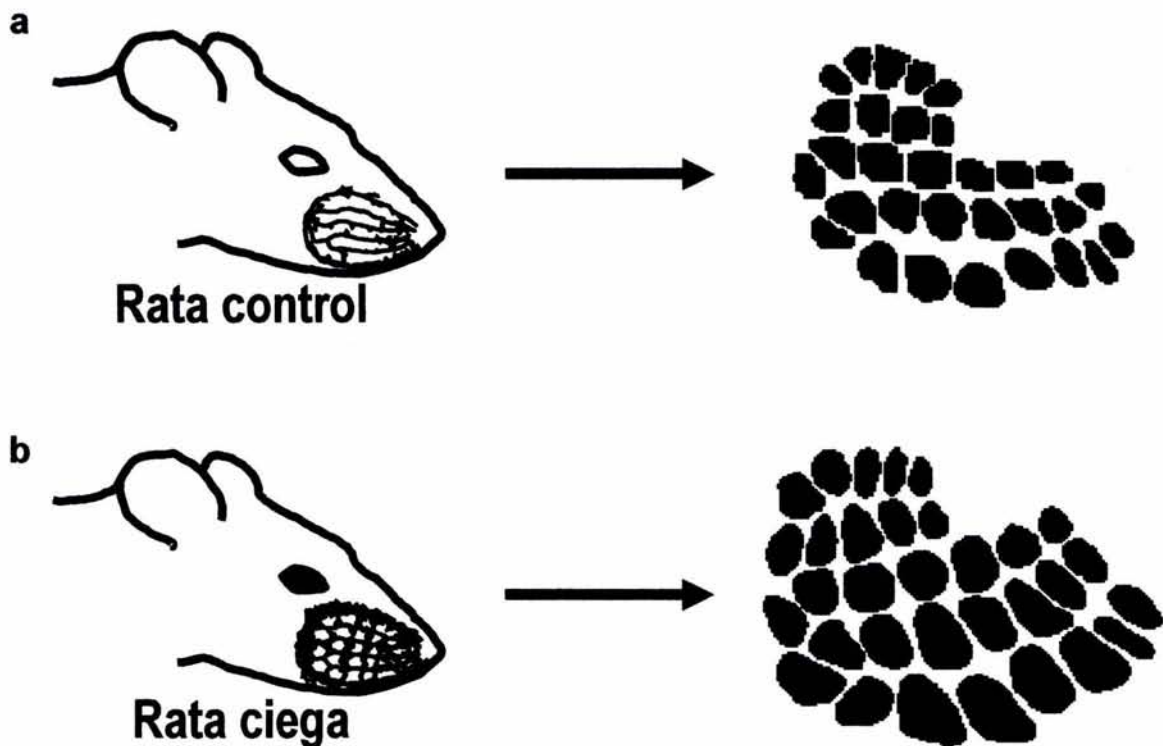


Figura 2. Papel de la densidad de inervación periférica sobre el tamaño de las representaciones corticales. Por años se ha sostenido que las representaciones corporales en la corteza cerebral dependen de la densidad de inervación periférica. Así, las vibrisas faciales de roedores de mayor tamaño que poseen las representaciones corticales más grandes, muestran una densidad de inervación mayor. Por eso, cabe la posibilidad que la expansión de la representación cortical de las vibrisas en ratas ciegas resulte de un aumento de la densidad de inervación

Vía somatosensorial del nervio del trigémino

Con el objeto de identificar los posibles factores y mecanismos que subyacen a la plasticidad sensoriomodal, requerimos de un sistema experimental donde se puedan ubicar consistentemente, y con relativa facilidad, los diferentes elementos neuronales participantes. La vía somatosensorial del nervio del trigémino de la rata reúne estas características, pues, a diferencia de otros sistemas sensoriales, podemos identificar exactamente la posición de los receptores somatosensoriales en las vibrisas de la rata y su correspondiente representación

como módulos neuronales en el tallo cerebral, el tálamo y la capa IV de la corteza somatosensorial (fig. 3). Por eso, la vía del trigémino ha sido utilizada como modelo para el estudio del desarrollo, reorganización y regeneración de las vías sensoriales⁵⁹.

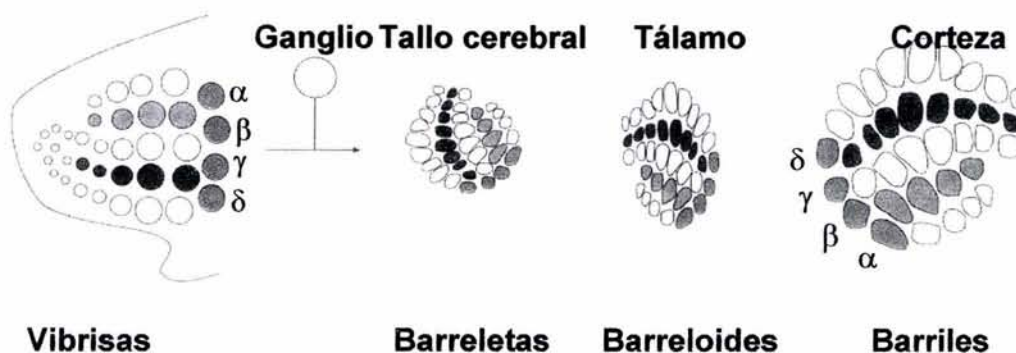


Figura 3. Esquema que ilustra la vía somatosensorial del trigémino. Las vibrisas en el cachete de la rata son inervadas por neuronas pseudounipolares localizadas en el ganglio del nervio del trigémino. Las vibrisas se representan a lo largo de la vía del trigémino por módulos neuronales que conservan la misma distribución anatómica que se observa en el cachete (observe α , β , γ y δ). Las neuronas del ganglio hacen sinápsis con neuronas en el tallo cerebral (barreletas). Las neuronas del tallo contactan a grupos neuronales específicos en el tálamo (barreloides). La capa IV de la corteza somatosensorial es inervada por las aferentes tálamo-corticales, dando lugar a los barriles.

Vibrisas

Los bigotes o vibrisas son los órganos táctiles más importantes en algunos grupos de mamíferos. En el cachete de la rata, las vibrisas están organizadas en cinco filas que incrementan su longitud en un gradiente dorso-caudal. El pelo de la vibrisa emana de una estructura en forma de huso que ha sido denominada como el complejo sinusal del folículo⁶⁰. Esta denominación reconoce que las vibrisas se

componen por un folículo de origen epidérmico y una cápsula de tejido conjuntivo de origen dérmico que da lugar a un seno sanguíneo que rodea al folículo (fig. 4).

El folículo tiene al centro dos capas concéntricas denominadas: vaina de la raíz interna, que está contigua al tallo del pelo; y a su alrededor, la vaina de la raíz externa que está rodeada por una membrana basal. A la mitad del folículo, la membrana basal es considerablemente gruesa y se le ha denominado la membrana vítrea. En el ápice del complejo sinusal del folículo, la epidermis es continua con el folículo y da lugar a una parte gruesa de tejido que se denomina collar epidérmico. La parte del folículo más distal a la piel constituye una estructura en forma de bulbo que contiene tejido dérmico denominada papila dérmica.

La cápsula alrededor del folículo, que da lugar a un seno venoso, se compone de una capa interna y una externa. La capa interna, denominada vaina mesenquimal, es de tejido conjuntivo laxo y recubre a la membrana vítrea. La capa externa está constituida por colágena de tipo denso y sella al seno tanto en el ápice del folículo como en la base de la papila dérmica. En el ápice del seno, la vaina mesenquimal se expande y forma el cuerpo cónico interno.

El seno venoso tiene dos subdivisiones: la mitad superior, conocida como el seno anular, tiene un lumen abierto y contiene una estructura anular que cuelga de la vaina mesenquimal. La mitad inferior del seno o seno cavernoso presenta un entramado de tejido conjuntivo a todo lo largo del lumen entre la cápsula y la vaina mesenquimal.

Tanto el folículo como la cápsula reciben inervación sensorial proveniente de la rama infraorbitaria de la división maxilar del nervio del trigémino⁶⁰⁻⁶². Cada folículo tiene dos fuentes principales de inervación denominadas de acuerdo a su localización relativa al folículo⁶⁰. El nervio superficial provee de axones mielinizados de mediano calibre al cuello y la boca del folículo. En el collar epidérmico existen terminales nerviosas que inervan a células de Merkel, y en disposición transversal al cuerpo cónico se localizan terminales nerviosas libres, de Ruffini y lanceoladas^{60,62-64}. Por su parte, el nervio profundo penetra la cápsula del folículo al nivel del seno cavernoso y provee de inervación al folículo y al seno. Al

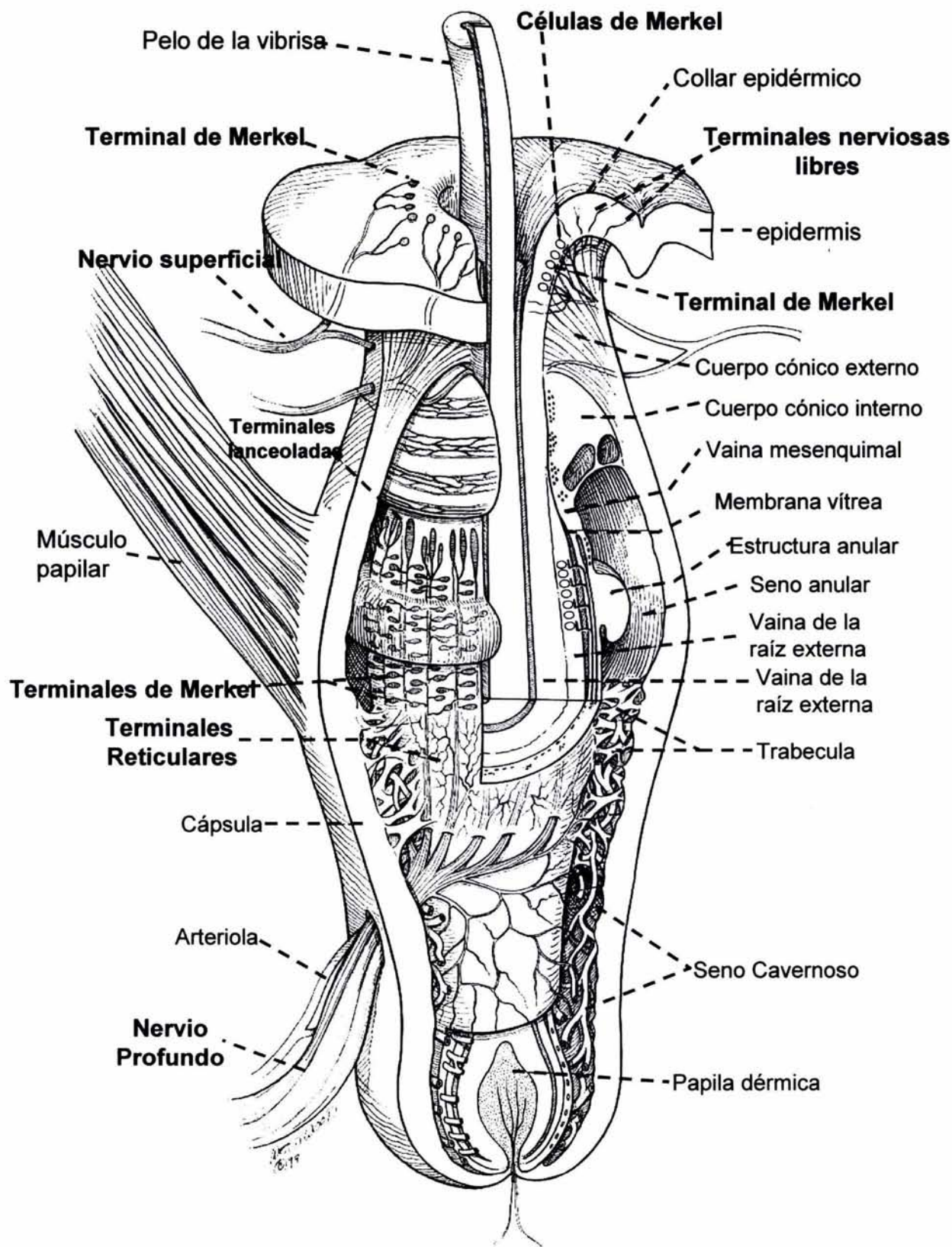


Figura 4. Dibujo esquemático de un corte longitudinal de una vibrisa de rata adulta. En el esquema de la vibrisa o complejo sinusal del folículo se indican los diferentes elementos estructurales que lo componen. El folículo es de origen epidérmico y consiste de la vaina radicular externa e interna. La membrana vítrea separa el folículo de los demás elementos que son de origen dérmico. El nervio superficial de la vibrisa inerva el tercio superior del complejo, mientras que el nervio profundo a los dos tercios inferiores.

nivel del seno anular, se localizan algunas terminales lanceoladas en la vaina mesenquimal, dispuestas en un arreglo semejante a una palizada; y en la vaina radicular externa, algunas terminales de Merkel. Finalmente, al nivel del seno cavernoso, se localizan terminales reticulares y espinosas en la membrana vítrea; terminales de Ruffini en la vaina mesenquimal; y axones pequeños mielinizados y axones delgados desmielinizados en la trabécula y lumen del seno cavernoso^{60,62-65}.

El pelaje entre las vibrisas y la piel del cachete también recibe inervación sensorial de la rama infraorbitaria del nervio del trigémino⁶⁶. Por otro lado, cada vibrisa esta envuelta por un músculo papilar. Estos músculos son inervados por el nervio facial y proveen de movimiento a las vibrisas durante la conducta exploratoria³².

Ganglio del trigémino

En la rata el ganglio del nervio del trigémino se localiza en la fosa media de la base del cráneo. Este ganglio es un cúmulo de aproximadamente 50,000 neuronas que inervan a los receptores sensoriales de la cara, a través de las divisiones oftálmica, maxilar o mandibular. Las neuronas de este ganglio son pseudounipolares y se clasifican con base en sus características ultraestructurales e inmucitoquímicas en células grandes tipo A y células pequeñas tipo B, con sus respectivas subclases^{67,68}. La rama infraorbitaria de la división maxilar del ganglio del trigémino inerva a los receptores táctiles de la vibrisa y de la piel del cachete de la rata. En el tallo cerebral, la rama axónica aferente de las neuronas ganglionares hace sinapsis con las neuronas del primer relevo central de la vía del trigémino.

Relevos centrales de la vía somatosensorial del nervio del trigémino

La piel de la rata alberga colecciones definidas de receptores táctiles que son representados por módulos neuronales en los distintos relevos centrales del sistema somatosensorial. Estos módulos se describieron por primera vez en la corteza somatosensorial primaria (S1) del ratón y se denominaron "barriles" por su peculiar estructura⁶⁹. Los módulos forman un mapa corporal en el tallo cerebral

(barreletas), tálamo (barreloides) y S1 (barriles) que está organizado en registro con la distribución anatómica de los receptores táctiles del cuerpo. En otras palabras, se dice que los módulos están organizados somatotópicamente. En el sistema somatosensorial de la rata la representación de las vibrisas contiene los módulos más prominentes. Cada vibrisa es representada a lo largo de la vía del trigémino por un módulo que conserva la posición anatómica relativa a la vibrisa correspondiente en la cara de la rata (fig. 3).

La representación de las vibrisas se localiza en la capa IV de S1 en la región conocida como subcampo de barriles posteromedial⁶⁹. En general, los barriles consisten de un anillo formado por los cuerpos de neuronas estelares (pared del barril) que rodean a las aferentes tálamo-corticales provenientes del núcleo ventroposteromedial del tálamo (espacio central del barril). La mayoría de las dendritas de las neuronas estelares se orientan hacia el espacio central donde hacen sinapsis con las aferentes tálamo-corticales. En este espacio también se encuentran, aunque en menor densidad, neuronas estelares, interneuronas, células gliales y vasos sanguíneos.

Justificación

En los últimos años ha quedado claro que sin la plasticidad neuronal no podrían ejecutarse la mayoría de las funciones del sistema nervioso. Al respecto, la reorganización cerebral en los individuos ciegos es uno de los procesos plásticos que más han llamado la atención, quizá porque se trata de entender la base neurobiológica de las presuntas mejorías en la discriminación de algunos estímulos sensoriales. En los cerebros de estos individuos se ha documentado que la corteza cerebral se reorganiza drásticamente, y se ha postulado que la cantidad de corteza destinada a un sistema sensorial depende en gran medida de la densidad de inervación periférica y del uso de los receptores sensoriales intactos. Sin embargo, no existen estudios que evalúen posibles cambios en los elementos celulares de la periferia sensorial de individuos ciegos. Por ello, para poder entender la reorganización de la corteza cerebral en los individuos ciegos es preciso estudiar también a la periferia sensorial.

Hipótesis

El incremento del uso de los receptores sensoriales intactos y de la densidad de inervación asociada a ellos promueve la reorganización sensoriomodal en ratas enceguecidas al nacimiento.

Objetivos

Objetivo General

Documentar los cambios periféricos que pudieran conducir a las modificaciones de la reorganización cortical en ratas hembras y machos enceguecidos al nacimiento.

Objetivos Particulares

- a) Determinar si la tasa de crecimiento y/o la longitud de las vibrisas se modifican durante el desarrollo posnatal, en ratas albinas enceguecidas al nacimiento.

- b) Evaluar a los 10 y 60 días posnatales la actividad relativa de las neuronas del ganglio del trigémino en ratas albinas control y enceguecidas al nacimiento mediante el análisis densitométrico de las tinciones histoquímicas para la enzima citocromo oxidasa.

- c) Evaluar a los 10, 30 y 60 días posnatales los posibles cambios en la densidad de inervación de las vibrisas en ratas albinas control y enceguecidas al nacimiento empleando el marcaje con quinacrina de células de Merkel.

- d) Determinar a los 2, 5, 7, 10, 15, 30 y 60 días posnatales el contenido de NT-3 en el cachete de ratas albinas control y enceguecidas al nacimiento por medio del análisis densitométrico de las transferencias tipo Western.

- e) Evaluar cualitativamente a los 10 y 60 días posnatales la histología de la piel del cachete en ratas albinas control y enceguecidas al nacimiento mediante tinciones con hematoxilina y eosina.

Materiales y Métodos

Animales

Los experimentos se realizaron en ratas Wistar de 2, 5, 7, 10, 15, 30, 60 y 200 días posnatales (DP). El número de crías se ajustó a 8 crías por camada para disminuir los efectos sobre el desarrollo cerebral que traen consigo el tamaño de la camada y el cuidado maternal diferencial⁷⁰. En cada camada, la mitad de las crías fueron hembras y la otra machos. La mitad de las crías se consideró como animales control y la otra mitad como animales experimentales.. Se usaron de dos a tres camadas por experimento. Todas las ratas tuvieron libre acceso a alimentación y agua, y se mantuvieron en cuartos con temperatura e iluminación (ciclo de 12/12) controladas. Las ratas que fueron sacrificadas después de 30DP se destetaron hacia al 21DP.

Enucleación

La remoción quirúrgica de los ojos se realizó siguiendo los lineamientos de protocolos descritos anteriormente^{11,13}. Brevemente, las ratas recién nacidas (entre las ocho y diez horas que siguen al nacimiento) se anestesiaron por hipotermia. Se hizo una incisión fina sobre la incisura palpebral y con una pinza fina se removió totalmente el tejido ocular. Después de la enucleación bilateral, las ratas se colocaron en una cobija termoregulada a 37°C, y se controló el sangrado producto de la cirugía. Una vez recuperada la temperatura, el color y el movimiento, las crías fueron devueltas a sus madres. Las ratas control fueron tratadas de la misma manera aunque no se realizó la cirugía. Este procedimiento quirúrgico se asocia con un porcentaje muy bajo de mortalidad e infecciones.

Determinación de la longitud de las vibrisas

Observaciones previas sugieren que ratones y gatos ciegos poseen un mayor número de vibrisas largas¹². Esta característica fenotípica ha sido asociada al uso incrementado de los bigotes y como un factor concomitante a la expansión de la corteza somatosensorial primaria. Sin embargo, esta característica fenotípica

sólo se ha observado en ratones adultos por lo que se desconoce si esta característica fenotípica se presenta, al menos para el caso de los roedores, cuando la corteza somatosensorial se reorganiza o tiempo después.

En los roedores adultos enceguecidos desde el nacimiento, los barriles que representan a las vibrisas más posteriores son aquellos que se expanden consistentemente con mayor magnitud^{12,13}. En consecuencia, en el presente trabajo decidimos evaluar la longitud, y demás parámetros, sólo en las vibrisas más largas, α , β , γ y δ (fig. 3). Además, estas vibrisas son fácilmente reconocibles y disecables tanto en ratas jóvenes como adultas. Las ratas Wistar de 10DP, 30DP y 60DP se anestesiaron con pentobarbital sódico y sus cachetes fueron removidos, fijados en una solución de paraformaldehído (4%) y almacenados en fijador a 4°C hasta su medición. Las vibrisas se disecaron cuidadosamente y fotografiaron (vibrisas provenientes de ratas de 10PD) en un microscopio estereoscópico equipado con una cámara digital o capturadas con un escáner (vibrisas provenientes de ratas de 30PD y 60PD). Todas las vibrisas se observaron bajo un microscopio y se descartaron aquellas que presentaron la punta rota. Las imágenes capturadas se utilizaron para estimar la longitud de las vibrisas desde la base del folículo hasta la punta del pelo utilizando el programa Scion Image (ScionCorp, beta 4.0.2). En los resultados se presenta el promedio de los valores de la longitud de las vibrisas α , β , γ y δ , expresada en milímetros. Para el caso de las vibrisas de las ratas de 60DP, de cuyo folículo emergen dos pelos, decidimos denominar primario al pelo más largo que ya no está en fase de crecimiento y secundario al pelo más corto que está en la fase activa de crecimiento^{71,72}. La longitud promedio de estas vibrisas fue estimada por grupo de animales y las comparaciones estadísticas entre animales control y ciegos fueron hechas utilizando la prueba de t de Student con un nivel de significancia de $p < 0.05$.

Evaluación de la tasa de crecimiento de los bigotes

Para determinar si la duración y la velocidad del crecimiento de las vibrisas faciales se alteran en ratas enceguecidas desde el nacimiento, se midió el incremento semanal en la longitud de las vibrisas durante un ciclo de crecimiento⁷².

Debido a la dificultad técnica para medir las vibrisas en ratas vivas de 10DP, se decidió medirlas durante el segundo ciclo de crecimiento que comienza alrededor de los 40DP, pues las alteraciones en el ciclo de crecimiento se conservan durante varios ciclos⁷². Las vibrisas se cortaron a ras de piel antes de la primera medición con el fin de vigilar la emergencia de las nuevas vibrisas. Durante las mediciones, las ratas se anestesiaron con halotano para impedir el movimiento de las vibrisas. El incremento semanal de la longitud de las vibrisas α , β , γ y δ se estimó insertando cada vibrisa en un capilar de vidrio y haciendo una marca sobre la pared externa del capilar en el punto de máxima longitud de la vibrisa. Estas referencias fueron registradas en papel milimétrico a lo largo de siete semanas. El valor del incremento semanal de la longitud de las vibrisas se obtuvo digitalizando los registros que contenían los puntos de referencia del crecimiento de cada semana, y la distancia entre dichos puntos se midió en el programa Scion Image. La tasa de crecimiento se calculó en el periodo lineal de crecimiento obteniendo el valor de la pendiente de la recta definida entre las primeras cinco mediciones registradas. La tasa de crecimiento promedio de las vibrisas fue estimada por grupo de animales y las comparaciones estadísticas entre las ratas control y ciegas fueron hechas utilizando la prueba de t de Student con un nivel de significancia de $p < 0.05$.

Estimación de la actividad de la enzima citocromo oxidasa en neuronas del ganglio del trigémino

En el sistema nervioso, la energía requerida para restaurar el potencial de membrana después de un evento de despolarización proviene predominantemente de la oxidación de glucosa. De esta manera, la captura de glucosa y/o la actividad de enzimas oxidativas pueden utilizarse como un índice indirecto de los niveles de actividad neuronal asociada a la estimulación de las vibrisas⁷³. Así, con el objeto de evaluar la participación de la actividad neuronal dependiente del uso en los procesos de plasticidad sensoriomodal en ratas ciegas desde el nacimiento, evaluamos densitométricamente la actividad relativa de la de la enzima citocromo oxidasa en las neuronas del ganglio del trigémino. Las ratas de 10DP y 60DP, controles y ciegas, se anestesiaron con pentobarbital sódico, su cerebro se removió

y los ganglios del trigémino se disecaron. Cada ganglio del trigémino se embebó en medio de congelación de tejidos (Tissue-Tek, O.C.T: compound) y se congelaron en 2-metilbutano. Posteriormente, se obtuvieron rebanadas de ganglio de 40 μm y se colocaron sobre portaobjetos recubiertos con gelatina. Las rebanadas se incubaron en una solución de amortiguador de fosfatos que contenía citocromo C, catalasa y 2,3-diaminobencidina a 37°C⁷⁴. Para asegurar que la comparación entre ganglios del animal control y del ciego se hiciera con la tinción correspondiente a la fase de ascenso de la reacción histoquímica, se incubaron cortes de ganglio a diferentes tiempos. El punto de máxima tinción se alcanzó alrededor de las 2 horas de incubación tanto en animales controles como enucleados, independientemente de la edad. Por esta razón se detuvo la reacción una hora después de iniciada la incubación para realizar las determinaciones densitométricas. Los cortes teñidos de ganglio se fotografiaron en un microscopio estereoscópico Nikon acoplado a una cámara digital. Los valores de ganancia y contraste se mantuvieron fijos durante toda la sesión de captura de imágenes⁷⁴. En cada imagen se obtuvo el promedio de densidad del producto de la reacción (en unidades arbitrarias de transmitancia) en la población de las neuronas ganglionares con el programa Scion Imagen. Para corregir por variaciones asociadas a la técnica histoquímica también se hicieron determinaciones densitométricas en la parte distal del nervio del trigémino. La actividad relativa de la citocromo oxidasa se determinó calculando las diferencias porcentuales entre los valores promedio de transmitancia de las neuronas ganglionares con relación a los valores del nervio del trigémino⁷⁴. Estos porcentajes fueron comparados y analizados por grupos de edad comparando a los ganglios de ratas controles y enucleadas. Para la comparación estadística se empleó la prueba de t de Student de una cola con un nivel de significancia $p < 0.05$.

Cuantificación del número de células de Merkel

Las terminales de Merkel son mecanorreceptores de adaptación lenta que están constituidas por una célula de Merkel y la terminal de un axón mielinizado⁷⁵. En general, existe una relación 1:1 entre el número de fibras nerviosas y el número

células de Merkel asociados a los folículos de las vibrisas faciales en roedores⁷⁵. Además se ha propuesto que estas células proveen de señales inductivas para especificar el patrón de los barriles durante el desarrollo temprano de S1⁷⁶. La cuantificación de estas células epiteliales puede, por tanto, ser utilizada como un indicador indirecto del número y densidad de fibras nerviosas sobre los folículos de las vibrisas. Con esto en mente, ratas control y ciegas de 10, 30 y 60 DP se inyectaron intraperitonealmente con quinacrina (10-15 mg/kg), un colorante que marca específicamente las células de Merkel⁷⁷⁻⁸¹. Transcurridas de 16 a 24 horas las ratas fueron anestesiadas con pentobarbital sódico. Posteriormente, los cachetes se extirparon y la columna correspondiente a los bigotes α , β , γ y δ fue disecada. Esta muestra se aplanó longitudinalmente entre dos portaobjetos con una separación de 1mm para las vibrisas de ratas de 10DP y de 2mm para las vibrisas de ratas de 30DP y 60DP. Las muestras aplanadas se congelaron en 2-metilbutano y se almacenaron a -70 °C. Luego, se obtuvieron cortes longitudinales en criostato de $20\mu\text{m}$ para las vibrisas de ratas de 10DP y de $40\mu\text{m}$ para vibrisas de ratas de 30DP y 60DP. Los cortes se observaron en un microscopio Nikon de epifluorescencia equipado con una cámara digital. Se capturaron entre 20 y 40 imágenes de la región inferior al anillo de tejido del seno anular de las vibrisas, debido a que la densidad celular de esta zona, en los cortes longitudinales, es moderada y permitió hacer cuantificaciones confiables y sistemáticas. Las células de Merkel se contaron manualmente en un área de 0.1mm^2 por imagen utilizando el programa Scion Image. Los datos obtenidos fueron promediados por grupo y comparados mediante la prueba estadística de t de Student de una cola con un nivel de significancia de $p < 0.05$.

Semicuantificación del contenido de neurotrofina-3

Ratas controles y ciegas de 2, 5, 7, 10 y 60 DP fueron anestesiadas y sus cachetes se disecaron y congelaron en metilbutano. Los cachetes congelados se molieron con nitrógeno líquido en un mortero. El cachete pulverizado se sonicó en solución de lisis (100mM NaCl, 10mM Tris, 1mM PMSF, 1% Tritón, adicionada con 1 tableta de inhibidores de proteasas ROCHE por cada 10ml de solución). El

homogenizado se centrifugó tres veces a 18,300 G a 4°C durante 15 minutos. El sobrenadante se colectó y la proteína se cuantificó mediante el ensayo de Bradford. Posteriormente, 40 µg de proteína total se separaron en mini-geles de SDS-PAGE Tris/Tricina⁸² al 16% y se electrotransfirieron a una membrana de nitrocelulosa en una cámara de transferencia semiseca. La membrana se bloqueó, al menos cinco horas, en TTBS (0.05% Tween 20, 10mM Tris, 150mM NaCl) adicionado con 5% de leche descremada; y a continuación, se incubó con anticuerpo primario de oveja anti-neurotrofina-3 (1:5,000) toda la noche a 4°C. Después de tres lavados con TTBS, las membranas se incubaron con anticuerpos secundarios anti-oveja biotinilados (1:10,000) por dos horas a temperatura ambiente. La membrana se lavó tres veces y se incubó 90 min con el complejo avidina-biotina (ABC; Vector Laboratories). Finalmente, las bandas inmunoreactivas se visualizaron en película utilizando la técnica de quimioluminiscencia (Amersham Biosciences). Las películas fueron fotografiadas digitalmente con el equipo FS Biorad y el análisis densitométrico de las bandas inmunoreactivas para neurotrofina-3 (NT-3) se realizó con el programa Quantity One (Bio Rad versión 4.4.1). En la gráfica del contenido de NT-3, cada punto corresponde a la fracción del valor densitométrico obtenido para la banda inmunoreactiva a NT-3 con referencia al valor obtenido del homogenizado del cachete control de 2DP. Los datos se compararon con la prueba-t de Student, con un valor de significancia $p < 0.05$.

Evaluación cualitativa de la histología de la piel

Durante la realización de los experimentos notamos que los cachetes de ratas ciegas, al menos a lo largo de la primera semana de vida, son más aplanados que en los controles. Por este motivo, decidimos revisar la histología de la piel del cachete. Para ello, se disecó la columna de bigotes α , β , γ y δ de ratas controles y ciegas de 10DP y 60DP. Estas muestras se fijaron en 4% paraformaldehído y se incluyeron en parafina. Posteriormente se obtuvieron cortes longitudinales de 8 µm de grosor y se tiñeron con hematoxilina y eosina.

Resultados

No existen diferencias en el peso corporal entre ratas control y ciegas a lo largo del desarrollo

Con el fin de determinar si la enucleación binocular al nacimiento trae consigo deficiencias en el desarrollo corporal y cambios en la tasa de desarrollo, se determinó el peso corporal de todas las ratas antes de su sacrificio. No se encontraron diferencias significativas entre ratas control y ciegas, independientemente del sexo (fig. 5 a y b). Sin embargo, sí se encontraron diferencias significativas en el peso corporal entre machos y hembras al nacimiento, a los 10DP y a partir de los 60DP (fig. 5 c y d). Estas diferencias fueron equivalentes en los grupos de ratas control y ciegas de ambos sexos.

La expansión cortical en ratas albinas enceguecidas al nacimiento no se acompaña de cambios en la dinámica de crecimiento del bigote

Se ha sugerido que el aumento en la longitud de las vibrisas observado en gatos y ratones ciegos resulta de un incremento en su uso^{5,12}. Así, para evaluar si la expansión anatómica de la corteza somatosensorial ocurre en paralelo con cambios en la longitud de las vibrisas faciales, y del uso de las mismas, determinamos la longitud promedio de las vibrisas α , β , γ y δ en ratas control y ciegas a los 10DP, 30DP y 60DP. Nuestros resultados muestran que si bien las vibrisas de ratas ciegas macho de 10DP tienden a ser más largas (16.05 ± 0.51 mm) que las correspondientes en ratas macho control (15.63 ± 0.41 mm), esta diferencia no es significativa (fig. 6a). Hacia el final del primer mes de vida, la longitud de las vibrisas fue muy similar entre ratas ciegas y controles (fig. 6b). Los folículos de ratas de 60DP presentan dos vibrisas. La vibrisa larga, a la cual denominamos primaria, fue la que creció durante los primeros 40 días de vida de la rata. La vibrisa corta, denominada secundaria, es la que estaba en plena fase de crecimiento durante el periodo evaluado. Nuestras mediciones en ambos tipos de vibrisa en el

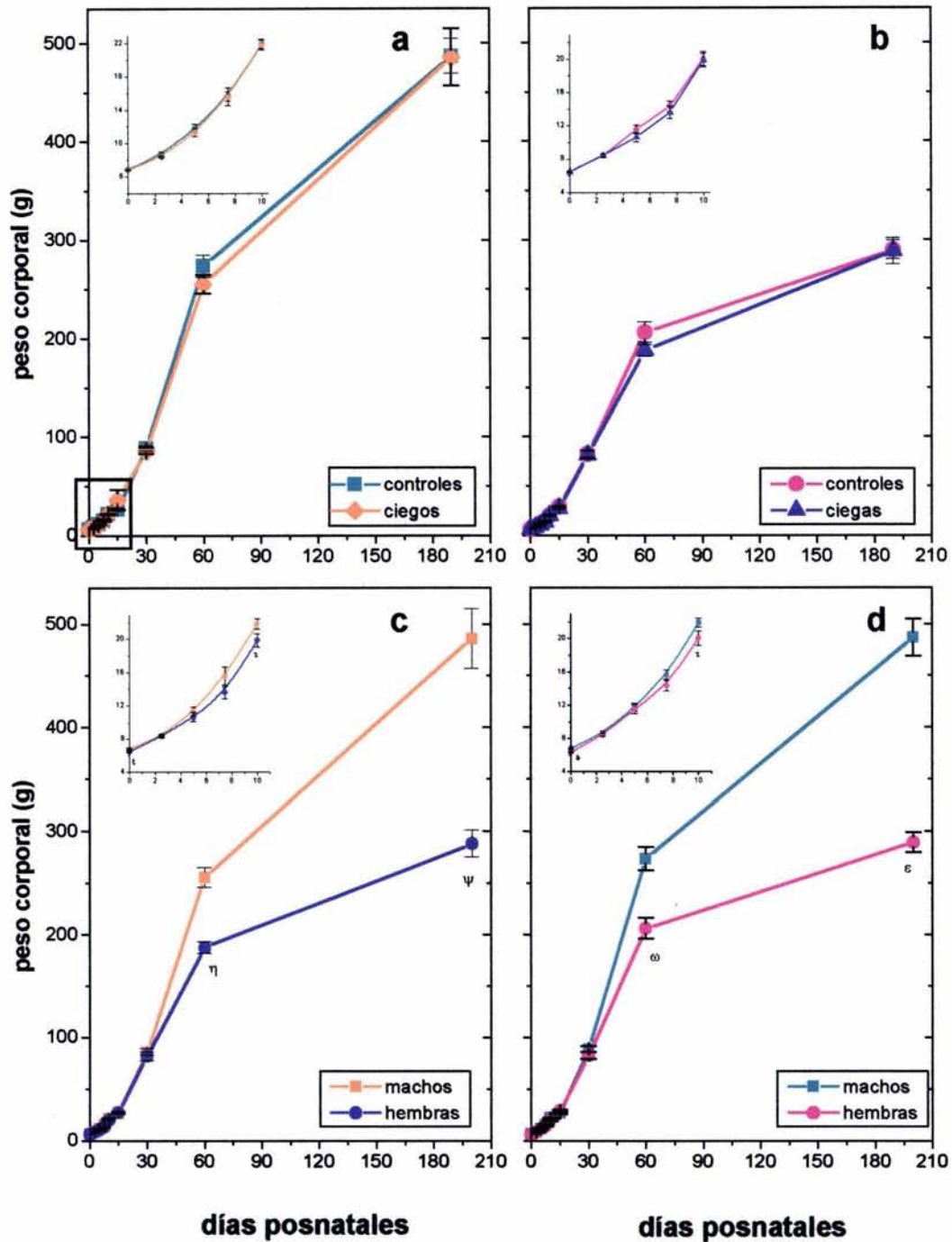


Figura 5. Peso corporal de ratas control y ciegas a lo largo del desarrollo. Gráficas que ilustran el peso corporal de ratas control y ciegas, machos (a) y hembras (b). En ninguno de los dos sexos se encontraron diferencias entre los grupos control y ciegos. En c se muestra la comparación del peso corporal entre machos y hembras control. En el panel d se muestra la misma comparación entre machos y hembras ciegos. En ambos grupos, se encontraron diferencias significativas al nacimiento, 10DP y a partir de los 60DP (los recuadros muestran los datos de peso corporal hasta 10DP). t de Student $\xi p < 4 \times 10^{-7}$, $\eta p < 1 \times 10^{-5}$, $\chi p < 0.03$, $\eta p < 0.0005$, $\omega p < 9.4 \times 10^{-5}$, $\psi p < 7 \times 10^{-5}$, $\epsilon p < 0.001$.

macho adulto, no detectaron diferencias significativas entre las ratas control y ciegas (figura 6c).

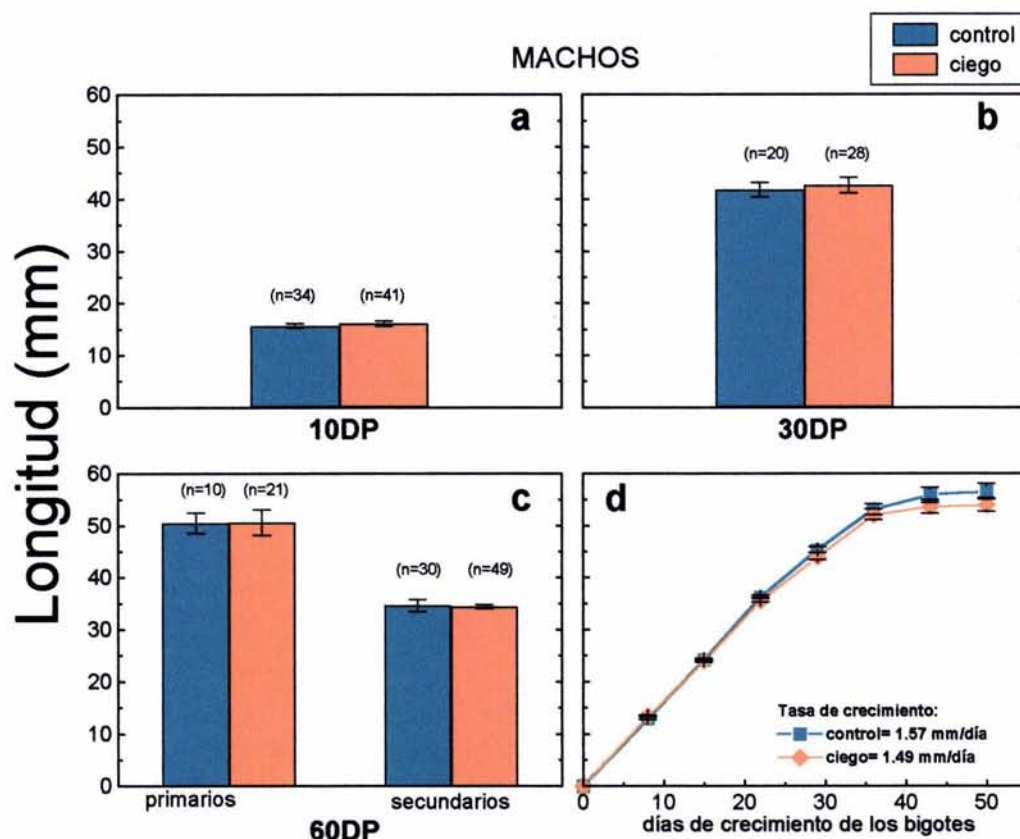


Figura 6. Longitud y ciclo de crecimiento de las vibrisas de ratas macho. Gráficas que ilustran la longitud promedio de los bigotes posteriores primarios y secundarios en machos control y ciegos a los 10DP (a), 30DP (b) y 60DP (c). La tasa de crecimiento promedio de los bigotes α , β , γ y δ de controles y ciegos se ilustra en d. No se observaron diferencias significativas en ninguno de los parámetros evaluados. Los paréntesis arriba de las columnas indican el número de bigotes que se midieron.

De igual manera, en las ratas hembra, no encontramos diferencias significativas entre las vibrisas de ratas control y ciegas a las distintas edades analizadas (fig. 7 a-c). Finalmente, sin llegar a ser una diferencia significativa, las vibrisas secundarias de las ratas hembra control (36.02 ± 0.48 mm) fueron ligeramente más largas que las correspondientes en las ratas hembra ciegas (34.82 ± 0.5 mm) (fig. 7c).

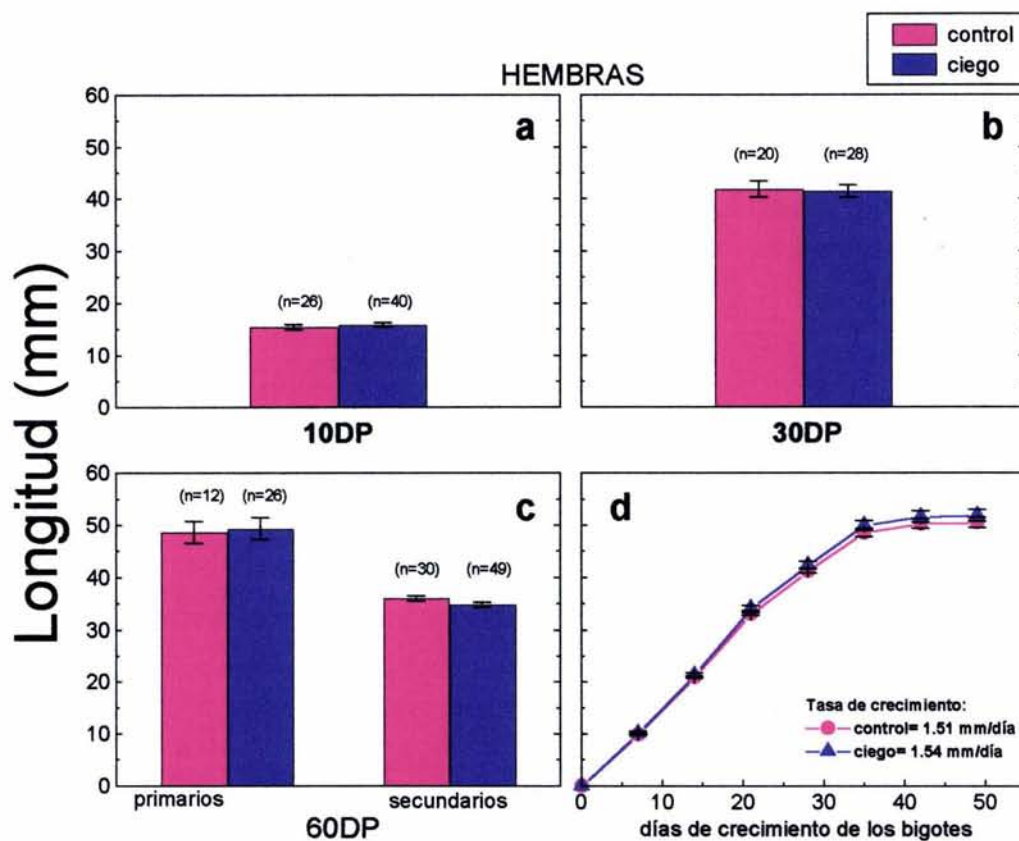


Figura 7. Longitud y ciclo de crecimiento de las vibrisas de ratas hembra. Gráficas que ilustran la longitud promedio de los bigotes posteriores primarios y secundarios en hembras control y ciegas a los 10DP (a), 30DP (b) y 60DP (c). La tasa de crecimiento promedio de los bigotes α , β , γ y δ de controles y ciegos se ilustra en d. No se observaron diferencias significativas en ninguno de los parámetros evaluados.

Durante una gran parte de la vida de los roedores, tanto la longitud total como la tasa de crecimiento de las vibrisas permanecen constantes. El ciclo de crecimiento de las vibrisas en la rata albina dura aproximadamente 40 días y es un fenómeno biológico de gran reproducibilidad cuya duración y velocidad son influidos por factores como el sexo y la alimentación⁷². Debido a que el aumento de longitud reportado en ratones y gatos ciegos¹² pudiera deberse a cambios en la velocidad de crecimiento del bigote, más que a un aumento de la longitud total, decidimos evaluar si el ciclo de crecimiento en ratas ciegas estaba alterado. En nuestras series experimentales no se observaron diferencias significativas ni en la velocidad de crecimiento ni en la duración del ciclo de crecimiento de las vibrisas de ratas control y ciegas de ambos sexos. (figura 4d y 5d). La longitud máxima

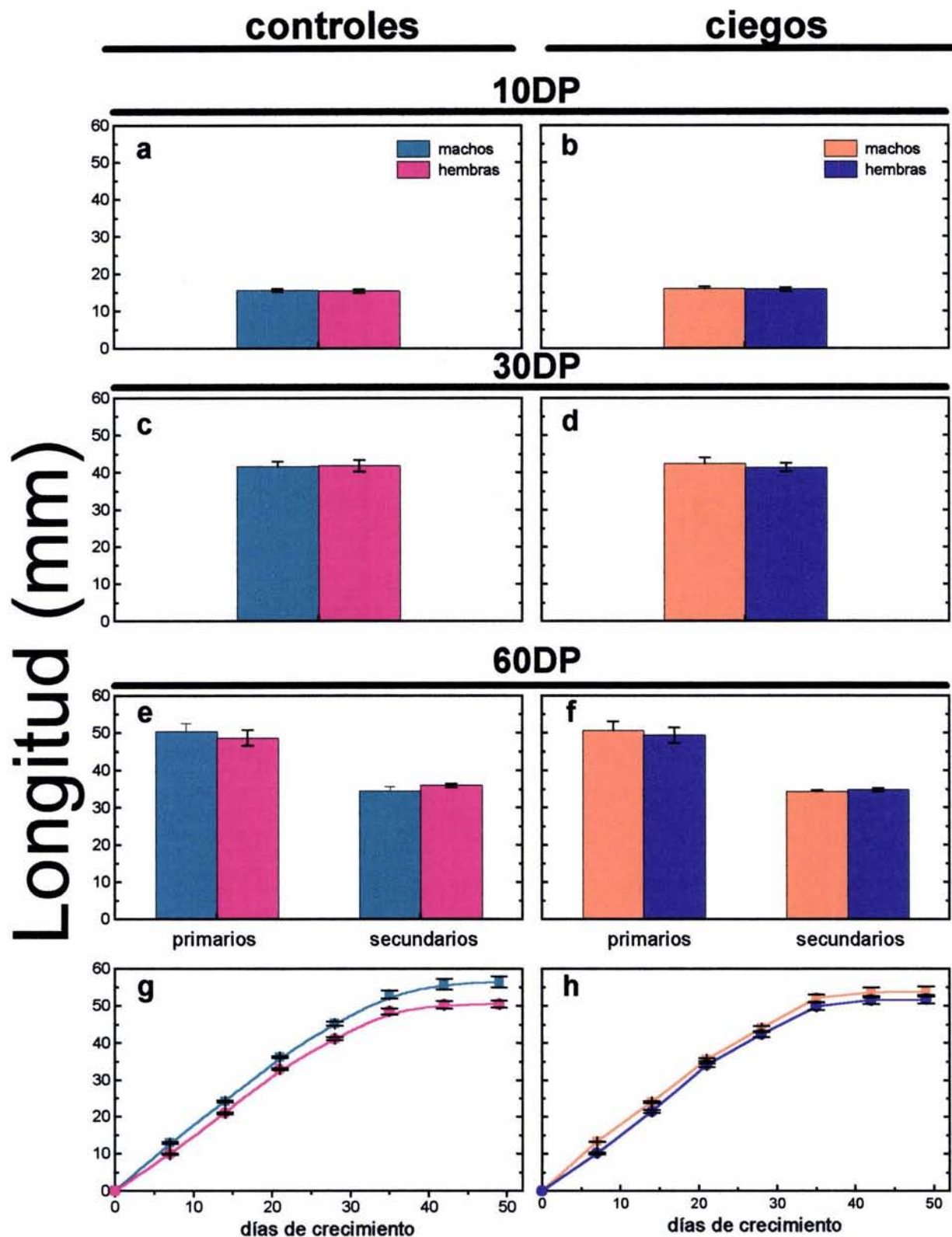


Figura 8. Longitud y ciclo de crecimiento de los bigotes en ratas macho y hembra. Gráficas donde se compara la longitud promedio de los bigotes posteriores primarios y secundarios entre ratas macho y hembra, control y ciegos a los 10DP (a y b), 30DP (c y d) y 60DP (e y f). La tasa de crecimiento promedio de los bigotes α , β , γ y δ de ratas control y ciegos, de ambos sexos, se ilustra en (g y h).

alcanzada al final del segundo ciclo de crecimiento fue de 56.47 ± 1.49 mm en los machos control y de 53.96 ± 1.29 mm en los machos ciegos; mientras que, en las hembras control fue de 50.52 ± 0.10 mm y en hembras ciegas, de 51.86 ± 1.14 mm.

La comparación de la longitud y ciclo de crecimiento de las vibrisas de las ratas macho y hembra se muestra en la figura 8. No se encontraron diferencias significativas en estos valores entre los grupos experimentales en ambos sexos. En concordancia con lo reportado⁷², observamos que el ciclo de crecimiento es ligeramente pero significativamente más largo en machos que en hembras control. Esta diferencia no es tan notoria entre las ratas ciegas de ambos sexos (fig 8 g y h).

En resumen, nuestros datos indican que la dinámica general de crecimiento y la longitud de las vibrisas de las ratas ciegas es semejante a la mostrada por las vibrisas de las ratas control, al menos hasta el segundo ciclo de crecimiento.

La actividad metabólica de las neuronas del ganglio del trigémino fue similar entre ratas control y enceguecidas al nacimiento

El monitoreo histoquímico de la actividad de las enzimas oxidativas citocromo oxidasa y succinato deshidrogenasa se ha utilizado previamente para analizar cambios en el metabolismo oxidativo y, por inferencia, de la actividad eléctrica en neuronas de ganglios de la raíz dorsal, en motoneuronas y en fibras musculares⁸³⁻⁸⁸. La actividad sináptica se relaciona, en cierto grado, con la intensidad de la tinción histoquímica para las enzimas oxidativas en neuronas sensoriales y motoras, así como en sus blancos periféricos excitables⁸³⁻⁸⁸. Por ello, empleamos esta técnica para evaluar si la actividad relativa de la citocromo oxidasa en las neuronas del ganglio del trigémino era mayor en las ratas ciegas que en las ratas control. Sin embargo, la actividad relativa de citocromo oxidasa fue muy similar entre ratas control y ciegas tanto a los 10DP como a los 60DP, independientemente del sexo (tablas 1 y 2; fig. 9). No obstante, en ambos sexos se observó un incremento significativo en la actividad relativa de citocromo oxidasa de 10 DP a 60 DP tanto en los controles como en los ciegos. Este aumento fue de aproximadamente 10% en machos y de 15% en hembras, independientemente de la condición experimental (tablas 1 y 2).

Neuronas del ganglio del trigémino

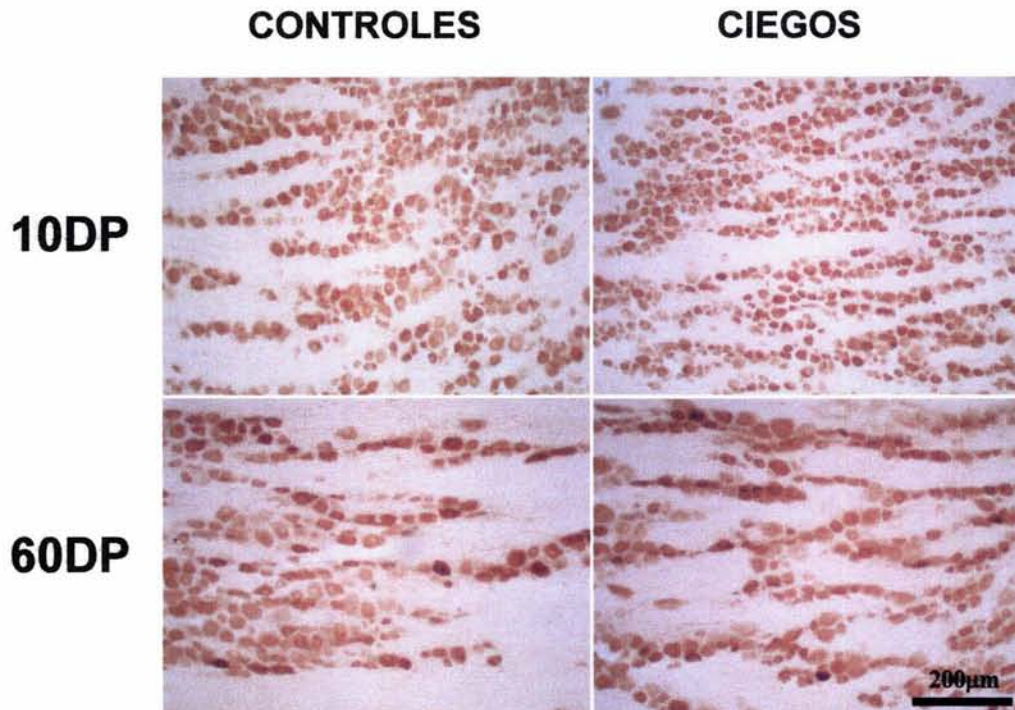


Figura 9. Microfotografías que ilustran histoquímicas para la enzima citocromo oxidasa en cortes longitudinales de ganglio del trigémino. Neuronas del ganglio del trigémino de ratas control (10DP, **a**; 60DP, **c**) y de ratas ciegas (10DP, **b**; 60DP, **d**). En ninguno de los casos se observaron diferencias en la intensidad de la marca para citocromo oxidasa entre los grupos de la misma edad. Sin embargo, hay un aumento significativo de la intensidad de la marca entre DP10 y DP60 en ambos grupos (ver tablas 1 y 2). Nótese que las neuronas ganglionares de ratas enceguecidas a los 10DP son de menor tamaño que las neuronas de ratas control de la misma edad (compare **b** con **a**). Barra de escala = 200µm

Tabla 1 . Actividad relativa de la enzima citocromo oxidasa en neuronas del ganglio del trigémino de ratas macho neonatas y adultas, control y ciegas.

Grupo experimental	% ± D.E. Neuronas ganlionares/ fibras del nervio trigémino	
	10 DP	60 DP
Control	75±5 n= 9	82±3^ξ n= 7
Ciego	76±4 * n= 7	83±2^{*, ξ} n= 6

Prueba-t ciego v.s. control de la misma edad *p<0.32, * p<0.40 (ambos valores no fueron significativos; 10DP vs. 60DP ^ξp<0.0016.

Tabla 2 . Actividad relativa de la enzima citocromo oxidasa en neuronas del ganglio del trigémino de ratas hembra neonatas y adultas, control y ciegas.

Grupo experimental	% \pm D.E. Neuronas ganlionares/ fibras del nervio trigémino	
	10 DP	60 DP
Control	72\pm4 n= 9	81\pm3^ξ n= 7
Ciego	70\pm5[*] n= 7	82\pm3^{*, ξ} n= 6

Prueba-t ciego vs. control de la misma edad *p<0.32, ^{*} p<0.40v (ambos valores no fueron significativos); 10DP vs. 60DP ^ξp<0.0001.

La densidad de inervación decrece en ratas ciegas durante la primera semana de vida, pero aumenta hacia la edad adulta

En general, cada célula de Merkel está asociada a una terminal axónica en la piel de los roedores⁷⁵. La cuantificación de estas células puede, por tanto, ser utilizada como un indicador indirecto del número de algunas fibras nerviosas en los folículos de las vibrisas. Así, para establecer posibles cambios en la densidad de inervación de las vibrisas se cuantificó el número de células de Merkel teñidas con quinacrina en ratas control y ciegas de ambos sexos. Para el caso de los machos, el número de células de Merkel en los ciegos fue 11% menor que en los controles a los 10DP. Esto sugiere que durante el tiempo en que ocurre la expansión de la representación cortical de las vibrisas la densidad de inervación, al menos para este tipo de mecanorreceptor, permanece baja en los ciegos. Esta tendencia se pierde a los 30DP. En contraste, el número de células de Merkel en ratas ciegas de 60DP es 17% mayor que en los controles (fig. 10).

El fenómeno de la variación del número de células de Merkel es muy parecido en hembras, aunque difiere en la magnitud y en el tiempo. En contraste

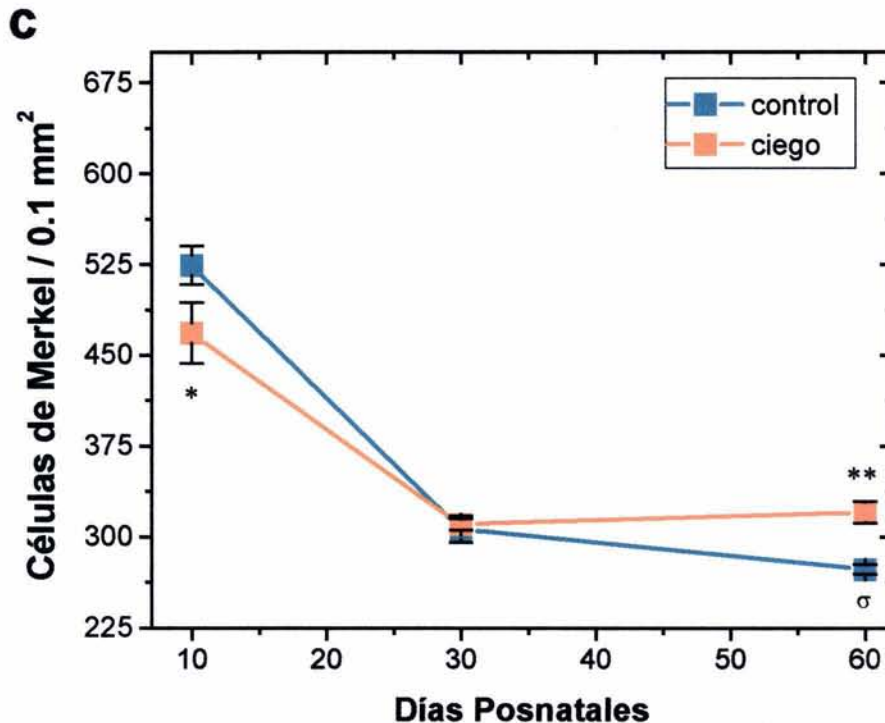
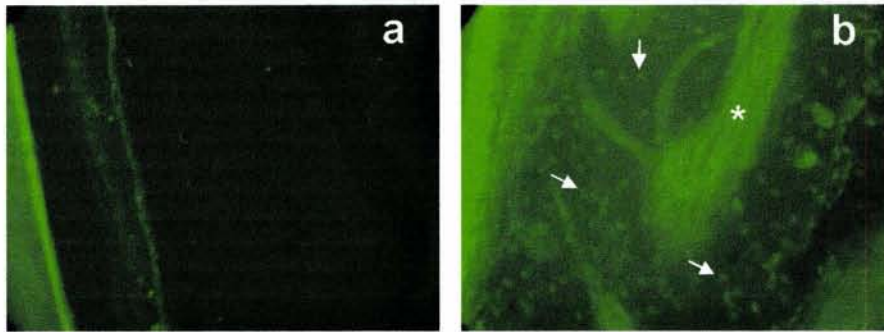


Figura 10. Promedio del número de células de Merkel en las vibrissas α , β , γ y δ de ratas macho, control y ciegas, a los 10DP, 30DP y 60DP. Para evaluar si la densidad de inervación cambiaba en las vibrissas de ratas ciegas se contó el número de células de Merkel marcadas con quinacrina. Las microfotografías muestran cortes longitudinales de una vibrissa de una rata control que no fue inyectada con quinacrina (a) y de una rata control inyectada con quinacrina (b). Note la presencia de células de Merkel (flecha) y tractos nerviosos marcados (asterisco) con quinacrina en la vibrissa de la rata tratada. La gráfica del panel c muestra el número de células de Merkel a los 10DP, 30DP y 60DP en los folículos de las vibrissas de ratas macho, control y ciegas. Nótese que el número de células de Merkel teñidas con quinacrina disminuye con la edad, y que esta disminución es menos acentuada en las ratas ciegas. Prueba t de Student ciego v.s. control de la misma edad * $p < 0.0393$; ** $p < 0.0012$; controles: 30DP v.s. 60DP $^{\sigma} p < 0.011$. (n=8)

con lo que ocurre en los machos ciegos, el número de células de Merkel en las hembras ciegas es menor respecto de los controles durante el primer mes de vida. Esta disminución es del 20% a los 10DP y del 8% a los 30DP. De la misma manera,

que en los machos ciegos adultos, el número de células de Merkel en las vibrisas de hembras ciegas es mayor, aunque sólo 10% más que en las hembras control (fig. 11).

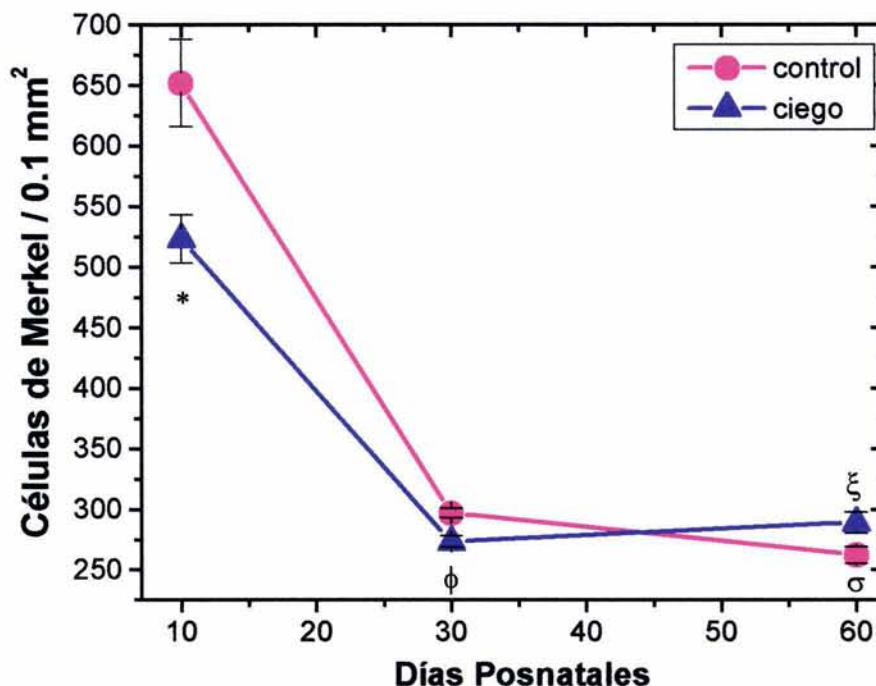


Figura 11 . Promedio del número de células de Merkel en las vibrisas α , β , γ y δ de ratas hembra, control y ciegas, a los 10DP, 30DP y 60DP.. La gráfica muestra el número de células de Merkel a los 10DP, 30DP y 60DP en los folículos de las vibrisas de ratas hembra, control y ciegas. Note que el número de células de Merkel disminuye con la edad, y que esta disminución es menos acentuada en las ratas ciegas. Prueba t de Student ciego v.s. control de la misma edad * $p < 0.005$; $\phi p < 0.001$ y $\xi p < 0.018$; controles: 30DP v.s. 60DP $\sigma p < 0.0004$. (n=8)

Por otra parte, el número de células de Merkel decrece con la edad en ambos sexos tanto en controles como en ciegos (fig. 10 y 11). Sin embargo, esta disminución se aminora a lo largo del tiempo en las ratas ciegas de ambos sexos. La disminución de estas células entre 10DP y 30DP es 15% menor en las ratas ciegas, independientemente del sexo. Las ratas control, tanto hembras como machos, presentaron una disminución del 11% en el número de células de Merkel entre 30DP y 60DP. Mientras que, en las ratas ciegas de ambos sexos no se

observó ningún cambio durante este mismo intervalo de tiempo. Estos resultados apoyan que en ratas ciegas la muerte celular de este tipo de mecanorreceptores se atenúa.

La comparación del número de células de Merkel entre ratas macho y hembra, control y ciegas, se muestra en la figura 12. Entre animales control de 10DP, la hembra tiene 24% más células de Merkel que los machos. En cambio, no se observaron diferencias ni a 30DP, ni 60DP. En animales ciegos de 10DP, por el contrario, no se observaron diferencias entre ambos sexos. Sin embargo, a los 30DP y 60DP, las hembras ciegas mostraron una reducción del 12% y 10%, respectivamente, del número de células de Merkel con relación a las ratas macho de edades equivalentes.

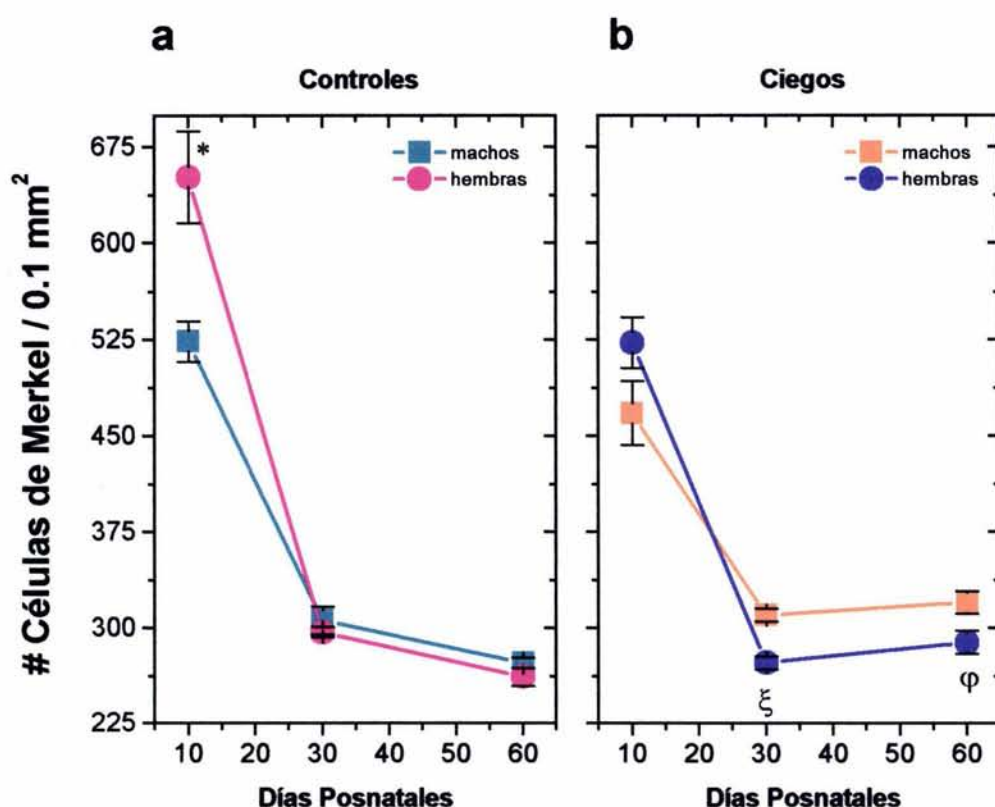


Figura 12 . Comparación del número de células de Merkel en las vibrisas entre ratas hembra y macho control (a) y ciegas (b). La gráfica muestra el número de células de Merkel a los 10DP, 30DP y 60DP en los folículos de las vibrisas de ratas hembra y macho, controles y ciegas. Nótese que, en general, el patrón de desarrollo del número de células de Merkel es similar entre machos y hembras de ambos grupos experimentales. La magnitud de muerte células en las ratas ciegas, sin embargo, es menor que la observada en los controles. Prueba t de Student hembra v.s. macho de la misma edad * $p < 0.009$; $^{\xi}p < 0.0002$, $^{\phi}p < 0.036$

El contenido de neurotrofina-3 en los cachetes de ratas ciegas disminuye durante los primeros días de vida, pero aumenta en la etapa adulta

La neurotrofina-3 (NT-3) es un factor de crecimiento fundamental para el desarrollo y sostenimiento de una buena parte de la inervación sensorial de la piel.

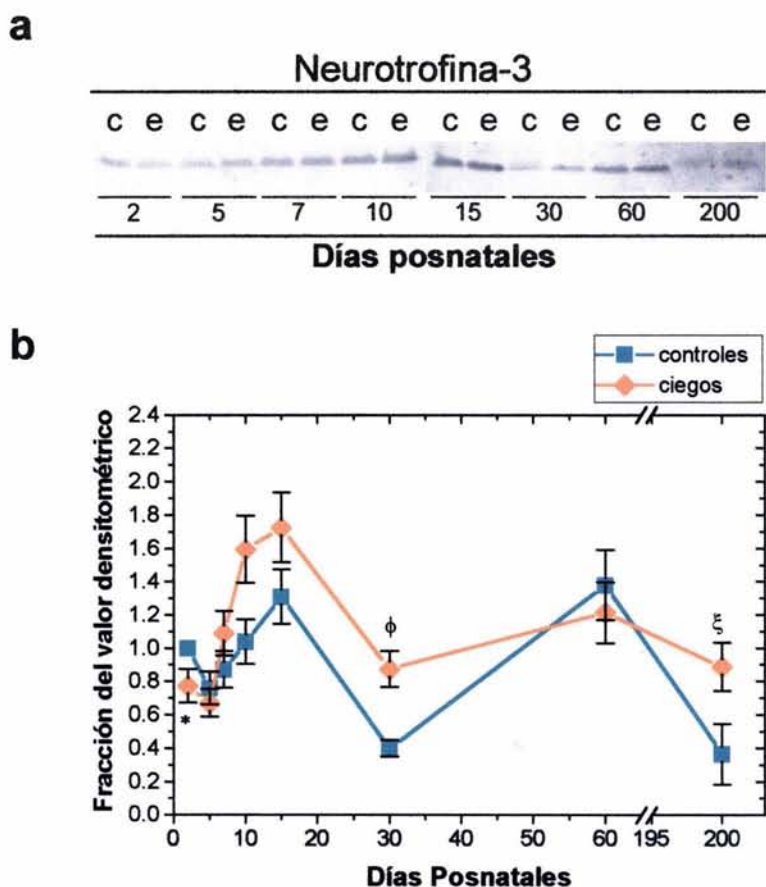
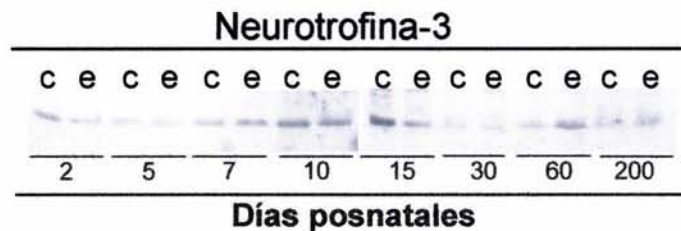


Figura 13. Contenido relativo de la neurotrofina-3 (NT-3) en el cachete durante el desarrollo de ratas machos, control y ciegas. En **a**) se ilustra una transferencia Western representativa en la que se identifican las bandas inmunoreactivas a NT-3 de ratas control (c) y ciegas (e) a distintas edades. En **b**) la gráfica muestra las variaciones del contenido de NT-3 en homogenados de cachete en distintas edades, evaluado por medio del análisis densitométrico de transferencias Western. El contenido de NT-3 disminuye 29% a los 2DP en cachetes de ratas ciegas respecto de sus contrapartes control. A partir de los 7DP el contenido de NT3 tiende a aumentar en las ratas ciegas. A los 30DP el contenido de NT-3 es 54% más alto en las ratas ciegas que en los control. Por último, a los 200DP la NT-3 aumenta 144% en los ciegos. En la gráfica, los datos se presentan como la fracción del valor densitométrico para cada edad con relación al valor densitométrico obtenido para los homogenados de cachete de ratas control de 2DP. Prueba t de Student ciego v.s. control de la misma edad * $p < 0.04$; $\phi p < 0.014$ y $\xi p < 0.032$. (n=5)

Entre los receptores sensoriales que dependen de la NT-3 están las terminales de Merkel. En consecuencia, evaluamos si el contenido de NT-3 variaba en la piel del cachete de la rata ciega, mediante el análisis densitométrico de transferencias Western. El contenido de la NT-3 en el cachete de machos ciegos disminuyó 22% a los 2DP y 12% a los 5DP respecto de los valores control. Sin embargo, el contenido de NT-3 en el cachete de machos ciegos tiende a aumentar desde los 7DP alcanzando una diferencia significativa hacia los 30DP (119% de incremento). A los 60DP, el contenido de NT-3 es muy similar entre ratas control y ciegas. Por último, a los 200DP el contenido de NT-3 en el cachete de los ciegos es 144% mayor que en las ratas control (fig. 13).

a



b

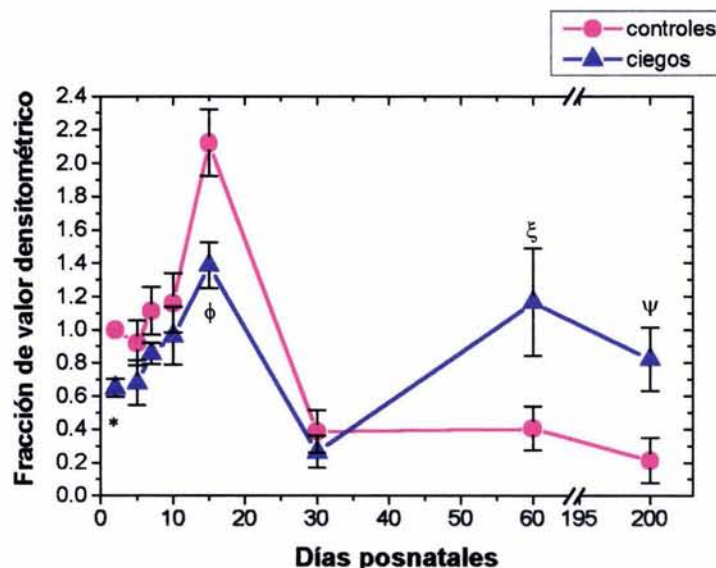


Figura 14. Contenido relativo de la neurotrofina-3 (NT-3) en el cachete durante el desarrollo de ratas hembra, control y ciegas. En **a** se ilustra una transferencia Western representativa en la que se identifican las bandas inmunoreactivas a NT-3 de ratas control (c) y ciegas (e) a distintas edades. En **b** la gráfica muestra las variaciones del contenido de NT-3 en homogenados de cachete en distintas edades. El contenido de NT-3 disminuye 35% tanto a 2DP como a 15DP en las ratas ciegas respecto de sus contrapartes control. A los 60DP el contenido de NT-3 es 187% más alto en la ratas ciega que en la control. Prueba t de Student ciego v.s. control de la misma edad * $p < 0.001$; † $p < 0.007$; ‡ $p < 0.038$ y § $p < 0.017$. (n=5)

En contraste, el contenido de NT-3 es menor en los cachetes de hembras ciegas durante todo el primer mes de vida, siendo este decremento significativo a los 2DP (35%) y a los 15DP (35%). Esta tendencia se revierte a los 60DP cuando hay un incremento (187%) significativo en el contenido de NT-3 en las hembras ciegas que se mantiene hasta los 200DP (283%) (fig. 14).

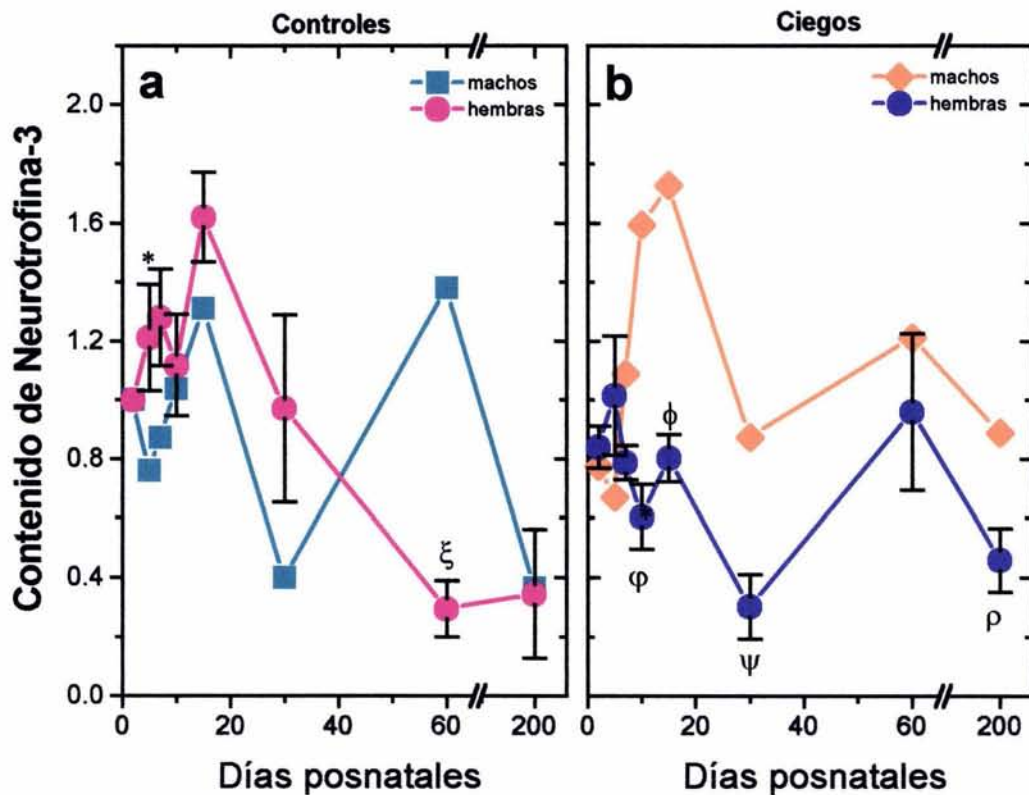


Figura 15. Comparación del contenido relativo de la neurotrofina-3 (NT-3) durante el desarrollo de ratas de ambos sexos, control y ciegas. Las gráficas muestran las variaciones del contenido de NT-3 en homogenados de cachete de ratas de ambos sexos, control (a) y ciegas (b) a distintas edades. Prueba t de Student hembra v.s. macho de la misma edad * $p < 0.044$; $\xi p < 0.013$; $\phi p < 0.004$; $\psi p < 0.002$, $\rho p < 0.024$, y $\rho p < 0.003$. (n=5)

La comparación del contenido de NT3 entre hembras y macho de los diferentes grupos experimentales, a lo largo del desarrollo, se muestra en la figura 15. Entre los animales control, las hembras tienden a presentar mayor contenido de NT-3 hasta los 30DP. A los 60DP, sin embargo, el contenido de NT-3 en los

cachetes de las hembras presenta una disminución relativa del 79% con respecto a los valores de los machos de la misma edad (fig. 15a). En los animales ciegos, las hembras presentan un menor contenido de NT-3 a los 10DP (62%), a los 15DP (53%), a los 30DP (65%) y a los 200DP (48%) respecto de los machos de edades similares. A los 60DP, sin embargo, el contenido de NT-3 en los cachetes se equipara en ambos sexos. En conjunto, estas variaciones en el contenido de NT3 pudieran explicar la atenuación de la muerte celular de las terminales de Merkel en el cachete de ratas ciegas.

La epidermis del cachete es más gruesa en ratas ciegas

Tras la remoción binocular de los ojos hemos observado que el hocico de las ratas ciegas se modifica anatómicamente, al menos durante la primera semana de vida. El hocico adquiere una apariencia afilada y los cachetes se observan aplanados respecto de los controles (fig. 16). Los cortes de cachete de 10DP revelaron que la epidermis tiende a ser más gruesa, aparentemente a expensas del estrato espinoso, en las ratas ciegas de ambos sexos. En general, la mayoría de los núcleos de las células del estrato basal epidérmico en las ratas ciegas son de mayor tamaño y presentan con mayor frecuencia cromatina dispersa. Cualitativamente, observamos que estos cambios son más notorios en machos ciegos a los 10DP. Además, la apariencia del tejido conjuntivo dérmico parece modificarse en las ratas ciegas, ya que, disminuye su contenido celular y aumenta el fibrilar. Con la edad, el grosor de la epidermis del cachete disminuye, y los núcleos celulares tienden a reducir su tamaño y a condensar su cromatina. Esta disminución del grosor de la epidermis y los cambios en el tamaño del núcleo celular y disposición de la cromatina son menos notorios en los animales ciegos, especialmente en las hembras (fig. 17).

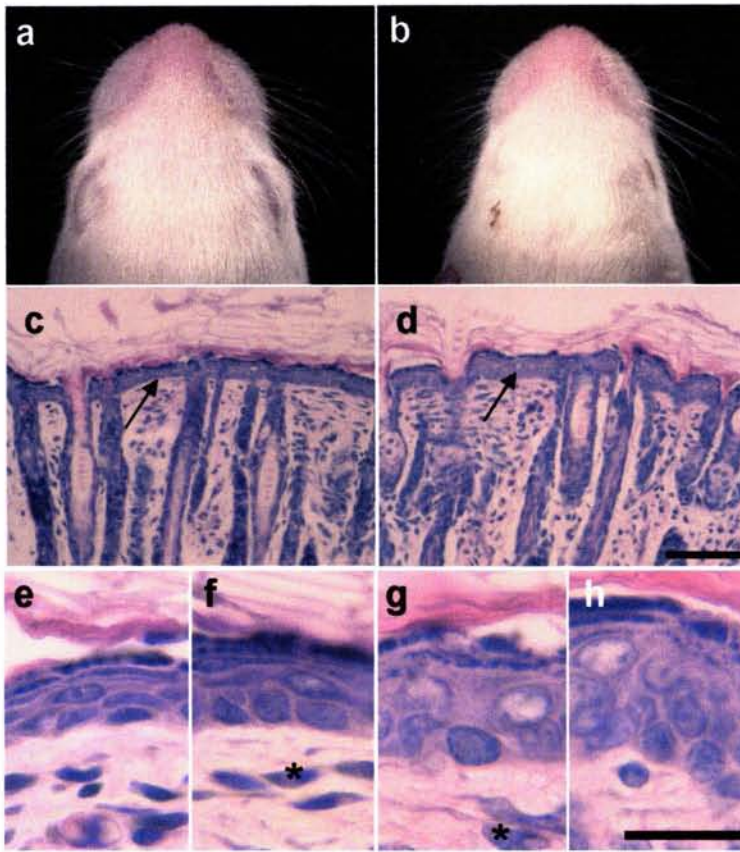


Figura 16 . Efecto de la remoción de los ojos al nacimiento sobre la anatomía de la cara y de la epidermis del cachete de la rata de 10DP. En las ratas ciegas de 10DP, el hocico adquiere una apariencia afilada (compare (b) con (a)). Además, la epidermis (flechas en c y d) de ratas ciegas es más gruesa que en la rata control. Las células del estrato basal epidérmico en el cachete de ratas ciegas se observan hipertróficas, por lo que la estratificación de la epidermis está distorsionada. En la epidermis de la rata control se observan zonas en las que predominan las células fusiformes, con núcleos aplanados de cromatina semicondensada (e). Con menor frecuencia se encuentran zonas que muestran células ovaladas con núcleos de cromatina dispersa (f). En cambio, la epidermis de la rata ciega presenta, generalmente, células esféricas con núcleos de mayor tamaño y de cromatina dispersa (g y h). Además, los fibroblastos (asteriscos) muestran más citoplasma y un núcleo de cromatina dispersa y de mayor tamaño en las ratas ciegas. Barra de escala: en c y d = a 60 μ m; en e-f = 20 μ m.

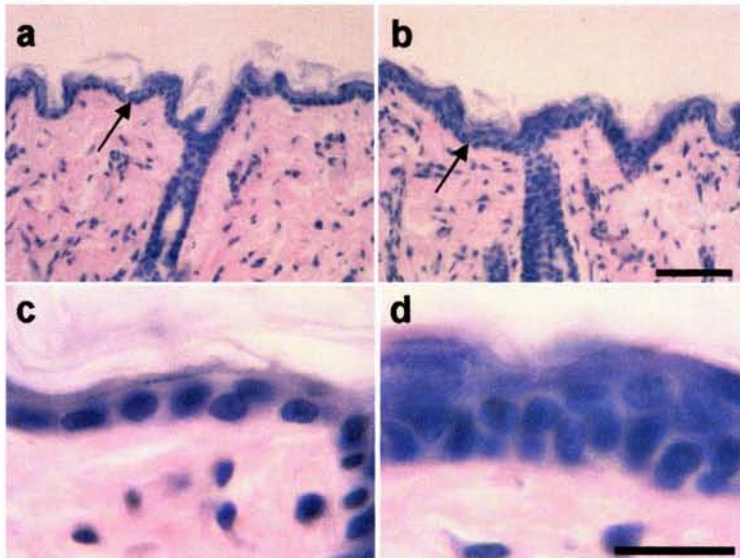


Figura 17 . Efecto de la remoción de los ojos al nacimiento sobre la anatomía de la epidermis del cachete de la rata de 60DP. También a esta edad la epidermis (flechas en a y b) de ratas ciegas (b) es más gruesa que en la rata control (a). Respecto de la epidermis de la rata control (c), la epidermis de la rata ciega (d) presenta con mayor frecuencia núcleos de mayor tamaño y con cromatina dispersa. Barra de escala: en a y b = a 60 μ m; en c y d = 20 μ m.

Discusión

La expansión de la representación corporal de S1 en ratas ciegas procede de independientemente de factores periféricos

La pérdida de la visión en mamíferos conduce a una expansión de la representación corporal en la corteza somatosensorial primaria (S1). A la fecha no se sabe con certeza cuáles son los factores inductores de esta reorganización. Se ha propuesto, sin embargo, que el incremento de la actividad neuronal asociada al uso de los receptores periféricos somatosensoriales podría conducir, a través de la liberación de factores de crecimiento, a la expansión de S1 en animales ciegos^{1-8,11-14}. En contra de esta idea, encontramos que la actividad neuronal, evaluada a partir de las tinciones histoquímicas para la citocromo oxidasa, es muy similar entre ratas control y ciegas de ambos sexos y en los diferentes grupos de edad. La ausencia de diferencia no se debe a la falta de sensibilidad de la técnica, pues se observó un aumento significativo en la intensidad de la marca histoquímica con la edad. Por otro lado, el análisis densitométrico no se restringió a la población neuronal del ganglio del trigémino asociada a las vibrisas. De esta forma, cabe la posibilidad que esta circunstancia haya oscurecido aumentos discretos del metabolismo oxidativo en las neuronas que inervan específicamente a las vibrisas. Sin embargo, en ratas ciegas la representación completa de la cabeza en S1 se expande, incluso en mayor proporción que la representación de las vibrisas¹³. Por lo que, si se asume que el aumento en la actividad neuronal periférica induce la expansión de la representación de la cabeza en S1, se esperaría que la actividad de la citocromo oxidasa aumentara en la mayoría de las neuronas del ganglio trigémino. No obstante, es difícil descartar, con base en nuestros resultados, que existan cambios discretos en la actividad de las neuronas ganglionares.

Otro de los elementos que se han considerado como parámetros indicadores del aumento de la actividad neuronal asociada al uso es el incremento en longitud de las vibrisas faciales en animales ciegos, también promovida por el aumento de la disponibilidad de factores de crecimiento^{5,12}. Sin embargo, este argumento pierde sustento ante las observaciones de que 1) las ratas albinas ciegas no presentan

incrementos en la longitud ni variaciones en el ritmo de crecimiento de sus vibrisas y 2) el porcentaje de expansión de la representación cortical de las vibrisas en ratas albinas enceguecidas al nacimiento es muy similar a la observada en ratas y ratones pigmentados cuya visión se supone que es mejor^{12,13,89}. No obstante, podría ser que nuestro método para registrar el ritmo de crecimiento de las vibrisas no fuera lo suficientemente sensible para registrar pequeños cambios. Esta posibilidad no parece ser favorecida porque en nuestras mediciones detectamos que el ciclo de crecimiento en hembras es ligeramente más corto que en machos, lo que coincide con trabajos previos^{72,90}. En conjunto, nuestras observaciones indican que la actividad neuronal asociada al uso de la vía trigeminal no participa de manera importante en la inducción de la reorganización cortical en animales ciegos. En apoyo a esta conclusión, se sabe que el movimiento voluntario de las vibrisas empieza alrededor del día 12 posnatal³², al menos cinco días después de que ocurre la expansión de S1³⁷. También se ha mostrado que la organización modular y el tamaño de los módulos a lo largo del sistema trigeminal no se modifican en roedores mutantes con malformaciones del pelo de las vibrisas, pero con folículos e inervación intactos⁹¹⁻⁹³. Además, la actividad espontánea y provocada en la corteza cerebral es muy baja en el tiempo que ocurre la expansión de S1³⁵. Finalmente, nuestras observaciones concuerdan con datos obtenidos en el sistema visual en el que se ha documentado la participación reducida de la actividad neuronal asociada al uso durante la formación y plasticidad de las columnas de dominancia ocular^{22,94-102}.

Otra posibilidad para explicar la expansión de S1 en individuos ciegos es el incremento en la densidad de inervación periférica, debido a que se asume que el área relativa de las sub-representaciones corporales en S1 es proporcional a la densidad de inervación del segmento corporal representado^{42,43}. No obstante, nuestros resultados muestran que este pudiera no ser el caso porque el número de células de Merkel en las vibrisas de las ratas ciegas es menor al término de la primera semana de vida. Este dato sugiere que el número de las terminales axónicas asociadas a este tipo de mecanorreceptor está disminuido con respecto a las ratas control durante el periodo en el que ocurre la expansión de S1. A pesar de

esta conclusión, existe también la posibilidad de que las células de Merkel sólo determinen la organización anatómica de la representación de las vibrisas³⁹ y no el tamaño de la misma; situación que no podemos descartar hasta el momento. Al respecto, sería importante determinar si la densidad de otro tipo de receptores táctiles se modifica en las ratas ciegas durante el periodo crítico de formación de S1.

Por mucho tiempo se ha pensado que la periferia instruye la organización y reorganización de la corteza cerebral. Sin embargo, el no encontrar diferencias ni en la actividad metabólica ni en la densidad de inervación apunta a que los cambios centrales ocurren, hasta cierto punto, independientemente de la periferia. En apoyo a esta idea, se ha mostrado que existe una desproporción entre la densidad de inervación y el tamaño de los módulos corticales que representan a los órganos táctiles en el topo con nariz estrellada, en ratones normales de distintas cepas y en aquellos con alteraciones en la disponibilidad del factor de crecimiento similar a insulina tipo 1^{40,42,43,103} (aunque ver⁴¹). Adicionalmente, algunos estudios han mostrado que el tamaño de la representación cortical de las vibrisas no se modifica, aun cuando la densidad de inervación aumente o disminuya en las vibrisas de roedores^{51,104}. Así la expansión de S1 en animales ciegos pudiera darse por interacciones de los elementos corticales independientemente de la periferia sensorial e incluso de relevos centrales subcorticales^{105,106}. Por ejemplo, en un paradigma de plasticidad de las columnas de dominancia ocular en la corteza visual del gato se ha observado que los cambios corticales guían la reorganización de las aferentes talamocorticales¹⁰⁶.

En las ratas ciegas se modifican las relaciones tróficas periféricas

Las neuronas establecen interacciones tróficas de larga duración con sus órganos blancos. Estas interacciones promueven la supervivencia y mantienen la integridad estructural y funcional tanto de las neuronas como de su órgano blanco. En años recientes se ha documentado que las interacciones tróficas entre los nervios y sus blancos periféricos son mediadas por las neurotrofinas. Ratones

manipulados genéticamente, en los cuales se sobreexpresa o se abate la expresión de las neurotrofinas, muestran incrementos o decrementos en la densidad de inervación, respectivamente^{50,52-54,56,107-110}. Así los datos que muestran cambios en el número de células de Merkel, y por inferencia en la inervación asociada a ellas, sugieren que las interacciones tróficas periféricas en animales ciegos difieren de aquellas presentes en las ratas control. Esto es particularmente interesante, puesto que el desarrollo y supervivencia posnatal de las terminales de Merkel en la piel y en las vibrisas de la rata depende de la presencia de NT-3^{44,49,50,54,56,58,107,111}. En concordancia, observamos que el contenido de NT-3 en el cachete de las ratas ciegas difiere del control, dependiendo de la edad y del sexo. En términos generales, esta variación fue correlativa con el número de células de Merkel. Así la disminución del contenido de NT-3 durante los primeros días de vida se asocia a un bajo número de células de Merkel en las ratas ciegas. Esto podría deberse a la disminución en la proliferación celular debido a que el número máximo de células de Merkel se alcanza alrededor de 7DP⁸⁰. En contraste con lo observado en animales jóvenes, el contenido de NT-3 tiende a aumentar a partir de 15DP y permanece alto por más tiempo hasta la etapa adulta. Creemos que estos cambios en el contenido de NT-3 podrían aminorar la muerte de las células de Merkel durante el primer mes de vida y promover el crecimiento local de los axones. Ambos procesos mantendrían constante el número de células de Merkel entre los 30DP y 60DP. Nuestra interpretación se fortalece por el hecho de que en las hembras ciegas el contenido de NT-3 permanece bajo por más tiempo que en los machos ciegos. Esto se asocia a que las hembras ciegas presenten, relativamente, un menor número de células de Merkel que los machos ciegos a los 10DP. Además, en estudios realizados en cultivos organotípicos de la vía del trigémino, se ha reportado que la NT-3 promueve el crecimiento de la arborización terminal de los axones en el cachete de la rata⁴⁸. Nuestros resultados sugieren que la dependencia por factores neurotróficos de las diversas terminales nerviosas en las vibrisas se conserva durante la etapa adulta (ver ⁵⁸).

Por otro lado, se sabe que la epidermis denervada reduce drásticamente su grosor^{78,112,113}, probablemente, por una disminución de la disponibilidad de los factores

neurotróficos¹¹⁴. Además, la sobreexpresión tanto de BDNF como de NT-3 en ratones transgénicos conduce a un engrosamiento de la piel en la región del lomo¹¹⁴. En este sentido, el aumento de NT3 en el cachete de ratas macho ciegas de 10DP y en hembras ciegas de 60DP podría explicar el engrosamiento de la piel, a través de un incremento en la proliferación de los queratinocitos¹¹⁵. En cambio, el hecho de que la epidermis aumente su grosor en hembras ciegas de 10DP y machos ciegos de 60DP, edades en las que no se modifica el contenido de NT-3 en el cachete, sugiere que otras neurotrofinas pudieran modificar su contenido. En apoyo a esta idea, hemos observado que el número de células cebadas asociadas a los nervios y la dermis de la piel del cachete aumenta en las ratas ciegas. Se sabe que el incremento de NGF en la piel promueve la diferenciación de las células cebadas y su invasión a la piel y otros órganos^{116,117}. Además, el hecho de que las células epidérmicas de la rata presenten citoplasma abundante y núcleos de mayor tamaño con cromatina dispersa indica que la actividad sintética aumenta en los queratinocitos. Respecto de la dermis, observamos un aumento en el contenido fibrilar de la matriz extracelular en los cachetes de las ratas ciegas a los 10DP; pero no en las ratas adultas. Estos datos apuntan a que la actividad secretora de los fibroblastos aumenta durante los primeros días de vida de las ratas ciegas. Esto es apoyado por la diferencia en el tamaño celular y nuclear y la disposición de la cromatina observada entre fibroblastos de cachete de ratas ciegas y control.

En conjunto, los resultados discutidos indican que las relaciones tróficas entre el sistema nervioso periférico y el cuerpo cambian en los individuos ciegos. En apoyo a este último punto, hemos obtenido evidencia preliminar que documentan cambios en el contenido de NT-3 en la piel de espalda de ratas hembras ciegas (fig. 18)

Dimorfismo sexual en la reorganización periférica tras la remoción de los ojos

Nuestros resultados indican que los procesos de reorganización periférica en ratas ciegas, aunque similares en su patrón, difieren en ambos sexos en la magnitud de las respuestas y el tiempo en el que ocurren los eventos. Por ejemplo, en las hembras ciegas, al término de la primera semana de vida, hay menos células

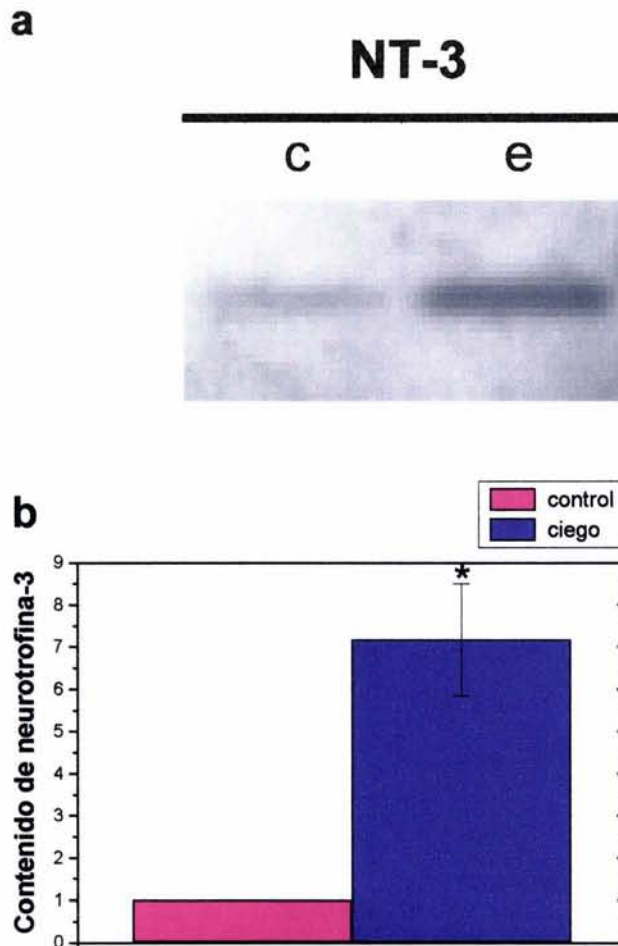


Figura 18. Contenido de neurotrofina-3 (NT-3) en la piel de la espalda de la rata hembra adulta. En **a)** se ilustra una transferencia Western representativa en la que se identifican las bandas inmunoreactivas a NT-3 de ratas control (c) y ciegas (e). La gráficas muestra el contenido de NT-3 en homogenados de piel de espalda de ratas de hembra de 60DP, control (**a**) y ciegos (**b**). t de Student * $p < 0.009$. (n=3)

de Merkel que en los machos ciegos de la misma edad. Además, las hembras ciegas muestran un incremento en el número de células de Merkel hasta a los 60DP, mientras que en los machos ciegos esto ocurre hacia los 30DP. El dimorfismo de la reorganización periférica no es sorprendente, pues existe numerosa evidencia que documenta diferencias estructurales y funcionales en el cerebro¹¹⁸ y el cuerpo¹¹⁹ entre los sexos. Igualmente, se sabe que la temporalidad de los procesos de desarrollo es diferente entre sexos (i.e. heterocronía). Es decir, algunos rasgos fenotípicos alcanzan más rápidamente la madurez en hembras,

mientras que para otros rasgos son los machos quienes maduran antes. Así, es probable que los cachetes tengan un desarrollo heterocrónico en machos y hembras. En apoyo a esta posibilidad, tanto el contenido de NT-3 como el crecimiento de las vibrisas difieren entre ambos sexos en ratas control y ciegas. Además, debido a que existe un dimorfismo corporal, y dado que el cerebro y el cuerpo intercambian información constantemente¹²⁰, no es raro que el cerebro refleje este dimorfismo en los procesos de reorganización. Finalmente, el hecho de que la reorganización periférica muestre diferencias entre ambos sexos desde los primeros días de vida, sugiere que esta reorganización es dimórfica tiempo antes de la diferenciación sexual gonadal. Esta conclusión está de acuerdo con datos que muestran que varias características dimórficas del cerebro ya están determinadas en etapas tempranas del desarrollo embrionario por una serie de interacciones entre los genes y otros factores, diferentes a hormonas sexuales, antes del inicio formal de la función gonadal^{119,121}.

Consideraciones sobre la reorganización periférica en la ceguera

Recientemente, algunos estudios han documentado que en los individuos ciegos algunas habilidades sensoriales discriminativas mejoran, permanecen igual o empeoran²¹. Estos cambios podrían ser producto tanto de la reorganización central como de la periférica. La mayor parte de los estudios se han dedicado a investigar los mecanismos centrales y se han dejado de lado los posibles cambios en la organización periférica. Así, cobra importancia el estudio de las modificaciones en el número o la distribución de los receptores táctiles de los ciegos y de las relaciones tróficas entre el sistema nervioso y el cuerpo. Por eso, es sobresaliente el hecho de que cambie el número de al menos un tipo de mecanorreceptor en las vibrisas de ratas ciegas adultas. Al respecto, si bien faltaría determinar si otro tipo de receptores táctiles modifican su densidad y/o localización en las vibrisas de ratas ciegas, se sabe que la NT-3 también afecta el desarrollo y mantenimiento de terminales nerviosas longitudinales y transversales lanceoladas, de Ruffini y reticulares⁵⁶. Así, nuestros resultados sugieren que los cambios en el

aparato de mecanosensación pudieran conducir a modificaciones en el desempeño de tareas de discriminación táctil de animales ciegos. En apoyo a esta posibilidad, se han reportado datos que muestran cambios en la conducta exploratoria asociados a modificaciones en los campos receptivos, velocidades umbral de respuesta y sensibilidad a cambios en la orientación del estímulo de las neuronas corticales en roedores ciegos¹²².

En general, el fenómeno de variación de la cantidad de NT-3 en ratas ciegas es interesante porque se ha reportado que distintas combinaciones de neurotrofinas durante el desarrollo determinan el fenotipo sensorial de la inervación que llega a un órgano periférico sin cambiar el número de neuronas ganglionares⁴⁵. Esto apunta a que si en los ciegos predominan ciertas combinaciones de neurotrofinas, probablemente se favorezcan determinados arreglos de la inervación táctil. Este efecto, no se restringiría al desarrollo temprano, pues el BDNF regula la sensibilidad de los mecanorreceptores de adaptación lenta en ratones adultos¹²³. Por las razones expuestas sería fundamental evaluar si otras neurotrofinas varían su expresión en los animales ciegos, ya que ayudaría a comprender por qué los ciegos son mejores en algunas tareas discriminativas y en otras no.

Se ha documentado que el número de mecanorreceptores decrece con la edad^{57,124,125}. Este decremento se acompaña de una pérdida en la capacidad discriminativa fina y de vibración. Debido a que los niveles de NT-3 se mantienen altos hasta muy avanzada edad sería muy importante evaluar si el aparato mecanosensorial y las capacidades discriminativas de ratas ciegas asemejan a aquellas observadas en ratas ciegas jóvenes. De ser cierto esto, nuestros resultados sugerirían que la reorganización neuronal periférica modifica la temporalidad de los eventos de desarrollo de sus blancos en el cuerpo.

Por último, cabe destacar que este trabajo muestra por primera vez algunas de las modificaciones anatómicas y bioquímicas del aparato mecanosensorial de individuos ciegos. Estas modificaciones pueden constituir la base neurobiológica formal de las diferencias en discriminación táctil que tan frecuentemente son referidas.

Agradecimientos

Agradezco de manera muy especial a la *Choma* y al *Modosan* por el apoyo invaluable durante mis estudios. A Gabriel y Eileen quienes han hecho divertido este camino. Al Dr. Luis Vaca por darme acceso a su equipo para la realización de las inmunotransferencias. Además agradezco la asistencia brindada por Adolfo en el suministro de animales y a Martha, Poncho, Mary y Lucy por el apoyo en la búsqueda de material bibliográfico.

Este proyecto fue hecho gracias al apoyo de CONACYT a través de los proyectos J28Q35N y 38615N.

Bibliografía

1. Uhl F, Franzen P, Lindinger G, Lang W, Deecke L: On the functionality of the visually deprived occipital cortex in early blind persons. *Neurosci Lett* 1991, 124:256-259
2. Sadato N, Pascual-Leone A, Grafman J, Deiber MP, Ibanez V, Hallett M: Neural networks for Braille reading by the blind. *Brain* 1998, 121 (Pt 7):1213-1229
3. Leclerc C, Saint-Amour D, Lavoie ME, Lassonde M, Lepore F: Brain functional reorganization in early blind humans revealed by auditory event-related potentials. *Neuroreport* 2000, 11:545-550
4. Arno P, De Volder AG, Vanlierde A, Wanet-Defalque MC, Streeel E, Robert A, Sanabria-Bohorquez S, Veraart C: Occipital activation by pattern recognition in the early blind using auditory substitution for vision. *Neuroimage* 2001, 13:632-645
5. Rauschecker JP: Compensatory plasticity and sensory substitution in the cerebral cortex. *Trends Neurosci* 1995, 18:36-43
6. Rauschecker JP: Cortical plasticity and music. *Ann N Y Acad Sci* 2001, 930:330-336
7. Kujala T, Alho K, Naatanen R: Cross-modal reorganization of human cortical functions. *Trends Neurosci* 2000, 23:115-120
8. Bavelier D, Neville HJ: Cross-modal plasticity: where and how? *Nat Rev Neurosci* 2002, 3:443-452
9. Calia E, Persico AM, Baldi A, Keller F: BDNF and NT-3 applied in the whisker pad reverse cortical changes after peripheral deafferentation in neonatal rats. *Eur J Neurosci* 1998, 10:3194-3200
10. Van der Loos H, Woolsey TA: Somatosensory cortex: structural alterations following early injury to sense organs. *Science* 1973, 179:395-398
11. Bronchti G, Schonenberger N, Welker E, Van der Loos H: Barreffield expansion after neonatal eye removal in mice. *Neuroreport* 1992, 3:489-492
12. Rauschecker JP, Tian B, Korte M, Egert U: Crossmodal changes in the somatosensory vibrissa/barrel system of visually deprived animals. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992, 89:5063-5067
13. Zheng D, Purves D: Effects of increased neural activity on brain growth. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995, 92:1802-1806

14. Toldi J, Farkas T, Volgyi B: Neonatal enucleation induces cross-modal changes in the barrel cortex of rat. A behavioural and electrophysiological study. *Neurosci Lett* 1994a, 167:1-4
15. Kahn DM, Krubitzer L: Massive cross-modal cortical plasticity and the emergence of a new cortical area in developmentally blind mammals. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2002, 99:11429-11434
16. Pascual-Leone A, Cammarota A, Wassermann EM, Brasil-Neto JP, Cohen LG, Hallett M: Modulation of motor cortical outputs to the reading hand of braille readers. *Ann Neurol* 1993, 34:33-37
17. Pascual-Leone A, Hamilton R, Tormos J, Keenan J, Catalá M: Neuroplasticity in the adjustment to blindness. *Neuronal plasticity: Building a bridge from the laboratory to the clinic*. Edited by Grafman J, Christen Y. Berlin, Springer-Verlag, 1999, pp 93-108
18. Rauschecker JP: Auditory cortical plasticity: a comparison with other sensory systems. *Trends Neurosci* 1999, 22:74-80
19. Sterr A, Muller MM, Elbert T, Rockstroh B, Pantev C, Taub E: Changed perceptions in Braille readers. *Nature* 1998a, 391:134-135
20. Sterr A, Muller MM, Elbert T, Rockstroh B, Pantev C, Taub E: Perceptual correlates of changes in cortical representation of fingers in blind multifinger Braille readers. *J Neurosci* 1998b, 18:4417-4423
21. Sathian K: Practice makes perfect: sharper tactile perception in the blind. *Neurology* 2000, 54:2203-2204
22. Yuste R, Sur M: Development and plasticity of the cerebral cortex: from molecules to maps. *J Neurobiol* 1999, 41:1-6
23. Polley DB, Chen-Bee CH, Frostig RD: Two directions of plasticity in the sensory-deprived adult cortex. *Neuron* 1999, 24:623-637
24. Recanzone GH, Allard TT, Jenkins WM, Merzenich MM: Receptive-field changes induced by peripheral nerve stimulation in SI of adult cats. *J Neurophysiol* 1990, 63:1213-1225
25. Recanzone GH, Jenkins WM, Hradek GT, Merzenich MM: Progressive improvement in discriminative abilities in adult owl monkeys performing a tactile frequency discrimination task. *J Neurophysiol* 1992, 67:1015-1030
26. Recanzone GH, Merzenich MM, Jenkins WM: Frequency discrimination training engaging a restricted skin surface results in an emergence of a cutaneous response zone in cortical area 3a. *J Neurophysiol* 1992, 67:1057-1070
27. Recanzone GH, Merzenich MM, Jenkins WM, Grajski KA, Dinse HR: Topographic reorganization of the hand representation in cortical area 3b owl monkeys trained in a frequency-discrimination task. *J Neurophysiol* 1992, 67:1031-1056
28. Elbert T, Sterr A, Flor H, Rockstroh B, Knecht S, Pantev C, Wienbruch C, Taub E: Input-increase and input-decrease types of cortical reorganization after upper extremity amputation in humans. *Exp Brain Res* 1997, 117:161-164
29. Jenkins WM, Merzenich MM, Ochs MT, Allard T, Guic-Robles E: Functional reorganization of primary somatosensory cortex in adult owl monkeys after behaviorally controlled tactile stimulation. *J Neurophysiol* 1990, 63:82-104
30. Killackey HP, Dawson DR: Expansion of the Central Hindpaw Representation Following Fetal Forelimb Removal in the Rat. *Eur J Neurosci* 1989, 1:210-221
31. Woolsey TA, Wann JR: Areal changes in mouse cortical barrels following vibrissal damage at different postnatal ages. *J Comp Neurol* 1976, 170:53-66
32. Welker W: Analysis of sniffing of the albino rat. *Behavior* 1964, 12:223-244
33. Micheva KD, Beaulieu C: Development and plasticity of the inhibitory neocortical circuitry with an emphasis on the rodent barrel field cortex: a review. *Can J Physiol Pharmacol* 1997, 75:470-478
34. Nicolelis MA, De Oliveira LM, Lin RC, Chapin JK: Active tactile exploration influences the functional maturation of the somatosensory system. *J Neurophysiol* 1996, 75:2192-2196
35. Landers MS, Sullivan RM: Vibrissae-evoked behavior and conditioning before functional ontogeny of the somatosensory vibrissae cortex. *J Neurosci* 1999, 19:5131-5137
36. Armstrong-James M: The functional status and columnar organization of single cells responding to cutaneous stimulation in neonatal rat somatosensory cortex S1. *J Physiol* 1975, 246:501-538

37. Geovannini H, Martínez-Martínez E, Uribe-Querol E, Santiago C, Hernández-Echeagaray E, Barrios-Álvarez F, Patricia P, Gutiérrez-Ospina G: Does use-dependent neuronal activity promote the intramodal component of plasticity in the primary somatosensory cortex of developing blind rats? , (*en preparación*)
38. Geovannini H, Santiago C, Robles S, Diaz-Cintra S, Favila R, Barrios F, Gutiérrez-Ospina G: Evaluation of proximate mechanisms underlying cross-modal plasticity in the developing rat primary somatosensory cortex (S1). *Soc Neurosci Abs* 2000, 26:2114
39. Killackey HP, Rhoades RW, Bennett-Clarke CA: The formation of a cortical somatotopic map. *Trends Neurosci* 1995, 18:402-407
40. Welker E, Van der Loos H: Quantitative correlation between barrel-field size and the sensory innervation of the whiskerpad: a comparative study in six strains of mice bred for different patterns of mystacial vibrissae. *J Neurosci* 1986, 6:3355-3373
41. Lee KJ, Woolsey TA: A proportional relationship between peripheral innervation density and cortical neuron number in the somatosensory system of the mouse. *Brain Res* 1975, 99:349-353
42. Catania KC, Kaas JH: The unusual nose and brain of the star-nosed mole. *Bioscience* 1996, 46:578-586
43. Catania KC: A nose that looks like a hand and acts like an eye: the unusual mechanosensory system of the star-nosed mole. *J Comp Physiol [A]* 1999, 185:367-372
44. Huang EJ, Reichardt LF: Neurotrophins: roles in neuronal development and function. *Annu Rev Neurosci* 2001, 24:677-736
45. Lewin GR, Barde YA: Physiology of the neurotrophins. *Annu Rev Neurosci* 1996, 19:289-317
46. Segal RA, Greenberg ME: Intracellular signaling pathways activated by neurotrophic factors. *Annu Rev Neurosci* 1996, 19:463-489
47. Ibanez CF, Ernfors P, Timmusk T, Ip NY, Arenas E, Yancopoulos GD, Persson H: Neurotrophin-4 is a target-derived neurotrophic factor for neurons of the trigeminal ganglion. *Development* 1993, 117:1345-1353
48. Ulupinar E, Jacquin MF, Erzurumlu RS: Differential effects of NGF and NT-3 on embryonic trigeminal axon growth patterns. *J Comp Neurol* 2000, 425:202-218
49. Cronk KM, Wilkinson GA, Grimes R, Wheeler EF, Jhaveri S, Fundin BT, Silos-Santiago I, Tessarollo L, Reichardt LF, Rice FL: Diverse dependencies of developing Merkel innervation on the trkA and both full-length and truncated isoforms of trkC. *Development* 2002, 129:3739-3750
50. Albers KM, Wright DE, Davis BM: Overexpression of nerve growth factor in epidermis of transgenic mice causes hypertrophy of the peripheral nervous system. *J Neurosci* 1994, 14:1422-1432
51. Jhaveri S, Erzurumlu RS, Laywell ED, Steindler DA, Albers KM, Davis BM: Excess nerve growth factor in the periphery does not obscure development of whisker-related patterns in the rodent brain. *J Comp Neurol* 1996, 374:41-51
52. Davis BM, Fundin BT, Albers KM, Goodness TP, Cronk KM, Rice FL: Overexpression of nerve growth factor in skin causes preferential increases among innervation to specific sensory targets. *J Comp Neurol* 1997, 387:489-506
53. LeMaster AM, Krimm RF, Davis BM, Noel T, Forbes ME, Johnson JE, Albers KM: Overexpression of brain-derived neurotrophic factor enhances sensory innervation and selectively increases neuron number. *J Neurosci* 1999, 19:5919-5931
54. Albers KM, Perrone TN, Goodness TP, Jones ME, Green MA, Davis BM: Cutaneous overexpression of NT-3 increases sensory and sympathetic neuron number and enhances touch dome and hair follicle innervation. *J Cell Biol* 1996, 134:487-497
55. Rice FL, Albers KM, Davis BM, Silos-Santiago I, Wilkinson GA, LeMaster AM, Ernfors P, Smeyne RJ, Aldskogius H, Phillips HS, Barbacid M, DeChiara TM, Yancopoulos GD, Dunne CE, Fundin BT: Differential dependency of unmyelinated and A delta epidermal and upper dermal innervation on neurotrophins, trk receptors, and p75LNGFR. *Dev Biol* 1998, 198:57-81
56. Fundin BT, Silos-Santiago I, Ernfors P, Fagan AM, Aldskogius H, DeChiara TM, Phillips HS, Barbacid M, Yancopoulos GD, Rice FL: Differential dependency of cutaneous

- mechanoreceptors on neurotrophins, trk receptors, and P75 LNGFR. *Dev Biol* 1997, 190:94-116
57. Bergman E, Fundin BT, Ulfhake B: Effects of aging and axotomy on the expression of neurotrophin receptors in primary sensory neurons. *J Comp Neurol* 1999, 410:368-386
 58. Bergman E, Ulfhake B, Fundin BT: Regulation of NGF-family ligands and receptors in adulthood and senescence: correlation to degenerative and regenerative changes in cutaneous innervation. *Eur J Neurosci* 2000, 12:2694-2706
 59. Coleman JR: Development of sensory systems in mammals. New York, Wiley, 1990, pp xxi, 628
 60. Rice FL, Mance A, Munger BL: A comparative light microscopic analysis of the sensory innervation of the mystacial pad. I. Innervation of vibrissal follicle-sinus complexes. *J Comp Neurol* 1986, 252:154-174
 61. Renehan WE, Munger BL: Degeneration and regeneration of peripheral nerve in the rat trigeminal system. II. Response to nerve lesions. *J Comp Neurol* 1986, 249:429-459
 62. Rice FL, Kinnman E, Aldskogius H, Johansson O, Arvidsson J: The innervation of the mystacial pad of the rat as revealed by PGP 9.5 immunofluorescence. *J Comp Neurol* 1993, 337:366-385
 63. Rice FL, Fundin BT, Arvidsson J, Aldskogius H, Johansson O: Comprehensive immunofluorescence and lectin binding analysis of vibrissal follicle sinus complex innervation in the mystacial pad of the rat. *J Comp Neurol* 1997, 385:149-184
 64. Renehan WE, Munger BL: Degeneration and regeneration of peripheral nerve in the rat trigeminal system. I. Identification and characterization of the multiple afferent innervation of the mystacial vibrissae. *J Comp Neurol* 1986, 246:129-145
 65. Ebara S, Kumamoto K, Matsuura T, Mazurkiewicz JE, Rice FL: Similarities and differences in the innervation of mystacial vibrissal follicle-sinus complexes in the rat and cat: a confocal microscopic study. *J Comp Neurol* 2002, 449:103-119
 66. Rice FL: Structure, vascularization, and innervation of the mystacial pad of the rat as revealed by the lectin Griffonia simplicifolia. *J Comp Neurol* 1993, 337:386-399
 67. Lazarov NE: Comparative analysis of the chemical neuroanatomy of the mammalian trigeminal ganglion and mesencephalic trigeminal nucleus. *Prog Neurobiol* 2002, 66:19-59
 68. Paxinos G: Trigeminal Sensory System. *The rat nervous system*. San Diego, Academic Press, 1995, pp 705-724
 69. Woolsey TA, Van der Loos H: The structural organization of layer IV in the somatosensory region (SI) of mouse cerebral cortex. The description of a cortical field composed of discrete cytoarchitectonic units. *Brain Res* 1970, 17:205-242
 70. Liu D, Diorio J, Day JC, Francis DD, Meaney MJ: Maternal care, hippocampal synaptogenesis and cognitive development in rats. *Nat Neurosci* 2000, 3:799-806
 71. Oshima H, RoCHAT A, Kedzia C, Kobayashi K, Barrandon Y: Morphogenesis and renewal of hair follicles from adult multipotent stem cells. *Cell* 2001, 104:233-245
 72. Ibrahim L, Wright EA: The growth of rats and mice vibrissae under normal and some abnormal conditions. *J Embryol Exp Morphol* 1975, 33:831-844
 73. Wong-Riley MT: Cytochrome oxidase: an endogenous metabolic marker for neuronal activity. *Trends Neurosci* 1989, 12:94-101
 74. Riddle DR, Gutierrez G, Zheng D, White LE, Richards A, Purves D: Differential metabolic and electrical activity in the somatic sensory cortex of juvenile and adult rats. *J Neurosci* 1993, 13:4193-4213
 75. Yasargil GM, Macintyre L, Doucette R, Visheau B, Holmes M, Diamond J: Axonal domains within shared touch domes in the rat: a comparison of their fate during conditions favoring collateral sprouting and following axonal regeneration. *J Comp Neurol* 1988, 270:301-312
 76. Killackey HP: Pattern formation in the trigeminal system of the rat. *Trends Neurosci* 1980, 3:303-306
 77. Nurse CA, Mearow KM, Holmes M, Visheau B, Diamond J: Merkel cell distribution in the epidermis as determined by quinacrine fluorescence. *Cell Tissue Res* 1983, 228:511-524
 78. Nurse CA, Macintyre L, Diamond J: A quantitative study of the time course of the reduction in Merkel cell number within denervated rat touch domes. *Neuroscience* 1984, 11:521-533

79. Nurse CA, Diamond J: A fluorescent microscopic study of the development of rat touch domes and their Merkel cells. *Neuroscience* 1984, 11:509-520
80. Nurse CA, Faraway L: Development of Merkel cell populations with contrasting sensitivities to neonatal deafferentation in the rat whisker pad. *Somatosens Mot Res* 1988, 6:141-162
81. Nurse CA, Macintyre L, Diamond J: Reinnervation of the rat touch dome restores the Merkel cell population reduced after denervation. *Neuroscience* 1984, 13:563-571
82. Schagger H, von Jagow G: Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal Biochem* 1987, 166:368-379
83. Wang GY, Hirai K, Odashima S: Quantitative cytochemical studies of cytochrome oxidase activity in rat dorsal root ganglion cells. *J Electron Microsc (Tokyo)* 1990, 39:231-237
84. Chalmers GR, Edgerton VR: Single motoneuron succinate dehydrogenase activity. *J Histochem Cytochem* 1989, 37:1107-1114
85. Carr PA, Yamamoto T, Staines WA, Whittaker ME, Nagy JI: Quantitative histochemical analysis of cytochrome oxidase in rat dorsal root ganglia and its co-localization with carbonic anhydrase. *Neuroscience* 1989, 33:351-362
86. Wong-Riley MT, Kageyama GH: Localization of cytochrome oxidase in the mammalian spinal cord and dorsal root ganglia, with quantitative analysis of ventral horn cells in monkeys. *J Comp Neurol* 1986, 245:41-61
87. Pette D, Smith ME, Staudte HW, Vrbova G: Effects of long-term electrical stimulation on some contractile and metabolic characteristics of fast rabbit muscles. *Pflügers Arch* 1973, 338:257-272
88. Brown MD, Cotter MA, Hudlicka O, Vrbova G: The effects of different patterns of muscle activity on capillary density, mechanical properties and structure of slow and fast rabbit muscles. *Pflügers Arch* 1976, 361:241-250
89. Geovannini H: Re-evaluación del papel de la actividad neuronal asociada con el uso y de la densidad de inervación periférica en la plasticidad sensoriomodal de la neocorteza de la rata. México, Universidad Nacional Autónoma de México, 2000
90. Lillesaar C, Hildebrand C: Denervation does not affect the growth of rat vibrissae. *Neurosci Lett* 1999, 261:69-72
91. Kuljis RO: Vibrissaeless mutant rats with a modular representation of innervated sinus hair follicles in the cerebral cortex. *Exp Neurol* 1992, 115:146-150
92. Genc B, Ma L, Erzurumlu RS: Whisker-related neural patterns develop normally despite severe whisker defects in *Msx2* knockout mice. *Brain Res Dev Brain Res* 2001, 132:107-111
93. Jhaveri S, Erzurumlu RS, Chiaia N, Kumar TR, Matzuk MM: Defective whisker follicles and altered brainstem patterns in activin and follistatin knockout mice. *Mol Cell Neurosci* 1998, 12:206-219
94. Sharma J, Angelucci A, Sur M: Induction of visual orientation modules in auditory cortex. *Nature* 2000, 404:841-847
95. Murphy KM, Duffy KR, Jones DG, Mitchell DE: Development of cytochrome oxidase blobs in visual cortex of normal and visually deprived cats. *Cereb Cortex* 2001, 11:122-135
96. Kuljis RO, Rakic P: Hypercolumns in primate visual cortex can develop in the absence of cues from photoreceptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1990, 87:5303-5306
97. Kennedy H, Dehay C, Horsburgh G: Striate cortex periodicity. *Nature* 1990, 348:494
98. Huberman AD, Wang GY, Liets LC, Collins OA, Chapman B, Chalupa LM: Eye-specific retinogeniculate segregation independent of normal neuronal activity. *Science* 2003, 300:994-998
99. Horton JC, Hocking DR: An adult-like pattern of ocular dominance columns in striate cortex of newborn monkeys prior to visual experience. *J Neurosci* 1996, 16:1791-1807
100. Hayes WP, Meyer RL: Impulse blockade by intraocular tetrodotoxin during optic regeneration in goldfish: HRP-EM evidence that the formation of normal numbers of optic synapses and the elimination of exuberant optic fibers is activity independent. *J Neurosci* 1989, 9:1414-1423
101. Godecke I, Bonhoeffer T: Development of identical orientation maps for two eyes without common visual experience. *Nature* 1996, 379:251-254

102. Crair MC, Gillespie DC, Stryker MP: The role of visual experience in the development of columns in cat visual cortex. *Science* 1998, 279:566-570
103. Gutierrez-Ospina G, Calikoglu AS, Ye P, D'Ercole AJ: In vivo effects of insulin-like growth factor-I on the development of sensory pathways: analysis of the primary somatic sensory cortex (S1) of transgenic mice. *Endocrinology* 1996, 137:5484-5492
104. Sikich L, Woolsey TA, Johnson EM, Jr.: Effect of a uniform partial denervation of the periphery on the peripheral and central vibrissal system in guinea pigs. *J Neurosci* 1986, 6:1227-1240
105. Fox K, Schlaggar BL, Glazewski S, O'Leary DD: Glutamate receptor blockade at cortical synapses disrupts development of thalamocortical and columnar organization in somatosensory cortex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996, 93:5584-5589
106. Taha S, Stryker MP: Rapid ocular dominance plasticity requires cortical but not geniculate protein synthesis. *Neuron* 2002, 34:425-436
107. Airaksinen MS, Koltzenburg M, Lewin GR, Masu Y, Helbig C, Wolf E, Brem G, Toyka KV, Thoenen H, Meyer M: Specific subtypes of cutaneous mechanoreceptors require neurotrophin-3 following peripheral target innervation. *Neuron* 1996, 16:287-295
108. Krimm RF, Davis BM, Albers KM: Cutaneous overexpression of neurotrophin-3 (NT3) selectively restores sensory innervation in NT3 gene knockout mice. *J Neurobiol* 2000, 43:40-49
109. Ritter AM, Woodbury CJ, Albers K, Davis BM, Koerber HR: Maturation of cutaneous sensory neurons from normal and NGF-overexpressing mice. *J Neurophysiol* 2000, 83:1722-1732
110. Stucky CL, Koltzenburg M, Schneider M, Engle MG, Albers KM, Davis BM: Overexpression of nerve growth factor in skin selectively affects the survival and functional properties of nociceptors. *J Neurosci* 1999, 19:8509-8516
111. Szeder V, Grim M, Kucera J, Sieber-Blum M: Neurotrophin-3 signaling in mammalian Merkel cell development. *Dev Dyn* 2003, 228:623-629
112. Burgess PR, English KB, Horch KW, Stensaas LJ: Patterning in the regeneration of type I cutaneous receptors. *J Physiol* 1974, 236:57-82
113. Chen WP, Chang YC, Hsieh ST: Trophic interactions between sensory nerves and their targets. *J Biomed Sci* 1999, 6:79-85
114. Botchkarev VA, Metz M, Botchkareva NV, Welker P, Lommatzsch M, Renz H, Paus R: Brain-derived neurotrophic factor, neurotrophin-3, and neurotrophin-4 act as "epitheliotrophins" in murine skin. *Lab Invest* 1999, 79:557-572
115. Huang IT, Lin WM, Shun CT, Hsieh ST: Influence of cutaneous nerves on keratinocyte proliferation and epidermal thickness in mice. *Neuroscience* 1999, 94:965-973
116. Matsuda H, Kannan Y, Ushio H, Kiso Y, Kanemoto T, Suzuki H, Kitamura Y: Nerve growth factor induces development of connective tissue-type mast cells in vitro from murine bone marrow cells. *J Exp Med* 1991, 174:7-14
117. Stead R, Perdue M, Blennerhassett M, Kakuta Y, P S, J B: The Innervation of Mast Cells. *The Neuroendocrine-immune network*. Edited by Freier S. Boca Raton, Fla., CRC Press, 1990, pp 19-37
118. Cooke B, Hegstrom CD, Villeneuve LS, Breedlove SM: Sexual differentiation of the vertebrate brain: principles and mechanisms. *Front Neuroendocrinol* 1998, 19:323-362
119. Gutierrez-Ospina G, Jimenez-Trejo FJ, Favila R, Moreno-Mendoza NA, Granados Rojas L, Barrios FA, Diaz-Cintra S, Merchant-Larios H: Acetylcholinesterase-positive innervation is present at undifferentiated stages of the sea turtle *Lepidochelis olivacea* embryo gonads: implications for temperature-dependent sex determination. *J Comp Neurol* 1999, 410:90-98
120. Purves D: *Body and brain : a trophic theory of neural connections*. Cambridge, Mass., Harvard University Press, 1988, pp 231 p.
121. Arnold AP: Genetically triggered sexual differentiation of brain and behavior. *Horm Behav* 1996, 30:495-505
122. Toldi J, Farkas T, Volgyi B: Neonatal enucleation induces cross-modal changes in the barrel cortex of rat. A behavioural and electrophysiological study. *Neurosci Lett* 1994, 167:1-4
123. Carroll P, Lewin GR, Koltzenburg M, Toyka KV, Thoenen H: A role for BDNF in mechanosensation. *Nat Neurosci* 1998, 1:42-46

124. Bruce MF: The relation of tactile thresholds to histology in the fingers of elderly people. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1980, 43:730-734
125. Hnik P: *Mechanoreceptors : development, structure, and function*. New York, Plenum Press, 1988, pp xv, 442