



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

---

---

**INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS  
FACULTAD DE MEDICINA**

**Plasticidad estructural y metabólica en el largo  
plazo de la musculatura asociada a las vibrisas**

**T E S I S**  
**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:**  
**Licenciada en Investigación Biomédica Básica**  
**P R E S E N T A**

**Brenda Toscano Márquez**

**DIRECTOR DE TESIS: Dr. Gabriel Gutiérrez Ospina**



**Ciudad Universitaria, México D.F.,**

**Mayo de 2006**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**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.

El presente trabajo fue realizado bajo la dirección del Dr. Gabriel Gutiérrez Ospina, en el laboratorio A107 del Departamento de Biología Celular y Fisiología del Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM, gracias al apoyo financiero del CONACYT, a través de los proyectos J28035N38615N y 45872M. Además se recibió beca del proyecto de CONACYT J28035N38615N.

## **AGRADECIMIENTOS**

Les agradezco de manera especial a mis padres, Yolanda y Rubén, por el amor, estímulo y apoyo incondicional que me brindan siempre, y a Lorena y Mari Fer por su comprensión y paciencia.

A los miembros del laboratorio: Abril, Esperanza, Horacio, Ingrid, Laura, Leonora, Luis, Miguel, Pancho y Sofia. Especialmente agradezco a Julieta, Eileen y Eduardo por la amistad, apoyo y ayuda que me brindaron durante estos años.

Hago extensivo mi agradecimiento a la M. en C. M. Patricia Padilla Cortés por su apoyo técnico-administrativo, y al señor José Guadalupe Baltasar por su apoyo técnico. Al personal del Bioterio del Instituto de investigaciones Biomédicas: Gerardo Arrellín Rosas y Adolfo Hernández Juárez por el suministro y cuidado de los animales. Al personal de la Biblioteca del Instituto de Investigaciones biomédicas: María Petra Muñoz García, Alfonso Martínez Amud y Erasto Brito Brito por su valiosa ayuda en la obtención del material bibliográfico.

Finalmente agradezco al Dr. Gabriel Gutiérrez Ospina por su asesoría y dirección en el trabajo de investigación.

## INDICE

INTRODUCCIÓN	1
ANTECEDENTES	
Plasticidad central y periférica en individuos con pérdida de visión	2
Plasticidad en el sistema motor central y periférico.	4
Plasticidad Muscular	5
Aparato motor asociado a vibrisas	7
JUSTIFICACIÓN	10
HIPÓTESIS	10
OBJETIVO	10
OBJETIVOS PARTICULARES	11
MATERIALES Y MÉTODOS	12
RESULTADOS	
La actividad de la enzima citocromo oxidasa en los músculos asociados a las vibrisas es mayor en las ratas enucleadas a partir de los 60 días de edad	18
La densidad capilar en las fibras musculares asociadas a las vibrisas es mayor en las ratas enucleadas	18
El tamaño de la placa neuromuscular incrementa en las ratas enucleadas a los 160 días de edad	21
La proporción de las fibras musculares rápidas y lentas se modifican con la edad pero no con la condición experimental	23
DISCUSIÓN	25
BIBLIOGRAFÍA	29

## RESUMEN

Estudios realizados en los individuos ciegos han documentado diferencias en sus habilidades somatosensoriales con relación a los sujetos sin pérdida de visión. Las diferencias parecen estar relacionadas con modificaciones en el sistema nervioso central y en el sistema nervioso periférico. Estos cambios se asocian con modificaciones en las estrategias de exploración. Debido a que existe una relación funcional estrecha entre los sistemas sensoriales y motor, es posible que estas diferencias conductuales y fisiológicas pudieran asociarse a cambios en la vía motora relacionada al movimiento de las vibrisas. En este trabajo se evaluó la morfología de las placas neuromusculares y parámetros metabólicos fisiológicos de las fibras musculares del bello de ratas control y enucleadas de 10, 60 y 160 días de edad. Se observó que tanto la actividad de la enzima citocromo oxidasa como la densidad de vasos sanguíneos de los músculos asociados a las vibrisas son similares en ambos grupos a los 10 días de edad. Sin embargo, a partir de los 60 días las ratas enucleadas presentaron una mayor actividad oxidativa y densidad vascular. No obstante, la proporción de fibras musculares rápidas y lentas no se modifica en las ratas enucleadas con respecto a los controles, en ninguna de las edades evaluadas. Por otro lado, el área de las placas neuromusculares en las ratas enucleadas fue mayor únicamente a los 160 días de edad. Nuestros resultados sugieren que en los individuos ciegos hay una reorganización del aparato motor periférico asociado a las vibrisas en el largo plazo que podría influir en la manera en que interactúan con el ambiente.

## INTRODUCCIÓN

Los individuos ciegos presentan reorganizaciones anatómicas (Rauschecker, 1995) y funcionales (Cohen et al., 1997; Theoret et al., 2004) en el sistema somatosensorial. Se piensa que modificaciones tanto centrales como periféricas podrían ser las responsables del aumento en la eficacia de las tareas de discriminación táctil (Van Boven et al., 2000; Goldreich and Kanics, 2003). Se sabe que la movilidad de las vibrisas en los roedores es importante para el desarrollo de las habilidades somatosensoriales y la adecuada adquisición de los estímulos táctiles (Nicoletti et al., 1996; Berg and Kleinfeld, 2003). Por otro lado, existe evidencia de que alteraciones en la vía sensorial repercuten en la vía motora. Por ejemplo, la activación de las vías sensoriales induce aumentos en la fuerza de contracción de los músculos (Conforto et al., 2002), mientras que la interrupción del flujo de la información sensorial da lugar a ramificaciones de la parte terminal de los axones de las motoneuronas. (Cuppini et al., 1999). En este sentido, la adquisición de la información sensorial depende de la estrecha interacción entre el sistema somatosensorial y motor durante la exploración del ambiente. Por este motivo es interesante explorar si los cambios en el sistema somatosensorial de ratas enucleadas se acompañan de modificaciones en el sistema motor. De esta forma las diferencias en la eficacia táctil de los individuos ciegos podrían influenciarse por un control refinado de los movimientos de las vibrisas (Cremieux et al., 1986; Toldi et al., 1994).

Con base en lo anterior, en este trabajo se evaluó la existencia de cambios en componentes periféricos de la vía motora de las vibrisas en ratas enucleadas al nacimiento. Se midieron las características morfológicas de las placas neuromusculares, las propiedades oxidativas y el tipo de isoformas de miosina presentes en los músculos de las vibrisas.

## ANTECEDENTES

### *Plasticidad central y periférica en individuos con pérdida de visión*

Desde hace tiempo, se reconoce que las habilidades tanto táctiles como auditivas, de los individuos ciegos se encuentran modificadas, siendo mejores para algunas tareas de discriminación (Goldreich and Kanics, 2003). Se cree que dichas modificaciones son el resultado de un mecanismo compensatorio a través del cual los individuos ciegos desarrollan alternativas fisiológicas y conductuales que les permiten adaptarse a su medio (Rauschecker, 1995). En particular, la pérdida de la visión durante etapas tempranas del desarrollo da lugar a cambios plásticos conocidos como sensoriomodales. Estos cambios están mejor documentados en la corteza cerebral. Entre los cambios corticales se observa un aumento en el área de las regiones que se encargan tanto del procesamiento de estímulos táctiles (somatosensorial primaria, S1) como del procesamiento de estímulos auditivos (auditiva primaria, A1) (Brochiti et al., 1992; Toldi et al., 1994). En S1, estos cambios anatómicos se asocian a modificaciones de la dimensión de los campos receptivos y de la sensibilidad angular de las neuronas corticales, es decir cambia la respuesta de las neuronas talámicas dependiendo de la dirección a la cual se mueve la vibrisa (Toldi et al., 1994). Además, se ha reportado la presencia de neuronas capaces de responder a estímulos táctiles y auditivos en el área que correspondería al procesamiento de estímulos visuales (corteza visual primaria, V1) (Kujala et al., 1995; Sadato et al., 1998) (figura 1, A y B).

Por otro lado, en el sistema somatosensorial periférico existen evidencias de modificaciones en órganos táctiles primarios tras la pérdida de la visión. Se ha observado, por ejemplo, hipertrofia del pelo de las vibrisas tanto en gatos como en roedores privados de la visión desde el nacimiento (Rauschecker et al., 1992). Un estudio reciente, realizado en este laboratorio, mostró que aunque las ratas enucleadas no presentaron diferencias en la longitud de las vibrisas, se



encontraron diferencias en la densidad de células de Merkel (i.e. mecanorreceptor de adaptación lenta) presentes en los folículos de las vibrisas en los animales enucleados desde el nacimiento (Martinez, 2004); figura 1, C y D). En ese mismo estudio, los animales enucleados presentaron además cambios en el grosor de la piel (figura 1, E y F) y en la disponibilidad de factores neurotróficos.

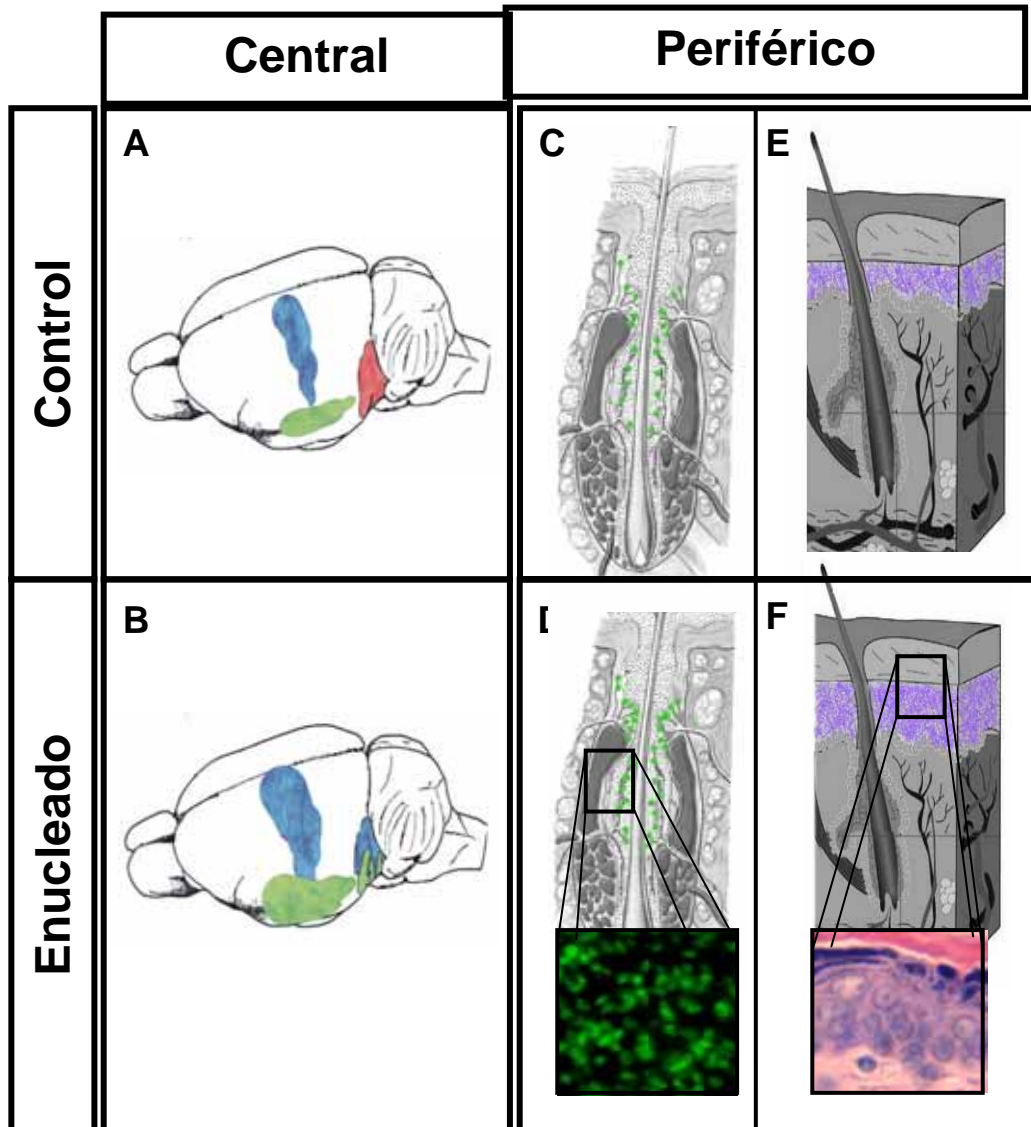


Figura 1. Cambios en el sistema nervioso central y periférico en los animales enucleados. Panel A-B: Esquemas que ilustran la distribución de las áreas auditivas (en verde), somatosensorial (en azul) y visual (en rojo) primarias en la corteza cerebral de ratas control (A) y enucleadas (B). Nótese la reactivación del área visual primaria por aferentes somatosensoriales y auditivas y la expansión de la corteza auditiva y somatosensorial primaria en los animales enucleados. Panel C-E: Esquemas y microfotografías que ilustran el aumento en el número de células de Merkel presentes en las vibrisas (C y D) y el aumento en el grosor de la epidermis (E y F) de animales enucleados (D y F) respecto a animales control (C y E).

## ***Plasticidad en el sistema motor central y periférico***

En el sistema nervioso, las vías sensoriales no son las únicas capaces de realizar procesos de plasticidad tanto en estructuras centrales como periféricas. Por ejemplo, se ha mostrado que el tamaño relativo de las representaciones de las distintas regiones corporales en la corteza motora se expande en respuesta a la actividad motora voluntaria (Wu et al., 2005), a la estimulación magnética transcranial (Ziemann et al., 2002) o a la estimulación artificial del músculo (Nudo et al., 1990). Además, se sabe que la estimulación de nervios sensoriales aumenta la excitabilidad de las neuronas corticales y expande las representaciones de la corteza motora (Hamdy et al., 1998; Ridding et al., 2000; Wu et al., 2005). Se han documentado modificaciones del sistema motor periférico como cambios en la ramificación de las terminales axónicas e incluso aumento en la fuerza de contracción de los músculos después de la estimulación sensorial (Cuppini et al., 1998; Cuppini et al., 1999; Conforto et al., 2002). En conjunto, se sugiere que estos cambios están involucrados en la adquisición de nuevas habilidades motoras o a cambios en la actividad de los músculos (Monfils et al., 2005; Tyc et al., 2005).

La plasticidad motora no se restringe a los relevos centrales, sino que se refleja en modificaciones anatómicas y funcionales de las motoneuronas. Así por ejemplo cuando la frecuencia de disparo de una motoneurona que inerva un músculo de contracción rápida disminuye a la frecuencia de una motoneurona de un músculo de contracción lenta, las características morfológicas de esa motoneurona se modifican (Sieck and Prakash, 1997). Algunas de estas modificaciones se observan en el diámetro del axón y en la placa neuromuscular. El área de placa neuromuscular del músculo lento es de menor tamaño y presenta invaginaciones más largas y numerosas que la de músculos rápidos. Asimismo, el número de las vesículas de las terminales de los músculos lentos es mayor que en las terminales de motoneuronas de contracción rápida (Padykula and Gauthier, 1970; Reid et al., 1999).

Por otro lado, los nervios motores se remodelan constantemente a lo largo del desarrollo. Los músculos en edades postnatales tempranas están inervados por dos o más motoneuronas. Esta polinervación se pierde alrededor de las dos primeras semanas postnatales para dar paso a la estabilización de la sinapsis entre el nervio y la motoneurona (Balice-Gordon and Lichtman, 1993; Colman and Lichtman, 1993). Sin embargo, puede volver a presentarse poli-inervación durante fenómenos de denervación. Bajo estas circunstancias, los nervios motores crecen e inervan fibras musculares vecinas perdiendo su especificidad. El proceso se revierte una vez re-establecida la comunicación neuromuscular (Bewick and Tonge, 1991; Zhou et al., 2002).

### ***Plasticidad Muscular***

El músculo esquelético, característico de todos los músculos voluntarios, constan de células largas multinucleadas que presentan un estriado característico debido al arreglo de las proteínas filamentosas, que en conjunto se denominan sarcómeras. Las sarcómeras constituyen la base mecánica de la contracción muscular (Squire, February 2001).

En términos generales, existen tres tipos de fibras musculares estriadas basados en sus características morfológicas y fisiológicas. Las fibras tipo I también llamadas lentas se caracterizan por utilizar preferentemente metabolismo aeróbico (i.e. la fosforilación oxidativa y la cadena respiratoria) como fuente de producción de ATP necesaria para la contracción. Este tipo de metabolismo les permite mantener las contracciones por períodos más largos y las hace resistentes a la fatiga. Se relacionan con velocidades de contracción bajas, por lo que se encuentran en músculos de postura o que realizan movimientos lentos en los que es necesario mantener una posición determinada. Por el contrario, las fibras tipo II o rápidas se caracterizan por utilizar un metabolismo preferentemente anaeróbico (i.e. que la generación de ATP es

producto de la glucólisis). Este metabolismo permite obtener ATP de manera más rápida que a través del metabolismo oxidativo. Sin embargo no brinda la cantidad suficiente de ATP para mantener la contracción por largos periodos; por lo que estas fibras musculares tienen contracciones rápidas intermitentes y se fatigan rápidamente. Están presentes en músculos que realizan contracciones rápidas y potentes. El tercer tipo de fibra son las denominadas fibras intermedias de tipo IIA. Estas fibras presentan propiedades metabólicas y fisiológicas intermedias con relación a las descritas para las fibras rápidas y lentas. Son fibras con un metabolismo oxidativo-glicolítico que tienden a ser resistentes a la fatiga (Rome, September 1999)

La mayoría de las proteínas involucradas en la contracción, como son las cadenas pesadas de miosina (MHC) y diferentes proteínas del sarcolema, están presentes como isoformas dependiendo del tipo de fibra muscular. De este modo, podemos decir que a las fibras de contracción rápida le corresponden las isoformas de miosina denominadas IIb y IIc/x, a las fibras intermedias les corresponden MHCs de tipo IIA, mientras que a las fibras lentas les corresponden las de tipo I. De igual manera, las enzimas asociadas a los procesos metabólicos oxidativos y glicolíticos se expresan de manera diferencial en los distintos fenotipos de fibras (Pette, 2002).

Otras características como la vascularización, el tamaño de la fibra muscular y morfología de la placa neuromuscular se encuentran muy coordinadas con el tipo de fibra. Por ejemplo, la densidad vascular es mayor alrededor de fibras musculares lentas-oxidativas que alrededor de las fibras rápidas-glicolíticas (Brown et al., 1976; Gray and Renkin, 1978). El diámetro de las fibras y el área de la placa neuromuscular incrementa a medida que aumenta la velocidad de contracción (Sieck and Prakash, 1997).

Las fibras musculares representan entidades versátiles que poseen un gran potencial adaptativo. Este potencial permite a las fibras ajustar la

composición de las proteínas sarcoméricas, el contenido mitocondrial y la proporción de las enzimas del metabolismo energético (Pette et al., 1973; Pette and Staron, 2000), lo que se traduce en cambios en las características de su contracción. El cambio de fibras rápidas a lentas se da de manera secuencial, es decir que una fibra rápida IIB necesariamente tiene que pasar por los isotipos IId/x y el IIa antes de llegar al isotipo de fibras lentas I (Ausoni et al., 1990; Hamalainen and Pette, 1996; Hilber et al., 1997; Pette and Staron, 2000; Pette, 2002).

La plasticidad fenotípica de las fibras musculares es instruida principalmente por el sistema nervioso (Pette, 2002; Fluck and Hoppeler, 2003). De esta manera, un músculo que posee un predominio de fibras de contracción lentas, se transforma tanto metabólicamente como funcionalmente en un músculo de contracción rápida si se estimula artificialmente con una frecuencia alta, característica de las fibras rápidas (Salmons and Sreter, 1976). Así mismo si se transfiere el axón proveniente de una fibra rápida a una fibra muscular lenta, la fibra lenta adopta un fenotipo de fibra rápida (Ziccone and Gibbs, 1983). Estos cambios en la actividad contráctil se reflejan en modificaciones tanto en la actividad de las enzimas mitocondriales y de las isoformas de las miosinas que expresan.

### ***Aparato motor asociado a vibrissas***

Las vibrissas o bigotes son órganos táctiles que se originan en folículos pilosos especializados que contienen una gran cantidad de mecanorreceptores. Éstos están inervados por la rama infraorbitaria del nervio trigémino (Rice et al., 1986). Especialmente en los roedores, se utilizan como instrumento principal para la obtención de información táctil del medio. Para que se lleve a cabo la obtención adecuada de los estímulos táctiles como textura y tamaño de los objetos, es necesario que las vibrissas se desplacen sobre el objeto (Darian-

Smith, 1984; Carvell and Simons, 1990). El movimiento de los músculos que se asocian a las vibrisas está controlado por la innervación proveniente del nervio facial. Las ramas de este nervio controlan el movimiento de dos grupos musculares denominados intrínsecos y extrínsecos. Los músculos intrínsecos rodean la parte rostral del folículo e insertan sus extremos directamente en el

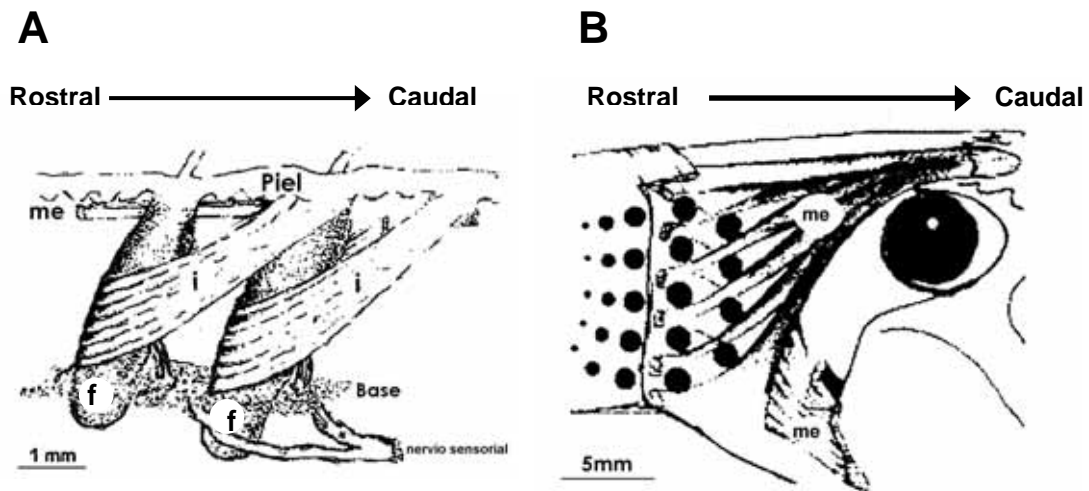


Figura 2. Músculos Asociados a las vibrisas. En el panel A se ilustra la organización de los músculos intrínsecos de las vibrisas (i). Éstos se encuentran rodeando al folículo (f) en su parte rostral y sus extremos terminan en la parte lateral del folículo caudal siguiente. En el panel B se ilustra la organización de los músculos extrínsecos (me). Éstos pasan superficialmente entre las filas de las vibrisas, e insertan unos de sus extremos en el cráneo fuera del belfo. Los puntos negros representan los folículos de las vibrisas. (Modificado de Berg et al. 2003).

folículo caudal inmediato (figura 2). La contracción de los músculos intrínsecos da como resultado el movimiento en dirección caudal del folículo que se traduce en el movimiento del pelo de la vibrisa hacia delante (protracción) (Dorfl, 1982; Wineski, 1985; Carvell et al., 1991; Berg and Kleinfeld, 2003). Los músculos extrínsecos, por su parte, forman puentes superficiales en el belfo sin entrar en contacto directo con los folículos. Estos se anclan en el cráneo fuera de los límites del belfo. La contracción de los músculos extrínsecos parecen jugar un papel importante en la retracción de la vibrisa (Wineski, 1985; Berg and Kleinfeld, 2003).

Aunque en general las vibrisas de las ratas se mueven en patrones rítmicos de una frecuencia de 9 Hz, se ha visto que se pueden generar diversos

patrones de movimiento alterando tanto la amplitud como la frecuencia a la que mueven las vibrisas. Estos patrones de movimientos se presentan en comportamientos particulares. Así, por ejemplo se ha visto que las ratas generan movimientos de baja frecuencia (5-15 Hz) y de gran amplitud durante la exploración de laberintos. Las vibrisas también pueden cambiar a movimientos de frecuencias altas (15-25 Hz) y de amplitudes más pequeñas durante la exploración de objetos novedosos. La activación de los músculos de las vibrisas a estas dos frecuencias también es diferente. Para las frecuencias bajas se activan los músculos intrínsecos y extrínsecos, mientras que para las frecuencias altas se activan únicamente los músculos intrínsecos (Berg and Kleinfeld, 2003).

## **JUSTIFICACIÓN**

Se sabe que las habilidades de discriminación de los individuos ciegos se encuentran modificadas. Al respecto se cree que dichas modificaciones resultan exclusivamente de cambios en el sistema somatosensorial. Sin embargo, se conoce que el sistema somatosensorial está estrechamente relacionado con el sistema motor. Por lo que es posible que, a la par de las modificaciones sensoriales, existan alteraciones en el sistema motor de los individuos ciegos. Conocer si existen dichas modificaciones en el sistema motor es importante para generar una concepción integrativa de las reorganizaciones adaptativas que ocurren tras la pérdida de la visión. Teniendo en cuenta la forma en que los individuos ciegos adquieren y analizan la información del medio se podrá ayudar a mejorar tanto los resultados obtenidos con terapias restitutivas, como de estrategias que permitan a los individuos ciegos interactuar mejor con su entorno.

## **HIPÓTESIS**

La enucleación al nacimiento conduce a cambios morfológicos y fisiológicos en las fibras musculares que se asocian a las vibrisas en la rata.

## **OBJETIVOS**

Evaluar parámetros morfológicos y fisiológicos de las fibras musculares y de las placas neuromusculares del bello de ratas enucleadas al nacimiento, a los 10, 60 y 160 días posteriores.



## Objetivos Particulares

- Evaluar la actividad oxidativa de las fibras musculares asociadas a las vibrisas, mediante la semicuantificación de la actividad de la enzima citocromo oxidasa.
- Evaluar la densidad de vasos sanguíneos de los músculos asociados a las vibrisas, utilizando una tinción histoquímica para la enzima fosfatasa alcalina.
- Determinar el área de la placa neuromuscular:
  - Determinar el área de la terminal presináptica a partir del análisis realizado en tinciones histoquímicas para para la enzima acetil colinesterasa
  - Determinar el área de la región postsináptica mediante el marcaje de los receptores nicotínicos con  $\alpha$ -bungarotoxina
- Determinar el tipo de las fibras musculares asociadas a las vibrisas de ratas control y enucleadas utilizando inmunohistoquímicas para las isoformas lentas y rápidas de las cadenas pesadas de miosina.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### ***Animales***

Todos los experimentos fueron realizados en ratas Wistar machos de 10, 60 y 160 días de edad. Después del nacimiento, cada camada se ajustó a 8 crías, de las cuales la mitad de las crías correspondió al grupo control y la otra mitad al grupo experimental. Las ratas se mantuvieron en cuartos con temperatura e iluminación controlada y con libre acceso al agua y alimento.

### ***Enucleación***

La enucleación se realizó siguiendo los lineamientos descritos en el protocolo utilizado por Bronchti et. al. (1992). Brevemente, las ratas entre las 6 y 8 horas de nacimiento fueron anestesiadas por hipotermia. Se efectuó una incisión sobre la fisura palpebral para remover totalmente el tejido ocular. Las ratas se colocaron en una cobija térmica y se regresaron con la madre una vez que el sangrado producto de la cirugía se detuviera y hubieran recuperado su temperatura, color y movimiento. Las ratas control fueron tratadas de la misma manera sólo que se omitió el procedimiento quirúrgico.

### ***Evaluación de la actividad oxidativa del músculo***

La citocromo oxidasa es una enzima que se localiza en la membrana interna de la mitocondria. Es la enzima terminal en la cadena respiratoria, por lo que está involucrada en el metabolismo oxidativo de la célula.(Gosker et al., 2002) De esta forma, se utilizó la actividad de esta enzima como marcador de la capacidad oxidativa de las fibras musculares.

Ratas controles y experimentales, de las distintas edades, se sacrificaron aplicando una sobredosis vía intraperitoneal de pentobarbital sódico (45mg/Kg

de peso). Después, los belfos fueron removidos y aplanados entre dos portaobjetos separados entre sí por 2mm. Las muestras fueron congeladas utilizando 2-metilbutano y almacenadas a  $-70^{\circ}\text{C}$  hasta ser procesadas. Se obtuvieron cortes tangenciales de  $20\mu\text{m}$  en un criostato que fueron montados en laminillas previamente gelatinizadas. Los cortes se incubaron a  $37^{\circ}\text{C}$  durante 30 minutos en una solución para revelar la actividad de la enzima citocromo oxidasa, preparada de acuerdo al protocolo descrito por Riddle (1993), la cual contiene: citocromo C, catalasa y 2,3-diaminobencidiana (DAB). Los cortes fueron montados con cytoseal 60 y las imágenes capturadas con una cámara digital (Coolpix, Nikon) acoplada a un microscopio de campo claro (Nikon optiphot-2). Los parámetros de iluminación y contraste se mantuvieron fijos durante toda la captura de imágenes. Para cada imagen se obtuvo el valor promedio de densidad óptica (en unidades arbitrarias de transmitancia) utilizando el programa Image J (NIH, USA). Se obtuvieron también los valores densitométricos del tejido conectivo adyacente para utilizarlos como controles internos. Los datos se presentan como diferencias porcentuales de los valores promedio de transmitancia de las fibras musculares con relación a los valores promedio del tejido conectivo. Estos valores se compararon por edad entre grupos control y enucleado. La significancia estadística fue evaluada utilizando la prueba t de Student fijando el valor de significancia en  $p \leq 0.05$

### ***Evaluación de la densidad de vasos sanguíneos***

La fosfatasa alcalina es una enzima abundante en las células endoteliales. Se localiza en la parte luminal del endotelio con su sitio activo hacia la luz del capilar. En estudios histoquímicos, se utiliza como marcador capilar. (Zoellner and Hunter, 1989; Schultz-Hector et al., 1993)

Con el objeto de evaluar la densidad capilar, se realizó la histoquímica para la enzima fosfatasa alcalina. Las muestras se obtuvieron tal y como se describió en la sección anterior. Una vez montados en las laminillas, los cortes se fijaron con una solución de paraformaldehído al 4% en amortiguador de

fosfatos (PB) 0.1M, pH 7.4. La histoquímica para fosfatasa alcalina se realizó empleando un reactivo comercial que utiliza como cromógeno azul nitrato de tetrazolio (Blue alkaline phosphatase substrate, Verctor), siguiendo las instrucciones del fabricante. Los cortes se incubaron con la solución del cromógeno por un período de 30 min. a temperatura ambiente. Los cortes fueron montados con cyto seal 60 libre de xileno. Se realizó la captura digital de las imágenes siguiendo los criterios y parámetros descritos en la sección previa. Para cada imagen se obtuvo el porcentaje de área ocupada por vasos sanguíneos sobre el área ocupada por fibras musculares. Estos valores se compararon por edad entre grupos control y enucleado. La significancia estadística fue evaluada utilizando la prueba t de Student con un valor de significancia de  $p \leq 0.05$ .

### ***Evaluación del área de placa neuromuscular***

Para evaluar posibles cambios en el tamaño de las placas neuromusculares en las ratas enucleadas, se utilizaron dos metodologías. La primera mediante un método histoquímico para revelar la actividad de la enzima acetil-colienesterasa. Esta enzima es la encargada principal de terminar la transmisión sináptica al catalizar la hidrólisis de acetilcolina, por lo que se encuentra localizada principalmente en la unión del músculo con la terminal nerviosa. Brevemente, se obtuvieron cortes tangenciales ( $20\mu\text{m}$ ) del belfo de ratas control y enucleadas como se describió para las histoquímicas anteriores. Los cortes fueron incubados por 6 horas a temperatura ambiente en una solución con acetil-tiocolina iodada como sustrato (50mM acetato de sodio, 4mM sulfato cúprico, 15mM glicina, 4mM de Acetil-tiocolina iodada y  $85\mu\text{M}$  mg de etopropazina). Una vez finalizada la incubación, los cortes se lavaron en agua destilada y se revelaron con una solución al 10% de sulfuro de sodio ( $\text{Na}_2\text{S} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ ) pH 7.5. La reacción se detuvo lavando los cortes varias veces con agua destilada. Los cortes fueron montados con cyto seal 60 y se realizó la captura digital de las de las zonas marcadas en las que las fibras musculares estuvieran

lo más transversal posible. El área se cuantificó automáticamente ajustando el umbral para seleccionar sólo las áreas del precipitado con el programa Image J. La evaluación de las diferencias estadísticas entre grupos se realizó utilizando una prueba t de Student fijando el valor de significancia de  $p \leq 0.05$ .

El segundo procedimiento utilizado para estimar el área de las placas neuromusculares fue la utilización de  $\alpha$ -bungarotoxina. Esta toxina se une irreversiblemente a los receptores nicotínicos para acetilcolina por lo que es un marcador específico de la región postsináptica de las placas neuromusculares. Para ello las ratas de diferentes edades fueron perfundidas en una solución de paraformaldehído 4% en PB 0.1M. Finalizada la perfusión, se disecó el área correspondiente al belfo y fueron postfijados 8 horas a 4°C. Posteriormente, las muestras, se pasaron por soluciones de sacarosa al 20% y 30%. Las muestras fueron congeladas en 2-metil butano y almacenadas a -70°C hasta su uso. Se obtuvieron cortes de 12 $\mu$ m en un criostato y fueron colocadas en portaobjetos previamente gelatinizados. Los cortes se incubaron durante 45 minutos en una solución de peróxido de hidrógeno diluido al 1% en PB 0.1M. Se realizaron tres lavados de 10 minutos cada uno en PB 0.1M adicionada con 0.3% tritón x-100 (0.3% PBT). Entonces, los cortes fueron transferidos a suero normal de caballo, diluido al 3% en PBT, durante hora y media a temperatura ambiente. Finalmente, los cortes se incubaron a 37°C durante una hora con  $\alpha$ -bungarotoxina rodaminada (Molecular Probes). Se retiró el exceso de toxina lavando los cortes en PB 0.1M. Las laminillas fueron montadas en un agente antidecaimiento (DAKO). Los cortes fueron observados en un microscopio confocal a un aumento de 40X con una magnificación de 4; las rebanadas ópticas fueron de 1 $\mu$ m. Se seleccionaron las placas neuromusculares que tuvieran una orientación lo más perpendicular posible sobre las fibras longitudinales de los músculos asociados a las vibrisas. Se realizó la reconstrucción tridimensional de las mismas. La cuantificación del área de la placa neuromuscular se realizó utilizando el programa Image J, mediante el trazo manual del contorno de la marca de  $\alpha$ -bungarotoxina. Estos valores se promediaron por condición

experimental y grupo de edad. La evaluación de la diferencia estadística se realizó utilizando una prueba t de Student fijando el valor de significancia de  $p \leq 0.05$ .

### ***Inmunohistoquímica para detectar las isoformas de cadena pesada de miosinas***

Con el fin de evaluar posibles cambios en la proporción de los diferentes tipos de fibras musculares asociadas a las vibrisas en los animales enucleados. Se realizó una doble inmunohistoquímica para detectar las isoformas de miosinas lentas y rápidas.

Los animales de 10, 60 y 160 días postnatales fueron perfundidos con una solución de paraformaldehído al 4% en PB 0.1 M. Finalizada la perfusión se disecaron los belfos y postfijaron en la misma solución fijadora 8 horas a 4°C. Posteriormente fueron inmersos en soluciones de sacarosa al 20% y 30% para su criopreservación. Las muestras fueron congeladas en 2-metil butano y almacenadas a -70° C hasta su utilización. De dichas muestras, se obtuvieron cortes de 12µm en un criostato a -19°C. Los cortes fueron colocados en portaobjetos previamente gelatinizados. Posteriormente, se incubaron en una solución de peróxido de hidrógeno al 1% durante 45min. Terminada la incubación, se hicieron 3 lavados en PBT 0.3% y se bloquearon con suero de caballo 3% durante 90 minutos. Los cortes se incubaron con el anticuerpo primario monoclonal contra miosina rápida (1:400; Biomed), diluido en PBT 0.1%, durante toda la noche a temperatura ambiente. Después de 3 lavados se incubaron con el anticuerpo secundario biotinilado contra ratón (1:800; Chemicon) durante dos horas. Al final de la incubación, se realizó otra serie de lavados, después de los cuales, se dejaron incubando los cortes durante 90 minutos a temperatura ambiente con el complejo avidina-biotina acoplado a peroxidasa (kit ABC, Vector laboratories). La actividad de peroxidasa se reveló

utilizando el sustrato diaminobencidina (Vector Laboratorios). La reacción fue detenida y los cortes fueron lavados tres veces en PBT 0.3%. Para evitar que los sitios de unión inespecífica a biotina interfirieran con el marcaje del siguiente antígeno, los cortes fueron incubados 15 minutos en la solución de Avidina (kit de bloqueo Avidina/Biotina, Vector Laboratorios) y posteriormente incubados con el anticuerpo primario contra miosina lenta (1:400; Chemicon) diluido en PBT 0.1% a la cual se le agregó la solución de biotina del kit de bloqueo (Vector). El anticuerpo primario se dejó incubando toda la noche. La inmunohistoquímica se realizó como en el primer caso, incubándose con el anticuerpo secundario biotinilado correspondiente (anti raton 1:800; Chemicon). La única diferencia fue que en la segunda reacción para revelar, la peroxidasa se intensificó con níquel, siguiendo el protocolo recomendado por el proveedor (Vector). Se realizó la captura digital de las imágenes de campos aleatorios del belfo de las ratas. Para cada imagen se midió el área ocupada por fibras de contracción lenta y el área ocupada por fibras de contracción rápida seleccionando manualmente cada una de las fibras. Los resultados se expresan como porcentaje de área de fibras lentas con respecto a las fibras rápidas. La evaluación de la diferencia estadística entre grupos experimentales se realizó utilizando una prueba t de Student fijando el valor de significancia de  $p \leq 0.05$ .

## RESULTADOS

### ***La actividad de la enzima citocromo oxidasa en los músculos asociados a las vibrisas es mayor en las ratas enucleadas a partir de los 60 días de edad.***

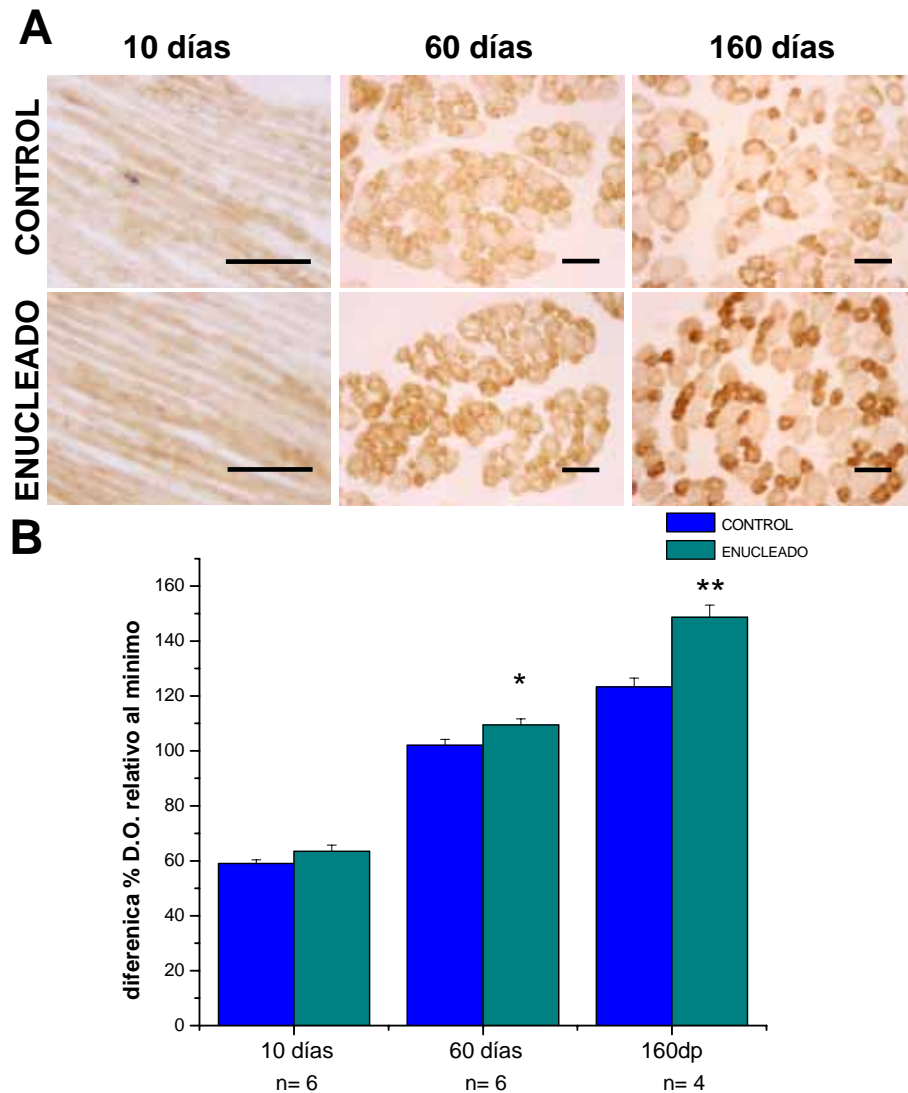
El análisis densitométrico de la marca histoquímica de la actividad de las enzimas oxidativas nos permite obtener una medida relativa de la intensidad del metabolismo energético del músculo (Frasch et al., 1978). De acuerdo a esto se evaluó densitométricamente la actividad de la enzima citocromo oxidasa en las fibras musculares asociadas a las vibrisas de ratas control y enucleadas a distintas edades. Como se observa en la figura 3, la actividad de esta enzima aumentó con la edad tanto en las ratas control como en las ratas enucleadas. A los 10 días de edad la tinción es clara y homogénea. Sin embargo, a los 60 y 160 días se distinguen dos poblaciones de fibras; unas más intensamente teñidas que otras.

Al comparar los valores densitométricos por edad y por condición, se observó que la actividad de citocromo oxidasa aumenta con la edad, las ratas enucleadas presentan una mayor tinción que los animales control tanto a los 60 días como a los 160 días de edad. La diferencia entre los grupos experimentales incrementó significativamente conforme aumenta la edad siendo de 7% a los 60 días y de 21% a los 160 días de nacimiento. No se observaron diferencias en la proporción de fibras con distinta intensidad de tinción entre las ratas control y enucleadas de 160 días de edad (datos no mostrados).

### ***La densidad capilar en las fibras musculares asociadas a las vibrisas es mayor en las ratas enucleadas***

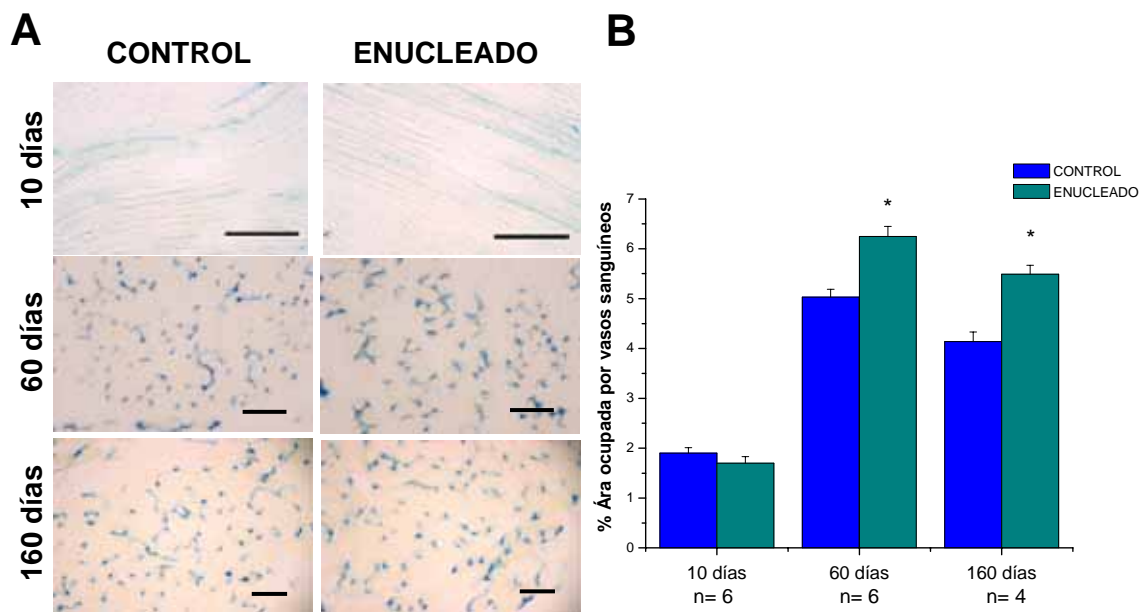
La densidad vascular es considerada como un índice del metabolismo energético en el músculo (Brown et al., 1976; Myrhage and Hudlicka, 1978). Con base en esta idea, se obtuvieron los porcentajes del área ocupada por vasos sanguíneos sobre el área de fibras musculares en ambos grupos de animales en las diferentes





**Figura 3. Panel A:** Microfotografías representativas de las histoquímicas para la enzima citocromo oxidasa de los músculos asociados a vibrisas de animales control y enucleados de 10, 60 y 160 días. Nótese el incremento de la actividad de la enzima a lo largo de la edad en ambos grupos de animales. Este incremento es más pronunciado en los animales enucleados. Escala = 60 $\mu$ m. **Panel B:** La gráfica muestra los promedios y errores estándar del porcentaje de diferencia de densidad óptica de las fibras musculares relativo a los valores del tejido conectivo circundante. (\*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.001$ )

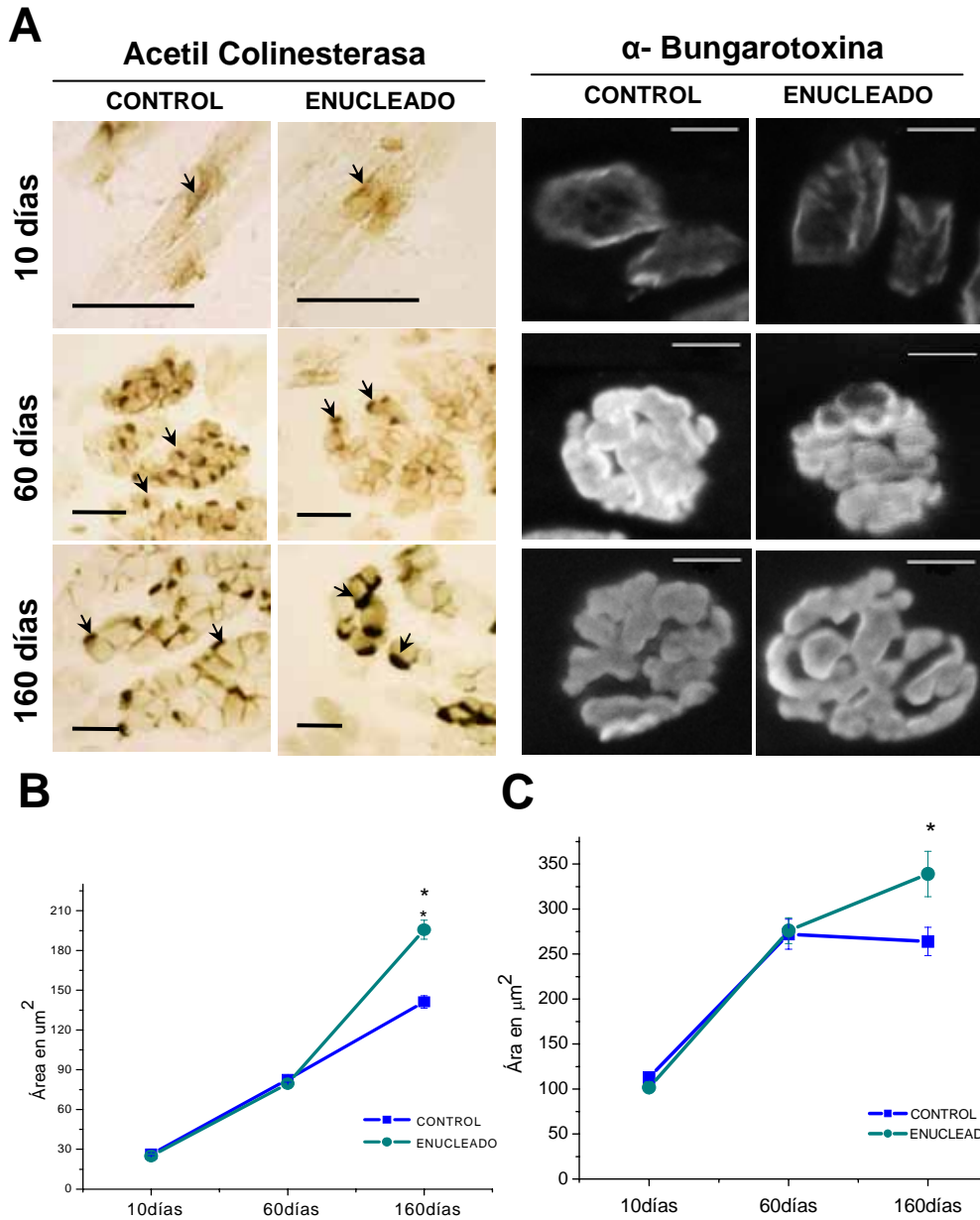
edades (Figura 4). La densidad de vasos sanguíneos en los músculos asociados a las vibrisas aumentó entre los 10 y los 60 días de edad tanto en ratas control como en las enucleadas. Entre los 60 y los 160 días de edad, sin embargo, la densidad capilar disminuye significativamente en ambos grupos (alrededor del 17 y del 11% en las ratas control y enucleados respectivamente) Al comparar los animales control y enucleados a los 10 días de edad no se documentaron diferencias en la densidad capilar. En contraste, tanto a los 60 como a los 160 días aumentó la densidad capilar asociadas con la condición experimental. De esta forma, las ratas enucleadas mostraron un incremento de 26% al los 60 días y de 36% a los 160 días con respecto a las ratas control.



**Figura 4.** Panel A: Microfotografías representativas de cortes de bello teñidos para la enzima fosfatasa alcalina de animales control y enucleado de 10, 60 y 160 días. Nótese el aumento en la marca cuando se compara los animales enucleados con los animales controles de las edades respectivas. Escala = 80  $\mu\text{m}$  para 60 y 160 días y Escala = 60 $\mu\text{m}$ . Panel B: La gráfica muestra los promedios y errores estándar del porcentaje de área ocupada por vasos sanguíneos relativo

### ***El tamaño de la placa neuromuscular (PNM) incrementa en las ratas enucleadas a los 160 días de edad***

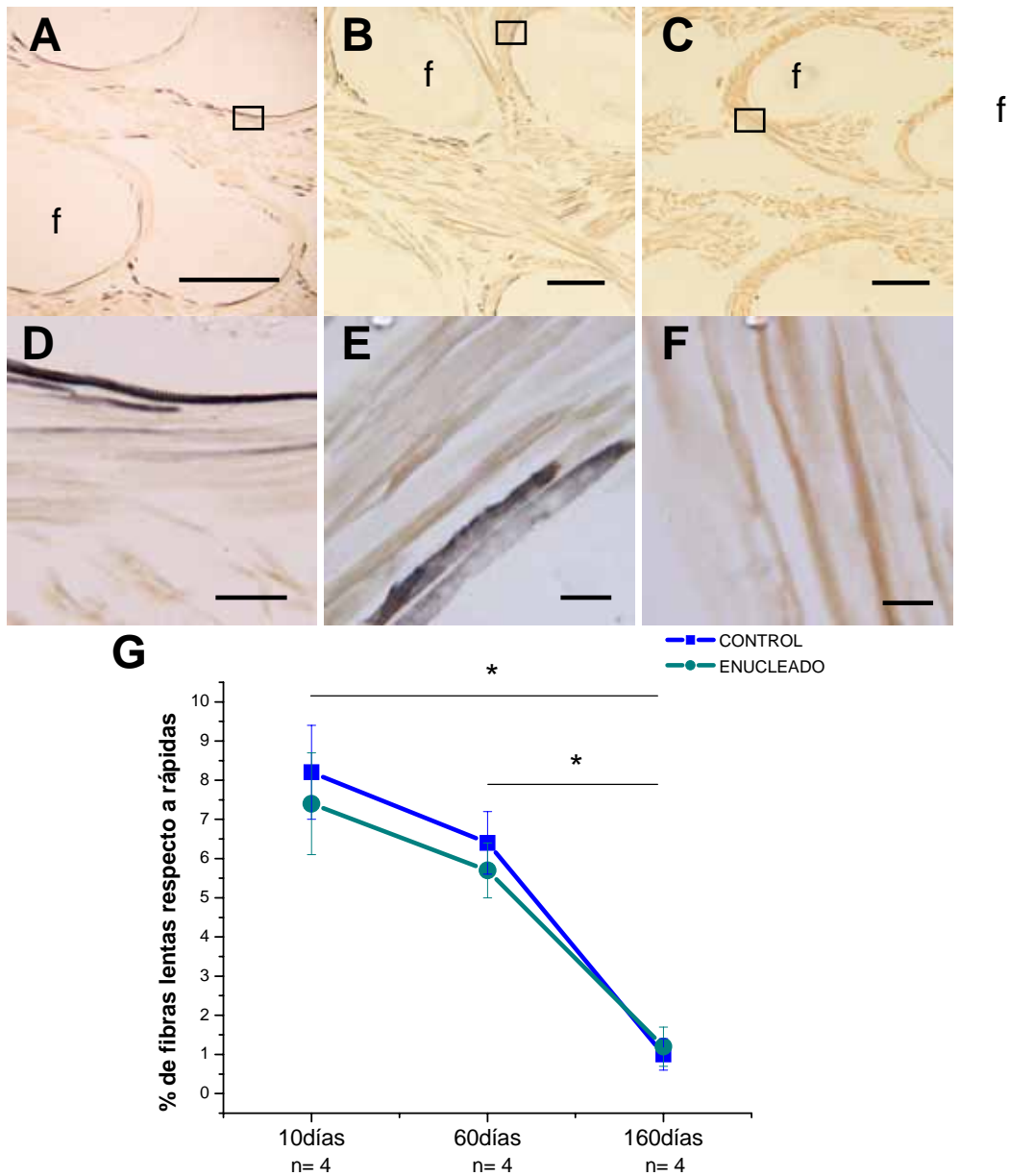
Los cambios en los patrones de actividad metabólica de las fibras musculares se asocian frecuentemente a modificaciones morfológicas de la placa neuromuscular (Pulliam and April, 1979; Wokke et al., 1990; Sieck and Prakash, 1997; Lomo, 2003). Debido a esto, se evaluó el área de la placa motora en los músculos asociados a las vibrisas de ratas control y enucleadas utilizando la reacción histoquímica para la acetilcolinesterasa como marcador presináptico, y la unión de  $\alpha$ -bungarotoxina a receptores nicotínicos colinérgicos como marcador postsináptico (Figura 5). El área del elemento presináptico de la PNM incrementó desde los 10 y hasta los 160 días en ambos grupos de animales. En las ratas enucleadas se observó un incremento aún mayor a la edad de 160 días, siendo un 38% más alto que el valor correspondiente a las ratas control. Con respecto al elemento postsináptico de la PNM, éste incrementa su área entre los 10 y 60 días de edad en ambos grupos de animales. Después de los 60 días, en las ratas control se observó una detención del crecimiento. En contraste, en las ratas enucleadas el elemento postsináptico continúa creciendo, si bien de manera más lenta, a lo largo del mismo periodo. La diferencia en el área ocupada por receptores colinérgicos a los 160 días en las ratas enucleadas es 28% mayor al grupo control.



**Figura 5. Panel A:** Microfotografías representativas de cortes del belfo teñidos para la enzima acetil colinesterasa (escala =80  $\mu\text{m}$ ) y marcadas con  $\alpha$ -bungarotoxina rodaminada (escala =10 $\mu\text{m}$ ) de los animales control y enucleados a los 10, 60 y 160 días. **Panel B:** Gráfica que muestra los valores del área de placa neuromuscular obtenidos a partir de cortes teñidos para la enzima AChE. (\*  $p < 0.05$ ;  $n= 6$  para 10 y 60 días y  $n= 4$  para 160 días). **Panel C:** Gráfica que muestra los valores del área de placa neuromuscular obtenidas a partir de cortes marcados con  $\alpha$ -bungarotoxina (\*  $p < 0.05$ ;  $n= 4$ ). En ambas gráficas los resultados se presentan como promedios y errores estándar del área de placa neuromuscular en  $\mu\text{m}^2$ . Nótese el incremento del área de PNM a los 160 días de edad de los animales enucleados en ambas técnicas.

***La proporción de las fibras musculares rápidas y lentas se modifican con la edad pero no con la condición experimental***

Frecuentemente, cambios en los patrones del metabolismo de las fibras musculares se acompañan de modificaciones en su fenotipo contráctil. Así, por ejemplo, las sarcómeras de fibras que muestran un metabolismo glicolítico acentuado contienen miosinas consideradas rápidas. Si el patrón de activación del mismo músculo se modifica llevándolo a desarrollar un metabolismo más oxidativo, el tipo de miosina que contienen sus sarcómeras cambia hacia isoformas consideradas como lentas (Pette, 1985; Leary et al., 2003; Quiroz-Rothe and Rivero, 2004). Con base en esto, se estimó el porcentaje de área ocupada por fibras de contracción lenta con relación al área ocupada por fibras de contracción rápida en el músculo de las vibrisas de animales control y enucleados a diferentes edades. En general, se observó un predominio de las fibras de contracción rápida en la totalidad del bello en ambos grupos de animales sin importar la edad. En las ratas de 10 días y 60 días de edad las fibras de contracción lenta se observaron principalmente en zonas adyacentes al folículo, rasgo poco frecuente en las ratas de 160 días (figura 6 paneles A-F). Los porcentajes del área de fibras de contracción lenta correspondieron a un 8% a los 10 días, 6% a los 60 días y 1% a los 160 días. De esta forma, el porcentaje de fibras de contracción lenta decae significativamente con la edad en ambos grupos de animales (figura 6 panel G).



**Figura 6.** Microfotografías representativas de animales de 10 (A), 60(B) y 160(C) días de edad en las que se muestra la distribución de las fibras con miosinas de contracción rápida (café) y miosinas de contracción lentas (negras) de los músculos asociados a los folículos (f) de las vibrisas. Escala = 500 $\mu$ m. En los paneles D, E y F se muestran las ampliaciones de los campos señalados en A, B y C respectivamente. Escala = 40 $\mu$ m. El panel G muestra la gráfica con los promedios y errores estándar de las proporciones de fibras lentas con relación a las fibras rápidas. (\*  $p < 0.05$ ; comparación de los animales control a las diferentes edades).

## DISCUSIÓN

Los individuos ciegos presentan reorganizaciones anatómicas y funcionales en el sistema somatosensorial. Se sugiere que estas modificaciones, son las responsables de las diferencias en los patrones de exploración. Sin embargo, se sabe que muchos procesos de somatosensación involucran el movimiento de los sensores sobre el objeto para obtener una mejor adquisición de la información (Carvell and Simons, 1990; Berg and Kleinfeld, 2003; Gao et al., 2003). Dado que la percepción táctil depende de la estrecha relación entre los sistemas somatosensorial y motor (Nicoletti et al., 1996; Huntley, 1997), es posible que en los individuos ciegos ocurran modificaciones en el sistema motor. Por esta razón, en el presente trabajo se evaluaron las modificaciones metabólicas y fenotípicas que pudieran indicar plasticidad en el sistema motor que se asocia a las vibrisas en rata enucleadas.

Es conocido que las características del metabolismo energético de las fibras musculares se modifican de acuerdo a las demandas funcionales. Así por ejemplo, al estimular eléctricamente a las motoneuronas con frecuencias bajas, las fibras adquieren un metabolismo energético predominantemente oxidativo (Pette et al., 1973). Tomando esto en cuenta, se evaluaron parámetros que indican la capacidad oxidativa de los músculos de las vibrisas. Para ello, se semicuantificó la actividad de la enzima citocromo oxidasa y la densidad de vascularización del músculo. Se encontró que la actividad de la enzima citocromo oxidasa aumentó a los 60 y a los 160 días en las ratas enucleadas con respecto a los animales control. En paralelo se observó un discreto aumento en la vascularización alrededor de los músculos a las mismas edades. Estos datos apuntan a que los músculos de las vibrisas de los animales enucleados adquieren un metabolismo más oxidativo, posiblemente para obtener un movimiento más refinado de las vibrisas.

Al respecto se sabe que cuando los músculos cambian de un metabolismo preferentemente glicolítico a uno más oxidativo, los isotipos de miosinas rápidas presentes en esas fibras son sustituidos ahora por la expresión de isotipos de contracción lenta (Pette, 1985; Leary et al., 2003; Quiroz-Rothe and Rivero, 2004). Sin embargo, el espectro de actividad de las enzimas mitocondriales se superpone en los distintos tipos de fibras. Por lo que los datos del metabolismo por sí solos no nos aseguran que esté ocurriendo la transición de fenotipos rápidos a lentos. Si esta transición tuviera lugar en las ratas enucleadas se esperaría un aumento en la proporción de las fibras que presenta el isotipo lento. No obstante en las dobles inmunohistoquímicas no se observó un aumento en la proporción de fibras de contracción lenta. A pesar de lo anterior, no se puede descartar que en los músculos de las vibrisas de las ratas enucleadas ocurra una transición hacia un fenotipo más lento, ya que las transiciones de fibra rápida a lenta pasan por la expresión de fenotipos intermedios (IIX/d, IIA) e incluso pueden detenerse en alguno de ellos o recuperar el fenotipo rápido (Pette, 2002). En este trabajo el anticuerpo utilizado para las miosinas rápidas no nos permite distinguir la presencia de miosinas intermedias (IIX/d, IIA). Sin embargo, el aumento de los parámetros metabólicos en las ratas enucleadas sugiere la transición a un fenotipo intermedio. En este sentido, se ha observado que en varios músculos de diferentes mamíferos las fibras intermedias muestran tanto la actividad de enzimas mitocondriales como la densidad vascular consistentemente más altas con respecto a las fibras rápidas (Pette, 1985; Hather et al., 1991).

Por otro lado, se postula que las modificaciones fenotípicas de las fibras musculares son inducidas en gran parte por las fibras nerviosas (Gundersen, 1998). En nuestros resultados esperaríamos por tanto que los cambios en las placas neuromusculares antecederan u ocurrieran en paralelo con los cambios metabólicos de las fibras musculares. Sin embargo esto no fue así. Los cambios metabólicos en las fibras musculares anteceden a aquellos morfológicos de las placas neuromusculares. Dada esta discrepancia temporal, creemos que el aumento en el área de placa neuromuscular puede estar dado por un mecanismo



retrógrado inducido por factores de crecimiento provenientes del músculo. En particular se conoce que las neurotrofina 3 y neurotrofina 4 modifican las propiedades de la placa neuromuscular. Estas neurotrofinas están implicadas en el establecimiento, maduración y estabilización de la placa neuromuscular (Wang et al., 1995; Belluardo et al., 2001; Sakuma et al., 2001). De esta forma se ha observado que si se induce eléctricamente la conversión de un músculo rápido a uno lento, la gran mayoría de las motoneuronas conservan sus propiedades funcionales dentro de los parámetros de las fibras rápidas (Munson et al., 1997). Estos datos sugieren que es posible que existan cambios en las propiedades contráctiles del músculo sin que se induzca simultáneamente grandes modificaciones de las propiedades estructurales y funcionales de la motoneurona. Lo que podría explicar las modificaciones tardías en el área de la placa neuromuscular. A pesar de que en este estudio no se cuantificaron los factores neurotróficos en los músculos de las vibrisas, existen datos que sugieren que los niveles de neurotrofinas se encuentran modificados en los bellos de las ratas enucleadas (Martinez, 2004).

Creemos que a nivel funcional, la tendencia de los músculos a utilizar más el metabolismo aeróbico podría traducirse en un movimiento más controlado y sostenido de la vibrisa. Los individuos con pérdida de visión disminuyen la velocidad con la que exploran ambientes novedosos (Cremieux et al., 1986; Save et al., 1998). Esto en parte se debe a que realizan movimientos más cautelosos durante el recorrido. Además estos mismos animales exploran por más tiempo y realizan con sus vibrisas un mayor número de contactos con el objeto (Save et al., 1998). Se postula que esta conducta es producto de un mecanismo compensatorio para obtener la información necesaria del medio tras la pérdida de la visión. Por otro lado, se sabe que durante la exploración de objetos, las vibrisas se agrupan hacia delante generando vaivenes de amplitud corta (Berg and Kleinfeld, 2003). Por lo tanto, los cambios que observamos en la musculatura de las vibrisas podrían ser la base fisiológica que permite la exacerbación de la conducta exploratoria de los animales ciegos. De esta manera, los músculos de contracción

más lenta permitirían mantener las vibrisas en un estado protraído por más tiempo, tomando en cuenta que las fibras de contracción intermedia y lenta presentan una mayor resistencia a la fatiga. Un cambio extremo a fibras de contracción lenta no sería lo más adecuado para los movimientos de protracción y retracción ya que incluso en especies que no mueven las vibrisas en forma constante (como los cuyos) presentan proporciones de fibras de contracción lenta similares a aquellos presentes en la rata (Jin et al., 2004). Cabe mencionar que las vibrisas no presentan fibras propioceptivas para controlar la posición de los músculos y probablemente la única forma de controlar los movimientos finos sea por la acción directa de la motoneurona a la fibra muscular.

En conclusión, podemos decir que existen modificaciones en la actividad de la enzima citocromo oxidasa y en la densidad de vasos sanguíneos que en conjunto parecen indicar un aumento en la utilización del metabolismo aeróbico por los músculos asociados a las vibrisas en los animales enucleados. Estos cambios no se asociaron a la expresión de isoformas de miosinas lentas. De hecho, la proporción de fibras de contracción lenta no permanece constante y va disminuyendo conforme aumenta la edad. El aumento en el área de la placa neuromuscular que se observa en los animales enucleados parece corresponder a cambios que se esperarían encontrar en transiciones de músculos lentos a rápidos, pero no descartamos que estas modificaciones sean inducidas por alteraciones en los niveles de factores tróficos locales. Para determinar si los cambios morfológicos y metabólicos de los músculos de las vibrisas de las ratas enucleadas reflejan cambios funcionales en las propiedades contráctiles de los músculos, sería conveniente realizar un análisis ultraestructural de las placas neuromusculares y de los isotipos intermedios de miosinas e incluso estudios electrofisiológicos de los músculos durante la realización de diferentes conductas exploratorias. Este trabajo representa un primer paso para conocer los cambios en el sistema motor de los individuos ciegos y ayuda a la comprensión de la fisiología compensatoria de dichos individuos.

## BIBLIOGRAFÍA

- Ausoni S, Gorza L, Schiaffino S, Gundersen K, Lomo T (1990) Expression of myosin heavy chain isoforms in stimulated fast and slow rat muscles. *J Neurosci* 10:153-160.
- Balice-Gordon RJ, Lichtman JW (1993) In vivo observations of pre- and postsynaptic changes during the transition from multiple to single innervation at developing neuromuscular junctions. *J Neurosci* 13:834-855.
- Belluardo N, Westerblad H, Mudo G, Casabona A, Bruton J, Caniglia G, Pastoris O, Grassi F, Ibanez CF (2001) Neuromuscular junction disassembly and muscle fatigue in mice lacking neurotrophin-4. *Mol Cell Neurosci* 18:56-67.
- Berg RW, Kleinfeld D (2003) Rhythmic whisking by rat: retraction as well as protraction of the vibrissae is under active muscular control. *J Neurophysiol* 89:104-117.
- Bewick GS, Tonge DA (1991) Characteristics of end-plates formed in mouse skeletal muscles reinnervated by their own or by foreign nerves. *Anat Rec* 230:273-282.
- Brochiti G, Schöenberger N, Wilker E, Van der Loos H (1992) Barreld expansion after neonatal eye removal in mice. *NeuroReport* 3:489-492.
- Brown MD, Cotter MA, Hudlicka O, Vrbova G (1976) The effects of different patterns of muscle activity on capillary density, mechanical properties and structure of slow and fast rabbit muscles. *Pflugers Arch* 361:241-250.
- Carvell GE, Simons DJ (1990) Biometric analyses of vibrissal tactile discrimination in the rat. *J Neurosci* 10:2638-2648.
- Carvell GE, Simons DJ, Lichtenstein SH, Bryant P (1991) Electromyographic activity of mystacial pad musculature during whisking behavior in the rat. *Somatosens Mot Res* 8:159-164.
- Cohen LG, Celnik P, Pascual-Leone A, Corwell B, Falz L, Dambrosia J, Honda M, Sadato N, Gerloff C, Catala MD, Hallett M (1997) Functional relevance of cross-modal plasticity in blind humans. *Nature* 389:180-183.
- Colman H, Lichtman JW (1993) Interactions between nerve and muscle: synapse elimination at the developing neuromuscular junction. *Dev Biol* 156:1-10.
- Conforto AB, Kaelin-Lang A, Cohen LG (2002) Increase in hand muscle strength of stroke patients after somatosensory stimulation. *Ann Neurol* 51:122-125.
- Cremieux J, Veraart C, Wanet-Defalque MC (1986) Effects of deprivation of vision and vibrissae on goal-directed locomotion in cats. *Exp Brain Res* 65:229-234.
- Cuppini R, Ambrogini P, Sartini S (1998) Enlargement of motoneuron peripheral field following partial denervation with or without dorsal rhizotomy. *Neuroscience* 84:151-161.
- Cuppini R, Sartini S, Ambrogini P, Fulgenzi G, Graciotti L (1999) Rat motor neuron plasticity induced by dorsal rhizotomy. *Neurosci Lett* 275:29-32.
- Darian-Smith I (1984) The sense of touch: performance and peripheral neural processes. In: *The Nervous System* (Brookhart JM, Mountcastle VB, eds), pp 739-788. Bethesda, Maryland: American Physiological Society.
- Dorfl J (1982) The musculature of the mystacial vibrissae of the white mouse. *J Anat* 135:147-154.
- Fluck M, Hoppeler H (2003) Molecular basis of skeletal muscle plasticity--from gene to form and function. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 146:159-216.
- Frasch AC, Itoiz ME, Cabrini RL (1978) Microspectrophotometric quantitation of the diaminobenzidine reaction for histochemical demonstration of cytochrome oxidase activity. *J Histochem Cytochem* 26:157-162.

- Gao P, Hattox AM, Jones LM, Keller A, Zeigler HP (2003) Whisker motor cortex ablation and whisker movement patterns. *Somatosens Mot Res* 20:191-198.
- Goldreich D, Kanics IM (2003) Tactile acuity is enhanced in blindness. *J Neurosci* 23:3439-3445.
- Gosker HR, van Mameren H, van Dijk PJ, Engelen MP, van der Vusse GJ, Wouters EF, Schols AM (2002) Skeletal muscle fibre-type shifting and metabolic profile in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Eur Respir J* 19:617-625.
- Gray SD, Renkin EM (1978) Microvascular supply in relation to fiber metabolic type in mixed skeletal muscles on rabbits. *Microvasc Res* 16:406-425.
- Gundersen K (1998) Determination of muscle contractile properties: the importance of the nerve. *Acta Physiol Scand* 162:333-341.
- Hamalainen N, Pette D (1996) Slow-to-fast transitions in myosin expression of rat soleus muscle by phasic high-frequency stimulation. *FEBS Lett* 399:220-222.
- Hamdy S, Rothwell JC, Aziz Q, Singh KD, Thompson DG (1998) Long-term reorganization of human motor cortex driven by short-term sensory stimulation. *Nat Neurosci* 1:64-68.
- Hather BM, Mason CE, Dudley GA (1991) Histochemical demonstration of skeletal muscle fibre types and capillaries on the same transverse section. *Clin Physiol* 11:127-134.
- Hilber K, Galler S, Pette D (1997) Functional differences of myosin heavy-chain isoforms in skeletal muscle. *Naturwissenschaften* 84:201-204.
- Huntley GW (1997) Differential effects of abnormal tactile experience on shaping representation patterns in developing and adult motor cortex. *J Neurosci* 17:9220-9232.
- Jin TE, Witzemann V, Brecht M (2004) Fiber types of the intrinsic whisker muscle and whisking behavior. *J Neurosci* 24:3386-3393.
- Kujala T, Huotilainen M, Sinkkonen J, Ahonen AI, Alho K, Hamalainen MS, Ilmoniemi RJ, Kajola M, Knuutila JE, Lavikainen J, et al. (1995) Visual cortex activation in blind humans during sound discrimination. *Neurosci Lett* 183:143-146.
- Leary SC, Lyons CN, Rosenberger AG, Ballantyne JS, Stillman J, Moyes CD (2003) Fiber-type differences in muscle mitochondrial profiles. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 285:R817-826.
- Lomo T (2003) What controls the position, number, size, and distribution of neuromuscular junctions on rat muscle fibers? *J Neurocytol* 32:835-848.
- Martinez E (2004) Evaluación de la plasticidad periférica en ratas ciegas. In: Instituto de Investigaciones Biomédicas, p 55. México, D.F: Universidad Nacional Autónoma de México.
- Monfils MH, Plautz EJ, Kleim JA (2005) In search of the motor engram: motor map plasticity as a mechanism for encoding motor experience. *Neuroscientist* 11:471-483.
- Munson JB, Foehring RC, Mendell LM, Gordon T (1997) Fast-to-slow conversion following chronic low-frequency activation of medial gastrocnemius muscle in cats. II. Motoneuron properties. *J Neurophysiol* 77:2605-2615.
- Myrhage R, Hudlicka O (1978) Capillary growth in chronically stimulated adult skeletal muscle as studied by intravital microscopy and histological methods in rabbits and rats. *Microvasc Res* 16:73-90.
- Nicolelis MA, De Oliveira LM, Lin RC, Chapin JK (1996) Active tactile exploration influences the functional maturation of the somatosensory system. *J Neurophysiol* 75:2192-2196.

- Nudo RJ, Jenkins WM, Merzenich MM (1990) Repetitive microstimulation alters the cortical representation of movements in adult rats. *Somatosens Mot Res* 7:463-483.
- Padykula HA, Gauthier GF (1970) The ultrastructure of the neuromuscular junctions of mammalian red, white, and intermediate skeletal muscle fibers. *J Cell Biol* 46:27-41.
- Pette D (1985) Metabolic heterogeneity of muscle fibres. *J Exp Biol* 115:179-189.
- Pette D (2002) The adaptive potential of skeletal muscle fibers. *Can J Appl Physiol* 27:423-448.
- Pette D, Staron RS (2000) Myosin isoforms, muscle fiber types, and transitions. *Microsc Res Tech* 50:500-509.
- Pette D, Smith ME, Staudte HW, Vrbova G (1973) Effects of long-term electrical stimulation on some contractile and metabolic characteristics of fast rabbit muscles. *Pflugers Arch* 338:257-272.
- Pulliam DL, April EW (1979) Degenerative changes at the neuromuscular junctions of red, white and intermediate muscle fibers. Part 1. Response to short stump nerve section. *J Neurol Sci* 43:205-222.
- Quiroz-Rothe E, Rivero JL (2004) Coordinated expression of myosin heavy chains, metabolic enzymes, and morphological features of porcine skeletal muscle fiber types. *Microsc Res Tech* 65:43-61.
- Rauschecker JP (1995) Compensatory plasticity and sensory substitution in the cerebral cortex. *Trends Neurosci* 18:36-43.
- Rauschecker JP, Tian B, Korte M, Egert U (1992) Crossmodal changes in the somatosensory vibrissa/barrel system of visually deprived animals. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89:5063-5067.
- Reid B, Slater CR, Bewick GS (1999) Synaptic vesicle dynamics in rat fast and slow motor nerve terminals. *J Neurosci* 19:2511-2521.
- Rice FL, Mance A, Munger BL (1986) A comparative light microscopic analysis of the sensory innervation of the mystacial pad. I. Innervation of vibrissal follicle-sinus complexes. *J Comp Neurol* 252:154-174.
- Ridding MC, Brouwer B, Miles TS, Pitcher JB, Thompson PD (2000) Changes in muscle responses to stimulation of the motor cortex induced by peripheral nerve stimulation in human subjects. *Exp Brain Res* 131:135-143.
- Riddle DR, Gutierrez G, Zheng D, White LE, Richards A, Purves D (1993) Differential Metabolic and Electrical Activity in the Somatic Sensory Cortex of Juvenile and Adult Rats. *J Neurosci* 13:4193-4213.
- Rome LC (September 1999) Comparative Vertebrate Muscle Physiology. In: *Encyclopedia of life sciences*: John Wiley & Sons, Ltd: Chichester <http://www.els.net/> [doi:10.1038/npg.els.0001862].
- Sadato N, Pascual-Leone A, Grafman J, Deiber MP, Ibanez V, Hallett M (1998) Neural networks for Braille reading by the blind. *Brain* 121 (Pt 7):1213-1229.
- Sakuma K, Watanabe K, Sano M, Uramoto I, Nakano H, Li YJ, Kaneda S, Sorimachi Y, Yoshimoto K, Yasuhara M, Totsuka T (2001) A possible role for BDNF, NT-4 and TrkB in the spinal cord and muscle of rat subjected to mechanical overload, bupivacaine injection and axotomy. *Brain Res* 907:1-19.
- Salmons S, Sreter FA (1976) Significance of impulse activity in the transformation of skeletal muscle type. *Nature* 263:30-34.
- Save E, Cressant A, Thinus-Blanc C, Poucet B (1998) Spatial firing of hippocampal place cells in blind rats. *J Neurosci* 18:1818-1826.

- Schultz-Hector S, Balz K, Bohm M, Ikehara Y, Rieke L (1993) Cellular localization of endothelial alkaline phosphatase reaction product and enzyme protein in the myocardium. *J Histochem Cytochem* 41:1813-1821.
- Sieck GC, Prakash YS (1997) Morphological adaptations of neuromuscular junctions depend on fiber type. *Can J Appl Physiol* 22:197-230.
- Squire JM (February 2001) Muscle Contraction. In: *Encyclopedia of Life Sciences*: John Wiley & Sons, Ltd:Chichester <http://els.net/> [doi:10.1038/npg.els.0001256].
- Theoret H, Merabet L, Pascual-Leone A (2004) Behavioral and neuroplastic changes in the blind: evidence for functionally relevant cross-modal interactions. *J Physiol Paris* 98:221-233.
- Toldi J, Farkas T, Volgyi B (1994) Neonatal enucleation induces cross-modal changes in the barrel cortex of rat. A behavioural and electrophysiological study. *Neurosci Lett* 167:1-4.
- Tyc F, Boyadjian A, Devanne H (2005) Motor cortex plasticity induced by extensive training revealed by transcranial magnetic stimulation in human. *Eur J Neurosci* 21:259-266.
- Van Boven RW, Hamilton RH, Kauffman T, Keenan JP, Pascual-Leone A (2000) Tactile spatial resolution in blind braille readers. *Neurology* 54:2230-2236.
- Wang T, Xie K, Lu B (1995) Neurotrophins promote maturation of developing neuromuscular synapses. *J Neurosci* 15:4796-4805.
- Wineski LE (1985) Facial morphology and vibrissal movement in the golden hamster. *J Morphol* 183:199-217.
- Wokke JH, Jennekens FG, van den Oord CJ, Veldman H, Smit LM, Leppink GJ (1990) Morphological changes in the human end plate with age. *J Neurol Sci* 95:291-310.
- Wu CW, van Gelderen P, Hanakawa T, Yaseen Z, Cohen LG (2005) Enduring representational plasticity after somatosensory stimulation. *Neuroimage* 27:872-884.
- Zhou CJ, Kawabuchi M, Wang S, Liu WT, Hirata K (2002) Age differences in morphological patterns of axonal sprouting and multiple innervation of neuromuscular junctions during muscle reinnervation following nerve crush injury. *Ann Anat* 184:461-472.
- Ziccone S, Gibbs C (1983) Effects of cross reinnervation on the energetics of rat skeletal muscle. *Pflugers Arch* 399:297-301.
- Ziemann U, Wittenberg GF, Cohen LG (2002) Stimulation-induced within-representation and across-representation plasticity in human motor cortex. *J Neurosci* 22:5563-5571.
- Zoellner HF, Hunter N (1989) Histochemical identification of the vascular endothelial isoenzyme of alkaline phosphatase. *J Histochem Cytochem* 37:1893-1898.