



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

## Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

RESPUESTA PLÁSTICA VASCULAR EN LA CORTEZA  
SOMATOSENSORIAL PRIMARIA DE LA RATA CEGADA AL NACIMIENTO

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
Maestra en Ciencias

PRESENTA:

Lic. en C.G. Silvia Vanessa Zenteno De León

TUTOR PRINCIPAL

Dr. Gabriel Gutiérrez Ospina  
Instituto de Investigaciones Biomédicas

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

Dr. Ricardo Tapia Ibarguengoitia	Instituto de Fisiología Celular
Dr. Gabriel Roldán Roldán	Facultad de Medicina
Dra. Beatriz Gómez González	Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas
Dr. Fredy Roberto Cifuentes Navarro	Instituto de Investigaciones Biomédicas
Dra. María Elena Chánez Cárdenas	Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

MÉXICO, D. F., junio, 2015



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.



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.



RESPUESTA  
PLÁSTICA VASCULAR  
EN LA CORTEZA SOMATOSENSORIAL  
PRIMARIA DE LA RATA CEGADA  
AL NACIMIENTO



*Agradezco  
a CONACYT por  
el financiamiento del proyecto  
aquí presentado y al Programa de  
Apoyo para Estudios del Posgrado por el amparo  
económico para asistir al XXIX Congreso Nacional de  
Bioquímica y al 17<sup>avo</sup> Congreso Internacional  
de Biología del Desarrollo, en donde  
tuve la oportunidad de exponer  
los avances de este  
trabajo.*



***“La ciencia es sólo la manera estadísticamente correcta de contar historias”***



## Contenido

Dedicatoria.....	4
Agradecimientos.....	5
<b>Resumen.....</b>	<b>6</b>
<b>1. Introducción.....</b>	<b>7</b>
<b>2. Antecedentes.....</b>	<b>7</b>
2.1. Plasticidad intermodal en la corteza de individuos ciegos.....	7
2.2. El sistema somatosensorial de la rata y de la S1.....	9
2.3. Modificaciones de los barriles en las ratas ciegas.....	11
2.3.1. Modelo de expansión por incremento en actividad.....	11
2.3.2. Modelo de expansión por adelanto en la formación.....	14
<b>3. Justificación.....</b>	<b>15</b>
<b>4. Hipótesis.....</b>	<b>15</b>
<b>5. Objetivo.....</b>	<b>15</b>
5.1. Objetivos particulares.....	16
<b>6. Materiales y métodos.....</b>	<b>16</b>
6.1. Obtención de los animales experimentales.....	16
6.2. Inyección de tinta china.....	16
6.3. Densidad Vascular.....	17
6.4. Inmunofluorescencia contra BrdU.....	18
6.5. Análisis estadístico.....	19
<b>7. Resultados.....</b>	<b>19</b>
7.1. El área ocupada por vasos sanguíneos en la S1 y en el globo pálido incrementó en las ratas adultas enucleadas al nacimiento.....	19
7.2. El área ocupada por vasos sanguíneos en la S1 y en el globo pálido es similar entre las ratas neonatas control y las enucleadas al nacimiento.....	20
7.3. El área ocupada por vasos sanguíneos en la S1 y en el globo pálido incrementó en las ratas juveniles enucleadas al nacimiento.....	21
7.4. La densidad vascular aumenta con el tiempo tanto en la S1 como en el globo pálido.....	22
<b>8. Discusión.....</b>	<b>25</b>
<b>9. Conclusiones.....</b>	<b>29</b>
<b>10. Perspectivas.....</b>	<b>29</b>
<b>11. Trabajos citados.....</b>	<b>30</b>

*Este trabajo está dedicado a mi madre, quien no ha dejado de apoyar mis ocurrencias, mis locuras, en cualquier manera que le ha sido posible, quien sin importar los obstáculos que se le interpongan siempre ha sabido salir adelante poniendo a sus hijos antes que a ella, la mujer que hace todo lo posible por hacerme feliz, quien ha soportado mis interminables quejas, quien siempre me ha tratado con respeto, con amor y con confianza, aquella persona sin quien yo no podría estar en donde me encuentro el día de hoy y a la que más amo en todo el mundo.*

*También está dedicado a mi padre, el hombre que me quiso tanto y a quien yo no siempre supe corresponder, aquél que a pesar de sus defectos siempre era cariñoso y tan alegre, quien me hizo morir de la risa tantas veces o más de las que me hizo enojar, aquél que me avergonzaba muy divertido frente a mis amigas, el que me acompañaba en mis noches de desvelo durante la preparatoria y para quien yo siempre fui especial; la persona que estoy segura, me hubiera apoyado al máximo en este cambio de rumbo y de vida, y que hubiera estado más emocionada que yo con cada uno de los pasos que doy y que daré.*

*Así mismo, le dedico este escrito a mi familia, a mis abuelos Vicky y Emilio, a mi hermano José Luis, a mis tíos Ana, Jorge, Maruca, Emilio, Gustavo y Lolita, y a mis primos, quienes a pesar de todo siempre quisieron lo mejor para mí.*

*También le dedico esta tesis a mi otra familia, mis amigos, a quienes no hubiera logrado conocer de no ser por eso que ahora me gusta llamar “mi pasado oscuro”; a Zarco, a quien no dejo de admirar, por ayudarme a entender tantas cosas, y siempre estar dispuesta a socorrerme sin importar lo insignificante o faltos de sentido de mis “problemas”; a Gacel, quien siempre se ha preocupado por mí y me ha ayudado a enfocarme en lo que es importante, quien se ha prestado desinteresadamente a que salga adelante, y que se ha ganado mi total confianza al pasar los años; a Paola, a quien atrajimos al otro lado oscuro, quien siempre me ha hecho reír y que contrarresta mi total negatividad con su exagerado positivismo; a mis demás amigos genómicos, que aunque nos hemos distanciado, sigo pensando en ellos; a Raquel, una de las personas por las que valió la pena darle una segunda oportunidad a la ciencia, quien me hizo sentir acogida en un laboratorio lleno de gente tan diferente y siempre se mostró comprensiva aunque no entendiera por completo mis obsesiones; a mis demás compañeros del laboratorio, por esas pláticas tan diversificadas; a Mommo quien siempre me ayuda a sacar mi niña interior (más de lo ya de por sí común); y por último, a David, un ex científico igual de frustrado que yo y un genio de la literatura.*

*Y, finalmente, le dedico esta tesis al Dr. Gabriel, por haberme ayudado a dar ese salto tan difícil y a deshacerme de esa niebla que, alimentada por el miedo, me obligaba a mantenerme autoengañada, por no haberme abandonado cuando llegó la hora de las confesiones, por ayudarme a crecer, sobretodo, como persona y haber creído en mi potencial todo este tiempo.*



## *Agradecimientos*

*Le agradezco a mi familia, a mi madre, a mi padre, por haber puesto tanto empeño en mi crianza y haberlo hecho de la mejor manera que les fue posible. A mi abuelita Vicky por todo el cariño, el apoyo y la compañía que me ha otorgado.*

*Le agradezco a todos mis amigos y compañeros con los que he convivido a lo largo de estos ocho años y que han hecho que esta transición sea una de las mejores etapas de mi vida; a mis amigos más cercanos, Zarco, Gacel, Paola, Raquel; y a los que quisiera ver más seguido, David, Mommo, Laura, Akram, Fanny y muchos otros genómicos y no-genómicos.*

*Le agradezco a Raquel quien a pesar de no tener la obligación, siempre estuvo dispuesta a sacarme de apuros, y que aguantó y me ayudó a corregir todos los errores que cometí a lo largo de esos dos años.*

*A Jesús quien a través de sus experiencias y su conocimiento en el trabajo de laboratorio supo guiarme, sin el que no podría trabajarse en el laboratorio como debe ser. A Leonora, Dannia, Daniel y Paulina por sus comentarios y críticas tan oportunos. A los demás compañeros del laboratorio con los que conviví, y con los que no también, por su apoyo como grupo.*

*También le estoy agradecida a mis tutores del proyecto, el Dr. Recillas y la Dra. Pérez, quienes aguantaron tanto ensayo y error y con sus agudos comentarios hicieron evolucionar mi pensamiento crítico.*

*Le estoy muy agradecida al Dr. Gabriel por aceptarme en su laboratorio, en el cual aprendí mucho y disfruté cada fallo y cada éxito, por estar dispuesto a resolver hasta las dudas más insignificantes y siempre mostrar un gran interés, por aguantar que le hablara de usted por más que me pidió que le hablara de tú, por permitir mis despliegues de locura artística y aguantar los interminables rastros de tinta que dejaba por todo el laboratorio, pero sobre todo, por el gran apoyo que me mostró desde un inicio y que me sigue mostrando.*

## Respuesta plástica vascular en la corteza somatosensorial primaria de la rata cegada al nacimiento

---

*Silvia Zenteno De León*

*Departamento de Biología Celular y Fisiología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM.*

**Resumen** | En los individuos ciegos existe una reorganización adaptativa en el cerebro que lleva a la expansión de la corteza somatosensorial primaria (S1), entre los días postnatales 3 y 7, y al incremento de la densidad vascular. Se considera que ambos eventos son el resultado de un incremento en la experiencia sensorial en las ratas enucleadas. Sin embargo, recientemente nuestro laboratorio publicó evidencia de que la actividad de la S1 no se ve incrementada. Por lo tanto, el mecanismo que lleva a la plasticidad vascular debe ser revisado con cuidado. Para establecer el papel de la vascularización en la expansión de la S1 durante el fenómeno de plasticidad neuronal, nos propusimos determinar la relación temporal que existe entre ambos fenómenos. Medimos la densidad vascular de la S1 en ratas enucleadas al nacimiento y en ratas con la vista intacta, a los siete y veinte días de edad, así como en ratas adultas. Aunque confirmamos los resultados previos que muestran un incremento en la densidad vascular de la S1 de ratas adultas enucleadas al nacimiento, no pudimos verlo a los 7 días postnatales. Sin embargo, la diferencia en la densidad vascular se encontró bien establecida a los 20 días de edad, por lo que concluimos que, aunque el cambio vascular no sucede durante la expansión de la S1, tampoco se debe necesariamente a un incremento en la experiencia sensorial.

# RESPUESTA PLÁSTICA VASCULAR EN LA CORTEZA SOMATOSENSORIAL PRIMARIA DE LA RATA CEGADA AL NACIMIENTO



## Introducción

En las ratas cegadas al nacimiento se desarrolla un proceso de reorganización en el cerebro que conduce a la expansión de la corteza somatosensorial primaria (S1). Se cree que esta expansión se debe a que hay un incremento en el influjo de información táctil, lo que a su vez incrementa la necesidad metabólica de la región, y como consecuencia su vascularización. Sin embargo, a pesar de que sí se ha observado un aumento en la vascularización de la S1 en ratas adultas cegadas al nacimiento, éste no es proporcional a la magnitud de la expansión de las subregiones que constituyen a la S1. Además, la actividad metabólica en la S1 es equivalente entre ratas control y aquellas enucleadas al nacimiento. Esto sugiere que la expansión no es originada por un aumento en el uso de esta modalidad sensorial, por lo que el aumento en la densidad vascular podría no estar reflejando los incrementos de la actividad neuronal somatosensorial. Debido a que recientemente hemos mostrado que la formación de la S1 inicia en edades más tempranas en las ratas enucleadas en comparación con los controles, la expansión parece ser el resultado de un proceso de heterocronía. De esta forma, es posible que el incremento en la densidad vascular observado en la S1 expandida de las ratas cegadas al nacimiento refleje también un proceso heterocrónico de crecimiento vascular, y no el incremento en el uso de la vía somestésica. En este trabajo evaluamos esta última posibilidad.

## Antecedentes

La plasticidad neural es la capacidad del sistema nervioso para auto-organizarse con base en la integración de la información extraída del genoma y de su entorno. Así, los procesos de reorganización suelen ser consecuencia de una variedad de eventos relativamente positivos (e.g., aprendizaje) o negativos (e.g., lesiones) que ocurren a lo largo de la vida del organismo, incluyendo la etapa embrionaria. Por ejemplo, diferentes estudios en animales y humanos han revelado que la privación de un sentido (o modalidad sensorial) conduce a incrementos en el tamaño de la representación neural de las modalidades sensoriales remanentes (Rauschecker, 1992; Hunt, 2006). También, como parte de la reorganización, la información derivada de los órganos sensoriales remanentes alcanza aquellas

áreas sensoriales privadas de su entrada principal (Buchel, 1998). A este tipo de reorganización se le conoce como plasticidad intermodal y aunque la fenomenología de ésta ha sido ampliamente reportada, poco sabemos sobre los mecanismos subyacentes. Entender dichos mecanismos se torna crucial en nuestros esfuerzos por intentar la recuperación de los sentidos en individuos que los han perdido.

### Plasticidad intermodal en la corteza de individuos ciegos

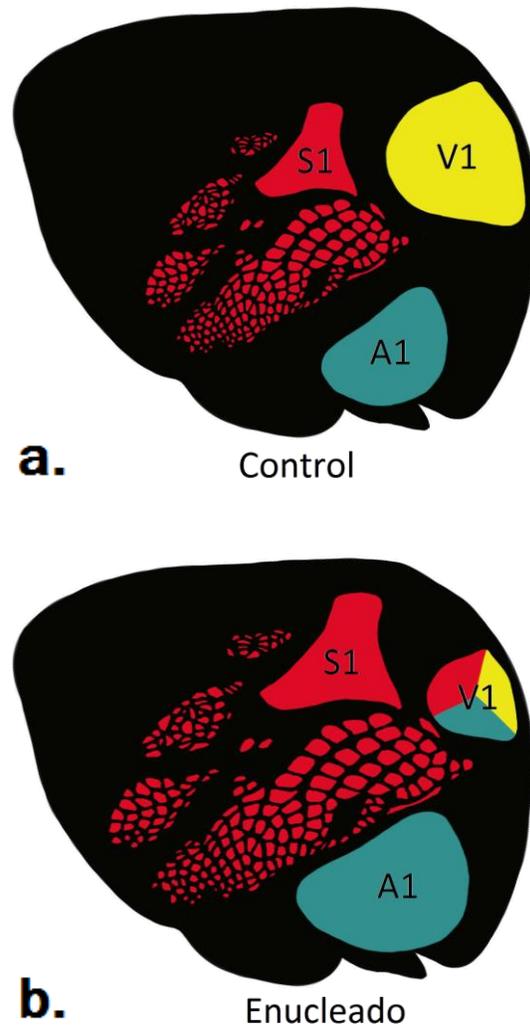
Estudios previos de privación sensorial, tanto en modelos animales como en humanos, han examinado las consecuencias conductuales y descrito los fenómenos que ocurren durante los procesos de plasticidad



intermodal, principalmente desde la perspectiva de la pérdida completa de la entrada visual. A través de la enucleación bilateral, los distintos autores han descrito mejoras relativas en el desempeño conductual relacionado con las modalidades somatosensorial (Alary, 2009; Goldreich & Kanics, 2009) y auditiva (Collignon, 2009; Roder, 1999), así como la presencia de respuestas a estos estímulos en la corteza visual primaria (V1) (Lewis, 2010; para una revisión extensa ver Cattaneo, *et al.* (2008) y Burton, *et al.* (2003)).

Desde el punto de vista fenomenológico, la respuesta de reorganización que tiene el cerebro cuando se enfrenta a las circunstancias que impone la ceguera comprende al menos tres procesos: 1) el reclutamiento de los centros visuales para llevar a cabo el procesamiento de la información auditiva y somatosensorial, 2) la transferencia de algunas de las funciones somatosensoriales y auditivas a la región que correspondía a la V1, y 3) el agrandamiento de los centros auditivos y somatosensoriales (ver Figura 1).

Estos cambios estructurales, y también los conductuales, han sido ligados causalmente con la demostración de que las habilidades especiales de los ciegos, tanto auditivas como somestésicas, desaparecen cuando la V1 nominal es inactivada con estimulación magnética transcraneal (Cohen, 1997; Hamilton, 2000). El proceso de plasticidad intermodal parece resultar de un principio de “negociación” evolutivamente conservado, usado por el cerebro para relocalizar funciones y reorganizar el espacio neural (Martínez, 2013).



**Figura 1 | Reorganización adaptativa de las cortezas sensoriales en las ratas enucleadas al nacimiento.** **a** | Localización y tamaño de las cortezas primarias somatosensorial (S1) y auditiva (A1) de la rata. Los óvalos rojos de la S1 reflejan las representaciones de las vibrisas (barriles) y la superficie de la piel. **b** | Modificaciones de las cortezas sensoriales en ratas con privación visual. La remodelación plástica intermodal produce tanto la expansión de la S1 y la A1, como la transferencia de algunas de las funciones somatosensoriales y auditivas a las neuronas multimodales de la corteza visual primaria (V1) para el procesamiento de su información.



La plasticidad intermodal observada en los sujetos ciegos no se restringe solamente a las cortezas consideradas como sensoriales unimodales primarias, sino que alcanza también a aquellas consideradas como multimodales con jerarquía superior. De hecho, en estas últimas el número de neuronas que responden a las modalidades somatosensorial y auditiva aumenta (Kahn & Krubitzer, 2002). Se presume que este tipo de respuestas resulta del desbalance de la fortaleza de las entradas asociadas con distintas modalidades sensoriales, y del desenmascaramiento de las terminales sinápticas que codifican la información de las modalidades sensoriales remanentes (Lomber, 2010). Incluso pudiera ser que la reorganización de las funciones que involucran más de una modalidad dependa de la calidad de la información con la que contribuyen las modalidades intactas, después de la pérdida de algún sentido (Bavelier & Hirsorn, 2010). Así, conforme procede la respuesta plástica intermodal, cada corteza sensorial podría llegar a ser activada por varias modalidades sensoriales. Esto difiere de lo que ocurre bajo condiciones normales, en las que las habilidades multisensoriales de las áreas sensoriales primarias parecen permanecer parcialmente enmascaradas (Fu, 2003; Shams, 2005).

Es importante mencionar que la magnitud de los cambios observados en el cerebro de individuos invidentes disminuye conforme esta condición es adquirida más tardíamente en la vida (Buchel, 1998).

Finalmente, se ha documentado que la redistribución del espacio cortical en respuesta a pérdidas sensoriales también se observa

durante la respuesta de plasticidad consecutiva a pérdidas parciales unimodales (i.e., plasticidad intramodal; ver abajo) (Martínez, 2014), por lo que parece ser un principio básico de reorganización neural.

### **El sistema somatosensorial de la rata y la estructura de la S1**

*“Los barriles ofrecen excelentes oportunidades para integrar estudios de la corteza cerebral a un grado de resolución de otra manera inaccesible”* (Woolsey & Van der Loos, 1970).

En general, el sistema somatosensorial de las ratas ha sido un modelo atractivo para el estudio de la estructura, función, desarrollo y plasticidad del sistema nervioso central de los vertebrados. En estos animales, la corteza somatosensorial primaria (S1) contiene una representación del cuerpo caracterizada por manifestaciones morfológicas discretas denominadas barriles, separadas por regiones llamadas septos (Woolsey & Van der Loos, 1970) (ver Figura 2-a). Cada una de estas unidades representa colecciones discretas de mecanorreceptores ubicados tanto en la superficie corporal como en los músculos y vísceras. Estos mecanorreceptores proporcionan la información exterior e interoceptiva que sirve como base para elaborar percepciones somestésicas (Woolsey & Van der Loos, 1970).

La S1 se organiza como un mapa tal que las terminaciones nerviosas van a un lugar específico en la corteza, y su distribución espacial refleja la disposición territorial de cada parte del cuerpo (Rice & Van der Loos, 1977). Las sub-representaciones de las vibras mistaciales ocupan un lugar

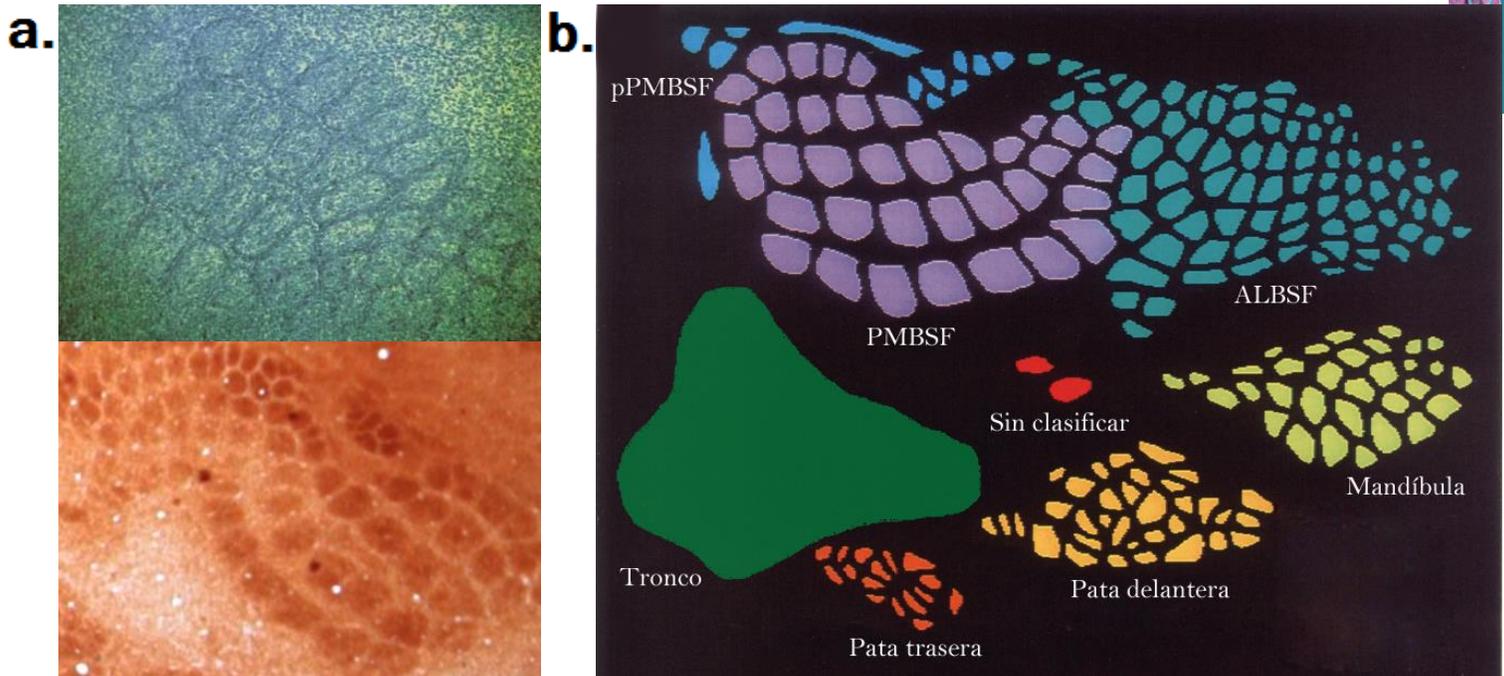


Figura b. tomada y modificada de Riddle, *et al.* (1993).

**Figura 2 | Barriles de la capa IV de la corteza somatosensorial primaria de la rata.** **a** | En la primera imagen se muestran los barriles de la S1 de la rata teñidos con azul de metilo, y en la segunda con un tratamiento con citocromo oxidasa. **b** | Esquema del mapa de barriles de la S1. Los más definidos, grandes y estudiados son los que procesan la información proveniente de las vibrisas mistaciales, los del subcampo postmedial (PMBSF). Encima y detrás de ellos se encuentran los posteriores a los del PMBSF (pPMBSF). Los del subcampo anterolateral (ALBSF) corresponden a la trompa.

preponderante. Éstas nacen en el belfo y están representadas en el llamado Subcampo de Barriles Postero Medial (PMBSF, por sus siglas en Inglés; ver Figura 2-b). Específicamente en esta subregión de la S1, los barriles se encuentran organizados en correspondencia precisa con el arreglo de vibrisas observado en la cara del animal (Woolsey & Van der Loos, 1970). Así, existen 5 filas con 4-7 barriles que representan las vibrisas ubicadas de forma paralela al puente de la nariz. Además, existe un Subcampo de Barriles Antero Lateral (ALBSF, por sus siglas en Inglés; ver Figura 2-b) y un subcampo de pequeños barriles, que representan a las microvibrisas del hocico y la mandíbula inferior, respectivamente. Finalmente, los cojinetes

de las plantas de los pies están representados por unidades discretas ubicadas en las subregiones correspondientes, y el tronco por una gran unidad ubicada hacia la zona medio lateral de la S1 (ver Figura 2-b).

En general, los barriles tienen un centro rico en neurópilo. Esta área se encuentra rodeada por un halo denso de cuerpos neuronales. Los barriles están constituidos por campos axónicos y/o dendríticos, y por células gliales y vasculares, relacionados de forma íntima y esencialmente confinados al barril. Los procesos se originan en cuerpos neuronales ubicados tanto en la capa IV de la S1, como en las capas corticales suprayacentes, contralaterales homólogas y subcorticales (Nackley, 2000).

Finalmente, es necesario mencionar que las neuronas contenidas en los barriles desarrollan plasticidad sináptica en función del historial de experiencia o ausencia de información táctil de la rata. Por ejemplo, si el folículo correspondiente a una de las vibrisas mistaciales es removido en una rata recién nacida, el barril que corresponde a dicha vibrisa se atrofiará mientras que los circundantes incrementarán su talla (Nackley, 2000). Aunque la magnitud de estas respuestas de reorganización disminuye después del cuarto día de vida en la capa IV, en las ratas se mantiene durante toda la vida en las capas II y III.

### Modificaciones de los barriles en las ratas ciegas

Tomando en cuenta que las cortezas primarias somatosensorial (S1) y auditiva (A1) se expanden en seres humanos ciegos (Kujala, 1995; revisado en Bavelier & Neville, 2002), no es de sorprender que lo mismo suceda en la S1 en ratas enucleadas bilateralmente, especialmente si son cegadas tempranamente (Volgyi, 1993). De acuerdo a ello, en el laboratorio se ha mostrado recientemente (Fetter, 2013) que los barriles del PMBSF de la rata albina cegada al nacimiento incrementan su área un 16-18% en promedio (ver Figura 3; panel superior). Aunque este aumento se asume relacionado al crecimiento y multiplicación de las neuronas que los conforman (Bronchti, 1992), prevalecen dos modelos diferentes que intentan explicar cómo es que ocurren los cambios descritos.

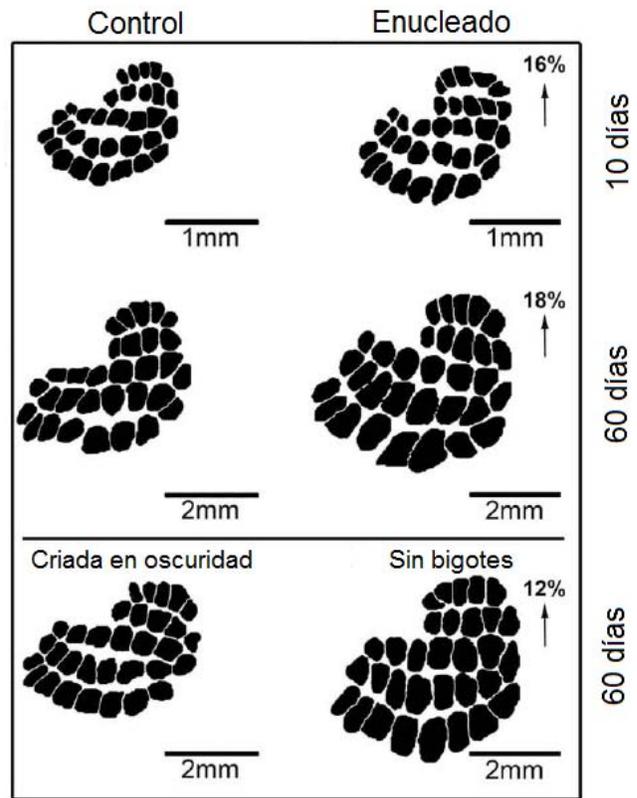


Figura tomada y modificada de Fetter, *et al.* (2013).

**Figura 3 | Comparación del tamaño de los barriles entre ratas videntes y ciegas.** Se muestran las reconstrucciones bidimensionales de cámara *lucida* de los barriles del PMBSF derivadas de los revelados por actividad de citocromo oxidasa. En las ratas ciegas hubo un aumento del 16% a los 10 días postnatales y 18% a los 60 días al compararlas con los controles. También aumentó el 12% en las ratas ciegas a las que se les removieron los bigotes de forma permanente al nacimiento. En cambio, en las ratas control criadas en oscuridad no se observó diferencia.

### Modelo de expansión por incremento de actividad

Uno de los modelos que explica la forma en la que ocurre la respuesta plástica manifestada como un aumento en el tamaño de la S1 y la A1 en las ratas cegadas al nacimiento propone que, al no existir la entrada de información visual en el cerebro, crecería el influjo de información de los sentidos que quedaron intactos, lo que acentuaría los niveles de procesamiento de esta información en las respectivas cortezas. Esto, a su vez, requeriría de un crecimiento



de los circuitos correspondientes para así proveer una mayor capacidad de procesamiento de información. Finalmente, de acuerdo con este modelo, a consecuencia del incremento en el tamaño y los niveles de procesamiento de la unidad durante un largo periodo, el metabolismo se vería intensificado de manera crónica, fomentando así un aumento en la vascularización de la región.

Apoyando a este modelo, existen datos que, en efecto, evidencian diferencias en la vasculatura entre ratas adultas control y cegadas al nacimiento. Zheng y Purves (1995), describieron que en las ratas enucleadas, la densidad vascular promedio de los microvasos en la S1 como un todo fue 11% mayor que en los controles, entre los 70 y 84 días de vida (Zheng & Purves, 1995). Al comparar los barriles individuales del PMBSF, se encontró un aumento en la densidad vascular promedio de cada uno de los 36 barriles, con diferencias de porcentaje que van desde el 7% hasta el 23% (Zheng & Purves, 1995). Esta diferencia no fue significativa en los septos. El aumento en la densidad vascular también fue observado de manera significativa en la A1 de las ratas enucleadas, aunque en menor magnitud (10% comparadas con los controles) (Zheng & Purves, 1995).

Sin embargo, a pesar de que algunos creen que ésta es evidencia suficiente para validar la idea de un incremento en el ingreso de información y por tanto de la intensificación en la actividad metabólica como causa de la expansión de la S1, también existen una serie de datos que no pueden ser explicados por este modelo o que incluso son incoherentes con él.

Entre ellos se encuentran los resultados reportados en el mismo estudio de Zheng y Purves (1995), quienes documentan un decremento (14%) de la densidad de vasos sanguíneos en la V1 de las ratas adultas (10-12 semanas) cegadas al nacimiento, observación que resulta paradójica, pues en seres humanos ciegos la V1 incrementa su tasa metabólica (De Volder, 1997; Wanet, 1988). Aunque las edades de las ratas y los humanos de los estudios no son equivalentes, igualmente las ratas ya llegaron a su madurez sexual, y en los estudios de humanos ciegos, todos muestran un aumento metabólico a pesar de que las edades de los sujetos van desde los 21 hasta los 58 años. Además, se ha observado lo mismo en macacos juveniles enucleados (Wu, 2013).

Otro aspecto contradictorio del trabajo referido (Zheng & Purves, 1995) es que, a lo largo de la representación corporal, muchos de los barriles que tienen un mayor aumento en la densidad vascular no son aquellos que presentan una mayor expansión. Finalmente, a pesar de que en los barriles expandidos se observa un tendencia a aumentar la densidad vascular en los animales enucleados, en más del 40% de los barriles del PMBSF esta diferencia no fue significativa (Zheng & Purves, 1995).

Dadas estas consideraciones, parece difícil de conciliar que el incremento en la densidad vascular observada en la S1 de las ratas cegadas al nacimiento responda a cambios en los niveles de actividad neuronal asociada con el uso. Reforzando la postura en contra del modelo de actividad se encuentran estudios llevados cabo en nuestro laboratorio que muestran que el aumento en



la densidad vascular no necesariamente ocurre como consecuencia de un incremento en los niveles de activación neuronal (Uribe-Querol, 2005) o bien por un aumento en la actividad metabólica oxidativa (Toscano-Marquez, 2008).

De hecho, en el laboratorio se ha mostrado que los niveles de actividad neuronal de la S1, monitoreados a través de mediciones de la actividad de citocromo oxidasa y la incorporación de 2-desoxi-D-glucosa (Fetter, 2013) (ver Figura 4), entre ratas control y enucleadas a los 10 o 60 días de edad, es similar (Fetter, 2013). Tampoco hubo correlación entre la actividad y el grado de expansión de los barriles (Fetter, 2013).

Adicionalmente, a pesar de que no se han realizado estudios que comprueben el

aumento en el uso de los bigotes en las ratas ciegas, sí se sabe que hasta el día postnatal 10 no existen movimientos voluntarios de las vibrisas mistaciales (Welker, 1964). Debido a que el aumento en el tamaño de los barriles entre los animales control y enucleados ya está presente antes del día 10 (Fetter, 2013) (ver Figura 3), no se puede hablar de una intensificación en el uso de las vibrisas como generador de un incremento en la actividad metabólica de la S1. Finalmente, la remoción postnatal de las vibrisas no previno la expansión de la S1 en las ratas enucleadas (Fetter, 2013), y tampoco se observó expansión en aquellos animales mantenidos en oscuridad desde el nacimiento hasta la vida adulta (Fetter, 2013) (ver Figura 3; panel inferior), una prueba más de que los cambios no se deben a un aumento en el uso de las vibrisas.

**Figura 4 | Comparación de los niveles de actividad neuronal en la S1 entre controles y enucleados a diferentes edades. a** | Cortes tangenciales representativos que muestran los barriles (flechas) teñidos con citocromo oxidasa. **b** | Autoradiogramas representativos de la <sup>3</sup>H2-deoxiglucosa de la capa IV de la S1. Los análisis densitométricos de ambos parámetros revelan que la actividad es similar entre controles y enucleados tanto en el día postnatal 10 como en el 60.

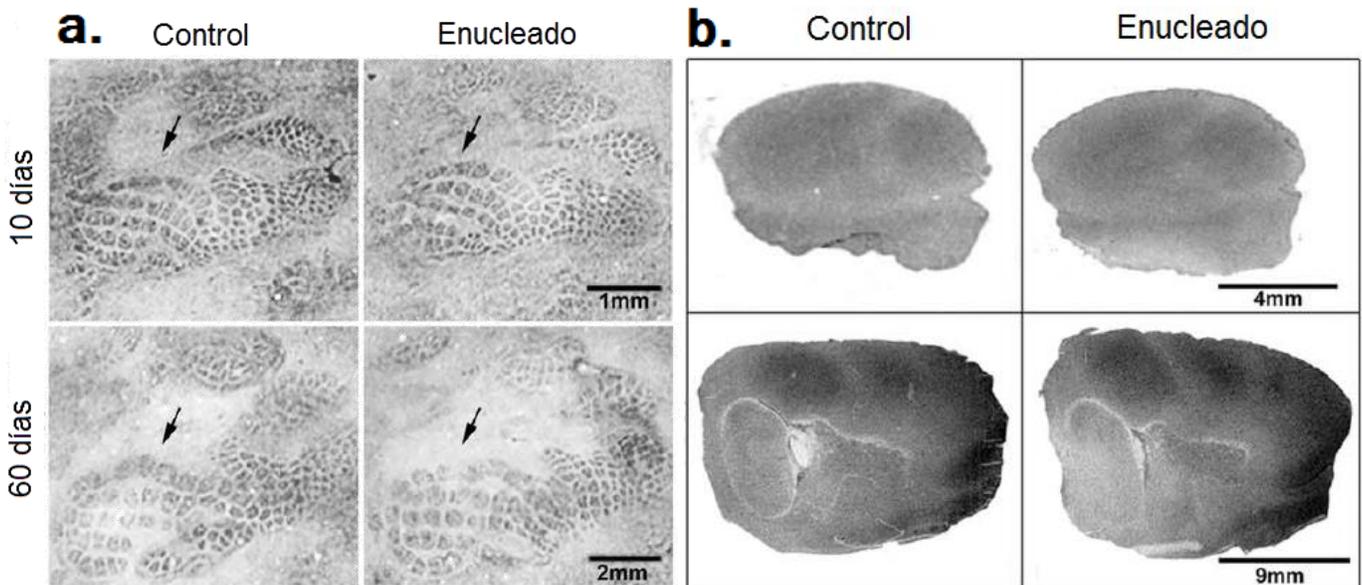


Figura tomada y modificada de Fetter, *et al.* (2013).



En conjunto, todo esto sugiere que la expansión de la S1 en las ratas cegadas al nacimiento no es originada por un aumento en el uso de esta modalidad sensorial, y que el incremento de la densidad vascular observado en los barriles de ratas adultas enucleadas pudiera representar el costo metabólico asociado con el hecho de tener barriles de mayor tamaño y no necesariamente un factor coadyuvante del proceso de expansión.

### Modelo de expansión por adelanto en la formación

Debido a que el modelo de hiperactividad no explica adecuadamente el incremento en el

área de la S1 en las ratas enucleadas, en el laboratorio se buscaron otros factores que pudieran hacerlo. Considerando que una forma en la que podría darse esta expansión sería a través un inicio temprano, un final tardío, la aceleración o la mayor duración de los sucesos que subyacen la ontogenia de esta región cerebral (McNamara, 1997; Smith, 2003), se exploró la posibilidad de que este proceso fuese el resultado de variaciones en la temporalidad de la formación y desarrollo de los barriles.

En concordancia con esto, se encontró un adelanto de 10 horas del proceso de formación de barriles en las ratas enucleadas (Fetter, 2013) (ver Figura 5-a).

#### Figura 5 | Comparación en el periodo de formación de barriles en ratas control y enucleadas. a

|Cortes tangenciales de la capa IV de la S1. A las 82 horas postnatales, se ve que ya hay indicios de la formación de la zona de barriles de las ratas ciegas, mientras que a las mismas horas postnatales aún no son distinguibles en las ratas control. La diferencia en el número de ratas en las que estas estructuras se volvieron apreciables se hizo mínima 10 horas después. b |Cortes coronales con los barriles teñidos con DiI, directamente desde el tálamo, a las 168 horas postnatales (panel superior). Dibujos con cámara lúcida de los axones en controles y enucleados (panel inferior). Los axones de los enucleados ocupan una mayor área dentro de la capa IV de la S1 que los controles, confirmando que la tasa de crecimiento axonal es mayor.

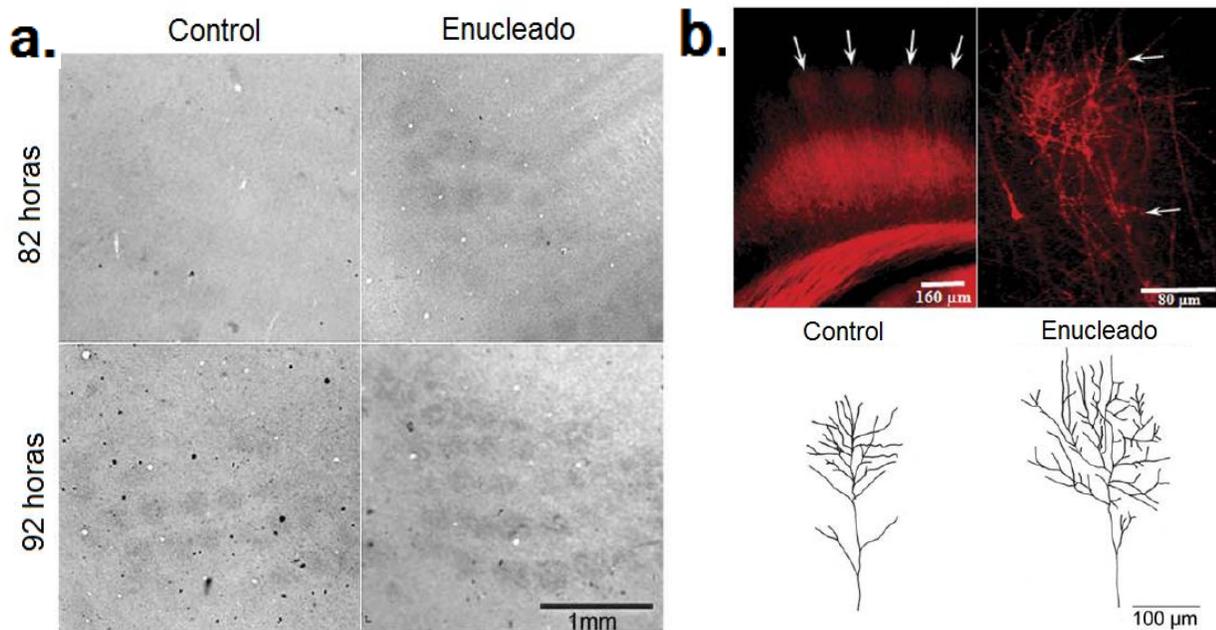


Figura tomada y modificada de Fetter, *et al.* (2013).



Específicamente, se observó que a las 82 horas de vida postnatal el 68% de los animales enucleados ya presentaba barriles, mientras que sólo aparecieron en el 29% de los controles. Asimismo, en las ratas enucleadas hubo un aumento en el tamaño y la complejidad de los axones talámicos que inervan a los barriles hacia los siete días de edad (ver Figura 5-b), lo que indica una aceleración en su desarrollo. De esta forma, la expansión de la S1 en las ratas enucleadas es el resultado de un proceso de heterocronía, quizá disparado por la ausencia de señales producidas por los ojos, en el que su formación empieza en edades más tempranas y el crecimiento axonal ocurre a una tasa más alta que en las ratas control (Fetter, 2013).

Sin embargo, aún queda la cuestión sobre cómo se originó el aumento en la densidad vascular observado en la S1 de ratas adultas enucleadas. Es posible que éste siga al proceso de crecimiento exacerbado de los componentes neuronales en esta región. De hecho, se sabe que, al menos a nivel periférico, el crecimiento axonal y el vascular están conjugados (Mukouyama, 2002). Como no existía un estudio en edades tempranas de los componentes vasculares en la S1 de las ratas ciegas que nos ayudara a valorar esta posibilidad, decidimos evaluarlo en el trabajo presente.

## **Justificación**

Si bien se sabe bastante sobre la plasticidad neural que ocurre después de adquirida la ceguera, no está claro cuánto tiempo es requerido para su desarrollo o qué otros cambios corticales pueden ocurrir como consecuencia. A través del estudio de la

reorganización que ocurre en el cerebro de sujetos privados visualmente, se pretende descubrir posibles maneras en las que las áreas corticales multi- y unisensoriales se forman durante el desarrollo y la evolución. Además, consideramos que los resultados obtenidos permitirán diseñar estrategias de rehabilitación para promover la recuperación de la función después de la ausencia de alguna sensación. Esto incluiría favorecer la plasticidad restaurativa después de que la entrada de sensaciones está comprometida y minimizar la interferencia de señales de otras modalidades.

En este contexto, sería ventajoso saber dos cosas: cómo se coordina la información de los sentidos que han quedado intactos, y cómo la información que sirve para más de un sentido afecta la distribución de los territorios que la procesan. Esto se pretende hacer desde un enfoque de plasticidad vascular. Siendo éste un elemento integral de la corteza cerebral, sus modificaciones también podrían llegar a afectar tanto los procesos de reorganización neuronal, como las interferencias ya observadas en implantes retinianos o cocleares.

## **Hipótesis**

Si la expansión de los barriles observada durante la primera semana de vida depende del aporte vascular, la densidad de los vasos sanguíneos deberá incrementarse durante la misma ventana de tiempo.

## **Objetivo**

Evaluar la respuesta plástica vascular de la S1 en ratas enucleadas neonatas y juveniles, para determinar el periodo de aparición del



incremento antes observado en los vasos de la S1 de las ratas adultas enucleadas.

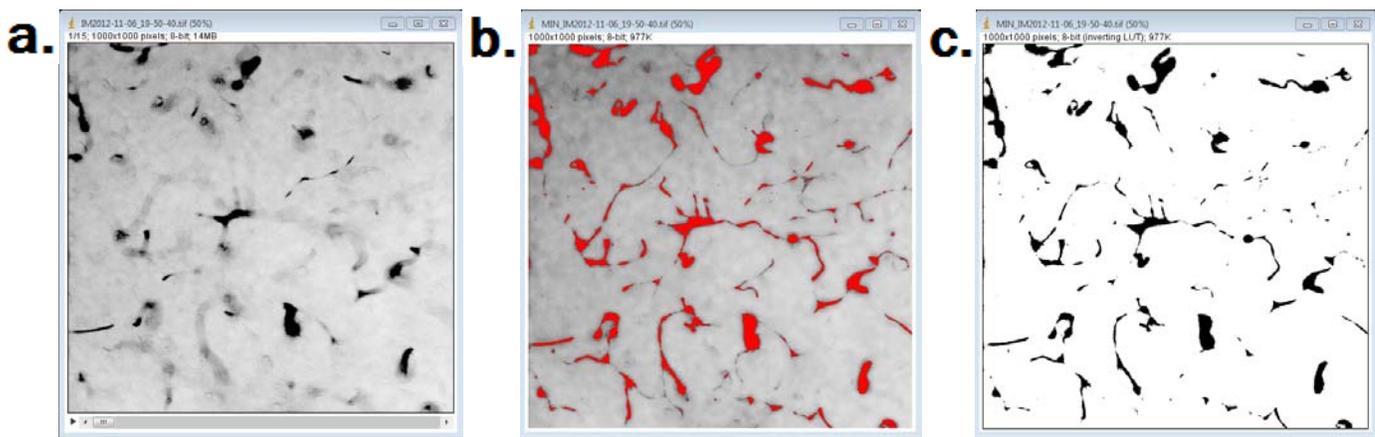
### Objetivos particulares:

1. **Confirmar la plasticidad vascular de los barriles de la S1 reportada en las ratas ciegas adultas**, estimando la densidad vascular de ratas de 70-75 días de vida, tanto controles como enucleadas al nacimiento, utilizando técnicas de perfusión supravital de tinta y micro-morfometría.
2. **Explorar el estado de proliferación vascular de la S1 en las ratas ciegas adultas**, utilizando técnicas de inmunofluorescencia contra BrdU y lectina LEA para la vasculatura.
3. **Determinar el periodo en el que se producen las diferencias de densidad vascular en la S1**, estimando la densidad vascular de crías de 7 y 20 días edad, tanto controles como enucleadas al nacimiento.
4. **Evaluar la especificidad de los cambios inducidos por la enucleación**, usando como control la densidad vascular del globo pálido, región que forma parte de los ganglios basales, ya que se ha visto previamente que en estructuras de los ganglios basales, como es el estriado, no hay cambios (Zheng & Purves, 1995).

## Métodos

**Obtención de los animales experimentales.** Se usaron ratas Wistar, machos y hembras, obtenidas del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM, y criadas en condiciones estándares controladas (a una temperatura de 21-25°C, con ciclos de luz de 7 de la mañana a 7 de la tarde, con libre acceso a comida y agua) en las instalaciones del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la misma dependencia. Todos los protocolos experimentales fueron aprobados por el comité de derechos animales del Instituto de Investigaciones Biomédicas. Cada camada fue ajustada a diez crías, de las cuales la mitad fue enucleada bilateralmente entre las 6 y las 10 horas después del nacimiento. Para esto se indujo anestesia quirúrgica por enfriamiento, induciendo hipotermia al meter a las crías directamente en hielo por tres minutos. Los ojos se removieron cortando con cuidado los músculos extrínsecos y el tejido conectivo que rodea a los globos oculares y cortando el nervio óptico justo detrás del disco óptico.

**Inyección de tinta china.** Para poder distinguir los vasos sanguíneos del cerebro, se inyectó tinta china a las ratas de 7, 20 y entre los 70 y los 75 días de edad. Los animales fueron anestesiados con pentobarbital sódico (250 mg/kg). A las ratas de 7 y 20 días se les inyectaron intracardiamente 5 ml de una solución de tinta china (Pelikan, color azul y morada) sin diluir. A las ratas de 10 semanas se les inyectaron 20 ml de una solución de tinta china (Casa Serra, color negra) con gelatina al 3%. La tinta de las ratas adultas tuvo que ser concentrada previamente un 20% de la



**Figura 6 | Procesamiento de las imágenes tomadas en las crías con el programa ImageJ.** a | Imagen representativa del archivo con los cortes ópticos de la vascularización de los barriles de la S1 a 20x tomados en las crías de 7 y 20 días de edad. b | La imagen muestra el siguiente paso en el procesamiento de las fotografías, en el que los cortes ópticos se apilaron para completar una misma imagen. En rojo se muestra el umbral de aceptación de los vasos sanguíneos para quitar el fondo. c | Imagen en blanco y negro (binaria) que fue la que se cuantificó para obtener la densidad vascular del área de los barriles.

original por evaporación y filtrada a través de un poro de 40  $\mu\text{m}$  para un mayor contraste. Después de ser hidratada en agua destilada, la grenetina se mezcló en una proporción de 1:1 con la tinta de las ratas adultas. Ambos tipos de perfusión se realizaron a un flujo promedio de 3.3 ml por minuto, con la rata colocada en posición supina sobre un cojín térmico para dilatar los vasos lo más posible; la tinta mezclada con gelatina se inyectó a 37 °C. En los animales adultos, la aorta descendente y el esófago fueron ligados para que la tinta reemplazara la sangre de los vasos únicamente de la parte superior del cuerpo, al introducirla tras el corte del atrio derecho. En las crías se permitió que la tinta recorriera todo el cuerpo. Posteriormente, se removieron los cerebros y se mantuvieron en paraformaldehído (PFA) al 4% durante una hora a temperatura ambiente antes de separar las cortezas y aplanarlas entre dos portaobjetos cubiertos con teflón a un grosor de exactamente 2mm. Las cortezas dentro del sistema de aplanado volvieron a ser incubadas en PFA durante dos noches a

4 °C, previo a su deshidratación en una serie de diferentes porcentajes de sacarosa: dos noches a 20% y dos a 30%. Finalmente, todos los tejidos se congelaron por medio de inmersión en 2-metilbutano enfriado a -40 °C en hielo seco y se guardaron a -80 °C hasta su uso. Debido a cuestiones técnicas, no se pudieron estudiar la S1 y el globo pálido de una misma rata en todos los animales.

**Densidad vascular.** De las cortezas aplanadas, se cortaron series de rebanadas tangenciales de 50  $\mu\text{m}$  que fueron teñidas con 4',6-diamino-2-fenilindol (DAPI). La tinción se hizo por inmersión (1 minuto) en el caso de los cerebros adultos. Para las muestras de ratas más jóvenes los cortes fueron montados en portaobjetos (1.5 minutos). Se capturaron aleatoriamente imágenes de los vasos sanguíneos llenados con tinta en la zona de barriles en varias representaciones de la S1. De la misma manera se examinó la densidad vascular en el globo pálido. Las fotografías de tinta negra y azul se tomaron en campo claro,



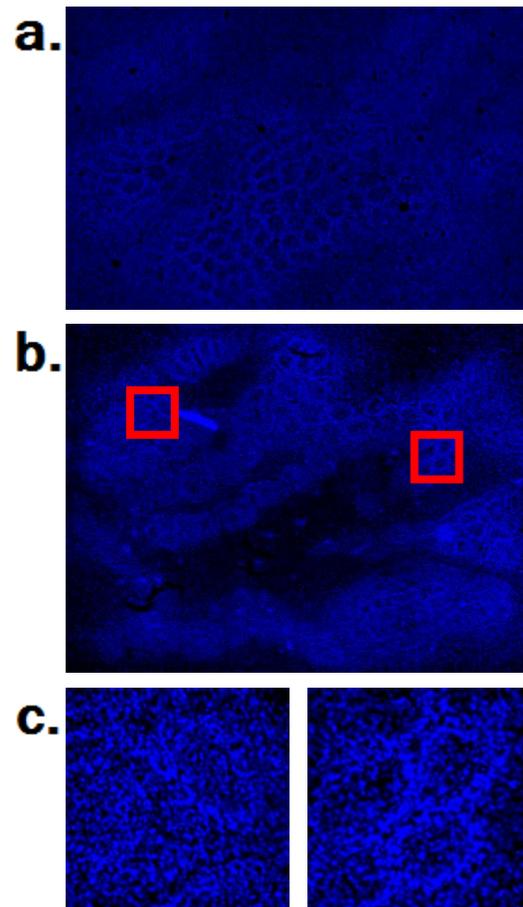
mientras que las de tinta morada se tomaron con el filtro de fluorescencia de rojo lejano. En los animales adultos se tomó una sola imagen en el plano focal en el que la mayoría de los vasos se veían bien definidos y en el mismo software del microscopio se hizo una adecuación de la imagen a blanco y negro (binario). Para las crías, debido a la distribución vertical de los vasos dentro de los cortes tangenciales, se apilaron cortes ópticos tomados cada 5  $\mu\text{m}$  hasta completar 50  $\mu\text{m}$  totales (Figura 6-a). Estas imágenes se procesaron en el programa ImageJ: los *stacks* se integraron en el eje z para reconstruir una sola imagen (Figura 6-b), que fue la que se analizó, y se ajustó el umbral para que quedara en blanco y negro (Figura 6-c). Posteriormente, las imágenes, tanto de crías como de adultos, fueron cuantificadas en ImageJ. Se definió la densidad vascular de cada fotomicrografía como el porcentaje de área de la imagen que los perfiles vasculares ocupaban en los barriles, de acuerdo a Zheng y Purves (1995), sin hacer distinción de capilares, vénulas o arteriolas. Se promediaron las densidades obtenidas para comparar la S1 como un todo. Como en los adultos la mayoría de los barriles pertenecientes al PMBSF y a la pata trasera tuvieron una pobre delimitación con la técnica de tinción de núcleos, no pudieron ser incluidos y sólo se muestrearon las representaciones de la mandíbula inferior, la pata delantera y sobre todo el ALBSF. Para las crías los barriles estuvieron mejor definidos, por lo que pudieron incluirse todas las representaciones en el análisis (ver Figura 7).

**Inmunofluorescencia contra BrdU.** Para ver si el aumento en la densidad vascular de

las ratas adultas enucleadas se lleva a cabo en la adultez, se analizó la proliferación endotelial de la S1 en las ratas de esa edad. Todas las ratas de 70-75 días fueron

**Figura 7 | Fotomicrografías de cortes tangenciales teñidos con DAPI que muestran una porción de la S1.**

**a** | Imagen a 4x de los barriles de la S1 en las ratas de 70-75 días postnatales; los barriles mejor definidos pertenecen a la trompa y la mandíbula inferior (ver Figura 2-b), mientras que los del PMBSF, que se encuentran cerca de la esquina inferior izquierda, están más difusos. **b** | Imagen a 4x de los barriles de la S1 en las ratas de 7 días de edad; aquí se logran ver con bastante definición los barriles de diferentes representaciones, incluidos los del PMBSF. Los recuadros rojos indican las regiones de las que se muestra aumento a continuación: **c** | Imágenes al 20x de algunos barriles del PMBSF en las crías de 7 días (izquierda), y los barriles posteriores del ALBSF (derecha).





inyectadas con bromodeoxiuridina (BrdU, 15 mg/ml de NaOH 7 mM y NaCl 0.9%) por cada 300 g del animal. Las muestras se incubaron con HCl 1N durante 30 min. a una temperatura de 37°C, previo al tratamiento con Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub> 0.1 M a pH 8.5 por 10 min. Después de la media hora a 65 °C con el InmunoRetriever, los cortes se incubaron una noche a 4 °C con el anticuerpo primario contra BrdU levantado en ratón a una dilución de 1:500 en PBT 0.3% con suero de caballo inactivado al 5%. Al día siguiente, se realizó la incubación del anticuerpo secundario contra ratón de Alexa 488 levantado en burro y diluido 1:500 en PBT durante 2 horas. Finalmente, el tejido fue incubado con el marcador vascular isolectina B4 (45 mg/ml de CaCl<sub>2</sub> (0.1 mg/ml) y MgCl<sub>2</sub> (0.1 mg/ml)) acoplada a un fluorocromógeno rojo por hora y media y se contratiñó con DAPI por un minuto. Por cuestiones técnicas de labilidad del tejido, no se pudo realizar la inmuno contra BrdU en las ratas más jóvenes.

**Análisis estadístico.** Para la S1 se promediaron los valores densitométricos de las imágenes de las diferentes representaciones de barriles. Todos los valores de densidad vascular se presentan como el promedio  $\pm$  el error estándar de la media (S.E.M.). Las diferencias en las densidades vasculares entre controles y enucleados se calcularon con la fórmula  $((\text{enucleados}-\text{controles})/\text{controles}) * 100$ . Se redujo el ruido de las muestras quitando los valores atípicos de cada uno de los grupos. Dado que todos los conjuntos de muestras se distribuían de forma normal (de acuerdo con la prueba de normalidad de Shapiro-Wilk y la de Anderson-Darling), se aplicó la

prueba T de Student para comparar las medias de las densidades vasculares de controles y enucleados en cada una de las edades estudiadas. Para ver si existía una relación lineal entre la densidad vascular de la S1 y el globo pálido se calcularon los Coeficientes de Correlación de Pearson, así como para la relación de la densidad vascular con el peso de los animales.

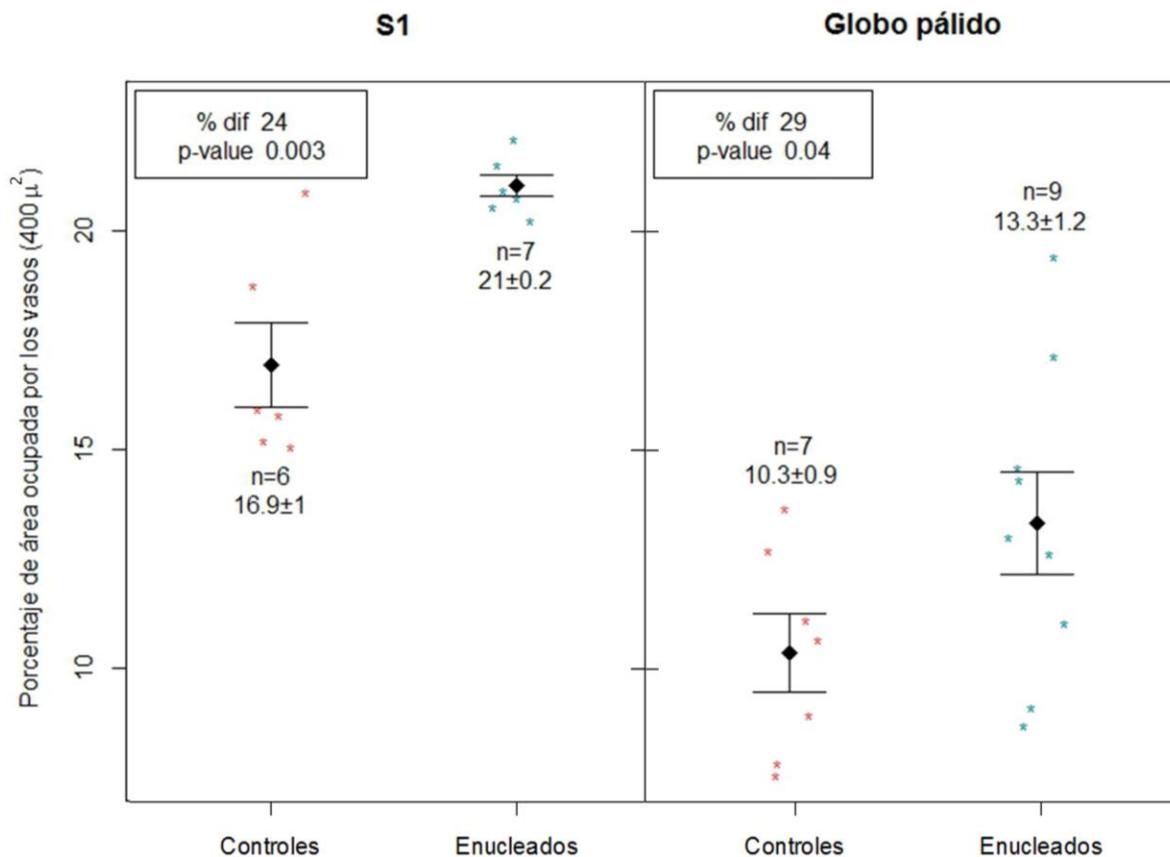
## Resultados

### El área ocupada por vasos sanguíneos en la S1 y en el globo pálido incrementó en las ratas adultas enucleadas al nacimiento

Con el objeto de corroborar los hallazgos reportados por Zheng y Purves, medimos la densidad vascular en ratas adultas. En promedio, el área ocupada por vasos sanguíneos en los barriles la S1 de las ratas de 70-75 días de edad enucleadas al nacimiento fue significativamente mayor (24%) que la observada en las ratas control (ver Figura 8; panel izquierdo). Algo similar se observó en el globo pálido, región escogida como control para evaluar la especificidad de los cambios, en el que las ratas enucleadas mostraron una densidad vascular 29% mayor a la mostrada por las ratas control (ver Figura 8; panel derecho).

Dado que nuestros resultados sugieren que sí hay diferencias en la vascularización del globo pálido, quisimos saber si éstos son específicos de cada zona, por lo que examinamos la relación entre la densidad vascular en ambas regiones, y no encontramos una correlación significativa ( $r=0.19$ ,  $p\text{-value}>0.05$ ).

## Controles vs Enucleados a los 70-75 días



**Figura 8| Densidad vascular de las ratas adultas.** Gráficas de dispersión de la densidad vascular de la capa IV de la S1 y del globo pálido, tanto en ratas control como en las enucleadas, a los 70-75 días de edad. Los asteriscos indican la densidad vascular de cada uno de los animales, mientras que el diamante indica el promedio y las barras el S.E.M del grupo. El porcentaje de diferencia para cada región se calculó con la fórmula  $((\text{enucleados}-\text{controles})/\text{controles})\cdot 100$ , y se aplicó una prueba T de Student.

Para ver si a esta edad había proliferación de células endoteliales, se realizó una inmunofluorescencia contra BrdU en los mismos adultos para los que se analizó la densidad vascular en la S1. Sin embargo, en ninguno de los controles o de los enucleados encontramos una sola célula marcada en esta región (ver Figura 9).

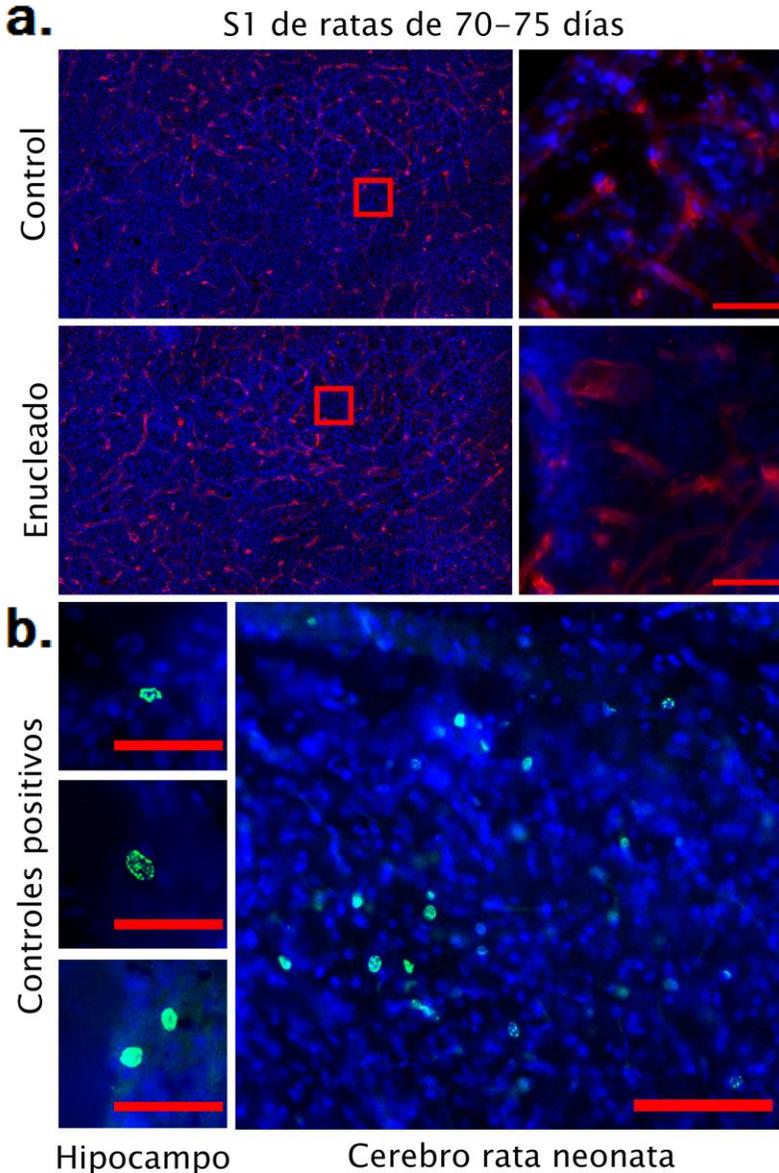
Una vez confirmado el aumento en la densidad vascular en la S1 de las ratas adultas enucleadas al nacimiento, y obtenidos los resultados preliminares que indican que la proliferación vascular, si ocurre, es muy baja en esta zona del cerebro en edades adultas, procedimos a analizar la vasculatura en ratas de 7 días de edad

postnatal, presumiendo que los cambios vasculares observados en la S1 de las ratas enucleadas ocurrirían en edades más tempranas y en paralelo a la expansión de los barriles.

### **El área ocupada por vasos sanguíneos en la S1 y en el globo pálido es similar entre las ratas neonatas control y las enucleadas al nacimiento**

En promedio, el área ocupada por vasos sanguíneos tanto dentro de los barriles de la S1 como en el globo pálido no fueron significativamente diferentes entre las ratas control y las enucleadas al nacimiento al ser comparadas a los siete días de edad (ver





**Figura 9 | Inmunofluorescencia contra BrdU en las ratas adultas. a** | Microfotografías representativas (y a la derecha aumento de las regiones indicadas por los recuadros rojos) que muestran la falta de células proliferantes (BrdU, verde) en la capa IV de la S1 de ratas de 70-75 días tanto en los 6 controles como en los 7 enucleados estudiados. En rojo se muestran la microvasculatura (isolectina B4). **b** | Controles positivos de la inmunofluorescencia. Las primeras tres microfotografías muestran las células proliferantes (BrdU, verde) dentro del hipocampo de las ratas de 70-75 días. La cuarta microfotografía muestra las células proliferantes dentro del cerebro de una rata de 7 días. Las barras rojas de todas las fotografías equivalen a 100  $\mu$ m. DAPI = azul; BrdU = verde, Isolectina B4 = rojo.

Figura 10). Al igual que en los adultos, no se encontró una correlación significativa ( $r=-0.07$ ,  $p\text{-value}>0.05$ ) de ambos parámetros.

Una vez evidenciado que los incrementos en la densidad vascular observados en las ratas enucleadas no concurren con el periodo de expansión neonatal de la S1, como se planteó en la hipótesis, se analizó una edad más tardía, con el objeto de estimar el momento en el que ocurren estos cambios. Se eligieron los 20 días postnatales debido a que a esta edad los movimientos de las vibrisas han madurado lo suficiente para alcanzar la frecuencia y coordinación características de las ratas adultas (Welker, 1964; Landers & Phillip Zeigler, 2006) (ver Figura 14); estudios previos han mostrado que la actividad motora se asocia con un incremento de la vasculatura, al menos en el cerebelo (Black, 1990; Isaacs, 1992). Además, se sabe que alrededor de los 20 días postnatales el índice de angiogénesis decae en el cerebro de ratas normales (Rowan & Maxwell, 1981).

### El área ocupada por vasos sanguíneos en la S1 y en el globo pálido incrementó en las ratas juveniles enucleadas al nacimiento

En promedio, el área del barril ocupada por vasos sanguíneos en la S1 y en el globo pálido fue 21% y 24% mayor, respectivamente, en las ratas enucleadas al nacimiento que en las control al ser comparadas a los 20 días



de edad (ver Figura 11). En este caso, tampoco hubo una correlación significativa entre la densidad vascular de la S1 y el globo pálido ( $r=-0.4$ ,  $p\text{-value}>0.05$ ).

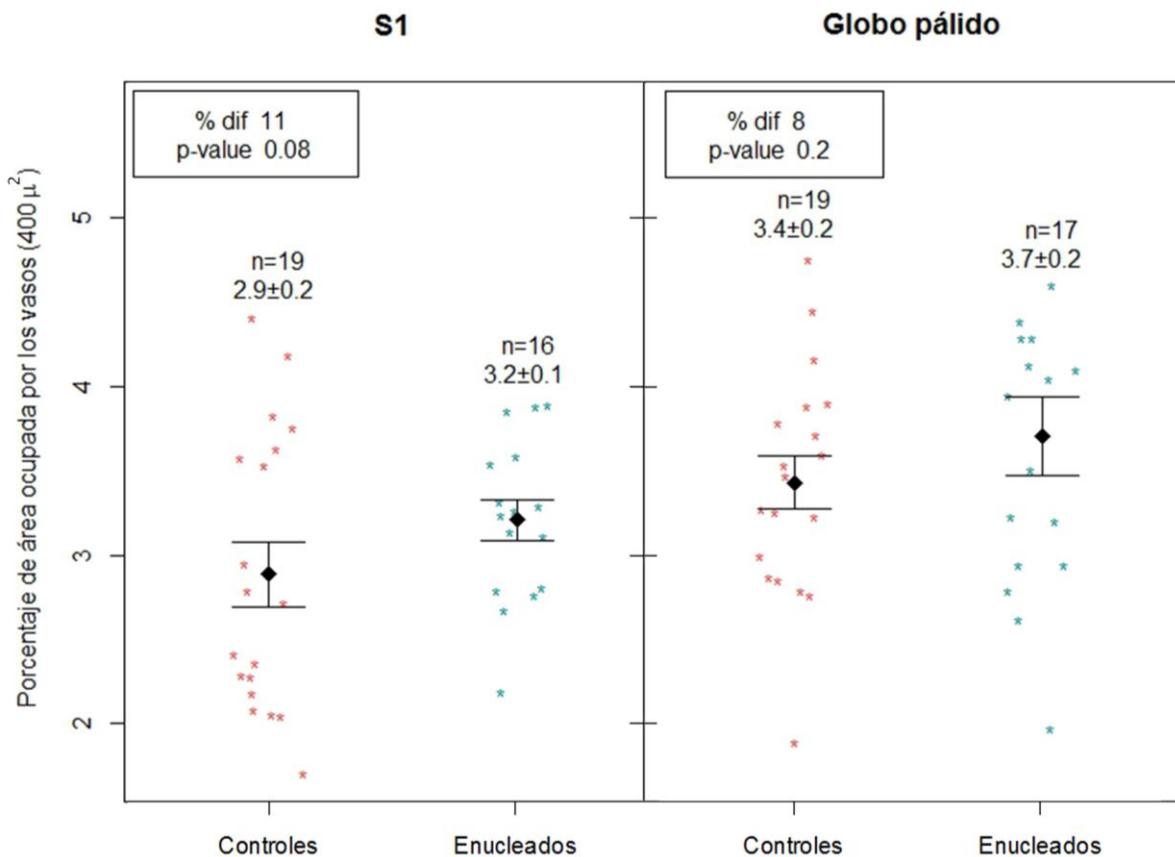
Con estos datos podemos asegurar que el aumento vascular observado en los adultos enucleados se inicia entre la primera y la tercera semanas de vida postnatal.

### La densidad vascular aumenta con el tiempo tanto en la S1 como en el globo pálido

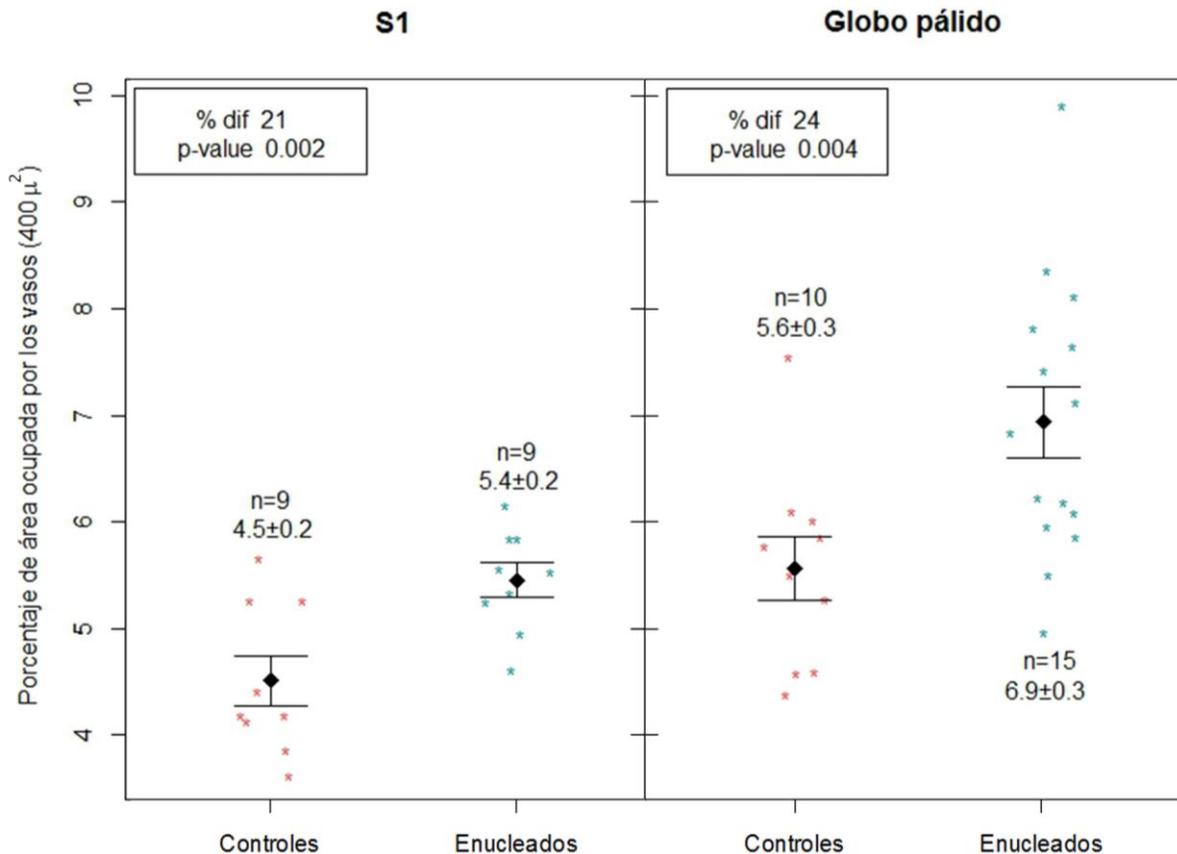
El área de los barriles ocupada por vasos sanguíneos en la S1 y en el globo pálido incrementa con la edad tanto en los animales control como en aquellos enucleados al nacimiento (ver Figuras 12 y 13). A los 7 días de edad se ven vasos gruesos, pero cortos y muy dispersos, mientras que dos semanas después, aunque los vasos son de menor calibre, ya se observa el establecimiento de la complejidad de la red vascular. Finalmente, en los adultos hay un aumento en el grosor de los vasos de ese lecho ya establecido (ver Figura 12).

**Figura 10| Densidad vascular de las ratas neonatas.** Gráficas de dispersión de la densidad vascular de la capa IV de la S1 y del globo pálido, tanto en ratas control como en las enucleadas, a los 7 días de edad. Los asteriscos indican la densidad vascular de cada uno de los animales, mientras que el diamante indica el promedio y las barras el S.E.M del grupo. El porcentaje de diferencia para cada región se calculó con la fórmula  $((\text{enucleados}-\text{controles})/\text{controles})\cdot 100$ , y se aplicó una prueba T de Student.

### Controles vs Enucleados a los 7 días



## Controles vs Enucleados a los 20 días



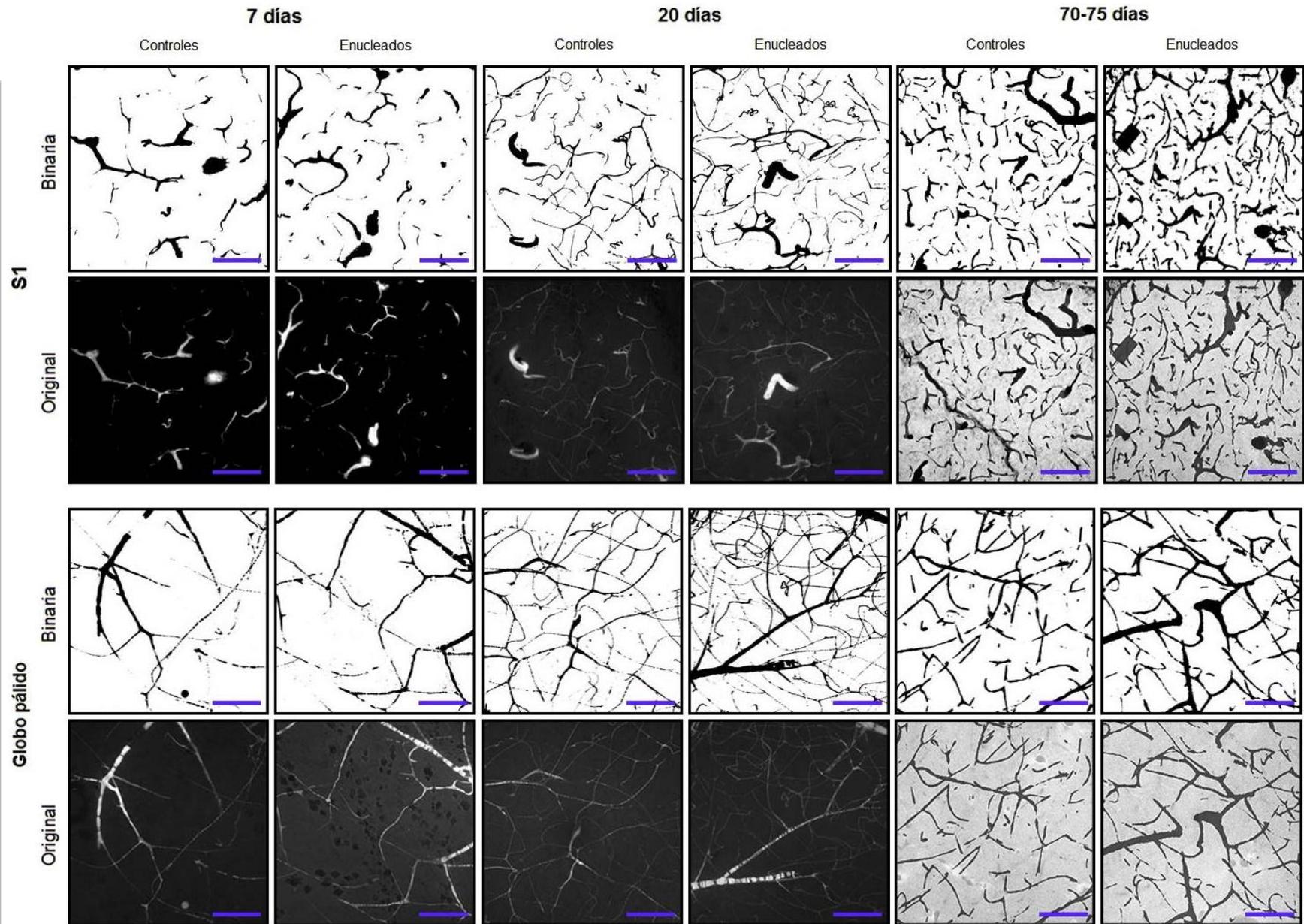
**Figura 11| Densidad vascular de las ratas juveniles.** Gráficas de dispersión de la densidad vascular de la capa IV de la S1 y del globo pálido, tanto en ratas control como en las enucleadas, a los 20 días de edad. Los asteriscos indican la densidad vascular de cada uno de los animales, mientras que el diamante indica el promedio y las barras el S.E.M del grupo. El porcentaje de diferencia para cada región se calculó con la fórmula  $((\text{enucleados}-\text{controles})/\text{controles})\cdot 100$ , y se aplicó una prueba T de Student.

La densidad vascular es mayor en el globo pálido que en la S1 en edades tempranas, y se invierte en los animales adultos (ver Figura 13), quizás en respuesta a las diferencias en la velocidad de maduración entre estas estructuras; el globo pálido alcanza la madurez antes que la S1 (Micheva & Beaulieu, 1995; Lucznka, 2003; Greenamyre, 1987; Oo, 2005).

Es interesante que la diferencia entre las pendientes de las curvas de crecimiento de las ratas control y las enucleadas fue mayor entre los 7 y los 20 días de vida que entre los 20 y los 70-75 días para ambas estructuras (S1: 7-20=0.4 vs 20-70=0.2; Globo pálido: 7-

20=0.5 vs 20-70=0.3). Esto indica que la diferencia entre los grupos con relación a este parámetro se instaure entre los 7 y los 20 días. Una vez establecida esta diferencia, más que aumentar con la edad, el lecho vascular pareciera expandirse de manera escalar en ambas estructuras junto con el crecimiento de la S1, como se puede ver en la Figura 13.

Finalmente, algo curioso es que mientras en la corteza somatosensorial la dispersión de los datos es menor en los enucleados que en los controles, en el globo pálido es lo contrario (ver Figuras 8, 10, 11 y 13).



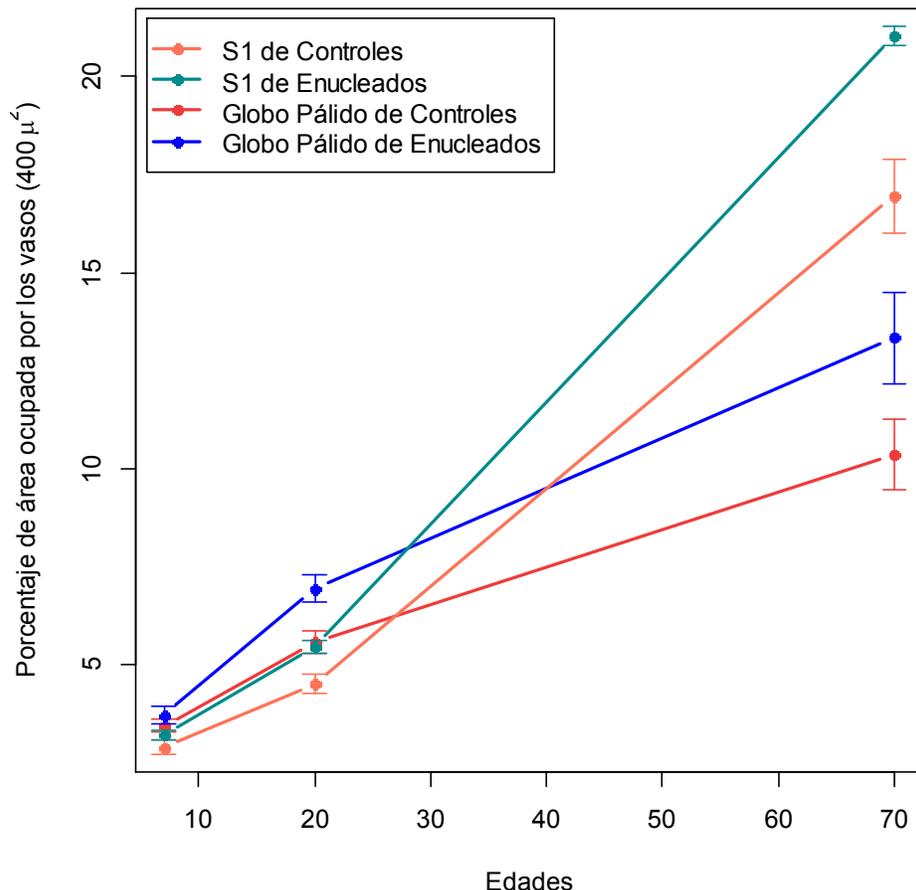
**Figura 12| Composición angiogénica de la S1 y el globo pálido de las ratas enucleadas en comparación con la de los controles.**

Microfotografías representativas de los cortes tangenciales de 50 µm de grosor que muestran la disposición vascular de la capa IV de la S1 (arriba) y del globo pálido (abajo) en ratas neonatas, juveniles y adultas, tanto en controles como en enucleadas. Se muestran las imágenes originales del microscopio (abajo) y las imágenes en las que se realizó la medición del porcentaje ocupado por los vasos (arriba). Las microfotografías de las crías fueron tomadas con epifluorescencia en rojo lejano y las de las adultas en campo claro. La barra equivale a 100





### Desarrollo del área vascular de S1 vs Globo Pálido



**Figura 13| Evolución de la densidad vascular en la S1 comparada con la del globo pálido en controles y enucleados.** Curvas de aumento del área ocupada por los vasos de los controles y los enucleados en la S1 (rosa y azul, respectivamente) y el globo pálido (rojo y azul marino, respectivamente) a los 7, 20 y 70-75 días postnatales. El S.E.M. de los datos no se indica ya que aparece en las figuras anteriores.

### Discusión

La enucleación neonatal en los roedores conduce a una expansión de la S1, la cual ha sido atribuida al aumento en la actividad neuronal sensorial a lo largo de la vía somestésica. Se asume también que el incremento en el uso de esta vía conlleva al incremento en la densidad vascular de los barriles (Zheng & Purves, 1995). Dado que se cree que la densidad vascular se relaciona

directamente con el nivel de actividad metabólica y neuronal (e.g. Riddle, *et al.* (1993); aunque ver Uribe-Querol, *et al.* (2005) para evidencia que contraviene esta presunción), el incremento del área ocupada por vasos en los barriles de la S1 en los animales enucleados al nacimiento apoyaría la hipótesis que sugiere que los incrementos en la actividad neuronal evocada conducen a la expansión de la S1 (Zheng & Purves, 1995).

Rivalizando con esta postura se encuentra un estudio llevado a cabo recientemente en nuestro laboratorio (Fetter, 2013), en el que se mostró que la actividad neuronal provocada que se asocia con el uso de la vía somatosensorial juega un papel menor en el proceso de expansión de la S1. En plena consonancia con esta visión, en el presente trabajo mostramos que el incremento en la densidad vascular en la

S1 ocurre posterior al séptimo día de vida (ver Figuras 10 y 11), y por tanto, posterior a la expansión de la S1 (Fetter, 2013) en las ratas enucleadas al nacimiento. De esta manera, es claro que los cambios en la densidad vascular no reflejan incrementos en los niveles de activación neuronal en las ratas enucleadas. Más aún si se toma en cuenta que los cambios se dan dentro del periodo de desarrollo normal del sistema



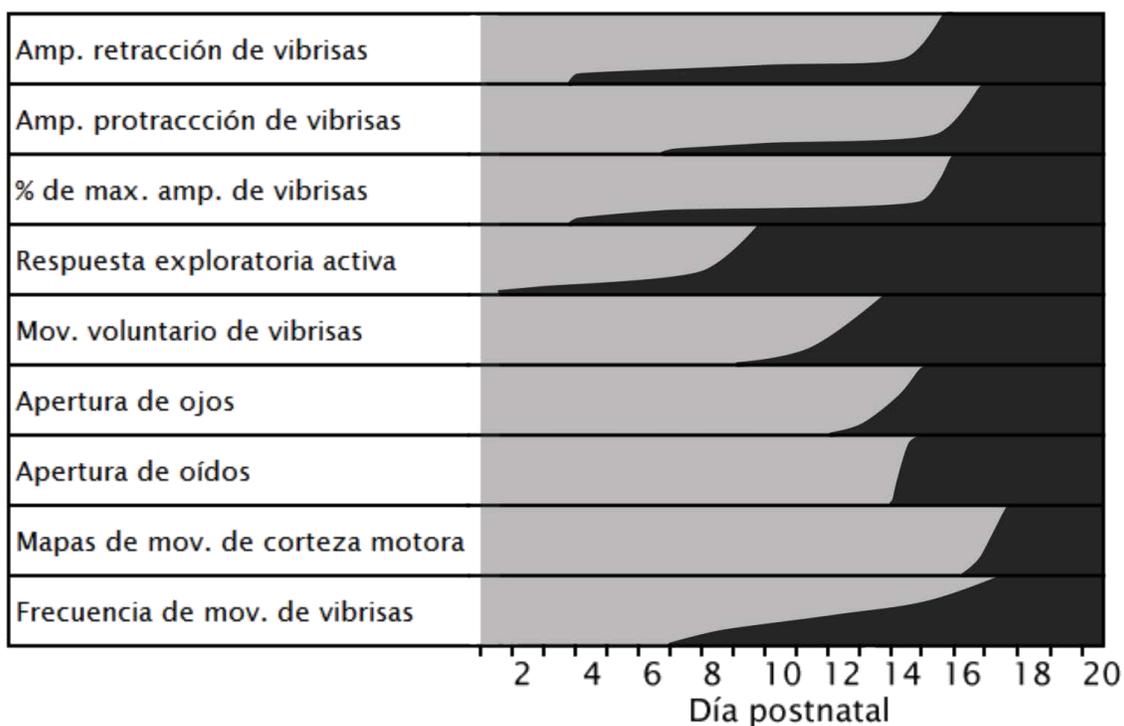
vascular del cerebro (Robertson, 1985) y no como consecuencia de un incremento crónico en el metabolismo en edades posteriores.

Pensamos que existen tres posibilidades, la primera no mutuamente excluyente con las otras dos, que podrían explicar el incremento de la densidad vascular en los barriles de la S1 en las ratas enucleadas. La primera es que sean el resultado de la puesta en marcha del movimiento voluntario de las

vibrisas y la exploración más activa del medio ambiente por parte de la cría, situaciones, entre otras, que ocurren a partir del día doce de vida postnatal en la ratas (Welker, 1964; Aldridge, 2004; Landers, 2006). Para explicar de forma más clara la coincidencia de diferentes actividades o eventos del desarrollo, se realizó un análisis de la información obtenida de los artículos de Welker (1964) y de Landers y Philip Zeigler (2006), el cual se resume en la Figura 14. La segunda es que respondan a cambios

**Figura 14| Calendario comparativo del desarrollo de las habilidades y canales de comunicación con el entorno en la rata.** En negro se muestra el grado de desarrollo de cada habilidad dependiente de la edad postnatal de la rata.

En el eje vertical se grafica el porcentaje de crías que cumplían con la característica señalada, excepto en el caso de las amplitudes de retracción y protracción, que se midieron en grados, y la frecuencia de movimiento de vibrisas, que se midió en Hz. En promedio, entre los 8 y 10 días de edad empiezan las respuestas exploratorias activas, y entre éstos y los 16 días postnatales surge el bigoteo voluntario, con movimientos pequeños y no coordinados que van mejorando con el tiempo hasta llegar a la amplitud máxima, momento en el que se da la aparición inicial de los mapas de movimiento para la estimulación del área motora cortical de las vibrisas. Es hasta el día 18 en el que en promedio el número de movimiento de las vibrisas por segundo se encuentra dentro del rango normal de las ratas adultas (6-9 Hz). Entre los 12 y los 14 días se abren los canales sensoriales. Amp. = amplitud, Mov. = movimiento.



La figura es el resultado de un análisis basado en los datos obtenidos por Welker (1964) y por Landers y Phillip Zeigler (2006).



en la organización espacio temporal de la actividad neuronal, sin que estos cambios impliquen un aumento en los niveles de activación neuronal (ver Uribe-Querol, *et al.* (2005)). Y, finalmente, los resultados aquí obtenidos, aunque descartan la existencia de un crecimiento paralelo de los componentes vasculares con los neuronales, no desechan la posibilidad de que el incremento en la densidad vascular de la ratas enucleadas se dé también por un proceso de heterocronía, independiente de la actividad metabólica. Dado que no hay mucha diferencia en el incremento vascular entre los 20 y 70-75 días y que a los 20 días ya se encontró la diferencia, es poco probable que se trate de un retraso en la formación del lecho vascular, pero todavía puede haber un adelanto o una aceleración. En el futuro, tendremos que evaluar estas posibilidades.

Una observación interesante realizada en nuestro estudio se relaciona con el hecho de que la diferencia porcentual de los promedios del área por barril ocupada por vasos sanguíneos con relación a las ratas control fue menor en los animales adultos enucleados evaluados por Zheng y Purves (1995) al ser comparados con los nuestros. Aunque dicha discrepancia pudiera atribuirse a que los valores que obtuvimos para este parámetro en los animales control fueron menores que los reportados por Zheng y Purves (1995) ( $16.9\% \pm 1$  vs  $19.3\% \pm 0.9$ , respectivamente), también podría resultar de diferencias en el manejo en el bioterio de las ratas empleadas en ambos estudios. En apoyo a esta posibilidad, se han mostrado diferencias en el número de anastomosis vasculares cerebrales, asociadas con diferencias en los procedimientos de

cuidado de los animales en diferentes bioterios (Oliff, 1997). Otra posibilidad que pudiese explicar las discrepancias entre estudios es que nuestras mediciones para las ratas adultas se realizaron predominantemente en los barriles pertenecientes al ALBSF, mientras que las de Zheng y Purves incluyeron los barriles del PMBSF en mayor proporción. Dado que las múltiples representaciones tienen diferentes magnitudes de expansión y aumento vascular en los enucleados (Zheng & Purves, 1995), es posible que la inclusión de barriles de diferentes subcampos en el análisis conduzca a promedios de la densidad vascular que sean inconsistentes entre los estudios. No obstante, el hecho de que ambos trabajos muestren un aumento en la densidad vascular en las ratas adultas enucleadas al nacimiento apoya dos cosas: que la plasticidad vascular es un proceso robusto y que forma parte de la plasticidad intermodal en los individuos ciegos. No encontramos una correlación significativa ( $cor = -0.4$ ,  $p\text{-value} > 0.1$ ) entre el peso corporal y la vasculatura en los animales adultos estudiados que pudiera proveer indicios sobre alguna otra posible explicación.

Otro hallazgo contrastante entre el estudio de Zheng y Purves y el nuestro tiene que ver con la especificidad de la respuesta plástica vascular. Si bien ellos sugieren que ésta se limita a las cortezas sensoriales, en nuestro trabajo mostramos que el globo pálido también desarrolla cambios plásticos vasculares. Si esta respuesta es más generalizada, no lo sabemos. Esta discrepancia seguramente se debe a la elección de la zona control. Mientras que



Zheng y Purves analizaron el estriado, nosotros nos enfocamos, por cuestiones técnicas, en el globo pálido, una estructura en la que se proyectan los axones de las neuronas del estriado, por lo que en teoría tampoco debería haber presentado cambios. Sin embargo, parece que las diferentes aferencias, eferencias, número de estriosomas, densidades de inervación cortical y conectividades que poseen son suficientes para que la enucleación tenga un efecto diferencial en la vascularización de ambas regiones. Esto nos indica que la elección del área de medición, de hecho, se torna crítica al momento de tratar de establecer comparaciones entre los estudios. Haría falta que nosotros revisáramos la misma región para verificar los datos.

Sin embargo, queda claro que la respuesta plástica vascular en las ratas enucleadas no se restringe a la S1 y que quizás compromete estructuras relacionadas con el movimiento, al menos, de las vibrisas (Aldridge, 2004). En apoyo a esta posibilidad, estudios previos han mostrado que el desempeño motor incrementa la vasculatura en el cerebelo (Black, 1990; Isaacs, 1992), que el globo pálido participa en la localización de estímulos originados en las vibrisas (Sharp & Evans, 1982; Schneider, 1982), que la remoción de las vibrisas conduce a respuestas plásticas en el estriado (Huston, 1986; Huston, 1988) y que estas zonas participan en la planeación, modulación y ejecución del movimiento voluntario de las vibrisas en ratas control y enucleadas (Alloway, 1999; Aldridge, 2004; Martin, 1967), conducta que se ve alterada con la condición de ceguera (Welker, 1964; Toscano-Marquez, 2008), por lo que no

sería tan sorprendente encontrar cambios en la vascularización de los ganglios basales.

A este respecto, el lector podría pensar que los cambios reportados en la densidad vascular en nuestro trabajo pudieran ser inespecíficos. Sin embargo, podrían estar reflejando un proceso de cambio diferencial específico para cada región, ya que cada una de estas modificaciones está ligada a la condición de ceguera del animal y ocurre en diferentes magnitudes.

Sobre el crecimiento vascular en general, podemos decir que el hecho de que la vascularización vaya en aumento con la edad tanto en la S1 como en el globo pálido en ambos grupos de animales es un hallazgo esperado pues se sabe que así es como ocurre en el cerebro (Ogunshola, 2000). De esta forma, aunque el proceso de angiogénesis está muy activo en la corteza cerebral durante las dos primeras semanas de vida postnatal (Rowan & Maxwell, 1981), la expansión rápida de esta región explica la baja densidad vascular observada en el cerebro de las crías lactantes (Wang, 1992), a pesar del evidente aumento en la complejidad durante este periodo. Una vez finalizado el proceso de expansión rápida de la corteza cerebral, la angiogénesis cortical incrementa progresivamente la densidad del lecho hasta la edad adulta, como se sabe que sucede (Rowan & Maxwell, 1981).

Finalmente, el trabajo presente abre paso para la búsqueda de la forma en la que los componentes vasculares puedan ser usados en el tratamiento de rehabilitación para la recuperación de algún sentido.



## Conclusiones

En este trabajo confirmamos que existe un aumento significativo de la densidad vascular en la S1 de las ratas adultas enucleadas al nacimiento, lo que concuerda con los datos obtenidos por Zheng y Purves (1995). Sin embargo, a diferencia del trabajo mencionado, encontramos que los cambios vasculares no se restringen a la S1 sino que alcanzan componentes motores del sistema nervioso central.

Por otro lado, no pudimos documentar diferencias en la densidad vascular entre los grupos de ratas control y enucleadas al nacimiento a los 7 días de edad, aunque sí a los 20 días de vida, por lo que concluimos que los cambios en la vascularización no ocurren en paralelo con la expansión de la S1.

En base a esto, pensamos que nuestros datos apoyan la noción de que la expansión de S1 en la ratas enucleadas no es dependiente del incremento en el uso de la vía somatosensorial.

## Perspectivas

Consideramos que en el futuro se deberán hacer las mediciones de las densidades vasculares dentro de la S1 de ratas control y enucleadas de 12 días de edad en busca de una relación entre estos cambios y el momento de inicio de los movimientos de las vibras y la actividad exploratoria y los momentos de inicio y término de la generación del cambio. Además, se deberá extender el análisis a otras regiones del cerebro, tal como el cuerpo calloso o la fimbria del hipocampo, en busca de alguna

región cuyos niveles de vascularización no se vean afectados por la enucleación, o mostrar que, si los hay, las magnitudes de cambio son específicas para cada zona.

También sería necesaria la validación de los resultados obtenidos con una técnica diferente al llenado de vasos, como pudiera ser la tinción con fosfatasa alcalina, para eliminar cualquier artefacto consecuencia de la técnica de detección utilizada en este trabajo.

Dado que el aumento en la densidad vascular no es la única forma de otorgar un aporte, deberían analizarse el flujo sanguíneo y la permeabilidad de los vasos en busca de diferencias en controles y enucleados.

De ser posible, sería interesante repetir las mediciones de los vasos sanguíneos aquí realizados en animales no enucleados pero sí mantenidos en oscuridad, o de animales enucleados pero sin bigotes, en espera de aclarar el evento que desencadena los cambios vasculares observados tras la remoción de los globos oculares.

Por otra parte, sería importante establecer el periodo de proliferación de las células endoteliales en esta región como parte de la dilucidación del mecanismo detrás del aumento en la densidad vascular en los adultos enucleados.

Otro de los análisis que deberá realizarse, dependiendo de los resultados que se obtengan en las densidades vasculares de edades más avanzadas, sería la medición de los potenciales de acción, por medio de técnicas de electrofisiología, para corroborar



los patrones de distribución temporal de los disparos neuronales.

Por último, el decremento observado en la densidad vascular de la V1 hasta ahora no puede ser explicado ni por el modelo del incremento en la actividad, ni por el de la heterocronía o el de la apertura de los canales sensoriales, por lo que representa información muy interesante en la que se podría trabajar en un futuro.

## Trabajos citados

- Alary, F., Duquette, M., Goldstein, R., Elaine Chapman, C., Voss, P., La Buissonniere-Ariza, V. & Lepore, F. **Tactile acuity in the blind: a closer look reveals superiority over the sighted in some but not all cutaneous tasks.** *Neuropsychologia* 47: 2037–2043 (2009).
- Aldridge, J.W., Berridge, K.C. & Rosen, A.R. **Basal ganglia neural mechanisms of natural movement sequences.** *Can J Physiol Pharmacol* 82(8–9):732–739 (2004).
- Alloway, K.D., Crist, J., Mutic, J.J. & Roy S.A. **Corticostriatal projections from rat barrel cortex have an anisotropic organization that correlates with vibrissal whisking behavior.** *J Neurosci* 19:10908–10922 (1999).
- Bavelier, D. & Neville, H.J. **Cross-modal plasticity: where and how?** *Nat Rev Neuroscience* 3:443–452 (2002).
- Bavelier, D. & Hirshorn, E. A. **I see where you're hearing: How cross-modal plasticity may exploit homologous brain structures.** *Nature Neuroscience* 13(11):1309–1311 (2010).
- Black, J.E., Isaacs, K.R., Anderson, B.J., Alcantara, A.A. & Greenough, W.T. **Learning causes synaptogenesis whereas motor activity causes angiogenesis in cerebellar cortex of adult rats.** *Proc Natl Acad Sci USA* 87:5568–5572 (1990).
- Bronchti, G., Schonenberger, N., Welker, E. & Van der Loos, H. **Barrel field expansion after neonatal eye removal in mice.** *Neuro Report* 3(6):489–492 (1992).
- Büchel, C., Price, C., Frackowiak, R.S. & Friston, K. **Different activation patterns in the visual cortex of late and congenitally blind subjects.** *Brain* 121:409–419 (1998).
- Burton, H. **Visual cortex activity in early and late blind people.** *J Neurosci* 23:4005–4011 (2003).
- Cattaneo, Z., Vecchi, T., Cornoldi, C., Mammarella, I., Bonino, D., Ricciardi, E. & Pietrini, P. **Imagery and spatial processes in blindness and visual impairment.** *Neurosci Biobehav Rev* 32:1346–1360 (2008).
- Cohen, L.G., Celnik, P., Pascual-Leone, A., Corwell, B., Faiz, L., Dambrosia, J., Honda, M., Sadato, N., Gerloff, C., Catala, M.D. & Hallett, M. **Functional relevance of cross-modal plasticity in blind humans.** *Nature* 389:180–183 (1997).
- Collignon, O., Voss, P., Lassonde, M. & Lepore, F. **Cross-modal plasticity for the spatial processing of sounds in visually deprived subjects.** *Exp Brain Res* 192:343–358 (2009).
- De Volder, A. G., Bol, A., Blin, J., Robert, A., Arno, P., Grandin, C., Michel, C. & Veraart, C. **Brain energy metabolism in early blind subjects: neural activity in the visual cortex.** *Brain Research*, 750(1-2):235–244 (1997).
- Fetter Pruneda, I. , Geovannini-Acuña, H., Santiago, C., Ibararán-Viniegra, A. S., Martínez-Martínez, E., Sandoval-Velasco, M., Uribe-Figueroa, L., Padilla-Cortés, P., Mercado-Célis, G. & Gutiérrez-Ospina, G. **Shifts in Developmental Timing, and Not Increased Levels of Experience-Dependent Neuronal Activity, Promote Barrel Expansion in the Primary Somatosensory Cortex of Rats ENUcleated at Birth.** *PLoS ONE*, 8(1):e54940 (2013).
- Fu, K.G., Johnston, T.A., Shah, A.S., Arnold, L., Smiley, J., Hackett, T.A., Garraghty, P.E. & Schroeder, C.E. **Auditory cortical neurons respond to somatosensory stimulation.** *J Neuroscience* 23:7510–7515 (2003).
- Goldreich, D. & Kanics, I.M. **Tactile acuity is enhanced in blindness.** *J Neuroscience* 23: 3439–3445 (2003).
- Hamilton, R., Keenan, J.P., Catala, M. & Pascual-Leone, A. **Alexia for Braille following bilateral occipital stroke in an early blind woman.** *Neuroreport* 11:237–240 (2000).
- Hunt, D.L., Yamoah, E.N. & Krubitzer, L. **Multisensory plasticity in congenitally deaf mice: how are cortical areas functionally specified?** *Neuroscience* 139:1507–1524 (2006).
- Huston, J. P., Morgan, S., Lange, K. W., & Steiner, H. **Neuronal plasticity in the nigrostriatal system of the rat**



after unilateral removal of vibrissae. *Experimental Neurology* 93:380–389 (1986).

Huston, J. P., Steiner, H., Schwarting, R. K. W., & Morgan, S. **Parallels in behavioral and neural plasticity induced by unilateral vibrissae removal and unilateral lesion of the substantia nigra.** In H. Flohr (Ed.), *Post-lesion neural plasticity* 537–551. Berlin: Springer (1988).

Isaacs, K.R., Anderson, B.J., Alcantara, A.A., Black, J.E. & Greenough, W.T. **Exercise and the brain angiogenesis in the adult rat cerebellum after vigorous physical activity and motor skill learning.** *Journal Of Cerebral Blood Flow & Metabolism* 12(1):110-119 (1992).

Kahn, D.M. & Krubitzer, L. **Massive cross-modal cortical plasticity and the emergence of a new cortical area in developmentally blind mammals.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:11429–11434 (2002).

Kujala, T., Alho, K., Kekoni, J., Hamalainen, H., Reinikainen, K., Salonen, O., Standertskjold-Nordenstam, C.G. & Naatanen, R. **Auditory and somatosensory event-related brain potentials in early blind humans.** *Exp Brain Res* 104:519–526 (1995).

Landers, M. & Philip Zeigler H. **Development of rodent whisking: trigeminal input and central pattern generation.** *Somatosens Mot Res* 23:1–10 (2006).

Lewis, L. B., Saenz, M., & Fine, I. **Mechanisms of cross-modal plasticity in early blind subjects.** *Journal of Neurophysiology* 106(6):2995-3008 (2010).

Lomber, S.G., Meredith, M.A. & Kral, A. **Crossmodal plasticity in specific auditory cortices underlies visual compensations in the deaf.** *Nature Neuroscience* 13:1421-1427 (2010).

Luczyńska, A., Dziewiatkowski, J., Jagalska-Majewska, H., Luczyńska, P., Spodnik, J., Moryś, J. **Postnatal development of the somatosensory thalamocortical projection in rat and rabbit—a combined retrograde transport and stereological comparative study.** *Folia Morphol (Warsz)* 62:129–132 (2003).

Greenamyre, T., Penney, J.B., Young, A.B., Hudson, C., Silverstein, F.S. & Johnston, M.V. **Evidence for transient perinatal glutamatergic innervation of globus pallidus.** *J Neuroscience* 7(4):1022-30 (1987).

Martin, J.P. **The basal ganglia and posture.** *Lippincott, Philadelphia* (1967).

Martínez-Méndez, R., Martínez-Martínez, E., Villafán-Monroy, H., Guzmán-López, J. A., Fuentes-Farías, A. L., Romo-González, T., Chavarria-Krauser, A. & Gutiérrez-Ospina, G. **Body and brain plasticity: Unraveling its principles through blindness.** *Recent Res Devel Neurosci* 4:89-107 ISBN:978-81-308-0525-2 (2013).

McNamara, K. **Shapes of time : the evolution of growth and development.** *Baltimore, Md: Johns Hopkins University Press* 342:16(1997).

Micheva, K.D. & Beaulieu, C. **Postnatal Development of GABA Neurons in the Rat Somatosensory Barrel Cortex: A Quantitative Study.** *European Journal of Neuroscience* 7(3):419-430 (1995).

Mukouyama, Y.S., Shin, D., Britsch, S., Taniguchi, M. & Anderson, D.J. **Sensory nerves determine the pattern of arterial differentiation and blood vessel branching in the skin.** *Cell* 109:693-705 (2002).

Nackley, A.G. **An integrative review of data and theoretical perspectives regarding brain function in the vibrissal system.** *Radford University Thesis* (2000).

Ogunshola, O.O., Stewart, W.B., Mihalcik, V., Solli, T., Madri, J.A., Ment, L.R. **Neuronal VEGF expression correlates with angiogenesis in postnatal developing rat brain.** *Develop Brain Res* 119:139-153 (2000).

Oloff, H. S., Coyle, P. & Weber, E. **Rat strain and vendor differences in collateral anastomoses.** *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 17(5):571–576 (1997).

Rauschecker, J.P., 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* 89:5063-5067(1992).

Rice, F.L. & Van der Loos, H. **Development of the barrels and barrel field in the somatic sensory cortex of the mouse.** *J Comp Neural* 171:545-560 (1977).

Riddle, D.R., Gutierrez, G., Zheng, D., White, L.E., Richards & Purves, D. **Differential metabolic and electrical activity in the somatic sensory cortex of juvenile and adult rats.** *J Neuroscience* 13:4193–4213 (1993).



- Robertson, P.L., Du Bois, M., Bowman, P.D. & Goldstein, G.W. **Angiogenesis in developing rat brain: an in vivo and in vitro study.** *Dev Brain Res* 23:219–223 (1985).
- Roder, B., Teder-Salejarvi, W., Sterr, A., Rosler, F., Hillyard, S.A. & Neville, H.J. **Improved auditory spatial tuning in blind humans.** *Nature* 400:162–166 (1999).
- Rowan, R.A. & Maxwell, D.S. **Patterns of vascular sprouting in the postnatal development of the cerebral cortex of the rat.** *Am J Anat* 160:247–255 (1981).
- Schneider, J.S., Morse, J.R. & Lidsky, T.I. **Somatosensory properties of globus pallidus neurons in awake cats.** *Exp Brain Res*. 46(2):311-4 (1982).
- Shams, L., Iwaki, S., Chawla, A. & Bhattacharya, J. **Early modulation of visual cortex by sound: an MEG study.** *Neuroscience Letter* 378:76–81 (2005).
- Sharp, F.R. & Evans, K. **Regional (14C) 2-deoxyglucose uptake during vibrissae movements evoked by rat motor cortex stimulation.** *J Comp Neurol* 208(3):255-87 (1982).
- Smith, K.K. **Time's arrow: heterochrony and the evolution of development.** *Int J Dev Biol* 47:613–621 (2003).
- Oo, T.F., Ries, V., Cho, J., Kholodilov, N. & Burke, R.E. **Anatomical basis of glial cell line-derived neurotrophic factor expression in the striatum and related basal ganglia during postnatal development of the rat.** *J Comp Neurol* 484(1):57-67(2005).
- Toscano-Marquez, B., Martinez-Martinez, E., Manjarrez, E., Martinez L., Mendoza-Torreblanca, J. & Gutiérrez-Ospina, G. **Late onset muscle plasticity in the whisker pad of enucleated rats.** *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105:15973–15978 (2008).
- Uribe-Querol, E., Martinez-Martinez, E., Tapia-Rodriguez, M., Hernandez, L.R., Toscano-Marquez, B., Padilla, P. & Gutierrez-Ospina, G. **Metabolic indices shift in the hypothalamic-neurohypophysial system during lactation Implications for interpreting their relationship with neuronal activity.** *Neuroscience* 134:1217-1222 (2005).
- Volgyi, B., Farkas, T. & Toldi, J. **Compensation of a sensory deficit inflicted upon newborn and adult animals. A behavioural study.** *Neuroreport* 4:827–829 (1993).
- Wanet-Defalque, M.C. Veraart, C., De Volder, A., Metz, R., Michel, C., Doods, G. & Goffinet, A. **High metabolic activity in the visual cortex of early blind subjects.** *Brain Res* 446:369–373 (1988).
- Wang, D.B., Blocher, N.C., Spence, M.E., Rovainen, C.M. & Woolsey, T.A. **Development and remodeling of cerebral blood vessels and their flow in postnatal mice observed with in vivo videomicroscopy.** *Journal Of Cerebral Blood Flow & Metabolism* 12(6):935-946 (1992).
- Welker, W.I. **Analysis of sniffing in the albino rat.** *Behavior* (22):223–244 (1964).
- Woolsey, T.A. & Van der Loos, H. **The structural organization of layer IV in the somatosensory region (SI) of mouse cerebral cortex. The description of a corticalfield composed of discrete cytoarchitectonic units.** *Brain Research* 17:205-242 (1970).
- Wu, L., Tang, Z., Sun, X., Feng, X., Qian, W., Wang, J., & Jin, L. **Metabolic Changes in the Visual Cortex of Binocular Blindness Macaque Monkeys: A Proton Magnetic Resonance Spectroscopy Study.** *Plos One* 8(11):e80073 (2013).
- Zheng, D. & Purves, D. **Effects of increased neural activity on brain growth.** *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92(6):1802–1806 (1995).