



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
**POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**  
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS  
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

**Evaluación de la actividad intrínseca de las células del núcleo ventro-basal talámico  
en ratas cegadas al nacimiento**

**TESIS**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
**MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

PRESENTA:

**Biol. Daniel Pérez Torres**

**TUTOR PRINCIPAL DE TESIS:**

**Dr. Gabriel Gutiérrez Ospina. Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM.**

**COMITÉ TUTOR:**

**Dra. Tatiana Fiordeliso Coll. Facultad de Ciencias, UNAM.**

**Dra. Elvira Galarraga Palacio. Instituto de Fisiología Celular. UNAM**

**CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX. JUNIO DEL 2019**



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.





**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
**POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**  
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS  
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

**Evaluación de la actividad intrínseca de las células del núcleo ventro-basal talámico  
en ratas cegadas al nacimiento**

**TESIS**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
**MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

PRESENTA:

**Biol. Daniel Pérez Torres**

**TUTOR PRINCIPAL DE TESIS:**

**Dr. Gabriel Gutiérrez Ospina. Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM.**

**COMITÉ TUTOR:**

**Dra. Tatiana Fiordeliso Coll. Facultad de Ciencias, UNAM.**

**Dra. Elvira Galarraga Palacio. Instituto de Fisiología Celular. UNAM**

**CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX. JUNIO DEL 2019**



OFICIO CPCB/438/2019

Asunto: Oficio de Jurado para Examen de Grado.

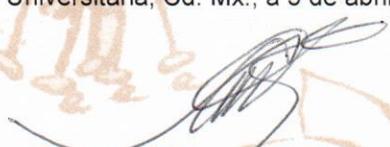
M. en C. Ivonne Ramírez Wence  
Directora General de Administración Escolar, UNAM.  
Presente

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 26 de noviembre del 2018, se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** del alumno **PÉREZ TORRES DANIEL** con número de cuenta **300071014** con la tesis titulada **"Evaluación de la actividad intrínseca de las células del núcleo ventro-basal talámico en ratas cegadas al nacimiento"** realizada bajo la dirección del **DR. GABRIEL GUTIÉRREZ OSPINA:**

Presidente: DR. GABRIEL ROLDÁN ROLDÁN  
Vocal: DR. BERTHA PRIETO GÓMEZ  
Secretario: DRA. TATIANA FIORELISIO COLL  
Suplente: DR. MARCO ARIELI HERRERA VALDEZ  
Suplente: DRA. YAZMÍN RAMIRO CORTÉS

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

**ATENTAMENTE**  
**"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"**  
Cd. Universitaria, Cd. Mx., a 5 de abril del 2019.

  
**DR. ADOLFO GERARDO NAVARRO SIGÜENZA**  
**COORDINADOR DEL PROGRAMA**



## **Agradecimientos**

Al posgrado de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Autónoma de México, por darme la oportunidad de satisfacer mi curiosidad y ampliar los horizontes de mi formación académica y personal.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), por la beca otorgada durante la realización de mis estudios de maestría.

Al proyecto CONACyT de ciencia básica CONACyT-ANR 273513 y al apoyo del Proyecto de Investigación PAPIIT IN227416, por el financiamiento otorgado para llevar a cabo mi proyecto de maestría.

Al Dr. Gabriel Gutiérrez Ospina por la confianza y la libertad para realizar el proyecto de maestría, así como a los miembros de mi comité tutor, a la Dra. Tatiana Fiordeliso Coll por su paciencia, apoyo y comentarios, y a la Dra. Elvira Galarraga Palacio por las observaciones durante el desarrollo de este proyecto.

## **Agradecimientos a título personal**

Gracias por no darme una guía y dejarme caer, por tender tu mano, por dejarme encontrar camino.

Gracias María

Gracias por la paciencia y el amor, por compartir tus sueños, por este tiempo en el que me has enseñado a caminar con calma y a contemplar la vida.

Gracias por dejar que la curiosidad sea un lugar de encuentro y la posibilidad de pensar a contracorriente, en donde todo es tan común.

Gracias Nadia

Gabriel, me da gusto que hayas dejado de ser mi mentor y seas mi amigo. En estos años he aprendido a tu lado, que las estructuras que nos confinan al ostracismo se caen en el momento en el que uno se reconoce en los otros por las diferencias.

Dra. Tatiana, gracias por abrir un lugar en tu laboratorio para la realización del proyecto, así, como por el apoyo, la paciencia, y los consejos no sólo en cuanto al proyecto, sino también, aquellos que nos forman y nos hacen tomar posturas en la vida. También te agradezco los desencuentros es este trayecto, ya que a partir de ellos encontré las reflexiones para replantear mi compromiso social y mis posturas políticas con la otredad.

Agradezco a la Dra. Elvira Galarraga Palacio por sus comentarios durante la realización de este proyecto.

Agradezco al los sinodales Al Dr. Marco Arieli Herrera Valdez, a la Dra. Bertha Prieto Gómez, a la Dra. Yazmín Ramiro Cortes y al Dr. Gabriel Roldan Roldan, por aceptar revisar este trabajo. También agradezco a la Dra. Violeta Giselle López Huerta por sus comentarios y sugerencias. Sus aportes dieron una vuelta más a este proyecto, gracias.

Gracias al M. en C. José Alfredo Jiménez Medina y a la Bióloga Lucrecia Pedroza Cummings por el apoyo técnico y compartir sus conocimientos.

Gracias a la Dra. María Guadalupe Barajas Guzmán y a la M. en C. Rosa Nuria Galindo Solano por sus comentarios y recomendaciones en el análisis estadístico.

A la Dra. Sonia Josefina Sánchez López y al Dr. Raúl Villegas Silva por la motivación y todo el apoyo que me han dado para ver terminado este ciclo. También les agradezco las reflexiones y las risas durante el desayuno, la comida y la cena. Les debo mucho y los agradecimientos no son suficientes.

Gracias a Ivonne, Alonso, Eleonor y Victor por ser un refugio para las posibilidades de la reflexión y el pensamiento.

A los chicos de laboratorio que se hacen llamar Eva Patricia, Midori, Mónica, Vicente, Paola, Coral y a su gemela Ita, a mi pareja preferida Juan y Yorgui, a Ana, a Ale niña y Ale niño, a todos ustedes les agradezco todos los momentos en los que hicieron algo para hacerme reír, sin los cuales, no habría motivo para regresar al laboratorio. Espero que cada uno encuentre su camino. Por cierto...gracias por tantas galletas y pizza, y donitas con café ...chido banda!

“Deeply ingrained in science is a view of the natural order as being passive and inert and having no initiating powers of its own. This I believe is a greatly mistaken image of reality –an image which pervades non-scientific as well as scientific thinking”.

Denbigh K, 1975.

“El problema es que la metafísica del positivismo [profesional y popular] es la metafísica mala, ya que está escondida, oculta detrás del escudo con la imagen de “cientificidad”, de que es la única, eterna y universal.”



## Índice

<b>Abreviaturas</b> .....	3
<b>Resumen</b> .....	4
<b>Abstract</b> .....	5
<b>Introducción</b> .....	6
<b>Antecedentes</b>	
El sistema somatosensorial primario (SI).....	7-8
Especificación y desarrollo de la SI.....	8-10
Ceguera y plasticidad tálamo-cortical en SI.....	10-13
Actividad neuronal intrínseca y regulación del desarrollo neural.....	13-15
Actividad neuronal intrínseca y plasticidad de las ATCs.....	16-17
<b>Problema</b> .....	18
<b>Hipótesis</b> .....	18
<b>Objetivos</b> .....	18
<b>Métodos</b>	
Animales.....	19
Enucleación.....	19
Obtención y procesamiento de las rebanadas de cerebro.....	19-20
Registro de la actividad de $[Ca^{2+}]_i$ (Imagenología de Calcio) .....	20-21
Análisis de imágenes y procesamiento de datos.....	21-22
Selección de las células con actividad intrínseca de $Ca^{2+}$ .....	22
<b>Estadística</b> .....	23
<b>Resultados</b>	
Sección tálamo-cortical de la vía somatosensorial primaria.....	24
Cambios en la fluorescencia de la $[Ca^{2+}]_i$ en las poblaciones neuronales del núcleo VB...	25
La amplitud de las transitorias de $Ca^{2+}$ intracelular incrementa en las poblaciones del núcleo VB registradas en ratas cegadas al nacimiento en el dp1.....	26

La frecuencia de las transitorias de $\text{Ca}^{2+}$ intracelular de las poblaciones neuronales del VB disminuye en las ratas cegadas al nacimiento en el dp1 y el dp3.....	27
El $\tau_d$ de las transitorias de $\text{Ca}^{2+}$ tiende a incrementar en las neuronas del núcleo VB en las crías enucleadas.....	28-29
El área bajo la curva de las transitorias de $\text{Ca}^{2+}$ incremento en las ratas cegadas al nacimiento.....	28-29
El número de neuronas que exhiben actividad intrínseca (transitorias de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ) en el VB disminuyó en las ratas enucleadas al nacimiento.....	29-31
<b>Discusión</b> .....	32-38
<b>Conclusiones</b> .....	39
<b>Anexo. Dinámica del calcio intracelular</b> .....	40-42
<b>Bibliografía</b> .....	43-52

## Abreviaturas

<b>SI</b>	corteza somatosensorial primaria
<b>AI</b>	corteza auditiva primaria
<b>VI</b>	corteza visual primaria
<b>PMBSF</b>	subcampo posteromedial de barriles
<b>VB</b>	núcleo talámico ventro-basal
<b>MGv</b>	núcleo talámico auditivo geniculado ventro-medial
<b>dLGN</b>	núcleo talámico visual geniculado dorso-lateral
<b>ATCs</b>	aferentes tálamo-corticales
<b>[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub></b>	concentración de calcio intracelular
<b>de</b>	día embrionario
<b>dp</b>	día postnatal

## Resumen

En los mamíferos, la pérdida de la retina en estadios de desarrollo prenatales y postnatales conduce a la reorganización morfo-funcional del encéfalo. En roedores, se ha observado que la ceguera postnatal promueve, entre otros cambios, la expansión de la corteza somatosensorial primaria (SI), particularmente del subcampo posteromedial de barriles (PMBSF). Se ha postulado que esta expansión resulta del incremento de la actividad neuronal provocada por la experiencia somestésica durante el desarrollo postnatal. Sin embargo, estudios recientes sugieren que la expansión de SI pudiese ser la consecuencia de procesos de reorganización neural relacionados a la temporalidad del desarrollo cortical, acelerando la tasa de crecimiento y la ramificación de las aferentes tálamo-corticales (ATCs) que se proyectan desde el núcleo ventro-basal talámico (VB), independientemente de la actividad provocada por la estimulación sensorial somestésica. Al respecto, se sabe que la velocidad de crecimiento y ramificación de las ATCs es regulada por la frecuencia y amplitud de las transitorias de la  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular que ocurren de forma intrínseca en las neuronas. Es probable, por tanto, que modificaciones en la frecuencia y en la amplitud de las transitorias de las  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular en el VB, que pudiesen subyacer al crecimiento exacerbado de las ATCs, expliquen la expansión del PMBSF observada en las ratas cegadas al nacimiento. En este trabajo se evaluó esta hipótesis mediante técnicas de imagenología de calcio para analizar la dinámica de las transitorias de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular en células del VB, en rebanadas tálamo-corticales somatosensoriales obtenidas de crías control (C) y enucleadas (E) a distintas edades postnatales. Nuestros resultados muestran que la amplitud de las transitorias de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular aumenta mientras que su frecuencia disminuye en las células del VB de ratas enucleadas, además, que en las células del VB de ratas enucleadas hay cambios en los parámetros –frecuencia, la amplitud y el tiempo de decaimiento ( $\tau_d$ )– de la dinámica de la actividad de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular. También se observó el decremento en el número de células en el VB de ratas enucleadas a través de los días analizados. En conclusión, el aumento en la amplitud y la disminución de la frecuencia de las transitorias de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular en las células del VB sugieren que los cambios en la actividad intrínseca neuronal promueven el sobre-crecimiento de las ATCs, induciendo así, la expansión de la PMBSF en ratas cegadas. Además, que los cambios observados en la frecuencia, la amplitud y la  $\tau_d$ , sugieren la madurez prematura de las células del VB en ratas enucleadas.

## Abstract

In mammals, retina loss at prenatal and postnatal developmental stages leads to morphological and functional brain reorganization. In the cerebral cortex of rodents, loss of sight –for example by enucleation in early stages of development– leads to the enlargement of the cortical body representation in the primary somatosensory system (SI), particularly the posteromedial barrel subfield (PMBSF). It has been postulated that the enlargement of this area results from increments of neuronal activity derived from somatosensory experience during postnatal development. Nevertheless, recent investigations suggest that –regardless of the peripheral somatosensory stimulation– the SI expansion could be the consequence of a neuronal reorganization processes related to the temporal cortex development that accelerates the axonal growth rate and the branching of the somatosensory thalamocortical afferents (TCA's) projected from the ventrobasal thalamic nucleus (VB). In this regard, it is known that the axonal growth rate and branching of the TCA's are regulated by the frequency and amplitude of the intracellular calcium transients in VB that occur intrinsically in neurons during brain development. Therefore, it is probable that modifications in the frequency and amplitude of calcium transients in VB that might be underlying the exacerbate growth of TCA's explain the enlargement of PMBSF in enucleated early born rats. In this work, we evaluated this hypothesis employing calcium imaging technics to analyze the intracellular calcium dynamics of VB cells in somatosensory thalamocortical brain slices, obtained from control (C) and postnatal enucleated (E) rat pumps in postnatal stages. Our results showed that the amplitude increased while the frequency of calcium transients decreased in the VB cells of enucleated rats compared to control animals during postnatal stages; also, we found changes in the calcium transient parameters associated with cellular maturity such as frequency, amplitude and time decay ( $\tau_d$ ). Additionally, in postnatal enucleated rats the number of cells in the VB decreased. In conclusion, the increase of amplitude and decrease of frequency of  $Ca^{2+}$  transients reported in the VB cells, suggests that changes in intrinsically neuronal activity promote the overgrowth of TCA's, leading to enlargement of PMBSF in postnatal enucleated rats. In addition, the observed changes in frequency, amplitude and  $\tau_d$ , suggest the premature maturation of VB in enucleated rats.

## Introducción

En los mamíferos, el daño o la pérdida de la retina durante estadios prenatales o postnatales del desarrollo induce a la reorganización morfo-funcional del cerebro (Bronchiti et al., 1992; Rauschecker et al., 1992; Bavelier y Neville, 2002; Piché et al., 2007; Karlen y Krubitzer, 2008; Fetter-Pruneda et al., 2013). En la corteza cerebral, esta reorganización se observa, en parte, en la expansión de la corteza somatosensorial primaria (SI). En la rata, esta representación está formada por módulos citoarquitectónicos denominados barriles. De éstos, los de mayor tamaño representan a las vibrisas mistaciales que emergen de la piel del bello de la rata; a esta representación se le conoce como el subcampo de barriles posteromedial (PMBSF, por sus siglas en inglés) (Woolsey y Van der Loos, 1970).

Estudios previos han mostrado que los barriles del PMBSF se expanden como consecuencia de la enucleación (Bronchiti et al., 1992; Rauschecker et al., 1992; Zheng y Purves, 1995). Aunque los mecanismos que subyacen a este proceso no son claros (Kupers et al., 2011; Fetter-Pruneda et al., 2013), se ha postulado que el proceso de expansión de la SI y por ende del campo de barriles, se debe a procesos de plasticidad neuronal promovidos por el incremento en la actividad neuronal generada a lo largo de la vía somatosensorial, durante el desarrollo postnatal en los individuos ciegos (Rauschecker et al., 1992; Zheng y Purves, 1995). Sin embargo, estudios llevados a cabo en nuestro laboratorio contravienen esta idea, mostrando que el crecimiento de las proyecciones axonales tálamo-corticales originadas en las neuronas del núcleo ventro-basal talámico (VB), ocurre de manera independiente de la actividad provocada por la estimulación sensorial somestésica (Fetter-Pruneda et al., 2013). Con base en el contexto anterior, una hipótesis alternativa es que debido a que la actividad intrínseca de calcio al estar relacionadas a la modulación del crecimiento axonal (Shatz y Stryker, 1988; Shatz 1990; Kater y Mills, 1991; Wong 1993; Spitzer 2006; Ackman et al., 2012; Mire et al., 2012; Leighton y Lohmann, 2016), y que la formación de los barriles depende del arribo a la SI de las ATCs (Li y Crair, 2011), las modificaciones en esta actividad podrían alterar la tasa de crecimiento de las ATCs que se proyectan desde el núcleo VB. Así, en este proyecto evaluamos principalmente si existen cambios en la amplitud y la frecuencia de las transitorias de  $Ca^{2+}$  intracelular en las neuronas del VB, origen de las ATCs, en respuesta a la enucleación postnatal en la rata.

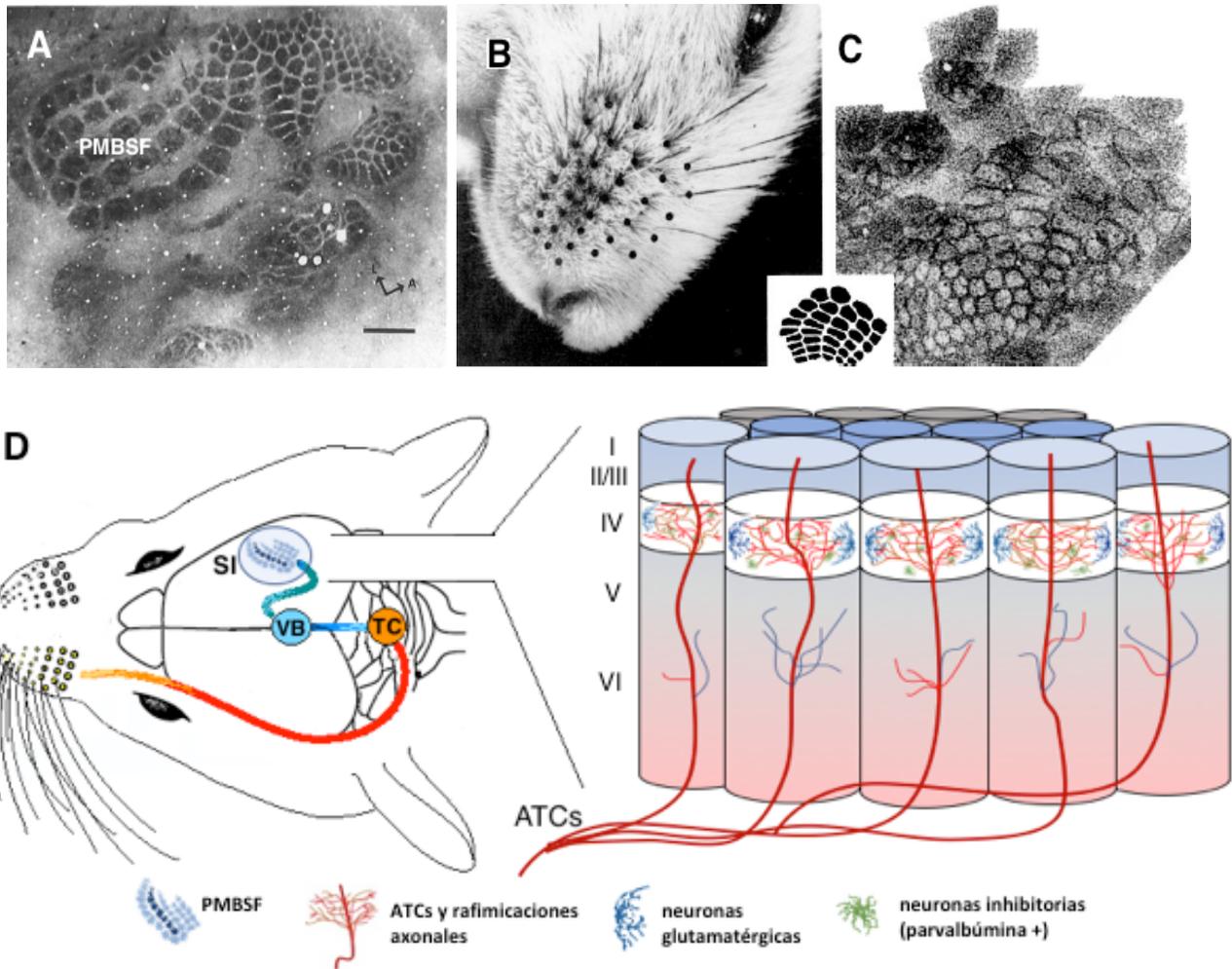
## Antecedentes

### El sistema somatosensorial primario

En los mamíferos, el cerebro tiene una organización anatómica y funcional regionalizada. En particular, las áreas de la corteza están organizadas en mapas sensoriales que en su interconectividad con el tálamo, integran y transmiten los estímulos sensoriales periféricos específicos asociados a cada modalidad sensorial como la auditiva, la visual o la somatosensorial (Li y Crair, 2011), generando una representación topográfica interna del mundo sensorial externo (Buonomano y Merzenich, 1998). En los roedores, el área sensorial cortical con mayor representación (41- 44% del total de la superficie cortical del cerebro) (Seelke, Dooley y Krubitzer, 2012) es la corteza somatosensorial primaria (Inan y Crair, 2007).

La corteza somatosensorial primaria está formada por unidades citoarquitectónicas denominadas barriles, los cuales están segregadas en sub-representaciones organizadas somato-tópicamente en función de los distintos segmentos corporales (Figura 1-A) (Woolsey y Van der Loos, 1970). De las sub-representaciones mencionadas anteriormente, la de mayor tamaño es la del subcampo posteromedial de barriles (Figura 1-A), cuya correspondencia sensorial son las vibrisas mistaciales ubicadas en el cojinete facial de la rata (Chapin y Lin, 1984; Rice 1995; Waters et al., 1995) (Figura 1-B y 1-C).

Los barriles están conformados a nivel intracortical por neuronas espinosas estelares (glutamatérgicas) y neuronas GABAérgicas (tipo parvalbúmina +) (Lübke et al., 2000; Lübke y Feldmeyer, 2007; Koelbl et al., 2013; Emmenegger et al, 2018), además de astrocitos (3-5%) asociados a las paredes de los barriles (Giaume et al., 2009), y de vasos sanguíneos (~10-15%) (Riddle et al., 1993). A nivel intercortical hay un componente de aferentes provenientes del hemisferio contralateral (Olavarria et al., 1984), y a nivel subcortical, de las ramificaciones axónicas derivadas de las aferentes tálamo-corticales (ATCs) provenientes del núcleo ventro-basal del tálamo (Killackaey et al., 1995) (Figura 1-D).



**Figura 1. Microfotografías y esquema de la SI.** A. Microfotografía cortical del campo de barriles (PMBSF-área de barriles asociada a las vibrisas mistaciales), escala 1mm. B. Microfotografía de las vibrisas mistaciales en el cojinete facial de la rata. C. Microfotografía de la representación de las vibrisas mistaciales en SI. D. Esquema de la vía neuroanatómica y de transmisión de la información somatosensorial desde las vibrisas a PMBSF, y estructura general de la corteza (capas corticales de I-VI) con elementos principales que componen al campo de barriles a nivel de la capa IV en SI. TC: tallo cerebral; VB: núcleo ventro-basal talámico; SI: corteza somatosensorial primaria; PMBSF: subcampo posteromedial de barriles; ATCs: aferentes talamo-corticales. A, microfotografía toma de y modificada de Waters et al., 1995. B y C. Imágenes tomadas de Woosley y Van der Loos, 1970.

### Especificación y desarrollo de la SI

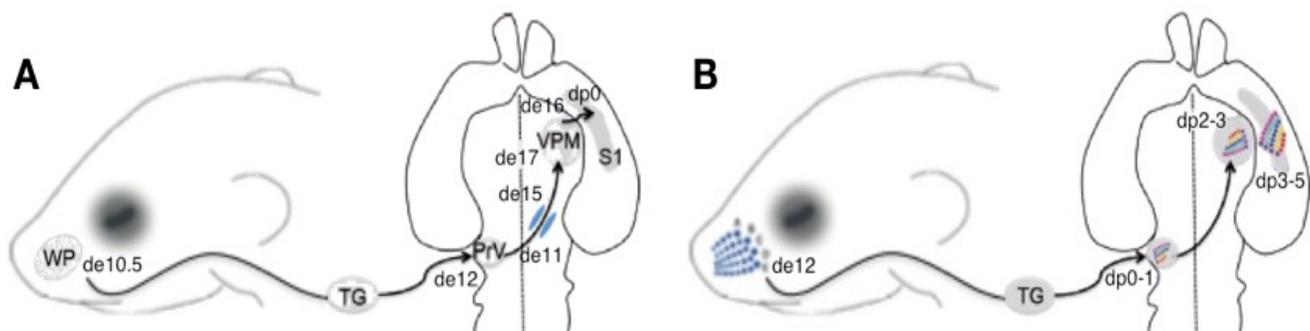
En la rata, el mapa corporal de la SI se forma durante los primeros cuatro días de vida postnatal. Eventos como la remodelación de los árboles dendríticos de las neuronas espinosas estelares en la capa IV, aunado a la entrada y crecimiento de las ATCs desde el núcleo VB, dan paso a la formación de los barriles en la SI (Schlaggar y O'Leary, 1994; Rice 1995; Catalano et al., 1996; Li y Crair, 2011; López-Bendito y Molnár, 2003; Erzurumlu y Gaspar, 2012). En particular, las ATCs alcanzan el borde interno de la placa

cortical y crecen hacia la SI en la medida que las capas corticales que la constituyen se forman y diferencian a partir de la placa cortical (Catalano et al., 1996). Sin embargo, el crecimiento de las ATCs hacia la SI, no se inicia al nacimiento ya que éstas comienzan a proyectarse desde las neuronas del núcleo VB al día embrionario 16 (de16). En este estadio, las ATCs atraviesan la capsula interna y se establecen en la zona intermedia del telencéfalo (Schlaggar y O'Leary, 1994; Killackaey et al., 1995; Catalano et al., 1996). Posteriormente, entre los días de17 y de18, las ATCs alcanzan la placa cortical, primordio de la corteza cerebral, e invaden la zona que dará origen a la capa VIa. Hacia el de19 y el de20, las ATCs continúan su crecimiento radial atravesando la capa VIb con periodos intermitentes de estasis durante su proyección, periodos durante los cuales algunos axones permanecen en la zona de interfaz entre la región basal de la placa cortical y la zona de diferenciación de las capas corticales (Catalano et al., 1996).

Por otra parte, alrededor del de20, la SI ha iniciado su proceso de formación y especificación neuroanatómica (Schlaggar y O'Leary, 1994). En este sentido, al de21, ya se observan los inicios de la segregación de las sub-representaciones de la cara, los extremidades y el tronco (Schlaggar y O'Leary, 1994; Catalano et al., 1996). Entre el de21 y el primer día postnatal (dp0), se pueden observar las sub-representaciones de los segmentos corporales claramente delineados en las capas profundas VI y V de la SI (Schlaggar y O'Leary, 1994; Killackaey et al., 1995; Rice 1995). Así, a partir de estos estadios de desarrollo, las neuronas que ocuparán las capas superiores corticales (capas corticales IV a II) ya se pueden apreciar a nivel de la placa cortical, cuya diferenciación está interrelacionada con la modulación de la inserción y ramificación de las ATCs de manera progresiva a través de las capas corticales, particularmente en la capa IV (Rice 1995; Catalano et al., 1996).

Para el caso de las poblaciones neuronales que poblarán a la SI, la secuencia de desarrollo sigue la fenomenología y la cronología que a continuación se describen. Para el de18, las neuronas precursoras que se establecerán en la capa IV, sitio principal de proyección de la ATCs, se encuentran proliferando en la capa profunda de la placa cortical, por encima de las capas corticales VI y V. Hacia el dp1, la capa IV ha comenzado a diferenciarse de la placa cortical, a la vez que las proyecciones axónicas que se encuentran cercanas a estas primeras neuronas inician sus procesos de ramificación. En el dp2, las ATCs se arreglan en grupos formando proto-barriles en la placa cortical. En el dp3, la capa IV se ha diferenciado totalmente de la placa cortical y las agrupaciones de ATCs y sus arborizaciones se han

insertado en esta capa (Catalano et al., 1996). Finalmente, en el dp4, las ATCs se ramifican dentro de los barriles (Rice 1995; Catalano et al., 1996) y las neuronas estelares espinosas ubicadas en las bordes de los barriles reorientan sus árboles dendríticos hacia el centro de estos. A partir de este día y hasta el dp7, los bordes de los barriles adquieren mayor definición, a la vez que van madurando es sus cualidades neuroanatómicas y fisiológicas (Rice 1985). Con base en lo anterior, la formación de la representación corporal en la SI de la rata se puede concebir como un proceso que tiene dos fases. La primera, en la cual se establece la topografía cortical e interconectividad tálamo-cortical; la segunda, durante la cual emerge el mapa somatotópico del campo de barriles (Killackaey et al., 1995) (Figura 2).

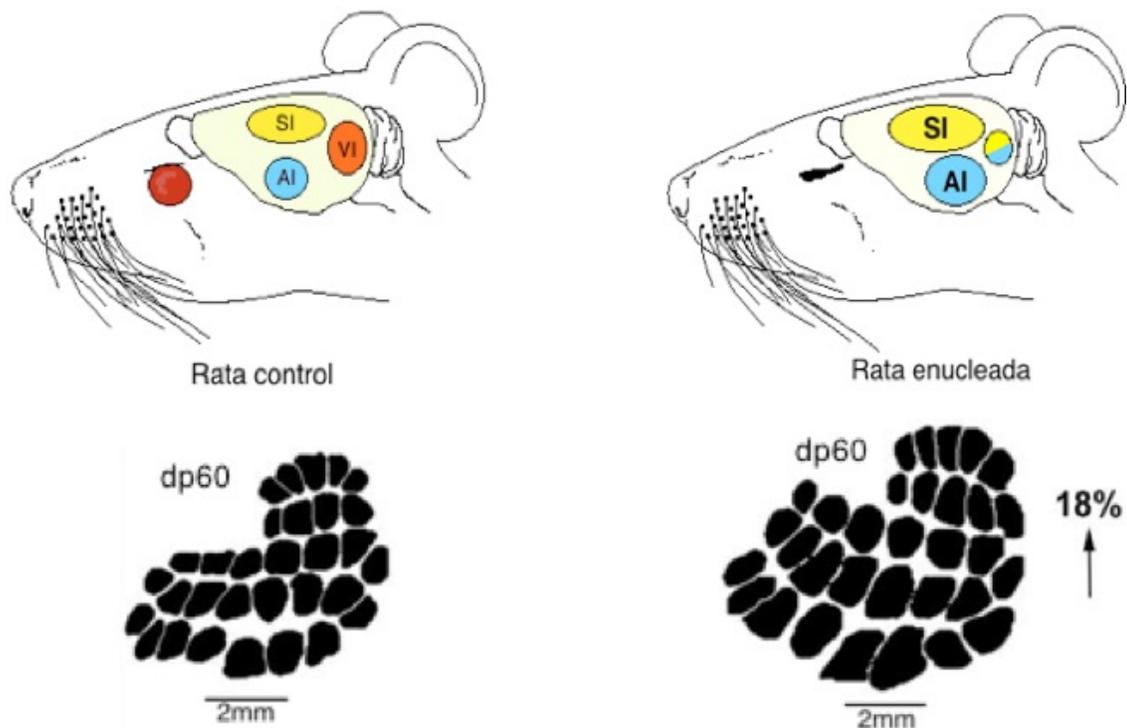


**Figura 2. Esquema del desarrollo de la conectividad y especificación del PMBSF en la SI.** A. Temporalidad del desarrollo de la interconectividad entre las áreas que conforman a la vía somatosensorial. B. Temporalidad de la formación y establecimiento del mapa somatotópico: día embrionario (de12), formación de los mecanorreceptores en el cojinete facial; día postnatal (dp0-1), formación los barreletes a nivel del núcleo sensorial del trigémino en el tallo cerebral; (dp2-3) formación del patrón de barreloides en VB; (dp3-5) formación del patrón somatosensorial PMBSF en SI. WP: cojinete facial; TG: ganglio del trigémino; PrV: principal núcleo sensorial del trigémino; VPM: núcleo ventral posteromedial talámico; S1: corteza somatosensorial primaria; de: día embrionario; dp: día postnatal. Tomada y modificada de Erzurumlu y Gaspar, 2012.

### Ceguera y plasticidad tálamo-cortical en la SI

En los mamíferos el daño o la pérdida de receptores sensoriales visuales durante estadios de desarrollo prenatales y postnatales genera la reestructuración funcional y morfológica del cerebro (Bronchiti et al., 1992; Rauschecker et al., 1992; Bavelier y Neville, 2002; Piché et al., 2007; Karlen y Krubitzer, 2008; Fetter-Pruneda et al., 2013) así, como la reorganización a nivel del sistema nervioso periférico (Toscano-Márquez et al., 2008). A nivel central, esta reestructuración se caracteriza principalmente por la expansión de la SI, la corteza auditiva (AI) y la contracción de la corteza visual (VI) (Bronchiti et al., 1992; Rauschecker et al., 1992; Zheng y Purves, 1995). En particular, se ha observado que en roedores la

enucleación promueve la expansión de los barriles del PMBSF (Bronchiti et al., 1992; Rauschecker et al., 1992; Zheng y Purves, 1995; Fetter-Pruneda et al., 2013), así como la extensión de sus campos receptivos (Toldi, Farfas, y Volgyi, 1994) (Figura 3).



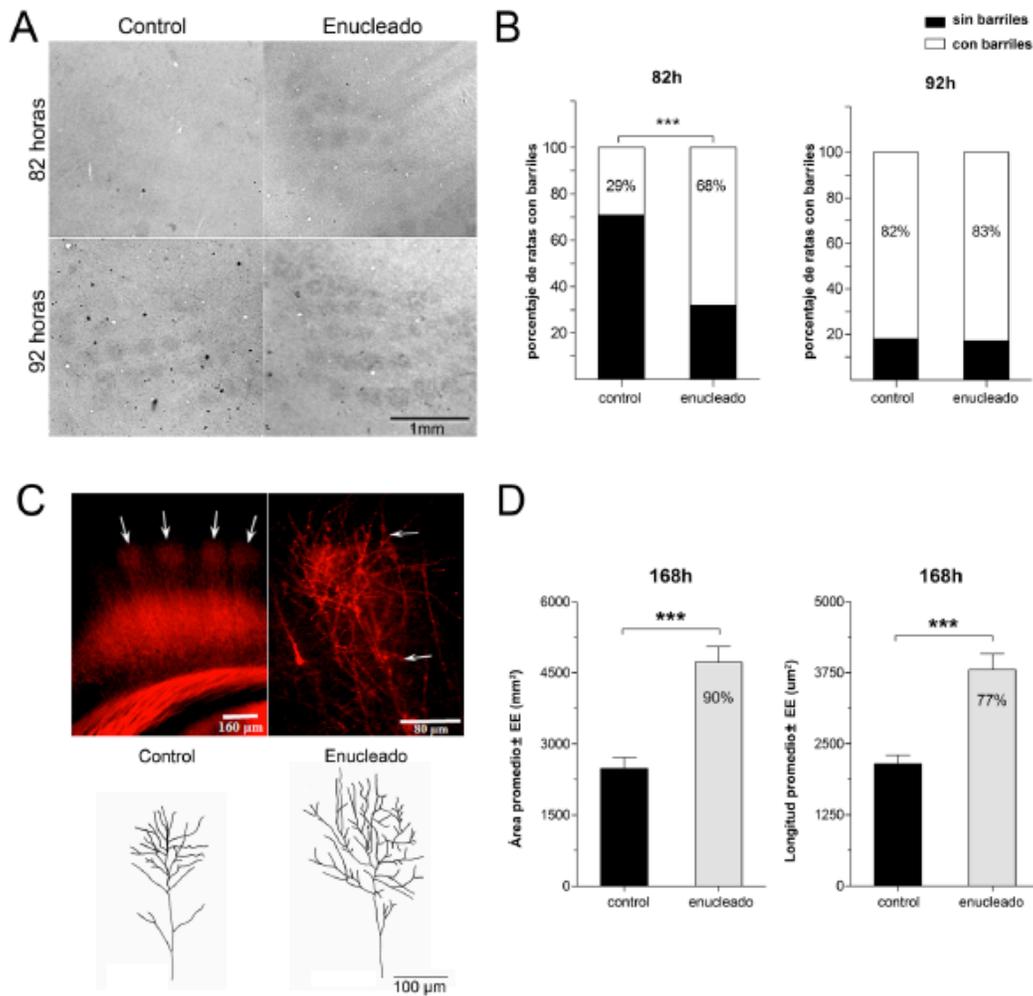
**Figura 3. Esquema de la reconfiguración cortical posterior a la enucleación.** En el panel superior se muestra el esquema de la expansión de la corteza somatosensorial primaria (SI) y la corteza auditiva (AI), y la contracción de la corteza visual (VI). La corteza visual adquiere características sensoriales tanto de la modalidad somatosensorial como auditiva. El panel inferior muestra la expansión (11-18%) del campo barriles del PMBSF al día postnatal 60 (dp60), en comparación con las ratas control. Las reproducciones con cámara lucida de PMBSF se tomaron de Fetter-Pruneda et al., 2013.

Aunque los mecanismos plásticos precisos que intervienen en la reconfiguración de la topografía espacial de la SI son en gran medida desconocidos (Kupers et al., 2011), el modelo dominante sostiene, que la expansión de la SI responde al incremento progresivo de los niveles de actividad neural asociada con la sobre-estimulación de la vía somatosensorial durante el desarrollo postnatal, debido a la compensación funcional que se especula, ocurre como resultado de la pérdida de la vista (Hamilton y Pascual-Leone, 1998; Zheng y Purves, 1995; Rauschecker et al., 1992). En contraste con lo anterior, diversos estudios sugieren que esto pudiera no ser así. Fetter-Pruneda y colaboradores (2013) reportaron que: 1) la enucleación postnatal seguida de una extracción de las vibrisas no evita la expansión de la SI; 2) que ni la enucleación al dp7, ni la crianza en condiciones de oscuridad, conducen

a la expansión de la SI; 3) que la magnitud de la expansión de la SI es similar entre animales jóvenes y adultos enucleados al nacimiento; y 4) que los valores de los índices metabólicos de actividad neuronal en relevos de la vía somatosensorial, son similares en ratas enucleadas al nacimiento y ratas control a diferentes edades.

En conjunto, estos resultados sugieren que la expansión de la SI en ratas cegadas al nacimiento procede en ausencia de cambios en los niveles de actividad neuronal generada en respuesta a la estimulación exteroceptiva. De acuerdo con ello, Dawson y Killackey (1985) han sugerido que el desarrollo perinatal, y por consiguiente la plasticidad de la SI en roedores, progresa independiente de la actividad evocada debido a que: 1) su especificación antecede a la formación de barreletas en el núcleo del trigémino y barreloides en el núcleo VB, y 2) precede a la posibilidad de generar actividad neuronal en respuesta a estímulos periféricos. Además, se ha observado que la inactivación de las aferencias somatosensoriales primarias (Jensen y Killackey, 1987; Catalano et al., 1995; Boylan et al., 2001; Molnár et al., 2002) o la reducción de la actividad neuronal excitatoria a nivel cortical no afectan la especificación neuroanatómica ni el crecimiento de la SI (Chaia et al., 1992; Fox et al., 1996; Boylan et al., 2001); también, que la privación sensorial visual o somestésica perinatal se traduce en ATCs más ramificadas (Harris 1984; Antonini y Stryker, 1993; Catalano et al., 1995), situación que parece asociarse con un incremento en la disponibilidad de la proteína de crecimiento axonal 43 (GAP-43) (Dunn-Meynell et al., 1992; Benowitz y Routtemberg, 1997) y con la expansión del PMBSF (Penschuck et al., 1999).

Un dato reportado por Fetter-Pruneda y colaboradores (2013) que pudiese dar indicios sobre el mecanismo molecular que conduce a la expansión de la SI en ratas cegadas al nacimiento, es aquel que sugirió que, en los animales enucleados la expansión de los barriles expresa una especificación temprana en su desarrollo (pd3/10h) en referencia al desarrollo en individuos control (dp4-5), así como un incremento de la tasa de crecimiento de las ATCs con un crecimiento exacerbado de las ramificaciones axonales a nivel de la capa IV en la SI (Figura 4). Debido a que la tasa de crecimiento y el proceso de ramificación axonales es regulada por corrientes de calcio que ocurren tanto el cuerpo neuronal como en las terminales axónicas a manera de espigas o transitorias (Shatz y Stryker, 1988; Lankford y Letourneau, 1989, 1991; Gómez y Spitzer, 1999; McLaughlin et al., 2003; Mire et al., 2012), es probable que la enucleación perinatal pudiese modificar estas corrientes, promoviendo así el sobrecrecimiento de las ATCs en ausencia de la llegada de información exteroceptiva.



**Figura 4. Microfotografías y graficas que muestran que la formación del campo de barriles PMBSF presenta un adelantamiento temporal en su desarrollo en ratas enucleadas neonatalmente, y las ATCs presentan un crecimiento exacerbado de las ramificaciones axonales a nivel de la capa IV en S1. A.** Microfotografías de secciones tangenciales a través de la capa IV de S1 de ratas controles y enucleadas visualizadas con CyOx a las 82 horas (recuadro superior) y 92 horas de nacimiento (recuadro inferior). **B.** Gráficas que muestran el porcentaje de animales con o sin barriles (control vs enucleados) en las edades evaluadas. **C.** Microfotografías que ilustran el patrón de tinción con Dil (marcador lipofílico) en cortes coronales de corteza cerebral a nivel de PMBSF después de ser inyectados en VB. Las flechas indican la posición de los barriles. El panel de la derecha muestra un incremento en los campos de las terminales axónicas tálamo-corticales en un barril de PMBSF. El panel inferior muestra las reconstrucciones con cámara lucida de las terminales axónicas tálamo-corticales de ratas control y ratas enucleadas en estadios postnatales. **D.** Gráficas del área axonal promedio (panel izquierdo) así como la longitud (panel derecho) sin diferentes  $p^{***}<0.001$  entre ratas control y ratas enucleadas. El porcentaje se muestra dentro de cada panel. Tomado de Fetter-Pruneda et al., 2013.

### Actividad neuronal intrínseca y regulación del desarrollo neural.

Durante el desarrollo ontogenético de la corteza, procesos celulares tales como la proliferación de precursores neuronales, la migración neuroblástica y el establecimiento tanto de los grupos neurales como de su conectividad son regulados, en parte por la actividad eléctrica neuronal generada de forma

intrínseca o espontánea (Katz y Shatz, 1996; Yuste 1997; O'Donovan 1999; McCormick 1999; Crair 1999; Spitzer 2006; Zhang y Poo, 2001), con alguna contribución tardía, particularmente en el refinamiento sináptico, de la actividad neuronal asociada con la estimulación sensorial periférica (Stryker 1989; Yuste 1997; Feller y Scanziani, 2005).

Con relación a la actividad neuronal intrínseca, ésta se caracteriza por la correspondencia que hay entre la generación de potenciales de acción y los incrementos de las  $[Ca^{2+}]_i$ , los cuales se expresan fundamentalmente como transitorias u oscilaciones de calcio citoplasmático a nivel del soma y de sus proyecciones axónicas y dendríticas (Smetters et al., 1999; Gobel y Helmchen, 2007). Aunque no es del todo claro el origen y persistencia de esta actividad, estudios realizados en diversas preparaciones tisulares obtenidas de distintas especies animales (O'Donovan 1999; Moody y Bosma, 2005), han permitido postular que: 1) la actividad intrínseca es generada a través de la excitación reverberante en los circuitos neuronales y modulada por procesos inhibitorios y 2) que está relacionada con mecanismos membranales intrínsecos en los que se incluyen corrientes catiónicas hiperpolarizantes (H), corrientes persistentes de  $Na^+$  ( $Na_p$ ) y corrientes de calcio dependientes de voltaje ( $I_{Ca^{2+}}$ ), las cuales modulan los incrementos en las concentraciones de calcio intracelular (Moody 1998; O'Donovan 1999; Mao et al., 2001; McCormick et al., 2003; Moody y Bosma, 2005).

Los efectos que las transitorias de la  $[Ca^{2+}]_i$  ejercen sobre el ensamblaje y desarrollo de los circuitos neuronales (Shatz 1990; Katz y Shatz, 1996; Yuste 1997; Crair 1999; McCormick 1999; Spitzer 2006) están asociados con la generación de “códigos” electroquímicos intracelulares y su modulación (Toescu y Verkhratsky, 1998; Ulhén y Fritz, 2010), los cuales son la consecuencia tanto de la activación por calcio extracelular de los senso-receptores de calcio (CaSR) a nivel de membrana (Spitzer 2008; Jones y Smith, 2016) como de la activación por medio del calcio intracelular de distintas cascadas de señalización relacionadas a segundos mensajeros\* (Ulhén y Fritz, 2010; Rosenberg y Spitzer, 2011; Berridge 2016).

Estos “códigos”, resultado de la dinámica de las  $[Ca^{2+}]_i$  se combinan en patrones de frecuencia (i.e., número de transitorias de calcio por unidad de tiempo) y de amplitud (i.e., altura de la transitoria de calcio) de las transitorias de  $Ca^{2+}$  intracelular (Toescu y Verkhratsky, 1998; Ulhén y Fritz, 2010). Estas

---

\* **Anexo 1.** Procesos relacionados en la generación de las transitorias de  $Ca^{2+}$  intracelular y su modulación.

transitorias, dependiendo de la región de la neurona (e.g., soma, dendritas o axones) en donde se generen, de su dinámica en los ensambles neuronales y de su relación espacio-temporal expresada como espigas únicas o en ráfagas en neuronas individuales, como nubes de calcio focalizadas en los procesos axonales y dendríticos, o como oscilaciones de actividad sincrónica o no, que se propagan a lo largo de poblaciones de neuronas (Shatz 1990; Kater y Mills, 1991; Wong 1993; Spitzer 2006; Blankenship y Feller, 2010; Kerschenteiner D, 2014; Leighton y Lohmann, 2016), resultara en la activación de procesos celulares como la diferenciación neural, el crecimiento axonal y dendrítico, la especificación fenotípica neuronal o la modulación de la expresión epigenética y genética (Corner y Ramakers 1992; Wong 1993; Katz y Shatz, 1996; Bito et al., 1997; McCormick 1999; Moody y Bosma, 2005; Spitzer 2006; Rosenberg y Spitzer, 2011; Leclerc et al.,2012).

En lo que respecta a la construcción de circuitos, se ha mostrado que la disminución en los niveles de las  $[Ca^{2+}]_i$  en neuronas del hipocampo del ratón y en neuronas de caracol, se asocia con un decremento de la tasa de crecimiento axonal, e incluso, con la interrupción del crecimiento del cono axónico (Connor 1986 y Cohan et al, 1987; citados en Kater y Mills, 1991). Sin embargo, este tipo de respuesta no representa un patrón de modulación del crecimiento axonal o dendrítico general para todos los procesos neuronales dependientes de este tipo de actividad, pues otros estudios indican que el incremento de las  $[Ca^{2+}]_i$  también puede inhibir la extensión de las neuritas en líneas celulares de neuroblastoma (Silver et al.,1989), mientras que en neuronas de caracol los incrementos de las  $[Ca^{2+}]_i$  además de inhibir el crecimiento de las neuritas, se promueve la retracción de los filopodios y lamelopodios del cono axonal (Mattson y Kater, 1987). De manera similar, en neuronas ganglionares asociados a la raíz dorsal se ha reportado que incrementos sostenidos en la frecuencia de las transitorias  $Ca^{2+}$  intracelular genera el colapso del cono axonal al afectar los filamentos de actina (Lankford y Letourneau, 1989, 1991, Gómez et al., 1995; Gómez y Spitzer, 1999). Finalmente, el uso combinado de métodos electrofisiológicos y de imagenología de calcio muestran que alteraciones en la temporalidad de propagación de los patrones de actividad eléctrica intrínseca a lo largo de la vía sensorial visual, afectan el crecimiento axonal, la madurez sináptica, el establecimiento y segregación axonal en las vías retino-colicular, colículo-genicular y genículo-cortical (Shatz y Stryker, 1988; Mooney et al., 1996; McLaughlin et al., 2003; Cang et al., 2005; Ackman et al.,2012), independientemente de la estimulación visual exteroceptiva (Ackman et al.,2012).

## Actividad neuronal intrínseca y plasticidad de las ATCs

Como se mencionó con antelación, el establecimiento de la conectividad de las ATCs se desarrolla entre el de17 y el dp4 en la rata (Rice 1995; Catalano et al., 1996). Para que este proceso se lleve a cabo se requiere de la participación de factores talámicos y corticales en una secuencia espacio-temporal que module y coordine el establecimiento de la conectividad tálamo-cortical (Cuadro 1; Vanderhaeghem y Polleux, 2004; Sutherland et al., 2014; Lokmane y Garel, 2014).

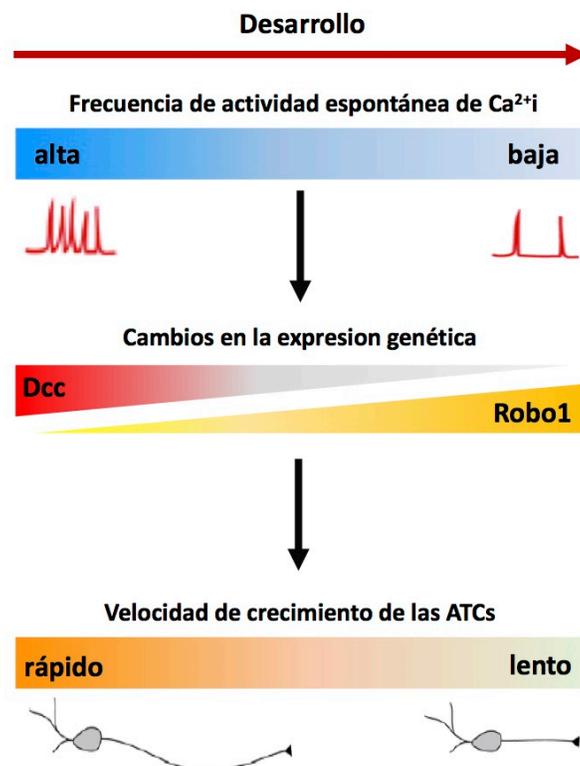
**Cuadro 1. Factores talámicos y corticales.** Factores moleculares asociados a la coordinación del desarrollo y establecimiento de la conectividad entre las áreas talámicas y las áreas corticales.

Tálamo	Corteza
Factor de crecimiento fibroblástico 8 (FGF8)	FGF8
Factor nuclear NF- $\kappa$ B	Netrinas (Netrina1)
Receptor nuclear <i>orphan Rorb</i> (ROR-beta)	Semaforinas (Sema3A y Sema3F)
Factores de transcripción:	Efrinas (receptores Eph)
• Emx2	Slits (proteínas de matriz extracelular)
• Pax6	Neurotrofinas (NGF, BDNF, NT-1)
• Sp8	Proteínas de regulación de proliferación celular (Wnt's)

En este contexto, si la secuencia espacio temporal de los eventos involucrados en la conectividad tálamo-cortical se modifica, entonces la forma en la que ocurre la especificación neuroanatómica de la representación corporal en la SI cambia (Fetter-Pruneda et al., 2013). Al respecto, se sabe que uno de los factores involucrados en modular la coordinación de los factores antes mencionados durante el desarrollo de la conectividad tálamo-cortical, es la actividad intrínseca neuronal asociada a la dinámica de las  $[Ca^{2+}]_i$  (Mire et al., 2012; Castillo-Paterna et al., 2015; Gezelius y López-Bendito, 2016).

Con relación a lo anterior, Mire y colaboradores (2012) mostraron que durante el desarrollo tálamo-cortical la tasa de crecimiento de las ATCs que se proyectan desde el VB disminuye en asociación con el decremento de la frecuencia de actividad de las transitorias de la  $Ca^{2+}$  de  $27.9 \pm 2.6 h^{-1}$  en el de12.5 a  $16.2 \pm 1.5 h^{-1}$  en el de17.5, y el incremento en la amplitud de las transitorias de  $Ca^{2+}$  intracelular. Estos cambios en la actividad intrínseca generaron modificaciones de la expresión de genes asociados a la síntesis de proteínas integrales de membrana que funcionan como receptores de señales moleculares

en el crecimiento y orientación de la proyección axonal, por ejemplo, al disminuir la frecuencia de la actividad espontánea aumentó la expresión de los genes *Robo1* en asociación con *Slit1*, generando la disminución del crecimiento de las ATCs (Mire et al., 2012), mientras que para el gen *DCC*, el aumento de la frecuencia de la actividad espontánea generó la disminución en su expresión, promoviendo así, el incremento en la tasa de crecimiento de las ATCs (ver Figura 5) (Castillo-Paterna et al., 2015). Cabe mencionar, que las transitorias de  $Ca^{2+}$  intracelular no sólo regulan el desarrollo temprano de las ATCs, sino que también controlan sus respuestas plásticas. En este sentido, se ha reportado en estudios con ratones en estadios embrionarios (de14.5) la generación de ondas de actividad espontánea de  $Ca^{2+}$  intracelular sincronizada a nivel talámico, cuya propagación además de llevarse a cabo por medio de uniones comunicantes, expresa patrones específicos de propagación entre los núcleos talámicos MGv (auditivo), dLGN (visual) y VPM (somatosensorial). Particularmente, se observó que en ratones enucleados (de14.5) la frecuencia de ondas de actividad espontánea en VPM incrementó, a la vez que precedió a la expansión del campo de barriles en la SI y a la activación de manera dependiente de la actividad espontánea del receptor nuclear *orphan Rorb* en VPM, asociado al aumento en la ramificación de las terminales axónicas tálamo-corticales (Moreno-Juan et al., 2017).



**Figura 5. Procesos asociados a la regulación del crecimiento de los ATCs durante el desarrollo embrionario.** En estadios embrionarios, la frecuencia la actividad de  $Ca^{2+}i$  decae en la medida en que las ATCs llegan y se insertan en la corteza. Este cambio activa procesos dependientes de la actividad de  $Ca^{2+}$  modificando la expresión de genes como *Dcc* y *Robo1*, los cuales tiene actividad antagonista sobre el crecimiento de los axones. Tomado y modificado de Castillo-Paterna et al., 2015.

## **Problema**

En individuos encefalocidos la SI está expandida, además, de presentar un adelanto temporal en su desarrollo y especificación neuroanatómica. Aunque este proceso es continuo e independiente al incremento de la actividad neuronal en la vía somatosensorial, se desconoce si la actividad eléctrica intrínseca podría estar modificando la tasa de crecimiento de los axones tálamo-corticales que se proyectan desde el VB, y por lo tanto el establecimiento neuroanatómico de la SI. En este contexto y debido a que uno de los factores involucrados en modular y coordinar el desarrollo de la conectividad tálamo-cortical es la actividad intrínseca asociada a la dinámica de las  $[Ca^{2+}]_i$  neuronal, en este proyecto evaluamos si existen cambios en la amplitud y la frecuencia de las transitorias de  $Ca^{2+}$  intracelular en neuronas del VB, origen de las ATCs, que puedan asociarse con la expansión postnatal del PMBSF en las ratas enucleadas al nacimiento.

## **Hipótesis**

La amplitud de las transitorias de  $Ca^{2+}$  intracelular en neuronas del núcleo VB incrementará en las ratas enucleadas al nacimiento.

La frecuencia de las transitorias de la  $Ca^{2+}$  intracelular en las neuronas del núcleo VB disminuirá durante el desarrollo postnatal en ratas enucleadas al nacimiento.

## **Objetivo**

Evaluar la amplitud y la frecuencia de las transitorias de  $Ca^{2+}$  intracelular en neuronas del núcleo VB de ratas control y ratas enucleadas al nacimiento en los tres primeros días postnatales.

## **Métodos**

### **Animales**

Los experimentos se realizaron en rebanadas de cerebro que se obtuvieron de crías de ratas Wistar, nacidas y criadas en la Unidad de Modelos Biológicos del Instituto de Investigaciones Biomédicas y en el Bioterio de la Facultad de Ciencias, ambas dependencias de la Universidad Nacional Autónoma de México. Se utilizaron crías indistintamente del sexo al dp1 (n=8/grupo), el dp2 (n=8/grupo) y al dp3 (n=8/grupo). Las crías permanecieron con sus madres hasta el momento del experimento. Las camadas se mantuvieron en un cuarto acondicionado con un fotoperiodo de 12 horas luz /12 horas oscuridad, teniendo temperatura controlada a 25°C. Las madres tuvieron acceso *ad libitum* a agua y alimento durante la gestación y la lactancia. Todos los procedimientos experimentales se realizaron en concordancia con los procedimientos establecidos en la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999, Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de animales de laboratorio.

### **Enucleación**

La enucleación de las ratas se realizó a las 5 horas de nacidas. Para realizar la cirugía, las ratas fueron anestesiadas por hipotermia. Una vez anestesiadas, se realizó una incisión a lo largo de la comisura palpebral y se extrajo el glóbulo ocular con ayuda de una pinza. Concluida la enucleación, las ratas se colocaron en un cojinete de algodón iluminadas con lámpara de luz incandescente hasta que recuperaron la movilidad, el color y la temperatura. En seguida, las crías se regresaron con la madre. Las ratas control fueron sometidas al mismo procedimiento de anestesia por hipotermia y recuperación, sin que se les haya realizado la incisión palpebral y la enucleación.

### **Obtención y procesamiento de las rebanadas de cerebro**

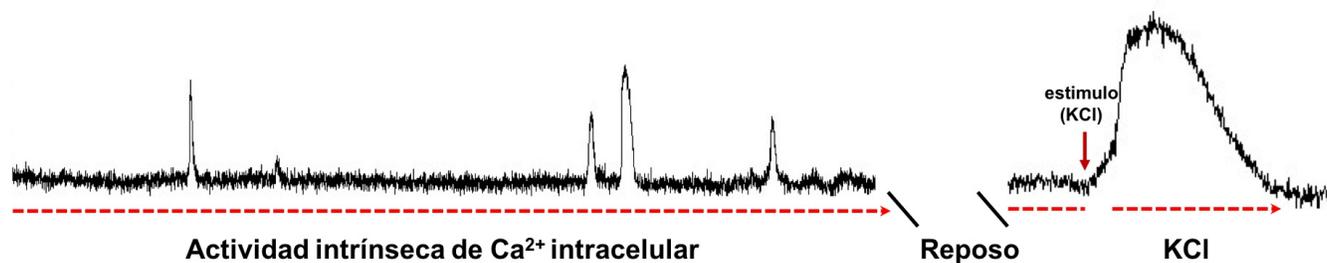
Las crías fueron anestesiadas por hipotermia y decapitadas. El cerebro se extrajo a través de una craneotomía y se sumergió en solución cerebrospinal artificial (ACSF) que contiene (en mM): 124,

NaCl; 5, KCl; 26, NaHCO<sub>3</sub>; 10, D-(+)-Glucosa; 1.25, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 1.3, MgSO<sub>4</sub>; 2, CaCl<sub>2</sub>, ajustada a un pH=7.4, saturada con 95:5 O<sub>2</sub>-CO<sub>2</sub> (Agmon y Connors, 1991). Con el objetivo de obtener cortes precisos, el cerebro se embebió en agar (3%; Invitrogen; Eugene Or, USA) diluido en ACSF. El bloque de inclusión se colocó por 5 minutos en un refrigerador (5°C) hasta que el agar se solidificó. Posteriormente a esta maniobra, el cerebro fue cortado en un vibratomo (Leica VT1000S) siguiendo las indicaciones reportadas por Agmon y Connors (1991) (ver también Lee et al, 2005) para obtener rebanadas de 300µm en el ángulo correcto para preservar la vía tálamo-cortical somatosensorial. Las rebanadas obtenidas se colocaron en una cámara con ACSF saturada con una mezcla de 95:5 O<sub>2</sub> -CO<sub>2</sub> por 15 minutos. Transcurrido este tiempo, las rebanadas se transfirieron a pozos en lo que se incubaron con el sensor intensiométrico de calcio acetoximetil de Fluo4 (Fluo 4-AM, 22 µM,  $K_d = 345\text{nm}$ ; Invitrogen; Eugene Or, USA) diluido en una solución al 0.4% de ácido plurónico F-127 (Sigma, St. Louis, MO, EUA), 0.1% de dimetil-dulfóxido (DMSO, Sigma, St Louis MO, USA) y ACSF (1ml). Las rebanadas así conservadas se colocaron en una cámara de incubación a ~35°C en una atmósfera de 95:5 O<sub>2</sub> -CO<sub>2</sub> durante 30 minutos. Terminado el tiempo de incubación, las rebanadas fueron lavadas con ACSF y se pusieron en reposo durante 15 minutos, posteriormente, se colocaron en una cámara de plexiglás previamente tratada con poly-L-lisina (30%; Sigma St, Louis MO, USA). Previo al registro de su actividad, se colocó una malla de nylon sobre la rebanada para evitar su movimiento.

### **Registro de la actividad de la Ca<sup>2+</sup> intracelular (Imagenología de Calcio)**

El registro de la actividad de la [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> se llevó a cabo en un microscopio estereoscópico de epifluorescencia (Leica M205FA) equipado con un objetivo APO2.0X. La excitación del fluoróforo (Fluo 4-AM) incorporado al tejido se realizó con una lámpara de mercurio utilizando un filtro de excitación de 488nm y capturándose la emisión filtrada de la fluorescencia a 510nm. La adquisición de las imágenes (30 minutos) se realizó con una cámara CCD (Cool-Snap HQ2, Photometrics) acoplada al microscopio estereoscópico, con un protocolo de registro de 5000 imágenes secuenciales con un intervalo de apertura de 100ms y un intervalo de cierre 300ms del obturador. A lo largo las sesiones de imagenología, se registró la actividad intrínseca de neuronas localizadas en el VB, tanto en crías control como de enucleados entre el dp1 y el dp3. Al termino de cada registro, y con la finalidad de determinar la viabilidad de la rebanada se realizó un registro adicional de 5 minutos, que consistió en un minuto de

registro de actividad basal, 50 segundos con perfusión de una solución de alto potasio (KCl) la cual contiene en mM: 50 KCl, 120 NaCl, 10 HEPES y 2 CaCl<sub>2</sub> a un pH de 7.4), y de 3 minutos 10 segundos de actividad basal posterior a la aplicación de KCl (Figura 6).

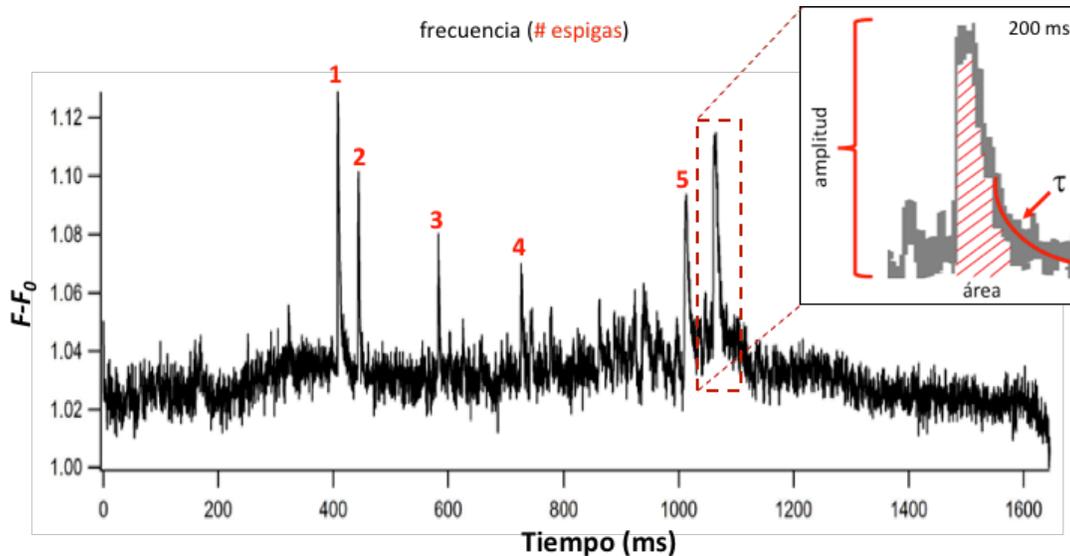


**Figura 6. Registro de la actividad intrínseca de Ca<sup>2+</sup> intracelular.** El protocolo de registro de la actividad intrínseca de Ca<sup>2+</sup> intracelular fue de 30 min (2000 seg), seguido de un registro de 5 minutos, periodo durante el cual se aplico un estímulo con KCl durante 50 seg.

### **Análisis de imágenes y procesamiento de datos**

El procesamiento de las secuencias de imágenes se realizó con el *software ImageJ* (National Institute of Health). Con el *plugin Image Stabilizer* de este *software* se realizó la corrección del movimiento de las secuencias de imágenes. Después se llevó a cabo la selección manual de las áreas de interés (ROI, por sus siglas en inglés), la cual incluyó a todos los somas de las células del VB que exhibieron respuesta a KCl. Posteriormente, las series de tiempo de actividad de [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> obtenidas de las células a partir del ImageJ se procesaron en el programa Igor Pro (Wavemetrics, Lake Oswego, OR, EUA), con el cual se realizó la corrección de la pendiente de los datos de las series de tiempo de las transitorias de Ca<sup>2+</sup> intracelular debido al efecto del foto-blanqueo de la rebanada, así como la aplicación de la función  $\Delta F/F_0 = (F_0 - F_1)/(F_0)$  para normalizar los valores de la intensidad de fluorescencia (las rutinas utilizadas fueron realizadas por el Dr. Pierre Fontaneaud del *Institute of Functional Genomics*, Montpellier Francia).

Con este mismo programa y utilizando una rutina escrita por el Dr. León Islas (Facultad de Medicina, UNAM) se obtuvieron las gráficas (raster) de actividad de la [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> de las poblaciones neurales. Para la estimación de los parámetros de la dinámica de calcio como la frecuencia, la amplitud, área bajo la curva y el tiempo de decaimiento de la señal ( $\tau_d$ ) de las transitorias [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> (ver Figura 7) se utilizó la rutina de análisis (Multi-peak Fitting, versión 2.6) del programa Igor Pro (Wavemetrics).



**Figura 7. Perfil de transitoria de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular.** Trazo representativo del cambio de fluorescencia inducido por transitorias de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular, en el cual se muestran las variables de interés a extraer y analizar en cada una de las células para cada estadio postnatal (dp1, dp2, dp3) en ambos grupos (controles vs enucleados).

### Selección de las células con actividad intrínseca de $\text{Ca}^{2+}$

La selección de las células con actividad intrínseca de  $\text{Ca}^{2+}$  (células que exhibieron transitorias de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular durante el periodo de registro) se realizó a partir de las células de núcleo VB seleccionadas que respondieron a KCl (Cuadro 2).

**Cuadro 2.** Número de células que respondieron a KCl y con que exhibieron actividad intrínseca (transitorias de  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ) durante el periodo de registro en VB de ratas control (C) y ratas enucleadas (E), en cada estadio postnatal (dp1, dp2, dp3).

Número de células responsivas a KCl y con actividad intrínseca de $[\text{Ca}^{2+}]_i$						
Edad	dp1		dp2		dp3	
Condición	C	E	C	E	C	E
# de células que respondieron a KCl	1465	1258	2252	1944	2966	2112
# de células con actividad intrínseca	735	669	938	741	1514	1013

## Estadística

Para el análisis estadístico se determinó el tamaño de muestra de la población de células ( $n=104$ ). Esta estimación se realizó con base en la desviación estándar ( $\sigma=0.01045$ ) de los datos de la variable de amplitud del DP1 grupo control, asumiendo un nivel de confianza del 95% y un error de estimación de 0.002. Con base en esta estimación y a partir del total de las células que exhibieron transitorias de  $[Ca^{2+}]_i$  (ver Cuadro 2) se realizó la selección al azar del número de células (ver Cuadro 3) necesarias para el análisis estadístico. De estas células se extrajeron los parámetros de interés (la frecuencia, la amplitud, el área bajo la curva y la  $\tau_d$ ) relacionados al análisis de la dinámica de  $Ca^{2+}$ . Posteriormente se realizaron comparaciones estadísticas dentro y entre grupos a las distintas edades estudiadas utilizando GraphPad Prism 7.04 (La Jolla, CA, EUA). Este programa nos permitió estimar la homogeneidad de la varianza y verificar la distribución normal de los datos (Shapiro-Wilk). Con base en este análisis se utilizó estadística para datos paramétricos.

**Cuadro 3.** Número de células analizadas en el núcleo VB en cada estadio postnatal (dp1, dp2 y dp3) para el grupo de ratas control (C) y el grupo de ratas enucleadas (E).

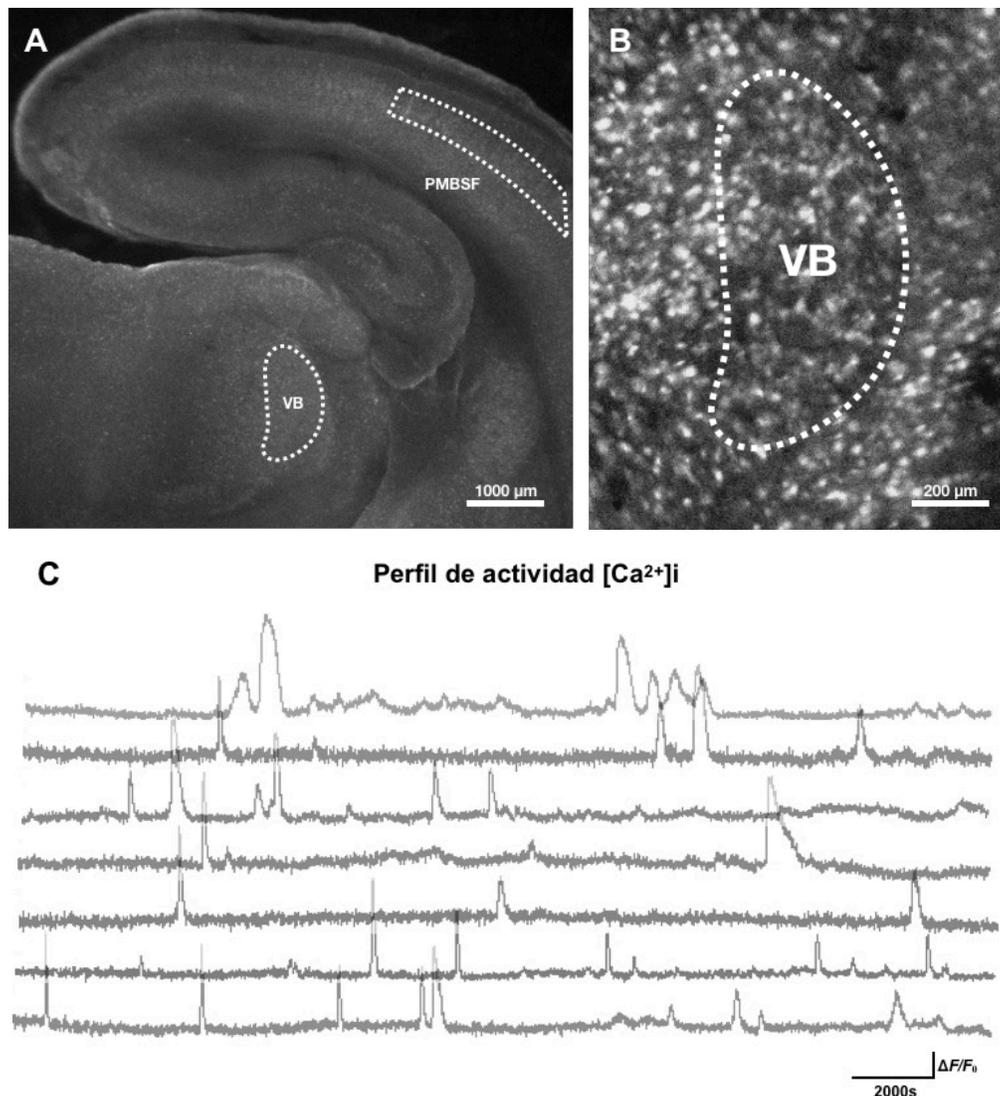
Edad	dp1		dp2		dp3	
Condición	C	E	C	E	C	E
# de células para el análisis estadístico	445	466	435	426	516	520

Para cada uno de los análisis se presentan los datos como media  $\pm$  error estándar considerando un valor de  $\alpha = 0.05$ . Se utilizó la prueba de T de Student para muestras independientes para comparar las variables entre grupos control y los grupos experimentales. Por otra parte, se utilizó la prueba de ANOVA de una vía para comparar las variables entre edades de la misma condición. Debido a que los datos presentaron homogeneidad de las varianzas, se utilizó la prueba *post hoc* de Tukey para estimar la significancia de las interacciones entre las variables.

## Resultados

### Sección tálamo-cortical de la vía somatosensorial primaria

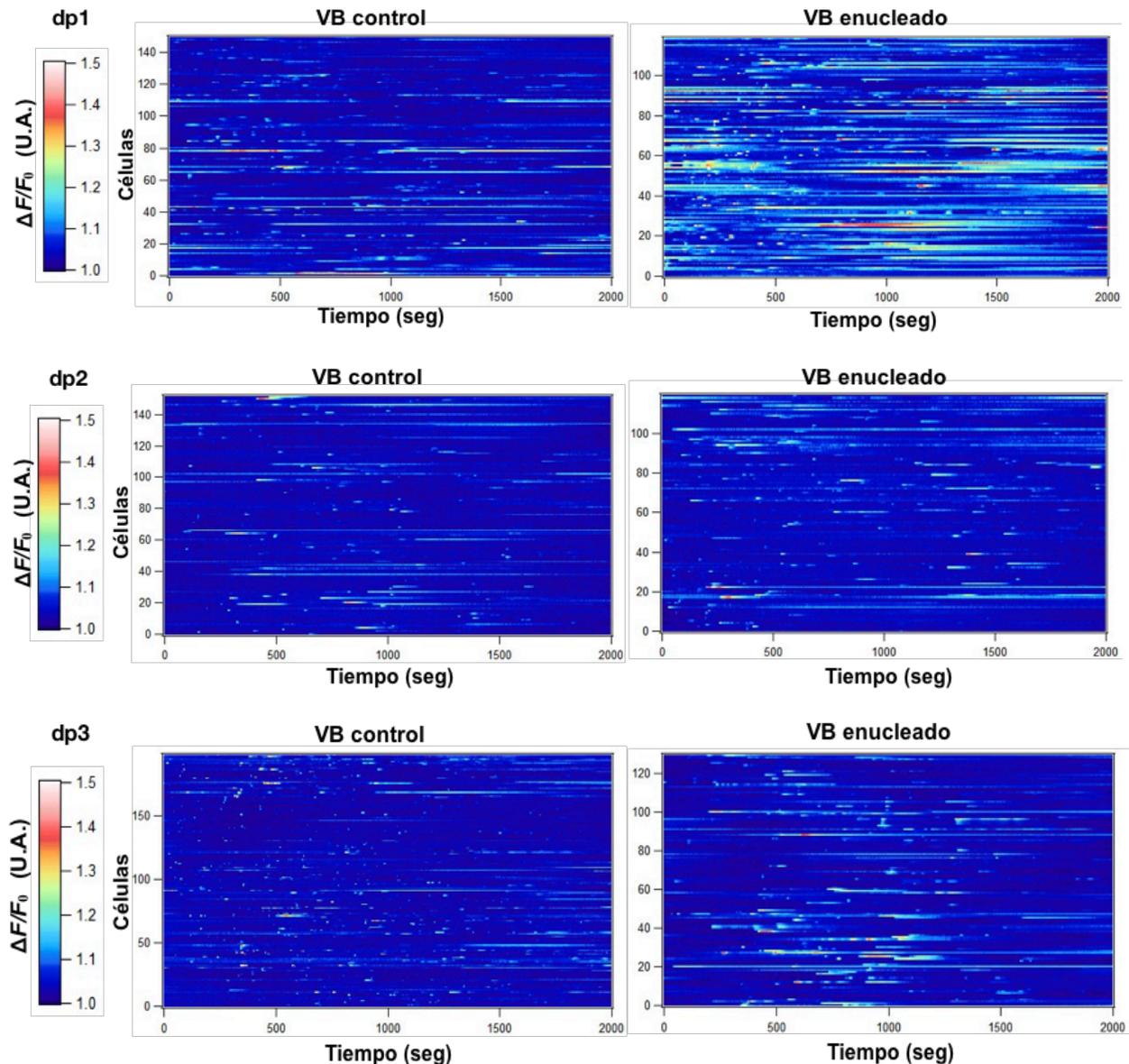
Corte representativo de una rebanada de cerebro de rata en estadios postnatales en la que se aprecia el núcleo VB talámico y el subcampo posteromedial de barriles en la S1, áreas que conforman la vía tálamo-cortical somatosensorial (figura 8-A). En el panel de la derecha se muestra el núcleo VB (figura 8-B). Perfiles de actividad de transitorias de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular obtenidos de los registros de las células del núcleo VB (figura 8-C).



**Figura 8. Fotografías de la región tálamo-cortical de la S1 y trazos de los perfiles de actividad de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular. A.** Rebanada tálamo-cortical que permite mantener la integridad de la conectividad entre el núcleo VB y la corteza de barriles en la S1, áreas delimitadas. **B.** Núcleo VB talámico. **C.** Perfiles de la actividad de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular de las células del núcleo VB.

## Cambios en la fluorescencia de la $[Ca^{2+}]_i$ en las poblaciones neuronales del núcleo VB

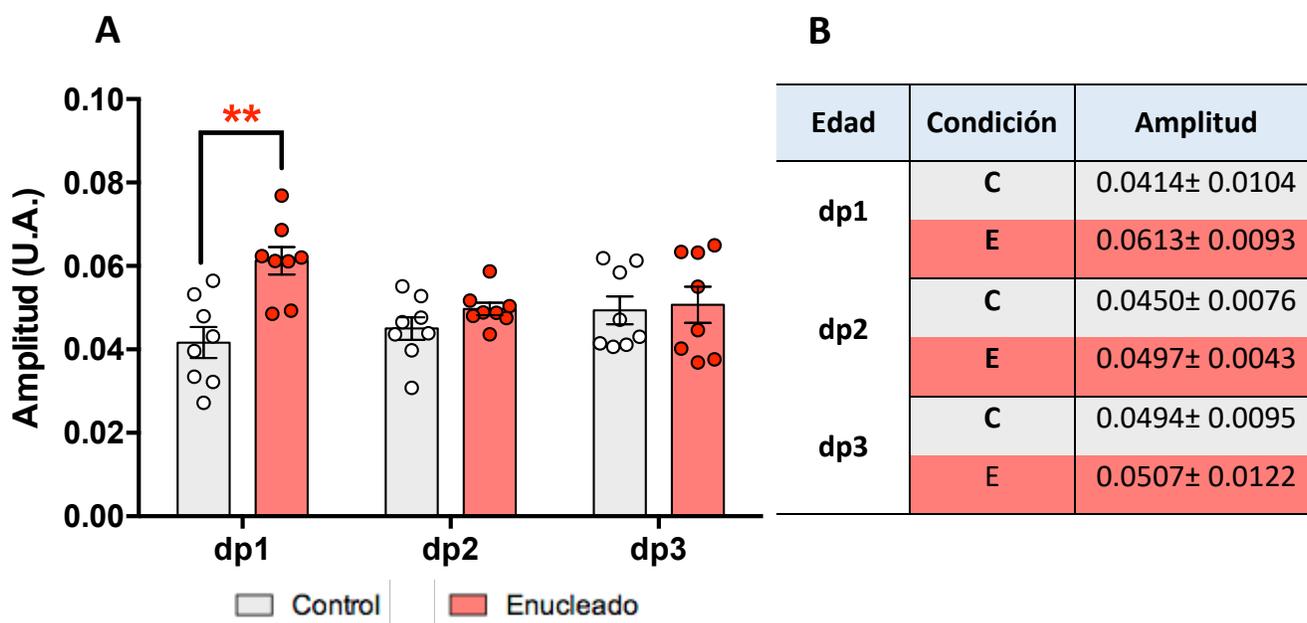
Las graficas muestran los cambios en la intensidad de fluorescencia ( $\Delta F/F_0$ ) del calcio intracelular, asociados a la amplitud y al tiempo de decaimiento ( $\tau_d$ ) de las transitorias de  $Ca^{2+}$  intracelular de las poblaciones celulares del núcleo VB al dp1, dp2 y dp3 de ratas control y ratas enucleadas. Cualitativamente se observa un incremento en la intensidad de fluorescencia (véase la escala  $\Delta F/F_0$ ) en las células del VB de las ratas enucleadas en comparación con las ratas control en dp1; esto, sin embargo no es consistente en dp2 y dp3 tanto para ratas control como enucleadas (figura9).



**Figura 9. Gráficas poblacionales de la actividad de  $Ca^{2+}$  intracelular en el núcleo VB talámico.** Graficas (representativas) poblacionales de cambios en la intensidad ( $\Delta F/F_0$ ) de fluorescencia de  $Ca^{2+}$  intracelular en las células del VB del grupo control y grupo enucleado al dp1, dp2 y dp3. El cambio de fluorescencia para cada célula esta representado horizontalmente con relación al tiempo.

**La amplitud de las transitorias de  $Ca^{2+}$  incrementa en las poblaciones neuronales del núcleo VB en ratas cegadas al nacimiento en el dp1.**

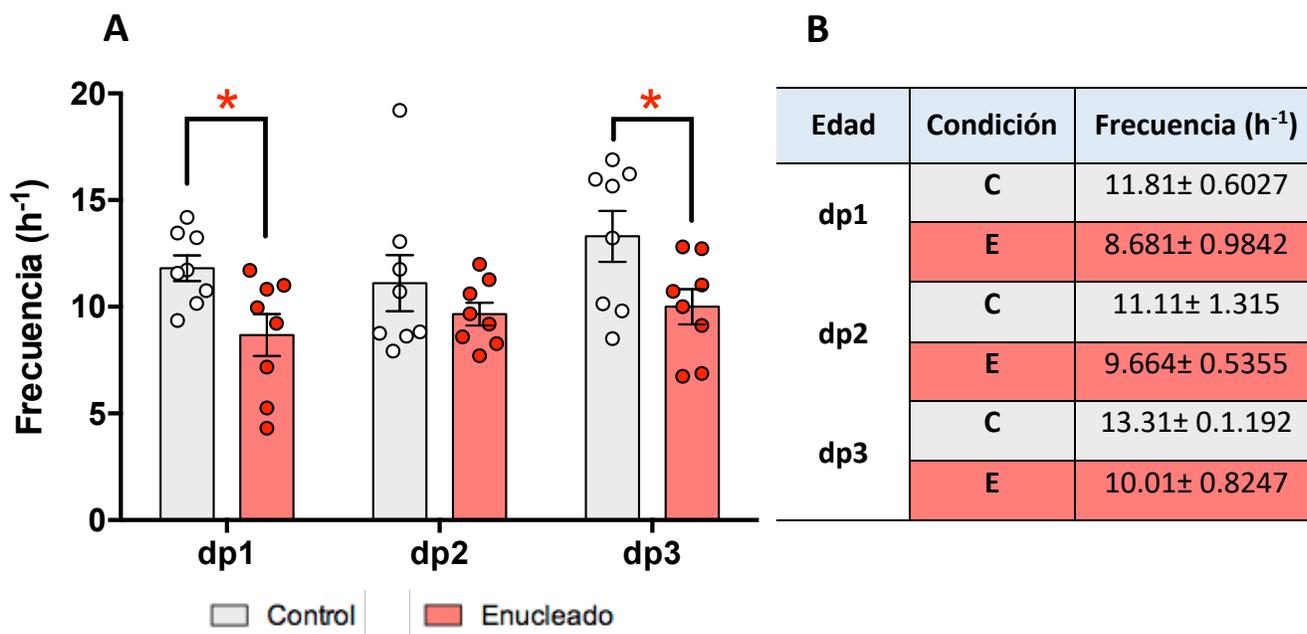
El análisis de los resultados de la amplitud de las transitorias de  $Ca^{2+}$  intracelular de las neuronas seleccionadas del núcleo VB, muestran que las diferencias entre las ratas control y ratas enucleadas sólo son estadísticamente significativas al primer día postnatal. El análisis para el dp2 y dp3 no mostró diferencias significativas de los valores de la amplitud de las transitorias de  $Ca^{2+}$  intracelular; no hubo diferencias significativas en el análisis entre edades, para cada grupo (Figura 10-A). En términos generales, los valores de la amplitud tienden consistentemente a ser más altos en las crías enucleadas al nacimiento que en las crías control, durante los primeros tres días de vida. En el caso de las crías control, sin embargo, se observa una tendencia ligera a elevar los valores de amplitud de las transitorias de calcio a través de los estadios postnatales (Figura 10-B).



**Figura 10. Análisis de la amplitud de la dinámica de  $Ca^{2+}$  intracelular.** **A.** La amplitud de la señal de fluorescencia de las transitorias de  $Ca^{2+}$  intracelular incremento significativamente ( $p < 0.0014$ ) en el grupo de enucleados en comparación con el grupo control en el dp1, indicado por \*\*. Los círculos blancos y rojos son los promedios de los datos analizados, y denotan la dispersión de los datos en los grupos de animales control y enucleados. **B.** Valores de la amplitud de las transitorias de  $Ca^{2+}$  intracelular en células del núcleo VB. Se muestran los promedios y error estándar de la amplitud del análisis de las transitorias de  $Ca^{2+}$  intracelular de los grupos control y enucleados, en los tres primeros días postnatales.

**La frecuencia de las transitorias de  $Ca^{2+}$  intracelular de las poblaciones neuronales del VB disminuye en las ratas cegadas al nacimiento en el dp1 y el dp3.**

El análisis de la frecuencia de las transitorias de calcio en neuronas del núcleo VB seleccionadas de rebanadas provenientes de cerebros de crías control y enucleadas al nacimiento, mostró que las diferencias entre los grupos sólo son estadísticamente significativas en el dp1 y el dp3. No obstante, y a pesar de que en el dp2 la dispersión de los datos no permite establecer las diferencias entre los grupos, se observa la misma tendencia – disminución de la frecuencia de las transitorias de  $Ca^{2+}$  en las ratas enucleadas– que en el dp1 y dp3. No existieron diferencias significativas de los valores de la frecuencia de las transitorias de calcio entre las edades, para cada grupo (Figura 11-A). En términos generales, los valores de la frecuencia tienden consistentemente a ser más bajas en las crías enucleadas al nacimiento que en las crías control, durante los primeros tres días de vida. Para ambos grupos se observa una tendencia ligera a elevar los valores de frecuencia de las transitorias de calcio a través de los estadios de desarrollo postnatal (Figura 11-B).



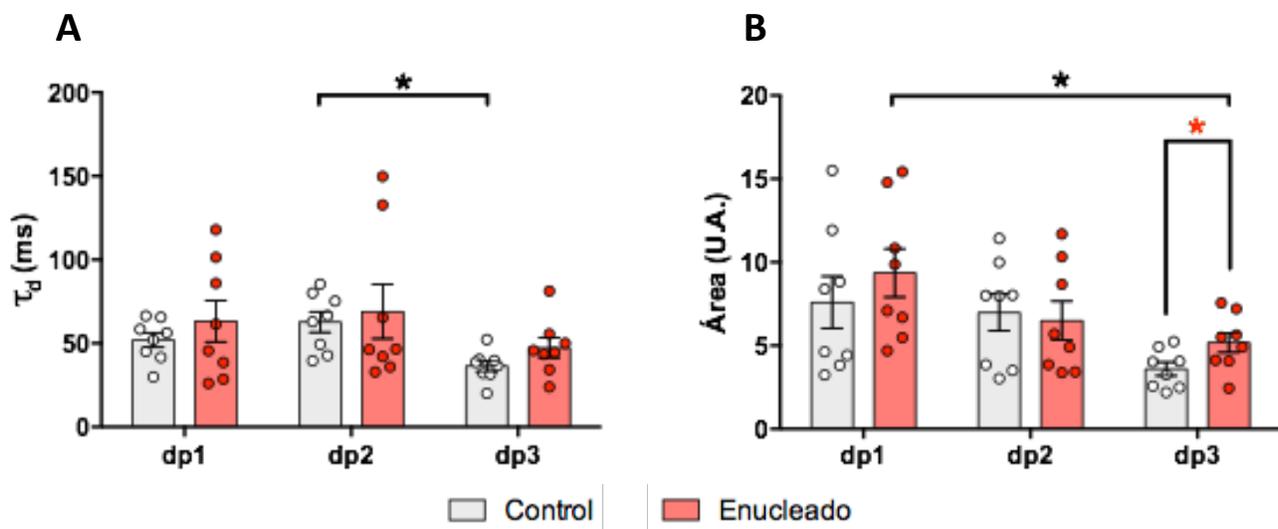
**Figura 11. Análisis de la frecuencia de actividad de  $Ca^{2+}$  intracelular.** **A.** La frecuencia de las transitorias de  $Ca^{2+}$  disminuyó significativamente en el dp1 ( $p < 0.0159$ ) y el dp3 ( $p < 0.0411$ ) en el grupo de enucleados en comparación con el grupo control, las diferencias significativas están indicadas por \*. Los círculos blancos y rojos son los promedios de los datos analizados, y denotan la dispersión de los datos en los grupos de animales control y enucleados. **B.** Valores de la frecuencia de las transitorias de  $Ca^{2+}$  en células de VB. Se muestran los promedios y error estándar de la frecuencia de las transitorias de  $Ca^{2+}$  intracelular de los grupos control y enucleados en los tres primeros días postnatales.

**El  $\tau_d$  de las transitorias de  $Ca^{2+}$  tiende a incrementar en las neuronas del núcleo VB en las crías enucleadas.**

El análisis del  $\tau_d$  de las transitorias de  $Ca^{2+}$  en las neuronas del núcleo VB de crías control y enucleadas al nacimiento en estadios postnatales, mostró el decremento significativo de la  $\tau_d$  en la comparación de edades en animales control entre el dp2 y el dp3 (Figura 12-A). En términos generales, los valores de la  $\tau_d$  tienden a ser más bajos en las crías control que en aquellas enucleadas al nacimiento, durante los primeros tres días de vida; además, de que los valores de la  $\tau_d$  tienden a incrementarse entre el dp1 y al dp2, para luego disminuir entre el dp2 y el dp3 (Figura 12-A y Cuadro 6).

**El área bajo la curva de las transitorias de  $Ca^{2+}$  incremento en las ratas cegadas al nacimiento.**

Los resultados del análisis de los datos obtenidos del área bajo la curva a partir del análisis de las transitorias de  $Ca^{2+}$  de las neuronas del VB de crías control y enucleadas al nacimiento, indicó que las diferencias significativas entre los grupos son al dp3. La comparación por edades mostró diferencias significativas del área bajo la curva de las transitorias de  $Ca^{2+}$  intracelular entre el dp1 y el dp3, en las crías enucleadas. En términos generales, para ambos grupos los valores del área bajo la curva de las transitorias de  $Ca^{2+}$  decaen a través de los estadios postnatales de desarrollo (Figura 12-B y Cuadro 6).



**Figura 12. Análisis de  $\tau_d$  y área bajo la curva de las transitorias de  $Ca^{2+}$ .** A. El análisis de  $\tau_d$  mostró diferencias entre el dp2 y el dp3 del grupo control ( $p < 0.0021$ ) indicado por \*. B. El análisis del área bajo la curva indicó un incremento significativo ( $p < 0.0459$ ) entre grupos en el dp3, indicado por \*; el análisis por edades mostró diferencias significativas ( $p < 0.0407$ ) entre el dp1 y el dp3 del grupo de enucleados, indicado por \*. Los círculos blancos y rojos son los promedios de los datos analizados, y denotan la dispersión de los datos en los grupos de animales control y enucleados.

**Cuadro 6. Valores de  $\tau_d$  y área bajo la curva de las transitorias de  $Ca^{2+}$ .** Se muestran los promedios y error estándar de  $\tau_d$  y área bajo la curva de las transitorias de  $Ca^{2+}$  intracelular de los grupos control y enucleados en los tres primeros días postnatales.

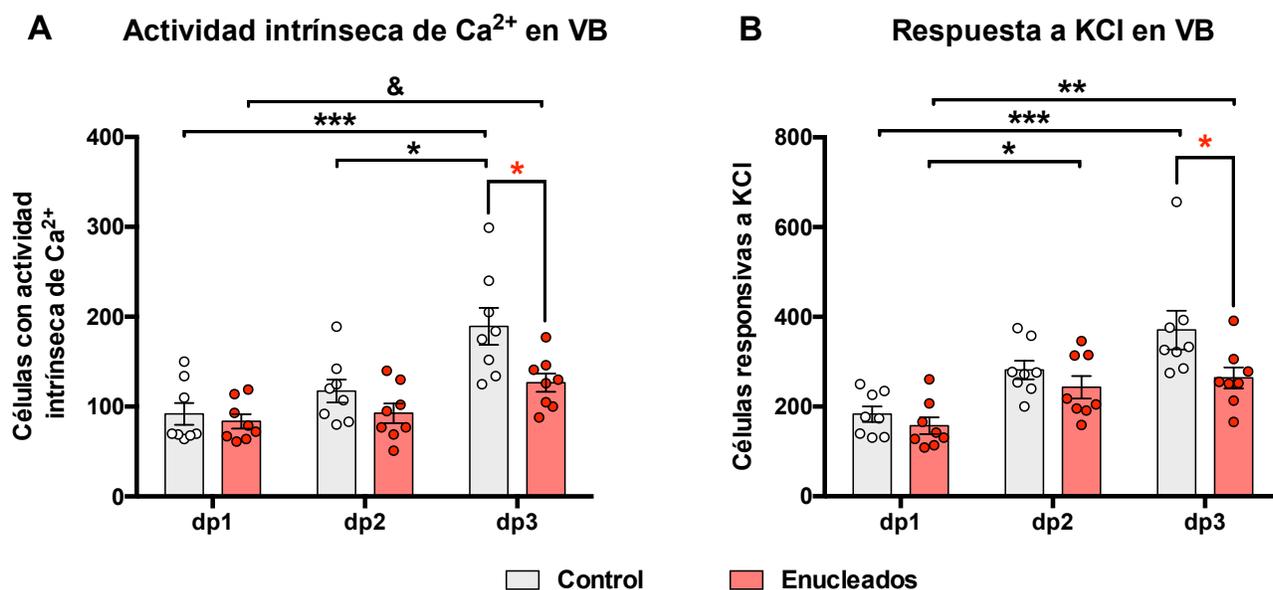
Edad	Condición	$\tau_d$ (ms)	Área bajo la curva
dp1	C	51.94± 12.50	7.60± 4.40
	E	63.19± 34.75	9.36± 4.10
dp2	C	62.75± 17.32	6.98± 3.15
	E	68.98± 45.88	6.50± 3.29
dp3	C	36.40± 9.19	3.60± 1.15
	E	47.32± 16.79	5.18± 1.69

***El número de neuronas que exhiben actividad intrínseca (transitorias de  $[Ca^{2+}]_i$ ) en el VB disminuyó en las ratas enucleadas al nacimiento.***

Los resultados obtenidos a partir del conteo de las células en el área del núcleo VB tanto de rebanadas provenientes de cerebros de crías control como enucleadas al nacimiento, muestran que en general el número de neuronas que exhibieron transitorias de  $Ca^{2+}$  intracelular incrementa con la edad en ambos grupos de crías durante el dp1, el dp2 y el dp3. No obstante, el incremento referido, en las crías enucleadas se observó consistentemente un número menor de neuronas intrínsecamente activas en el VB, que en las crías control a las edades estudiadas (Figura 13-A y Cuadro 7). La comparación entre grupos mostró que un decremento significativo de la actividad intrínseca entre los grupos al dp3. La comparación entre edades indicó que el número de células con actividad intrínseca incrementó significativamente en el VB es entre las edades del dp1 vs el dp3 y entre el dp2 vs el dp3 en las crías control, mientras que en las crías enucleadas hubo un incremento significativo entre el dp1 vs el dp3 (Figura 13-A).

Como se mencionó en los métodos, la despolarización con alto potasio permite evaluar la viabilidad de la rebanada hacia el final de los experimentos, además, de permitir estimar el número de neuronas que muestran actividad intrínseca. Así, y con base en el conteo celular de la respuesta a KCl en el núcleo VB se observó que en ambos grupos hay incrementos de la respuesta a KCl con referencia a las que exhibieron actividad intrínseca – transitorias de  $Ca^{2+}$  intracelular – durante el periodo de registro. A

pesar del incremento de la respuesta a KCl, se observó consistentemente un número menor de neuronas responsivas a KCl de las células del VB en las crías enucleadas, en comparación con las crías control a las edades analizadas (Figura 13-B y Cuadro 7). El análisis entre grupos indicó que sólo hay diferencias significativas al dp3 (Figura 13-B); mientras que, el análisis de la comparación entre edades mostró que los incrementos fueron significativos para las crías control entre las edades al dp1 vs el dp3, y para las crías enucleadas fueron entre el dp1 vs el dp2 y entre el dp1 vs el dp3 (Figura 13-B).



**Figura 13. Actividad intrínseca de Ca<sup>2+</sup> y respuesta celular a KCl en el núcleo VB al dp1, dp2 y dp3.** A. Análisis de las células con actividad intrínseca de Ca<sup>2+</sup> intracelular. El análisis inter-poblacional mostró diferencias significativas entre controles y enucleados en el dp3 de p<0.0163 indicado por \*. A su vez, el análisis por edades en el grupo de control mostró diferencias significativas entre el dp1 vs el dp3 de p<0.0007 y el dp2 vs el dp3 de p<0.0102 indicadas por \*\*\* y \* respectivamente; mientras que en el grupo de ratas enucleadas hubo diferencias significativas entre el dp1 vs el dp3 de p<0.0136 indicado por &. B. Análisis cuantitativo de las células responsivas a KCl. El análisis inter-poblacional mostró diferencias significativas entre controles y enucleados en el dp3 de p<0.0148 indicado por \*. El análisis por edad indicó diferencias en el grupo control entre el dp1 vs el dp3 de p<0.0005 indicado por \*\*\*, mientras que el análisis por edades en el grupo de enucleados mostró diferencias significativas entre el dp1 vs y el dp2 de p<0.0345 y el dp1 vs el dp3 de p<0.0080 indicadas por \* y \*\* respectivamente. Los círculos blancos y rojos son los promedios de los datos analizados, y denotan la dispersión de los datos en los grupos de ratas control y enucleadas.

La relación porcentual entre células con actividad intrínseca de Ca<sup>2+</sup> en el VB de crías control y crías enucleadas al nacimiento, muestra, tomando como referencia a la actividad intrínseca de Ca<sup>2+</sup> de las crías control, que en las ratas enucleadas las células con actividad intrínseca de Ca<sup>2+</sup> van disminuyendo a lo largo de los días analizados. Así, en este grupo la diferencia porcentual de células con actividad intrínseca Ca<sup>2+</sup> muestra la disminución en el dp1 en un 9%, en el dp2 de un 21% y en el dp3 del 33%,

con relación a los grupos de crías control (Cuadro 7, ver relación porcentual de células con actividad intrínseca). De manera semejante, la relación porcentual entre células responsivas a KCl en el VB de crías control y crías enucleadas al nacimiento, tomando como referencia la respuesta a KCl de las células del VB de las crías control, mostró la disminución de la respuesta a KCl en las células de las ratas enucleadas. La diferencia porcentual relacionada al decremento fue del 15% en el dp1, 16 en el dp2 y del 29% al dp3, con relación a los grupos de crías control (Cuadro 7, ver relación porcentual de células responsivas a KCl).

Ahora bien, la relación porcentual entre las células responsivas a KCl y las células con actividad intrínseca de  $Ca^{2+}$  intracelular del mismo grupo (por ejemplo: la relación porcentual de 735/1465 de las crías control en el dp1), indicó que tanto para las crías control como aquellas enucleadas al nacimiento, la actividad intrínseca de las células del VB con relación a la respuesta a KCl fue del 50% en el dp1 y el dp3 para ambos grupos, mientras que para el dp2 esta relación no se mantuvo. No obstante, la proporción de células con actividad intrínseca en el VB para ambos grupos a lo largo de los días analizados, en términos generales oscilo al rededor de la mitad de las células que exhibieron actividad intrínseca, con relación a las células que respondieron a KCl (Cuadro 7, ver relación porcentual entre células responsivas a KCl / células con actividad intrínseca).

**Cuadro 7.** Número y relación porcentual de las células del núcleo VB con actividad intrínseca de  $Ca^{2+}$  y de células que respondieron a KCl en el dp1, dp2 y dp3 en ratas control y enucleadas.

<b>Número de células con actividad intrínseca de <math>Ca^{2+}</math> en el núcleo VB</b>						
<b>Edad</b>	<b>dp1</b>		<b>dp2</b>		<b>dp3</b>	
<b>Condición</b>	<b>C</b>	<b>E</b>	<b>C</b>	<b>E</b>	<b>C</b>	<b>E</b>
<b># células con actividad intrínseca</b>	735	669	938	741	1514	1013
<b>relación % de células con actividad intrínseca</b>	<b>91%</b>		<b>79%</b>		<b>67%</b>	
<b># células responsivas a KCl</b>	1465	1258	2252	1944	2966	2112
<b>relación % de células responsivas a KCl</b>	<b>85%</b>		<b>86%</b>		<b>71%</b>	
<b>relación % entre células responsivas a KCl / células con actividad intrínseca</b>	<b>50%</b>	<b>50%</b>	<b>41%</b>	<b>38%</b>	<b>51%</b>	<b>48%</b>

## Discusión

Como se mencionó, la pérdida de la visión en estadios tempranos del desarrollo genera la expansión de la SI (Bronchiti et al., 1992; Rauschecker et al., 1992; Zheng y Purves, 1995). Aunque los mecanismos de este proceso aún so poco claros, se ha propuesto que la expansión de la SI resulta del incremento de la actividad neuronal generada por la estimulación sensorial durante el desarrollo postnatal (Rauschecker et al., 1992; Zheng y Purves, 1995). No obstante, se ha demostrado que la expansión de esta área cortical resulta de incrementos en la tasa de crecimiento y la ramificación de las ATCs que se proyectan desde el núcleo VB en ratas cegadas al nacimiento, independientemente de incrementos en los niveles de la actividad provocada por la estimulación sensorial (Fetter-Pruneda et al., 2013). En relación con lo anterior, y debido a que la dinámica de las transitorias de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular – expresada en “códigos” de amplitud y frecuencia – (Toescu y Verkhratsky, 1998), es fundamental en la modulación de los procesos que participan en la proyección y establecimiento de la conectividad axonal durante el desarrollo (Ackman et al., 2012; Mire et al., 2012), en este proyecto se exploró si en las células del núcleo VB – cuyos axones se proyectan a la capa IV de la SI – la dinámica de las transitorias de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular, particularmente en sus parámetros de frecuencia y amplitud, se modificó como consecuencia de la enucleación postnatal durante el periodo de la especificación del PMBSF.

Los resultados del análisis de la amplitud de las transitorias de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular, muestran que la amplitud de las transitorias de  $\text{Ca}^{2+}$  tienden consistentemente a ser elevadas, particularmente en el dp1, en las neuronas del núcleo VB de las ratas cegadas al nacimiento, al compararlas con los resultados de las ratas controles entre el dp1 y el dp3. Con relación a esto, es conveniente mencionar que Mire y colaboradores (2012) reportaron que, en las células talámicas del núcleo somatosensorial en estadios embrionarios, la amplitud de las transitorias de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular incrementó a través de los estadios de desarrollo analizados. A pesar de que en el estudio mencionado anteriormente no se estableció la relación entre los incrementos en la amplitud de las transitorias de  $\text{Ca}^{2+}$  y el crecimiento de ATCs somatosensoriales que se proyectan hacia la corteza, en otros estudios se ha reportado que los incrementos en las concentraciones de  $\text{Ca}^{2+}$  citoplasmático, ya sea a nivel del soma o sus proyecciones, activan vías específicas de procesos intracelulares relacionados a segundos mensajeros (Tonelli et al., 2012). En estos estudios se ha observado que las variaciones de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular asociadas a la amplitud de las transitorias de  $\text{Ca}^{2+}$  promueven la plasticidad neuronal (Gasperini et al., 2017) al modular

procesos transcripcionales como *NFTA* o *netrin-1* (Wen et al., 2004; Tang y Kalil, 2005; Moore y Goldberg, 2011), que modifican el comportamiento del crecimiento axonal y su segregación dependiendo de los gradientes de las  $[Ca^{2+}]_i$  locales (Zheng 2000; Tang et al., 2003; Gomez y Zheng, 2006; Ooashi et al., 2005; Tojiima et al., 2007). Con respecto a lo anterior, y considerando los antecedentes antes mencionados, es posible que el incremento sostenido de la actividad de  $Ca^{2+}$  intracelular expresada en la amplitud de las transitorias de  $Ca^{2+}$  a través de los estadios postnatales observado en las neuronas del núcleo VB de las crías cegadas al nacimiento, en comparación con lo observado en las crías de ratas control, pudiese fomentar el sobre-crecimiento de las ATCs talámicas, al modificar procesos relacionados con la temporalidad de su crecimiento, y participar así en la expansión de los barriles de la SI durante su especificación neuroanatómica. Estudios subsecuentes enfocados a modular la amplitud de las espigas de calcio *in vivo* nos permitirían evaluar esta hipótesis.

Por otra parte, y con relación a los resultados de la amplitud de las transitorias de  $Ca^{2+}$  intracelular, es de notar que si bien los valores de la amplitud de las transitorias de  $Ca^{2+}$  intracelular en las células del VB en las ratas enucleadas se mantiene por encima de los valores de las ratas control – particularmente al dp1 –, esta decae al nivel de lo observado en el dp2 y el dp3 de las crías control. Este incremento en el dp1 y posterior decremento en el dp2 y el dp3, sugiere que en las células del VB de ratas enucleadas hay modificaciones en la regulación de las  $[Ca^{2+}]_i$  debidas a la enucleación expresadas en los incrementos de la amplitud de las transitorias de  $Ca^{2+}$ , y una posterior regulación negativa de las  $[Ca^{2+}]_i$  (véase Figura 9). En concordancia con este proyecto y contextualizando estas observaciones, se sabe que durante el desarrollo de los circuitos neuronales, tanto las variaciones que se generan en los elementos estructurales de las neuronas (tipos de canales iónicos, o generación y eliminación de botones sinápticos) como los cambios que emergen de la conformación estructural de los circuitos neuronales (formación de sinapsis o la modulación entre distintos tipos de células neuronales), generan la inestabilidad en los niveles de actividad eléctrica neuronal (Turrigiano 1999). No obstante, y debido a que la inestabilidad de la actividad eléctrica puede generar un estado excito-toxico, posteriormente a la detección de los incrementos o decrementos sostenidos de la actividad eléctrica (Tien y Kerschensteiner, 2018) por medio de los canales calcio dependientes de voltaje (CCDV) (Frank 2014), se da la activación de procesos de plasticidad neuronal relacionados tanto a las propiedades eléctricas intrínsecas de las neuronas como al grado de conectividad sináptica de manera autónoma en los

circuitos neuronales, que en conjunto generan ajustes homeostáticos que restablecen la excitabilidad neuronal a umbrales neurofisiológicos estables (Turrigiano 1999; Turrigiano y Nesol, 2000).

Ahora bien, aunque aún no claro cómo se dan los procesos de plasticidad homeostática, se sabe que entre la transición de un estado estable a un inestable y viceversa, hay modificaciones en la liberación de neurotransmisores pre-sinápticos, la expresión de receptores de neurotransmisores, la densidad de canales iónicos, la conductancia de las neuronas, la densidad sináptica, y modificaciones en el balance entre la excitación e inhibición (Turrigiano 2012; Frank 2014; Yin y Yuan, 2015). Por ejemplo, cuando la tasa de disparo de una neurona es baja, las  $[Ca^{2+}]_i$  disminuyen y las conductancias se modifican incrementando la tasa de generación de potenciales. De manera inversa, cuando la actividad en la tasa de disparo es alta, las  $[Ca^{2+}]_i$  incrementan y las conductancias se modifican para disminuir la tasa de disparo neuronal, generando un proceso de escalamiento sináptico y por lo tanto de regulación homeostática con base en la tasa de disparo neuronal (Turrigiano 1999). En particular, en estudios en la corteza visual primaria se han reportado procesos de escalamiento sináptico en neuronas piramidales posterior a la privación visual, en las cuales, hay un incremento multiplicativo en la amplitud de las corrientes miniatura excitatorias post-sinápticas (mEPSC); mientras que durante el desarrollo normal, hay una disminución de la amplitud de las corrientes miniatura excitatorias post-sinápticas, en la medida en que incrementa tanto el número de sinapsis como la frecuencia de las corrientes miniatura excitatorias. Caso similar es el que se ha reportado en la corteza somatosensorial primaria posterior a la privación sensorial relacionada a las vibrisas, en donde las neuronas de la corteza de una columna cortical asociada a una vibrisa lesionada disminuyen su actividad, mientras que en las columnas corticales adyacentes la actividad neuronal incrementa paulatinamente (Gainey y Feldman, 2017).

Con base en lo anterior, los resultados reportados sugieren que la enucleación genera por efectos de la reorganización neuronal a nivel del tálamo visual, indirectamente cambios en la regulación de los circuitos del VB, implicando, probablemente cambios en la modulación de las  $[Ca^{2+}]_i$  debido a modificaciones en los mecanismos de la modulación del  $Ca^{2+}$  extracelular al alterar el tipo y la densidad de canales iónicos de  $Ca^{2+}$ , e intracelular, por ejemplo, por modificaciones a nivel del retículo endoplasmático o la generación de amortiguadores de  $Ca^{2+}$ . Desde luego que las modificaciones antes mencionadas, tiene que ser situadas en el contexto de la estructura de los circuitos neuronales relacionada a la interacción entre células inhibitorias y excitatorias. En conjunto, estas observaciones

podría estar indicando la activación de mecanismos de plasticidad homeostática posteriores a la fluctuación de las  $[Ca^{2+}]_i$  generada por efectos de la enucleación.

Con relación a la frecuencia de las transitorias de  $Ca^{2+}$  intracelular, recordemos que en las neuronas del VB de las crías enucleadas este parámetro fue consistentemente menor que el obtenido para las crías control entre el dp1 y el dp3. Estudios previos, han mostrado que el incremento en la frecuencia de las transitorias de  $Ca^{2+}$  intracelular en neuronas corticales en estadios postnatales se asocia tanto con el decremento de la tasa de crecimiento como la estasis del crecimiento del cono axonal, a la vez que promueve la ramificación axonal (Tang et al., 2003). Sin embargo, en otros estudios se ha observado la asociación contraria (Mattson y Kater, 1987; Lankford y Leoturneau, 1989; Gomez et al., 1995; Gomez y Spitzer, 1999; Tang et al., 2003), además, de que se pueden generar procesos de reorganización y segregación axonal paralelos, de tal manera, que en una misma ramificación axonal una proyección axonal puede aumentar su tasa de crecimiento con relación al incremento de la frecuencia de transitorias de  $Ca^{2+}$ , mientras que otra proyección axonal del mismo axón, a su vez puede detener su crecimiento si la frecuencia de actividad de  $Ca^{2+}$  intracelular disminuye (Hutchins y Kalil, 2008; Hutchins et al., 2011). Además, y en relación con los resultados obtenidos en este proyecto, se ha reportado que en células talámicas del núcleo VB en estadios embrionarios, la frecuencia de las transitorias espontáneas de  $Ca^{2+}$  disminuye en la medida en que los axones tálamo-corticales se extendían hacia la corteza (Mire et al., 2012). Así, en conjunto, los estudios mencionados anteriormente proveen un panorama en el cual las variaciones en la frecuencia de las transitorias de  $Ca^{2+}$  en neuronas puede promover paralelamente el crecimiento axonal y la reorganización de sus ramificaciones, en función tanto del contexto celular como de ventanas de tiempo del desarrollo definidos.

Con base en lo anterior, y en relación con nuestros resultados, podríamos comentar que es posible que el descenso sostenido de la frecuencia, aunado al incremento de los valores de la amplitud de las transitorias de  $Ca^{2+}$  observado en las neuronas del VB de las crías cegadas al nacimiento, al ser comparadas con los valores obtenidos para ratas control en los mismos estadios postnatales, pudiese contribuir al sobre-crecimiento y mayor elaboración de los árboles axónicos de las terminales de las ATCs y participar así, en la expansión de los barriles de la SI. En particular, los decrementos en la frecuencia de las transitorias de calcio podrían estar relacionados a dos procesos no excluyentes, siendo el primero una reducción de la tasa de crecimiento de los axones durante su inserción paulatina en las

zonas corticales en la medida en que estas se van diferenciando de la placa cortical, mientras que el segundo, promovería la construcción más elaborada de las terminales axónicas de las ATCs a nivel de capa IV en la SI, situación esta última documentada por Fetter-Pruneda y colaboradores (2013)..

Otro aspecto relacionado con la dinámica del  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular durante el desarrollo del sistema nervioso central, es aquel, en el cual las propiedades electrofisiológicas de las células van cambiando a lo largo de la madurez de las células y establecimiento de los circuitos neurales, debido al establecimiento de los diferentes tipos de canales iónicos (Spitzer N, 1991; Moody and Bosma, 2005). En particular, parámetros como la amplitud, el tiempo de decaimiento ( $\tau_d$ ) o la frecuencia de la actividad de los potenciales de acción (Bahrey y Moody, 2003; Oswald y Reyes, 2007; Ehrlich et al., 2012; Parker et al, 2009) y de las transitorias de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular (McCabe et al., 2006; Corlew et al, 2004; Lee et al, 2016), sirven como referentes neurofisiológicos para evaluar la madurez celular. Con relación a este proyecto, y como se menciona previamente, Fetter-Pruneda y colaboradores (2013) propusieron que los barriles del PMBSF se forman prematuramente en la SI de las crías cegadas el nacimiento. De acuerdo con esto, y con relación a los resultados de este proyecto, se sabe que la  $\tau_d$  disminuye paulatinamente conforme las neuronas maduran (Warren y Jones, 1997; Ehrlich et al., 2012; Lee et al., 2016), situación que observamos en nuestras series experimentales. Con respecto a la amplitud, se ha reportado que incrementos tanto en la amplitud de los potenciales de acción (Warren y Jones, 1997; Parker et al, 2009; Ehrlich et al, 2012) como en las transitorias de  $\text{Ca}^{2+}$ , este ultimo reportado en neuronas talámicas en estadios embrionarios (Mire et al., 2012), indican mayor madurez celular. Esta tendencia también se observo a lo largo de los estadios postnatales analizados de nuestras series experimentales. Por último, y con relación a la frecuencia de las transitorias de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular, se ha reportado que en la medida en que las neuronas van madurando la actividad de las transitorias de  $\text{Ca}^{2+}$  decrece (Corlew et al., 2004; McCabe et al., 2006; Mire et al., 2012), esta tendencia se documentó también en las series experimentales de este proyecto. Con base en esta información, los resultados de este proyecto parecen apoyar la idea de que, en las crías enucleadas al nacimiento las neuronas del núcleo VB maduran prematuramente.

Un hallazgo interesante del presente trabajo es que tanto el número de neuronas que muestran transitorias de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular como aquellas que respondieron a KCl, aumenta a través de los estadios postnatales en ambos grupos de crías. Sin embargo, el número de neuronas activas (que exhibieron

transitorias de relacionadas a las variaciones de las  $[Ca^{2+}]_i$  durante el registro) fue consistentemente menor en las crías cegadas al nacimiento a lo largo de los estadios postnatales analizados. Aunque la explicación para esta diferencia no es clara, parece que el decremento en el número de células en los grupos de animales enucleados reportado en este proyecto podría no deberse principalmente a afectaciones en los procesos de neurogénesis en el VB, esto, debido por una parte a que la neurogénesis y establecimiento de las células en este núcleo sucede entre los días embrionarios 14 y 15 (Altman y Bayer, 1989), con un periodo de decaimiento en los primeros días postnatales (entre el dp0 y el dp2) e incrementando posteriormente a partir del dp3 (Mooney y Miller, 2007), y por otra, que los cambios observados en las ratas enucleadas, están dentro de la primera fase de maduración de la estructura neuroanatómica del núcleo VB, periodo durante el cual se lleva a cabo el reclutamiento secuencial e integración de células resultantes de la neurogénesis (Mooney y Miller, 2007).

Una alternativa para explicar el decremento mencionado anteriormente en las ratas enucleadas es que debido al posible adelantamiento en la maduración del núcleo VB y del circuito tálamo-cortical somatosensorial, los procesos de madurez del núcleo VB asociados a la apoptosis (Schiebel et al., 1976) y el refinamiento de los circuitos neurales que inician al nacimiento (Waite et al., 1992), presenten un aceleramiento como resultado de la enucleación. En este sentido, es fundamental tomar en cuenta tanto a los procesos de reconfiguración de los núcleos talámicos visuales geniculado ventro-lateral (LGv) y el geniculado dorsal (LGd) (Tsang 1937; Karlen, y Krubitzer, 2008; Izraeli et al., 2002), como de la conectividad entre los núcleos talámicos VB y dLGN (Moreno-Juan et al., 2017) posteriores a la enucleación, de tal manera, que la pérdida de las aferentes visuales pudiera precipitar los procesos relacionados a la apoptosis en el VB generados por la reorganización a nivel subcortical.

Aunado a lo anterior, y no obstante el decremento paulatino en el número de células en las ratas enucleadas es necesario hacer notar que los resultados de la relación porcentual entre las células con actividad intrínseca de  $Ca^{2+}$  intracelular y las células responsivas a KCl, indican que las células con actividad intrínseca en el VB oscilo alrededor del 50% tanto para ratas control como enucleadas a lo largo de los días analizados. En este sentido, es fundamental tener en cuenta que las células resultantes de la neurogénesis que *per se* sucede en el VB se van integrando y madurando en sus cualidades fenotípicas y funcionales (Mooney y Miller, 2007), a la vez que hay un decremento en la densidad de neuronas debido a procesos apoptóticos durante la primera semana postnatal (Waite et al., 1992;

Zantua et al.,1996), los cuales son fundamentales durante el desarrollo del sistema nervioso al promover la transición de grupos neurales inmaduros a un estado maduro debido a la eliminación de neuronas, atrofitos y algunas de sus conexiones (Oppenheim 1991; Dekkers et al., 2013; Kole et al., 2013). En el contexto de los procesos neuronales del desarrollo ya mencionados, esto parece sugerir, que a pesar de los efectos que pudiese tener la enucleación sobre la restructuración neuroanatómica del núcleo VB en los estadios postnatales del desarrollo por efectos de la apoptosis, también habría un componente plástico relacionado a la estabilidad estructural neuroanatómica. Este componente plástico implicaría un equilibrio entre los procesos apoptóticos y el reclutamiento de grupos neuronales, manteniendo así, de un mínimo de células involucradas en la conectividad de los circuitos neuronales necesarios para las cualidades funcionales del núcleo VB. Desde luego, las hipótesis planteadas de estas observaciones tendrán que ser evaluadas con métodos para establecer índices de muerte celular y configuración neuroanatómica del núcleo VB

## Conclusiones

Con base en los resultados de este proyecto se puede concluir que:

- La enucleación en estadios postnatales genera cambios en los parámetros de la dinámica de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular en las células del núcleo ventro-basal talámico.
- Con base en el contexto de este proyecto, el aumento en la amplitud y el decremento de la frecuencia de las transitorias de  $\text{Ca}^{2+}$  en las células del VB en los animales enucleados, sugiere que los cambios en la dinámica de las  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  están relacionadas a las modificaciones en la tasa de crecimiento de los axones tálamo-corticales somatosensoriales.
- Los cambios en los parámetros de las transitorias de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular, es su conjunto, sugieren un adelantamiento en la madurez de las células talámicas del VB en las ratas enucleadas.
- El decremento en el número de células de VB en ratas cegadas al nacimiento podría estar indicando un adelantamiento en la estructura talámica del núcleo ventro-basal debido a cambios en los procesos apoptóticos y la reorganización a nivel subcortical.

Desde una perspectiva integral, los resultados de este proyecto tendrían que ser considerados desde la posible relación entre la reconfiguración estructurales de los circuitos neuronales en el VB y las variaciones neurofisiológicas asociadas a las  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  en un contexto de los procesos relacionados a la plasticidad homeostática en el VB posterior a la enucleación, los cuales, paralelamente estarían relacionados con los procesos neuronales asociados a la temporalidad del crecimiento y la ramificación de las aferentes tálamo-corticales que se proyectan desde el núcleo ventro-basal talámico.

## Anexo

### Dinámica del calcio intracelular

Los efectos que las transitorias de la  $[Ca^{2+}]_i$  ejercen sobre el ensamblaje y desarrollo de los circuitos neuronales están asociados con la generación de “códigos” electroquímicos intracelulares y su modulación (Shatz 1990; Katz y Shatz, 1996; Yuste 1997; Crair 1999; McCormick 1999; Spitzer 2006). Estos procesos son en parte el resultado de la versatilidad en la dinámica de  $[Ca^{2+}]_i$  y su regulación a nivel neuronal, la cual genera fluctuaciones en las concentraciones de  $[Ca^{2+}]_i$  que van de entre ~50-100nM en un estado de “reposo” a incrementos de ~500-1000nM como el resultado tanto de la entrada de calcio a través de los canales iónicos, como por la liberación de calcio de los compartimientos intracelulares. Estas fluctuaciones se ven reflejadas en la generación de transitorias u oscilaciones de calcio intracelular, y se pueden entender como un proceso en dos fases: de incremento y decremento de  $[Ca^{2+}]_i$  (Berridge 1998; Berridge et al., 2000; Uhlén y Fritz, 2010; Jones y Smith, 2016).

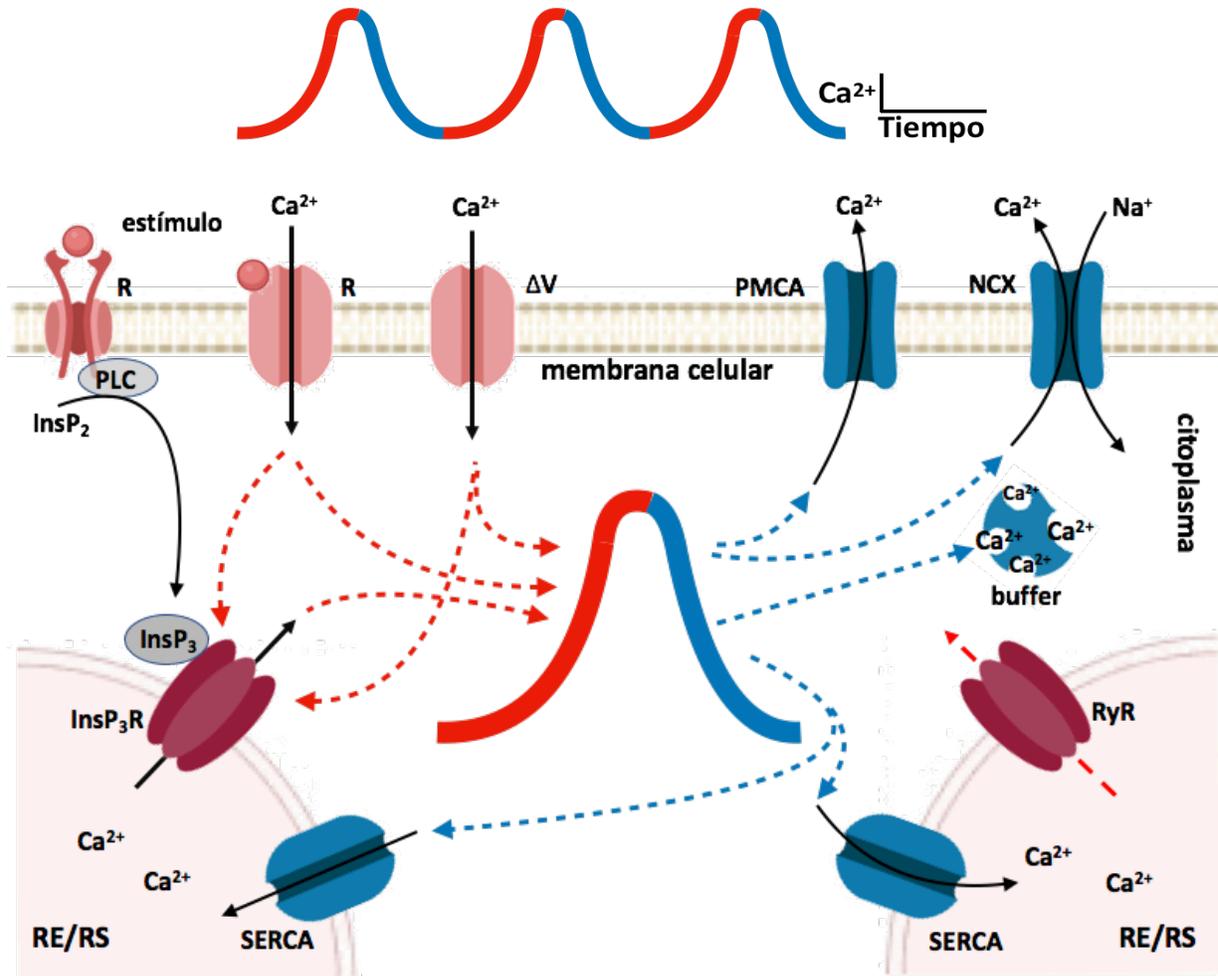
La fase de incremento (ver Figura 14, procesos celulares señalados en rojo) de  $Ca^{2+}$  intracelular se puede dividir en dos procesos, uno a nivel de membrana plasmática, el cual comienza cuando un estímulo (cambios en el potencial de membrana, interacciones célula-célula o activación de proteínas de membrana por ligando) a nivel de membrana celular genera la activación y apertura de canales de  $Ca^{2+}$  voltaje-dependientes (VOC's), canales ionotrópicos asociados a la regulación de  $Ca^{2+}$  dependientes de ligando (ROC's) como los AMPA y NMDA activados por glutamato, así como los P2X activados por ATP; en este proceso también participan canales metabotrópicos relacionados a la regulación de  $Ca^{2+}$ , los P2Y activados por ATP, los receptores muscarínicos (mAChR) y de glutamato (mGluR5), y los de receptores acoplados a tirosina-quinasa (RTKs) (Berridge et al., 2000; Uhlén y Fritz, 2010).

El segundo proceso dentro de la fase oscilatoria inicial se encuentra asociado a nivel de la membrana del retículo endoplasmático, el cual contribuye al incremento de calcio citoplasmático por medio de la apertura de canales altamente permeables a calcio asociados a receptores de rianodina (RyR) e Inositol 1,4,5-trifosfato (InsP<sub>3</sub>R), ambos acoplados a mecanismos sensores de calcio intracelular (SOC's) (Berridge et al., 2000; Uhlén y Fritz, 2010; Leybaert y Sanderson, 2012). En el caso de los receptores de rianodina, si bien se sabe que la ADP-ribosa cíclica también genera la apertura de estos canales, la

activación se lleva a cabo fundamentalmente por la unión de los iones calcio a los receptores de rianodina, ya sea por el calcio liberado del retículo endoplasmático por medio de otros canales asociados a RYR o  $\text{InsP}_3\text{R}$  (Berridge 1998), o por el calcio que entra al citoplasma por la apertura de canales a nivel de membrana celular. Por otra parte, la activación de los receptores de  $\text{InsP}_3$  se lleva a cabo cuando un ligando se une a los receptores metabotrópicos como los P2YR, mAChR, mGluR5 o RTKs a nivel de membrana celular. Este proceso activa a la fosfolipasa C (PLC), la cual cataliza la hidrólisis de fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato ( $\text{PIP}_2$ ) para producir  $\text{InsP}_3$  y diacilglicerol. Posteriormente el  $\text{InsP}_3$  se une a sus receptores acoplados a los canales en la membrana del retículo endoplasmático, causando el cambio conformacional del canal y permitiendo el flujo de  $\text{Ca}^{2+}$  hacia el citoplasma (Uhlén y Fritz, 2010; Leybaert y Sanderson, 2012). Es importante resaltar que estos receptores intracelulares son fundamentales en la dinámica y la temporalidad de los patrones de las señales neuronales de calcio intracelular, tanto por su participación en la integración de la información generada en el citoplasma y el lumen, como por ser parte del proceso de regeneración a través del proceso de liberación de calcio por inducción de calcio (CICR), responsable de la amplificación de las señales de  $\text{Ca}^{2+}$  generadas a nivel extracelular y la generación de ondas de  $\text{Ca}^{2+}$  (Berridge 1998).

En la medida en que incrementan las concentraciones de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular, se van activando los mecanismos asociados a la segunda fase, en la cual participan proteínas censorsas y amortiguadoras que se acoplan al  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular (CaBPs), como la calmodulina (CaM), calneurina, sensor neuronal de  $\text{Ca}^{2+}$  (NCS), la parvalbumina (PV), la calbindina (CB) y calretinina (CR), localizadas principalmente en el lumen del retículo endoplasmático (también se localizan en el aparato de Golgi, mitocondrias, peroxisomas y compartimientos endo-lisomales) y el citoplasma celular. Su activación es parte de los procesos bioquímicos traslapados entre la fase de incremento/decremento que participan en la modulación del  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular. En este contexto, se considera que la fase de decremento (ver Figura 14, procesos celulares señalados en azul) comienza estrictamente con la activación de las  $\text{Ca}^{2+}$ -ATP-etas (PMCA's) y los intercambiadores  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  (NCX) que a nivel de membrana plasmática eliminan calcio dependiendo de los gradientes de concentración. Mientras que, a nivel intracelular, tanto los intercambiadores  $\text{Ca}^{2+}$ -ATP-etas del retículo endoplasmático (SERCA) que introducen el calcio del citoplasma al lumen del retículo, como los transportadores uniporter en las membranas mitocondriales contribuyen a la recaptura de calcio. Si bien estos mecanismos de bombas se activan a diferentes concentraciones de calcio citoplasmático y tienen tasas de intercambio particulares para este ion, en conjunto estos

mecanismos y procesos caracterizan a la fase de decremento, y por lo tanto están relacionados a la homeostasis de calcio intracelular (Uhlén y Fritz, 2010; Schawaller 2012).



**Figura 14. Procesos involucrados en la generación de las transitorias de  $Ca^{2+}$  intracelular.** Las oscilaciones o transitorias de  $Ca^{2+}$  intracelulares son generadas mediante procesos celulares que una vez activados modulan el incremento (procesos en rojo) y decremento (procesos en azul) de las concentraciones del  $Ca^{2+}$  en el citoplasma celular. Tomado y modificado de Uhlén y Fritz, 2010.

## Bibliografia

- Ackman, J. B., Burbridge, T. J., & Crair, M. C. (2012). Retinal waves coordinate patterned activity throughout the developing visual system. *Nature*, *490*(7419), 219.
- Agmon, A., & Connors, B. W. (1991). Thalamocortical responses of mouse somatosensory (barrel) cortex in vitro. *Neuroscience*, *41*(2-3), 365-379.
- Altman, J., & Bayer, S. A. (1989). Development of the rat thalamus: IV. The intermediate lobule of the thalamic neuroepithelium, and the time and site of origin and settling pattern of neurons of the ventral nuclear complex. *Journal of Comparative Neurology*, *284*(4), 534-566.
- Antonini, A., & Stryker, M. P. (1993). Rapid remodeling of axonal arbors in the visual cortex. *Science*, *260*(5115), 1819-1821.
- Bahrey, H. L. P., & Moody, W. J. (2003). Early development of voltage-gated ion currents and firing properties in neurons of the mouse cerebral cortex. *Journal of neurophysiology*.
- Bavelier, D., & Neville, H. J. (2002). Cross-modal plasticity: where and how?. *Nature Reviews Neuroscience*, *3*(6), 443.
- Benowitz, L. I., & Routtenberg, A. (1997). GAP-43: an intrinsic determinant of neuronal development and plasticity. *Trends in neurosciences*, *20*(2), 84-91.
- Berridge, M. J. (1998). Neuronal calcium signaling. *Neuron*, *21*(1), 13-26.
- Berridge, M. J. (2016). The inositol trisphosphate/calcium signaling pathway in health and disease. *Physiological reviews*, *96*(4), 1261-1296.
- Berridge, M. J., Lipp, P., & Bootman, M. D. (2000). The versatility and universality of calcium signalling. *Nature reviews Molecular cell biology*, *1*(1), 11.
- Bito, H., Deisseroth, K., & Tsien, R. W. (1997). Ca<sup>2+</sup>-dependent regulation in neuronal gene expression. *Current opinion in neurobiology*, *7*(3), 419-429.
- Blankenship, A. G., & Feller, M. B. (2010). Mechanisms underlying spontaneous patterned activity in developing neural circuits. *Nature Reviews Neuroscience*, *11*(1), 18.
- Boylan, C. B., Kesterson, K. L., Bennett-Clarke, C. A., Chiaia, N. L., & Rhoades, R. W. (2001). Neither peripheral nerve input nor cortical NMDA receptor activity are necessary for recovery of a disrupted barrel pattern in rat somatosensory cortex. *Developmental Brain Research*, *129*(1), 95-106.
- Bronchti G, Schöenberger N, Welker E, Van der Loos H. (1992). Barreldfield expansion after neonatal eye removal in mice. *Neuroreport*. *3*(6):489-92.

- Buonomano, D. V., & Merzenich, M. M. (1998). Cortical plasticity: from synapses to maps. *Annual review of neuroscience*, 21(1), 149-186.
- Cang, J., Rentería, R. C., Kaneko, M., Liu, X., Copenhagen, D. R., & Stryker, M. P. (2005). Development of precise maps in visual cortex requires patterned spontaneous activity in the retina. *Neuron*, 48(5), 797-809.
- Castillo-Paterna, M., Moreno-Juan, V., Filipchuk, A., Rodríguez-Malmierca, L., Susín, R., & López-Bendito, G. (2015). DCC functions as an accelerator of thalamocortical axonal growth downstream of spontaneous thalamic activity. *EMBO reports*, 16(7), 851-862.
- Catalano, S. M., Robertson, R. T., & Killackey, H. P. (1995). Rapid alteration of thalamocortical axon morphology follows peripheral damage in the neonatal rat. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 92(7), 2549-2552.
- Catalano, S. M., Robertson, R. T., & Killackey, H. P. (1996). Individual axon morphology and thalamocortical topography in developing rat somatosensory cortex. *Journal of Comparative Neurology*, 367(1), 36-53.
- Chapin, J. K., & Lin, C. S. (1984). Mapping the body representation in the SI cortex of anesthetized and awake rats. *Journal of Comparative Neurology*, 229(2), 199-213.
- Chiaia, N. L., Fish, S. E., Bauer, W. R., Bennett-Clarke, C. A., & Rhoades, R. W. (1992). Postnatal blockade of cortical activity by tetrodotoxin does not disrupt the formation of vibrissa-related patterns in the rat's somatosensory cortex. *Developmental brain research*, 66(2), 244-250.
- Corlew, R., Bosma, M. M., & Moody, W. J. (2004). Spontaneous, synchronous electrical activity in neonatal mouse cortical neurones. *The Journal of physiology*, 560(2), 377-390.
- Corner, M. A., & Ramakers, G. J. A. (1992). Spontaneous firing as an epigenetic factor in brain development—physiological consequences of chronic tetrodotoxin and picrotoxin exposure on cultured rat neocortex neurons. *Developmental brain research*, 65(1), 57-64.
- Crair, M. C. (1999). Neuronal activity during development: permissive or instructive?. *Current opinion in neurobiology*, 9(1), 88-93.
- Dawson, D. R., & Killackey, H. P. (1985). Distinguishing topography and somatotopy in the thalamocortical projections of the developing rat. *Developmental Brain Research*, 17(1-2), 309-313.
- Dekkers, M. P., Nikolettou, V., & Barde, Y. A. (2013). Death of developing neurons: New insights and implications for connectivity. *J Cell Biol*, 203(3), 385-393.
- Dunn-Meynell, A. A., Benowitz, L. I., & Levin, B. E. (1992). Vibrissotomy induced changes in GAP-43 immunoreactivity in the adult rat barrel cortex. *Journal of Comparative Neurology*, 315(2), 160-170.

- Ehrlich, D. E., Ryan, S. J., & Rainnie, D. G. (2012). Postnatal development of electrophysiological properties of principal neurons in the rat basolateral amygdala. *The Journal of physiology*, *590*(19), 4819-4838.
- Emmenegger, V., Qi, G., Wang, H., & Feldmeyer, D. (2018). Morphological and Functional Characterization of Non-fast-Spiking GABAergic Interneurons in Layer 4 Microcircuitry of Rat Barrel Cortex. *Cerebral Cortex*, *28*(4), 1439-1457.
- Erzurumlu, R. S., & Gaspar, P. (2012). Development and critical period plasticity of the barrel cortex. *European Journal of Neuroscience*, *35*(10), 1540-1553.
- Feller, M. B., & Scanziani, M. (2005). A precritical period for plasticity in visual cortex. *Current opinion in neurobiology*, *15*(1), 94-100.
- Fetter-Pruneda, I., Geovannini-Acuña, H., Santiago, C., Ibarrarán-Viniegra, A. S., Martínez-Martínez, E., Sandoval-Velasco, M., Uribe-Figueroa, L., Padilla-Cortés, P., Mercado-Célis, G., & Gutiérrez-Ospina, G. (2013). 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.
- Fox, K., Schlaggar, B. L., Glazewski, S., & O'leary, D. D. (1996). Glutamate receptor blockade at cortical synapses disrupts development of thalamocortical and columnar organization in somatosensory cortex. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *93*(11), 5584-5589.
- Frank, C. A. (2014). How voltage-gated calcium channels gate forms of homeostatic synaptic plasticity. *Frontiers in cellular neuroscience*, *8*, 40.
- Gainey, M. A., & Feldman, D. E. (2017). Multiple shared mechanisms for homeostatic plasticity in rodent somatosensory and visual cortex. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, *372*(1715), 20160157.
- Garel, S., & Lopez-Bendito, G. (2014). Inputs from the thalamocortical system on axon pathfinding mechanisms. *Current opinion in neurobiology*, *27*, 143-150.
- Gasperini, R. J., Pavez, M., Thompson, A. C., Mitchell, C. B., Hardy, H., Young, K. M., Chilton, J. K & Foa, L. (2017). How does calcium interact with the cytoskeleton to regulate growth cone motility during axon pathfinding? *Molecular and Cellular Neuroscience*, *84*, 29-35.
- Gezelius, H., & López-Bendito, G. (2017). Thalamic neuronal specification and early circuit formation. *Developmental neurobiology*, *77*(7), 830-843.
- Giaume, C., Maravall, M., Welker, E., & Bonvento, G. (2009). The barrel cortex as a model to study dynamic neuroglial interaction. *The Neuroscientist*, *15*(4), 351-366.
- Gobel, W., & Helmchen, F. (2007). In vivo calcium imaging of neural network function. *Physiology*, *22*(6), 358-365.

- Gomez, T. M., & Spitzer, N. C. (1999). In vivo regulation of axon extension and pathfinding by growth-cone calcium transients. *Nature*, 397(6717), 350.
- Gomez, T. M., & Zheng, J. Q. (2006). The molecular basis for calcium-dependent axon pathfinding. *Nature Reviews Neuroscience*, 7(2), 115.
- Gomez, T. M., Snow, D. M., & Letourneau, P. C. (1995). Characterization of spontaneous calcium transients in nerve growth cones and their effect on growth cone migration. *Neuron*, 14(6), 1233-1246.
- Gu, X., & Spitzer, N. C. (1995). Distinct aspects of neuronal differentiation encoded by frequency of spontaneous Ca<sup>2+</sup> transients. *Nature*, 375(6534), 784.
- Hamilton, R. H., & Pascual-Leone, A. (1998). Cortical plasticity associated with Braille learning. *Trends in cognitive sciences*, 2(5), 168-174.
- Harris, W. A. (1984). Axonal pathfinding in the absence of normal pathways and impulse activity. *Journal of Neuroscience*, 4(4), 1153-1162.
- Hutchins, B. I., & Kalil, K. (2008). Differential outgrowth of axons and their branches is regulated by localized calcium transients. *Journal of Neuroscience*, 28(1), 143-153.
- Hutchins, B. I., Li, L., & Kalil, K. (2011). Wnt/calcium signaling mediates axon growth and guidance in the developing corpus callosum. *Developmental neurobiology*, 71(4), 269-283.
- Inan, M., & Crair, M. C. (2007). Development of cortical maps: perspectives from the barrel cortex. *The Neuroscientist*, 13(1), 49-61.
- Izraeli, R., Koay, G., Lamish, M., Heicklen-Klein, A. J., Heffner, H. E., Heffner, R. S., & Wollberg, Z. (2002). Cross-modal neuroplasticity in neonatally enucleated hamsters: structure, electrophysiology and behaviour. *European Journal of Neuroscience*, 15(4), 693-712.
- Jensen, K. F., & Killackey, H. P. (1987). Terminal arbors of axons projecting to the somatosensory cortex of the adult rat. II. The altered morphology of thalamocortical afferents following neonatal infraorbital nerve cut. *Journal of Neuroscience*, 7(11), 3544-3553.
- Jones, B. L., & Smith, S. M. (2016). Calcium-sensing receptor: a key target for extracellular calcium signaling in neurons. *Frontiers in Physiology*, 7, 116.
- Karlen, S. J., & Krubitzer, L. (2008). Effects of bilateral enucleation on the size of visual and nonvisual areas of the brain. *Cerebral Cortex*, 19(6), 1360-1371.
- Kater, S. B., & Mills, L. R. (1991). Regulation of growth cone behavior by calcium. *Journal of Neuroscience*, 11(4), 891-899.
- Katz, L. C., & Shatz, C. J. (1996). Synaptic activity and the construction of cortical circuits. *Science*, 274(5290), 1133-1138.

- Kerschensteiner, D. (2014). Spontaneous network activity and synaptic development. *The Neuroscientist*, 20(3), 272-290.
- Killackey, H. P., Rhoades, R. W., & Bennett-Clarke, C. A. (1995). The formation of a cortical somatotopic map. *Trends in neurosciences*, 18(9), 402-407.
- Koelbl, C., Helmstaedter, M., Lübke, J., & Feldmeyer, D. (2013). A barrel-related interneuron in layer 4 of rat somatosensory cortex with a high intrabarrel connectivity. *Cerebral cortex*, 25(3), 713-725.
- Kole, A. J., Annis, R. P., & Deshmukh, M. (2013). Mature neurons: equipped for survival. *Cell death & disease*, 4(6), e689.
- Kupers, R., Pietrini, P., Ricciardi, E., & Ptito, M. (2011). The nature of consciousness in the visually deprived brain. *Frontiers in Psychology*, 2, 19.
- Lankford, K. L., & Letourneau, P. C. (1989). Evidence that calcium may control neurite outgrowth by regulating the stability of actin filaments. *The Journal of Cell Biology*, 109(3), 1229-1243.
- Lankford, K. L., & Letourneau, P. C. (1991). Roles of actin filaments and three second-messenger systems in short-term regulation of chick dorsal root ganglion neurite outgrowth. *Cell motility and the cytoskeleton*, 20(1), 7-29.
- Leclerc, C., Moreau, M., & Néant, I. (2012). The calcium: an early signal that initiates the formation of the nervous system during embryogenesis. *Frontiers in molecular neuroscience*, 5, 64.
- Lee, K. F., Soares, C., Thivierge, J. P., & Béïque, J. C. (2016). Correlated synaptic inputs drive dendritic calcium amplification and cooperative plasticity during clustered synapse development. *Neuron*, 89(4), 784-799.
- Lee, L. J., Iwasato, T., Itohara, S., & Erzurumlu, R. S. (2005). Exuberant thalamocortical axon arborization in cortex-specific NMDAR1 knockout mice. *Journal of Comparative Neurology*, 485(4), 280-292.
- Leighton, A. H., & Lohmann, C. (2016). The wiring of developing sensory circuits—from patterned spontaneous activity to synaptic plasticity mechanisms. *Frontiers in neural circuits*, 10, 71.
- Leybaert, L., & Sanderson, M. J. (2012). Intercellular Ca<sup>2+</sup> waves: mechanisms and function. *Physiological reviews*, 92(3), 1359-1392.
- Li, H., & Crair, M. C. (2011). How do barrels form in somatosensory cortex?. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1225(1), 119-129.
- Lokmane, L., & Garel, S. (2014). Map transfer from the thalamus to the neocortex: inputs from the barrel field. In *Seminars in cell & developmental biology* (Vol. 35, pp. 147-155). Academic Press.
- López-Bendito, G., & Molnár, Z. (2003). Thalamocortical development: how are we going to get there?. *Nature Reviews Neuroscience*, 4(4), 276.

Lübke, J., & Feldmeyer, D. (2007). Excitatory signal flow and connectivity in a cortical column: focus on barrel cortex. *Brain Structure and Function*, 212(1), 3-17.

Lübke, J., Egger, V., Sakmann, B., & Feldmeyer, D. (2000). Columnar organization of dendrites and axons of single and synaptically coupled excitatory spiny neurons in layer 4 of the rat barrel cortex. *Journal of Neuroscience*, 20(14), 5300-5311.

Mao, B. Q., Hamzei-Sichani, F., Aronov, D., Froemke, R. C., & Yuste, R. (2001). Dynamics of spontaneous activity in neocortical slices. *Neuron*, 32(5), 883-898.

Mattson, M. P., & Kater, S. B. (1987). Calcium regulation of neurite elongation and growth cone motility. *Journal of Neuroscience*, 7(12), 4034-4043.

McCabe, A. K., Chisholm, S. L., Picken-Bahrey, H. L., & Moody, W. J. (2006). The self-regulating nature of spontaneous synchronized activity in developing mouse cortical neurones. *The Journal of physiology*, 577(1), 155-167.

McCormick, D. A. (1999). Spontaneous activity: signal or noise?. *Science*, 285(5427), 541-543.

McCormick, D. A., Shu, Y., Hasenstaub, A., Sanchez-Vives, M., Badoual, M., & Bal, T. (2003). Persistent cortical activity: mechanisms of generation and effects on neuronal excitability. *Cerebral Cortex*, 13(11), 1219-1231.

McLaughlin, T., Torborg, C. L., Feller, M. B., & O'Leary, D. D. (2003). Retinotopic map refinement requires spontaneous retinal waves during a brief critical period of development. *Neuron*, 40(6), 1147-1160.

Mire, E., Mezzera, C., Leyva-Díaz, E., Paternain, A. V., Squarzoni, P., Bluy, L., Castillo-Paterna, M., José López, M., Peregrín, S., Tessier-Lavigne, M., Garel, S., Galcerán, J., Lerma, J., & López-Bendito, G. (2012). Spontaneous activity regulates Robo1 transcription to mediate a switch in thalamocortical axon growth. *Nature neuroscience*, 15(8), 1134.

Molnár, Z., López-Bendito, G., Small, J., Partridge, L. D., Blakemore, C., & Wilson, M. C. (2002). Normal development of embryonic thalamocortical connectivity in the absence of evoked synaptic activity. *Journal of Neuroscience*, 22(23), 10313-10323.

Moody, W. J. (1998). Control of spontaneous activity during development. *Journal of neurobiology*, 37(1), 97-109.

Moody, W. J., & Bosma, M. M. (2005). Ion channel development, spontaneous activity, and activity-dependent development in nerve and muscle cells. *Physiological reviews*, 85(3), 883-941.

Mooney, R., Penn, A. A., Gallego, R., & Shatz, C. J. (1996). Thalamic relay of spontaneous retinal activity prior to vision. *Neuron*, 17(5), 863-874.

- Mooney, S. M., & Miller, M. W. (2007). Postnatal generation of neurons in the ventrobasal nucleus of the rat thalamus. *Journal of Neuroscience*, 27(19), 5023-5032.
- Moore, D. L., & Goldberg, J. L. (2011). Multiple transcription factor families regulate axon growth and regeneration. *Developmental neurobiology*, 71(12), 1186-1211.
- Moreno-Juan, V., Filipchuk, A., Antón-Bolanos, N., Mezzera, C., Gezelius, H., Andrés, B., Rodríguez-Malmierca, L.M., Susin, R. R., Schaad, O., Iwasato, T., Schüle, R., Rutlin, M. L., Nelson, S. B., Ducret, S., Valdeolmillos, M., Rijli F. M., López-Bendito, G. (2017). Prenatal thalamic waves regulate cortical area size prior to sensory processing. *Nature communications*, 8, 14172.
- O'Donovan, M. J. (1999). The origin of spontaneous activity in developing networks of the vertebrate nervous system. *Current opinion in neurobiology*, 9(1), 94-104.
- Olavarria, J., Van Sluyters, R. C., & Killackey, H. P. (1984). Evidence for the complementary organization of callosal and thalamic connections within rat somatosensory cortex. *Brain research*, 291(2), 364-368.
- Ooashi, N., Futatsugi, A., Yoshihara, F., Mikoshiba, K., & Kamiguchi, H. (2005). Cell adhesion molecules regulate Ca<sup>2+</sup>-mediated steering of growth cones via cyclic AMP and ryanodine receptor type 3. *J Cell Biol*, 170(7), 1159-1167.
- Oppenheim, R. W. (1991). Cell death during development of the nervous system. *Annual review of neuroscience*, 14(1), 453-501.
- Oswald, A. M. M., & Reyes, A. D. (2008). Maturation of intrinsic and synaptic properties of layer 2/3 pyramidal neurons in mouse auditory cortex. *Journal of neurophysiology*.
- Parker, P. R., Cruikshank, S. J., & Connors, B. W. (2009). Stability of electrical coupling despite massive developmental changes of intrinsic neuronal physiology. *Journal of Neuroscience*, 29(31), 9761-9770.
- Penschuck, S., Giorgetta, O., & Fritschy, J. M. (1999). Neuronal activity influences the growth of barrels in developing rat primary somatosensory cortex without affecting the expression pattern of four major GABAA receptor  $\alpha$  subunits. *Developmental brain research*, 112(1), 117-127.
- Piché, M., Chabot, N., Bronchti, G., Miceli, D., Lepore, F., & Guillemot, J. P. (2007). Auditory responses in the visual cortex of neonatally enucleated rats. *Neuroscience*, 145(3), 1144-1156.
- Rauschecker, J. P., Tian, B., Korte, M., & Egert, U. (1992). Crossmodal changes in the somatosensory vibrissa/barrel system of visually deprived animals. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 89(11), 5063-5067.
- Rice, F. L. (1995). Comparative aspects of barrel structure and development. In *The barrel cortex of rodents* (pp. 1-75). Springer, Boston, MA.

- Rice, F. L., Gomez, C., Barstow, C., Burnet, A., & Sands, P. (1985). A comparative analysis of the development of the primary somatosensory cortex: Interspecies similarities during barrel and laminar development. *Journal of Comparative Neurology*, 236(4), 477-495.
- Riddle, D. R., Gutierrez, G., Zheng, D., White, L. E., Richards, A., & Purves, D. (1993). Differential metabolic and electrical activity in the somatic sensory cortex of juvenile and adult rats. *Journal of Neuroscience*, 13(10), 4193-4213.
- Rosenberg, S. S., & Spitzer, N. C. (2011). Calcium signaling in neuronal development. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 3(10), a004259.
- Scheibel, M. E., Davies, T. L., & Scheibel, A. B. (1976). Ontogenetic development of somatosensory thalamus I. Morphogenesis. *Experimental neurology*, 51(2), 392-406.
- Schlaggar, B. L., & O'Leary, D. D. (1994). Early development of the somatotopic map and barrel patterning in rat somatosensory cortex. *Journal of Comparative Neurology*, 346(1), 80-96.
- Schwaller, B. (2012). The regulation of a cell's Ca<sup>2+</sup> signaling toolkit: The Ca<sup>2+</sup> homeostasome. In *Calcium Signaling* (pp. 1-25). Springer, Dordrecht.
- Seelke, A. M., Dooley, J. C., & Krubitzer, L. A. (2012). The emergence of somatotopic maps of the body in S1 in rats: the correspondence between functional and anatomical organization. *PLoS one*, 7(2), e32322.
- Shatz, C. J. (1990). Impulse activity and the patterning of connections during CNS development. *Neuron*, 5(6), 745-756.
- Shatz, C. J., & Stryker, M. P. (1988). Prenatal tetrodotoxin infusion blocks segregation of retinogeniculate afferents. *Science*, 242(4875), 87-89.
- Silver, R. A., Lamb, A. G., & Bolsover, S. R. (1989). Elevated cytosolic calcium in the growth cone inhibits neurite elongation in neuroblastoma cells: correlation of behavioral states with cytosolic calcium concentration. *Journal of Neuroscience*, 9(11), 4007-4020.
- Smetters, Diana; Majewska, Ania; Yuste, Rafael. (1999). Detecting action potentials in neuronal populations with calcium imaging. *Methods*.vol. 18, no 2, p. 215-221.
- Spitzer, N. C. (1991). A developmental handshake: neuronal control of ionic currents and their control of neuronal differentiation. *Journal of neurobiology*, 22(7), 659-673.
- Spitzer, N. C. (2006). Electrical activity in early neuronal development. *Nature*, 444(7120), 707.
- Spitzer, N. C. (2008). Calcium: first messenger. *Nature neuroscience*, 11(3), 243.
- Stryker, M. P. (1989). Role of neural activity in development and plasticity of mammalian visual cortex. *Biomed Res [Suppl]*, 10, 37-42.

- Sutherland, D. J., Pujic, Z., & Goodhill, G. J. (2014). Calcium signaling in axon guidance. *Trends in neurosciences*, 37(8), 424-432.
- Tang, F., & Kalil, K. (2005). Netrin-1 induces axon branching in developing cortical neurons by frequency-dependent calcium signaling pathways. *Journal of Neuroscience*, 25(28), 6702-6715.
- Tang, F., Dent, E. W., & Kalil, K. (2003). Spontaneous calcium transients in developing cortical neurons regulate axon outgrowth. *Journal of Neuroscience*, 23(3), 927-936.
- Tien, N. W., & Kerschensteiner, D. (2018). Homeostatic plasticity in neural development. *Neural development*, 13(1), 9.
- Toescu E.C y Verkhatsky A, (1998). Introduction: Principles of Calcium Signaling in Verkhatsky, A., & Toescu, E. C. (Eds.). *Integrative aspects of calcium signalling*. Springer Science & Business Media.
- Tojima, T., Hines, J. H., Henley, J. R., & Kamiguchi, H. (2011). Second messengers and membrane trafficking direct and organize growth cone steering. *Nature Reviews Neuroscience*, 12(4), 191.
- Toldi, J., Farkas, T., & Völgyi, B. (1994). Neonatal enucleation induces cross-modal changes in the barrel cortex of rat. A behavioural and electrophysiological study. *Neuroscience letters*, 167(1-2), 1-4.
- Tonelli, F. M., Santos, A. K., Gomes, D. A., da Silva, S. L., Gomes, K. N., Ladeira, L. O., & Resende, R. R. (2012). Stem cells and calcium signaling. In *Calcium Signaling* (pp. 891-916). Springer, Dordrecht.
- Toscano-Márquez, B., Martínez-Martínez, E., Manjarrez, E., Martínez, L., Mendoza-Torreblanca, J., & Gutiérrez-Ospina, G. (2008). Late onset muscle plasticity in the whisker pad of enucleated rats. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(41), 15973-15978.
- Tsang, Y. C. (1937). Visual centers in blinded rats. *Journal of Comparative Neurology*, 66(1), 211-261.
- Turrigiano, G. (2012). Homeostatic synaptic plasticity: local and global mechanisms for stabilizing neuronal function. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 4(1), a005736
- Turrigiano, G. G. (1999). Homeostatic plasticity in neuronal networks: the more things change, the more they stay the same. *Trends in neurosciences*, 22(5), 221-227.
- Turrigiano, G. G., & Nelson, S. B. (2000). Hebb and homeostasis in neuronal plasticity. *Current opinion in neurobiology*, 10(3), 358-364.
- Uhlén, P., & Fritz, N. (2010). Biochemistry of calcium oscillations. *Biochemical and biophysical research communications*, 396(1), 28-32.
- Vanderhaeghen, P., & Polleux, F. (2004). Developmental mechanisms patterning thalamocortical projections: intrinsic, extrinsic and in between. *Trends in neurosciences*, 27(7), 384-391.

- Waite, P. M., Li, L., & Ashwell, K. W. (1992). Developmental and lesion induced cell death in the rat ventrobasal complex. *Neuroreport*, 3(6), 485-488.
- Warren, R. A., & Jones, E. G. (1997). Maturation of neuronal form and function in a mouse thalamo-cortical circuit. *Journal of Neuroscience*, 17(1), 277-295.
- Waters, R. S., Li, C. X., & McCandlish, C. A. (1995). Relationship between the organization of the forepaw barrel subfield and the representation of the forepaw in layer IV of rat somatosensory cortex. *Experimental brain research*, 103(2), 183-197.
- Wen, Z., Guirland, C., Ming, G. L., & Zheng, J. Q. (2004). A CaMKII/calcineurin switch controls the direction of Ca<sup>2+</sup>-dependent growth cone guidance. *Neuron*, 43(6), 835-846.
- Wong, R. O. (1993). The role of firing patterns in neuronal development of sensory systems. *Current opinion in neurobiology*, 3(4), 595-601.
- Woolsey, T. A., & Van der Loos, H. (1970). The structural organization of layer IV in the somatosensory region (SI) of mouse cerebral cortex: the description of a cortical field composed of discrete cytoarchitectonic units. *Brain research*, 17(2), 205-242.
- Yin, J., & Yuan, Q. (2015). Structural homeostasis in the nervous system: a balancing act for wiring plasticity and stability. *Frontiers in cellular neuroscience*, 8, 439.
- Yuste, R. (1997). Introduction: spontaneous activity in the developing central nervous system. In *Seminars in cell & developmental biology* (Vol. 8, No. 1, pp. 1-4).
- Zantua, J. B., Wasserstrom, S. P., Arends, J. J., Jacquin, M. F., & Woolsey, T. A. (1996). Postnatal development of mouse "whisker" thalamus: ventroposterior medial nucleus (VPM), barreloids, and their thalamocortical relay neurons. *Somatosensory & motor research*, 13(3-4), 307-322.
- Zhang, L. I., & Poo, M. M. (2001). Electrical activity and development of neural circuits. *Nature neuroscience*, 4(11s), 1207.
- Zheng, D., & Purves, D. (1995). Effects of increased neural activity on brain growth. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 92(6), 1802-1806.
- Zheng, James Q. (2000). "Turning of nerve growth cones induced by localized increases in intracellular calcium ions." *Nature* 403.6765: 89.