



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE PSICOLOGÍA

REMODELACIÓN DE LAS POBLACIONES BACTERIANAS COLÓNICAS
EN LAS RATAS ENUCLEADAS AL NACIMIENTO: IMPLICACIONES
MECANÍSTICAS PARA LA PLASTICIDAD INTERMODAL

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

LICENCIADO EN PSICOLOGÍA

P R E S E N T A:

CHRISTIAN GIOVANI CURIEL GUERRERO

DIRECTOR: DR. GABRIEL GUTIÉRREZ OSPINA

REVISOR: D. en C. ISAAC GONZÁLEZ SANTOYO

SINODALES: DRA. MARTHA LILIA ESCOBAR RODRÍGUEZ

DR. HUGO SÁNCHEZ CASTILLO

DRA. OLGA ARACELI ROJAS RAMOS



Ciudad Universitaria, Cd. Mx., septiembre, 2019



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

A mi mamá.

A mi familia.

A todas las ratas que dan su vida en la investigación.

Se acerca el invierno.

(George R. R. Martin, Canción de hielo y fuego)

Agradecimientos

A la **Universidad Nacional Autónoma de México** por darme la oportunidad de crecer como profesional, de permitirme caminar en sus instalaciones día a día y obtener nuevas experiencias tanto profesionales como personales, gracias a la mejor Universidad de México, ¡GRACIAS QUERIDA CASA DE ESTUDIO!

A la **Facultad de Psicología** por formarme como psicólogo, por enseñarme a ser crítico y por inspirarme para conocer siempre más. Gracias por otorgarme la oportunidad de conocer increíbles personas y amigos, y por demostrarme que todo es posible.

Al **Dr. Gabriel Gutiérrez Ospina** por enseñarme la importancia de hacer ciencia y buscar soluciones fuera de lo cotidiano, gracias por la oportunidad de trabajar a tu lado, por todo este tiempo y otorgarme toda esa confianza. Gracias Gabriel.

A la **Dra. Olga Rojas** por acompañarme durante todo este camino, darme los mejores consejos, permitirme obtener grandes y valiosas oportunidades y experiencias, por siempre recordarme que como psicólogo hay que valorar lo que sabemos, que hay que empujarse las fronteras con otras profesiones, pero nunca olvidando nuestro origen. Gracias Dra.

Al **Dr. Isaac González Santoyo** por compartir ese entusiasmo sobre la nueva frontera de conocimiento que es el estudio de microbiota-cerebro.

Al **Dr. Hugo Sánchez** por tan asombrosas clases, por compartir tan agradables discusiones sobre diversos temas y por enseñarme que el mejor hábito intelectual a veces no está en leer siempre sobre cosas profesionales.

A la **Dra. Martha Escobar** por compartirme su entusiasmo dentro y fuera de clases y demostrarme que en lo “sencillo” a veces se puede obtener grandes descubrimientos (e. g. estudios de memoria).

A ti **mamá** por levantarte todas las mañanas para que yo no me fuera sin desayunar, acompañarme a la puerta de la casa y darme tu bendición. Por estar siempre a mi lado, por darme tu apoyo incondicional, por escucharme y darme consejos. ¡TE AMO!

A mi **papá** que, aunque con dificultades, siempre tuve su apoyo cuando lo necesitaba y enseñarme a valorar lo que se tiene, aunque sea mínimo.

A mis **hermanas** (Naye y Ari), por darme tan gratos e increíbles momentos y experiencias, por ayudarme cuando lo necesitaba y estar a mi lado.

A mis **abuelitos** (Lupita y Carlos) por brindarme su apoyo en todo momento, abrirme sus puertas, enseñarme la importancia de la perseveración, del esfuerzo y del trabajo.

A mis **tíos** (Juan, Toño, Iván y Gabino), **tías** (Paty, Vero, Yessy y Karina) y **primos** (Charly, Karen, Lupita, Arturito), gracias por apoyarme, por creer en mí, por animarme y por darme los mejores momentos.

A **Viry** gracias por tan increíbles momentos y por años de experiencias, confesiones y tan maravillosa amistad. Por no abandonarme desde la prepa, por confiar en mí, por demostrar que la vida no siempre es bella, solo hay que saber cómo hay que vivirla de acuerdo a los nuevos retos.

A **Dianita, Jimena y Mitsu** porque me hicieron conocer la ciudad de México y pasar en ello tan impactantes momentos a mi lado, por su valiosa amistad, por compartir conmigo tantas cosas, convertir un momento de estrés en risas y por tantos datos curiosos. Gracias.

A **Carlita** con quien no creí terminar con una muy bonita amistad por ser tan seria (-_-), por escucharme, aconsejarme, acompañarme, insistir en que me apurara y darme los mejores ánimos, charlas y confiar en mí, gracias.

A **Dalia, Emma y Lu-Lu** por tan divertidos momentos, locuras, por escucharme y compartir conmigo tantos momentos, por exigirme en lo académico y por tantas risas juntos. Gracias por hacer de mis días lo mejor. ¡Gracias bebes!

A **todos los chicos de la SDC nuevos y viejos** (Jessica, Aline, Carlitos, Noé, etc., porque son muchos). En especial a **Paulette y Gustavo** por dejarme ver que los sueños se alcanzan fácilmente, aunque parezcan extraños. A **Lidia** por compartir conocimiento, trabajo y tan bonitos momentos. A **Misa** por enseñarme a valorar el conocimiento desde otros puntos de vista y demostrarme que en ningún momento hay que conformarse con el contenido de algo, siempre hay que buscar la comparación u otras palabras, y que los objetivos facilitan todo.

A mis **compañeros del laboratorio** (Cynthia, Anita, Zan, Dr. Jesús) por aconsejarme y darme las mejores críticas. En especial a la **Dra. Margarita G. Chavarín**, quien me apoyo durante todo este proceso, quien me escucho y con quien compartí tantos momentos especiales en el laboratorio, por enseñarme a hacer histología, gracias por su paciencia y confianza.

Por último, tengo que agradecer a todas las personas que ya puedo considerar **mis alumnos**, me dieron la mejor experiencia en esta etapa, me dejaron acompañarlos mientras hacia una de las cosas que más me gusta (dar clases), ustedes me permitieron retarme y crecer en lo académico.

Aunque quisiera dedicarles más palabras, espero haber transmitido mi gratitud a todos y cada uno de ustedes.

¡GRACIAS!

ÍNDICE

RESUMEN	5
1. INTRODUCCIÓN	6
2. ANTECEDENTES	8
2.1 Plasticidad cerebral intermodal	8
2.4 Ácido butírico: participación en funciones del sistema nervioso	11
2.3 Microbiota intestinal y plasticidad neuronal	12
3. JUSTIFICACIÓN	13
4. HIPÓTESIS	14
5. OBJETIVOS	14
5.1 Objetivo general	14
5.2 Objetivos específicos	14
6. MATERIAL Y MÉTODOS	15
6.1 Animales	15
6.2 Enucleación	16
6.3 Sacrificio de animales y extracción de cerebros	17
6.4 Estimación del área de la S1	17
6.5 Evaluación de la remodelación de las poblaciones bacterianas colónicas	20
6.6 Análisis estadístico	22
7. RESULTADOS	23
7.1 Las manipulaciones experimentales no afectan significativamente el peso corporal, la ganancia de peso, ni el peso cerebral	23
7.2 El área ocupada por el SCBPM en la S1 es mayor en el grupo de crías enucleadas de ambos sexos	25
7.3 La microbiota colónica en las ratas enucleadas muestra un incremento en la proporción de bifidobacterias.....	26
8. DISCUSIÓN	30
9. CONCLUSIONES	33
10. BIBLIOGRAFÍA	34
11. APÉNDICE	39
12. FIGURA SUPLEMENTARIA	41

RESUMEN

La remoción quirúrgica bilateral de los ojos (enucleación), al nacimiento en ratas conduce a diversos cambios morfofuncionales en la corteza cerebral, entre los que destaca un incremento en el área ocupada por la corteza somatosensorial primaria (S1), a este fenómeno se le ha denominado plasticidad cerebral intermodal. Estudios previos mostraron que dicha expansión de S1 es promovida por un incremento en la desacetilación de histonas, proceso que induce a una disminución de la transcripción genética. La administración de ácido valproico (AVP) por leche materna es capaz de bloquear la desacetilación y prevenir la expansión de S1 en las crías enucleadas. En esta tesis iniciamos las pesquisas que nos permita identificar si existen factores endógenos sistémicos capaces de regular el proceso de desacetilación en la neuronas de la S1 durante su desarrollo y plasticidad. En este contexto el ácido butírico, un ácido graso de cadena corta, posee la capacidad de inhibir la desacetilación, pudiendo así ser un candidato como regulador endógeno a este fenómeno. Para abordar experimentalmente esta propuesta, hemos diseñado un estudio por fases que permitirá evaluar si el butirato es candidato para modular la plasticidad intermodal en enucleados. Debido a que la fuente primordial de butirato es la microbiota colónica, específicamente las bifidobacterias, en esta primera fase evaluaremos si dicha expansión se asocia con una disminución en la proporción de bifidobacterias. Para ello realizamos enucleaciones en crías de ratas recién nacidas y evaluamos la magnitud de la expansión de la S1 a los 10 días de edad, en algunos de estos animales se colectaron muestras de heces fecales y se cultivaron en medios selectivos para estimar el número de bifidobacterias, lactobacilos y enterobacterias, comparándolas así entre grupos experimentales. Nuestros resultados confirmaron que la enucleación conduce a la expansión de la S1. Además, documentamos que la microbiota colónica en muestras fecales de crías enucleadas se enriquece en bifidobacterias, al ser comparadas con las muestras de los grupos controles. El análisis de componentes principales sugiere que la microbiota colónica es un factor importante que explica parte del fenotipo de enucleados y que pudiese modular la plasticidad intermodal consecutiva a la enucleación postnatal. Estudios subsecuentes deberán explorar causalmente esta relación en crías libres de gérmenes y/o en aquellas con disbiosis, incluyendo mediciones de butirato en sangre.

Palabras clave: *Corteza somatosensorial primaria, plasticidad cortical intermodal, bifidobacterias, butirato, deacetilasas de histonas*

1. INTRODUCCIÓN

La plasticidad intermodal es un fenómeno caracterizado por la reorganización de la arquitectura morfofuncional cerebral, en respuesta a la pérdida de un órgano de los sentidos. Al respecto, la enucleación neonatal en roedores conduce a la expansión de la corteza somatosensorial primaria (S1; *Bronchti, Shönenberger, Welker & Van der Loos, 1992*). Aunque se ha afirmado que este cambio resulta del sobreuso compensatorio de las vías somestésicas por la falta de la vista, lo que conllevaría a incrementos progresivos de la actividad neuronal provocada por estímulos mecánicos naturales a lo largo de la vida (*Martínez-Méndez et al., 2013*), estudios recientes indican que esta postura es equívoca. En verdad, *Fetter-Pruneda et al. (2013)* mostraron que la expansión de la S1 progresa, durante los primeros días de vida postnatal, como el resultado de la formación prematura de S1 en las ratas enucleadas al nacimiento. Además, *Fetter-Pruneda et al. (2013)* previnieron la expansión de S1 al inhibir el proceso de desmetilación de histonas mediante la administración de ácido valproico (AVP), suministrado por medio de la leche materna, durante los primeros días de vida postnatal en crías enucleadas, sugiriendo así que mecanismos epigenéticos están involucrados. Estos resultados también indican que dichos factores epigenéticos provenientes de fuentes externas al sistema nervioso y al propio cuerpo son una fuente que modula la plasticidad intermodal.

En general, la plasticidad neuronal es regulada por factores locales (e.g., neurotransmisores), externos al sistema nervioso (e.g., hormonas) y por agentes ambientales externos al organismo (e.g., experiencia). Sin embargo, poco se sabe sobre los factores endógenos locales y/o sistémicos que regulan la plasticidad intermodal (*Martínez-Méndez et al., 2013*). Una posibilidad podría ser el ácido butírico, uno de los ácidos grasos de cadena corta (AGCC) que se ha mostrado que promueve un aumento en las conexiones nerviosas en hipocampo y amígdala (*Bourassa, Alim, Bultman & Ratan, 2016; Luczynski, Whelan, O'sullivan, Clarke, Shanahan, Dinan & Cryan,*

2016). Además, en un estudio previo, *Fetter (2013)* mostró, por medio de microarreglos en tejido de la S1, una disminución de la expresión del receptor olfativo Olfr1443, molécula capaz de unir butirato (*Halperin Khuns, Sánchez, Sanver, Khalil, Marr & Pluznick, 2019*) para promover la función de sus células.

La fuente principal de ácido butírico la constituye la microbiota colónica (*Pluznick et al., 2013*). En específico, se sabe que las bifidobacterias aportan el mayor porcentaje de este compuesto en los mamíferos (*Kasubuchi et al., 2015; Wu, Wang, Zou, Long, Yan, Zeng & Chen, 2017*), y debido a que cambios en la composición de la microbiota colónica, principalmente en la proporción de estas bacterias, modifican la disponibilidad de butirato, y la disminución de esta molécula a su vez está asociada con modificaciones de la respuestas plásticas neuronales (*Fung, Olson y Hsiao, 2017; Heijtz et al., 2011; Koh, Vadder, Kovatcheva-Datchary, Bäckhed, 2016; Nankova, Agarwal, McFabe, La Gamma, 2014*) pensamos que, en su conjunto, las observaciones comentadas justifican el evaluar si las ratas enucleadas al nacimiento, pudiesen presentar una remodelación de las poblaciones de bifidobacterias, presumiendo que éstas pudieran fungir como fuentes de butirato el cual modularía la plasticidad intermodal en etapas tempranas en el desarrollo.

2. ANTECEDENTES

2.1 Plasticidad cerebral intermodal

La plasticidad neural es la propiedad que despliega el Sistema Nervioso para modificar su morfo-fisiología en respuesta a circunstancias internas o externas al organismo, que demandan ajustes funcionales y estructurales (*Báez-Saldaña, Fetter-Pruneda, Fuentes-Farías, Granados-Rojas, Gutiérrez-Ospina, Martínez-Méndez, Meléndez-Herrera, Mendoza-Torreblanca & Sandoval-Velasco., 2009*). Esta propiedad no es genéticamente determinada, sino el resultado de la interacción que se da entre genes y el medio ambiente, a través de mecanismos epigenéticos (*Báez-Saldaña et al., 2009; Berardi, Sale & Maffei, 2015; Fagiolini, Jensen, & Champagne, 2009*).

Una de las manifestaciones de plasticidad neuronal más elocuentes es aquella que ocurre en respuesta a la pérdida de un órgano sensorial. En particular, la pérdida de la vista asociada con procesos degenerativos de la retina, micro-oftalmia o enucleación de los globos oculares durante el desarrollo prenatal o postnatal temprano, lo que conduce a una expansión de las cortezas somatosensorial (S1) y auditiva primarias (A1; *Figura 1*), y a la re-activación de la corteza “visual” primaria, por información somestésica y auditiva (*i.e., plasticidad intermodal*; revisado en *Bavelier & Neville, 2002; Martínez-Méndez et al., 2013*). Estos cambios son funcionalmente significativos pues se ha mostrado que se asocian con mejoras en el desempeño de la ejecución de tareas de orientación espacial, y conductas de discriminación de estímulos auditivos asociadas con la emisión de respuestas instrumentales (*Gougoux, Zatorre, Lassonde, Voss & Lepore, 2005; Stilla, Hanna, Hu, Mariola, Deshpande, & Sathian, 2008*), así como con modificaciones de las estrategias de exploración táctil en diferentes ambientes (*Nicolelis, Oliveira, Lin & Chapin, 1996*).

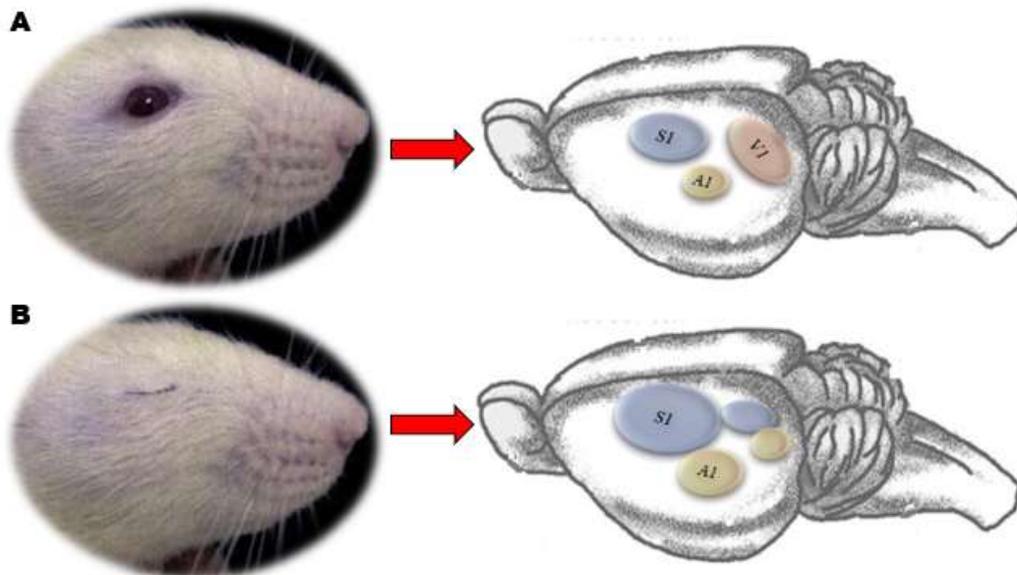


Figura 1. Reorganización anatómico-funcional de la corteza de ratas cegadas al nacimiento. En el esquema se ilustra la organización topográfica de las cortezas somatosensorial (S1), auditiva (A1) y visual (V1) primarias en el cerebro de una rata control (A) y una rata enucleada (B) al nacimiento. Nótese la expansión de los territorios ocupados por la S1 y A1, y la reactivación bimodal de V1.

Los cambios observados en el cerebro de individuos invidentes han llamado la atención de los investigadores en el área. La mayor parte de ellos presumen que las expansiones de la S1 y A1 responden a incrementos de la actividad neuronal naturalmente evocada a lo largo de las vías somestésica y auditiva (*Bronchti, et al., 1992; Coullon et al., 2015; Rauschecker, Tian, Korte & Egert, 1992*). Sin embargo, *Fetter-Pruneda et al. (2013)* mostraron que la expansión, al menos de S1, en ratas enucleadas al nacimiento procede durante la primera semana de vida, antes de que el animal explore activamente su ambiente. Estos autores también mostraron que la actividad oxidativa y el consumo de glucosa en la S1, es similar en las ratas control y enucleadas al nacimiento a los 10 y 60 días de edad, lo que sugiere que no existen diferencias en los niveles de activación neuronal evocada en la S1 entre ambos grupos de animales. Finalmente, en los mismos experimentos, se mostró que la expansión ocurre aún si se retiran las vibrisas mistaciales del hocico de la rata después de la enucleación, probando así que la expansión no depende del uso de estas, y que la remoción quirúrgica del ojo es indispensable para que la expansión de la S1 tenga lugar.

Así, la evidencia descrita indica que la expansión de la S1 en las ratas enucleadas al nacimiento no depende de incrementos progresivos de la actividad neuronal evocada a lo largo de la vía somestésica durante el desarrollo postnatal. *Fetter-Pruneda et al. (2013)* incluso mostraron que la expansión de la S1 en las ratas enucleadas al nacimiento resulta de la formación prematura de ésta, relacionada con un proceso también adelantado de desacetilación de la cromatina en las neuronas ubicadas en la S1; si ésta última se previene mediante el suministro de AVP por leche materna, la formación de los barriles se retrasa o normaliza y la expansión no ocurre (*Figura 2*). Estos resultados también indican que factores epigenéticos provenientes de fuentes externas al sistema nervioso y al propio cuerpo podrían modular la plasticidad intermodal. Se entiende como epigenética a los mecanismos de modificación genética que van desde cambios en la secuenciación del ADN como de cambios en la transcripción de determinados genes como respuesta a modificaciones en el ambiente endógeno o exógeno al organismo (*Ahmad, Ramadoss & Mahadevan, 2016*).

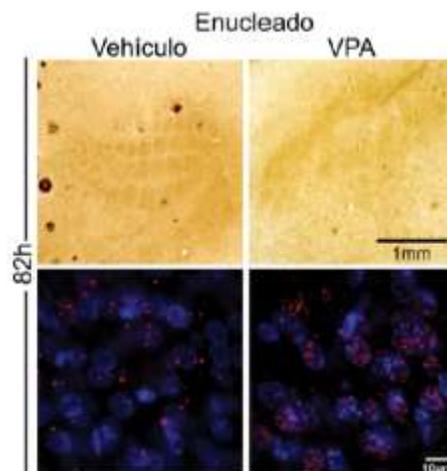


Figura 2. El tratamiento con ácido valproico (AVP), administrado a través de la alimentación normaliza los niveles de acetilación y el tiempo de formación de los barriles, impidiendo su expansión en ratas enucleadas al nacimiento. Panel superior, microfotografías que ilustran cortes tangenciales de la S1 de crías enucleadas tratadas con AVP o vehículo, visualizadas con la histoquímica para citocromo oxidasa 82 horas después del nacimiento. Nótese que se retrasa la formación de barriles en ratas enucleadas tratadas con AVP. Panel inferior, microfotografía de secciones coronales de la S1 inmunomarcadas para la acetilación de la histona 4 (rojo) y contrastadas con DAPI (azul) en los animales enucleados de 82 horas alimentados con AVP o vehículo. (**Figura tomada y modificada de *Fetter, 2013***).

2.2 Ácido butírico: participación en funciones del sistema nervioso

Una de las cualidades que posee que el sistema nervioso es su capacidad para modificar las conexiones sinápticas a lo largo del desarrollo. En este proceso interviene tanto factores locales (BDNF; *Bercik et al., 2011*) o externos (Hormona tiroidea; *Milletta, Petkovic, Eblé, Ammann, Flück & Mullis, 2014*) al sistema nervioso, como agentes ambientales externos al organismo (*Gougoux et al., 2005*). Para el caso de la plasticidad intermodal se ha propuesto, por ejemplo, que la reorganización cortical es modulada por factores locales tales como serotonina y ácido gamma-aminobutírico (GABA). En particular, ambos neurotransmisores son necesarios para que la corteza occipital, antes visual, reciba y procese información somestésica en ratas cegadas (*Jitsuki et al., 2011; Nys Smolders, Laramée, Hofman, Hu & Arckens, 2015*). En contraste, poco sabemos sobre los factores sistémicos que regulan la plasticidad intermodal. En referencia a esto último, una posibilidad podría ser el ácido butírico, un ácido graso monocarboxilado cuya cadena contiene cuatro átomos de carbono, que junto al ácido propiónico y acético (*Apéndice A*), regula directamente distintas funciones nerviosas. Este compuesto es producto de la fermentación de las fibras dietéticas por las bifidobacterias que colonizan el lumen del colon en mamíferos (*Sanz, Collado & Dalmau, 2006; Valles-Colomer et al., 2019*). Además de ser un metabolito alternativo del metabolismo energético intermediario cuya oxidación a lo largo de la cadena respiratoria de la mitocondria permite la producción de ATP (*Zeng, et al., 2016*), también participa en la cadena metabólica para la síntesis de neurotransmisor GABA a nivel del colon (*Stilling, Dinan & Cryan, 2014*).

Con relación a las acciones directas o indirectas que sobre la plasticidad cerebral tiene el butirato, se ha documentado que el incremento de éste en suero se asocia con un aumento en la generación de conexiones sinápticas en hipocampo, amígdala y corteza prefrontal en roedores durante los

primeros dos meses de vida (Hoban, et al., 2016; Luczynski et al., 2016; Miletta, et al., 2014). Se ha observado también que incrementos en la disponibilidad de butirato en suero promueve la neurogénesis hipocampal (Matsumoto et al., 2008). Aunque nuestra revisión no es extensa, los ejemplos anteriores permiten tener información básica que apoya la posibilidad de que el butirato pudiese regular la plasticidad intermodal, circunstancia que no ha sido aún valorada.

2.3 Microbiota Intestinal y Plasticidad Neuronal

Se considera como microbiota intestinal al conjunto de microorganismos que colonizan de manera convencional el lumen del intestino (Rojo, Méndez-García, Raczkowska, Bargiela, Moya, Ferrer & Barbas, 2017). En el intestino de la rata se han reportado alrededor de 400 especies de microorganismos, de los cuales sobresalen las bacterias tanto aeróbicas (e.g., *enterobacteriacaceae* y *lactobacillus*) como anaeróbicas (e.g., *bifidobacterium*, *bacteroides*, y *eubacterium*) (Brunser, Gotteland, Cruchet, Figueroa, Garrido & Steenhout, 1992; Sanz, et al., 2006). La colonización intestinal ocurre a lo largo del desarrollo postnatal temprano, alcanzando estructura poblacional madura relativamente estable después del destete. Si bien su establecimiento es fundamental para garantizar un adecuado desarrollo del colón en el organismo en crecimiento (Valles-Colomer et al., 2019), también es de suma importancia para establecer funciones de nutrición, protección vía maduración del sistema inmunológico y crecimiento (Bourassa et al., 2011; Han et al., 2014; Kasubuchi et al., 2015).

Con relación al sistema nervioso, diversos estudios en roedores libres de gérmenes (GF; *germ free*) han mostrado que la colonización de microbiota es necesaria para la regulación del desarrollo del sistema nervioso central. Por ejemplo, en ratones GF hay una disminución en la expresión de genes que participan en la formación de nuevas sinapsis en estructuras como la amígdala, hipocampo y corteza (Heijtz et al., 2011). La ingesta de lactobacilos regula la función del sistema GABAérgico.

En particular disminuye conductas tipo ansiosas y depresivas en ratas GF (*Bravo et al., 2011*). Además, roedores con disbiosis, muestran una desregulación de la respuesta del sistema inmunológico ante alérgenos, aumento de la respuesta proinflamatoria y disminución de la eficacia de la barrera hematoencefálica (*Carty & Bowie, 2011; Fox, Knorr, Haptonstall, 2019*).

Por otro lado, la microbiota colónica es la fuente principal de AGCC en el cuerpo de los mamíferos. A través de modificar la disponibilidad de estos mensajeros, mediante cambios en las proporciones de las bacterias de la microbiota conllevan a modificaciones en los patrones de expresión genética en regiones cerebrales como el hipocampo, la amígdala y el hipotálamo (*Grenham, Clarke, Cryan & Dinan, 2011; Heijtz et al., 2011*). A nivel celular, la disminución significativa de las bacterias colónicas afecta negativamente a la neurogénesis, promueve la remodelación de los circuitos neuronales, reduce la disponibilidad de factores neurotróficos y desregula la integración de procesos neurofisiológicos en estas mismas estructuras (*Collins, Surette, y Bercik, 2012; Luczynski, et al., 2016; Nankova et al., 2014; Perry et al., 2016; Zeng et al., 2016*).

3. JUSTIFICACIÓN

La enucleación conduce a una expansión de la S1. Datos obtenidos en el laboratorio sugieren que dicha respuesta plástica es modulada por factores epigenéticos de los cuales los endógenos sistémicos no han sido identificados. Una posibilidad es que la microbiota colónica pudiera modular el proceso a través de modificaciones en el aporte de AGCC. En particular, pensamos en la modificación de bifidobacterias. Esta tesis pretende aportar evidencia que valore las posibilidades de esta idea.

4. HIPÓTESIS

La proporción de bifidobacterias en ratas enucleadas al nacimiento se modificará al ser comparadas con aquellas asignadas a los grupos control.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo general:

Evaluar los cambios en la composición de la microbiota colonica y su relación fenoménica con el proceso de plasticidad intermodal de la S1 en ratas enucleadas al nacimiento.

5.2 Objetivos específicos:

- a. Estimar el tamaño de la S1 en ratas de referencia, testigo y enucleadas al nacimiento, mediante el uso de técnicas histológicas y de morfometría.
- b. Determinar la composición de la microbiota colónica en ratas de referencia, testigo y enucleadas al nacimiento, mediante el uso de cultivos bacterianos diferenciales para la identificación de bifidobacterias, lactobacilos, enterobacterias y coliformes.
- c. Establecer las relaciones entre los cambios en la composición de la microbiota colónica y los cambios en las dimensiones de la S1 en ratas de referencia, testigo y enucleadas al nacimiento, mediante métodos estadísticos cualitativos multivariados.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Animales

Se utilizaron Ratas Wistar recién nacidas, las cuales fueron divididas por sexo y asignadas aleatoriamente a los siguientes grupos (véase figura 3): Ratas Enucleadas (E): Estos animales (hembras $n=10$, machos $n=10$) fueron sometidos a enucleación bilateral previa anestesia por hipotermia, siguiendo los protocolos validados en el laboratorio (*Fetter-Pruneda et al., 2013*). Ratas de referencia (R1): Estos animales (hembras $n=10$, machos $n=10$) no tuvieron manejo experimental alguno. Ratas testigo únicamente sujetas a anestesia por hipotermia (T1): Estos animales (hembras $n=10$, machos $n=10$) fueron sujetos únicamente a anestesia por hipotermia en conformidad a los protocolos empleados durante la enucleación (ver siguiente sección). Ratas testigo sujetas a cirugías oculares falsas (T2): Estos animales (hembras $n=10$, machos $n=10$) fueron anestesiados por hipotermia y sus párpados incididos en concordancia con los lineamientos de los protocolos utilizados para realizar la enucleación. Los procedimientos de manejo y experimentación en animales fueron aprobados por el Comité de Ética del Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México (Protocolo No. 80).

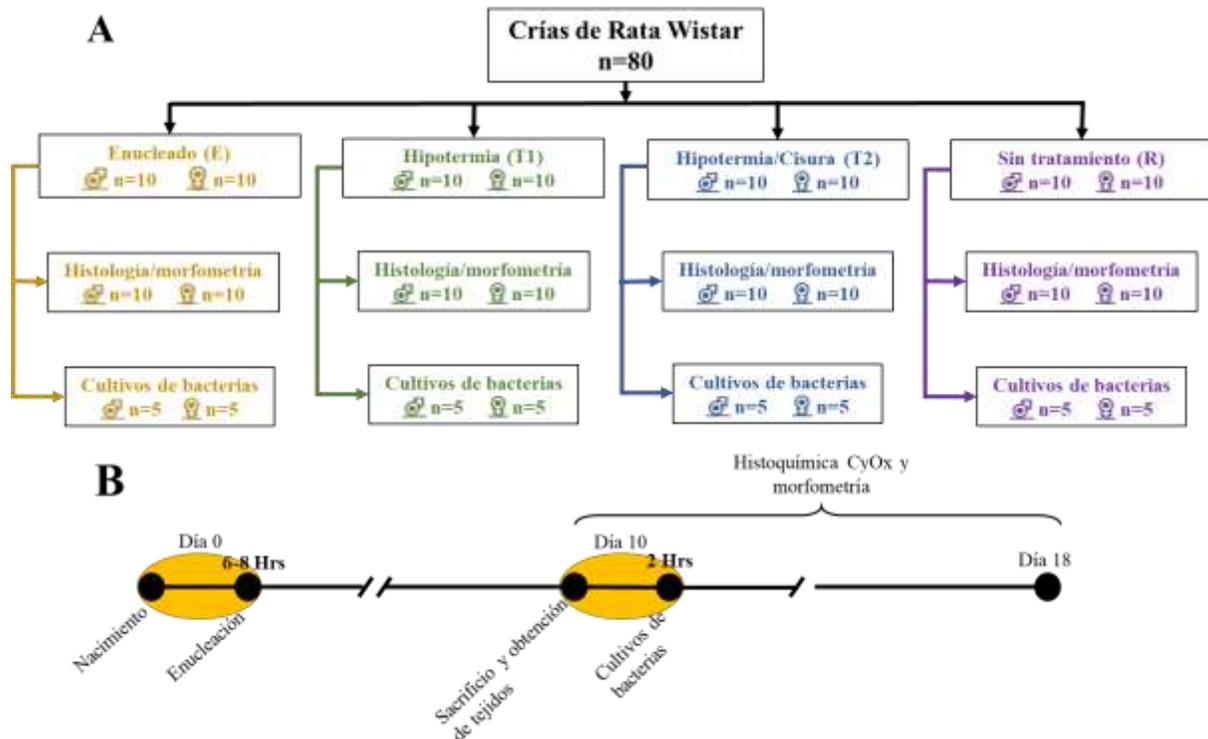


Figura 3. (A) Esquema de asignación de grupos y procedimientos metodológicos empleados, ratas de la cepa Wistar recién nacidas (n=80). (B) Esquema representativo de la metodología empleada.

6.2 Enucleación

La enucleación ocular bilateral se llevó a cabo siguiendo los lineamientos previamente publicados (*Fetter-Pruneda et al., 2013*). Para ello, se colocaron a las crías de 8 horas de nacidas sobre hielo durante 3 minutos. Una vez anestesiados, se retiraron las crías del hielo, se colocaron en la mesa sobre una hoja de papel absorbente y sus párpados se incidieron con un bisturí, herida quirúrgica que permitió la extracción del tejido ocular. El sangrado de la cavidad ocular se controló con hisopos de algodón, al tiempo que las crías recuperaban su temperatura, color y movimiento, bajo un foco de luz incandescente. Finalizado el procedimiento, las crías se devolvieron a sus madres.

6.3 Sacrificio de los animales y extracción de los cerebros

Las crías (10 días de edad) fueron perfundidas por vía intracardiaca con solución salina (35 mililitros, 0.15M) seguida de una disolución de paraformaldehído (4%) amortiguado con sales de fosfato (30 ml, 0.1M, pH 7.4) previa anestesia (pentobarbital sódico; 10 mg/Kg de peso). Al término del procedimiento, sus cerebros fueron extraídos, pesados y postfijados en la solución fijadora ya descrita, durante dos horas a temperatura ambiente. Las cortezas cerebrales fueron disecadas, aplanadas entre dos portaobjetos cubiertos con cinta teflón separados por 2 milímetros de distancia. El armado fue colocado y almacenado en cajas de Petri que contenían una disolución de sacarosa amortiguada primero al 15% durante 72 horas y posteriormente al 30% durante 72 horas, ambos almacenajes llevados a cabo a 4°C.

6.4 Estimación del área de la S1

En las ratas, la S1 contiene una representación del cuerpo denominada ratúnculo. Ésta se encuentra conformada por unidades citoarquitectónicas conocidas como barriles. Cada una de estas unidades representa colecciones de mecanorreceptores ubicadas en lugares específicos del cuerpo. La representación de las vibrisas mistaciales ubicadas en el belfo, el denominado *subcampo de barriles posteromedial* (SCBPM; *Figura 4*), es la más prominente, y está conformado por 33 barriles. La presencia de cada barril se puede revelar mediante el uso de tinciones histoquímicas (e.g., citocromo oxidasa) diseñadas para identificar sitios de alta actividad metabólica asociada, preferentemente, a las terminales nerviosas (*Arnold, 2012*).

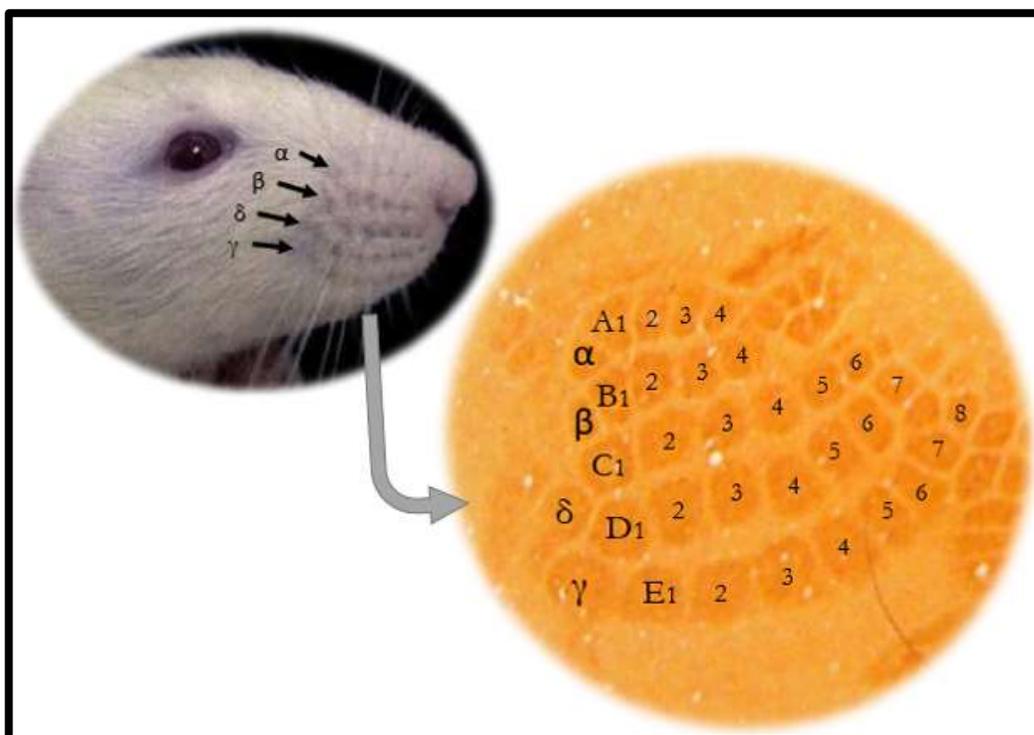


Figura 4. Representación cortical de la vibrisas mistaciales. (A) El belfo de la rata presenta 33 vibrisas largas que se organizan en el sentido dorso-ventral en cinco estratos denominados como alfa, beta, gama y delta, y en el sentido caudo-rostral en líneas de vibrisas designadas con numerales arábigos en orden creciente. (B) Esta organización se refleja de forma homotópica en la S1 en el subcampo de barriles posteromedial (SCBPM), aquí teñido con la técnica histoquímica diseñada para evidenciar zonas ricas en actividad de la enzima citocromo oxidasa.

Con el objeto de detectar las diferencias en las dimensiones de los barriles del SCBPM entre los distintos grupos de crías considerados en nuestro estudio, las cortezas cerebrales fueron aplanadas y cortadas tangencialmente en un criostato (50 μ m). Los cortes obtenidos fueron colectados en pozos e incubados en una solución amortiguada de 2,2-diaminobencidina (1.38 nM), citocromo C (12.1 uM), catalasa (200 ug/ml) y sacarosa (116.8 mM) durante tres horas a 37°C, manteniendo una agitación ligera. La reacción se detuvo al aplicar tres lavados de cinco minutos con amortiguador de fosfatos. Por último, los cortes se colocaron sobre portaobjetos previamente gelatinizados, se dejaron secar a temperatura ambiente por 24 horas y se montaron con cubreobjetos utilizando Cytoseal (*Allen Laboratories, Ref. 8310-4*).

Para estimar el área de cada barril en el SCBPM, y de éste en su conjunto, se delinearon los perímetros de cada barril siguiendo el orden topológico del SCBPM, todo ello con ayuda de una cámara lúcida y un microscopio de campo claro (*Gutiérrez-Ospina, Calikoglu, Ye & D'Ercole, 1996*). Este procedimiento permitió la construcción de mapas bidimensionales del SCBPM que al ser reproducidos en papel albanene, escaneados para obtener imágenes digitales (*Figura 5A*) y finalmente transformados en imágenes binarias (Programa Image J; NIH), nos permitió generar las máscaras (*Figura 5*) que facilitaron la estimación del área calibrada por barril y por SCBPM estudiado de manera automática (*Figura 5A*). El área total de los barriles se estimó sumando el área de cada uno de los barriles considerados en el estudio. El área del SCBPM se estimó trazando el perímetro de este, completando el trazo entre las caras externas de los barriles periféricos mediante una línea procurando recorrer la menor distancia posible (*Figura 5B*). Finalmente, también se estimó el área ocupada por el tejido cortical no incluido en los barriles dentro del SCBPM; el área interbarril se calculó restando esta área de aquella ocupada por los barriles en su conjunto. Todas las mediciones fueron corregidas aplicando un factor de corrección de $5.8 \pm 0.78\%$ ($\bar{X} \pm DE$) para las mediciones obtenidas de cada animal, asociado a posibles diferencias adquiridas por las muestras durante el proceso de aplanado, y en conformidad con los protocolos descritos por *Riddle et al. (1992)*.

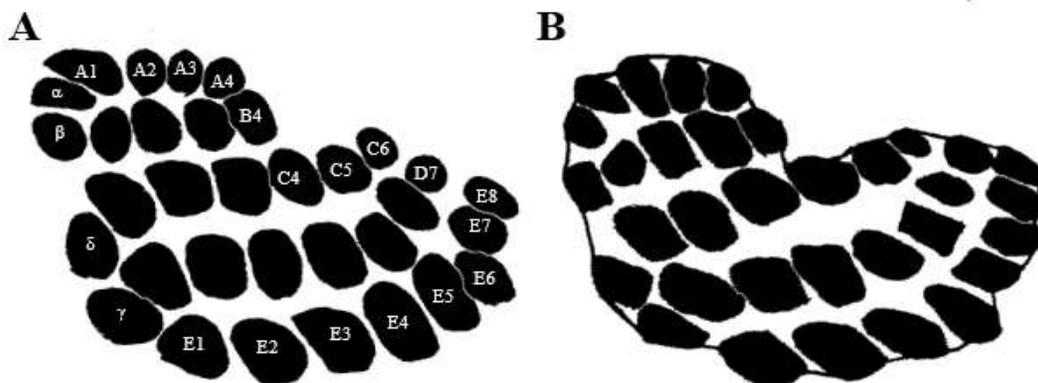


Figura 5. Perfil digitalizado del SCBPM de la S1 de la rata. Reconstrucción bidimensional del SCBPM de la S1 por medio del microscopio con cámara lucida. (A) se muestra la reconstrucción de los 33 barriles y se nombra aquellos barriles que se usaron para marcar la periferia del subcampo. (B) se muestra la línea perimetral tangencial que delimita la periferia del SCBPM.

6.5 Evaluación de la remodelación de las poblaciones bacterianas colónicas

Cinco crías (10 días de vida) por sexo, por grupo fueron anestesiadas (pentobarbital sódico). Se realizó entonces una incisión abdominal a través de la cual se extrajo el colon, el cual fue abierto en canal para adquirir una muestra de 10 mg de heces. Las muestras de heces fueron solubilizadas en 2 mililitros de amortiguador de fosfatos estéril (PBS, pH 7.4) e incubadas a 4°C durante 2 horas. Posteriormente se realizaron cultivos selectivos para la detección de Enterobacterias (Cat. 1019-A, DIBICO), *Escherichia coli* (Cat. 1305-B, DIBICO), Lactobacilos (Cat. 1267-A, DIBICO) y Bifidobacterias (Cat. 88517-500G-F, Sigma-Aldrich), todas ellas habitantes convencionales del intestino, y diferencialmente distribuidas en el colon de la rata Wistar, a lo largo del desarrollo (Brunser *et al.*, 2006).

Los medios de cultivo fueron esterilizados a 120 libras de presión en autoclave durante 20 minutos y repartidos en cajas de Petri individuales (10 mililitros del medio por caja). El medio de cultivo para bifidobacterias se adicionó con 116 mg de BSM Supplement (Cat. 83055-1G-F, Sigma-Aldrich), reactivo que contiene antibióticos necesarios para impedir el crecimiento de otras especies bacterianas. Para finalizar, todas las cajas se dejaron secar a temperatura ambiente durante

24 horas hasta alcanzar su polimerización. Para la siembra, se tomaron y dispersaron sobre los medios muestrales de 200 µL de la disolución de heces fecales; los cultivos se llevaron a cabo por duplicado para cada animal. Las cajas sembradas fueron incubadas a 37°C durante 36 horas. En el caso de los cultivos de bifidobacterias, las cajas de Petri fueron colocadas a 37°C durante 48 horas en condiciones de anaerobiosis

Después, se comprobó la presencia de colonias de bacterias por cada cultivo (*véase Cuadro 1*) y se procedió a contar cada una de ellas y calcular la proporción de supervivencia de bacterias, de acuerdo con *Brunser et al. (2006)*. Debido a que cada colonia surge de una bacteria, el conteo de las colonias nos permite estimar el número aproximado de bacterias por volumen de heces fecales para cada animal muestreado.

Cuadro 1. Medios de cultivo utilizados para el conteo de bacteriano en el intestino de ratas a los 10 días postnatales.

Nombre del medio de cultivo	Descripción de colonias	Imagen
<p style="text-align: center;">AGAR MRS (cultivo, aislamiento y cuenta de LACTOBACILOS)</p>	<p>Colonias redondas de color blanco.</p>	
<p style="text-align: center;">AGAR ECD (cultivo, aislamiento directo de ESCHERICHIA COLI)</p>	<p>Colonias grandes y esféricas de color blanco esmeralda.</p>	
<p style="text-align: center;">AGAR DE MAC CONKEY (cultivo, aislamiento e identificación de ENTEROBACTERIAS)</p>	<p>Colonias esféricas de color rosado.</p>	

AGAR BSM
(cultivo, aislamiento de
BIFIDOBACTERIAS)

Colonias pequeñas de
color rojo.



6.6 Análisis Estadístico

La distribución estadística de los valores del área correspondiente al SCBPM y a la S1, por grupo de ratas fue valorada estadísticamente con la prueba de normalidad de *Shapiro-Wilk* (*The R Project Statistical Computing*; <https://www.r-project.org/>), considerando una $p > 0.05$ como valor significativo. Comprobada su distribución normal, las comparaciones de varianza entre grupos fueron realizadas utilizando una ANOVA, seguida de una prueba *Post hoc* de comparaciones múltiples con el método de corrección de *Bonferroni*. Las gráficas se elaboraron con el programa GraphPad Prisma versión 6. En todos los datos se consideró una significancia con un valor de $p < 0.01$, a excepción de los datos cuantitativos discretos correspondientes al conteo de las bacterias. éstos tuvieron el mismo tratamiento para probar la normalidad de su distribución. Para el análisis de Componentes Principales (CP) se realizó una matriz en la cual se conjuntaron todos los datos de las diferentes variables lineales (vectores Eigen) por cada individuo (variables morfológicas y del conteo de bacterias), y se correlacionaron los efectos de cada variable para conocer los componentes fenotípicos de cada individuo para cada grupo experimental.

7. RESULTADOS

7.1 Las manipulaciones experimentales no afectan significativamente el peso corporal, la ganancia de peso, ni el peso cerebral.

Con el objeto de evaluar si las distintas manipulaciones utilizadas afectaban el desarrollo corporal de las crías, evaluamos el peso de éstas a las ocho horas, después de haber sido asignadas a los distintos grupos experimentales, pero antes de realizar cualquier manipulación en ellas, y a los 10 días de edad, posteriores a haber sido manipuladas, justo antes de su sacrificio. La *figura 6* permite observar, para ambos sexos, que los valores promedio para el peso corporal y la ganancia de peso son similares entre los grupos de animales, al ser comparados a las 8 horas y 10 días de vida postnatal. Esto corrobora que la asignación de cada animal a los distintos grupos fue homogéneamente aleatoria. Es importante destacar que la dispersión de los valores para ambos parámetros incrementa después de que las crías fueron sometidas a las manipulaciones experimentales, siendo esto particularmente notoria en las hembras, lo que indica que la enucleación afecta cualitativamente a la condición corporal de cada individuo de manera diferente, esta situación deberá considerarse al momento de interpretar los resultados. Ahora bien, con respecto a los valores promedio y sus dispersiones del peso cerebral al momento del sacrificio (*figura 6C y F*), no se observaron diferencias entre grupos por sexo y entre sexos. Así, se vuelve a corroborar que la asignación de cada animal a los distintos grupos fue homogéneamente aleatoria y, en este caso, que las manipulaciones no parecen comprometer significativamente el crecimiento cortical.

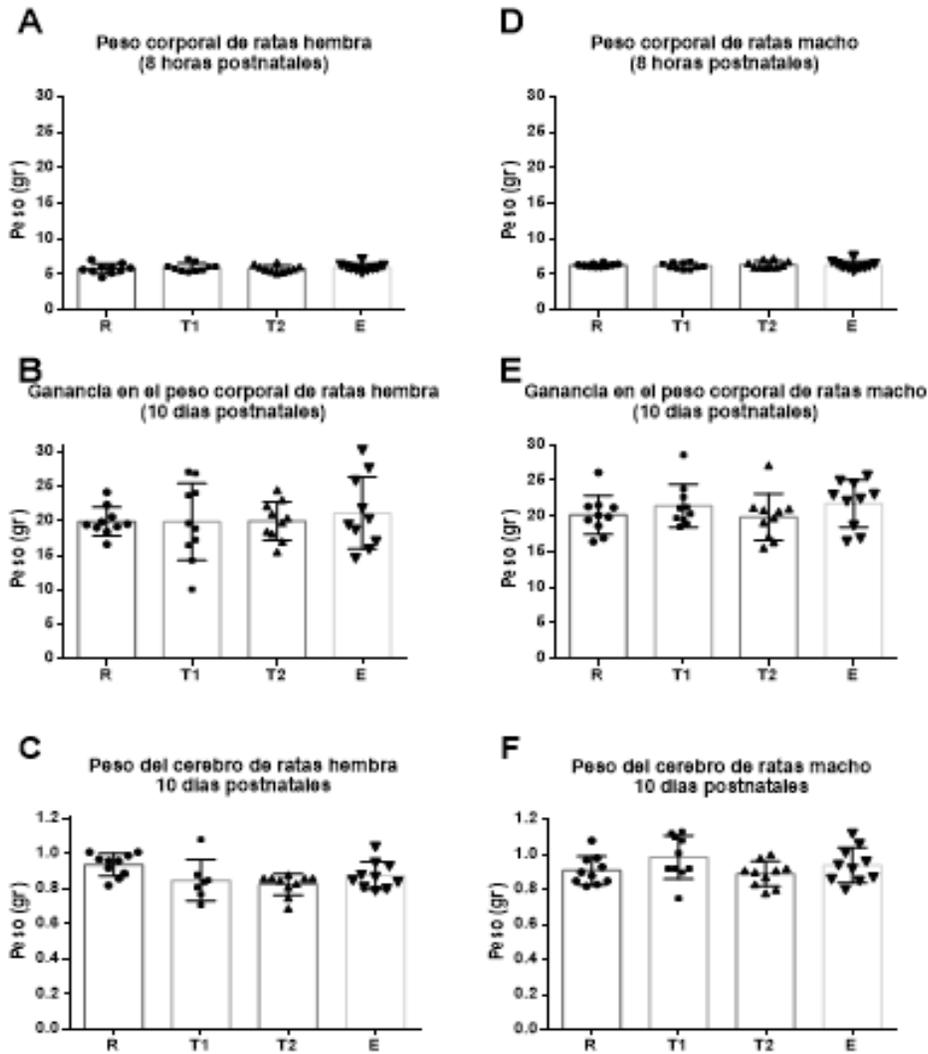


Figura 6. El peso corporal promedio de hembras y machos controles y experimentales no difiere entre grupos y entre sexos. Análisis cuantitativo del peso corporal (gramos) de (A) Hembras y (D) Machos a las 8 horas postnatales (antes de las distintas intervenciones experimentales) y a los 10 días postnatales (antes del sacrificio) de (B) Hembras y (E) Machos respectivamente, del peso del cerebro postmortem (C y F). No se encontró diferencias estadísticamente significativas por medio de la prueba ANOVA ($p < 0.01$). (R = sin tratamiento alguno; E = enucleados; T1 = anestesiados por hipotermia; T2 = cisura en el parpado).

7.2 El área ocupada por el SCBPM en la s1 es mayor en el grupo de crías enucleadas de ambos sexos

Estudios previos han mostrado que la enucleación bilateral neonatal en roedores conduce a una expansión de los barriles del SCBPM (*Martínez-Méndez et al., 2013*). En nuestro análisis no se mostraron diferencias entre ratas hembras con respecto a los machos, por lo que se decidió unirlos en una sola base de datos. De acuerdo con ello, observamos un incremento significativo (21-23%) del valor promedio de la suma del área de los barriles en las crías E, con relación a los valores obtenidos para el mismo parámetro en los grupos R1, T1 y T2 (*Figura 7A*). Aunque, el valor promedio del área para el SCBPM y la corteza interbarril tiende a incrementarse o decrementarse, respectivamente, en las crías E con relación a los valores obtenidos para los grupos R1, T1 y T2, estas diferencias no fueron estadísticamente significativas (*Figuras 7B y C*). Finalmente, se observa que el proceso de anestesia por hipotermia contribuye en un 7% a la expansión de S1 en los animales enucleados (*Figuras 7D*). Esta circunstancia hace que, la diferencia de los valores promedio del área de los barriles en las crías E, con relación a los valores obtenidos para el mismo parámetro en los grupos T1, alcance una significancia estadísticamente menor ($p < 0.001$) en comparación con la diferencia con a R y T2 ($p < 0.0001$). El resultado comentado no parece reflejar diferencias importantes en la variabilidad intergrupar (dispersión de los datos o desviaciones típicas), pues ésta es similar en cada uno de los grupos.

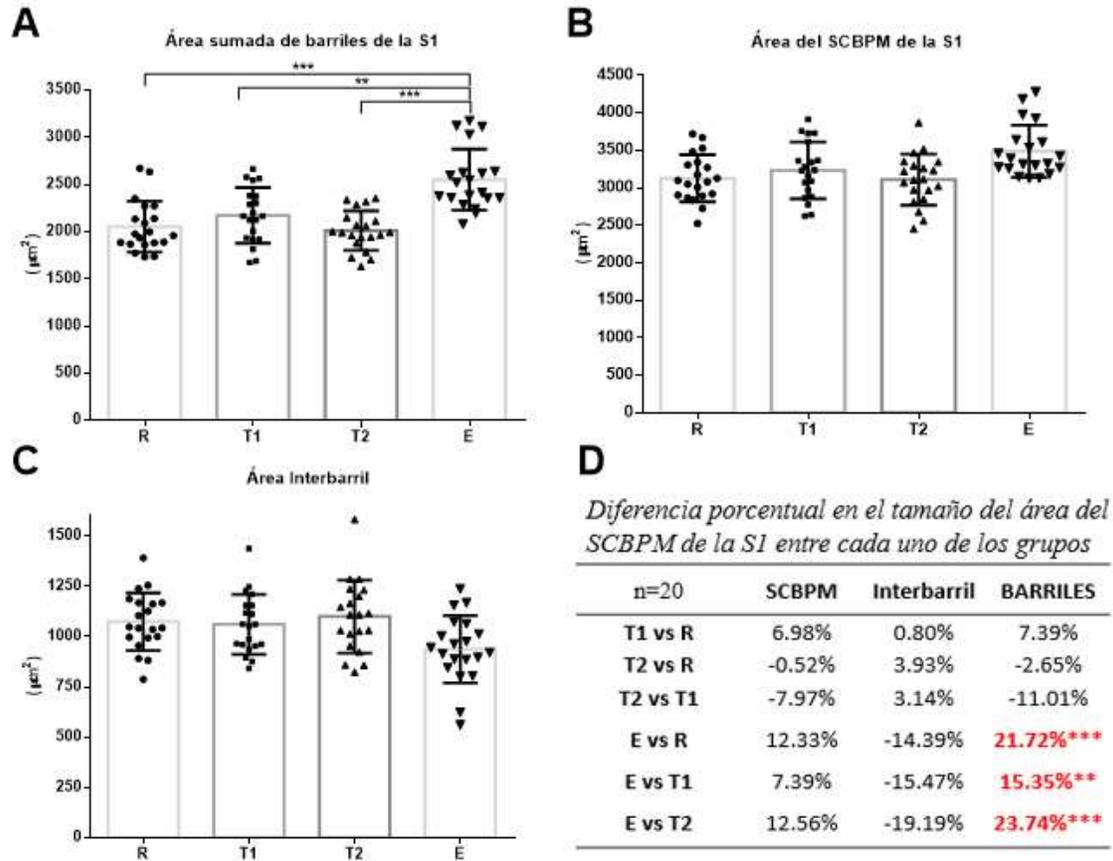


Figura 7. El área ocupada por los barriles del SCBPM de la S1 es mayor en ratas que fueron enucleadas al nacimiento. Gráficas de barras que muestran el promedio (\pm desviación estándar) (A) del área sumada de los barriles, (B) el área completa del SCBPM y (C) del área interbarril en la S1 de ratas agrupadas en los diferentes tratamientos experimentales. Los corchetes señalan las diferencias estadísticamente significativas entre los identificados. (D) Cuadro que presenta las diferencias porcentuales intergrupales para cada una de las áreas estimadas. Prueba ANOVA y análisis *post-hoc* con el ajuste de Bonferroni. ($p < 0.001$ ** y $p < 0.0001$ ***). (R = sin tratamiento alguno; E = enucleados; T1 = anestesiados por hipotermia; T2 = cisura en el parpado).

7.3 La microbiota colónica en las ratas enucleadas muestra un incremento en la proporción de bifidobacterias

La estimación del número total de bacterias se obtuvo con base en la suma de los conteos obtenidos en los cuatro cultivos específicos. Este valor fue similar para cada uno de los grupos (Figura 8A). Resultados semejantes fueron obtenidos al comparar el estimado del número total de lactobacilos, enterobacterias y E. coli entre los diferentes grupos experimentales (Figura

suplementaria 1). Finalmente, con relación a las proporciones de los distintos tipos de bacterias estudiadas, no encontramos diferencias entre los valores correspondientes para cada tipo de bacteria entre los distintos grupos experimentales (Figura 8B), con excepción de la proporción correspondiente a las bifidobacterias, que se encontraron elevadas en crías enucleadas (Figura 8B). Con referencia a este último hallazgo, alrededor del 50% de las crías enucleadas mostraron un incremento en el número total de bifidobacterias a los 10 días (Figura 8C).

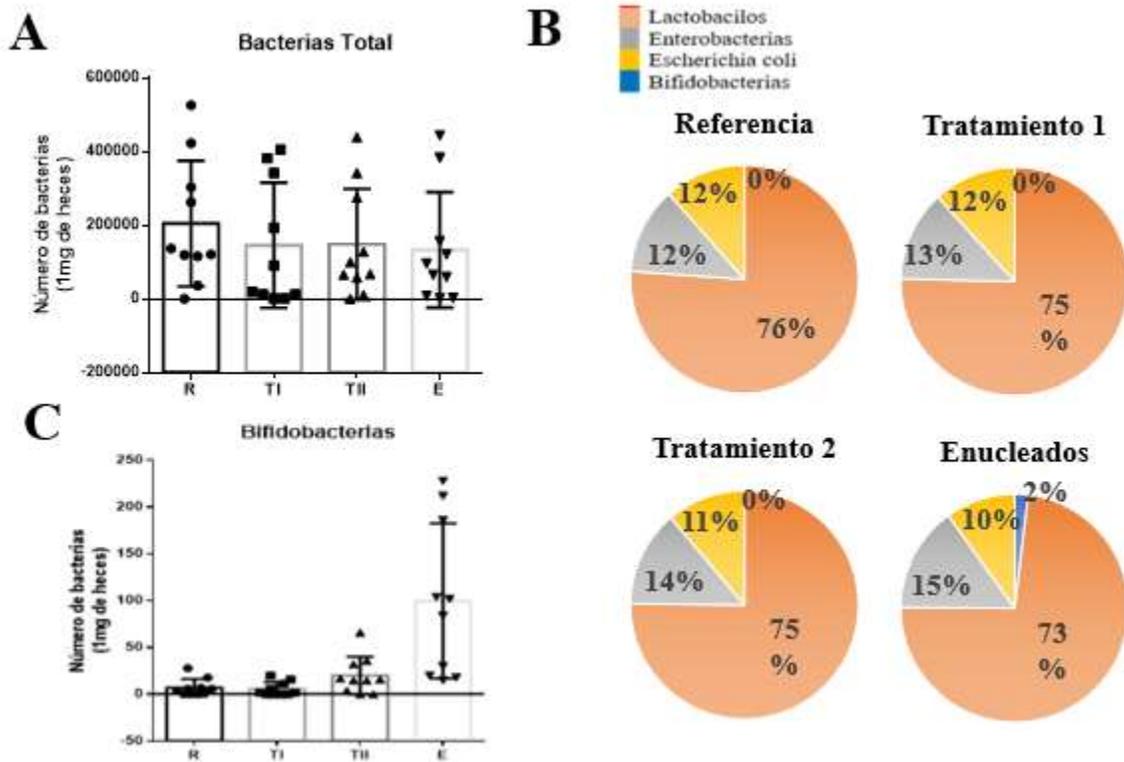


Figura 8. El número total de bacterias colónicas es similar en los animales con diferentes tratamientos experimentales, pero la proporción de bifidobacterias es mayor en ratas enucleadas. (A) Gráfica de barras que muestra el promedio (\pm desviación estándar) estimación del total de bacterias por miligramo de heces colectadas y cultivadas en los diferentes medios, por cada tratamiento experimental. (B) Gráficas de pastel que muestran la relación proporcional de lactobacilos, enterobacterias, *Escherichia coli*, bifidobacterias, en cada grupo experimental. Se observa que, para el caso de lactobacilos (anaranjado), enterobacterias (gris), *Escherichia coli* (amarillo), las diferencias son mínimas. En contraste, para el grupo de bifidobacterias (azul), la proporción es del 2% en el grupo de crías enucleadas; estas grupo bacteriano no apareció en el resto de los grupos de ratas estudiadas. (C) Gráfica de barras que muestra el número estimado para bifidobacterias observado para cada grupo experimental; la estimación es mayor para los animales enucleados al nacimiento. (R = sin tratamiento alguno; E = enucleados; T1 = anestesiados por hipotermia; T2 = cisura en el párpado).

De acuerdo con los datos previamente mostrados se instrumentó un *Análisis de Componentes Principales* (ACP) de tres dimensiones (*Cuadro 2 y Figura 9*). En él, se identificaron las interacciones que se establecen entre el número total estimado de lactobacilos, enterobacterias, coliformes o bifidobacterias, con la dimensiones correspondientes al área total ocupada por barriles y al área del SCBPM en la S1. Nuestros resultados mostraron que la cantidad de coliformes, enterobacterias y lactobacilos explican el 29.21, 23.81 y 18.44%, respectivamente, de la varianza para el *Componente Principal 1* (CP1). En el caso del CP2, el área ocupada por los barriles y del SCBPM explican el 36.44 y 30.49%, de la varianza, respectivamente. Finalmente, en el CP3 el número de bifidobacterias explica el 92.77% de la varianza.

Cuadro 2. *Distribución de componentes principales con las seis variables que determinan el fenotipo para todos los grupos experimentales. Se tomaron en cuenta tres componen en tres dimensiones del plano de distribución.*

Variables	CP1	CP2	CP3
Área sumada de barriles	14.64%	36.44%	0.08%
Área del SCBPM	13.87%	30.49%	0.40%
Estimación de Lactobacilos	18.44%	5.94%	5.11%
Estimación de Enterobacterias	29.21%	12.97%	0.53%
Estimación de Escherichia coli	23.81%	14.07%	1.10%
Estimación de Bifidobacterias	0.03%	0.09%	92.78%

La varianza o distribución mostrada en el análisis de CP, es similar entre los diferentes grupos (*Figura 9A*). Cada variable es representada por un vector de Eigen. Éstos reflejan la participación de cada variable sobre la varianza total observada para cada grupo experimental. Se grafican únicamente dos dimensiones (CP1 y CP2), en las que participan las variables con respecto al área ocupada por los barriles y el SCBPM de la S1, y el número estimado de lactobacilos,

enterobacterias y coliformes. En una tercera dimensión, se observa la participación de la variable del número estimado para bifidobacterias.

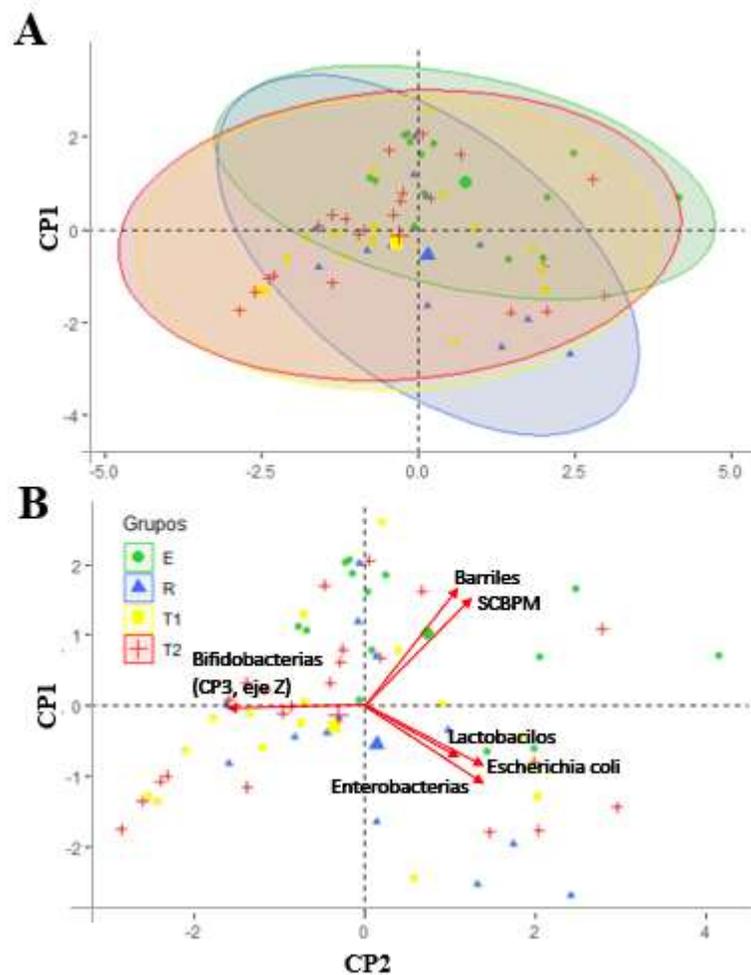


Figura 9. Gráfico de dos dimensiones correspondiente al análisis de componentes principales con respecto a el área ocupada por los barriles y el número estimado de bacterias colónicas en los diferentes grupos. Análisis del área de los barriles del SCBPM de la S1 y el conteo de los diferentes de bacterias intestinales cultivadas en ratas de 10 días postnatales en los diferentes tratamientos. En las gráficas se puede apreciar, para el componente principal 1 y 2 (CP1 y CP2), la distribución de los datos. Cada símbolo y color representa a los animales en los diferentes tratamientos ajustado de acuerdo con cada componente. (A) Las elipses representan el intervalo de confianza 95% de distribución de los datos por casa uno de los grupos. Las figuras B no muestran elipses para mejor apreciación de los datos, pero se señala en flechas rojas los vectores Eigen para cada variable tomada en cuenta en el análisis. (R = sin tratamiento alguno; E = enucleados; T1 = anestesiados por hipotermia; T2 = cisura en el parpado).

8. DISCUSIÓN

La enucleación ocular bilateral en ratas neonatas incrementa el área cortical ocupada por la S1 (*Martínez-Mendez et al., 2013*). Los mecanismos que conducen a esta expansión son aún poco claros. Recientemente, *Fetter-Pruneda et al. (2013)* mostraron que la inhibición de la desacetilación de histonas mediante el suministro de AVP, bloquea la expansión de S1, retrasando (i.e., normalizando) el inicio de su formación. Los resultados referidos sugieren que existen factores exógenos que modulan epigenéticamente la plasticidad intermodal en ratas enucleadas al nacimiento. Desconocemos aún si factores sistémicos endógenos también pudiesen modular este proceso. Al respecto, evidencia creciente apoya la posibilidad de que el ácido butírico regula diversos procesos plásticos neurales tanto en el desarrollo como en la vida adulta (*Hoban, et al., 2016; Luczynki, et al., 2016; Matsumoto, et al., 2008; Miletta, et al., 2014*). Una de las fuentes principales de ácido butírico en el cuerpo de los mamíferos son las bifidobacterias colónicas (*Sanz, Collado & Dalmau, 2006; Valles-Colomer et al., 2019*). Al fermentar fibras dietéticas a través de procesos anaeróbicos, este grupo bacteriano produce butirato que pasa posteriormente al torrente sanguíneo. Por ello, cambios en la composición del contenido de bifidobacterias de la microbiota colónica se asocia con alteraciones diversas de la morfofisiología neural, demostrablemente asociado con la baja o alta disponibilidad de butirato (*Gundersen & Blendy, 2009; Miletta et al., 2014; Rose et al., 2018*). Por lo que, en el presente trabajo, evaluamos si la enucleación se acompaña de una remodelación de la microbiota colónica, que pudiese favorecer la expansión de S1. Nuestros resultados mostraron que las crías de rata enucleadas al nacimiento expanden el área integrada de los barriles en el SCBPM. En asociación con ello, las crías enucleadas mostraron un incremento en la proporción de bifidobacterias con relación a los observado en los otros grupos experimentales. Es destacable que los grupos de ratas sujetas a anestesia por hipotermia también

mostraron un expansión del área integrada de los barriles (7.3%), si bien no hubo cambios relevantes en la proporción de bifidobacterias. Finalmente, es importante mencionar que de acuerdo con el análisis de CP, los cambios en la proporciones de bifidobacterias explican un porcentaje significativo de la varianza fenotípica entre grupos. Así, circunstancialmente, nuestros resultados favorecen la posibilidad de que productos secretados por la microbiota colónica pudiesen modular la plasticidad intermodal en las ratas enucleadas. Estudios posteriores deberán incluir el análisis de la microbiota colónica en edades más tempranas, así como estimar la concentración de butirato en tejido nervioso y suero durante los primeros 10 días de vida. También se deberá evaluar el proceso de expansión en crías libres de gérmenes en el mismo periodo.

Fetter-Pruneda et al. (2013) mostraron que la desacetilación de la histona 4 acompaña a la expansión. Cuando el proceso de desacetilación se inhibe con AVP, la expansión de la S1 se impide. El incremento observado de bifidobacterias, acompañado por un presunto incremento del butirato, debería impedir que la expansión de S1 ocurriese en las ratas enucleadas pues éste también inhibe a las deacetilasas de histonas que actúan sobre las histonas 3 y 4 (*Gundersen & Blendy, 2009*). Aunque el efecto podría parecer paradójico, sabemos que el Olfr1443, un receptor olfativo que liga butirato (*Halperin Kuhns et al., 2019*), se encuentra reducido en la S1 de ratas enucleadas, por lo que el efecto de ligando se pudiese ver interferido. Es claro que la determinación de butirato en sangre durante los 10 primeros días de vida se torna central para ayudar a resolver este aspecto.

Otro resultado importante es la observación de que la baja temperatura conduce a una expansión del área integrada de barriles. Pensamos que pudiera ser un efecto asociado con el estrés neonatal. El estrés en edades temprana está asociado a la modificación de funciones neuroendocrinas y cambios de la capacidad plástica neuronal (*Grundwald & Brunton, 2015*), así como con la

disminución de algunas funciones inmunes y proinflamatorias en el sistema nervioso (*Wu et al., 2017*). También, el estrés es asociado a cambios epigenéticos, en particular, tiende a ocasionar un incremento en los niveles de desacetilación de histonas, promoviendo cambios en la transcripción de genes que participan en la consolidación de sinapsis (*Vargas-López, Lamprea, Múnera, 2016*).

La presente tesis constituye una primera aproximación al posible papel de la microbiota sobre la plasticidad ontogenética intermodal. Reconocemos que esta investigación aún es corta en alcances, pero permite proveer de información necesaria para tomar decisiones del camino a seguir. Además de las recomendaciones expresadas al final del párrafo primero de esta sección, deseamos agregar algunas reflexiones que podrían enriquecer el trabajo subsecuente en esta línea. Así, consideramos que se debe investigar los posibles efectos de la enucleación sobre la colonización y composición de la microbiota abarcando el mayor número de especies posibles, a través de la ejecución de análisis meta-genómicos (*Rojo et al., 2017*), prestando mayor atención en el género de bacterias *Clostridium* debido a que este grupo es uno de los principales productores de butirato (*Brunser et al., 2006*). También será necesario estudiar el efecto de la remodelación de la microbiota inducida por manipulaciones de la dieta, sobre la disponibilidad de butirato y sobre la diversidad individual de la expansión de S1. Finalmente, sería indispensable estudiar los efectos de la enucleación sobre la microbiota de otras partes del cuerpo.

9. CONCLUSIONES

- 1) Las crías de rata enucleadas al nacimiento muestran una expansión de S1 a los 10 días de vida, al compararse con los grupos de referencia y control.
- 2) Un 30% de la expansión observada en S1 es explicada por el estrés que genera la exposición a hipotermia que tiene lugar la cirugía de enucleación.
- 3) Las crías de rata enucleadas al nacimiento muestran un incremento de bifidobacterias a los 10 días de vida, al compararse con los grupos de referencia y control.
- 4) El estimado total y proporcional de lactobacilos, enterobacterias y coliformes no difiere entre los grupos experimentales.
- 5) La varianza que se observa en el análisis de Componentes Principales en la muestra de ratas enucleadas y control, es explicada en parte por el número estimado de bacterias colónicas tanto bifidobacterias, enterobacterias, coliformes y lactobacilos, pero este resultado no determina una relación más directa.

10. BIBLIOGRAFÍA

- Ahmad, S., Ramadoss, M., & Mahadevan, V. (2016). Histone Deacetylase (HDAC) Inhibitors-emerging roles in neuronal memory, learning, synaptic plasticity and neural regeneration. *Current neuropharmacology*, 14(1), 55-71.
- Arnold, S. (2012). Cytochrome c oxidase and its role in neurodegeneration and neuroprotection. In *Mitochondrial Oxidative Phosphorylation* (pp. 305-339). *Springer New York*.
- Báez-Saldaña, A., Fetter-Pruneda, I., Fuentes-Farías, A. L., Granados-Rojas, L., Gutiérrez-Ospina, G., Martínez-Méndez, R., Meléndez-Herrera, E., Mendoza-Torreblanca, J., & Sandoval-Velasco, M. (2009). Brain Plasticity, Signal Transduction and Epigenesis: a Missing Link Revealed. *Annual Review of Biomedical Sciences*, 11, 114-122.
- Bavelier, D., & Neville, H. J. (2002). Cross-modal plasticity: where and how? *Nature Reviews Neuroscience*, 3(6), 443-452.
- Berardi, N., Sale, A., & Maffei, L. (2015). Brain structural and functional development: genetics and experience. *Developmental Medicine & Child Neurology*, 57(s2), 4-9.
- Bercik, P., Denou, E., Collins, J., Jackson, W., Lu, J., Jury, J., Deng, Y., Blennerhassett, P., Macri, J., McCoy K. D., Verdu, E. F. & Collins, S. M. (2011). The intestinal microbiota affect central levels of brain-derived neurotrophic factor and behavior in mice. *Gastroenterology*, 141(2), 599-609.
- Bourassa, M. W., Alim, I., Bultman, S. J., & Ratan, R. R. (2016). Butyrate, neuroepigenetics and the gut microbiome: can a high fiber diet improve brain health? *Neuroscience letters*, 625, 56-63.
- Bravo, J. A., Forsythe, P., Chew, M. V., Escaravage, E., Savignac, H. M., Dinan, T. G., Bienenstock, J. & Cryan, J. F. (2011). Ingestion of *Lactobacillus* strain regulates emotional behavior and central GABA receptor expression in a mouse via the vagus nerve. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(38), 16050-16055.
- Breza, J. M., & Contreras, R. J. (2012). Acetic acid modulates spike rate and spike latency to salt in peripheral gustatory neurons of rats. *Journal of neurophysiology*, 108(9), 2405-18.
- Bronchti, G., Schönenberger, N., Welker, E., & Van der Loos, H. (1992). Barrelfield expansion after neonatal eye removal in mice. *Neuroreport*, 3(6), 489-492.
- Brunser, O., Gotteland, M., Cruchet, S., Figueroa, G., Garrido, D., & Steenhout, P. (2006). Effect of a milk formula with prebiotics on the intestinal microbiota of infants after an antibiotic treatment. *Pediatric research*, 59(3), 451-456.
- Carty, M., & Bowie, A. G. (2011). Evaluating the role of Toll-like receptors in diseases of the central nervous system. *Biochemical pharmacology*, 81(7), 825-837.

- Collins, S. M., Surette, M., & Bercik, P. (2012). The interplay between the intestinal microbiota and the brain. *Nature Reviews Microbiology*, 10(11), 735-742.
- Coullon, G. S. L., Jiang, F., Fine, I., Watkins, K. E., & Bridge, H. (2015). Subcortical functional reorganization due to early blindness. *Journal of Neurophysiology*, 113(7), 2889–2899.
- DeCastro, M., Nankova, B. B., Shah, P., Patel, P., Mally, P. V., Mishra, R., & La Gamma, E. F. (2005). Short chain fatty acids regulate tyrosine hydroxylase gene expression through a cAMP-dependent signaling pathway. *Molecular brain research*, 142(1), 28-38.
- Fagiolini, M., Jensen, C. L., & Champagne, F. A. (2009). Epigenetic influences on brain development and plasticity. *Current opinion in neurobiology*, 19(2), 207-212.
- Fetter, I. A. (2013). Evaluación de la Reorganización Cromatínica durante la Plasticidad Cortical de la rata engeuecida al nacimiento. Tesis que para obtener el grado de: Doctor en Ciencias. Universidad Nacional Autónoma de México: México. Tutor principal: Dr. Gabriel Gutiérrez Ospina
- Fetter-Pruneda, I., Geovannini-Acuña, H., Santiago, C., Ibararán-Viniegra, A. S., Martínez-Martínez, E., Sandoval-Velasco, M., Uribe-Figueroa, L., Padilla-Cortés, P., Mercado-Célis, G., & Gutiérrez-Ospina, G. (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. doi:10.1371/journal.pone.0054940
- Fox, M., Knorr, D. A., & Haptonstall, K. M. (2019). Alzheimer's disease and symbiotic microbiota: an evolutionary medicine perspective. *Annals of the New York Academy of Sciences*.
- Frye, R. E., Rose, S., Chacko, J., Wynne, R., Bennuri, S. C., Slattery, J. C., Tippett, M., Delhey, L., Melnyk, S., Kahler, S. G., & MacFabe, D. F. (2016). Modulation of mitochondrial function by the microbiome metabolite propionic acid in autism and control cell lines. *Translational psychiatry*, 6(10), e927.
- Fung, T. C., Olson, C. A., & Hsiao, E. Y. (2017). Interactions between the microbiota, immune and nervous systems in health and disease. *Nature Neuroscience*, 20(2), 145-155.
- Grenham, S., Clarke, G., Cryan, J. F., & Dinan, T. G. (2011). Brain–gut–microbe communication in health and disease. *Frontiers in physiology*, 2, 94.
- Gougoux, F., Zatorre, R. J., Lassonde, M., Voss, P., & Lepore, F. (2005). A functional neuroimaging study of sound localization: visual cortex activity predicts performance in early-blind individuals. *PLoS biology*, 3(2), e27.
- Gundersen, B. B., & Blendy, J. A. (2009). Effects of the histone deacetylase inhibitor sodium butyrate in models of depression and anxiety. *Neuropharmacology*, 57(1), 67-74.
- Gutiérrez-Ospina, G., Calikoglu, A. S., Ye, P., & D'Ercole, A. J. (1996). In vivo effects of insulin-like growth factor-I on the development of sensory pathways: analysis of the primary somatic sensory cortex (S1) of transgenic mice. *Endocrinology*, 137(12), 5484-5492.

- Han, K. S., Balan, P., Hong, H. D., Choi, W. I., Cho, C. W., Lee, Y. C., Mounghan, P. J. & Singh, H. (2014). Korean ginseng modulates the ileal microbiota and mucin gene expression in the growing rat. *Food & function*, 5(7), 1506-1512.
- Halperin Kuhns, V. L., Sanchez, J., Sarver, D. C., Khalil, Z., Rajkumar, P., Marr, K. A., & Pluznick, J. L. (2019). Characterizing Novel Olfactory Receptors Expressed in the Renal Cortex. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*.
- Heijtz, R. D., Wang, S., Anuar, F., Qian, Y., Björkholm, B., Samuelsson, A., Hibberd, M. L., Forsberg, H., & Pettersson, S. (2011). Normal gut microbiota modulates brain development and behavior. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(7), 3047-3052.
- Hoban, A. E., Stilling, R. M., Ryan, F. J., Shanahan, F., Dinan, T. G., Claesson, M. J., Clarke, G., & Cryan, J. F. (2016). Regulation of prefrontal cortex myelination by the microbiota. *Translational psychiatry*, 6(4), e774.
- Jitsuki, S., Takemoto, K., Kawasaki, T., Tada, H., Takahashi, A., Becamel, C., Sano, A., Yuzaki, M., Zukin, R. S., Ziff, E. W., Kessels, H. W. & Takahashi, T. (2011). Serotonin mediates cross-modal reorganization of cortical circuits. *Neuron*, 69(4), 780-792.
- Kasubuchi, M., Hasegawa, S., Hiramatsu, T., Ichimura, A., & Kimura, I. (2015). Dietary gut microbial metabolites, short-chain fatty acids, and host metabolic regulation. *Nutrients*, 7(4), 2839-2849.
- Koh, A., De Vadder, F., Kovatcheva-Datchary, P., & Bäckhed, F. (2016). From dietary fiber to host physiology: short-chain fatty acids as key bacterial metabolites. *Cell*, 165(6), 1332-1345.
- Luczynski, P., Whelan, S. O., O'sullivan, C., Clarke, G., Shanahan, F., Dinan, T. G., & Cryan, J. F. (2016). Adult microbiota-deficient mice have distinct dendritic morphological changes: differential effects in the amygdala and hippocampus. *European Journal of Neuroscience*, 44(9), 2654-2666.
- Maruta, H., Yoshimura, Y., Araki, A., Kimoto, M., Takahashi, Y., & Yamashita, H. (2016). Activation of AMP-Activated Protein Kinase and Stimulation of Energy Metabolism by Acetic Acid in L6 Myotube Cells. *PloS one*, 11(6), e0158055.
- Matsumoto, M., Inoue, R., Tsukahara, T., Ushida, K., Chiji, H., Matsubara, N., & Hara, H. (2008). Voluntary running exercise alters microbiota composition and increases n-butyrate concentration in the rat cecum. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 72(2), 572-576.
- Martínez-Méndez, R., Martínez-Martínez, E., Villafán-Monroy, H., Guzmán-López, J. A., Fuentes-Farías, A. L., Romo-González, T., Chavarría-Krauser, A., & Gutiérrez-Ospina, G. (2013) 4. Body and brain plasticity: Unraveling its principles through blindness.
- MacFabe, D. F., Rodríguez-Capote, K., Hoffman, J. E., Franklin, A. E., Mohammad-Asef, Y., Taylor, A. R., Boon, F., & Ossenkopp, K. P. (2008). A novel rodent model of autism: intraventricular infusions of propionic acid

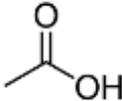
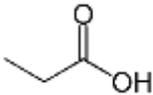
- increase locomotor activity and induce neuroinflammation and oxidative stress in discrete regions of adult rat brain. *Am J Biochem Biotechnol*, 4(2), 146-66.
- Miletta, M. C., Petkovic, V., Eblé, A., Ammann, R. A., Flück, C. E., & Mullis, P. E. (2014). Butyrate increases intracellular calcium levels and enhances growth hormone release from rat anterior pituitary cells via the G-protein-coupled receptors GPR41 and 43. *PloS one*, 9(10), e107388.
- Nankova, B. B., Agarwal, R., MacFabe, D. F., & La Gamma, E. F. (2014). Enteric Bacterial Metabolites Propionic and Butyric Acid Modulate Gene Expression, Including CREB-Dependent Catecholaminergic Neurotransmission, in PC12 Cells-Possible Relevance to Autism Spectrum Disorders. *PloS one*, 9(8), e103740.
- Nicolelis, M. A., De Oliveira, L. M., Lin, R. C., & Chapin, J. K. (1996). Active tactile exploration influences the functional maturation of the somatosensory system. *Journal of neurophysiology*, 75(5), 2192-2196.
- Nys, J., Smolders, K., Laramée, M. E., Hofman, I., Hu, T. T., & Arckens, L. (2015). Regional Specificity of GABAergic Regulation of Cross-Modal Plasticity in Mouse Visual Cortex after Unilateral Enucleation. *The Journal of Neuroscience*, 35(32), 11174-11189.
- Perry, R. J., Peng, L., Barry, N. A., Cline, G. W., Zhang, D., Cardone, R. L. & Shulman, G. I. (2016). Acetate mediates a microbiome–brain– β -cell axis to promote metabolic syndrome. *Nature*, 534(7606), 213-217.
- Pluznick, J. L., Protzko, R. J., Gevorgyan, H., Peterlin, Z., Sipos, A., Han, J., Brunet, I., Wan L-X et al. (2013). Olfactory receptor responding to gut microbiota-derived signals plays a role in renin secretion and blood pressure regulation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(11), 4410-4415.
- 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.
- Riddle, D., Richards, A., Zsuppan, F., & Purves, D. (1992). Growth of the rat somatic sensory cortex and its constituent parts during postnatal development. *The Journal of neuroscience*, 12(9), 3509-3524.
- Rojo, D., Méndez-García, C., Raczowska, B. A., Bargiela, R., Moya, A., Ferrer, M., & Barbas, C. (2017). Exploring the human microbiome from multiple perspectives: factors altering its composition and function. *FEMS microbiology reviews*, 41(4), 453-478.
- Rörig, B., Klaus, G., & Sutor, B. (1996). Intracellular acidification reduced gap junction coupling between immature rat neocortical pyramidal neurones. *The Journal of physiology*, 490(1), 31-49.
- Rose, S., Bennuri, S. C., Davis, J. E., Wynne, R., Slattery, J. C., Tippett, M., Delhey, L., Kahler, S. G., MacFabe, D., & Frye, R. E. (2018). Butyrate enhances mitochondrial function during oxidative stress in cell lines from boys with autism. *Translational psychiatry*, 8(1), 42.

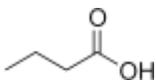
- Sanz, Y., Collado, M. C., & Dalmau, J. (2006). Contribución de la microbiota intestinal y del género *Bifidobacterium* a los mecanismos de defensa del huésped frente a patógenos gastrointestinales. *Acta pediatri esp*, 64(2), 74-78.
- Stilla, R., Hanna, R., Hu, X., Mariola, E., Deshpande, G., & Sathian, K. (2008). Neural processing underlying tactile microspatial discrimination in the blind: a functional magnetic resonance imaging study. *Journal of vision*, 8(10), 13-13.
- Stilling, R. M., Dinan, T. G., & Cryan, J. F. (2014). Microbial genes, brain & behaviour—epigenetic regulation of the gut–brain axis. *Genes, Brain and Behavior*, 13(1), 69-86.
- Thomas, R. H., Meeking, M. M., Mepham, J. R., Tichenoff, L., Possmayer, F., Liu, S., & MacFabe, D. F. (2012). The enteric bacterial metabolite propionic acid alters brain and plasma phospholipid molecular species: further development of a rodent model of autism spectrum disorders. *Journal of neuroinflammation*, 9(1), 153.
- Valles-Colomer, M., Falony, G., Darzi, Y., Tigchelaar, E. F., Wang, J., Tito, R. Y., Schiwecks, C., Kurilshikov, A., Joossens, M., Wijmenga, C., Claes, S., Van Oudenhove, L., Zhernakova, A., Vieira-Silva, S., & Raes, J. (2019). The neuroactive potential of the human gut microbiota in quality of life and depression. *Nature microbiology*, 1.
- Vargas-López, V., Lamprea, M. R., & Múnera, A. (2016). Histone deacetylase inhibition abolishes stress-induced spatial memory impairment. *Neurobiology of learning and memory*, 134, 328-338.
- Wu, W., Wang, Y., Zou, J., Long, F., Yan, H., Zeng, L., & Chen, Y. (2017). *Bifidobacterium* adolescents protects against necrotizing enterocolitis and upregulates TOLLIP and SIGIRR in premature neonatal rats. *BMC pediatrics*, 17(1), 1.
- Zeng, L., Zeng, B., Wang, H., Li, B., Huo, R., Zheng, P., Zhang, X., Du, X., Liu, M., Fang, Z., Xu, X., Zhou, C., Chen, J., Li, W., Guo, J., Wei, H. & Xie, P., (2016). Microbiota Modulates Behavior and Protein Kinase C mediated cAMP response element-binding protein Signaling. *Scientific Reports*, 6, 29998.

11. APÉNDICE

Apéndice A

Literatura que presenta información sobre la participación de Ácidos Grasos de Cadena Corta (AGCC), particularmente Acetato, Propionato y Butirato, en distintas funciones neurales.

Ácido Graso de Cadena corta	Generalidades	Regulación de funciones en el Sistema Nervioso	Referencia
<p>Ácido Acético (C₂H₄O₂)</p> 	<p>Uno de los AGCC más simples producto de la fermentación de carbohidratos (azúcares principalmente) por Lactobacilos.</p>	Es uno de los principales nutrientes que participan en el metabolismo energético de las células. Incrementa la fosforilación de AMC por medio de la activación de la <i>Protein Kinasa</i> .	Maruta et al. (2016)
		La disminución está asociada con la presencia de conductas depresivas y de ansiedad.	Valles-Colomer et al. (2019)
		Incrementa la liberación de insulina ante la presencia de Glucosa a partir de la excitación del sistema parasimpático en su división del nervio vago.	Perry et al. (2016)
		Modula la activación eléctrica del nervio geniculado ante la presencia de sabores salados.	Breza & Contreras (2012)
<p>Ácido Propiónico (C₃H₆O₂)</p> 	<p>Producto de fermentación de Lactobacilos, Enterobacterias, Bifidobacterias y otras bacterias del género clostridium. Es el AGCC más sintetizado a partir del consumo de carbohidratos (azúcares y fibras principalmente). Su primera actividad metabólica es llevada a cabo por el hígado para la síntesis de lípidos.</p>	Participa en la síntesis de <i>Tiroxina Hidroxilasa</i> (precursor de algunos Neurotransmisores) mediante la actividad de AMPc.	DeCastro et al. (2005)
		Forma parte de la cadena oxidativa dentro de la función mitocondrial para la actividad antioxidante de las células nerviosas.	Frye et al. (2016)
		Modula la función de proteínas <i>Gap Junctions</i> en células piramidales en corteza sensoriomotora y prefrontal.	Rörig, Klaus & Sutor (1996)
		En mayores cantidades está asociado con el aumento de la locomoción y la neuro-inflamación en ratas adultas.	MacFabe et al. (2008)
		La administración vía intracerebrovascular está asociada con la patogénesis del Autismo.	Thomas et al. (2012)
		La disminución está asociada con la presencia de conductas depresivas y de ansiedad tanto en modelos animales como primates humanos.	Heijtz et al. (2011); Valles-Colomer et al. (2019)
<p>Ácido Butírico (C₄H₈O₂)</p>	<p>Uno de los productos por medio de la fermentación de fibras y lácteos, por lactobacilos, enterobacterias (E. coli) y bifidobacterias, principalmente en ambientes anaeróbicos.</p>	Participa en la cadena de fosforilación oxidativa en la mitocondria de células nerviosas.	Rose et al. (2018)
		Induce un incremento de calcio intracelular en células de la pituitaria anterior por medio de la activación de receptores GPR41 y GPR43, asociado a	Miletta et al. (2014)



un aumento en la liberación de la hormona del crecimiento.	
La actividad física y el aumento de la respuesta del sistema simpático, incrementa la síntesis de butirato en el organismo.	Matsumoto et al. (2008)
Es un inhibidor de la desacetilación de histonas. Al incrementar la acetilación de histonas aumenta la transcripción de genes que participan en la plasticidad sináptica.	Bourassa et al. (2016)
Su incremento está asociado con la disminución de conductas tipo ansiosas y depresivas en ratones.	Gundersen & Blendy (2009)

12. FIGURA SUPLEMENTARIA

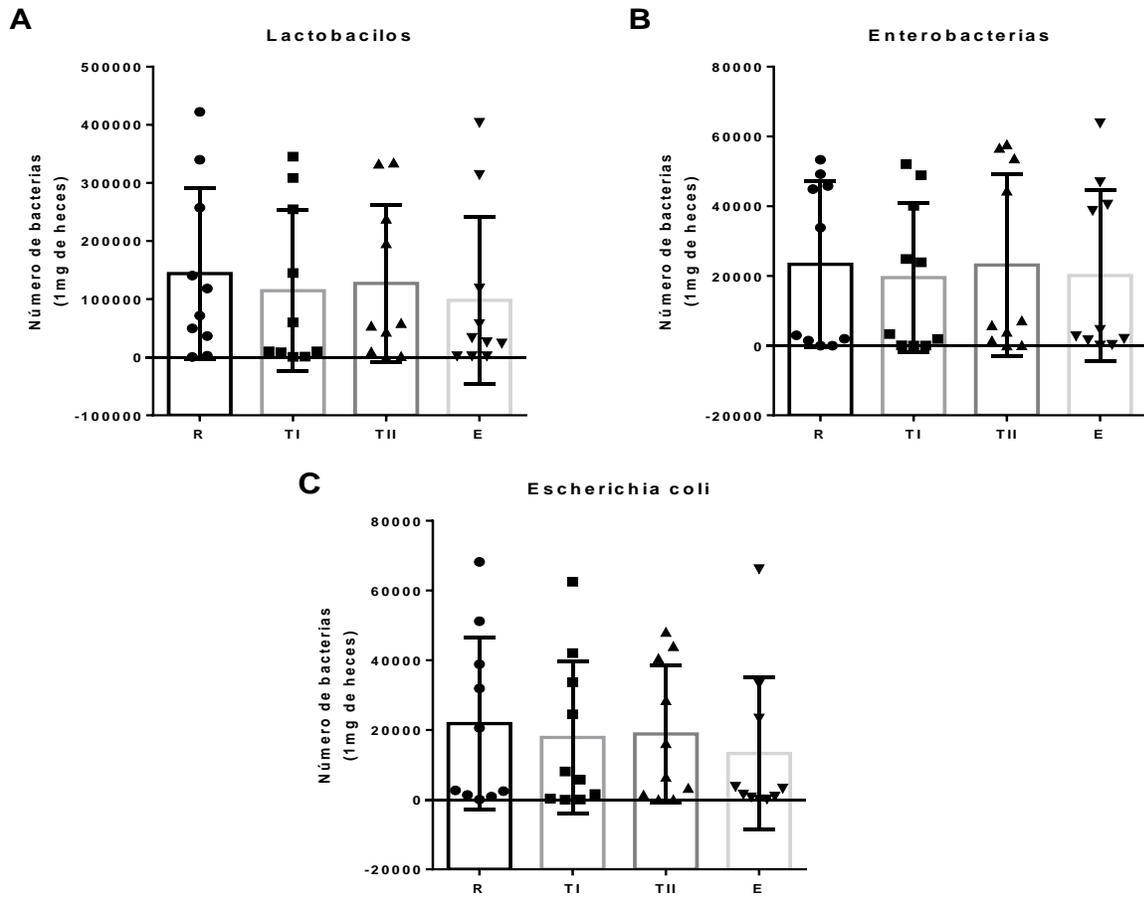


Figura suplementaria 1. Gráfica de barras que muestra el promedio (+/- desviación estándar) del número estimado de lactobacilos (A), enterobacterias (B) y coliformes (C) obtenido para cada grupo experimental; no se observan diferencias estadísticamente significativas. ANOVA de una vía y análisis *post-hoc* con el ajuste de Bonferroni. ($p < 0.01$). (R = sin tratamiento alguno; E = enucleados; T1 = anestesiados por hipotermia; T2 = cisuza en el parpado).