



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE PSICOLOGÍA

**EVALUACIÓN MORFOLÓGICA DE LOS ÁRBOLES DENDRÍTICOS DE
LAS NEURONAS ESTRELLADAS ESPINOSAS DE LA CAPA IV DE LA
CORTEZA SOMATOSENSORIAL PRIMARIA DE RATAS CEGADAS AL
NACIMIENTO**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE
LICENCIADO EN PSICOLOGÍA**

P R E S E N T A

JUAN CARLOS MARTÍNEZ GUERRA

DIRECTOR DE TESIS: DR. GABRIEL GUTIÉRREZ OSPINA

REVISOR DE TESIS: DR. OCTAVIO CÉSAR GARCÍA GONZÁLEZ

SINODALES

DRA. KARINA SIMÓN ARCEO

DR. RODRIGO PEDROZA LLINAS

MTRO. JOSÉ ANTONIO HERNÁNDEZ SANTOS



**Facultad
de Psicología**

CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX. JUNIO DE 2022.



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.

Agradecimientos

Al Dr. Gabriel Gutiérrez Ospina, por su apoyo, paciencia y asesoría a lo largo de estos años. Por todas sus enseñanzas y por acompañarme en este proceso.

A la Dra. Margarita Gómez Chavarín, por su apoyo y paciencia a lo largo de este proyecto. Sin su asesoría este proyecto no habría podido llevarse a cabo.

Al Dr. Miguel Lara Tapia de la Unidad de Microscopía del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM, por su apoyo en las reconstrucciones neuronales.

A mis padres y hermanos, por su cariño y apoyo. Por enseñarme con el ejemplo a salir adelante cuando las circunstancias son adversas.

A Fernanda, por su amistad y solidaridad en este camino. Por siempre estar presente y darme las palabras de aliento necesarias cuando más falta me hacían.

A todos quienes directa o indirectamente formaron parte de este proceso y contribuyeron a su conclusión.

El presente proyecto de investigación se llevó a cabo en el laboratorio B-220 del Departamento de Biología Celular y Fisiología del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM. Muchas gracias.



Contenido

1. Resumen	4
2. Introducción.....	5
3. Antecedentes	6
3.1 La plasticidad neuronal	6
3.2 La corteza somatosensorial primaria de la rata	6
3.3 El PMBSF y la plasticidad intermodal	7
3.3.1 Factores anatómicos que subyacen a la expansión del PMSBF en roedores cegados perinatalmente	9
4. Justificación y planteamiento del problema	11
5. Hipótesis.....	12
6. Objetivos	12
6.1 General	12
6.2 Específicos	12
7. Materiales y métodos	13
7.1 Animales	13
7.2 Enucleación.....	13
7.3 Obtención y procesamiento histológico de cortezas	14
7.4 Selección de neuronas y reconstrucciones	15
7.5 Análisis morfológico	16
7.6 Análisis estadístico.....	19
8. Resultados	20
9. Discusión.....	25
10. Conclusiones.....	28
11. Anexo	29
12. Referencias	30

1. Resumen

La pérdida de la vista en etapas tempranas del desarrollo postnatal conduce a una reorganización del sistema nervioso. En particular, en el cerebro de los roedores, la corteza somatosensorial primaria (S1) y la auditiva primaria incrementan su área, mientras que la corteza occipital, nominalmente visual, se torna bimodal respondiendo a estímulos auditivos y somestésicos. Los mecanismos celulares por los cuales estos cambios tienen lugar son poco claros. Para el caso de la S1, se presume que las neuronas corticales ubicadas en su capa IV, que reciben las aferencias talámicas somestésicas, incrementan el tamaño y la complejidad de sus árboles dendríticos. Sin embargo, esta hipótesis no ha sido evaluada. Por ello, en el presente trabajo, analizamos la morfología de los árboles dendríticos de las neuronas estrelladas espinosas (NEE) de la capa IV en la S1 de ratas intactas y de aquéllas sujetas a la remoción quirúrgica neonatal de los ojos (enucleación), empleando técnicas de impregnación argéntica tipo Golgi a los 30 y 60 días de edad. Esto nos permitió inferir si los patrones de crecimiento y las dimensiones de los árboles dendríticos se alteran en respuesta a la enucleación. Nuestros resultados mostraron que el promedio de la longitud dendrítica total, la distribución de las ramas dendríticas en función de la longitud intervalar, la complejidad de los árboles dendríticos y la longitud de las ramas dendríticas por orden de las NEE fueron comparables entre las ratas control y aquéllas enucleadas al nacimiento, a los 30 y 60 días de edad. Estos resultados claramente muestran que el patrón de crecimiento y las dimensiones de los árboles dendríticos de las NEE ubicadas en la capa IV de la S1 no se modifican en respuesta a la enucleación. Por ello, la expansión de la S1 observada en las ratas enucleadas al nacimiento no tiene un componente dendrítico local, sino que es más bien atribuible al sobrecrecimiento de los árboles terminales de las aferentes talamocorticales somestésicas. Dicho sobrecrecimiento resultaría en un mayor reclutamiento de las NEE en el dominio tangencial del espacio cortical.

2. Introducción

En el ámbito neurobiológico, se define como plasticidad neuronal a la capacidad perenne que muestran las neuronas para modificar su morfología y/o fisiología, de manera contingente, en respuesta a cambios inestimados que ocurren en el ambiente circundante a las propias neuronas o al organismo (Fox, 2002; Waite, 1984). Uno de los eventos en el que los cambios plásticos neuronales son más claros tiene lugar después de la pérdida de la vista consecutiva a la anoftalmia, la remoción quirúrgica de los ojos, o al desarrollo de estados tumorales o degenerativos de la retina (Bavelier & Neville, 2002). Específicamente, en los roedores, la extirpación de los globos oculares (enucleación), en etapas tempranas del desarrollo, conduce a un incremento en el área correspondiente a la representación corporal (Woolsey & Van der Loos, 1970), la cual se localiza en la corteza somatosensorial primaria (S1; Rauschecker, 1995, 1999). Sin embargo, aunque han transcurrido décadas desde que este fenómeno se describió como un proceso de plasticidad intermodal, los eventos citológicos que lo subyacen son aún desconocidos (Champoux et al., 2008; Rauschecker et al., 1992; Withington, 1992). Recientemente, diversos estudios han sugerido que los axones talamocorticales somatosensoriales crecen a una tasa acelerada en dirección a la S1 e incrementan su complejidad y volumen de distribución a su arribo a la capa IV de esta área cortical (Fetter-Pruneda et al., 2013; Martini et al., 2018; Mezzera & López-Bendito, 2015). La circuitería de la capa IV de la S1, sin embargo, también está formada por los árboles dendríticos de las neuronas estrelladas espinosas (NEE). A la fecha, desconocemos si éstos participan en el proceso de expansión de la S1. Por ello, el propósito principal de este trabajo fue el de evaluar los patrones de crecimiento y las dimensiones de los árboles dendríticos de las NEE ubicadas en la capa IV de la S1 en respuesta a la enucleación neonatal.

3. Antecedentes

3.1 La plasticidad neuronal

La plasticidad neuronal se define como la capacidad contingente de las células neurales para modificar su morfología funcional en respuesta a estímulos internos o externos de distinta naturaleza fisicoquímica (Mezzera & López-Bendito, 2015). Para el caso de la plasticidad neuronal inducida por daños significativos a los órganos sensoriales periféricos correspondientes a una modalidad sensorial, las investigaciones han mostrado que estas lesiones no sólo impactan la morfología funcional de las regiones del cerebro relacionadas con la modalidad sensorial afectada, sino que también inducen una reorganización de las demás vías sensoriales (i.e., plasticidad intermodal, Bavelier & Neville, 2002; Lee & Whitt, 2015; Rauschecker & Korte, 1993). Sin embargo, a pesar del progreso en las técnicas utilizadas hoy en día, y de los avances en las investigaciones realizadas, los mecanismos que rigen estos procesos plásticos, así como las modificaciones anatómicas que subyacen a los cambios fisiológicos que ocurren en el sistema nervioso aún son poco conocidos.

3.2 La corteza somatosensorial primaria de la rata

El sistema somatosensorial de la rata posee diversos atributos que lo hacen una excelente herramienta para modelar experimentalmente los procesos de plasticidad intermodal (Woolsey & Van der Loos, 1970). En particular, la capa IV de la S1 contiene un mapa corporal formado por unidades citoarquitectónicas denominadas barriles (Woolsey & Van der Loos, 1970). Cada barril representa agrupaciones de mecanorreceptores distribuidos sobre la superficie corporal. Las vibrisas faciales se encuentran representadas por el denominado subcampo de barriles posteromedial (PMBSF, por sus siglas en inglés; figura 1). Estudios previos llevados a cabo con tinciones histoquímicas para citocromo oxidasa han mostrado que estos barriles se expanden en respuesta a la enucleación perinatal (Fetter-Pruneda et al., 2013). Es menester mencionar que cada barril está constituido por los árboles terminales de las aferentes talamocorticales somestésicas, de la corteza contralateral y de

interneuronas ipsilaterales. Los bordes de los barriles están constituidos por los somas de las NEE cuyas dendritas se orientan hacia el interior de cada barril (Erzurumlu & Gaspar, 2012).

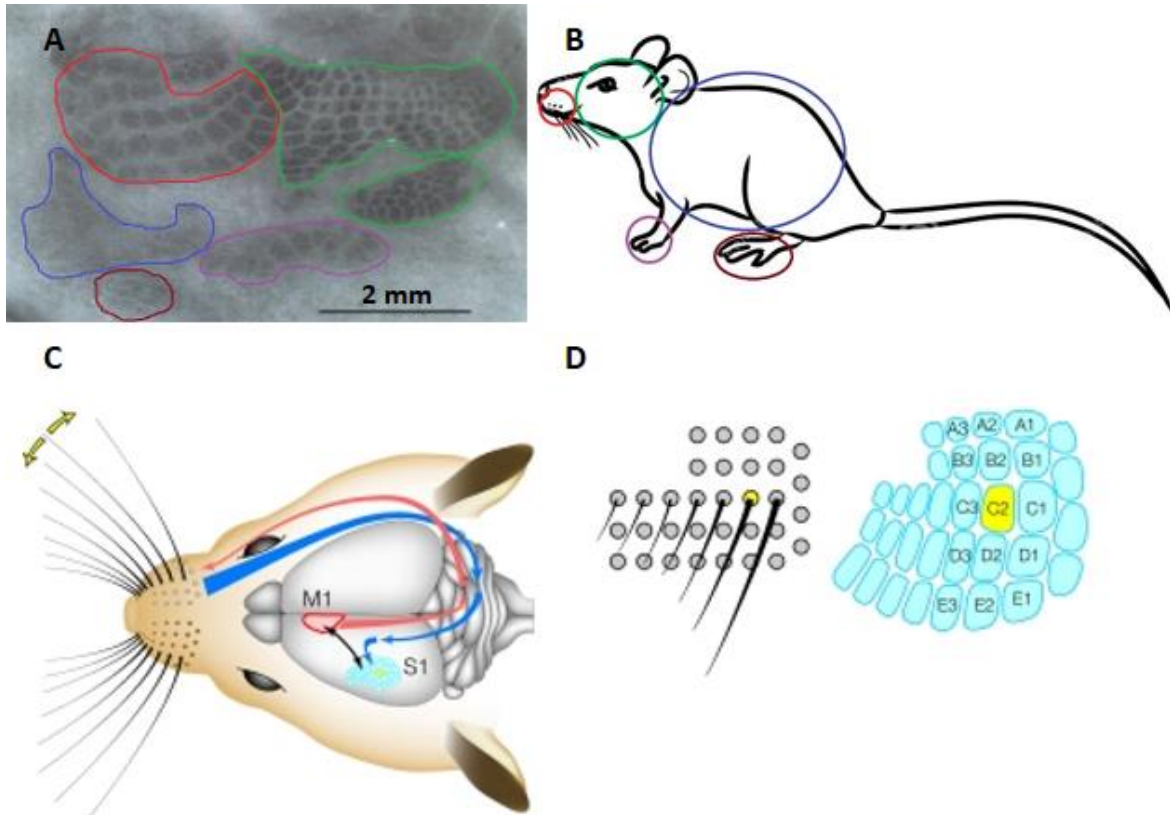


Figura 1 | Representación corporal en la corteza somatosensorial primaria (S1) de la rata. **A.** Fotomicrografía obtenida a partir de un corte tangencial de la S1, en su capa IV, teñida con deshidrogenasa succínica (modificado de Riddle et al., 1993). Se observan las distintas agrupaciones de barriles que representan las vibrisas (trazo en rojo claro), el dorso de la nariz y la mandíbula (trazos en verde), el tronco (trazo en azul) y la pata anterior (trazo en lila) y la posterior (trazo en marrón). **B.** Esquema de los segmentos corporales que son representados por cada subrepresentación en la S1 de la rata en la ilustración en A. **C.** Representación de la vía somatosensorial, desde las vibrisas hasta la S1 (delineada en azul). En términos generales, esta vía se inicia en los mecanorreceptores asociados a las vibrisas mistaciales que son inervadas por aferentes del nervio trigémino. Las fibras de proyección central se dirigen desde el ganglio del trigémino hacia las neuronas del núcleo principal trigeminal. Las neuronas centrales trigeminales proyectan hacia el complejo ventral posteromedial talámico. En turno, las neuronas talámicas proyectan a la S1, en donde alcanzan mayoritariamente a las neuronas corticales ubicadas en la capa IV, aunque también existen proyecciones a otras capas de la S1. **D.** Esquema que ilustra la representación isomórfica de las vibrisas mistaciales con los barriles del subcampo de barriles posteromedial en la S1 del cerebro de la rata (C y D, modificados de Aronoff & Petersen, 2009).

3.3 EI PMBSF y la plasticidad intermodal

Si bien diversas investigaciones han estudiado la plasticidad del PMBSF en unidades experimentales, cuyo objetivo es lograr la privación de esta vía somatosensorial mediante la remoción de los bigotes mistaciales, otro campo de

investigación que se ha explorado es aquél enfocado en entender los mecanismos de plasticidad del PMBSF tras la privación de la vía auditiva o visual (Jitsuki et al., 2011; Rauschecker et al., 1992). Con referencia a esta última línea de investigación, se ha encontrado que la pérdida de la función visual, asociada con la lesión de las estructuras nerviosas oculares durante las primeras horas de vida, conduce a la expansión del PMBSF. La magnitud de la expansión depende de la edad en la que ocurre dicha pérdida (Berardi et al., 2000; Dye et al., 2012) y del tipo de técnica utilizada para privar de la vista a la rata (Champoux et al., 2008; He et al., 2012). En general, las investigaciones apoyan que mientras más invasivas sean las manipulaciones y más temprano en el desarrollo se ejecuten, mayor será la expansión observada en el PMBSF (Waite, 1984). Es por ello que el PMBSF se ha tornado como una de las herramientas experimentales fundamentales para estudiar los efectos de la pérdida de la vista y de la audición sobre la organización morfofuncional de la S1 (Fetter-Pruneda et al., 2013; Karlen & Krubitzer, 2009; Rauschecker et al., 1992). Al respecto, cabe señalar que, si bien el PMBSF puede incrementar su tamaño tras la privación de una vía sensorial, como la vista o la audición, las investigaciones señalan que el tipo de lesión y la etapa del desarrollo en que ésta tiene lugar, así como la vía sensorial de la que se priva al organismo son factores determinantes en la magnitud del incremento del PMBSF. Por estas razones, es de vital importancia definir estos factores para diseñar un protocolo experimental. En la presente investigación nos enfocamos en las modificaciones del PMBSF tras la pérdida de la vista inducida mediante la enucleación perinatal.

En consonancia con lo hasta ahora descrito, diversos grupos han mostrado consistentemente que la mayor expansión del PMBSF en roedores adultos se logra si la enucleación se lleva a cabo durante las primeras horas de vida (Négyessy et al., 2000; Rauschecker, 1995; Rauschecker et al., 1992); la magnitud de la expansión se reduce progresivamente si la enucleación se lleva a cabo más tardíamente durante los primeros tres días de vida en roedores. Después del día cinco de vida postnatal, la expansión anatómica es inobservable (Fetter-Pruneda et al., 2013), aunque la plasticidad funcional de la representación pueda ocurrir a lo largo de la vida (Xerri et al., 1994). La disyunción anatómico-funcional observada en

las ratas enucleadas a distintas edades es un proceso fascinante que carece aún de explicación.

3.3.1 Factores anatómicos que subyacen a la expansión del PMBSF en roedores cegados perinatalmente

Como ha sido mencionado, han transcurrido décadas desde la primera descripción fenoménica de la plasticidad intermodal tanto en humanos como en unidades experimentales animales (Martínez-Méndez et al., 2013). No obstante, no existen aún explicaciones robustas que den cuenta de los cambios observados tanto en el sistema nervioso central como en el cuerpo de animales cegados al nacimiento. Nuestro grupo de trabajo (Fetter-Pruneda et al., 2013) y el encabezado por la Dra. López-Bendito (revisado en Mezzera & López-Bendito, 2015), hemos responsabilizado a las aferentes talamocorticales somatosensoriales de la expansión observada en el PMBSF de roedores enucleados perinatalmente (figura 2). Ambos grupos presumen que incrementos en el ritmo y modificaciones en el patrón del crecimiento axonal regulados por la relación que se establece entre la frecuencia y la amplitud de las espigas espontáneas de calcio conducen a que los árboles terminales de las aferentes talamocorticales somestésicas amplíen su volumen de ocupación en la capa IV de la S1. Esta teoría es apoyada por el hecho de que la inhibición de la actividad espontánea en la vía auditiva, prenatalmente, conduce a un aumento en el tamaño del PMBSF en la vida postnatal de las unidades experimentales (Moreno-Juan et al., 2017).

Si bien es indudable que una fase del proceso de especificación del PMBSF depende de la entrada de las aferentes talamocorticales a la capa IV de la S1 (Schlaggar & O'Leary, 1994), la reorientación y el crecimiento de los árboles dendríticos de las neuronas estrelladas espinosas son eventos que definen los sitios en los que los bordes de los barriles se establecen durante la especificación de la S1 (Jan & Jan, 2010). Teniendo en mente este detalle, es posible que el sobrecrecimiento de los árboles dendríticos de las NEE pudiese contribuir a la expansión de la S1 observada en roedores enucleados al nacimiento. En este trabajo, evaluamos esta posibilidad.

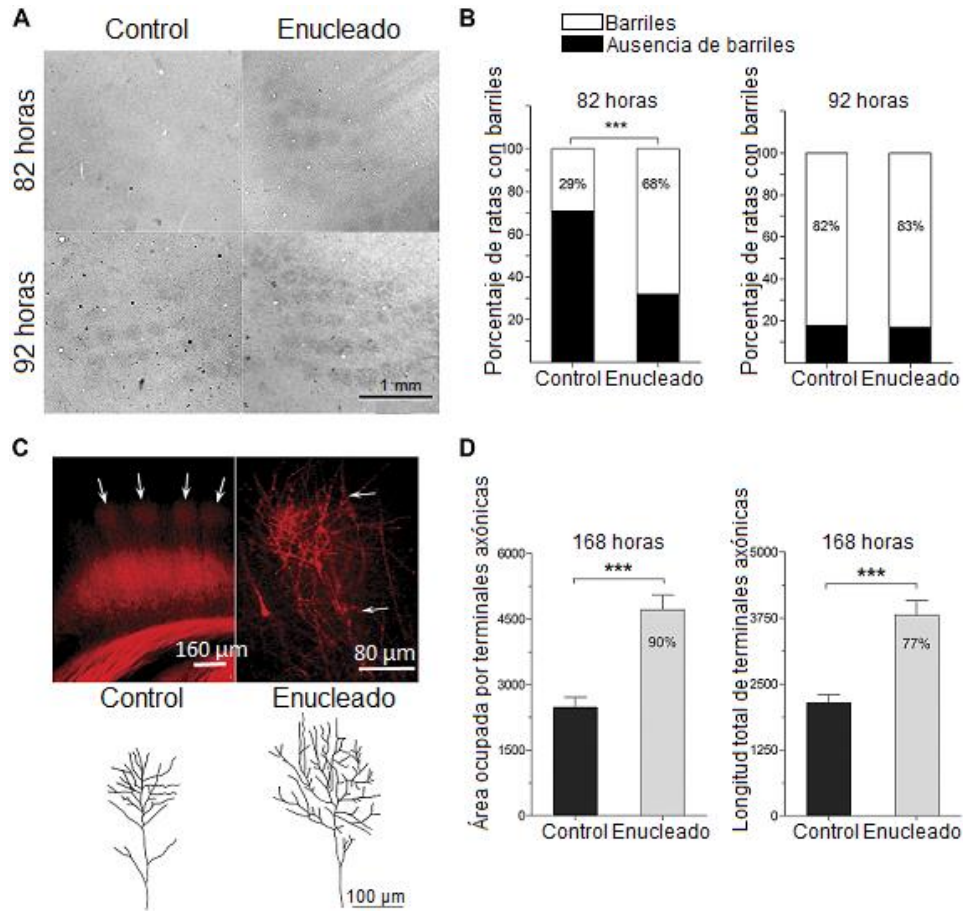


Figura 2 | Arribo anticipado de las terminales axónicas al PMBSF en ratas enucleadas. **A.** Fotomicrografías de cortes tangenciales en ratas enucleadas y control a las 82 y 92 horas postnatales; en éstas se aprecia que a las 82 horas hay un desarrollo anticipado de los barriles en los animales enucleados en comparación con los animales control, dicha diferencia tiende a disminuir a las 92 horas. **B.** Porcentaje de animales control o enucleados con o sin barriles a las 82 y 92 horas, prueba de Fisher: $***p < 0.001$. **C.** Corte coronal de la S1 teñida mediante inyecciones de Dil en el núcleo ventroposteromedial del tálamo. En las imágenes superiores se observa un mayor desarrollo de las aferentes axónicas que arriban a la capa IV de la S1. Los dibujos realizados mediante una cámara lúcida denotan el desarrollo exacerbado de dichas aferentes a las 168 horas postnatales. **D.** A la izquierda se muestra el porcentaje del área ocupada por terminales axónicas y a la derecha la longitud de las terminales axónicas en animales control y enucleados a las 168 horas postnatales, prueba t de Student: $***p < 0.001$, (modificado de Fetter et al., 2013).

4. Justificación y planteamiento del problema

La plasticidad intermodal es uno de los procesos de reorganización neural de mayor envergadura hasta ahora documentado. Los mecanismos involucrados en su desarrollo son aún materia de controversia. Esclarecerlos es fundamental para aportar información que permita diseñar estrategias destinadas a fomentar la recuperación de funciones o la adquisición de nuevas propiedades sensoriales en individuos que han sufrido pérdidas visuales. Al respecto, sabemos que el cerebro de individuos que pierden la vista durante la vida postnatal temprana muestra un incremento en el área de representación morfofuncional de la S1. Estudios realizados en roedores sugieren que las aferentes talamocorticales somatosensoriales ocupan un mayor volumen en el manto cortical que podría explicar la expansión de la S1. Sin embargo, el tamaño relativo de las áreas corticales no sólo depende del territorio abarcado por sus aferencias, también depende de las interacciones que se establecen entre éstas y las NEE a nivel cortical. Así, en la presente tesis, inferimos los patrones de crecimiento y estimamos las dimensiones de los árboles dendríticos de las NEE, con la finalidad de deducir el posible papel de estas neuronas en el proceso de expansión de la S1.

5. Hipótesis

Las dimensiones de los árboles dendríticos de las NEE en las ratas cegadas al nacimiento serán mayores que las observadas en los árboles dendríticos de ratas intactas control a las edades de 30 y 60 días postnatales.

6. Objetivos

6.1 General

Inferir el patrón de crecimiento y estimar las dimensiones de los árboles dendríticos de las NEE en la S1 de ratas adolescentes (30 días de edad) y adultas (60 días de edad), control o cegadas al nacimiento.

6.2 Específicos

1. Determinar la longitud promedio de las ramas dendríticas, así como la densidad, el número y la distribución de los puntos de ramificación (i.e., nodos) en los árboles dendríticos de las NEE de ratas adolescentes y adultas, control o cegadas al nacimiento a través del análisis de Sholl.
2. Estimar la longitud de las ramificaciones de distinto orden de los árboles dendríticos de las NEE en ratas adolescentes y adultas, control o cegadas al nacimiento a través del análisis de Sholl.
3. Estimar el porcentaje del árbol dendrítico total ocupado por ramas dendríticas de diferente orden en las NEE de ratas adolescentes y adultas, control o cegadas al nacimiento a través del análisis de Sholl.

7. Materiales y métodos

7.1 Animales

Para llevar a cabo el presente estudio, se utilizaron 20 crías de rata de la cepa Wistar, sin distinción de sexo, enucleadas aleatoriamente al nacimiento (n=10) o no (n=10). Estas crías se obtuvieron de madres gestantes con quienes se mantuvieron hasta el destete a los 21 días. Las camadas se mantuvieron en el bioterio de estancia temporal del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM. Una vez ablactadas, las crías se separaron por sexo, se alojaron en grupos de 5 individuos por caja entremezclando ratas intactas y enucleadas; se mantuvieron bajo condiciones controladas de iluminación (12 horas luces encendidas/12 horas luces apagadas, en un ciclo regular de luz y oscuridad), humedad (60%) y temperatura (23 °C), teniendo acceso libre a alimento y bebida hasta el día de su sacrificio a los 30 o a los 60 días de edad. Los protocolos experimentales y de manejo de animales llevados a cabo fueron revisados y aprobados por el Comité Interno para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (No. De Registro 80), en cumplimiento de las disposiciones de la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999: *Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio*. En todo momento se tomaron las medidas indispensables para minimizar el malestar animal y disminuir el número de individuos sacrificados. La conformación de los grupos control y experimental se describe en la tabla 1.

Tabla 1 | Distribución de los grupos control y experimental a los 30 y 60 días de edad.

Condición	30 días de edad (n)	60 días de edad (n)
Control	5	5
Enucleado	5	5

7.2 Enucleación

Las crías de ambos sexos fueron enucleadas bilateralmente, 6 a 10 horas después del nacimiento. Para ello, los animales fueron anestesiados por medio de hipotermia inducida por exposición al hielo-agua durante un periodo de 10 minutos. Las crías

fueron enucleadas a través de una incisión ejecutada sobre la cisura palpebral y ambos globos aculares se extrajeron con ayuda de unas pinzas delgadas. El sangrado se controló por compresión durante este periodo y, al término de la cirugía, las crías fueron colocadas sobre un cojinete térmico hasta recuperar la temperatura, el color y el movimiento. Las crías control fueron manipuladas de manera similar, sin embargo, no fueron sometidas a alguna manipulación quirúrgica. Una vez finalizado todo el procedimiento, las crías de ambos grupos fueron devueltas con sus respectivas madres. En este momento, las camadas fueron igualadas a 8 crías (50% hembras y 50% machos) con el propósito de disminuir la competencia por tener acceso a alimentación, procurando así reducir las diferencias en el crecimiento corporal. Las crías de menor tamaño fueron descartadas del estudio y sometidas a eutanasia por hipotermia. Para una consulta ilustrativa sobre los procedimientos quirúrgicos, se sugieren los siguientes links: <https://tinyurl.com/3htdkec6> y <https://tinyurl.com/d8x5y teb>

7.3 Obtención y procesamiento histológico de cortezas

Ratas control y enucleadas, juveniles y adultas, fueron anestesiadas profundamente con pentobarbital sódico (35 mg/kg i.p.) y rápidamente decapitadas. Los cerebros fueron obtenidos y colocados en una solución mordente constituida por dicromato de potasio y cloruro de mercurio a temperatura ambiente, protegidos de la luz, siguiendo las indicaciones del fabricante del estuche de impregnación argéntica (FD Rapid GolgiStain™ Kit Neurotechnologies). Una vez transcurridos 14 días, los cerebros se sumergieron en una solución de sacarosa (30%) amortiguada (0.1 M Fosfatos, 0.15 M NaCl; pH 7.4) durante 24 horas a 4 °C. Transcurrido este lapso, se obtuvieron cortes coronales (100 µm) en un vibratomo. Los cortes fueron impregnados en una solución de nitrato de plata, revelados y fijados en las soluciones correspondientes, de conformidad con las instrucciones provistas por el fabricante. Los cortes impregnados fueron finalmente montados en laminillas embebidas con gelatina y montados con Cytoseal (Fisher). Con la finalidad de localizar con mayor precisión el PMBSF, algunos de los cortes fueron contrateñidos con violeta de cresilo (ver Anexo).

7.4 Selección de neuronas y reconstrucciones

Para los estudios morfológicos propuestos, seleccionamos 10 NEE de cada cría, control o experimental, ubicadas en la capa IV de la zona de representación del bello en la S1. Para ello, retomamos los criterios de inclusión utilizados por Lübke et al. (2000) y los adaptamos para nuestro protocolo de investigación:

1. Se eligieron neuronas que carecieran de dendritas apicales y cuyos cuerpos mostraran formas poligonales características de las NEE.
2. En todos los casos se eligieron neuronas que estuviesen relativamente aisladas de otros componentes celulares.
3. Se verificó que las dendritas de primer orden tuviesen claramente definido su origen en el soma.
4. Se corroboró que la impregnación de las células fuese lo más completa posible.
5. Por último, se verificó que los árboles dendríticos mostraran una orientación centrífuga con referencia al septo del barril.

La reconstrucción de las NEE se llevó a cabo en la Unidad de Microscopía del Instituto de Investigaciones Biomédicas. Para ello, se utilizó el microscopio Nikon Labophot-2 de campo claro, el cual está acoplado a una cámara digital Olympus. Las reconstrucciones se llevaron a cabo mediante la integración de imágenes alineadas de cada neurona, las cuales fueron capturadas con los objetivos 20X (A.N. 0.75) y 40X (A.N. 0.95) en distintos planos focales, con ayuda del sistema automatizado de captura Neurolucida®, MBF Bioscience, versión 11.11.3, (figura 3 A y B).

Para analizar el patrón de crecimiento y estimar las dimensiones de los árboles dendríticos, se calculó su longitud total, el número y densidad de puntos de ramificación o nodos, el número de ramificaciones de distinto orden y el porcentaje del árbol ocupado por ramas dendríticas de diferente orden de cada NEE analizada. Para ello, se utilizó el programa Neuroexplorer® versión 11.11.3, basados en el análisis de Sholl (Sholl, 1953). Éste consiste en trazar digitalmente esferas concéntricas de circunferencia creciente sobre cada neurona, procurando que la

ubicación de la primera esfera (la de menor tamaño) se circunscribiera al cuerpo neuronal y la última coincidiera con el extremo distal de las ramas dendríticas más lejanas (figura 3C). La separación entre cada esfera fue de 10 μm para tratar de realizar un análisis más minucioso.

7.5 Análisis morfológico

Para inferir el patrón de crecimiento y la dimensión de los árboles dendríticos de las NEE, en ratas control y enucleadas, juveniles y adultas, evaluamos un total de 200 neuronas provenientes de 5 ratas de cada grupo de edad y condición sin importar el sexo; no se observaron diferencias entre los sexos. Para cuantificar los siguientes parámetros, retomamos y adaptamos la metodología utilizada previamente por Ramírez-Reyes (2017), Aspra-Polo (2013) y Hernández-Miranda (2006).

En primera instancia estimamos, en micras, el promedio de la longitud dendrítica total para cada grupo. Este parámetro fue calculado sumando la longitud de todas las ramas de los árboles dendríticos de cada neurona. Posteriormente, estimamos la media y el error estándar para cada animal y grupo estudiado.

El segundo parámetro estimado fue la densidad dendrítica en intervalos de 10 μm a partir del soma de cada neurona y hasta completar el volumen ocupado por la totalidad del árbol dendrítico, utilizando como referencia las esferas concéntricas del análisis de Sholl. Posteriormente, calculamos el promedio y el error estándar de este parámetro en cada una de las esferas para nuestros grupos control y experimental.

El tercer parámetro estimado correspondió al número de nodos de bifurcación a lo largo de la extensión de los árboles dendríticos. Para ello cuantificamos el total de nodos en los árboles dendríticos de cada neurona. Posteriormente, obtuvimos la media y el error estándar para cada animal y grupo estudiado.

El cuarto parámetro evaluado corresponde a la distribución de los nodos de bifurcación a lo largo del árbol dendrítico en referencia al intervalo de separación establecido entre las esferas concéntricas del análisis de Sholl. Posteriormente,

obtuvimos la media y el error estándar para este parámetro en cada animal y grupo estudiado.

El quinto parámetro evaluado fue la longitud dendrítica promedio de cada uno de los órdenes dendríticos. En este análisis consideramos a las ramas que emergen del soma como las dendritas de primer orden, las de segundo orden fueron aquellas que se originaron de las del primer orden, y así sucesivamente. Posteriormente, calculamos la media y el error estándar de cada orden dendrítico para cada animal y grupo estudiado.

El último parámetro que determinamos fue la proporción relativa ocupada por cada orden con relación al árbol dendrítico total. Para ello estimamos en cada grupo el porcentaje promedio del árbol dendrítico correspondiente a cada orden, considerando como 100% el promedio de la longitud dendrítica total para cada grupo.

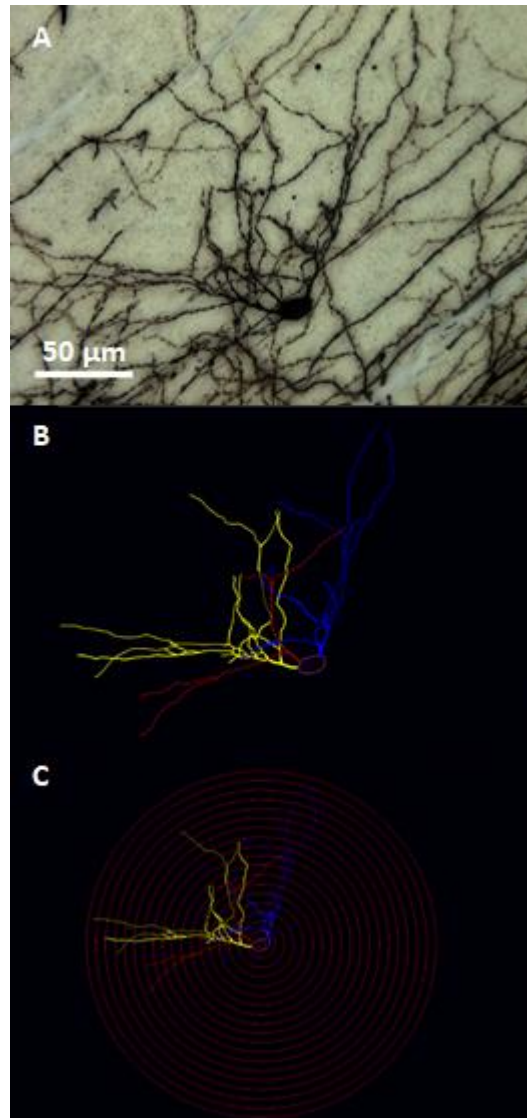


Figura 3 | Reconstrucción de una neurona estrellada espinosa y su evaluación mediante el análisis de Sholl. A. Neurona estrellada espinosa del PMBSF impregnada en un cerebro de 60 días de edad obtenida de una rata control. **B.** Reconstrucción de una neurona estrellada espinosa mediante el programa Neurolucida®. **C.** Representación del análisis de Sholl mediante el programa Neuroexplorer®.

7.6 Análisis estadístico

Los datos numéricos obtenidos fueron capturados en hojas de registro digitales (Excel, Microsoft) y los análisis estadísticos se llevaron a cabo con el programa Prism Graph Pad®, versión 6.0. La normalidad de los conjuntos de datos se corroboró mediante la prueba de Kolmogorov-Smirnov. Analizamos si se presentaron diferencias entre grupos y se estableció si éstas eran significativas mediante una prueba ANOVA de dos vías. Para este análisis se consideró como primer factor la edad y como segundo factor la condición de los animales. Para identificar los grupos entre los que existían diferencias estadísticamente significativas se utilizó la prueba *Post hoc* de Tukey. Todos los resultados se presentan como media \pm error estándar de la media (SEM) y la significancia se estableció con un valor de $p < 0.01$.

8. Resultados

El promedio de la longitud dendrítica total de las NEE fue comparable a los 30 y 60 días de edad entre las ratas control y aquéllas enucleadas al nacimiento. En ambos grupos, este parámetro tiende a incrementarse con la edad, si bien el cambio no alcanza diferencias significativas (figura 4). Así, estos resultados sugieren que la enucleación no afecta el crecimiento longitudinal del árbol dendrítico como un todo.

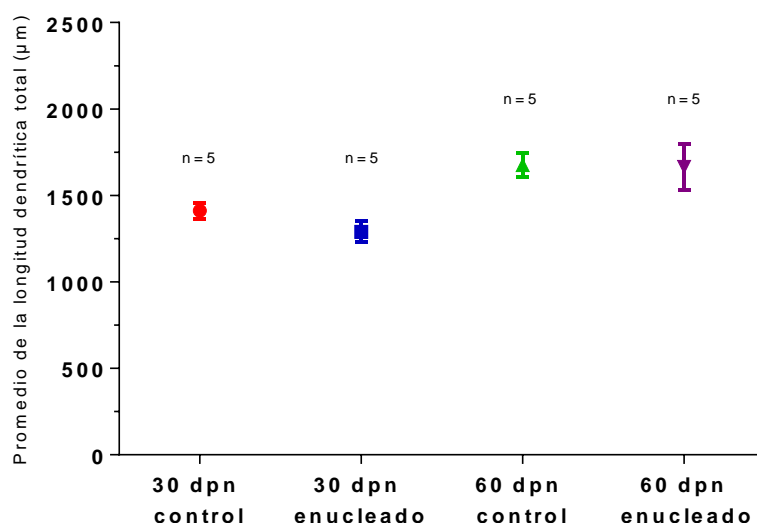


Figura 4 | Promedio de la longitud dendrítica total de las neuronas estrelladas espinosas muestreadas del PMBSF en ratas controles y enucleadas a los 30 y 60 días postnatales. Las barras representan el error estándar relativo a un total de 50 neuronas por grupo (n=5; 10 neuronas por rata/grupo). Prueba estadística ANOVA de 2 vías: * $p < 0.01$.

Con el objeto de evaluar la existencia de posibles cambios en la distribución de las ramas de los árboles dendríticos de las NEE como resultado de la enucleación, estimamos la densidad dendrítica en función de la distancia respecto del soma. Esta estimación fue realizada considerando un intervalo de longitud de 10 µm partiendo desde el soma hasta alcanzar la rama más lejana de los árboles analizados. Como se puede observar en la figura 5, no se observaron cambios significativos en la distribución de las ramas dendríticas en función de la longitud intervalar, en los árboles dendríticos de las NEE, al ser comparadas entre los grupos a los 30 y 60 días de vida.

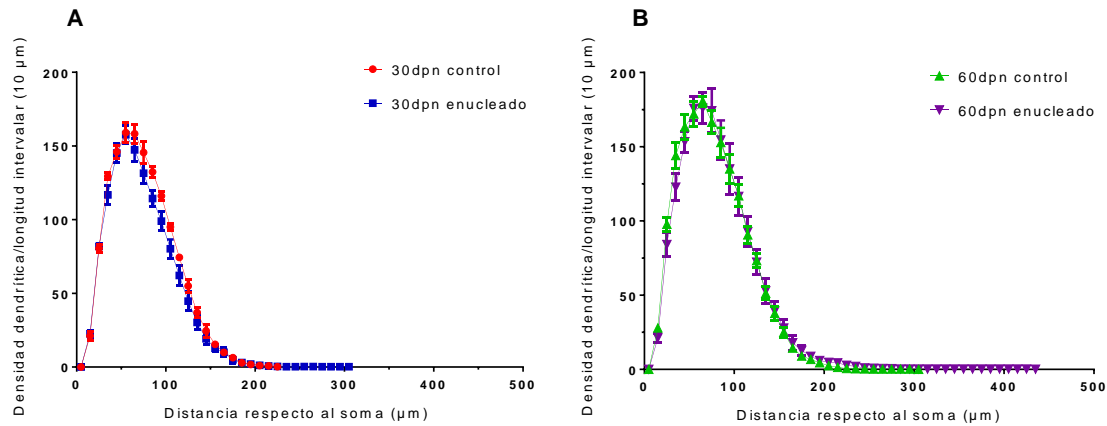


Figura 5 | Densidad dendrítica promedio en función de la distancia respecto al soma de las neuronas estrelladas espinosas en los grupos control y enucleados a los 30 (A) y 60 (B) días postnatales. Las barras representan el error estándar relativo a un total de 50 neuronas por grupo (n=5; 10 neuronas por rata/grupo). Prueba estadística ANOVA de 2 vías: * $p < 0.01$.

Con el propósito de analizar si existían cambios en la complejidad del árbol dendrítico, se cuantificó el número total y la densidad de los nodos de ramificación para cada grupo. Como se aprecia en la figura 6, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos a la misma edad. Sin embargo, se observa una tendencia a incrementar el número de puntos de ramificación hacia los 60 días en ambos grupos de animales (figura 6).

La densidad de puntos de ramificación fue semejante entre los grupos control y enucleados a las distintas edades estudiadas. En ambos casos la mayor cantidad de puntos de ramificación se encontraron alrededor de las primeras 50 micras, decayendo progresivamente a partir de esta distancia hasta el fin del árbol (figura 7). Es interesante destacar que entre los 30 y 60 días se observa un incremento en los puntos de ramificación en las porciones más distales del árbol dendrítico, lo que sugiere un crecimiento distal de éste entre los 30 y 60 días.

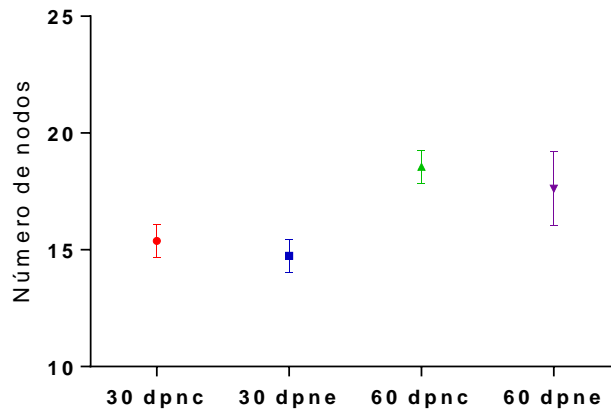


Figura 6 | Promedio total de nodos en los grupos control y enucleados a los 30 y 60 días de edad. Las barras representan el error estándar relativo a 50 neuronas por grupo (n=5; 10 neuronas por rata/grupo). Prueba estadística ANOVA de dos vías: * $p < 0.01$.

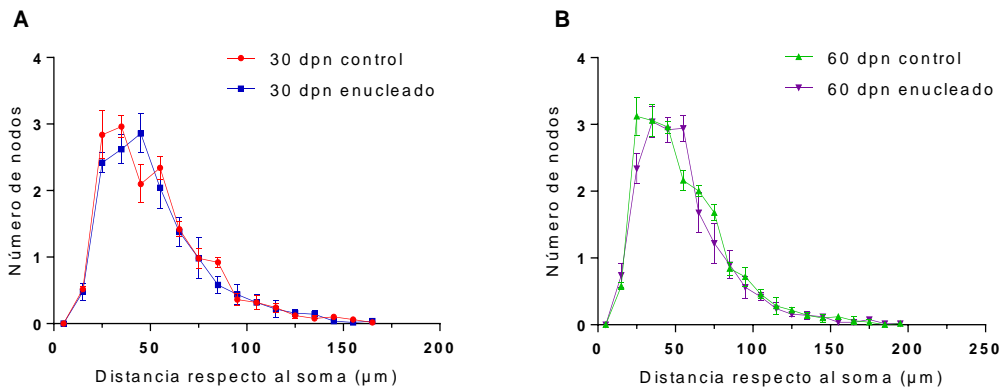


Figura 7 | Distribución promedio de nodos a lo largo de los árboles dendríticos de los grupos control y enucleados a los 30 (A) y 60 (B) días de edad. Las barras representan el error estándar relativo a 50 neuronas por grupo (n=5; 10 neuronas por rata/grupo). Prueba estadística ANOVA de dos vías: * $p < 0.01$.

Para evaluar si la enucleación modifica la longitud de las ramas dendríticas por orden, independientemente de la longitud desde el soma, se estimó la longitud de las dendritas de distinto orden en las neuronas estrelladas espinosas de ratas controles y enucleadas al nacimiento, a los 30 y 60 días de edad. Como se observa en la figura 8, la longitud de las ramas de distintos órdenes es similar al compararse entre los distintos grupos. En general, los árboles estuvieron conformados por dendritas del primero hasta el noveno orden, y aunque predominaron aquéllas de los órdenes tercero, cuarto y quinto, la longitud fue similar para cada orden. Es

interesante que, al comparar grupos de edad, las dendritas de los órdenes cuarto y quinto presentaron un ligero incremento de su longitud en las ratas enucleadas con el paso de la edad.

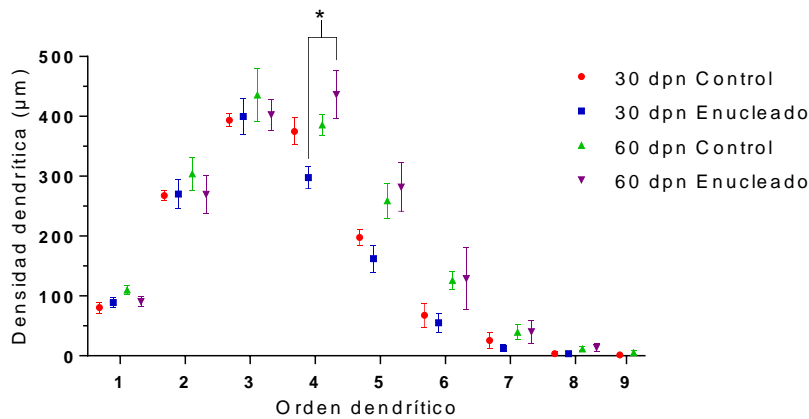


Figura 8 | Longitud promedio de las dendritas por orden de las neuronas estrelladas espinosas en animales enucleados y control a los 30 y 60 días postnatales. Las barras representan el error estándar de la media (SEM) relativo a 50 neuronas por grupo (n=5; 10 neuronas por rata/grupo). Prueba estadística ANOVA de dos vías: * $p < 0.01$.

Finalmente, con la finalidad de documentar si existía una remodelación diferencial de los árboles dendríticos en ambos grupos de animales, analizamos si la proporción de ocupación de cada orden dendrítico cambiaba en función de la edad y/o de la manipulación con relación al total del árbol dendrítico. Para este análisis transformamos a puntos porcentuales el promedio de la longitud dendrítica correspondiente a cada orden dendrítico por grupo y consideramos como 100% el promedio de la longitud dendrítica total de cada grupo. Como se muestra en la figura 9, el árbol dendrítico de las NEE, en el grupo de ratas enucleadas juveniles, está preferentemente constituido por dendritas del cuarto orden (>50%), no siendo así en las ratas control ($\approx 27\%$). Hacia los 60 días de edad, este parámetro se conserva en los animales enucleados, incrementándose en los controles ($\approx 39\%$). Una diferencia adicional observada a esta edad ocurrió en las ramas del quinto orden. En las ratas control, el porcentaje de longitud abarcada por el orden quinto fue de $\approx 17\%$, mientras que para el grupo de ratas enucleadas fue de $\approx 8\%$. Por último, es interesante destacar que el árbol dendrítico de las NEE, en las ratas control, alcanzó

a desarrollar ramificaciones hasta del noveno orden. En contraste, las NEE en ratas enucleadas sólo se ramificaron hasta el octavo orden.

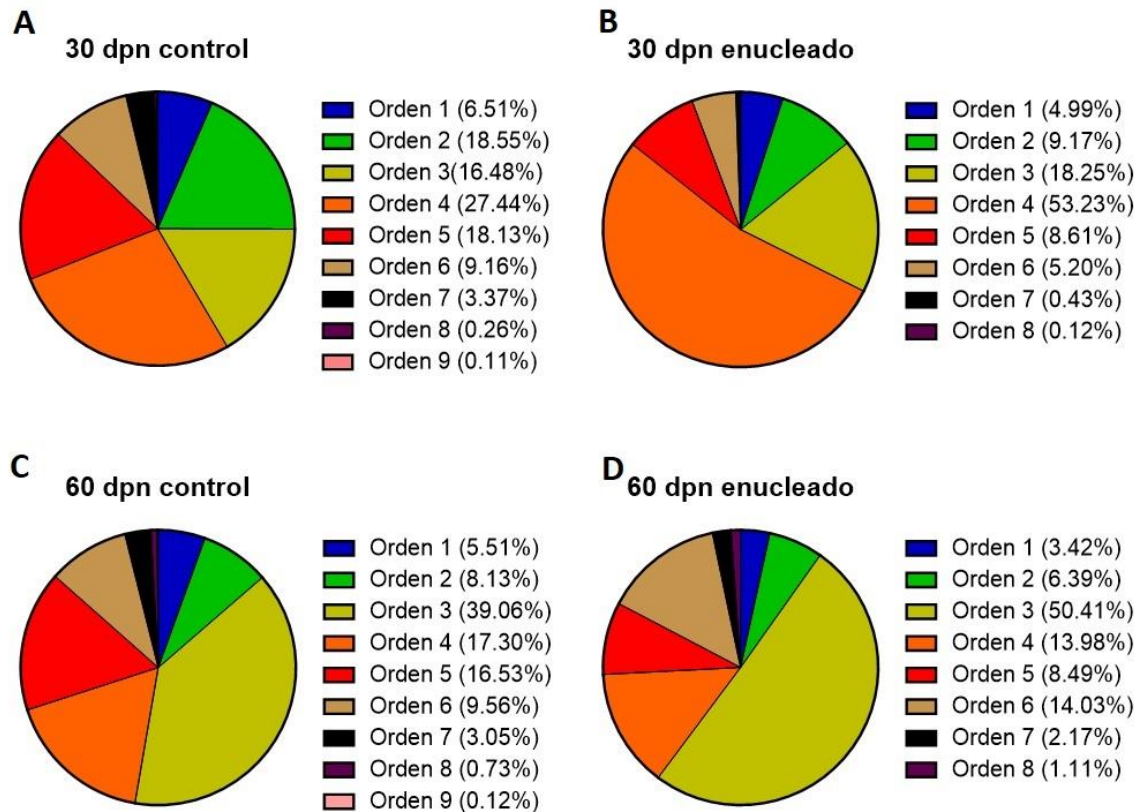


Figura 9 | Composición porcentual por orden de los árboles dendríticos. Las gráficas A y B corresponden a los grupos control y experimental a los 30 días. Las gráficas C y D corresponden a los grupos control y experimental a los 60 días postnatales. Cada gráfica representa la composición dendrítica promedio en puntos porcentuales de 50 neuronas muestreadas por cada grupo (n=5).

9. Discusión

La pérdida de la vista en etapas perinatales del desarrollo conduce a una expansión de la S1 que, se presume, refleja un sobrecrecimiento de las aferentes talamocorticales somatosensoriales (Fetter-Pruneda et al., 2013; Martini et al., 2018; Mezzera & López-Bendito, 2015; Moreno-Juan et al., 2017). Los procesos plásticos neuronales, sin embargo, retan no solamente a las respuestas morfológicas de las aferencias corticales, sino también a los elementos neuronales a las que ellas inervan (Martínez-Méndez et al., 2019). Por ello, decidimos inferir el papel que pudieran jugar las NEE en el proceso de expansión de la S1 en respuesta a una enucleación neonatal, a través de analizar el patrón de crecimiento y las dimensiones de los árboles dendríticos de estas neuronas, blanco principal de las aferentes talamocorticales somestésicas.

Nuestros resultados mostraron que la longitud dendrítica total, la longitud promedio correspondiente a cada orden dendrítico, la densidad dendrítica intervalar, el número y la densidad de nodos de ramificación dendrítica a lo largo de los árboles dendríticos de las NEE fue similar entre grupos, a las edades de 30 y 60 días de vida. Estos resultados sugieren que los patrones de crecimiento dendrítico y la dimensión total del árbol dendrítico son inmunes a la enucleación. Ello refuerza la noción de que el incremento del tamaño anatómico de la S1, observado en las ratas enucleadas, responde en buena medida al sobrecrecimiento y consecuente sobrerreclutamiento de neuronas corticales por parte de las aferentes talamocorticales somatosensoriales. No obstante, los análisis que muestran que el porcentaje del árbol dendrítico ocupado por ramas de cuarto y quinto órdenes difiere significativamente entre grupos y que los árboles dendríticos de las NEE en las ratas control alcanzan el noveno orden, mientras que las ratas enucleadas ramifican hasta el octavo orden, sugieren que las NEE modelan diferencialmente sus árboles dendríticos en ambos grupos de animales. Esto indica que el proceso de remodelación del árbol dendrítico sí es influenciado por la enucleación. El significado morfofuncional de este hallazgo es desconocido. Quizás esté involucrado con los cambios en la dinámica de calcio intracelular que parecen estar

regulando la temporalidad de la formación de S1 en ambos grupos de ratas (Martínez-Méndez et al., 2019). Esta sugerencia constituye una posibilidad tangible que se basa en datos que muestran una relación estrecha entre la frecuencia y distribución de los distintos órdenes de dendritas y las propiedades biofísicas de las neuronas (Spruston, 2008).

Uno de los eternos debates en las neurociencias del desarrollo tiene que ver con los mecanismos celulares que gobiernan la formación de los diagramas finos de las conexiones en los circuitos neuronales. Se ha propuesto que, en general, la estrategia que gobierna la producción de conexiones sigue reglas regresivas. Es decir, se podan conexiones supernumerarias. En la S1, sin embargo, distintos autores han sugerido que la estrategia es progresivamente aditiva (Riddle et al., 1993; Gutiérrez-Ospina, 1996; Micheva & Beaulieu, 1996; Fetter-Pruneda et al., 2013; Uribe-Querol et al., 2013). Los datos que documentan tendencias al incremento de la longitud dendrítica total y del número de nodos de ramificación y de su densidad hacia las dendritas distales son compatibles con esta noción. Nuestros datos sugieren, además, la posibilidad de que los árboles dendríticos sigan creciendo incluso semanas después de que la S1 ha sido plenamente especificada.

Estudios previos han documentado que existe una región anular de hiperplasticidad (definida con base en el análisis de los círculos concéntricos de Sholl), de espinas y dendritas en los árboles dendríticos de las neuronas corticales en mamíferos (revisado y comentado en Aspra Polo, 2013). Esta región inicia alrededor de las 75 μm y culmina hacia las 125 μm desde el soma en ratones y de las 40 μm hasta las 200 μm en gatos, y se presume que es responsable de generar las remodelaciones dendríticas asociadas con la individuación de las funciones neuronales durante los periodos críticos del desarrollo (Aspra Polo, 2013). En general, las distancias aducidas abarcan las dendritas proximales, más significativamente, las del tercero, cuarto y quinto órdenes (Aspra Polo, 2013). En nuestro trabajo, observamos que las dendritas de cuarto y quinto órdenes son particularmente responsivas a sufrir remodelación en respuesta a la enucleación, tiempo después de la especificación de S1. Así, nuestros datos no sólo apoyan la presencia de módulos de conectividad “hiperplástica” en las NEE de la S1, sumando

un ejemplo más a las neuronas corticales que lo muestran, sino que también sugieren que los módulos pudiesen perdurar hasta edades más avanzadas. Estos hallazgos son importantes pues se ha reportado que las NEE tienen una zona anular enriquecida en sinapsis a las 60 μm desde el soma (Feldmeyer et al., 1999).

Para concluir, nos gustaría comentar que la ausencia de diferencias de los patrones de crecimiento y de las dimensiones de los árboles dendríticos entre grupos de tratamiento a la misma edad, pudiera resultar de aspectos técnicos difíciles de franquear con la metodología utilizada. Debido a que las técnicas de impregnación argéntica con frecuencia varían, las NEE muestreadas no necesariamente fueron seleccionadas de zonas ni profundidades absolutamente equivalentes a lo largo y ancho de la capa IV de la S1. Otro aspecto que pudo haber influido es que la calidad de la impregnación y la frecuencia de marcaje decae con la edad.

En cuanto a las perspectivas para el futuro del presente proyecto, consideramos que principalmente es necesario explorar los efectos de la enucleación en las neuronas del PMBSF en días subsecuentes al que se produce la lesión. Ello nos permitiría dar un seguimiento mucho más puntual en cuanto a la reorganización de las dendritas de las NEE. De igual forma, consideramos que es necesario explorar si en el sobrecrecimiento del PMBSF tras la enucleación participa un sobrerreclutamiento celular que dé cuenta de este fenómeno.

10. Conclusiones

En suma, nuestros resultados apoyan que la expansión de S1 refleja el crecimiento exacerbado de las aferentes talamocorticales somatosensoriales. Los árboles dendríticos de las NEE remodelan diferencialmente, sin modificar sus patrones generales de crecimiento ni sus dimensiones, en respuesta a la enucleación.

11. Anexo

Con el propósito de localizar con mayor precisión las neuronas correspondientes a los barriles del PMBSF, algunos de los cortes en los que se llevó a cabo la impregnación de Golgi fueron contrateñidos con violeta de cresilo. Para ello, se adaptó el protocolo mencionado en Paxinos y Watson (2007), el cual se describe a continuación:

Tras llevar a cabo el revelado de la Tinción de Golgi mediante las soluciones proporcionadas por el fabricante (FD Rapid GolgiStain™ Kit Neurotechnologies), los cortes fueron montados en laminillas previamente gelatinizadas. Posteriormente, fueron sumergidos durante 5 minutos en cada una de las siguientes soluciones: xilol, alcohol concentrado al 100%, al 95%, al 70% y agua destilada. Después de este proceso, los cortes fueron sumergidos durante 10 minutos en una solución de violeta de cresilo al 0.5%. Transcurrido este tiempo, los cortes fueron inmersos en agua destilada durante 3 minutos para eliminar los residuos. Por último, los cortes fueron deshidratados gradualmente, sumergiendo las laminillas durante 3 minutos en soluciones de alcohol con concentraciones al 70%, 95% y 100%. Para finalizar, las laminillas se sumergieron en xilol durante 3 minutos y se cubrieron con un cubreobjetos que se fijó con resina.

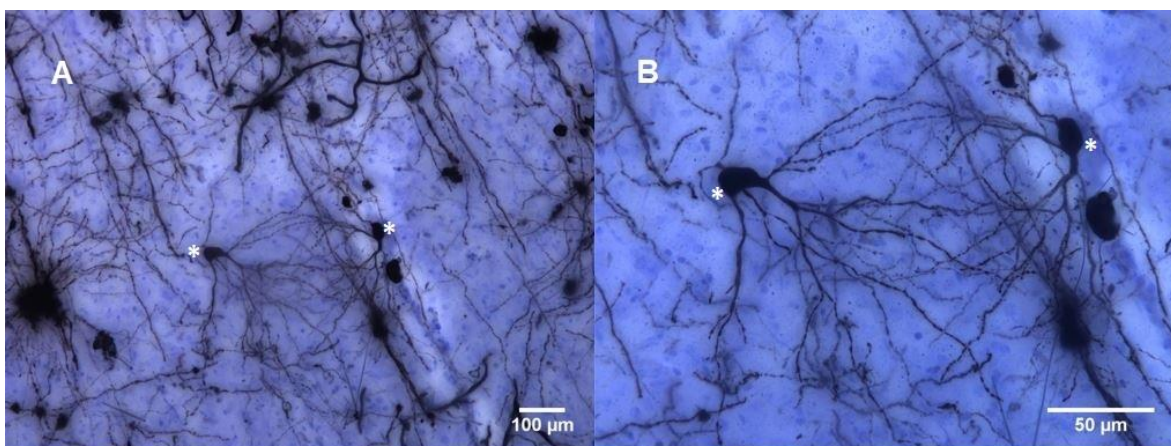


Figura 10 | Tinción de violeta de cresilo en cortes coronales de un animal experimental a los 60 días de edad. Fotografías capturadas con aumentos de 20X (A) y 40X (B). Los asteriscos señalan las neuronas estrelladas espinosas consideradas para el análisis de Sholl. En las fotografías se aprecia que la orientación de las dendritas es centrífuga con relación al septo del barril y que los somas se localizan en las paredes de los barriles.

12. Referencias

- Aerts, J., Nys, J., Arckens, L. (2014). A Highly Reproducible and Straightforward Method to Perform In Vivo Ocular Enucleation in the Mouse after Eye Opening. *J. Vis. Exp.* (92), e51936, doi:10.3791/51936
- Aronoff, R., & Petersen, C. C. H. (2009). Layer, column and cell-type specific genetic manipulation in mouse barrel cortex. In *Frontiers in Neuroscience* (Vol. 2, Issue JUL, pp. 64–71). Frontiers Media SA. <https://doi.org/10.3389/neuro.01.001.2008>
- Aspra Polo, Q. P. (2013). *Variaciones individuales en la circuitería neuronal de la amígdala basolateral del gato*. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Bavelier, D., & Neville, H. J. (2002). Cross-modal plasticity: where and how? *Nature Reviews. Neuroscience*, 3(6), 443–452. <https://doi.org/10.1038/nrn848>
- Berardi, N., Pizzorusso, T., & Maffei, L. (2000). Critical periods during sensory development. *Current Opinion in Neurobiology*, 10(1), 138–145. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10679428>
- Champoux, F., Bacon, B. A., Lepore, F., & Guillemot, J.-P. (2008). Effects of early binocular enucleation on auditory and somatosensory coding in the superior colliculus of the rat. *Brain Research*, 1191, 84–95. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2007.11.003>
- Dye, C. A., Abbott, C. W., & Huffman, K. J. (2012). Bilateral enucleation alters gene expression and intraneocortical connections in the mouse. *Neural Development*, 7(1), 5. <https://doi.org/10.1186/1749-8104-7-5>
- Erzurumlu, R. S., & Gaspar, P. (2012). Development and critical period plasticity of the barrel cortex. *European Journal of Neuroscience*, 35(10), 1540–1553. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2012.08075.x>
- Feldmeyer, D., Egger, V., Lübke, J., & Sakmann, B. (1999). Reliable synaptic connections between pairs of excitatory layer 4 neurones within a single “barrel” of developing rat somatosensory cortex. *Journal of Physiology*, 521(1), 169–190. <https://doi.org/10.1111/j.1469-7793.1999.00169.x>
- 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. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0054940>
- Fox, K. (2002). Anatomical pathways and molecular mechanisms for plasticity in the barrel cortex. *Neuroscience*, 111(4), 799–814. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12031405>
- He, K., Petrus, E., Gammon, N., & Lee, H.-K. (2012). Distinct sensory requirements for unimodal and cross-modal homeostatic synaptic plasticity. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 32(25), 8469–8474. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1424-12.2012>
- Hernández-Mendez, L. R. (2006). *Modificaciones anatómicas y celulares de la corteza somatosensorial primaria de ratones enceguecidos al nacimiento*. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Jan, Y. N., & Jan, L. Y. (2010). Branching out: Mechanisms of dendritic arborization. In *Nature Reviews Neuroscience* (Vol. 11, Issue 5, pp. 316–328). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nrn2836>
- Jitsuki, S., Takemoto, K., Kawasaki, T., Tada, H., Takahashi, A., Becamel, C., Sano, A., Yuzaki, M., Zukin, R. S., Ziff, E. B., Kessels, H. W., & Takahashi, T. (2011). Serotonin mediates cross-modal reorganization of cortical circuits. *Neuron*, 69(4), 780–792. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2011.01.016>
- Karlen, S. J., & Krubitzer, L. (2009). Effects of bilateral enucleation on the size of visual and nonvisual areas of the brain. *Cerebral Cortex (New York, N.Y. : 1991)*, 19(6), 1360–1371. <https://doi.org/10.1093/cercor/bhn176>
- Lee, H.-K., & Whitt, J. L. (2015). Cross-modal synaptic plasticity in adult primary sensory cortices. *Current Opinion in Neurobiology*, 35, 119–126. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2015.08.002>
- Lübke, Joachim, Egger, Verónica, Sakmann, Bert & Feldmeyer Dirk (2000). Columnar Organization of Dendrites and Axons of Single and Synaptically

- Coupled Excitatory Spiny Neurons in Layer 4 of the Rat Barrel Cortex. *The Journal of Neuroscience*, 20 (14), 5300–5311.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.20-14-05300.2000>
- Mahajan, V. B., Skeie, J. M., Assefnia, A. H., Mahajan, M., Tsang, S. H. (2011). Mouse Eye Enucleation for Remote High-throughput Phenotyping. *J. Vis. Exp.* (57), e3184, doi:10.3791/3184
- 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., Martínez Méndez, R., & Gutiérrez-Ospina, G. (2013). Body and brain plasticity: Unraveling its principles through blindness. In *Research Signpost India Recent Res. Devel. Neurosci* (Vol. 37661, Issue 4, pp. 89–107).
- Martini, F. J., Moreno-Juan, V., Filipchuk, A., Valdeolmillos, M., & López-Bendito, G. (2018). Impact of Thalamocortical Input on Barrel Cortex Development. *Neuroscience*, 368, 246–255.
<https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2017.04.005>
- Mezzera, C., & López-Bendito, G. (2015). Cross-modal plasticity in sensory deprived animal models: From the thalamocortical development point of view. *Journal of Chemical Neuroanatomy*, 75(Pt A), 32–40.
<https://doi.org/10.1016/j.jchemneu.2015.09.005>
- Moreno-Juan, V., Filipchuk, A., Antón-Bolaños, N., Mezzera, C., Gezelius, H., Andrés, B., Rodríguez-Malmierca, L., Susín, R., Schaad, O., Iwasato, T., Schüle, R., Rutlin, M., Nelson, S., 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.
<https://doi.org/10.1038/ncomms14172>
- Négyessy, L., Gál, V., Farkas, T., & Toldi, J. (2000). Cross-modal plasticity of the corticothalamic circuits in rats enucleated on the first postnatal day. *The European Journal of Neuroscience*, 12(5), 1654–1668.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10792443>
- Paxinos, G., & Watson, C. (2007). *The rat brain in stereotaxic coordinates*. Elsevier.

- Ramírez-Reyes, A. K. (2017). *Efecto de la administración intranasal de sulfato de zinc en el desempeño de la memoria espacial y la morfología del hipocampo*. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Rauschecker, J. P. (1995). Compensatory plasticity and sensory substitution in the cerebral cortex. *Trends in Neurosciences*, 18(1), 36–43. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7535489>
- Rauschecker, J. P. (1999). Auditory cortical plasticity: a comparison with other sensory systems. *Trends in Neurosciences*, 22(2), 74–80. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10092047>
- Rauschecker, J. P., & Korte, M. (1993). Auditory compensation for early blindness in cat cerebral cortex. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 13(10), 4538–4548. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8410202>
- 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 of the United States of America*, 89(11), 5063–5067. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1594614>
- 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. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 13(10), 4193–4213. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8410183>
- Schlaggar, B. L., & O'Leary, D. D. M. (1994). Early development of the somatotopic map and barrel patterning in rat somatosensory cortex. *Journal of Comparative Neurology*, 346(1), 80–96. <https://doi.org/10.1002/cne.903460106>
- Sholl, D. A. (1953). Dendritic organization in the neurons of the visual and motor cortices of the cat. *Journal of Anatomy*, 87(4), 387–406. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13117757>
- Waite, P. M. (1984). Rearrangement of neuronal responses in the trigeminal system of the rat following peripheral nerve section. *The Journal of Physiology*, 352, 425–445. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6747897>

- Withington, D. J. (1992). The effect of binocular lid suture on auditory responses in the guinea-pig superior colliculus. *Neuroscience Letters*, 136(2), 153–156. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1641183>
- 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. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4904874>
- Xerri, C., Stern, J. M., & Merzenich, M. M. (1994). Alterations of the cortical representation of the rat ventrum induced by nursing behavior. *Journal of Neuroscience*, 14(3 II), 1710–1721. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.14-03-01710.1994>