

UCH-FC
MAB-B
DS42e
C.1

EFFECTOS DE UNA TAREA MOTORA LATERALIZADA PRECOZ
SOBRE EL GROSOR CORTICAL Y EL RECuento CELULAR EN LA
CORTEZA MOTORA DE LA RATA.

ci2

Tesis entregada a la
Universidad de Chile
en cumplimiento parcial de los
requisitos para optar al grado de
Magister en Ciencias Biológicas
con mención en Biología Celular.

30 de mayo

Facultad de Ciencias



por

EUGENIA GLORIA DIAZ GUERRA

Marzo, 1991

Director de Tesis: Dra. Teresa Pinto

Facultad de Ciencias

Universidad de Chile

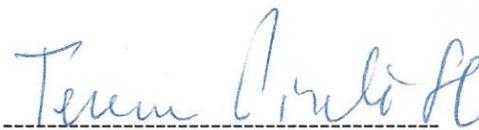
INFORME DE APROBACION
TESIS DE MAGISTER

Se informa a la Escuela de Postgrado de la Facultad de Ciencias, que la Tesis de Magister presentada por la candidata

EUGENIA GLORIA DIAZ GUERRA

ha sido aprobada por la Comisión Informante de Tesis como requisito de Tesis para el Grado de Magister en Ciencias Biológicas con mención en Biología Celular.

Director de Tesis:
Dra. Teresa Pinto Santa Cruz



Comisión Informante de Tesis:

Dr. Carlos Doggenweiler

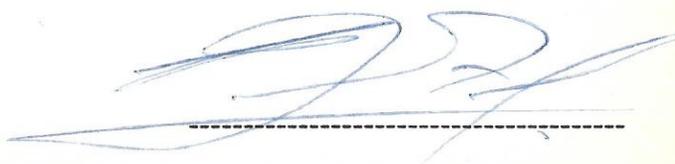


Dr. Humberto Maturana

Dra. Cecilia Vergara

C. Vergara Lu.

Dr. Patricio Zapata



A MIS PADRES.

AGRADECIMIENTOS.

Deseo expresar mi más profunda gratitud a la Dra. Teresa Pinto Santa Cruz, mujer excepcional, quien con su gran vitalidad me impulsó a seguir adelante, tanto en las etapas difíciles del trabajo como en ciertos momentos aciagos de la vida.

También agradezco profundamente al Dr. Juan Fernández y a Nancy Olea, en cuyo laboratorio inicié mi formación y a quienes debo en gran parte lo obtenido.

Al Dr. Víctor Fernández, por su asesoría en la parte morfológica y las enriquecedoras discusiones sostenidas.

A Aníbal Martínez, amigo y colaborador. A mis amigos Mauricio Lagos, Cecilia Babul, Rigoberto Solís y Claudia Passig, quienes siempre tuvieron tiempo para escucharme y una palabra de aliento cuando fue necesario.

A mis Padres y hermanos, Patricia, Cecilia y Francisco, por darme la oportunidad de llegar hasta aquí.

Y muy especialmente a mi postergada familia, Miguel Angel y Paulinita, por su constante e incondicional apoyo y el amor que me brindan.

INDICE DE MATERIAS

LISTA DE TABLAS	viii
LISTA DE FIGURAS	ix
ABREVIATURAS	x
RESUMEN	xi
ABSTRACT	xiii
INTRODUCCION	1
Período Crítico	2
Privación parcial o total de una modalidad sensorial	3
Experiencia precoz y estimulación ambiental	4
El adiestramiento como estimulación	7
La importancia del momento en la estimulación ambiental	8
Estimulación ambiental predestete en la rata	9

Tesis	10
MATERIAL Y METODOS	13
Animales Utilizados	13
Tarea motora lateralizada	13
Implementación de la tarea motora	14
Caja de adiestramiento	14
Adaptación	16
Adiestramiento	17
Criterios de selección de la región cortical involucrada	17
Procedimiento histológico	20
Medición de los parámetros morfológicos	21
Grosor cortical	21
Recuento celular por área	23

RESULTADOS	25
I) Resultados conductuales	25
II) Resultados morfológicos	27
COMPARACION INTRA-SUJETOS	27
Grosor cortical	27
Recuento celular	32
COMPARACION INTER-SUJETOS	35
Grosor cortical	35
Recuento celular	37
DISCUSION	39
CONCLUSIONES	48
REFERENCIAS	50

LISTA DE TABLAS

- TABLA 1.- Porcentaje total de lateralización de la respuesta motora alcanzado por los sujetos experimentales y controles. 28
- TABLA 2.- Promedio individual y desviación estándar del grosor cortical y diferencia porcentual entre los HA y los HNA de las ratas experimentales, en los Planos de Sección A y B. 31
- TABLA 3.- Promedio individual y desviación estándar del grosor cortical y diferencia porcentual entre los HD y los HI de ratas controles, en el Plano de Sección A. 33
- TABLA 4.- Promedio individual y desviación estándar del recuento celular por área y diferencia porcentual entre los HA y los HNA de las ratas experimentales, en los Planos de Sección A y B. 34
- TABLA 5.- Promedio individual y desviación estándar del recuento celular por área y diferencia porcentual entre los HD y los HI de las ratas controles, en el Plano de Sección A. 36
- TABLA 6.- Promedios y desviación estándar del grosor cortical de los hemisferios contralaterales a la extremidad "preferida", de ratas adiestradas y de sujetos controles con la misma "preferencia manual", en el Plano de Sección A. 38
- TABLA 7.- Promedios y desviación estándar del recuento celular por área de los hemisferios contralaterales a la extremidad "preferida", de ratas adiestradas y de sujetos controles con la misma "preferencia" manual, en el Plano de Sección A. 38

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1.- Caja de Adiestramiento. 15
- FIGURA 2.- Diagrama de la representación de los mapas sensorial y motor en la corteza cerebral de la rata. 19
- FIGURA 3.- Esquema de un corte coronal de cerebro de rata, mostrando la disposición de las líneas de medición del grosor cortical. 22
- FIGURA 4.- Esquema de un corte coronal de cerebro de rata, mostrando la disposición de los sectores Medial y Lateral y las áreas de recuento celular. 24
- FIGURA 5.- Promedios y desviación estándar del peso corporal de ratas de una camada adiestrada (N=6) y de una camada control de vivero (N=6), entre los días 14 y 32 de vida. 26
- FIGURA 6.- Fluctuaciones individuales del porcentaje de lateralización de la respuesta conductual de las ratas experimentales durante el adiestramiento. 29

ABREVIATURAS Y SIMBOLOS

CC:	Cuerpo Calloso
FR:	Fisura Rinal
gl:	Grados de libertad
HA:	Hemisferio Adiestrado
HD:	Hemisferio Derecho
HI:	Hemisferio Izquierdo
HNA:	Hemisferio No-Adiestrado
NE:	Núcleo Neoestriado
sd:	Desviación Estándar
V:	Ventrículo
\bar{X} :	Promedio

RESUMEN

Se plantea un estudio sobre la plasticidad de la corteza motora del mamífero joven, adiestrando a la rata en una tarea motora lateralizada, durante una etapa precoz del desarrollo.

La respuesta visuo motora exigida - coger alimento con una sola extremidad anterior - se manifiesta nítidamente desde el día 22 post-natal. Cada animal realizó un total de 1000 ensayos, durante 10 días de adiestramiento, lo que equivale a un tiempo total de 6½ hrs aproximadamente. El grupo experimental (N = 7) debía cumplir con un 92% o más de respuestas lateralizadas. En el grupo control, ratas no-adiestradas (N = 7), se determinó la "preferencia" manual de los sujetos en una o dos sesiones de prueba.

Los cortes histológicos de corteza cerebral se obtuvieron procesando los cerebros según la metodología de Nissl.

Las ratas adiestradas presentaron una lateralización conductual y morfológica. Esta última se expresó tanto en el grosor cortical como en la densidad celular, en todos los sujetos experimentales.

El hemisferio cerebral contralateral a la extremidad utilizada por las ratas adiestradas ("hemisferio adiestrado"), presentó un aumento altamente significativo del grosor cortical ($p < .005$ a $.0025$).

El recuento celular mostró una disminución del número de células por área en el "hemisferio adiestrado" de todos los animales entrenados. Esta diferencia fue también

altamente significativa ($p < .0025$). En ambos casos se realizó una comparación interhemisférica.

Los sujetos controles mostraron lateralización de la respuesta conductual, pero no evidenciaron lateralización morfológica. La comparación intra-sujeto de los parámetros morfológicos estudiados, no arrojó diferencias significativas entre los hemisferios derecho e izquierdo de las ratas no entrenadas.

El cambio plástico evidenciado por este adiestramiento motor lateralizado, estaría localizado en el área de la corteza motora correspondiente a la representación cortical de la extremidad utilizada. Los cortes histológicos provenientes de una región más anterior de la corteza motora, no mostraron los cambios descritos.

Se concluye que la corteza motora de la rata evidencia plasticidad, detectable a un nivel morfológico grueso.

Finalmente, se discuten posibles mecanismos que subyacen a los cambios morfológicos descritos.

Tesis financiada por Proyecto FONDECYT 1227/90.-

ABSTRACT

A study on motor cortex plasticity is proposed. Rats are trained on a lateralized motor task during an early stage of development.

The visual-motor response demanded from the animal - to grasp food with a forelimb - is present on post-natal day 22.

One thousand trials per subject during 10 days of training were completed, approximately equivalent to a total of 6 hrs 30 min.

The experimental rats (N=7) were asked to deliver 92% or more lateralized responses. Preferences in the control rats (N=7) were determined in one or two test sessions.

Histology was performed according to the Nissl procedure.

Trained rats showed limb and morphologic lateralization. The latter was manifest both on cortical thickness and cellular quantification, in every experimental subject.

These showed a highly significant increase in cortical thickness of the contralateral cerebral hemisphere ("trained hemisphere") to the forelimb employed ($p < .005$ and $p < .0025$).

Cellular quantification indicated a highly statistical significant ($p < .0025$) decrease in the "trained hemisphere", in every experimental subject. In both cases, an interhemispheric comparison was made.

Control subjects showed behavioral but not morphologic lateralization; comparisons between the right and left hemispheres yielded no differences.

The plastic change induced by this motor training was localized and corresponded to the preferred forelimb cortical representation within the motor area. Analysis of histological slides of rostral sections of the motor cortex showed none of the described changes.

The answer to the question posed was positive.

The possible mechanisms underlying these morphological changes were discussed.

INTRODUCCION

El problema planteado en esta Tesis incide en un área temática de gran interés biológico, como es la importancia de los factores genéticos y ambientales en la especificación de la estructura del sistema nervioso (SN) y la capacidad de aprendizaje del sujeto. Es de gran interés la determinación experimental de aquellas modificaciones ambientales o adiestramientos específicos que resulten ser los más adecuados para provocar cambios detectables, ya sea en el sustrato morfológico y/o en la función del SN, así como en la conducta ulterior del sujeto.

Jacobson (1973) y posteriormente Black y Greenough (1986), han planteado que el desarrollo del SN estaría determinado, tanto por un programa genético como por factores ambientales, los que interactuarían entre sí modulando el establecimiento de ciertos patrones de conexiones neuronales, en las etapas tempranas de la vida del sujeto. Los primeros antecedentes respecto a los efectos del ambiente sobre el desarrollo del SN datan del Siglo XVIII. El anatomista italiano Gaetano Malacarne (1780) observó que ciertos animales sometidos a entrenamiento, mostraban un mayor desarrollo de fisuras en la superficie cerebral.

El interés por esta correlación morfo-funcional y conductual ha tenido un enorme desarrollo en los últimos 30 años.

El fenómeno de "imprinting", descrito por Lorenz (1965) en aves, constituye, desde nuestro punto de vista, uno de los más hermosos ejemplos de esta interacción entre los

factores genéticos y ambientales en la determinación de una conducta precoz. Normalmente las aves recién nacidas muestran una conducta de seguimiento hacia el primer objeto percibido. La respuesta de seguimiento (factor genético) y la naturaleza del estímulo ambiental (experiencia) determinan a qué o a quién sigue el ave. Experimentalmente, se puede gatillar la misma respuesta conductual con otros estímulos, tales como la presencia de un individuo, modelos de animales, un destello luminoso o un sonido (James, 1960). Se ha mostrado, además, que los cerebros de estas aves evidencian cambios en la síntesis de proteínas y RNA, asociados a esta forma de aprendizaje (Bateson et al., 1973).

Período Crítico.

El programa genético de desarrollo del SN requiere, en ciertos momentos, de la acción conjugada de agentes ambientales para completar su proceso normal. Esto nos lleva a la necesidad de analizar el concepto de "período crítico". Tal concepto hace referencia al momento del desarrollo en que ciertos eventos ambientales son esenciales para la maduración normal del SN. Lorenz (1965) lo señala como "el único momento en que el organismo está preparado para responder a un evento específico". En la actualidad, este concepto no tiene una restricción temporal tan estricta.

Mencionaremos algunos ejemplos clásicos que ilustran la importancia fundamental que tiene el momento en que se produce la interacción entre el SN en desarrollo y ciertos eventos ambientales.

Privación parcial o total de una modalidad sensorial.-

Los experimentos de Hubel y Wiesel (1963 y 1965), en gatos recién nacidos sometidos a privación visual unilateral, mostraron que las neuronas de la capa IV del área 17 en la corteza visual, responden a estímulos luminosos procedentes sólo del ojo que no fue privado de visión. Le Vay y col. (1980) demostraron, en monos, que la segregación de bandas de dominancia ocular en la capa IVc de la corteza visual, depende de la llegada de estímulos provenientes de ambos ojos; si se hace una sutura monocular inmediatamente después del nacimiento, se produce una casi completa desaparición de las bandas de dominancia correspondientes al ojo privado de visión. Si ésta se realiza más tardíamente, no produce iguales efectos que la privación visual precoz.

Otro claro ejemplo de la modulación del medio sobre el SN, es la aparición de espinas dendríticas en las neuronas piramidales de la corteza visual del ratón, evento que coincide con la apertura de los párpados y que es posible retardar experimentalmente, si los animales son privados de estímulos luminosos (Ruíz-Marcos y Valverde, 1969).

De los experimentos anteriores se puede concluir que la privación parcial o total de estimulación visual en una etapa temprana de la vida, produce una clara perturbación en la especificación de ciertas vías neuronales.

Estudios realizados en chimpancés por Nissen y colaboradores (1951), privándolos de ciertas experiencias sensoriales en etapas tempranas de su vida, ponen en evidencia la importancia de éstas en el desarrollo de las capacidades perceptuales del adulto. Sujetos a los cuales se los priva precozmente de estímulos somestésicos, presentan alteraciones

estímulos visuales, somestésicos, olfatorios, etc.

El estudio de cambios morfológicos inducidos por el ambiente tuvo un fuerte impulso en las décadas de los años 60 y 70. La metodología experimental consistió, en términos generales, en exponer a las ratas, después del destete, a un "ambiente enriquecido". Forgays y Forgays (1952) ya habían aportado evidencias conductuales del papel fundamental que tenía la interacción de los sujetos con el medio. Estos autores mostraron que, al comparar ratas que interactuaron directamente con los estímulos ambientales, con aquéllas a las que sólo se les permitió observarlos, las primeras evidenciaron un mejor rendimiento en la resolución de laberintos. Posteriormente, Ferchmin et al. (1975) demostraron que ratas "observadoras", colocadas en el "medio enriquecido" pero a su vez, dentro de pequeñas jaulas, tenían pesos cerebrales similares a los de ratas aisladas.

La metodología de estimulación ambiental polisensorial ha permitido establecer que los cerebros de ratas expuestas a estos ambientes presentan cambios en su anatomía gruesa y fina. Se encontró que los animales estimulados tenían un mayor peso y longitud cerebral y un mayor grosor cortical (Diamond et al., 1966 y 1972; Diamond, 1967; Ferchmin et al., 1970; Bennett et al., 1970; Bennett, 1976; Rosezweig y Bennett, 1969 y 1978; Cummins y Livesey, 1979; Katz y Davies, 1984). También se detectaron diferencias significativas en la densidad neuronal y glial en la neocorteza de ratas estimuladas, comparadas con sus pares controles. (Altman y Das, 1964; Diamond et al., 1966 y 1975; Szeligo y Leblond, 1977). Malkasian y Diamond (1971) informaron de

un aumento significativo del tamaño nuclear y del pericarión de neuronas piramidales y estrelladas de la corteza visual, en cerebros de ratas estimuladas precozmente. Otros investigadores encontraron, en esta misma especie, incrementos significativos en el número de espinas sinápticas en las ramificaciones dendríticas de neuronas piramidales de la corteza visual (Globus et al., 1973; Greenough et al., 1985) y modificaciones en el número y morfología de las sinápsis (Greenough et al., 1978; Wesa et al., 1982; Turner y Greenough, 1983 y 1985; Sirevaag y Greenough, 1985 y 1987; Greenough y Chang, 1985 y 1988; Greenough y Bayley, 1988).

Existe abundante evidencia que señala que la exposición a un "ambiente enriquecido" incrementa las ramificaciones dendríticas neuronales en cerebros de ratas estimuladas, al compararlas con sujetos controles mantenidos en medio social o aislado. Numerosos trabajos muestran que las neuronas piramidales y las células estrelladas de la corteza visual de las ratas estimuladas polisensorialmente, presentan segmentos dendríticos distales más numerosos y extensos que los de animales controles (Holloway, 1966; Schapiro y Vukovich, 1970; Volkmar y Greenough, 1972; Greenough et al., 1973; Greenough y Volkmar, 1973; Uylings et al., 1978; Connor et al., 1980; Juraska et al., 1980; Walsh, 1981; Green et al., 1983; Juraska, 1984).

Cabe hacer notar que estos cambios morfológicos, inducidos por el ambiente enriquecido, persisten incluso después de someter a los animales a períodos prolongados de aislamiento (Katz y Davies, 1984; Camel et al., 1986).

Es importante destacar que existe un amplio consenso entre los investigadores en el

sentido que los cambios inducidos por este tipo de estimulación global son más notorios en el área visual que en las demás áreas cerebrales, entre ellas la motora. Esta última evidenciaría un menor grado de modificaciones frente a este tipo de manipulación experimental, por lo que ha sido considerada menos "ambiente-dependiente".

El adiestramiento como estimulación.-

En relación con situaciones de adiestramiento motor propiamente tal, Physh y Weiss (1979), al comparar ratones a los que se les permitió realizar actividad física a voluntad entre los días 18 al 35 de edad, con sujetos que permanecieron inmovilizados durante el mismo tiempo, encontraron en los primeros un incremento significativo, tanto en el tamaño del árbol dendrítico como en el número de espinas sinápticas de las células de Purkinje del cerebelo. En otro estudio, realizado en monos, se encontró que aquéllos que realizaron una considerable actividad física desde el 1° al 6° mes de edad presentaban, en las neuronas piramidales de la capa III de corteza motora I, un número significativamente mayor de ramificaciones dendríticas basales (Stell y Riesen, 1978).

En ratas adultas, sometidas a entrenamientos en resolución de laberintos, se ha encontrado una arborización más profusa de las ramas oblícuas a la dendrita apical en neuronas piramidales de las capas IV y V en corteza occipital, al compararlas con las de animales no entrenados y mantenidos en aislamiento parcial (Greenough et al., 1979). Otros estudios sobre los efectos del entrenamiento han confirmado este hallazgo: a diferencia de la estimulación ambiental, que produce sus efectos sobre las dendritas

basales, el efecto del entrenamiento se expresaría fundamentalmente sobre la arborización dendrítica apical de las neuronas piramidales de la corteza occipital de la rata (Greenough, W. T., 1975; Chang y Greenough, 1982).

Importancia del momento en la estimulación ambiental.-

Prácticamente todos los estudios mencionados han sido realizados durante la etapa post-destete de la rata, cuando el período más acelerado de crecimiento cerebral ha pasado (Dobbing y Sand, 1971). Los trabajos en que se han estudiado los efectos de la estimulación durante etapas más precoces son escasos. En uno de ellos las crías fueron puestas junto a la madre en el "ambiente enriquecido" (Forgays y Read, 1962). Durante el predestete, las crías permanecen gran parte del tiempo bajo el vientre de la madre, alimentándose o durmiendo. Este hecho podría haber influido negativamente en su interacción con el medio, lo que podría explicar la falta de diferencias encontradas por estos autores al comparar el efecto de la estimulación predestete versus postdestete.

Con respecto al período óptimo para obtener los cambios descritos previamente, se ha demostrado que, a la inversa de lo que ocurre con la privación de una modalidad sensorial, los efectos de la estimulación ambiental se pueden manifestar en cualquier etapa de la vida del sujeto (Greenough y Chang, 1988). Los efectos del medio enriquecido sobre el SN han sido estudiados en ratas cuyas edades fluctúan entre 20 a 900 días (Holloway, 1966; Riege, 1971; Uylings et al., 1978; Connor et al., 1980; Juraska et al., 1980; Connor, 1982). Es interesante señalar que al aumentar la edad del

sujeto, los efectos tienden a evidenciarse fundamentalmente sobre las ramificaciones terminales del árbol dendrítico (Cummins et al., 1973; Greenough et al., 1979; Chang y Greenough, 1982; Green et al., 1983; Diamond et al., 1985). No obstante lo anterior, se ha descrito un período en que el tejido nervioso es más susceptible de ser modificado por el ambiente. Como se señaló previamente, Dobbing y Sand (1971) mostraron que el cerebro de la rata presenta un período de máximo crecimiento, expresado en términos de incrementos de peso, durante la etapa post-natal temprana. Dado lo anterior, es razonable suponer que en este período se podrían obtener mayores efectos con la estimulación ambiental.

Estimulación ambiental predestete en la rata.-

Los antecedentes anteriormente señalados nos llevaron a desarrollar una metodología de estimulación dirigida hacia sujetos jóvenes. En un trabajo publicado previamente (Venable, Fernández, Díaz y Pinto-Hamuy, 1989), demostramos que una estimulación ambiental polisensorial aplicada en el período pre-destete de la rata, es suficiente para gatillar cambios significativos en las dendritas basales de las neuronas piramidales de la capa III de la corteza visual. En ellas se encuentran incrementos altamente significativos, tanto en el número como longitud dendrítica, incluso desde el primer orden de ramificación. Nuestros resultados son más consistentes, de mayor magnitud y de una distribución más amplia que los obtenidos por otros autores con estimulación en el período postdestete. Este hallazgo alcanza mayor relevancia si consideramos que

hemos utilizado como controles a sujetos mantenidos en medio social y no aislado. Finalmente, cabe destacar que el tiempo de estimulación fue sólo de 30 horas totales, mientras que en estudios comparables de otros autores, realizados en el postdestete, los sujetos permanecieron entre 15 a 30 días en el "medio enriquecido".

En otro de los trabajos previos de nuestro grupo (Venable, Pinto-Hamuy, Arraztoa, Contador, Chellew, Perán y Valenzuela, 1988), se contrastaron los efectos conductuales de la estimulación en el período predestete versus el postdestete de la rata. Se comparó la habilidad en tareas de aprendizaje de laberintos de sujetos estimulados en un período u otro. Las ratas estimuladas durante el predestete mostraron diferencias significativas, en varios de los parámetros medidos, con respecto a las estimuladas en el postdestete y con el grupo social. Más aún, llama la atención que el grupo estimulado en el postdestete (30 hr. de estimulación) no se diferencia del control en varios de estos parámetros. Estas evidencias conductuales señalarían al período predestete como el más indicado para inducir los mayores cambios morfológicos y conductuales.

Tesis.-

Los resultados comentados anteriormente nos llevaron a plantear la siguiente Tesis:

"La corteza motora de la rata, aunque considerada poco dependiente del ambiente, puede evidenciar cambios plásticos morfológicos cuando la estimulación consiste en la ejecución de una tarea motora específica, y el adiestramiento se realiza en una etapa temprana de la vida del animal".

Con el propósito de explorar los posibles cambios en la corteza motora, se escogió la tarea de coger alimento con una extremidad anterior (Peterson, G. M., 1963). El paradigma experimental propuesto exige que se satisfagan tres condiciones: i) que la tarea sea fundamentalmente motora, ii) que el adiestramiento se realice lo más precozmente posible y iii) que la respuesta exigida sea lateralizada.

Las aferencias y eferencias motoras esencialmente cruzadas del SN de la rata (Wise y Jones, 1976; Dolbykan et al., 1977; Sapienza et al., 1981), nos permiten considerar el hemisferio contralateral a la extremidad utilizada como el "adiestrado" y el ipsilateral como control, "no-adiestrado". Este hecho presenta la ventaja de analizar los efectos de este adiestramiento motor específico comparando los dos hemisferios en un mismo sujeto (Hydén y Egyházi, 1964; Krivanek y Buresova, 1972; Chang y Greenough, 1982). La situación experimental planteada nos permitiría descartar que las posibles diferencias se deban a factores inespecíficos asociados a cualquier situación de aprendizaje, tales como cambios en el nivel atencional, grado de estrés, entre otros.

Para poner a prueba la Tesis se escogieron los parámetros **grosor cortical** y **recuento celular**, ya que cambios en este nivel han sido ampliamente estudiados con el paradigma de estimulación ambiental. Además, ambos ofrecen la ventaja de ser analizados a través de la técnica de Nissl, método que tiene la capacidad de teñir todas las células corticales, permitiendo así, realizar estudios cuantitativos. Por ser de fácil ejecución y por su amplia aplicación, éste método constituye una valiosa herramienta que hace posible establecer comparaciones de los efectos de este adiestramiento motor en cerebros

de ratas de distintas edades. Pensamos que, de haber cambios plásticos detectables a un nivel anatómico grueso, esto permitiría definir una región sobre la cual centrar estudios posteriores, conducentes a explorar mecanismos de plasticidad en esta área motora.

MATERIAL Y METODOS

Animales utilizados.

Se trabajó con rata gris de la cepa AxC, procedente de una colonia del vivero del Departamento de Fisiología y Biofísica de la Facultad de Medicina.

Los animales adultos fueron apareados durante 3 días consecutivos, seleccionando aquellas camadas nacidas dentro de un período no superior a 24 hrs. Los grupos experimental y control fueron integrados exclusivamente por crías machos más una madre sustituta por grupo. Estos se formaron el día postnatal 1, descartando aquellos sujetos que, a la inspección visual, mostraran un tamaño no adecuado. Hermanos de camada fueron asignados a cada condición. Se trabajó con $N = 6$ crías por grupo, número que aseguraría una adecuada ingesta de nutrientes. Las ratas permanecieron en el vivero, sometidas a un régimen diurno 12/12 h de luz-obscuridad, con agua y alimento ad-libitum hasta el día 14.

Tarea motora lateralizada.

Durante el período post-destete, la rata habitualmente coge el alimento con el hocico y lo sujeta con ambas extremidades anteriores mientras lo roe. De este patrón conductual, propio de la especie, se seleccionaron algunos elementos. La tarea consistió en inducir a la rata, en el período pre-destete, a coger alimento con una de sus extremidades anteriores a través de una ranura. El refuerzo (alimento) fue presentado

a una distancia tal, que ésta debía realizar una respuesta motora sostenida durante algunos segundos, antes que el experimentador liberara el cereal.

Implementación de la tarea motora lateralizada.

Se realizó un experimento piloto con el propósito de determinar la edad mínima en que la rata estaba capacitada para realizar la tarea. Se trabajó con sujetos de 15 días de edad al inicio del experimento, los que se expusieron diariamente a la caja de adiestramiento. El refuerzo consistió en pequeños trozos de cereal dilatado azucarado ("Natur"). Con la finalidad de inducir a los animales a ingerir este alimento no lácteo, las crías fueron privadas parcialmente de lactancia, separándolas de la madre 1 hora antes de cada sesión. Se observó el desarrollo de la conducta exploratoria en la caja, así como la apetencia por el cereal.

La edad mínima a la cual la rata está capacitada para efectuar esta tarea resultó estar entre los días 19 y 20 post-natal. Se compararon los pesos corporales promedio de ratas de una camada experimental con los de ratas de una camada control de vivero, nacida el mismo día y no sometida a privación parcial de lactancia.

Caja de adiestramiento.

La caja de adiestramiento, diseñada en nuestro laboratorio, se muestra en la Fig. 1. Consiste en un cubículo de madera, de 20x20x17 cm, en cuya pared frontal hay una

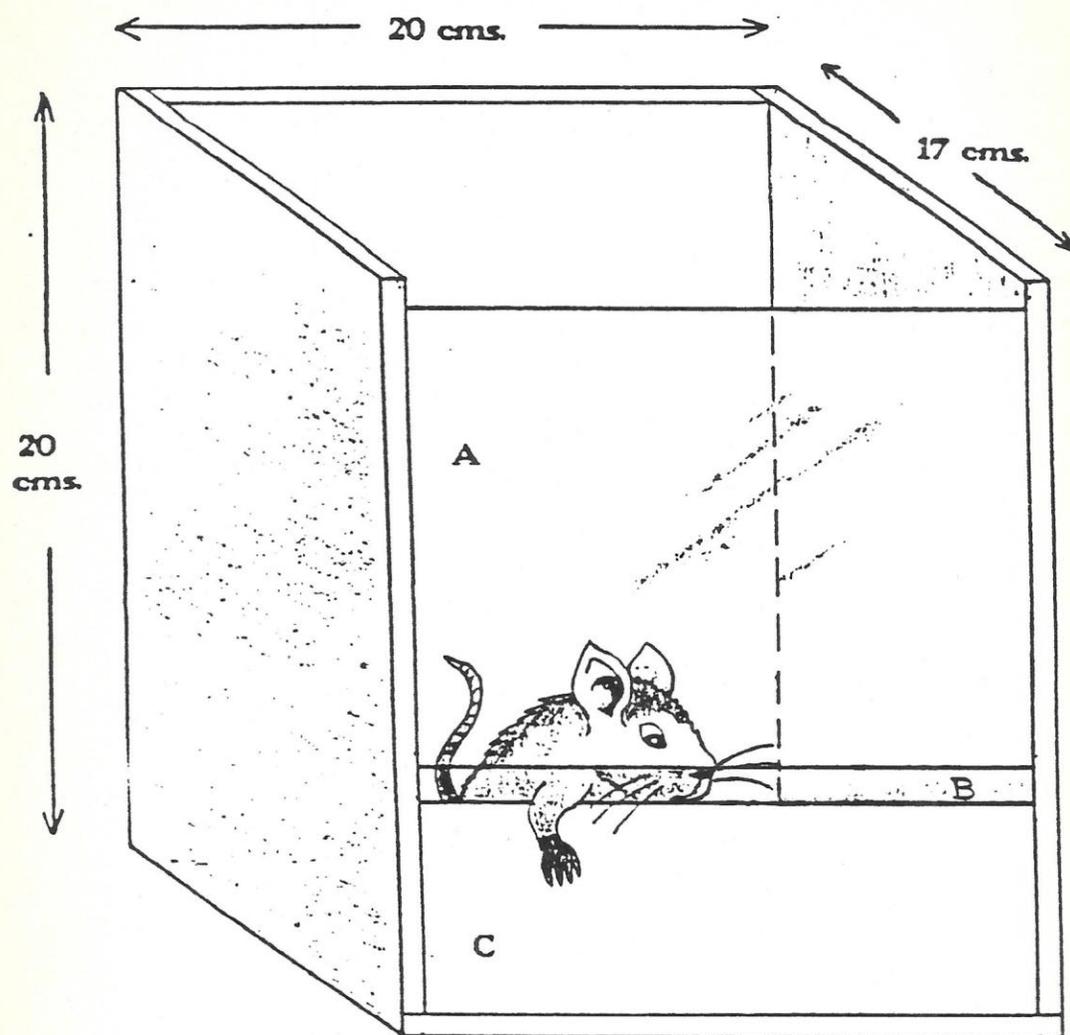


FIGURA 1.- CAJA DE ADIESTRAMIENTO.

- A: Panel de vidrio.
- B: Ranura.
- C: Panel de madera.

ranura horizontal angosta (18 x 1.3 cm) ubicada a 5.5 cm del piso de la caja y que permite que el animal sólo pueda introducir sus extremidades anteriores a través de ella. Sobre ésta hay un panel de vidrio que permite la visión del sujeto hacia el exterior.

Adaptación

La adaptación de los sujetos experimentales y controles se llevó a cabo en el período predestete, entre los días 15 al 21 de edad. En ésta se distinguieron 2 etapas: en la primera, común para ambos grupos, los sujetos fueron adaptados a la caja de adiestramiento, en tanto que en la segunda, los animales experimentales aprendieron la tarea requerida. Al iniciarse la primera etapa, debido a la corta edad de las ratas, resultó conveniente adaptarlas en pareja. Posteriormente se trabajó en forma individual.

La preferencia manual espontánea de los sujetos experimentales se determinó durante el aprendizaje de la tarea. En ningún momento se exigió el uso preferente de una extremidad determinada. El criterio de preferencia manual fué de al menos un 92 % de respuestas consistentes. En otras palabras, si en 23 de 25 ensayos la rata utilizaba una misma extremidad, se la catalogaba como diestra o zurda según la extremidad empleada (Hyden y Egyhazi, 1964). Los animales que no cumplieron este criterio fueron considerados como alternantes y no se utilizaron en este estudio.

Adiestramiento

El adiestramiento se realizó inmediatamente después del destete, entre los días 22 al 31 de edad. Se efectuaron 4 sesiones diarias, con un intervalo mínimo de 1 hora entre dos sesiones consecutivas. Cada sesión constó de 25 ensayos. Un ensayo consistió en presentar a la rata el refuerzo, desde el exterior de la caja y a una cierta distancia, lograr que el animal extendiese la extremidad anterior a través de la ranura intentando cogerlo y mantuviese esta respuesta durante un tiempo que fluctuó entre los 5 a 8 seg, después de los cuales el experimentador liberaba el grano de cereal. Un mayor tiempo de duración de la respuesta no resultó aconsejable, ya que los sujetos desistían de su empeño.

Durante esta etapa las ratas permanecieron en la sala de adiestramiento, disponiendo de agua y alimento habitual ("pellet") ad-libitum.

Las ratas controles fueron puestas en una caja similar, disponiendo en su interior de una cantidad de cereal equivalente al ingerido por las experimentales en una sesión de adiestramiento. La preferencia manual de estos sujetos se estableció a los 32 días de edad, con un máximo de 2 sesiones de 25 ensayos cada una, por sujeto.

Criterios de selección de la región cortical supuestamente involucrada.

La corteza motora de la rata se encuentra en la mitad anterior del cerebro, en la región dorsolateral. Dada la característica lisencefálica de este animal, no existen en su cerebro surcos ni grandes fisuras que sirvan de referencia para establecer localizaciones

topográficas (Woolsey, 1960). Sobre las bases de un conjunto de criterios establecidos en la literatura, que incluyen citoarquitectura (Krieg, 1946; Caviness, 1975; Krettick y Price, 1977; Kolb, 1984), trazamiento retrógrado con HRP (Donoghue y Wise, 1982), mapas de representación cortical obtenidos mediante las técnicas de estimulación eléctrica (Hall y Lindholm, 1974; Neafsey et al., 1986) y de potenciales evocados (Settlage et al., 1949), se determinó porcentualmente la región del cerebro de rata adulta que corresponde a la corteza motora. El área equivalente en un encéfalo de rata de 32 días de edad se estableció mediante una relación proporcional a la del encéfalo de la rata adulta.

Dentro de la corteza motora se determinaron dos Planos de Sección (Fig. 2). El Plano A, ubicado aproximadamente al centro de la representación cortical de la extremidad anterior, y el Plano B, más anterior, que corresponde aproximadamente a la región de representación cortical de cara y mandíbula del animal. El estudio en ambos Planos de Sección se realizó sobre los mismos cerebros.

Los cortes histológicos obtenidos de las regiones así determinadas, se observaron al microscopio de luz y se compararon con las imágenes de un Atlas Estereotáxico del cerebro de la rata (Pellegrino y Cushman, 1967).

Los marcadores subcorticales considerados fueron: el perfil y disposición del cuerpo calloso, la posición del ventrículo lateral y la presencia del núcleo neoestriado.

El criterio citoarquitectónico utilizado por nosotros fue buscar el límite entre las regiones motora y somato-sensorial basado en la ausencia aparente de la capa IV

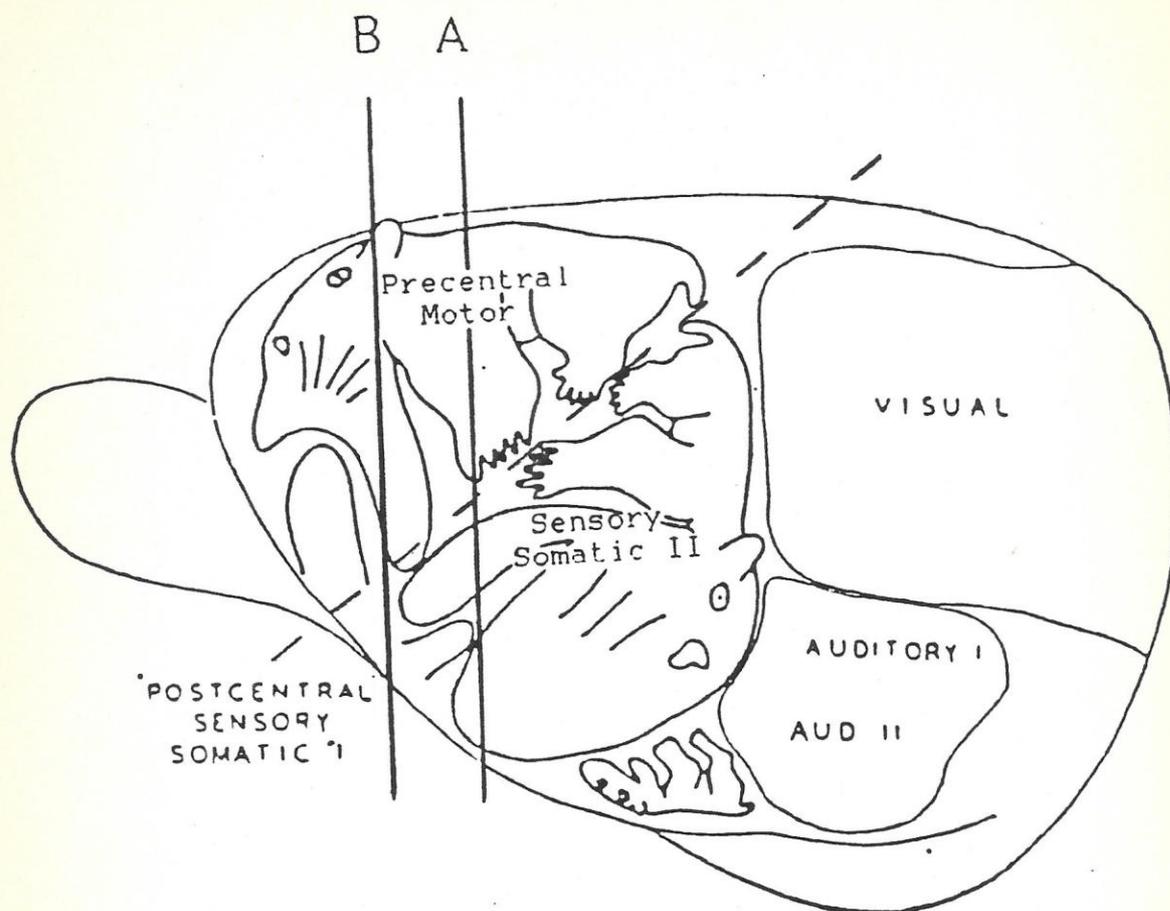


FIGURA 2.- DIAGRAMA DE LA REPRESENTACION DE LOS MAPAS SENSORIAL Y MOTOR EN LA CORTEZA CEREBRAL DE LA RATA.

Disposición general de las áreas somato sensorial I y II, área motora precentral y ubicación de las áreas auditiva y visual. Las líneas continuas y la segmentada, sobrepuestas en el diagrama, señalan la ubicación aproximada de los Planos de Sección A y B y el límite grueso entre las áreas motora y somato sensorial, respectivamente.

Tomada de: C. Woolsey, "Organization of Sensory Motor Areas of the Cerebral Cortex". En Harlow y Woolsey (Eds.), "Biological and Biochemical Bases of Behavior", University of Wisconsin Press, 1958.

granular en la primera región. Dicha capa es, en cambio, muy evidente en la región somato-sensorial (Peters y Walsh, 1972). Una línea imaginaria, trazada entre estas dos áreas corticales, seguiría una dirección rostro-caudal y latero-medial (Ver Fig. 2).

Procedimiento histológico.

Los dos parámetros morfológicos analizados fueron cuantificados examinando cortes histológicos procesados según el siguiente protocolo: Finalizado el adiestramiento, al día 32 de edad, los animales fueron anestesiados con vapores de éter dietílico y sacrificados mediante perfusión aórtica con suero salino (0,9% NaCl) y posteriormente con formaldehído neutro al 10% en suero salino.

Los cerebros fueron extraídos de la caja craneana y permanecieron en el fijador por 3 ó 4 días. Después de varios lavados en agua destilada, quedaron inmersos en una solución acuosa de sacarosa al 30%. Este paso tiene como propósito evitar la formación de grandes cristales de hielo durante el procedimiento ulterior.

Mediante microtomía de congelación, se obtuvieron cortes transversales (coronales) seriados, de 30 μ m de grosor de la región estudiada. Dichos cortes histológicos se montaron sobre portaobjetos albuminizados y se secaron en una estufa a 37°C por 1 ó 2 días. Luego de una deshidratación e hidratación en una batería de alcoholes, los cortes se tiñeron con el colorante Cresil Violeta al 0,2% acuoso, pH 3,7 y se cubrieron con Bálsamo del Canadá natural y cubreobjetos.

Medición de los parámetros morfológicos.

Tanto la medición del grosor cortical como el recuento celular por área se realizaron sobre los mismos 6 cortes consecutivos, procedentes del Plano de Sección A. Se comparó el grosor cortical del hemisferio contralateral a la extremidad utilizada, ("hemisferio adiestrado", HA) versus el del hemisferio ipsilateral ("hemisferio no-adiestrado", HNA). Este análisis intra-sujeto se realizó también a nivel del Plano de Sección B. Las mediciones en este sector se realizaron sobre 3 cortes consecutivos de los mismos cerebros de animales adiestrados.

En los sujetos controles, se procedió a realizar el análisis sólo a nivel del Plano A, comparando el grosor cortical entre los hemisferios derecho e izquierdo.

Grosor cortical.

Se diseñó una plantilla de un corte coronal de cerebro, en una lámina de mica transparente. Sobre ésta se trazaron 12 líneas por cada hemisferio, perpendiculares a la superficie pial, según el método descrito en la literatura (Diamond et al., 1966). La distancia entre estas líneas fue de 5 mm, ubicando la primera inmediatamente después de la elevación máxima del cuerpo calloso y siguiendo las restantes un sentido dorso-lateral (Ver Fig. 3). Los cortes histológicos fueron proyectados con un aumento de 14,5 X mediante un proyector histológico Möller Wedel, sobre un tablero digitalizador (resolución = 0.025 mm; 1000 pixeles/pulgada), conectado a un computador Acer 910 provisto del programa "Sigmascan Measurement System" (Jandel Scientific).

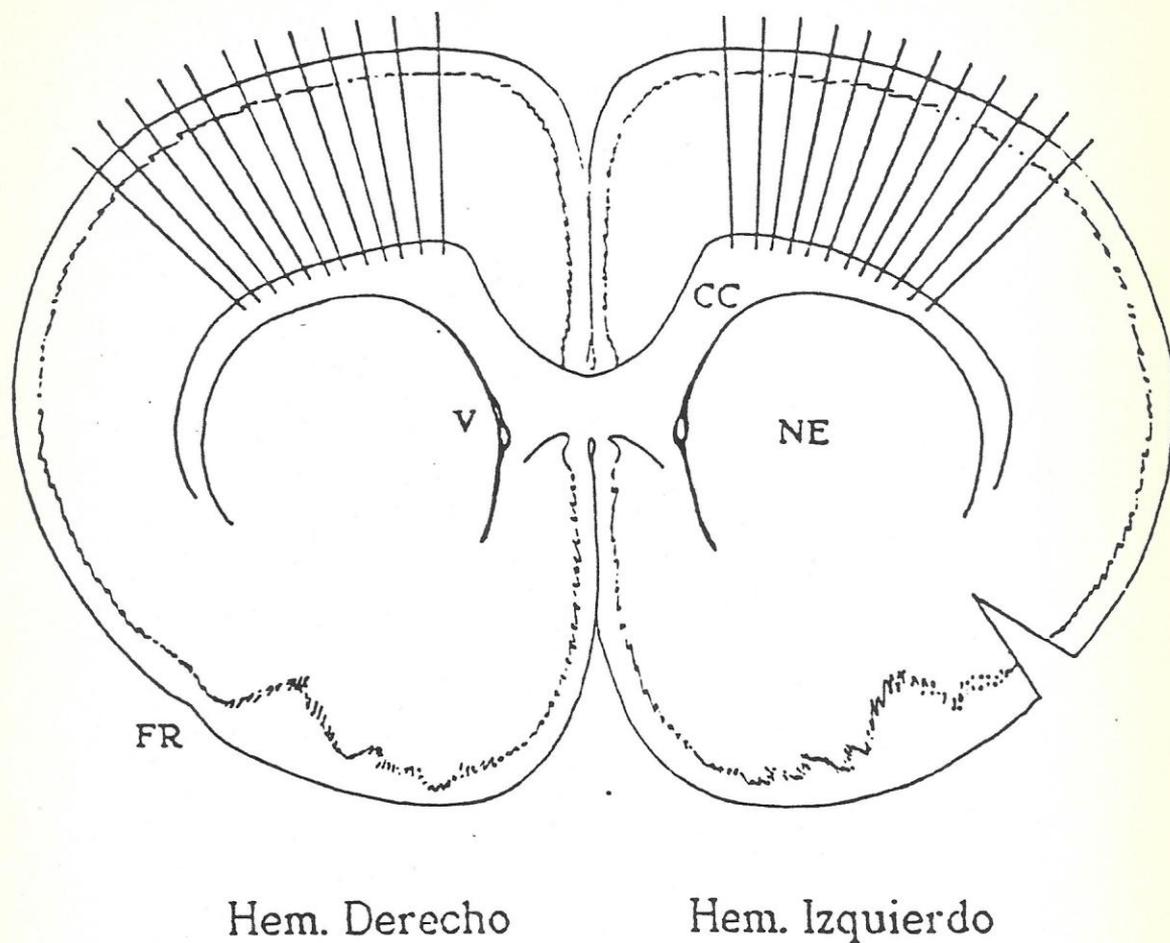


FIGURA 3.- ESQUEMA DE UN CORTE CORONAL DE CEREBRO DE RATA, MOSTRANDO LA DISPOSICION DE LAS LINEAS DE MEDICION DEL GROSOR CORTICAL.

Se trazaron 12 líneas por hemisferio cerebral, ubicando la primera de ellas en la parte más alta del cuerpo calloso y perpendicular a la superficie pial. Las líneas de medición se separaron entre sí por una distancia de 5 mm.

CC: Cuerpo calloso; NE: Neocórtex; V: Ventrículo lateral;
FR: Fisura rinal.

Con la ayuda de un "mouse" provisto de mirilla central se digitalizó, desde la proyección ampliada de los cortes histológicos, la posición de los puntos de intersección de las líneas de la plantilla, tanto con la superficie pial como con el borde dorsal del cuerpo calloso. El programa determina la magnitud de la distancia entre los dos puntos, en base a una calibración previa, y almacena los datos en una planilla electrónica desde la cual pueden ser procesados con otro tipo de aplicaciones computacionales.

Recuento celular por área.

Este análisis se realizó mediante microscopía de luz, con un microscopio Nikon provisto de un dispositivo de dibujo (cámara lúcida) Leitz Wetzlar de 1,25 X. El recuento se realizó a un aumento de 200 X, desde la imagen formada en la cámara lúcida. Se consideraron dos sectores de recuento, determinados por los siguientes ejes referenciales: El primero está situado en la elevación máxima del cuerpo calloso (sector medial) y el segundo se encuentra formando un ángulo aproximado de 45° con el primero (Sector lateral) (Fig. 4). En cada uno de ellos se dispusieron 3 áreas paralelas de 6 cm cuadrados (1 cm = 20 μ m), separadas entre sí por distancias de 5 mm. Al ubicar estas áreas de recuento inmediatamente debajo de la capa I molecular, se cubren las capas II y III de la corteza motora. Se contabilizaron los perfiles celulares de neuronas, células gliales y endoteliales existentes en el interior, así como los de aquellas que, ubicadas en el límite, tuvieran al menos la mitad de su soma en el interior.

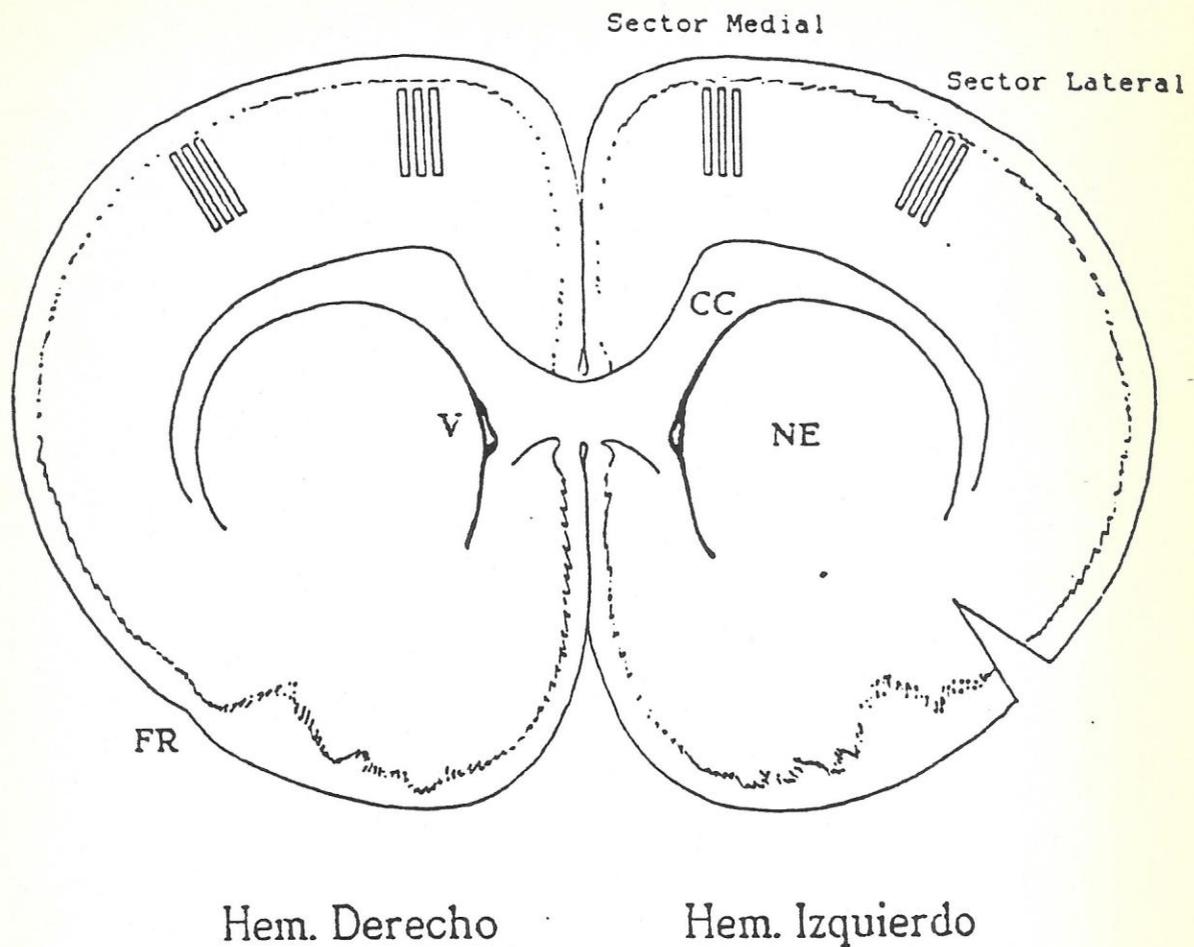


FIGURA 4.- ESQUEMA DE UN CORTE CORONAL DE CEREBRO DE RATA, MOSTRANDO LA UBICACION DE LOS SECTORES MEDIAL Y LATERAL Y LA DISPOSICION DE LAS AREAS DE RECUESTO CELULAR.

Las áreas fueron trazadas en la superficie de proyección de la cámara lúcida, ubicando las tres primeras sobre la elevación máxima del cuerpo calloso. Las tres restantes se ubicaron formando un ángulo aproximado de 45° con las anteriores. Cada una comprende una superficie de 6 cm².

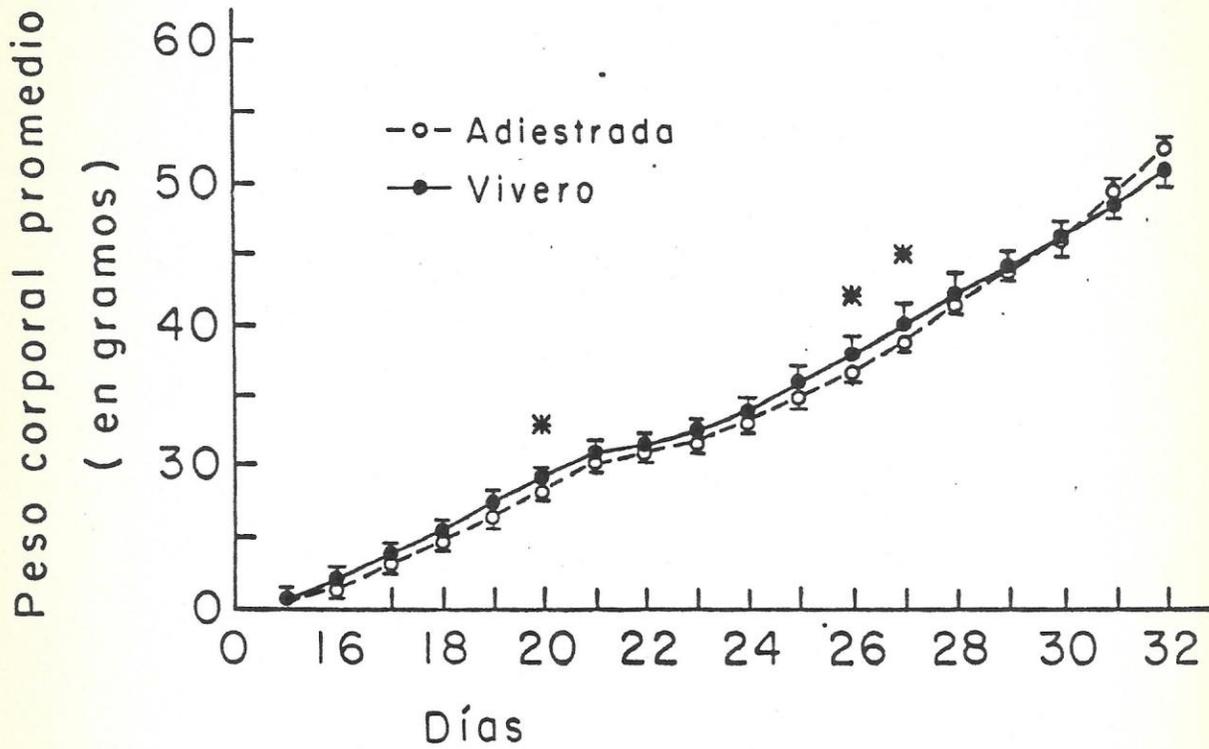
CC: Cuerpo calloso; NE: Neocórtex estriado; V: Ventrículo lateral;
FR: Fisura rinal.

RESULTADOS

I) RESULTADOS CONDUCTUALES.-

Al iniciarse la adaptación, entre los días 15 al 21 de edad, los animales exploraban la caja, ignorando inicialmente el alimento que se encontraba en su interior. Durante la etapa exploratoria descubrían la ranura, apoyándose repetidamente en su borde. La apetencia por el cereal sólo se manifestó a partir de los días 16 - 17 de edad, en tanto que la respuesta motora deseada se evidenció entre los días 19 - 20.

El peso corporal promedio de ratas de una camada adiestrada, y por lo tanto sometida a privación parcial de lactancia, y los de ratas de una camada de vivero mantenida siempre junto a la madre, se muestran en la Fig. 5. Sólo existen diferencias significativas ($p < .05$) en favor de esta última camada en los pesos promedios de los días 20 (predestete), 26 y 27 (postdestete). La privación parcial de lactancia terminó el día 21, cuando los animales fueron destetados, de modo que para éste período sólo hay un valor promedio significativamente mayor (día 20). En los restantes días, no existen diferencias significativas entre los pesos corporales promedios de ambas camadas, aun cuando existe una tendencia hacia un mayor peso corporal promedio en la camada de vivero.



* $p < 0.05$

FIGURA 5.- PROMEDIO Y DESVIACION ESTANDAR DEL PESO CORPORAL DE RATAS DE UNA CAMADA ADIESTRADA (N=6) Y DE RATAS DE UNA CAMADA CONTROL DE VIVERO (N=6), ENTRE LOS DIAS 15 Y 32 DE VIDA.

En relación con la respuesta motora exigida, 9 de los 12 sujetos adiestrados presentaron una lateralización de ésta, con un grado de exigencia superior al 92% fijado como criterio de lateralización. Los 3 restantes, si bien mostraron una tendencia en su respuesta, esta no alcanzó a satisfacer el criterio, por lo tanto estos animales se consideraron "alternantes" y fueron descartados del análisis morfológico. La Tabla 1 muestra el porcentaje total de lateralización de la respuesta motora, efectuada con la extremidad preferida por cada rata experimental, en un total de 1000 ensayos. El porcentaje de lateralización de los animales controles se obtuvo de un máximo de 50 respuestas, exigidas el día 31 de edad.

Las fluctuaciones en la lateralización de cada sujeto durante los 10 días de adiestramiento se muestran en la Fig. 6. Los valores porcentuales diarios se obtuvieron promediando los observados en las 4 sesiones del mismo día. Es notable la alta consistencia en el uso de la extremidad "preferida" en los animales que satisfacen el criterio de lateralización.

II) RESULTADOS MORFOLOGICOS.-

Comparación Intra-sujetos.

Grosor Cortical.

A nivel del Plano A, ubicado en la zona de representación cortical motora de la extremidad anterior, la comparación del grosor cortical entre HA versus HNA de cada sujeto del grupo experimental se realizó con un total de 144 mediciones. De este total,

TABLA 1. Porcentaje total de lateralización (% Lat.) de la respuesta motora alcanzado por los sujetos adiestrados y controles. Se muestra también los porcentajes obtenidos por ratas adiestradas que no fueron consideradas en el estudio morfológico.

Condición del sujeto	Número de código	Extremidad "preferida"	% Lat.
Ratas adiestradas	R1	IZQ	98.6
	R2	DER	99.8
	R3	DER	99.1
	R4	DER	99.4
	R5	DER	99.5
	R6	IZQ	98.4
	R7	DER	97.9
Ratas Controles	R8	DER	100
	R9	DER	100
	R10	DER	100
	R11	ALT	88 *
	R12	IZQ	96
	R13	IZQ	100
Ratas Adiestradas no analizadas	R14	DER	100
	R15	DER	93.6 **
	R16	DER	99.8 **
	R17	IZQ	71.2 ***
	R18	DER	74.4 ***
	R19	IZQ	61.8 ***

Porcentaje de lateralización determinado en el total de 1000 ensayos para las ratas adiestradas y en 25 ó 50 ensayos para las ratas controles.

- * Tendencia a la derecha.
- ** Cortes histológicos asimétricos.
- *** No satisfacen criterio de lateralización exigido.

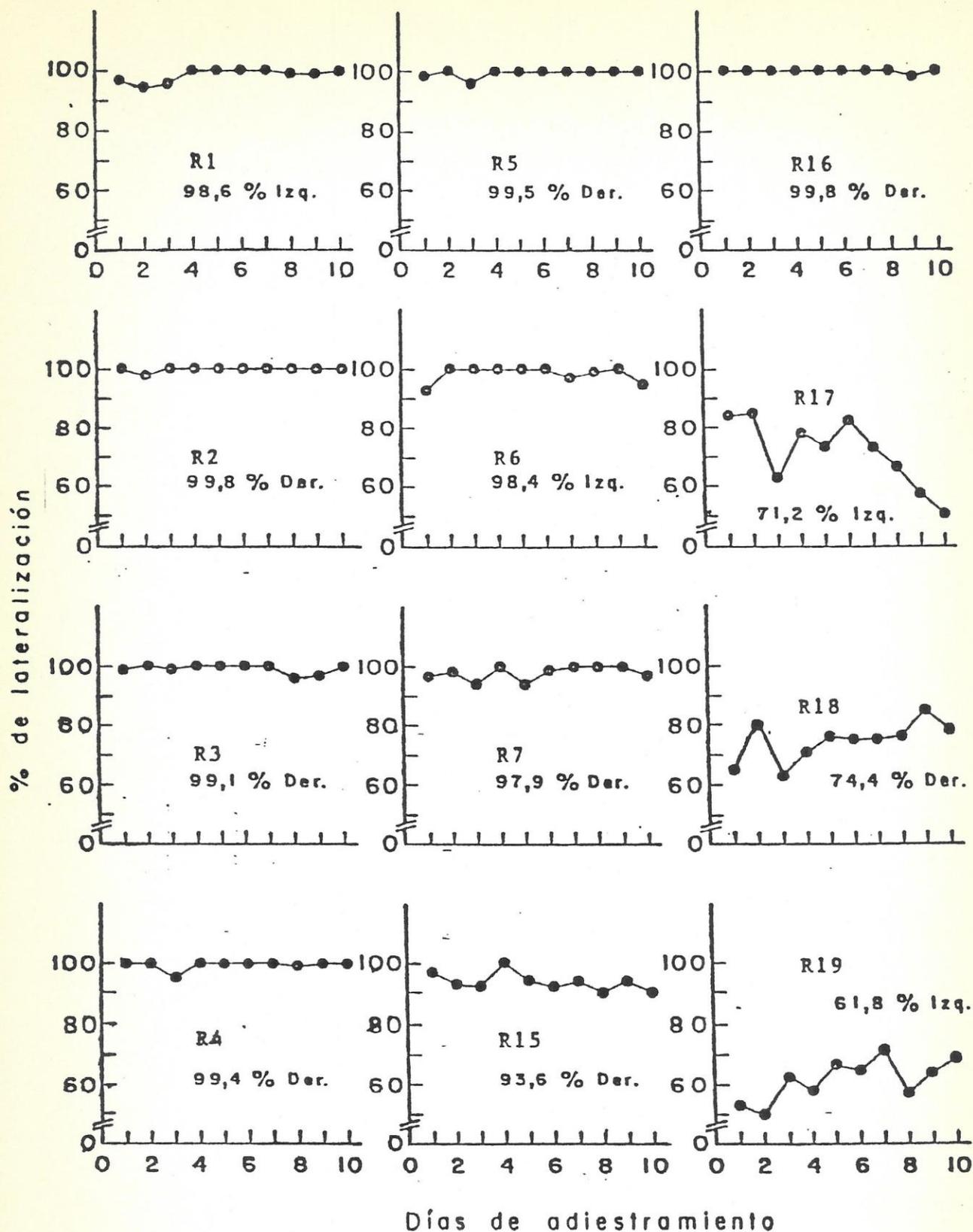


FIGURA 6.- FLUCTUACIONES INDIVIDUALES DEL PORCENTAJE DE LATERALIZACION DE LA RESPUESTA CONDUCTUAL, PRESENTADO POR LAS RATAS EXPERIMENTALES DURANTE EL ADIESTRAMIENTO.

72 valores corresponden a cada hemisferio. A nivel del Plano B, ubicado aproximadamente en la representación cortical motora de la cara, solo se consideraron 72 mediciones, correspondiendo 36 valores a cada hemisferio. La Tabla 2 muestra el promedio individual del grosor cortical y la desviación estándar para el HA y HNA de ratas adiestradas, a nivel de los dos Planos de Sección (Ver Fig. 2 en Métodos). El análisis estadístico de los datos se realizó mediante la prueba "t" de Student unilateral. Dicho estadígrafo muestra que, a nivel del Plano A, existe una diferencia altamente significativa en el promedio del grosor cortical, en favor del HA de todos los sujetos adiestrados. En seis de ellos la diferencia alcanza una alta significancia estadística ($p < 0.0025$), en tanto que en el restante (R6) alcanza una significancia sólo ligeramente menor ($p < 0.005$). En términos porcentuales, el grosor cortical de la región involucrada del HA muestra incrementos que oscilan entre un 1.2% y 6.3% en relación con la misma región del HNA.

Este mismo tipo de análisis, realizado en la zona correspondiente al Plano de Sección B de cerebros de animales adiestrados muestra que las Ratas 4 y 5 presentan un grosor cortical del HA significativamente mayor que el HNA ($p < 0.0025$ y 0.005), siendo este incremento de un 2.6% y un 3.5%, respectivamente. En las Ratas 1, 2, 3, 6 y 7, las diferencias de grosor cortical entre HA y HNA no son estadísticamente significativas, sin embargo, los valores promedios de cada uno de estos sujetos, (excepto R7) muestran una tendencia en favor del HA.

TABLA 2. Promedio individual (\bar{X}), desviación estándar (sd) y porcentaje de incremento (% Inc.) del grosor cortical entre los hemisferios adiestrados (HA) y no adiestrados (HNA) de las ratas experimentales, en los dos Planos de Sección.

PLANO DE SECCION A

SUJETO	HA $\bar{X} \pm sd$	HNA $\bar{X} \pm sd$	% Inc.	t	p <
R1 IZQ	32.2 1.1	30.9 1.1	4.34	11.62	.0025
R2 DER	31.9 1.4	30.0 1.5	6.26	12.35	.0025
R3 DER	29.7 0.9	28.2 0.8	5.24	12.03	.0025
R4 DER	30.3 0.7	28.5 0.8	6.17	17.82	.0025
R5 DER	29.6 1.1	28.3 0.7	4.70	14.99	.0025
R6 IZQ	27.7 0.7	27.3 0.7	1.17	2.83	.005
R7 DER	26.3 0.6	25.4 0.6	3.55	10.60	.0025

PLANO DE SECCION B

R1 IZQ	31.5 1.9	31.4 1.1	0.43	0.559	NS
R2 DER	29.8 2.2	29.8 1.6	0.13	0.258	NS
R3 DER	28.3 1.5	28.1 1.2	0.60	1.270	NS
R4 DER	30.2 1.6	29.1 1.3	3.50	4.196	.0025
R5 DER	28.0 1.1	27.3 2.2	2.61	2.932	.005
R6 IZQ	27.5 1.3	27.3 1.4	0.81	0.578	NS
R7 DER	24.7 0.7	24.9 0.8	-0.61	0.848	NS

Valores expresados en mm. La primera columna muestra el número de código del sujeto y la extremidad anterior "preferida". Se aplicó la prueba "t" de Student unilateral, para datos pareados.

- Plano de Sección A: Se analizaron 6 cortes histológicos consecutivos, realizando 12 mediciones por hemisferio cerebral. Total: 72 mediciones por hemisferio.
- Plano de Sección B: El mismo análisis anterior, sobre 3 cortes histológicos consecutivos. Total: 36 mediciones por hemisferio.

Igual análisis para las ratas controles, no-adiestradas, se muestra en la Tabla 3. Se compara aquí, en el Plano de Sección A, el promedio del grosor cortical y desviación estándar de los hemisferios derecho (HD) e izquierdo (HI) de sujetos controles. Se puede apreciar que R11 no presenta diferencia interhemisférica. En cinco de ellos, las diferencias no son estadísticamente significativas; sólo la rata 12 muestra una diferencia significativa ($p < 0.05$) en favor del HI.

Recuento Celular.

El recuento celular por área se analizó con un total de 72 valores por sujeto, correspondiendo 36 a cada hemisferio. Análisis preliminares de los valores obtenidos en los sectores Medial y Lateral no mostraron diferencias significativas entre ellos. Por esta razón, en el análisis estadístico posterior, no se hizo diferencia entre ambos sectores.

La Tabla 4 muestra el promedio individual del recuento celular por área del grupo experimental, en los Planos de Sección A y B de los "hemisferios adiestrados" (HA) y "no-adiestrados" (HNA). Los resultados obtenidos en el Plano A indican que el HA siempre presenta una menor densidad celular que el HNA, siendo esta diferencia altamente significativa ($p < 0.0025$) para todos los sujetos adiestrados. Cabe hacer notar que en ésta región de la corteza motora, este parámetro morfológico evidencia notorias diferencias porcentuales. Estas oscilan entre un 8.8% y un 17.8% de disminución en el recuento celular por área, en el HA.

TABLA 3. Promedio individual (\bar{X}), desviación estándar (sd) y porcentaje de incremento (% Inc) del grosor cortical entre los hemisferios derechos (HD) e izquierdos (HI) de las ratas controles, en el Plano de Sección A.

PLANO DE SECCION A

SUJETO	HD $\bar{X} \pm sd$	HI $\bar{X} \pm sd$	% Inc.	t	p
R8 DER	28.2 0.8	28.1 0.7	0.21	0.673	NS
R9 DER	29.2 0.9	29.4 1.2	-0.55	0.981	NS
R10 DER	28.1 0.8	27.9 0.8	0.43	0.739	NS
R11 ALT	28.3 0.5	28.3 0.5	0	-	-
R12 IZQ	28.1 0.8	28.4 1.1	-1.03	1.912	.05
R13 IZQ	28.0 1.1	28.1 1.0	-0.29	0.955	NS
R14 DER	30.6 0.9	30.7 0.9	-0.26	0,633	NS

Valores expresados en mm.

Se aplicó la prueba "t" de Student unilateral, para datos pareados.

Se analizaron 6 cortes consecutivos, realizando 12 mediciones por hemisferio cerebral.

Total: 72 mediciones por hemisferio.

TABLA 4. Promedio individual (\bar{X}), desviación estándar (sd) y porcentaje de disminución (% Dis.) del recuento celular por área entre los hemisferios adiestrados (HA) y no adiestrados (HNA) de las ratas experimentales, en los dos Planos de Sección.

PLANO DE SECCION A

SUJETO	HA $\bar{X} \pm sd$	HNA $\bar{X} \pm sd$	% Dis.	t	p <
R1 IZQ	23.2 2.0	26.5 1.8	-12.6	8.013	.0025
R2 DER	24.6 2.2	28.0 2.2	-12.1	7.057	.0025
R3 DER	26.2 3.0	29.2 2.6	-8.8	4.519	.0025
R4 DER	26.3 1.2	29.3 2.1	-10.2	5.758	.0025
R5 DER	20.3 2.1	24.3 2.8	-16.7	7.145	.0025
R6 IZQ	24.7 2.2	29.9 1.7	-17.4	12.441	.0025
R7 DER	24.1 2.1	29.3 2.1	-17.8	11.765	.0025

PLANO DE SECCION B

R1 IZQ	21.6 3.3	20.3 3.1	5.92	1.051	NS
R2 DER	25.4 3.2	25.3 4.9	0.43	1.159	NS
R3 DER	27.3 4.2	27.4 2.6	-0.40	0.134	NS
R4 DER	27.7 2.9	24.8 3.3	10.64	2.458	.025
R5 DER	22.5 3.4	22.1 3.6	1.73	0.360	NS
R6 IZQ	27.5 2.2	28.9 2.5	-4.98	1.758	.05
R7 DER	28.4 4.2	28.7 3.6	-0.97	0.212	NS

Valores expresados en número de células por área (6 cm², en cámara lúcida).
Se aplicó la prueba "t" de Student unilateral, para datos pareados.

- Plano de Sección A: Se analizaron 6 cortes histológicos consecutivos, realizando 6 recuentos por hemisferio cerebral. Total: 36 recuentos por hemisferio.
- Plano de Sección B: Se analizaron 3 cortes histológicos. Total: 18 recuentos por hemisferio.

El mismo tipo de análisis, realizado a nivel del Plano B, muestra que sólo la Rata 6 presenta una disminución significativa de la densidad celular en el HA ($p < 0.05$). Las Ratas 1, 2, 3, 5 y 7 no presentan diferencias estadísticamente significativas. La única excepción la constituye R4, que presenta un menor recuento celular por área ($p < 0.025$) en el HNA, es decir, en sentido inverso al esperado.

En relación con los sujetos controles, en la Tabla 5 se muestra el promedio de la densidad celular en el Plano A, de los hemisferios derecho e izquierdo de ratas no-adiestradas. Se puede apreciar que este parámetro no arroja diferencias estadísticamente significativas entre ambos hemisferios cerebrales, en ninguno de los animales controles.

Comparación Inter-sujetos.

Grosor Cortical.

Un tercer tipo de análisis se estableció comparando, a nivel del Plano de Sección A, los valores de todos los hemisferios contralaterales a la extremidad preferida, de sujetos diestros, con los hemisferios de ratas controles con la misma "preferencia" manual. El mismo procedimiento se aplicó a los sujetos izquierdos. Los animales que mostraron "preferencia" manual derecha (hem. izquierdo "entrenado") fueron $N = 5$ experimentales y $N = 4$ controles. Las ratas con "preferencia" manual izquierda (hem. derecho "entrenado") fueron $N = 2$, en cada condición.

TABLA 5. Promedio individual (\bar{X}), desviación estándar (sd) y porcentaje de disminución (% Dis.) del recuento celular por área entre los hemisferios derechos (HD) e izquierdos (HI) de las ratas controles, en el Plano de Sección A.

PLANO DE SECCION A

SUJETO	HD $\bar{X} \pm sd$	HI $\bar{X} \pm sd$	% Dis.	t	p <
R8 DER	25.9 1.7	26.2 1.8	-1.26	0.992	NS
R9 DER	27.3 2.1	27.8 1.6	-1.80	1.334	NS
R10 DER	26.3 1.9	26.8 1.6	-1.98	1.441	NS
R11 ALT	23.3 2.2	23.5 2.1	-0.60	0.353	NS
R12 IZQ	27.6 1.8	27.9 1.7	-1.00	0.860	NS
R13 IZQ	26.9 1.3	27.1 1.3	-0.59	0.600	NS
R14 DER	27.4 1.8	27.5 1.5	-0.32	0.234	NS

Valores expresados en número de células por área (6 cm², en cámara lúcida).
Se aplicó la prueba "t" de Student unilateral, para datos pareados.

Se analizaron 6 cortes histológicos consecutivos, realizando 6 recuentos por hemisferio cerebral.

Total: 36 recuentos por hemisferio.

En la Tabla 6 se muestran los promedios del grosor cortical en el Plano A, de los hemisferios "adiestrados" y de los hemisferios controles, así como el número total de mediciones consideradas en el análisis estadístico. Los hemisferios "adiestrados", ya sean izquierdos o derechos tienen, a nivel de este Plano, un grosor cortical significativamente mayor ($p < 0.0025$) que los hemisferios provenientes de sujetos controles. Al establecer una comparación inter-sujetos de éste parámetro, entre los animales adiestrados versus sujetos controles, se encuentra un porcentaje de incremento de 2.0 % en los HD y de 6.6 % en los HI.

Recuento celular

El recuento celular por área en el Plano A, se muestra en la Tabla 7, donde se puede apreciar que los hemisferios "adiestrados" presentan un recuento celular promedio significativamente menor que los hemisferios controles ($p < 0.0025$). Al analizar la variación inter-sujetos de éste parámetro, se puede apreciar que, en este Plano de Sección, el porcentaje de disminución de la densidad celular, en los sujetos adiestrados versus controles, es de 10.0 % en los HD y de 12.3 % en los HI.

Estos resultados son concordantes con los obtenidos en el análisis intra-sujeto. Es decir, el área de representación cortical de la extremidad anterior en los hemisferios "entrenados", sean éstos derechos o izquierdos, es significativamente diferente, tanto en grosor cortical como en densidad celular, al comparar los cerebros de animales entrenados versus los de sujetos controles, no-adiestrados.

TABLA 6.- Promedios (\bar{X}), desviación estándar (sd) y porcentaje de incremento (% Inc.) del grosor cortical de los hemisferios contralaterales a la extremidad "preferida" de ratas adiestradas y de sujetos controles con la misma "preferencia" manual. Plano de Sección A.

Pref	Hem. Adiestrados		Hem. Controles		% Inc.	t	p <
	N	$\bar{X} \pm sd$	N	$\bar{X} \pm sd$			
DER	360	29.55 2.08	288	28.97 1.42	2.0	4.00	.0025
IZQ	144	29.95 2.48	144	28.09 0.97	6.6	8.35	.0025

Valores expresados en mm. N: número de mediciones por condición.
Se aplicó la prueba "t" de Student, no-correlacionada, unilateral.
(gl: Der=646, Izq=286)

TABLA 7.- Promedios (\bar{X}), desviación estándar (sd) y porcentaje de disminución (% Dis.) del recuento celular por área de los hemisferios contralaterales a la extremidad "preferida" de ratas adiestradas y de sujetos controles con la misma "preferencia" manual. Plano de Sección A.

Pref	Hem. Adiestrados		Hem. Controles		% Dis.	t	p <
	N	$\bar{X} \pm sd$	N	$\bar{X} \pm sd$			
DER	180	24.37 3.25	144	27.09 1.72	10.0	9.1	.0025
IZQ	72	23.94 2.23	72	27.30 1.60	12.3	10.3	.0025

Valores expresados en número de células por área (6 cm², en cámara lúcida).
N: número de recuentos por condición.
Se aplicó la prueba "t" de Student, no-correlacionada, unilateral.
(gl: Der=322, Izq=142)

DISCUSION

La Tesis planteada se fundamenta en estudios previos que muestran un alto grado de plasticidad en la corteza cerebral de la rata, frente a estimulaciones ambientales y en situaciones de adiestramiento. Hay abundante evidencia de cambios morfológicos en la corteza visual de las ratas sometidas a medios enriquecidos con estímulos polisensoriales (Holloway, 1966; Volkmar y Greenough, 1972; Connor et al., 1980; Juraska et al., 1980; Connor, 1982; Green et al., 1983). Nos preguntamos si una situación de estimulación más restringida, tal como un adiestramiento motor específico, sería suficiente para gatillar cambios plásticos en el cerebro de la rata. La Tesis formulada fue la siguiente: **La corteza motora de la rata, considerada poco dependiente del ambiente, puede evidenciar cambios morfológicos gruesos a consecuencia de una estimulación específica, tal como el adiestramiento motor lateralizado, si éste se realiza precozmente.**

Con respecto a la tarea exigida a la rata - coger alimento con una extremidad anterior - se trata de un aprendizaje visuo-motor que ha sido empleado como tal en trabajos previos de otros autores (Peterson y Devine, 1963; Hyden y Egyházi, 1964; Krivanek y Buresová, 1972).

La lateralización de la respuesta, requisito fundamental para comparar posibles efectos diferenciales entre ambos hemisferios cerebrales, mostró ser muy adecuada. La mayoría de los animales alcanzaron el criterio de lateralización, de modo que se seleccionaron

como sujetos experimentales aquellas ratas que lograron un 92% o más de respuestas con una misma extremidad, fuese esta derecha o izquierda. Las ratas que no alcanzaron el criterio (un 25% de la muestra) de todos modos presentaban una clara tendencia en su lateralización conductual.

El adiestramiento propiamente tal, se inició el día 22 post-natal, en pleno período de destete, mientras que la adaptación y aprendizaje se realizaron durante la etapa pre-destete. Es muy poco probable que la tarea pueda ser efectuada por sujetos más jóvenes, ya que factores de maduración neural y de motivación son requeridos para su ejecución. Las ratas abren los párpados entre los días 12 -14 de edad y muestran apetencia por un alimento distinto a su dieta láctea sólo entre los días 16 - 17, período que coincide con la aparición de los incisivos. Es razonable pensar que estos factores, que inciden en la respuesta, determinen el momento en que el animal está capacitado para efectuar la tarea motora requerida. Nuestro aporte en este sentido, consiste en haber determinado el momento más precoz en que la rata puede ejecutarla.

Es necesario señalar que la lateralización de la respuesta conductual no es inducida por el adiestramiento. En la gran mayoría de las ratas, ésta es innata y sólo se pondría en evidencia a consecuencia de la situación experimental. Los sujetos controles presentan una lateralización conductual similar.

El análisis del grosor cortical del grupo experimental, en el Plano de Sección A en la región motora estudiada, muestra que existen diferencias significativas al comparar los datos de los hemisferios adiestrado y no-adiestrado (comparación intra-sujeto), y los de

hemisferios homónimos de ratas adiestradas versus controles (comparación inter-sujetos). Por el contrario, en los animales controles no-adiestrados no se encontraron diferencias significativas para este parámetro entre los hemisferios derechos e izquierdos.

Al comparar el grosor cortical de ambos hemisferios de ratas adiestradas, en el Plano de Sección B, no se encontraron diferencias significativas. Esto confirma nuestra interpretación de los resultados obtenidos en el Plano A, región motora específica para la tarea. El hecho que dos sujetos adiestrados muestren un cambio morfológico en esta región podría deberse a variaciones individuales, ya sea en la extensión de la representación cortical (Sanderson et al., 1984; Merzenich et al, 1987; Dawson y Killackey, 1987) y/o en la forma de ejecutar la tarea, comprometiendo un mayor número de masas musculares.

El incremento del grosor cortical en la región motora involucrada en la ejecución de la tarea varía en un bajo porcentaje. Cabe señalar que no todos los sujetos entrenados muestran un cambio de la misma magnitud. Para seis de los siete animales adiestrados el incremento del grosor cortical en el HA está entre un 3.6 y un 6.3%. El menor incremento obtenido es de un 1.2% (R6), sin embargo es estadísticamente significativo ($p < 0.005$). En base a los antecedentes expuestos, el parámetro grosor cortical pareciera ser relativamente sensible al adiestramiento motor efectuado en el predestete tardío y postdestete temprano de la rata. Llama poderosamente la atención que se obtengan modificaciones morfológicas gruesas en solo 10 días de adiestramiento, con un tiempo total no superior a 6½ horas. Este tiempo es más corto que los que se

infieren de trabajos de otros autores, los que van desde 18 días a 6 meses de permanencia en medios diseñados para promover actividad física voluntaria (Physh y Weiss, 1979; Stell y Riesen, 1978).

El otro parámetro estudiado, recuento celular por área, muestra cambios que se correlacionan inversamente con los del grosor cortical. Al realizar una comparación interhemisférica, el HA presenta un recuento celular significativamente menor que el HNA, para todos los sujetos experimentales. Esta diferencia se hace nuevamente evidente si se comparan los recuentos correspondientes a los hemisferios contralaterales al miembro adiestrado, de ratas experimentales, con los de los hemisferios equivalentes de sujetos controles no-adiestrados, que muestran la misma "preferencia" manual. Por el contrario, al hacer una comparación del recuento celular entre los hemisferios derecho e izquierdo de animales controles no se encuentran diferencias significativas. El mismo parámetro, analizado en el Plano de Sección B de cerebros de ratas adiestradas, no presenta diferencias significativas en cinco de los siete sujetos. De los dos animales restantes, uno de ellos (R6) presenta un recuento celular significativamente menor en favor del HA, en tanto que en el otro (R4), la diferencia se da en sentido inverso.

En términos generales, estos resultados estarían corroborando el carácter localizado de los cambios plásticos descritos.

Del análisis de los porcentajes de disminución del recuento celular, en la región cortical involucrada del hemisferio adiestrado, se puede apreciar que este parámetro morfológico varía en mayor magnitud que el grosor cortical, en respuesta al adiestramiento motor realizado. Los valores porcentuales de disminución del recuento celular por área fluctúan entre un 8.8% y un 17.8% en los HA de sujetos entrenados, contituyendo así, el cambio morfológico de mayor sensibilidad frente a nuestro paradigma experimental.

En relación con el fenómeno de lateralización morfológica cerebral en las ratas adiestradas, éste resultaría de la conjunción de dos factores: uno genético -lateralización conductual - y otro adquirido -lateralización morfológica. Este último se evidenciaría a consecuencia del adiestramiento. Los sujetos controles, en cambio, si bien manifiestan lateralización manual (determinada en una sesión de prueba), no expresan una lateralización morfológica cerebral a nivel de los parámetros estudiados. Es necesario enfatizar que al plantear lo anterior, no descartamos la posibilidad que esta lateralización del uso de la extremidad anterior en ratas pudiera tener un sustrato a nivel electrofisiológico, bioquímico o estructural.

Es razonable entonces concluir, que el factor genético por sí solo no explicaría las diferencias interhemisféricas observadas en las ratas experimentales.

Al analizar los cambios morfológicos obtenidos, cabe señalar que el menor recuento celular en los hemisferios adiestrados de sujetos experimentales podría atribuirse a un

aumento de las ramificaciones dendríticas, situación que resulta consistente con un trabajo previo de Turner y Greenough (1985), quienes observaron un incremento significativo del grosor cortical del área 17 en la corteza visual de ratas estimuladas. Este cambio está asociado a un aumento, también significativo del número de células gliales y material dendrítico. La relación entre estos dos parámetros aparece como una constante en diversos trabajos (Diamond et al, 1964 y 1966; Diamond, 1967; Clark et al., 1973; Greenough y Volkmar, 1973; Katz y Davies, 1984).

Es importante señalar que el propio Nissl observó hace un siglo atrás que la disminución de la densidad celular constituye un índice de evolución filogenética. Esta afirmación, que podría interpretarse "a priori" como un signo negativo o de deterioro estructural, corresponde, durante el desarrollo filogenético y ontogenético a un proceso de maduración neuronal. Tanto la estimulación ambiental como el adiestramiento provocan efectos que son congruentes con los descritos previamente por Nissl. Dichos cambios se evidencian además en un mayor desarrollo de las prolongaciones dendríticas de determinadas poblaciones neuronales, tal como lo han observado otros autores (Greenough et al., 1973; Uylings et al., 1978; Juraska et al., 1980, entre otros).

Nuestros resultados son concordantes, en términos generales, con los que han obtenidos otros investigadores con el paradigma de la estimulación ambiental, los que fueron analizados en la Introducción.

Una de las diferencias fundamentales que muestran nuestros resultados, en relación con los de otros autores, es que el cambio plástico se produce en una zona relativamente

restringida, dentro de un área funcionalmente específica, como es la representación motora cortical de la extremidad anterior involucrada. En los trabajos anteriormente citados, el cambio compromete regiones mucho más extensas, como toda el área visual.

Una gran cantidad de evidencias señalan que los animales estimulados presentan incrementos significativos tanto del grosor cortical como del número y longitud de los segmentos dendríticos neuronales. La relación directa entre estos cambios parece bien fundamentada.

Por otra parte, la capacidad plástica de las neuronas de la corteza visual se expresa también frente a situaciones de privación parcial de la nutrición o estímulos ambientales. Fifkova (1969), en un estudio del efecto de la privación unilateral de estímulos visuales en la rata, encontró una disminución del grosor de las capas II a la IV de la corteza visual, y un incremento de la densidad celular en las capas III y IV. Los estudios de Leuba y Rabinowicz (1979) sobre diferenciación neuronal y desnutrición han mostrado que este proceso se retarda si las camadas son sometidas a restricción alimentaria precoz. Este fenómeno se evidencia como una disminución del grosor de las capas corticales y un estrecho empaquetamiento de los elementos celulares, lo que necesariamente va aparejado con un retardo en la diferenciación neuronal. Es evidente que a medida que progresa la diferenciación, las neuronas van incrementando sus ramificaciones dendríticas, de modo que, para una misma área, la densidad neuronal disminuye (Leuba y Rabinowicz, 1979; Beaver, 1982; Adaro et al., 1986).

Sobre la base de los argumentos anteriores, parece razonable pensar que el incremento del grosor cortical evidenciado por los "hemisferios adiestrados" podría explicarse por un probable aumento del material dendrítico neuronal en la región involucrada. Para dilucidar este punto, será necesario cuantificar este parámetro. Este tipo de estudios, con metodología de Golgi, se encuentra en marcha dentro del Proyecto de Investigación del cual esta Tesis forma parte.

Observaciones preliminares de los perfiles celulares de los cerebros estudiados parecen indicar que existirían diferencias cualitativas entre los hemisferios "adiestrado" y "no-adiestrado". El primero presenta perfiles celulares piriformes, en tanto que en el segundo, éstos son más redondeados. Esto podría interpretarse como un mayor grado de madurez o diferenciación celular, punto que podría dilucidarse con el estudio de Golgi mencionado.

Los resultados obtenidos confirman la Tesis inicial: **La corteza motora de la rata es suficientemente plástica como para evidenciar cambios morfológicos gruesos frente al paradigma de adiestramiento motor lateralizado precoz.**

Los resultados de este trabajo permiten delimitar una región relativamente pequeña de la corteza motora de la rata, en la cual se evidencia un cambio plástico. Esto es de gran importancia para trabajos posteriores, pues precisa un lugar de búsqueda para la identificación y caracterización de los elementos estructurales involucrados en este cambio. Así, las investigaciones proyectadas a un corto plazo contemplan:

- 1) identificación y caracterización de las poblaciones neuronales que expresan mayores

cambios, 2) cuantificación de las ramificaciones dendríticas mediante el método de Golgi, 3) análisis de la actividad neuronal por medio de la técnica de citocromo-oxidasa (Wong-Riley, M. T., 1989). En una etapa posterior, se intentará la determinación de posibles neurotransmisores involucrados, mediante técnicas de inmunocitoquímica.

CONCLUSIONES

- 1.- La tarea visuo-motora exigida, pone en evidencia que la rata lateraliza su respuesta conductual en un alto porcentaje, manifestando una clara "preferencia manual".
- 2.- Las ratas adiestradas presentan lateralización conductual y morfológica, a nivel cerebral. Esta última se manifiesta en el grosor cortical y en el recuento celular por área.
- 3.- Los sujetos adiestrados evidencian un aumento significativo del grosor de una región de la corteza motora, en el hemisferio contralateral a la extremidad utilizada. Las diferencias encontradas, tanto intra como inter-sujetos, son altamente significativas.
- 4.- En las ratas adiestradas, la densidad celular de la región motora específica de la extremidad utilizada, muestra una disminución con respecto al "hemisferio no-adiestrado". Esta diferencia es también altamente significativa, tanto intra como inter-sujetos

5.- Las ratas controles, aunque muestran lateralización en el uso de la extremidad, no revelan diferencias morfológicas estadísticamente significativas entre los hemisferios derecho e izquierdo.

6.- Un período de 10 días de adiestramiento, con 1000 ensayos por animal y un tiempo total de aproximadamente 6½ hrs, fue suficiente para desencadenar los cambios morfológicos analizados.

7.- Los cambios morfológicos inducidos por este tipo de adiestramiento, se manifiestan en una zona restringida de la corteza motora, correspondiente a la representación cortical de la extremidad utilizada.

REFERENCIAS

ADARO, L., FERNANDEZ, V. & KAUFFMANN, W., (1986). Effects of nutritional-environmental interactions upon weight, body size and development of cortical pyramids. Nutr. Rep. Intl., 33: 1013-1020.

ALTMAN, J & DAS, G. D., (1964). Autoradiographic examination of the effects of enriched environment on the rate of glial multiplication in the adult rat brain. Nature, 4964: 1161-1163.

BATESON, P. G., ROSE, S. P. & HORN, G., (1973). Imprinting: lasting effects on uracil incorporation into chick brain. Science, 181: 256-258.

BEAVER, B. V., (1982). Somatosensory development in puppies. Vet. Med. Small Anim. Clin., 77: 39-41.

BENNET, E. L., (1976). Cerebral effects of differential experience and training. En: M. R. Rosenzweig & E. L. Bennet (Eds.), "Neural Mechanisms of Learning and Memory", MIT Press, Cambridge, Mass.

BENNETT, E. L., ROSEZWEIG, M. R. & DIAMOND, M. C., (1970). Time course of effects of differential experience on brain measures and behavior in rats. En: W. L. Byrne (Ed.), "Molecular Approaches to Learning and Memory". Academic Press, New York.

BLACK, J. E. & GREENOUGH, W. T., (1986). Induction of pattern in neural structure by experience: Implications for cognitive development. En: M. Lamb, A. Brown & B. Rogoff (Eds.), "Advances in Developmental Psychology", Vol. 4, Lawrence Earlbaum Associates: Hillsdale, New York.

CAMEL, J. E., WITHERS, G. S. & GREENUOGH, W. T., (1986). Persistence of visual cortex dendritic alterations induced by postweaning exposure to a "superenriched" environment in rats. Behav. Neurosci., 100: 810-813.

CAVINESS, V. S., (1975). Architectonic map of neocortex of the normal mouse. J. Comp. Neurol., 164: 247-264.

CLARK, G.M., ZAMENHOF, S., VAN MARTHENS, E., GRAUEL, L. & KRUGER, L., (1973). The effect of prenatal malnutrition on dimensions of cerebral cortex. Brain Res. 54: 397-402.

CONNOR, J. R., (1982). A dichotomous response by two population of layer V pyramidal neurons in the old adult rat visual cortex to differential housing conditions. Brain Res., 243: 153-154.

CONNOR, J. R., DIAMOND, M. C. & JOHNSON, R. E., (1980). Occipital cortical morphology of the rat: alterations with age and environment. Exp. Neurol., 68: 158-170.

CUMMINS, R. A. & LIVESEY, P., (1979). Environmental enrichment, cortex length, and the rank order effect. Brain Res., 178: 89-98.

CUMMINS, R. A., WALSH, R.N., BUDTZ-OLSEN, O., KONSTANTINOS, T & HOSFALL, C. R., (1973). Environmentally-induced changes in the brains of elderly rats. Nature, 243: 516-518.

CHANG, F. L., & GREENOUGH, W. T., (1982). Lateralized effect of monocular training on dendritic branching in adult split-brain rats. Brain Res., 232: 283-292.

DAWSON, D. R. & KILLACKY, H. P., (1987). The organization and mutability of the forepaw and hindpaw representations in the somatosensory cortex of the neonatal rat. J. Comp. Neurol., 256: 246-256.

DIAMOND, M. C., (1967). Extensive cortical depth measures and neuron size increases in the cortex of environmentally enriched rats. J. Comp. Neurol., 131: 357-364.

DIAMOND, M. C., KRECH, & ROSENZWEIG, M., (1964). The effects of an enriched environment on the histology of the rat cerebral cortex. J. Comp. Neurol., 123: 111-120.

DIAMOND, M. C., LAW, F., RHODES, H., LINDNER, B., ROSENZWEIG, M., KRECH, D. & BENNETT, E., (1966). Increases in cortical depth and glial numbers in rats subjected to enriched environment. J. Comp. Neurol., 125: 117-125.

DIAMOND, M. C., ROSENZWEIG, M., BENNETT, E., LINDNER, B. & LYON, L., (1972). Effects of environmental enrichment and impoverishment on rat cerebral cortex. J. Neurobiol., 3: 47-64.

- DIAMOND, M. C., LINDNER, B., JOHNSON, R., BENNETT, E. & ROSENZWEIG, M. R., (1975). Differences in occipital cortex synapses from enriched, impoverished and standard colony rats. J. Neurosci. Res., 1: 109-119.
- DIAMOND, M. C., JOHNSON, R. E., PROTTI, A. M., OTT, C. & KAJISA, L., (1985). Plasticity in the 90-day-old rat cerebral cortex. Exp. Neurol., 87: 309-317.
- DOBBING, J. & SANDS, J., (1971). Vulnerability of developing brain. Biol. Neonate, 19: 393-378.
- DOLBYKAN, E., HERNANDEZ-MESA, N. & BURES, J., (1977). Skilled forelimb movements and unit activity in motor cortex and caudate nucleus in rats. Neuroscience, 2: 73-80.
- DONOGHUE, J. P. & WISE, S. P., (1982). The motor cortex of the rat: Cytoarchitecture and microstimulation mapping. J. Comp. Neurol., 212: 76-88.
- FERCHMIN, P. A., ETEROVIC, V. A. & CAPUTTO, R., (1970). Studies of brain weight and RNA content after short periods of exposure to environmental complexity. Brain Res., 20: 49-57.
- FERCHMIN, P. A., BENNETT, P. E. & ROSENZWEIG, M., (1975). Direct contact with enriched environment is required to alter cerebral weights in rats. J. Comp. Physiol. Psychol., 88: 360-367.
- FIFKOVA, E., (1969). The effect of unilateral deprivation on visual centers in rats. J. Comp. Neurol., 140: 431-438.
- FORGAYS, D. G. & FORGAYS, J. W., (1952). The nature of the effect of free-environmental experience in the rats. J. Comp. Physiol. Psychol., 45: 322-328.
- FORGAYS, D. G. & READ, J. M., (1962). Crucial periods for free-environmental experience in the rat. J. Comp. Physiol. Psychol., 55: 816-818.
- GLOBUS, A., ROSENZWEIG, M. R., BENNETT, E. L. & DIAMOND, M. C., (1973). Effects of differential experience on dendritic spine counts in rat cerebral cortex. J. Comp. Physiol. Psychol., 82: 175-181.

GREEN, E. J., GREENOUGH, W. T. & SCHLUMPF, B. E., (1983). The effects of complex or isolated environments on cortical dendrites of middle-aged rats. Brain Res., 264: 233-240.

GREENOUGH, W. T. & VOLKMAR, F. R., (1973). Pattern of dendritic branching in occipital cortex of rats reared in complex environments. Exp. Neurol., 40: 491-504.

GREENOUGH, W. T. & CHANG, F. L., (1985). Synaptic structural correlates of information storage in mammalian nervous systems. En: C. V. Cotman (Ed.), "Synaptic Plasticity", Academic Press, New York.

GREENOUGH, W. T. & BAYLEY, C. H., (1988). The anatomy of a memory: convergence of results across a diversity of test. Trends Neurosci., 11: 142-147.

GREENOUGH, W. T. & CHANG, F. L., (1988). Plasticity of synapse structure and pattern in the cerebral cortex. En: E. G. Jones & A. Peters (Eds.), "Cerebral Cortex", Vol 7, Plenum Publishing Co., New York.

GREENOUGH, W. T., VOLKMAR, F. R. & JURASKA, J. M., (1973). Effects of rearing complexity on dendritic branching in frontolateral and temporal cortex of the rat. Exp. Neurol., 41: 371-378.

GREENOUGH, W. T., WEST, R. W. & De VOOGD, T. J., (1978). Subsynaptic plate perforations: Changes with age and experience in the rat. Science, 202: 1096-1098.

GREENOUGH, W. T., JURASKA, J. M. & VOLKMAR, F. R., (1979). Maze training effects on dendritic branching in occipital cortex of adult rats. Behav. Neural Biol., 26: 287-297.

GREENOUGH, W. T., HWANG, H. M. & GORMAN, C., (1985). Evidence for active synapse formation or altered postsynaptic metabolism in visual cortex of rats reared in complex environments. Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 82: 4549-4552.

HALL, R. D. & LINDHOLM, E. P., (1974). Organization of motor and somatosensory neocortex in the albino rat. Brain Res., 66: 23-38.

HEBB, D., (1949). "The Organization of Behavior", Wiley, New York.

- HOLLOWAY, R. L., (1966). Dendritic branching: some preliminary results of training and complexity in the rat visual cortex. Brain Res., 2: 393-396.
- HUBEL, D. H. & WIESEL, T. N., (1963). Single-cell responses in striate cortex of kittens deprived of vision in one eye. J. Neurol., 26: 1003-1017.
- HUBEL, D. H. & WIESEL, T. N., (1965). Comparison of the effects of unilateral and bilateral eye closure on cortical unit responses in kittens. J. Neurophysiol., 28: 1029-1040.
- HYDEN, H. & EGYHAZI, E., (1964). Changes in RNA content and base composition in cortical neurons of rats in a learning experiment involving transfer of handedness. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 52: 1030-1035.
- JACOBSON, M., (1973) A plenitude of neurons. En: G. Gottlieb (Ed.), "Studies on the Development of Behavior and the Nervous System". Academic Press, New York.
- JAMES, H., (1960). Canad. J. Psychol., 14: 13-20. Citado sin referencia al título en: "Psychology", D. O. Hebb, (1966), W. B. Saunders Company, Philadelphia.
- JURASKA, J. M., (1984). Sex differences in dendritic response to differential experience in the rat visual cortex. Brain Res., 295: 27-34.
- JURASKA, J. M., GREENOUGH, W. T., ELLIOT, C., MACK, K. & BERKOWITZ, R., (1980). Plasticity in adult rat visual cortex: An examination of several cell populations after differential rearing. Behav. Neural Biol., 29: 157-167.
- KATZ, H. B. & DAVIES, C. C., (1984). Effects of differential environment on the cerebral anatomy as a function of previous and subsequent housing conditions. Exp. Neurol., 83: 274-287.
- KOLB, B., (1984). Functions of the frontal cortex of the rat: A comparative review. Brain Res. Rev., 8: 65-98.
- KRETTICK, J. E. & PRICE, J. L., (1977). The cortical projections of the mediodorsal nucleus and adjacent thalamic nuclei in the rat. J. Comp. Neurol., 171: 157-192.
- KRIEG, W. J., (1946). Connections of the cerebral cortex. I. The albino rat. A topography of the cortical areas. J. Comp. Neurol., 84: 221-275.
- KRIVANEK, J. & BURESOVA, O., (1972). Cortical acetyl-cholinesterase and "handedness" in rats. Experientia, 28: 291-292.

- LEUBA, G. & RABINOWICZ, TH., (1979). Long-term effects of postnatal undernutrition and maternal malnutrition on mouse cerebral cortex. Exp. Brain Res., 37: 283-298.
- LE VAY, S., WIESEL, T. N. & HUBEL, D. H., (1980). The development of ocular dominance columns in normal and visually deprived monkeys. J. Comp. Neurol., 191: 1-51.
- LORENZ, K., (1965). "Evolution and Modification of Behavior". University of Chicago Press, Chicago.
- MALACARNE, M. G. Experiencia descrita hacia 1780 y citada por Rosenzweig, M. R., Bennett, E. L. & Diamond, M. C. en: Brain Changes in response to experience. Sci. Amer., 226: 22-29.
- MALKASIAN, D. R. & DIAMOND, M. C., (1971). The effects of environmental manipulation on the morphology of the neonate rat brain. Int. J. Neurosci., 2: 161-170.
- MELZACK, R. & THOMPSON, W. R., (1956). Canad. J. Psychol., 10: 82-90. Citado sin referencia al título en: "Psychology", D. O. Hebb, (1966), W. B. Saunders Company, Philadelphia.
- MERZENICH, M., NELSON, R., KAAS, J., STRYKER, M., JENKINS, W., ZOOK, J., CYNADER, M. & SCHOPPMANN., (1987). Variability in hand surface representations in areas 3b and 1 in adult owl and squirrel monkeys. J. Comp. Neurol., 258: 281-296.
- NEAFSEY, E. J., BOLD, E. L., HASS, G., HURLEY-GIUS, K., QUIRK, G., SIEVERT, C. F. & TERREBERRY, R. R., (1986). The organization of the rat motor cortex: A microstimulation mapping study. Brain Res. Rev., 11: 77-96.
- NISSEN, H. W., CHOW, K. L. & SEMMES, J., (1951). Am. J. Psychol., pp: 485-507. Citado sin referencia al título en: "Psychology", D. O. Hebb, (1966), W. B. Saunders Company, Philadelphia.
- PELLEGRINO, L. J. & CUSHMAN, A. J., (1967). "A Stereotaxic Atlas of the Rat Brain". Elliot, R., Lindzey, G. & MacCorquodale, K. (Eds.), Appleton-Century-Crofts, New York.
- PETERS, A. & WALSH, T. M., (1972). A study of the organization of apical dendrites in the somatic sensory cortex of the rat. J. Comp. Neurol., 144: 253-268.

PETERSON, G. M. & DEVINE, J. V., (1963). Transfers in handedness in the rat resulting from small cortical lesions after limited forced practice. J. Comp. Physiol. Psychol., 56: 752-756.

PHYSH, J.J. & WEISS, G. M., (1979). Exercise during development induce an increase in Purkinje cell dendritic tree size. Science, 206: 230-231.

RIEGE, W. H., (1971). Environmental influences on brain and behavior of year-old rats. Dev. Psychobiol., 4: 157-167.

ROSENZWEIG, M. R. & BENNETT, E. L., (1969). Effects of differential environments on brain weights and enzyme activities in gerbils, rats and mice. Dev. Psychobiol., 2: 87-95.

ROSENZWEIG, M. R. & BENNETT, E. L., (1978). Experimental influences on brain anatomy and brain chemistry in rodents. En: G. Gottlieb (Ed.), "Studies on the Development of Behavior and the Nervous System", Vol. 4., Academic Press, New York.

RUIZ-MARCOS, A. & VALVERDE, F., (1969). The temporal evolution of the distribution of dendritic spines in the visual cortex of normal and dark raised mice. Brain Res., 14: 427-445.

SANDERSON, K. J., WELKER, W. & SHAMBES, G. M., (1984). Re-evaluation of motor cortex and of sensorymotor overlap in cerebral cortex of albino rats. Brain Res., 292: 251-260.

SAPIENZA, S, TALBI, B., JACQUEMIN, J. & ALBE-FESSARD, D., (1981). Relationship between input and output of cells in motor and somatosensory cortices of the chronic awake rat. Brain Res., 292: 251-260.

SCHAPIRO, S. & VUKOVICH, K. R., (1970). Early experience effects upon cortical dendrites: A proposed model for development. Science, 167: 292-294.

SETTLAGE, P. H., BINGHAM, W. G., SUCKLE, H. M., BORGE, A. F. & WOOLSEY, C. N., (1949). The pattern of localization in the motor cortex of the rat. (Abstract) Fed. Proc., 8: 144.

SIREVAAG, A. M. & GREENOUGH, W. T., (1985). Differential rearing effects on rat visual cortex synapses. II. Synaptic morphometry. Dev. Brain Res., 19: 215-226.

- SIREVAAG, A. M. & GREENOUGH, W. T., (1987). Differential rearing effects on rat visual cortex synapses. III. Neuronal and glial nuclei, boutons, dendrites and capillaries. Brain Res., 424: 320-332.
- STELL, M. & RIESEN, A., (1978). Effects of early environments on monkey cortex. Neuroanatomical changes following somatomotor experience: effects on layer III pyramidal cells in monkey cortex. Behav. Neurosci., 101: 341-346.
- SZELIGO, F. & LEBLOND, C. P., (1977). Response of the three main types of glial cells of cortex and corpus callosum in rats handled during suckling or exposed to enriched, control and impoverished environment following weaning. J. Comp. Neurol., 1972: 247-264.
- TURNER, A. M. & GREENOUGH, W. T., (1983). Synapsis per neuron and synaptic dimensions in occipital cortex of rats reared in complex, social or isolation housing. Acta Stereol., 2 (Suppl. 1): 239-244.
- TURNER, A. M. & GREENOUGH, W. T., (1985). Differential rearing effects on rat visual cortex synapses. I. Synaptic and neuronal density and synapses per neuron. Brain Res., 195-203.
- UYLINGS, H., KUYPERS, K, DIAMOND, M. C. & VELTMAN, W., (1978). Effects of differential environments on plasticity of dendrites of cortical pyramidal neurons in adult rats. Exp. Neurol., 62: 658-677.
- VENABLE, N., PINTO-HAMUY, T., ARRAZTOA, J. A., CONTADOR, M. T., CHELLEW, A., PERAN, C. & VALENZUELA, X., (1988). Greater efficacy of preweaning than postweaning environmental enrichment on maze learning in adult rats. Behav. Brain Res., 31: 89-92.
- VENABLE, N., FERNANDEZ, V., DIAZ, E. & PINTO-HAMUY, T., (1989). Effects of preweaning environmental enrichment on basilar dendrites of pyramidal neurons in occipital cortex: a Golgi study. Dev. Brain Res., 49: 140-144.
- VOLKMAR, F. R. & GREENOUGH, W. T., (1972). Rearing complexity affects branching of dendrites in the visual cortex of the rat. Science., 176: 1445-1447.
- WALSH, R. N., (1981). Effects of environmental complexity and deprivation on brain anatomy and histology: A review. Int. J. Neurosci., 12: 33-51.

WESA, J. M., CHANG, F. L., GREENOUGH, W. T. & WEST, R. W., (1982). Synaptic contact curvature: effects of differential rearing on rat occipital cortex. Dev. Brain Res., 4: 253-257.

WISE, S. P & JONES, E. G., (1976). Organization and postnatal development of the commissural projections of the rat SI cortex. J. Comp. Neurol., 168: 313-343.

WONG-RILEY, M. T. T., (1989). Cytochrome oxidase: an endogenous metabolic marker for neuronal activity. Trends Neurosci., 12: 94-101.

WOOLSEY, C. N., (1960). Some observations on brain fissuration in relation to cortical localization of function. En: D. B. Tower & J. P. Shadé (Eds.), "Structure and Function of the Cerebral Cortex", Elsevier Publishing Company, Amsterdam.