

eman ta zabal zazu



Universidad  
del País Vasco

Euskal Herriko  
Unibertsitatea

# **Plasticidad Postlesional en el Sistema Visual: Estrategias Experimentales para su Incremento en el Adulto**

**TESIS DOCTORAL**  
**Bárbara Rienda Manrique**

**Leioa, 2011**



**NEUROZIENTZIAK SAILA**  
**DEPARTAMENTO DE NEUROCIENCIAS**

**MEDIKUNTZA ETA ODONTOLOGIA FAKULTATEA**  
**FACULTAD DE MEDICINA Y ODONTOLÓGIA**



Esta obra está bajo una licencia [Creative Commons Reconocimiento-NoComercial-SinObraDerivada 4.0 Unported](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/)



Trabajo realizado en el Departamento de Neurociencias de la UPV/EHU bajo la dirección del Catedrático Luis Martínez Millán y la Dra. Inmaculada Gerrikagoitia Marina.

Este trabajo está financiado por:

- Beca Predoctoral de la UPV/EHU (PIFA/01/2006/042)
- Subvención a Grupos de Investigación UPV/EHU (GIU06/15)
- Gobierno Vasco (Saiotek SA-2010/00095 y GIC10/113)
- Fondo de Investigaciones Sanitarias (PI05/2046 y PS09/00476)

La autora agradece el apoyo técnico y humano de los SGiker (UPV/EHU, MICINN, GV/EJ, FSE).



## ***AGRADECIMIENTOS***

---

Después de tanto tiempo y esfuerzo dedicado a este trabajo por fin se vislumbra el final. En este momento de regocijo piensas... “no voy a escribir una frase más por lo menos, por lo menos, en una semana”... Sin embargo, de repente te viene a la cabeza... “si todavía me faltan los agradecimientos, ¿y qué pongo yo ahora?”... Y sin acabar de formularte esa pregunta te das cuenta que, no sólo tienes la respuesta sino que además sientes la necesidad de expresarlo, porque sabes que todo ésto no hubiera sido posible sin esas personas que de algún modo, sea a nivel profesional como a nivel personal, te han apoyado durante este duro y largo, pero emocionante camino.

Ante todo quiero agradecer a mis directores, Luis e Inma, haberme brindado la oportunidad de poder formar parte de su grupo de investigación, y haberme dado su apoyo para la realización de este trabajo de tesis doctoral.

Me gustaría dar las gracias a todos los miembros del Departamento de Neurociencias, en especial al director del departamento, Pedro Grandes, por haber depositado su confianza en mi y haberme animado a tomar parte activa en las reuniones de la comisión permanente como representante de alumnos de tercer ciclo.

Quiero dar las gracias a todos mis compañeros por estar siempre ahí para intentar solucionar cualquier duda que se presentara, y por supuesto, por haber hecho que este periodo de mi vida fuera más divertido. Me encantaría poder dedicaros a cada uno de vosotros unas palabras pero no acabaría nunca, y probablemente me dejaría a alguien. Todos y cada uno de vosotros habéis puesto vuestro granito de arena en hacer que este camino sea más fácil. Me alegro de haber tenido la oportunidad de conocerlos!!

Quiero dar las gracias a mis compañeras de grupo, Laura y Fátima, por haberme apoyado, tanto en los momentos buenos como en los no tan buenos. También quiero dar las gracias a los compañeros que ya no están y a las nuevas incorporaciones. Gracias a todos!!

Me gustaría agradecer también el poder contar con el apoyo de compañeros de otros departamentos, en especial, el Departamento de Biología Celular. Muchas gracias también a vosotros. Que sepáis que todavía está pendiente una partida de paintball Neurociencias vs.

Celular, aunque sabéis que no tenéis nada que hacer... espero veros las caras en el campo de batalla!!

Aunque estéis incluidos en el párrafo anterior, quiero hacer una mención especial a María, Pafi (bueno, Pablo Moreno) y Fede (Belén, va por ti también). Qué os voy a decir que no sepáis... Simplemente, me considero afortunada por haber podido compartir con vosotros éstos momentos (bueno, y los que nos quedan por compartir...). Ojalá todo el mundo tuviera la suerte de tener a los amigos tan cerca. Aprovecho aquí para agradecer al resto de la “cuchipandi” de biólogos por todos los momentos que hemos podido disfrutar y disfrutaremos juntos, las sesiones de risoterapia que hemos vivido y viviremos. Os aseguro, que conseguís renovar las fuerzas a cualquiera, tan necesarias para seguir adelante. Gracias, os quiero!!!

No podría escribir estos agradecimientos sin dedicar una párrafo a mi gran amiga y compañera de andanzas, Belén. He tenido el placer de recorrer mano a mano este camino contigo. Aunque ya te lo he dicho, no encuentro palabras para expresarte lo agradecida que te estoy. Tu apoyo y ayuda incondicional ha sido esencial en la realización de este trabajo. Bel, aquí va nuestra primera tesis!!!! Enseguida, a ponernos manos a la obra con la segunda...

Quiero dar las gracias a mis amigas, Malia, Natalia, Susana, y Yolanda (no te nos vayas más lejos, por favor!!!) por ser quien sois, y sobre todo, por haber tenido paciencia en este último tramo final. Sabéis lo importantes que sois para mí, al fin y al cabo sois mi segunda familia. Muchas gracias, os quiero un montón!!

Por último, quiero dar las gracias a mis padres y a mi hermano. A vosotros sí que os ha tocado aguantarme... Sin embargo, siempre he podido contar con vosotros hasta en los momentos más difíciles. Muchísimas gracias, os estaré eternamente agradecida.

*“...una vez terminado el desarrollo, las fuentes de crecimiento y regeneración de los axones y dendritas se secan irrevocablemente. En los cerebros adultos las vías nerviosas son algo fijo, terminado, inmutable. Todo puede morir, nada puede regenerarse. Corresponde a la ciencia del futuro cambiar, si es posible, este cruel decreto”*

Santiago Ramón y Cajal

*“Degeneración y regeneración del sistema nervioso” (1914)*





**INDICE**

<b>ABREVIATURAS</b>	V
<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	3
1.1. El sistema visual	3
1.2. El colículo superior	4
1.3. Neuroplasticidad	6
1.4. Factores reguladores de la neuroplasticidad	9
1.4.1. Moléculas implicadas en la inhibición del crecimiento axonal	10
1.4.2. Neurotrofinas como reguladoras del crecimiento axonal	17
1.5. c-Fos	21
1.6. Magnetorrecepción	23
<b>2. PLANTEAMIENTO Y OBJETIVOS</b>	27
2.1. Planteamiento	27
2.2. Objetivos	28
<b>3. MATERIAL Y MÉTODOS</b>	33
3.1. Animal de experimentación	33
3.2. Intervenciones quirúrgicas	36
3.2.1. Anestesia y analgesia	36
3.2.2. Desafereciación retiniana unilateral	36
3.2.3. Ablación unilateral del colículo superior	37
3.2.4. Inyección de trazadores	37
3.2.4.1. Inyección intraocular de la subunidad B de la toxina colérica	38
3.2.4.2. Inyección de biotín-dextranamina en la corteza visual primaria	38
3.2.5. Administración de siRNAs	39
3.2.5.1. Diseño de siRNAs	40
3.2.5.2. Inyección de siRNAs en la corteza visual primaria	41
3.3. Tratamiento crónico con fluoxetina	42
3.4. Estimulación magnética	42
3.5. Preparación del tejido nervioso para histología	43
3.5.1. Fijación	43
3.5.2. Extracción de cerebro y microtomía	43
3.6. Inmunohistoquímica	44
3.6.1. Protocolo de inmunohistoquímica	45
3.7. Técnica neurohistoquímica para el revelado de la biotín-dextranamina	47
3.8. Técnica de Nissl	48

3.9. Análisis de la expresión génica mediante qRT-PCR	48
3.9.1. Diseño de cebadores	49
3.9.2. Extracción del RNA de la corteza visual	50
3.9.3. Retrotranscripción	50
3.9.4. Protocolo de qRT-PCR	51
3.9.4.1. Protocolo de qRT-PCR para la detección del receptor de Nogo y RhoA mediante la química SYBR Green	52
3.9.4.2. Protocolo de qRT-PCR para los controles endógenos mediante sondas de hidrólisis	53
3.9.5. Análisis de los resultados de qRT-PCR	53
3.10. Inmunoensayo para cuantificación de la proteína BDNF mediante ELISA	54
3.10.1. Extracción y cuantificación de proteínas totales	54
3.10.2. Protocolo para la cuantificación de la proteína de BDNF mediante ELISA	55
3.11. Examen del material histológico	55
3.12. Análisis estadístico	56
<b>4. RESULTADOS</b>	59
4.1. Organización del campo terminal retinocolicular en animales adultos tras lesiones del sistema visual	59
4.1.1. Animales control	59
4.1.2. Animales sometidos a desaferenciación retiniana neonatal	60
4.1.3. Animales sometidos a desaferenciación retiniana en fase adulta	60
4.1.4. Animales sometidos a ablación del colículo superior neonatal	62
4.1.5. Animales sometidos a ablación del colículo superior y desaferenciación retiniana neonatal	63
4.1.6. Animales sometidos a ablación del colículo superior en fase adulta	65
4.2. Organización del campo terminal corticocolicular visual en animales adultos sometidos a ablación del colículo superior neonatal	66
4.3. Patrón de expresión de proteínas ligantes de calcio y de GFAP en los estratos superficiales del colículo superior de animales adultos sometidos a lesiones neonatales del sistema visual	67
4.3.1. Cambios en el patrón de expresión de la calbindina	67
4.3.2. Cambios en el patrón de expresión de la calretinina	68
4.3.3. Cambios en el patrón de expresión de la parvalbúmina	68
4.3.4. Cambios en el patrón de expresión de GFAP	71
4.4. Organización del campo terminal corticocolicular visual tras diferentes estrategias para promover la plasticidad en animales sometidos a desaferenciación retiniana en fase adulta	72

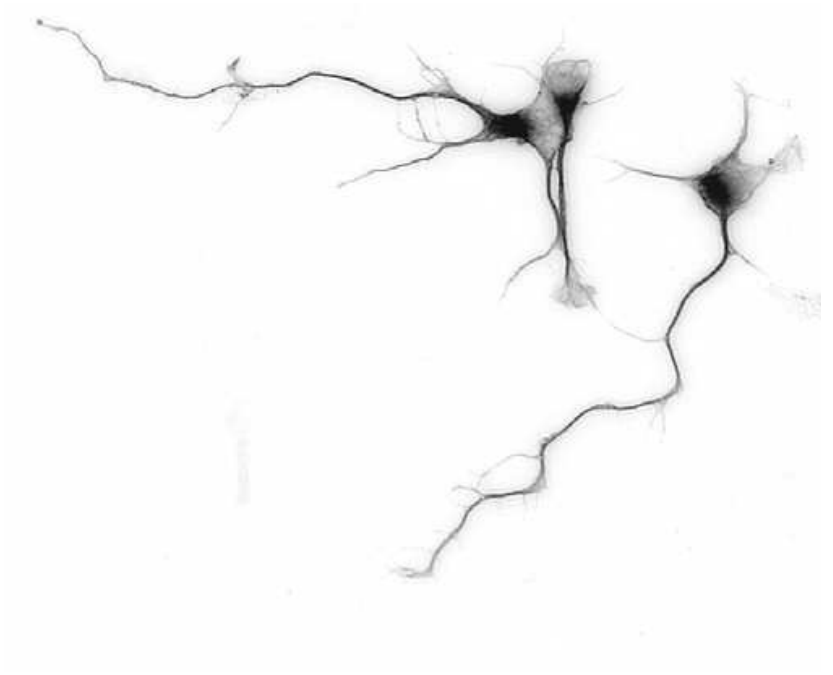
4.4.1. Animales control	73
4.4.2. Animales sometidos a desaferenciación retiniana en fase adulta	75
4.4.3. Efecto de la administración de siRNAs frente a moléculas inhibitoras del crecimiento axonal en la corteza visual primaria	77
4.4.3.1. Efecto de la microinyección de siRNAs frente al receptor de Nogo	77
4.4.3.2. Efecto de la microinyección de siRNAs frente a RhoA	79
4.4.3.3. Efecto de la microinyección de siRNAs frente al receptor de Nogo y a RhoA	83
4.4.3.4. Cuantificación del mRNA del receptor de Nogo y del RhoA en la corteza visual primaria tras la administración de siRNAs	85
4.4.4. Efecto del tratamiento crónico con fluoxetina	86
4.5. Efecto de la estimulación magnética	91
4.5.1. Expresión de c-Fos en los estratos superficiales del colículo superior y posibles modificaciones debidas a la desaferenciación retiniana neonatal y en fase adulta	91
4.5.2. Expresión de c-Fos en regiones corticales	95
4.5.3. Posible contribución de la conexión corticocolicular visual en la inducción de c-Fos en los estratos superficiales del colículo superior	99
4.5.3.1. Patrón de expresión del transportador de glutamato vesicular 1 en animales adultos sometidos a desaferenciación retiniana neonatal o en fase adulta	99
4.5.3.2. Expresión del transportador de glutamato vesicular 1 y de c-Fos mediante doble inmunofluorescencia en el estrato gris superficial del colículo superior de animales sometidos a desaferenciación retiniana neonatal	100
4.5.4. Efecto de la exposición a un campo magnético con polaridad alternante en la organización del campo terminal corticocolicular visual de animales sometidos a desaferenciación retiniana en fase adulta	102
4.5.5. Estudio cuantitativo de la expresión de BDNF tras la exposición a un campo magnético con polaridad alternante	106
<b>5. DISCUSIÓN</b>	<b>111</b>
5.1. Alteraciones en la organización del campo terminal retinocolicular en animales adultos tras lesiones del sistema visual	112
5.1.1. Animales control	112
5.1.2. Efecto de la desaferenciación retiniana neonatal	114
5.1.3. Efecto de la desaferenciación retiniana en fase adulta	116
5.1.4. Efecto de la ablación del colículo superior neonatal	117

5.1.5. Efecto conjunto de la ablación del colículo superior y la desaferenciación retiniana neonatal	119
5.1.6. Efecto de la ablación del colículo superior en fase adulta	120
5.2. Organización del campo terminal corticocolicular visual en animales adultos sometidos a ablación del colículo superior neonatal	121
5.3. Alteraciones en el patrón de expresión de proteínas ligantes de calcio y de GFAP en los estratos superficiales del colículo superior de animales adultos sometidos a lesiones neonatales del sistema visual	121
5.3.1. Cambios en el patrón de expresión de la calbindina	122
5.3.2. Cambios en el patrón de expresión de la calretinina	123
5.3.3. Cambios en el patrón de expresión de la parvalbúmina	124
5.3.4. Cambios en el patrón de expresión de GFAP	125
5.4. Organización del campo terminal corticocolicular visual tras diferentes estrategias para promover la plasticidad en animales sometidos a desaferenciación retiniana en fase adulta	126
5.4.1. Efecto de la microinyección de siRNAs frente al receptor de Nogo y a RhoA en la corteza visual primaria	128
5.4.1.1. Comparación con otros estudios similares	129
5.4.1.2. Eficacia de los siRNAs en la supresión de la expresión del receptor de Nogo y de RhoA en la corteza visual	133
5.4.2. Efecto del tratamiento crónico con fluoxetina	134
5.4.2.1. Comparación con otros estudios similares	134
5.4.2.2. Posibles mecanismos involucrados	136
5.5. Efecto de la estimulación magnética	138
5.5.1. Inducción de c-Fos en animales adultos expuestos a un campo magnético con polaridad alterada	138
5.5.1.1. Efecto de la desaferenciación retiniana en la inducción de c-Fos en los estratos superficiales del colículo superior	139
5.5.2. Efecto de la exposición a un campo magnético con polaridad alternante en la organización del campo terminal corticocolicular visual de animales sometidos a desaferenciación retiniana en fase adulta	142
5.5.3. Efecto de la exposición a un campo magnético con polaridad alternante en la expresión de BDNF	143
5.6. Recapitulación de resultados	146
<b>6. CONCLUSIONES</b>	151
<b>7. BIBLIOGRAFÍA</b>	155

## ABREVIATURAS

<b>ABC</b>	Avidina-biotina-peroxidasa
<b>AP-1</b>	Factor de transcripción nuclear activador de la proteína-1
<b>BDA</b>	Biotín-dextranamina
<b>BDNF</b>	Factor neurotrófico derivado del cerebro
<b>BSA</b>	Albúmina de suero bovino
<b>CA1</b>	Corteza auditiva primaria
<b>CB</b>	Calbindina
<b>cDNA</b>	DNA complementario
<b>CI</b>	Colículo inferior
<b>CM1</b>	Corteza motora primaria
<b>CR</b>	Calretinina
<b>CS</b>	Colículo superior
<b>CSPGs</b>	Condroitín sulfato proteoglicanos
<b>CTB</b>	Subunidad B de la toxina colérica
<b>CV</b>	Corteza visual
<b>CV1</b>	Corteza visual primaria
<b>DAB</b>	3',3'-Diaminobenzidina
<b>DV</b>	Desaferenciación visual
<b>E</b>	Día embrionario
<b>ELISA</b>	Ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas
<b>EM</b>	Estimulación magnética
<b>ERK</b>	Proteína quinasa activada por señal extracelular
<b>GAP</b>	Proteína asociada al crecimiento
<b>GFAP</b>	Proteína ácida fibrilar glial
<b>GLD</b>	Núcleo geniculado lateral dorsal
<b>HRP</b>	Peroxidasa de rábano
<b>IEGs</b>	Genes tempranos inmediatos
<b>LTP</b>	Potenciación a largo plazo
<b>MAG</b>	Glicoproteína asociada a la mielina
<b>MAPK</b>	Proteína quinasa activada por mitógeno
<b>mRNA</b>	RNA mensajero
<b>NGF</b>	Factor de crecimiento nervioso

<b>NgR</b>	Receptor de Nogo
<b>NT</b>	Neurotrofina
<b>Omgp</b>	Glicoproteína miélica del oligodendrocito
<b>P</b>	Día postnatal
<b>p75<sup>NTR</sup></b>	Receptor de neurotrofina p75
<b>PB</b>	Tampón fosfato 0,01M, pH 7,4
<b>PBS</b>	Tampón fosfato salino 0,01M, pH 7,4
<b>PBS-Tx</b>	PBS con Tritón X-100 al 0,5%
<b>PCR</b>	Reacción en cadena de la polimerasa
<b>PI3K</b>	Fosfatidil-inositol 3-quinasa
<b>PLC<math>\gamma</math></b>	Fosfolipasa C $\gamma$
<b>PV</b>	Parvalbúmina
<b>qRT-PCR</b>	Reacción en cadena de la polimerasa a tiempo real cuantitativa
<b>RISC</b>	Complejo de silenciamiento inducido por RNA
<b>RNAi</b>	Interferencia mediada por RNA
<b>RTN</b>	Reticulón
<b>SAI</b>	Estrato blanco intermedio o <i>stratum album intermediale</i>
<b>SAP</b>	Estrato blanco profundo o <i>stratum album profundum</i>
<b>SEM</b>	Error típico estándar
<b>SGI</b>	Estrato gris intermedio o <i>stratum griseum intermediale</i>
<b>SGP</b>	Estrato gris profundo o <i>stratum griseum profundum</i>
<b>SGS</b>	Estrato gris superficial o <i>stratum griseum superficiale</i>
<b>shRNAs</b>	<i>Small hairpin</i> RNAs
<b>siRNAs</b>	RNAs pequeños de interferencia
<b>SNC</b>	Sistema nervioso central
<b>SNP</b>	Sistema nervioso periférico
<b>SO</b>	Estrato óptico o <i>stratum opticum</i>
<b>SZ</b>	Estrato zonal o <i>stratum zonale</i>
<b>Tris-HCl</b>	Trizma base-HCl 0,05M, pH 7,4
<b>Trks</b>	Receptores tirosina quinasa
<b>VGluT</b>	Transportador de glutamato vesicular
<b>WGA</b>	Agglutinina del germen de trigo
<b>WGA-HRP</b>	WGA conjugada a la enzima peroxidasa de rábano



# **1. INTRODUCCIÓN**





## **1. INTRODUCCIÓN**

La capacidad de regeneración y reorganización de las conexiones nerviosas tras las lesiones que afectan al sistema nervioso central (SNC) se ve notablemente disminuida a lo largo del desarrollo postnatal. Conocer los mecanismos que subyacen a estas reorganizaciones provee la posibilidad para la búsqueda y el desarrollo de dianas terapéuticas potenciales en enfermedades neurodegenerativas y tras el daño neurológico.

El sistema visual es bien conocido y sus distintos eslabones están bien individualizados. La entrada de estímulos a través de la retina puede manipularse fácilmente en cualquier estadio postnatal, constituyendo un modelo experimental de lesión del SNC idóneo para investigar los mecanismos de regeneración nerviosa y plasticidad postlesional (Serfaty et al., 2005; revisado por Sabel, 2008).

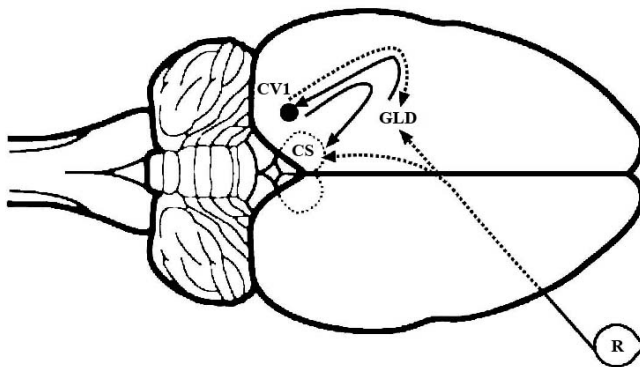
### **1.1. El sistema visual**

El sistema visual está organizado de manera similar en todos los mamíferos. Los principales eslabones que componen este sistema son la retina, el núcleo geniculado lateral dorsal (GLD), el colículo superior (CS) y la corteza visual primaria (CV1) o estriada (área de Brodmann 17). Este trabajo se centra principalmente en el sistema visual de la rata, especie ampliamente empleada para estudios de regeneración y reorganización tras lesiones del SNC.

El primer eslabón del sistema lo constituye la retina, estructura central receptora de estímulos visuales. Las neuronas ganglionares constituyen la única eferencia de la retina, determinando la naturaleza de la información proporcionada a cada núcleo receptor de estímulos visuales.

En la rata y el conejo albinos, los axones de las células ganglionares de la retina atraviesan el quiasma óptico mayoritariamente (en torno al 98% y 95%, respectivamente) al lado contralateral. Esta característica les hace sujetos ideales de experimentación en los que estudiar los efectos de las lesiones retinianas unilaterales, ya que virtualmente el lado contralateral a la lesión queda totalmente desafereciado y el ipsilateral prácticamente intacto (Lund, 1965).

A nivel talámico, la vía visual se reparte en dos rutas: la retinogeniculada y la retinocolicular. La información visual llega desde la retina a la capa IV de la CV1 con el GLD como relevo talámico. Existe además una conexión corticogeniculada de vuelta desde la capa VI de la CV1. La vía retinocolicular envía información que llega a los estratos superficiales del CS (Harvey y Worthington, 1990) para distribuirse a centros subcorticales talámicos (Perry, 1980), mesencefálicos y espinales (revisado por Sefton et al., 1998). Los estratos superficiales del CS reciben además aferentes de la capa V de la CV1 ipsilateral (Lund, 1966; Harvey y Worthington, 1990), no existiendo proyecciones directas colícolocorticales (Fig. 1). Todas estas conexiones están retinotópicamente organizadas de manera que cada uno de los sectores de la retina tiene sus correspondientes áreas terminales tanto en el CS (Siminoff et al., 1966) como en el GLD (Reese y Jeffery, 1983). Asimismo, en la CV1 existe una representación retinotópica del campo visual, de tal forma que existe una conexión bidireccional con el GLD entre los dos sectores retinotópicos homólogos de las dos estructuras (Thomas y Espinoza, 1987; Dreher et al., 1990) y una vía corticocolicular en la que también se mantiene este patrón topográfico.

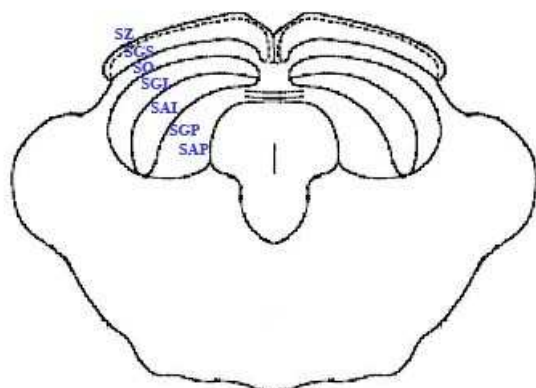


**Fig. 1. Representación esquemática de los circuitos básicos del sistema visual en roedores.** CS, colículo superior; GLD, núcleo geniculado lateral dorsal; CV1, corteza visual primaria; R, retina.

## 1.2. El colículo superior

El CS, localizado en la parte dorsal del mesencéfalo, es uno de los centros integradores más importantes del SNC. Presenta una estructura laminar, constituida por siete capas, cada una definida por la presencia o ausencia de paquetes de fibras orientadas tangencialmente. Desde la superficie colicular hacia el acueducto del mesencéfalo las estratos que lo componen son: el estrato zonal o *stratum zonale* (SZ), el estrato gris superficial o *stratum griseum superficiale* (SGS), el estrato óptico o *stratum opticum* (SO), el estrato gris intermedio o *stratum griseum intermediale* (SGI), el estrato blanco intermedio o *stratum*

*album intermediale* (SAI), el estrato gris profundo o *stratum griseum profundum* (SGP) y el estrato blanco profundo o *stratum album profundum* (SAP) (Huber y Crosby, 1943) (Fig. 2).



**Fig. 2. Representación esquemática de los estratos que componen el colículo superior.** SZ, estrato zonal; SGS, estrato gris superficial; SO, estrato óptico; SGI, estrato gris intermedio; SAI, estrato blanco intermedio; SGP, estrato gris profundo; SAP, estrato blanco profundo (Huber y Crosby, 1943).

Desde el punto de vista funcional y de sus conexiones, las capas coliculares se pueden subdividir en tres grupos: los estratos superficiales (SZ, SGS y SO), los intermedios (SGI y SAI) y los profundos (SGP y SAP). En condiciones normales los estratos superficiales, relacionados con funciones visuales, reciben sus principales aferencias de la retina y de la CV1 (Dreher et al., 1990; Harvey y Worthington, 1990). Los estímulos visuales son canalizados a través de conexiones locales desde los estratos superficiales hacia los estratos intermedios y profundos del CS. En éstos la información visual se integra con información de naturaleza multisensorial, entre las que destacan la auditiva y la somatosensorial, que reciben estos estratos desde un gran número de estructuras nerviosas corticales y subcorticales (Huerta y Harting, 1984; Stein y Meredith, 1993) para el control de respuestas motoras de aproximación y alejamiento (Dean et al., 1989). Esta organización del CS es característica de todos los mamíferos (Stein, 1981) e incluso de todos los vertebrados (Stein y Gaither, 1983).

En la rata, virtualmente todas las células ganglionares de la retina proyectan al CS contralateral (Linden y Perry, 1983; Dreher et al., 1985). La mayoría de los axones ópticos llegan prenatalmente, pero axones de las células ganglionares de nacimiento tardío todavía continúan creciendo en los estratos superficiales del CS durante los primeros días postnatales (Dallimore et al., 2002). Contrariamente, las neuronas piramidales de la capa V de la CV1 proyectan al CS ipsilateral (Lund, 1966; Harvey y Worthington, 1990). En esta conexión los primeros axones que alcanzan el CS lo hacen durante el tercer y cuarto día postnatal (P)3/P4 y continúan creciendo hasta adquirir la organización característica del adulto entre P13 y P19 (Thong y Dreher, 1987). Aunque tanto los terminales de la retina como los de la CV1 inervan densamente las capas superficiales del CS, las aferencias retinocoliculares entran en el CS a

través de SO, desde donde ascienden para ramificarse más densamente en SZ y en la región dorsal del SGS, mientras que los axones corticocoliculares provenientes de las células piramidales proyectan más profusamente a la región ventral del SGS y a la dorsal del SO (Lund, 1966; Harvey y Worthington, 1990). El principal neurotransmisor excitatorio empleado por las aferencias retinocoliculares y corticocoliculares es el glutamato (Ortega et al., 1995; Binns, 1999). Estudios previos sugieren que el transporte de este aminoácido excitatorio en vesículas sinápticas es llevado a cabo por el transportador de glutamato vesicular (VGluT)2 y el VGluT1, respectivamente (Fremeau et al., 2001; Varoqui et al., 2002; Fujiyama et al., 2003; revisado por Fremeau et al., 2004).

A lo largo del desarrollo, las fibras procedentes de la retina y de la CV1 están sometidas a cambios plásticos que incluyen el crecimiento, búsqueda de rutas hacia las dianas, acortamiento de axones y refinamiento de las conexiones (Land y Lund, 1979; Simon y O'Leary, 1992). Como resultado de estos fenómenos de plasticidad, se constituye un mapa topográfico organizado con precisión, estableciéndose una representación del campo visual en el CS.

### **1.3. Neuroplasticidad**

La neuroplasticidad es la capacidad que el sistema nervioso posee para modificar su organización anatómica y funcional en respuesta a cambios en la entrada de estímulos o a lesiones de sus estructuras. Se consideran manifestaciones de la plasticidad neuronal cualquier cambio prolongado o poco duradero en la eficiencia de la transmisión sináptica, en el silenciamiento de sinapsis, en la activación de sinapsis previamente silentes, así como en la distribución de conexiones sinápticas existentes entre neuronas. Estos cambios plásticos se dan durante el desarrollo y maduración normal de un organismo, así como en el aprendizaje (revisado por Galván, 2010), tanto de organismos maduros como inmaduros, y como consecuencia de lesiones del sistema nervioso (revisado por Navarro et al., 2007).

Existen periodos en el desarrollo postnatal temprano, conocidos como periodos críticos, durante los cuales los circuitos neuronales presentan una sensibilidad incrementada frente a los estímulos ambientales y son ampliamente formados por la experiencia sensorial natural. Los periodos críticos están presentes en todas las especies testadas hasta la fecha, desde los humanos hasta en *Drosophila* (Barth et al., 1997), y los altos niveles de plasticidad manifestados durante estos periodos se ha probado que son esenciales para asegurar el

desarrollo correcto de los sistemas sensoriales (Berardi et al., 2000; Hensch, 2004). En este sentido, estudios desarrollados en mamíferos, incluyendo en humanos, han mostrado que si la visión de un ojo es deficiente durante la infancia, la agudeza visual de ese ojo no se desarrolla normalmente y la binocularidad de la visión se ve dañada, condición patológica conocida como ambliopía (Kiorpes et al., 1998; Prusky y Douglas, 2003). A nivel cortical, trabajos que emplean la privación monocular en animales, como por ejemplo mediante el cierre de un ojo a través de sutura del párpado, han mostrado que las neuronas corticales visuales se vuelven fuertemente dominadas por el ojo no privado y la proporción de neuronas binoculares decrece intensamente (revisado por Berardi et al., 2000). Si el déficit visual se corrige de manera temprana durante el desarrollo se produce una recuperación completa. Por el contrario, la recuperación se ve profundamente limitada si se retrasa la corrección del déficit visual hasta el estadio adulto. Además se ha observado que la capacidad de la privación monocular para modificar de forma efectiva la dominancia ocular de las neuronas corticales visuales y producir cambios morfológicos detectables declina con la edad (Hubel y Wiesel, 1970; Fagiolini et al., 1994; Prusky y Douglas, 2003; Liao et al., 2004).

Lesiones del SNC también dan lugar a fenómenos de plasticidad. Es bien conocido que la desaferenciación retiniana durante el desarrollo postnatal temprano resulta en severas alteraciones de los sistemas aferentes que llegan a los estratos superficiales del CS (revisado por Toldi et al., 1996). Por ejemplo, en roedores como consecuencia de la ablación de la retina en el nacimiento, se genera una proyección retinocolicular ipsilateral aberrante (Chow et al., 1973; Lund et al., 1980; Insausti et al., 1985; Ostrach et al., 1986; Chan y Jen, 1988). Asimismo, García del Caño y colaboradores, tras la administración del trazador anterógrado biotín-dextramina (BDA) en la CV1 de conejos (García del Caño et al., 1997) y ratas (García del Caño et al., 2002), observaron que la retirada de estímulos visuales neonatalmente daba lugar a una expansión considerable del campo terminal de la conexión corticocolicular ipsilateral. Por el contrario, cuando la enucleación se llevó a cabo en ratas adultas esta expansión no tuvo lugar (García del Caño et al., 2002). Por otro lado, lesiones neonatales en la corteza visual inducen una proyección aberrante hacia el CS contralateral (Rhoades y Chalupa, 1978), así como una expansión de la conexión corticocolicular ipsilateral desde la corteza visual lesionada remanente (Rhoades, 1981). Se piensa que en estos fenómenos podrían estar involucradas varias respuestas plásticas como son el *sprouting* axonal y/o la prevención de la retracción axonal regulada durante el desarrollo.

Esta capacidad de respuesta plástica no concierne exclusivamente a las conexiones del sistema visual primario. La desaferenciación visual neonatal también da lugar a la invasión de la división superficial del CS por fibras que normalmente proyectan a capas más profundas del CS cuando se produce durante el desarrollo postnatal temprano (Rhoades et al., 1981; García del Caño et al., 2001; García del Caño et al., 2004; Mundiñano y Martínez-Millán, 2010). Rhoades y colaboradores observaron que tras la enucleación neonatal aferencias espinales, del troncoencéfalo y de la corteza somatosensorial cambian su territorio normal, los estratos intermedios, para inervar los estratos superficiales visuales del CS (Rhoades et al., 1981). Asimismo, García del Caño y colaboradores mostraron que el SGS y el SO en animales visualmente desaferenciados de recién nacidos eran específicamente inervados por fibras originadas en el núcleo cuneado del núcleo de la columna dorsal (García del Caño et al., 2004). En este contexto, en un trabajo de nuestro laboratorio recientemente publicado se observó que aferencias coliculares originadas en el campo de barriles de la corteza somatosensorial primaria de rata normalmente acaban en los estratos intermedios del CS. Sin embargo, la desaferenciación visual neonatal causaba una invasión de la porción lateral de los estratos superficiales del CS (Mundiñano y Martínez-Millán, 2010). Estos fenómenos podrían ser una respuesta compensatoria funcional en la que las fibras ascendentes podrían participar en el reclutamiento de neuronas de la superficie colicular para funciones sensoriales diferentes a las visuales.

Cuando la desaferenciación de la retina se lleva a cabo en el estadio adulto, cambios plásticos que dan lugar a un incremento de la densidad de los terminales hacen referencia principalmente a las conexiones difusas catecolaminérgicas (Rhoades y Hess, 1983), serotoninérgicas (Rhoades et al., 1990) y acetilcolinérgicas (Gerrikagoitia et al., 2001), mientras que apenas existen evidencias que muestren cambios notables en estímulos de tipo excitatorio de origen cortical o subcortical, lo que ha llevado a la idea de que estos sistemas aferentes no están dotados de capacidad de respuesta plástica. Sin embargo, trabajos llevados a cabo en otros sistemas (revisado por Deller y Frotscher, 1997) indican que las fibras terminales excitatorias adultas mantienen todavía cierta capacidad de reorganización en respuesta a la desaferenciación. Asimismo, el rápido descenso del porcentaje de terminales de tipo excitatorio que ocurre en los estratos superficiales del CS tras la enucleación en adultos se restaura parcialmente tras largos periodos de supervivencia (Lund y Lund, 1971a,b), lo que sugiere que tiene lugar la formación nueva de terminales sinápticos excitatorios. García del Caño y colaboradores muestran que tras la desaferenciación retiniana llevada a cabo en ratas

adultas, aunque el patrón del campo terminal visual corticocolicular no se ve alterado respecto a sus dimensiones a lo largo del eje rostrocaudal ni lateromedial, se producía una redistribución de los botones sinápticos hacia regiones más dorsales de los estratos superficiales del CS, reflejando un proceso de sinaptogénesis reactiva (García del Caño et al., 2002). Además, Kreutz y colaboradores describen reajustes de la proyección retinocolicular tras aplastamiento parcial del nervio óptico en ratas adultas, quedando confinada a la región rostromedial del CS (Kreutz et al., 2004). Esta respuesta sugiere que los axones tanto retino- como corticocoliculares adultos todavía presentan cierto grado de capacidad para su remodelación plástica postlesional.

Con el fin de poner de manifiesto la diferente capacidad de respuesta plástica y regenerativa según la edad en que se produce la lesión, neonatal o en fase adulta, en este trabajo mediante el empleo de trazadores anterógrados se han estudiado los posibles cambios en la organización de las proyecciones al CS procedentes de la retina y de la CV1 como consecuencia de diferentes tipos de lesiones llevadas a cabo en el sistema visual de la rata, que incluyen la desaferenciación retiniana y la ablación del CS.

#### **1.4. Factores reguladores de la neuroplasticidad**

En el SNC de mamíferos, los axones progresivamente frenan su crecimiento una vez que alcanzan los tejidos diana y establecen las conexiones nerviosas. Cuando se produce una lesión, la mayoría de neuronas del SNC axotomizadas son incapaces de regenerarse espontáneamente más allá de la zona lesionada, habiendo sólo una pequeña minoría que lleva a cabo *sprouting* compensatorio lo que provee una recuperación funcional limitada (Ramón y Cajal, 1928; Li y Raisman, 1995). Debido a esto, las lesiones en el SNC postnatales generalmente conllevan un déficit funcional permanente. Esto contrasta con lo que sucede en el sistema nervioso periférico (SNP), donde los conos de crecimiento se reestablecen tras la axotomía, seguido por la regeneración nerviosa de larga distancia y la recuperación funcional sustancial (Fawcett y Keynes, 1990).

Inicialmente el fracaso de los axones maduros para la regeneración fue atribuida a la pérdida de su capacidad intrínseca para regenerarse (le Gros Clark, 1943). Sin embargo, trabajos posteriores han puesto de manifiesto que los axones lesionados en el SNC presentan todavía la capacidad de formar conos de crecimiento activos funcionalmente, pudiéndose extender largas distancias en un ambiente permisivo como puede ser el vehículo que supone

un injerto de nervio periférico (David y Aguayo, 1981; Benfey y Aguayo, 1982). Asimismo, la regeneración axonal de neuronas del ganglio de la raíz dorsal, que contienen axones que se extienden tanto en el SNC como en el SNP, tiene lugar en las ramificaciones periféricas pero cesa en las ramas centrales que entran en la médula espinal (Benfey y Aguayo, 1982), lo que sugiere que esta limitada capacidad para la regeneración axonal sea debida, al menos en parte, a las diferencias del ambiente que rodea a los axones, no permisivo del SNC frente al ambiente permisivo del SNP para la regeneración axonal. En este sentido, está siendo cada vez más evidente que varios factores están implicados en este fracaso de las neuronas del SNC para preservar la regeneración axonal tras el daño nervioso siendo atribuible tanto al desarrollo de la cicatriz glial/cicatriz de colágeno que forma una barrera bioquímica/física frente al avance del axón (Berry et al., 1998; Logan y Berry, 2002), o a la presencia de inhibidores del crecimiento axonal (McKerracher y Winton, 2002; Tang, 2003; Sandvig et al., 2004; Schwab, 2004), así como a la limitada disponibilidad de neurotrofinas (Berry et al., 1998; Logan y Berry, 2002), o a la combinación de éstas (Logan y Berry, 2002; Sandvig et al., 2004).

Se están llevando a cabo numerosos estudios basados en la neutralización o reemplazamiento del ambiente adverso en el SNC, o en la estimulación de la respuesta celular robusta, con el fin de explorar activamente los caminos para promover la regeneración del SNC. Entre éstos se incluyen la administración de factores neurotróficos para promover la supervivencia celular y la extensión axonal, la aplicación de injertos celulares para proveer una matriz celular permisiva para el crecimiento (Ramón-Cueto et al., 2000; Bunge, 2002), y el tratamiento con péptidos y anticuerpos para neutralizar el carácter inhibitorio del ambiente del SNC (Xu et al., 2004; Liebscher et al., 2005; Mullner et al., 2008).

#### **1.4.1. Moléculas implicadas en la inhibición del crecimiento axonal**

Los determinantes en el fracaso de la regeneración axonal en el SNC adulto son complejos. Numerosas evidencias han sugerido que la cicatriz glial y la mielina contribuyen significativamente a estas características inhibitorias del ambiente del SNC dañado. La cicatriz glial, uno de los impedimentos más importantes para el crecimiento de los axones (Rudge y Silver, 1990; Silver y Miller, 2004), está compuesta por una red de astrocitos reactivos, precursores de oligodendrocitos, fibroblastos de las meninges y microglía que han migrado hacia el lugar de la lesión. Prolongaciones de estas células están intensamente entrecruzadas, actuando como una barrera física impenetrable para los axones en



regeneración. La cicatriz glial además de obstruir físicamente el paso de los axones, es una fuente muy importante de moléculas que pueden inhibir directamente la regeneración. Tras la lesión, los astrocitos reactivos y los fibroblastos de las meninges en la cicatriz aumentan rápidamente la producción y la liberación de moléculas de la matriz extracelular como los condroitín sulfato proteoglicanos (CSPGs), que son los principales inhibidores para el crecimiento axonal asociados a la cicatriz glial (Fawcett y Asher, 1999; Morgenstern et al., 2002). Asimismo, se han identificado moléculas indicadoras de guía axonal, como son las efrinas y el receptor de efrina A4 (Willson et al., 2002; Bundesen et al., 2003), la semaforina 3A (Pasterkamp et al., 2001; De Winter et al., 2002; Kaneko et al., 2006) y proteínas Slit (Hagino et al., 2003) con efectos en la prevención del crecimiento asociadas a la cicatriz glial (Silver y Miller, 2004).

Otra fuente principal de inhibición de la regeneración axonal en el SNC es la mielina. El concepto de la mielina del SNC como un sustrato inhibitor del crecimiento axonal fue iniciado por Berry, que observó inhibición específica de la extensión axonal por productos postlesionales de la mielina del SNC (Berry, 1982). Este postulado fue posteriormente corroborado demostrando que la mielina del SNC y los oligodendrocitos maduros poseen componentes moleculares que pueden potencialmente restringir la regeneración axonal (Caroni y Schwab, 1988; Savio y Schwab, 1989; Bandtlow et al., 1990; Moorman, 1996). Basadas en su capacidad para inhibir el crecimiento de neuritas y de inducir el colapso de los conos de crecimiento en neuronas primarias, varias proteínas expresadas por oligodendrocitos han sido identificadas como inhibidores asociados a la mielina, entre los cuales, el Nogo o Reticulón (RTN)4 (Chen et al., 2000; GrandPré et al., 2000; Prinjha et al., 2000), la glicoproteína asociada a la mielina (MAG) (McKerracher et al., 1994; Mukhopadhyay et al., 1994), y la glicoproteína mielínica del oligodendrocito (Omgp) (Wang et al., 2002) están siendo actualmente considerados como los principales contribuidores de la capacidad inhibitoria de la mielina. Asimismo, el conocimiento del papel que desempeñan los receptores neuronales de estas moléculas inhibitoras asociadas a la mielina en la mediación de las señales inhibitorias es crucial para el mejor entendimiento de los mecanismos de restricción en la regeneración del SNC (revisado por Cao et al., 2010).

En un intento de identificar los inhibidores de crecimiento derivados de la mielina, se generó un anticuerpo monoclonal, denominado IN-1, con capacidad para neutralizar la fracción inhibitoria de la mielina (Caroni y Schwab, 1988). En el año 2000, tres grupos

independientes clonaron el gen *Nogo* y evidenciaron que el Nogo-A, el producto más largo del gen *Nogo*, era un potente inhibidor del crecimiento de neuritas y el antígeno para IN-1 (Chen et al., 2000; GrandPré et al., 2000; Prinjha et al., 2000).

El Nogo, que se expresa de manera ubicua, forma parte de la familia génica Reticulón que está compuesta por cuatro miembros en mamíferos, RTN1, RTN2, RTN3 y Nogo/RTN4. Tres proteínas diferentes son codificadas por el gen *Nogo*, el Nogo-A, -B y -C, como resultado del *splicing* alternativo y del uso diferencial del promotor. Las tres isoformas comparten un extremo C-terminal de 188 aminoácidos. La región N-terminal de Nogo-A, denominada amino-Nogo, y un bucle de 66 aminoácidos localizado entre las dos porciones transmembrana putativas de Nogo, conocido por Nogo-66, se ha observado que inhiben el crecimiento de neuritas y causan el colapso de los conos de crecimiento *in vitro* con distintas especificidades (Chen et al., 2000; GrandPré et al., 2000; Fournier et al., 2001; Oertle et al., 2003).

El Nogo-A se expresa predominantemente en el sistema nervioso, aunque también se ha detectado en bajos niveles en el músculo, en el testículo y en el corazón (Huber et al., 2002). En el SNC de roedores la expresión de Nogo-A se localiza preferentemente en los oligodendrocitos y en la mielina. Sin embargo, también se ha detectado su expresión en múltiples poblaciones neuronales del cerebro y de la médula espinal (Huber et al., 2002; Nyatia y Lang, 2007). Por el contrario, en el SNP, una fuerte inmunoreactividad para Nogo-A se ha encontrado en neuronas del ganglio de la raíz dorsal, con niveles considerablemente más bajos en la mielina y en las células de Schwann (GrandPré et al., 2000; Huber et al., 2002; Pot et al., 2002; Nyatia y Lang, 2007). El Nogo-A está asociado predominantemente con la membrana del retículo endoplasmático, y en menor medida localizado en el aparato de Golgi y la membrana plasmática en cultivos de oligodendrocitos, neuronas, fibroblastos y mioblastos (Chen et al., 2000; GrandPré et al., 2000; Dodd et al., 2005).

Numerosas trabajos han evidenciado que el Nogo-A puede limitar la regeneración en el SNC dañado. En los primeros estudios, el tratamiento de ratas adultas con el anticuerpo anti-Nogo-A IN-1 tras lesiones de médula espinal resultó en un *sprouting* axonal significativo y regeneración a lo largo de largas distancias caudales al lugar de la lesión, con una mejora motora y restauración de la función sensorial (Schnell y Schwab, 1990; Bregman et al., 1995; Thallmair et al., 1998). Se ha demostrado en modelos animales de lesión medular o infarto que la administración intratecal de anticuerpos podía neutralizar eficazmente la actividad de Nogo-A, llevando a un aumento de la regeneración de las fibras del tracto corticoespinal,

reestableciendo los circuitos neuronales dañados, y la recuperación funcional (Liebscher et al., 2005; Mullner et al., 2008). Estos descubrimientos en roedores han sido recientemente extendidos a modelos en primates de daño de la médula espinal, en los que la infusión intratecal de anticuerpos anti-Nogo-A daba lugar a una recuperación funcional extensa y a un incremento del *sprouting* y elongación axonal regenerativo en monos con hemisección de la médula espinal cervical (Freund et al., 2006). Otros trabajos han demostrado el papel de Nogo en la regeneración de la médula espinal en ratones mutantes para Nogo (Kim et al., 2003; Simonen et al., 2003). Kim y colaboradores muestran que los ratones mutantes para Nogo-A/B jóvenes presentan un aumento intenso del *sprouting* y extensión axonal tras daño medular, acompañado por una recuperación locomotora sustancial (Kim et al., 2003). Un resultado similar se observó en el trabajo publicado por Simonen y colaboradores en ratones *knockout* para Nogo-A (Simonen et al., 2003). Sin embargo, otro estudio mostró resultados contradictorios, en los que ni ratones *knockout* dobles para Nogo-A/B, ni triples para Nogo-A/B/C exhibieron evidencia alguna de aumento de la regeneración axonal (Zheng et al., 2003). Un trabajo publicado recientemente empleando como modelo de lesión el aplastamiento del nervio óptico evidenció una mejora significativa en la regeneración en ratones *knockout* triples para Nogo-A/B/C (Su et al., 2008), sugiriendo de nuevo que el Nogo-A es un factor influyente en la inhibición de la regeneración axonal *in vivo*.

El receptor de Nogo (NgR)1, también conocido por NgR, fue identificado como un receptor que se puede unir a Nogo-66 y es requerido para la función de Nogo-66 en neuronas (Fournier et al., 2001). Posteriormente se ha encontrado que MAG y Omgp se pueden unir también a NgR para ejercer su función inhibitoria (Domeniconi et al., 2002; Liu et al., 2002; Wang et al., 2002). Se han identificado dos receptores relacionados cercanos, el NgR2 y el NgR3, que comparten similitud en las secuencias y que presentan patrones de expresión solapantes con el NgR (Lauren et al., 2003; Pignot et al., 2003). El NgR2 es ácido siálico dependiente, con alta afinidad de unión a MAG (Venkatesh et al., 2005; Lauren et al., 2007). En ensayos realizados *in vitro*, neuronas del ganglio de la raíz dorsal deficientes tanto para NgR1 como para NgR2 presentaban una moderada reducción de la respuesta inhibitoria inducida por MAG, mientras que neuronas deficientes para sólo uno de los receptores no mostraron diferencias respecto a los de tipo salvaje (Wortner et al., 2009).

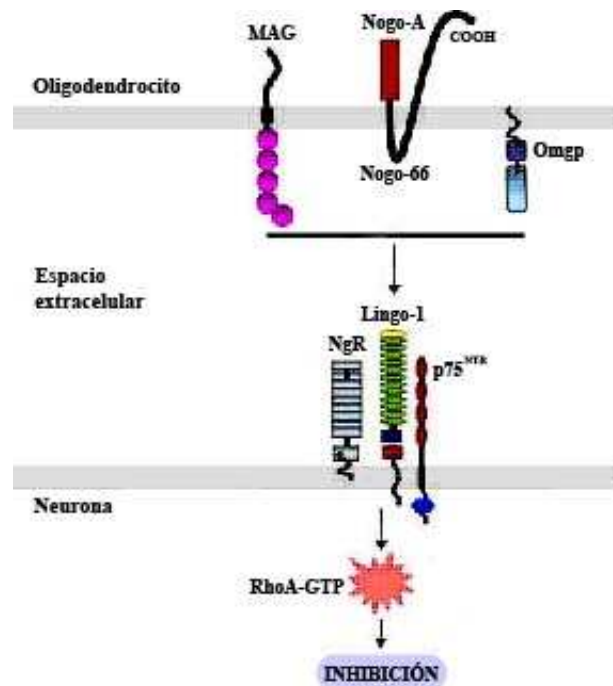
El NgR es una proteína ligada a la membrana por uniones glicosil-fosfatidilinositol (GPI) que contiene repeticiones ricas en leucina (LRR). El receptor de neurotrofinas p75

(p75<sup>NTR</sup>), identificado inicialmente como receptor de neurotrofinas tal y como indica su nombre, puede actuar formando un complejo con NgR y mediar la inhibición del crecimiento y la cascada de señalización desencadenada por los inhibidores de la mielina (Wang et al., 2002; Wong et al., 2002; Yamashita et al., 2002). Dado que el p75<sup>NTR</sup> no se expresa de forma ubicua en el cerebro durante el estadio adulto, mientras que casi todas las neuronas maduras del SNC responden a la inhibición por la mielina, es probable que otras proteínas puedan llevar a cabo la función de p75<sup>NTR</sup>. Dos grupos independientes identificaron TROY, un miembro huérfano de la superfamilia de receptores del factor de necrosis tumoral (TNFR) que está ampliamente expresado en neuronas adultas y embrionarias (Kojima et al., 2000; Hisaoka et al., 2003), como homólogo funcional de p75<sup>NTR</sup> en la mediación de los efectos inhibitorios de los componentes de la mielina en la regeneración axonal (Park et al., 2005; Shao et al., 2005). Sin embargo, la importancia de TROY como receptor de la transducción de la señal para la inhibición de la señal mediada por inhibidores de la mielina está todavía a la espera de ser evaluada puesto que su expresión no se ha demostrado de manera consistente en el SNC adulto (Barrette et al., 2007).

Lingo-1 es el tercer componente encontrado en este complejo receptor (Mi et al., 2004). Pertenece a la familia de proteínas que contienen LRR y dominios de tipo inmunoglobulina, y está involucrado en el desarrollo y el crecimiento axonal del SNC (Carim-Todd et al., 2003). Los primeros estudios que investigaron el papel de Lingo-1 en la regeneración axonal observaron una asociación física de Lingo-1 a NgR y a p75<sup>NTR</sup> en cultivos de neuronas, formando un complejo receptor tripartito que media la señalización inhibitoria provocada por inhibidores de la mielina (Mi et al., 2004). Se ha demostrado *in vitro* que el ectodominio soluble de Lingo-1 actúa como antagonista para aliviar la inhibición de la mielina, presumiblemente mediante la competición de la interacción de Lingo-1 con sus compañeros de unión (Mi et al., 2004). Además, se ha observado que la administración intratecal de Lingo-1 soluble resulta en un aumento del *sprouting* axonal del tracto corticoespinal y recuperación funcional tras hemisección dorsal, lo que sugiere que puede modular la regeneración axonal *in vivo* (Ji et al., 2006).

Con la unión del ligando, el complejo receptor NgR/Lingo-1/p75<sup>NTR</sup> dirige una cascada de señalización intracelular que da lugar al cambio en el equilibrio de Rac1/RhoA en los conos de crecimiento. RhoA, Rac1 y Cdc42 son tres miembros de la familia de las GTPasas pequeñas ampliamente expresados, que actúan coordinadamente como interruptores

moleculares para regular la dinámica de la actina y el ensamblaje de los microtúbulos durante los cambios morfológicos celulares. Rac1 y RhoA ejercen un papel antagonista en la dinámica de los conos de crecimiento a través de sus quinasas efectores, PAK1 y ROCK, para estimular la movilidad del cono de crecimiento o inducir el colapso, respectivamente. En el SNC dañado, los inhibidores derivados de la mielina alteran el balance de la señalización de Rac1 y RhoA, de forma que la actividad de RhoA se ve incrementada y la de Rac1 disminuida (Niederöst et al., 2002). La activación de RhoA desencadena la cascada de señalización secuencial ROCK/LIM quinasa/cofilina que da lugar a la despolimerización de los filamentos de actina y el colapso de los conos de crecimiento (Maekawa et al., 1999). Este evento intracelular es compartido por múltiples moléculas entre las que se incluyen MAG, Nogo, Omgp, Netrin-1, efrinas y CSPGs. Se puede sugerir que éste es el punto de convergencia en el que varios inhibidores asociados a la mielina ejercen una función similar (Lehmann et al., 1999; Dergham et al., 2002; Niederöst et al., 2002; Monnier et al., 2003; Mi et al., 2004). En la figura 3, según un modelo propuesto por Chaudhry y Filbin (2006), se muestra una representación de la cascada de señalización intracelular desencadenada por la unión de los ligandos inhibidores del crecimiento axonal asociados a la mielina al complejo receptor NgR/Lingo-1/p75<sup>NTR</sup> lo que desencadena la activación del efector RhoA. Como resultado, debido a la despolimerización de la actina mediada por RhoA, tiene lugar el colapso de los conos de crecimiento y la inhibición del crecimiento axonal.



**Fig. 3.** Cascada de señalización de los inhibidores asociados a mielina (adaptado de Chaudhry y Filbin, 2006).

Se ha observado que el bloqueo de la activación de RhoA y ROCK con los antagonistas C3 transferasa e Y-27632, respectivamente, da lugar a un incremento del crecimiento axonal en sustratos con mielina *in vitro* (Lehmann et al., 1999; Dergham et al., 2002; Fournier et al., 2003), así como *in vivo* (Lehmann et al., 1999; Dergham et al., 2002). Sin embargo, la efectividad de estos antagonistas parece ser dependiente de su modo de administración, puesto que C3 transferasa no ha resultado efectiva en todos los estudios desarrollados *in vivo* (Fournier et al., 2003). Para una desinhibición más mantenida, dirigirse a los genes de moléculas involucradas en las cascadas inhibitorias es probable que sea más efectivo que el tratamiento con antagonistas. Sin embargo, estudios desarrollados en *knockouts* para un único gen no han dado los resultados satisfactorios esperados. Por ejemplo, la regeneración en mutantes carentes de Nogo-A fue modesta, con una regulación compensatoria mayor de Nogo-B (Simonen et al., 2003), y tal y como se ha comentado anteriormente, mutantes carentes de Nogo-A/B y de Nogo-A/B/C no mostraban una regeneración axonal significativa *in vivo* (Zheng et al., 2003).

La desinhibición del crecimiento axonal del SNC podría conseguirse empleando RNAs pequeños de interferencia (siRNAs), herramienta que permite silenciar específicamente la expresión de genes frente a los cuales van dirigidos (Elbashir et al., 2001). Estudios *in vitro* han demostrado la eficacia de la administración de siRNAs para favorecer el crecimiento. Por ejemplo, siRNAs dirigidos frente a p75<sup>NTR</sup> desinhiben el crecimiento de neuritas de neuronas del ganglio de la raíz dorsal en presencia de MAG (Higuchi et al., 2003). En estos cultivos el silenciamiento de p75<sup>NTR</sup>, NgR y RhoA mediante siRNAs desinhibía el crecimiento de neuritas inducido por neurotrofinas en presencia de mielina del SNC, resultando el bloqueo de la expresión de RhoA el más efectivo en la promoción de la regeneración axonal (Ahmed et al., 2005). Un trabajo *in vivo* publicado recientemente muestra que el silenciamiento de Nogo-A mediante siRNAs bloquea la expresión de este inhibidor del crecimiento axonal derivado de la mielina promoviendo la recuperación funcional en un modelo murino de esclerosis múltiple, y sugiere que esta recuperación pueda estar mediada por la reparación axonal en ratones tratados con siRNAs frente a Nogo-A (Yang et al., 2010).

A la vista de estos resultados obtenidos en estudios realizados *in vitro* e *in vivo* tras la administración de siRNAs demostrando la eficacia en la supresión de la expresión de las moléculas frente a las cuales van dirigidos resulta de notable interés su empleo para el

bloqueo de la expresión de moléculas inhibitoras del crecimiento axonal en modelos animales con lesiones del SNC.

Puesto que los últimos descubrimientos han implicado al NgR como punto de convergencia en la señal de transducción de varios inhibidores asociadas a la mielina, en este trabajo de tesis vamos a prestar especial atención al papel que ejerce en la inhibición del crecimiento axonal. Mediante la administración de siRNAs específicamente dirigidos frente a este receptor analizaremos la posible contribución del bloqueo de la expresión NgR en la recuperación de la plasticidad postlesional en el SNC adulto de rata, empleando como modelo de lesión la desaferenciación retiniana practicada en el adulto. Asimismo, en otro intento de promover la plasticidad en este sistema, se bloqueará mediante siRNAs la expresión de RhoA, efector aguas abajo de la cascada de señalización activada como consecuencia de la unión de los ligandos al complejo receptor NgR/Lingo-1/p75<sup>NTR</sup> y que da como resultado la inhibición del crecimiento axonal como consecuencia de la despolimerización de la actina.

#### **1.4.2. Neurotrofinas como reguladoras del crecimiento axonal**

Las neurotrofinas inicialmente fueron identificadas como promotoras de la supervivencia axonal, pero evidencias posteriores pusieron de manifiesto que regulan además muchos aspectos del desarrollo y función neuronal, incluyendo la formación de la sinapsis y la plasticidad sináptica (Lewin y Barde, 1996; Bibel y Barde, 2000; Kaplan y Miller, 2000; Poo, 2001; Sofroniew et al., 2001; Lu et al., 2008). La primera neurotrofina identificada, el factor de crecimiento nervioso (NGF), fue descubierta durante la búsqueda de factores de supervivencia que pudieran explicar el efecto deletéreo de la delección de tejidos diana en la subsecuente supervivencia de neuronas sensoriales y motoras (Levi-Montalcini, 1987; Shooter, 2001). Su descubrimiento validó el modelo de acción neurotrófica en el cual las dianas de inervación neuronal secretan cantidades limitantes de factores de supervivencia para equilibrar el tamaño del tejido diana con el número de neuronas que lo inervan. La segunda neurotrofina caracterizada, el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), fue purificada del cerebro del cerdo como un factor de supervivencia para varias poblaciones neuronales que no respondían al NGF (Barde et al., 1982). Características conservadas de las secuencias de estas dos proteínas permitieron aislar clones que codificaron miembros adicionales de esta familia. Esta incluye, además del NGF y el BDNF, la neurotrofina (NT)-3, NT-4/5 y NT-6 (Barbacid, 1995). Las neurotrofinas han sido implicadas en un amplio espectro de acciones biológicas en neuronas (revisado por Lewin y Barde, 1996), y en tejidos no neuronales

(Shibayama y Koizumi, 1996), incluyendo la prevención de la muerte celular neuronal durante el desarrollo (Buj-Bello et al., 1994), y mantenimiento neuronal tras condiciones de estrés tales como la axotomía (Sendtner et al., 1992; Nakazawa et al., 2002) y la isquemia (revisado por Wu, 2005).

Las neurotrofinas pueden ser transportadas tanto retrógradamente como anterógradamente (Spalding et al., 1998; Reynolds et al., 2000; von Bartheld et al., 2001) y se ha demostrado que interactúan con dos tipos de receptores totalmente distintos. El primer receptor en ser descubierto fue el p75<sup>NTR</sup>, identificado como un receptor de baja afinidad para las neurotrofinas (Johnson et al., 1986; Radeke et al., 1987). Posteriormente los receptores tirosina quinasa (Trks), fueron identificados como los receptores de alta afinidad para la familia de neurotrofinas (Kaplan et al., 1991; Klein et al., 1991; Soppet et al., 1991). La unión de NGF a TrkA, de BDNF y NT-4/5 a TrkB, o de NT-3 a TrkC (y débilmente a TrkB) lleva a la activación de varias rutas de señalización intracelular que incluyen la señalización por la proteína quinasa activada por mitógeno/la proteína quinasa activada por señal extracelular (MAPK/ERK), la fosfolipasa C $\gamma$  (PLC $\gamma$ ), y la fosfatidil-inositol 3-quinasa (PI3K) (Huang y Reichardt, 2003).

El BDNF y su receptor, TrkB, se expresan ampliamente en el cerebro de mamíferos, tanto en desarrollo como en el adulto. La señalización intracelular estimulada por BDNF/TrkB es crítica para la supervivencia neuronal y la morfogénesis de las neuronas del SNC. La administración de BDNF *in vivo* ha mostrado que protege a una variedad de tipos neuronales de lesiones cerebrales (Wu y Pardridge, 1999; Schäbitz et al., 2000). A parte del efecto neuroprotector atribuido, el BDNF se ha visto que es esencial para la transmisión neuronal y la plasticidad neuronal dependiente de actividad (Kang y Schuman, 1995; Patterson et al., 1996; Li et al., 1998). La potenciación a largo plazo (LTP) es la forma más estudiada de plasticidad sináptica. Está ampliamente aceptado que el BDNF está involucrado en los mecanismos que subyacen a la inducción y mantenimiento de la LTP (revisado por Lu et al., 2008). Asimismo, el BDNF ejerce un papel muy importante en la morfología de neuritas (Cohen-Cory y Fraser, 1995; McAllister et al., 1995), siendo uno de los efectos más destacables la inducción de la ramificación axonal en neuronas del SNC (Patel y McNamara, 1995) y el crecimiento de neuritas (Ahmed et al., 1995; Avwenagha et al., 2003). Un estudio pionero *in vivo* desarrollado por Cohen-Cory y Fraser reveló que la inyección de BDNF en el techo óptico de *Xenopus laevis* aumentaba la complejidad y las ramificaciones del campo



terminal de axones ópticos durante el desarrollo (Cohen-Cory y Fraser, 1995). En el modelo que emplearon, la inyección de anticuerpos que neutralizan el BDNF reducía la arborización de los axones y la complejidad, lo que sugirió que el BDNF estaba involucrado en cambios morfológicos del axón. En este sentido, se ha evidenciado que el BDNF también promueve la elongación axonal en axones motores y sensoriales (Tucker et al., 2001), y la ramificación axonal en neuronas hipocampales (Danzer et al., 2002).

Es ampliamente conocido que, las neuronas que proyectan al SNP mantienen la capacidad de regenerar sus axones tras lesiones. A diferencia de éstas, las neuronas confinadas al SNC carecen de esta capacidad. Esta diferencia, al menos en parte, puede estar mediada por el hecho de que las neuronas del SNC fracasan en la regulación de proteínas asociadas a la regeneración, que incluyen factores tróficos y sus receptores. Debido a esto, se ha sugerido que la carencia de este aporte trófico de las neuronas del SNC axotomizadas puede atenuarse mediante la aplicación exógena de factores tróficos tanto en el cuerpo celular neuronal como en los axones dañados en el lugar de la lesión. Por ejemplo, se ha observado que la administración exógena de BDNF o NT-4/5 en los cuerpos celulares rubroespinales una semana después de la axotomía cervical o torácica prevenía la atrofia rubroespinal, resultaba en la expresión mantenida de genes asociados a la regeneración, tales como la proteína asociada al crecimiento (GAP)-43 y la tubulina  $\alpha$ -1, y promovía la regeneración axonal en trasplantes de nervio periférico en el lugar de la lesión (Kobayashi et al., 1997). De igual modo, estudiando el efecto de la administración de BDNF directamente en los cuerpos celulares rubroespinales un año después de lesión espinal cervical se observó que estas neuronas con daño crónico respondían a este aporte trófico mostrando una reversión masiva de la atrofia, la estimulación de la expresión de GAP-43 y de la tubulina  $\alpha$ -1, y la promoción de la regeneración axonal en los trasplantes de nervio periférico (Kwon et al., 2002). Asimismo, neuronas corticoespinales dañadas mostraron una respuesta trófica similar tras la aplicación de BDNF en los cuerpos celulares aumentando la expresión de GAP-43 y la tubulina  $\alpha$ -1. Sin embargo, aunque no se observó una promoción de la regeneración en los trasplantes de nervio periférico insertados en la columna dorsal de la médula espinal, sí que se mostró un incremento en el *sprouting* de axones corticoespinales axotomizados dentro de la sustancia gris de la médula espinal ventral al lugar transplantado (Hiebert et al., 2002). Tras la axotomía unilateral del tracto corticoespinal por piramidotomía, el tratamiento con BDNF también resultó en la estimulación del *sprouting* de los axones corticoespinales axotomizados (Khodarahmi et al., 2001).

También se han estudiado extensamente los efectos del BDNF en otro tipo de lesión del SNC, como es la axotomía de las células ganglionares de la retina. En la retina de mamíferos adultos las células ganglionares axotomizadas degeneran retrógradamente mediante apoptosis (Berkelaar et al., 1994; García-Valenzuela et al., 1994). Se ha observado que la inyección intraocular de esta neurotrofina promueve la supervivencia de las células de la retina axotomizadas (Mansour-Robaey et al., 1994; Peinado-Ramón et al., 1996). Además, tanto la administración de BDNF como de NT-4/5 en el humor vítreo aumenta el crecimiento y la expansión de los axones de las células ganglionares de la retina tras la transección del nervio óptico en ratas adultas (Sawai et al., 1996).

Trabajos previos han evidenciado que el tratamiento crónico con antidepresivos da lugar a un incremento de los niveles de expresión de BDNF, así como de su principal receptor, el TrkB, en el hipocampo (Martínez-Turrillas et al., 2005; Castrén et al., 2007). Un trabajo reciente desarrollado por Maya Vetencourt y colaboradores pone de manifiesto que el tratamiento crónico con fluoxetina, un inhibidor selectivo de la recaptación de la serotonina que clínicamente es ampliamente empleado para el tratamiento de la depresión, incrementa la respuesta plástica en el sistema visual adulto de la rata (Maya Vetencourt et al., 2008). En este trabajo demuestran que la administración crónica de fluoxetina reinstaura la plasticidad de la dominancia ocular en el estadio adulto, normalmente asociada al periodo crítico, y promueve la recuperación de funciones visuales en animales adultos con ambliopía, sometidos a privación monocular a largo plazo. Asimismo, muestran que el tratamiento con este antidepresivo produjo un incremento de los niveles de proteína del BDNF en la corteza visual (CV), lo que sugiere el posible efecto de esta neurotrofina en el reestablecimiento de la plasticidad, dado que la inyección intracortical de BDNF mostró, a su vez, un cambio en la dominancia ocular en respuesta a la privación monocular comparable al observado tras el tratamiento de fluoxetina (Maya Vetencourt et al., 2008).

Teniendo en cuenta el incremento en la expresión de BDNF en la corteza visual tras el tratamiento crónico con el antidepresivo fluoxetina y su efecto en la reinstauración de la plasticidad de la dominancia ocular en el adulto, nos postulamos su posible efecto en la recuperación de la plasticidad en la conexión visual corticocolicular tras la desafrenciación retiniana llevada a cabo en ratas adultas.

### 1.5. c-Fos

La estimulación de neuronas puede activar dos mecanismos diferentes mediante los cuales procesan y transmiten la información: la actividad electrofisiológica que inmediatamente se procesa y transmite información sobre el estímulo; y las cascadas de señalización de segundos mensajeros que actúan a largo plazo y que dan lugar a la producción de factores de transcripción que inician y/o reprimen la transcripción de otros genes, y de ese modo alterando la respuesta neuronal a subsecuentes estímulos. Estos genes activados por factores de transcripción pueden ser, por ejemplo, nuevas (o más) proteínas que formen receptores de la transmisión, canales iónicos y estructuras del citoesqueleto, así como aquellas requeridas para la síntesis de neurotransmisores y para la regeneración. Los factores de transcripción juegan un papel crucial y específico en el desarrollo y en el funcionamiento del sistema nervioso, así como en las respuestas adaptativas del sistema nervioso a diferentes estímulos y a diferentes situaciones patológicas (revisado por Herdegen y Leah, 1998).

Se ha sugerido que la inducción de genes tempranos inmediatos (IEGs) está estrechamente relacionada con la respuesta plástica del SNC (Beaver et al., 1993; Mower, 1994; Kaplan et al., 1996; Sato et al., 2000; Hartwig et al., 2008). Los IEGs son el primer conjunto de genes activados por señales externas y no requieren síntesis *de novo* de proteínas. Su activación por estímulos trans-sinápticos es rápida y transitoria (Morgan y Curran, 1991) y su expresión no puede ser prevenida por inhibidores de la síntesis de proteínas (Sheng y Greenberg, 1990).

Entre la variedad de IEGs identificados el proto-oncogen *c-fos*, que codifica para la fosfoproteína nuclear c-Fos, es probablemente el mejor estudiado (revisado por Herrera y Robertson, 1996). El c-Fos, y otros miembros de su familia, forman el factor de transcripción nuclear activador de la proteína-1 (AP-1) por dimerización con miembros de la familia Jun. El AP-1 activa la transcripción de genes diana que contienen lugares AP-1 (Sheng y Greenberg, 1990) regulando, por tanto, la expresión de estos genes, lo que modificará el fenotipo de la célula en cuestión. De este modo, señales externas pueden alterar la expresión fenotípica de las células, pudiendo dirigir cambios a largo plazo en el fenotipo celular (Sheng y Greenberg, 1990; Morgan y Curran, 1991).

Los primeros estudios que sugirieron que la expresión de los IEGs podría tener un papel en el funcionamiento neuronal fueron realizados en células PC12 diferenciadas. Se

mostraron los efectos del NGF en la expresión de c-Fos en esta línea celular (Curran y Morgan, 1985). Estudios posteriores demostraron que agentes despolarizantes inducían la expresión de c-Fos en células PC12 diferenciadas neuronalmente (Greenberg et al., 1986; Morgan y Curran, 1986). Se demostró la presencia de niveles basales de inmunorreactividad del tipo Fos en el cerebro de rata (Dragunow et al., 1987). Tres estudios posteriores observaron que el aumento de actividad neuronal *in vivo* podría inducir la expresión de c-Fos. Analizaron la inducción de la expresión de c-Fos tras daño generalizado (Morgan et al., 1987), estimulación nociva (Hunt et al., 1987), y mediante *kindling* (Dragunow et al., 1988).

Desde estos primeros estudios pioneros se han publicado una serie de artículos investigando la expresión del c-Fos en el SNC. Actualmente, la expresión de c-Fos es ampliamente aceptada para identificar la localización de la activación neuronal inducida por diversos estímulos (Sagar et al., 1988; Dragunow y Faull, 1989), y especialmente aquellos conducidos por la transmisión glutamatérgica (revisado por Morgan y Curran, 1991; Herdegen y Leah, 1998). De esta forma, el c-Fos ha sido extensamente empleado para mapear neuronas activadas en el núcleo supraquiasmático en respuesta a cambios generales de iluminación y ritmos circadianos en roedores como la rata (Aronin et al., 1990; Sutin y Kilduff, 1992), el hámster (Chambille et al., 1993; Guido et al., 1999) y el gerbo (Fite et al., 2005). La inducción de c-Fos ha sido también caracterizada en la retina y otros centros visuales centrales de animales sometidos a flases globales de luz (Sagar y Sharp, 1990; Craner et al., 1992; Koistinaho et al., 1993), tras estímulos visuales con patrones localizados (Montero y Jian, 1995) y tras la exposición a diferentes estimulaciones de luz (Correa-Lacárcel et al., 2000; Poveda y Kretz, 2009).

En relación al estado de plasticidad, varios trabajos han comparado el diferente nivel de inducción del c-Fos en la corteza visual durante el periodo crítico (Kaplan et al., 1996; Sato et al., 2000). Yagi y colaboradores estudiando la expansión funcional de la vía visual ipsilateral resultante de la desaferenciación monocular en ratas determinaron que la estimulación visual inducida por neuronas inmunorreactivas de tipo Fos es mucho más densa en las capas superficiales del CS cuando la desaferenciación tiene lugar en el nacimiento respecto a la madurez (Yagi et al., 2001). Asimismo, en un trabajo reciente de nuestro laboratorio, analizando los efectos de dos tipos de estimulación de las vibrisas en la expresión de c-Fos en el CS de ratas se observó que los animales enucleados neonatalmente mostraban

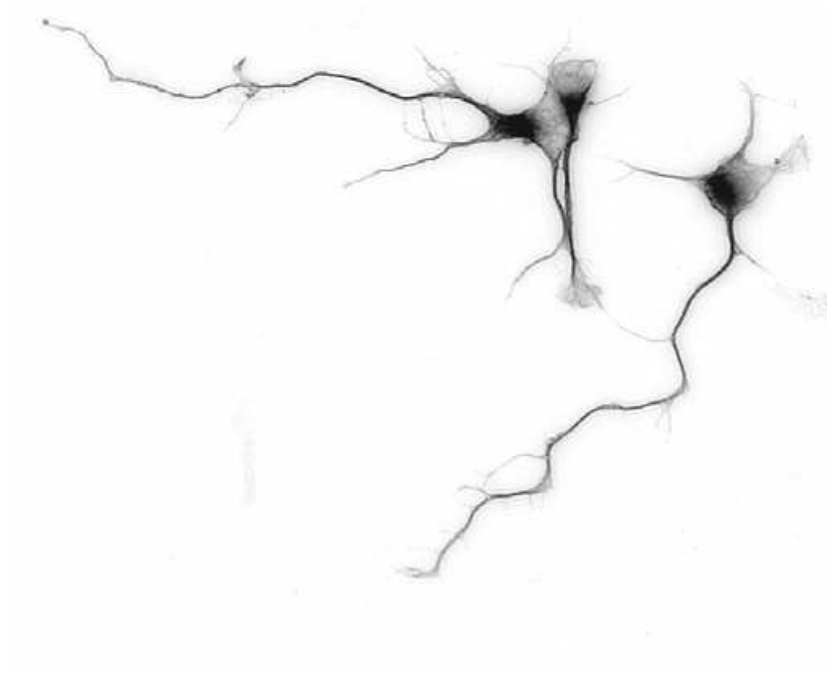
un aumento en el inmunomarcado de c-Fos en la estratos superficiales del CS (Mundiñano y Martínez-Millán, 2010).

## 1.6. Magnetorrecepción

La magnetorrecepción es una habilidad sensorial ampliamente extendida, pero que todavía resulta enigmática. Aunque estudios de comportamiento han aportado abundantes evidencias sobre la orientación en el campo magnético entre los vertebrados (Lohmann y Johnsen, 2000), los mecanismos de transducción y la base neuronal de la magnetorrecepción y la orientación magnética se desconocen (revisado por Johnsen y Lohmann 2005, 2008; Wiltschko y Wiltschko, 2006). Unos pocos estudios electrofisiológicos se han dirigido a involucrar regiones específicas del cerebro en el procesamiento de la información magnética (Semmler et al., 1984; Demaine y Semmler, 1985; Semmler y Demaine, 1986; Beason y Semmler, 1987; Semmler y Beason, 1990; Walker et al., 1997). En aves, trabajos tempranos de mapeo electrofisiológico (Semmler et al., 1984; Semmler y Demaine, 1986) y mediante 2-desoxiglucosa- $C^{14}$  (Mai y Semmler, 1990) han demostrado de la involucración del sistema visual óptico accesorio y el tectofugal. Estudios recientes, empleando factores de transcripción inducibles como marcadores de actividad neuronal, han sugerido la implicación del sistema visual talamofugal (Mouritsen et al., 2005; Heyers et al., 2007; Liedvogel et al., 2007) y el hipocampo (Shimizu et al., 2004), lo cual se ha confirmado por experimentos de lesión (Zapka et al., 2009) y mediante electrofisiología (Vargas et al., 2006). Además, mediante la visualización inmunocitoquímica de la proteína reguladora transcripcional c-Fos, en el topo se ha demostrado el procesamiento de la información magnética en el CS (Němec et al., 2001), así como en constituyentes clave del circuito de navegación como es el sistema de representación espacial entorrinal-hipocampal (Burger et al., 2010). Este último trabajo ha evidenciado, por primera vez, que el circuito de navegación de roedores pueda estar influenciado por campos magnéticos estáticos de baja intensidad ( $\leq 50 \mu T$ ).

Los topos son roedores subterráneos congénitamente microoftálmicos que representan un caso extremo de adaptación sensorial ya que poseen un sistema visual severamente reducido, lo que les dificulta para la navegación guiada por estímulos de tipo visual (revisado por Němec et al., 2008). Sin embargo, presentan elevadas habilidades táctiles (revisado por Park et al., 2007) y magnetosensoriales (revisado por Moritz et al., 2007). Investigaciones recientes han demostrado que la sensibilidad magnética se extiende a otros mamíferos. La orientación en el campo magnético ha sido evidenciada en roedores como el hámster

(Deutschlander et al., 2003), el ratón (Muheim et al., 2006) y el murciélago (Holland et al., 2006; Wang et al., 2007) y la alineación magnética en rumiantes (Begall et al., 2008; Burda et al., 2009). Además, otros trabajos demostraron que la exposición aguda a campos magnéticos estáticos de alta intensidad (0,14 T) (Kristofikova et al., 2005) y a campos magnéticos de 60 MHz (Lai et al., 1993; Lai y Carino, 1999) disminuye la actividad colinérgica en el hipocampo de rata, causando deficiencias en la actuación en el laberinto de brazo radial (Lai, 1996). Esto sugiere que el procesamiento de la información magnética dentro del circuito de navegación podría no estar limitada a especies especializadas como los topos. Teniendo en cuenta ésto y las observaciones descritas por Němec y colaboradores en las que muestran que el CS del topo contiene neuronas que responden a estímulos magnéticos y que estas neuronas son selectivas direccionalmente y se organizan dentro de subcapas discretas (Němec et al., 2001) nos planteamos estudiar el efecto de los cambios en la polaridad del campo geomagnético en el CS de rata, dada su naturaleza integradora de estímulos sensoriales. Concretamente, mediante la detección de c-Fos, técnica neuroanatómica extensamente empleada en investigación sensorial en respuesta a estímulos externos (Dragunow y Faull, 1989; Morgan y Curran, 1991; Herdegen y Leah, 1998), hemos analizado la presencia de células que respondiesen a estímulos magnéticos en los estratos superficiales coliculares, así como las posibles variaciones en esta respuesta en animales privados de estímulos visuales mediante desafereciación retiniana neonatal y en estadio adulto.



## **2. PLANTEAMIENTO Y** **OBJETIVOS**





## **2. PLANTEAMIENTO Y OBJETIVOS**

### **2.1. Planteamiento**

Durante el desarrollo del SNC tiene lugar la formación y el posterior refinamiento de las conexiones hasta alcanzar su patrón maduro tras el periodo crítico postnatal. Durante este proceso de maduración, las conexiones poseen una gran capacidad de reorganización o plasticidad postlesional. Con la madurez, esta capacidad se ve claramente limitada. El avance llevado a cabo en las últimas décadas en el conocimiento de los mecanismos que subyacen a esta reducción de la respuesta plástica ante las lesiones del SNC adulto provee la posibilidad para la búsqueda y el desarrollo de dianas terapéuticas potenciales que promuevan la regeneración y reorganización de las conexiones nerviosas. Entre los factores que se han identificado implicados en este fracaso de las neuronas para la regeneración de sus procesos ante daño nervioso en el estadio adulto se encuentran la presencia de inhibidores del crecimiento axonal (McKerracher y Winton, 2002; Tang, 2003; Sandvig et al., 2004; Schwab, 2004), así como a la limitada disponibilidad de factores neurotróficos (Berry et al., 1998; Logan y Berry, 2002).

El amplio conocimiento de la conectividad nerviosa del CS de la rata, así como la facilidad de acceso a sus principales aferencias visuales, hace de éste un modelo idóneo para investigar los fenómenos implicados en la regeneración y plasticidad postlesional del SNC.

En este estudio, inicialmente, mediante el empleo de trazadores anterógrados, se estudiarán las conexiones a los estratos superficiales del CS procedentes de la retina y de la CV1 para intentar poner de manifiesto la diferente capacidad de la respuesta plástica y regenerativa según su grado de madurez ante diferentes tipos de lesiones, la desaferenciación retiniana y/o la ablación del CS, llevadas a cabo en el sistema visual de la rata.

A continuación, se abordarán distintas estrategias dirigidas a promover la plasticidad en el sistema visual maduro, estudiando la conexión corticocolicular visual en un modelo de lesión como es la desaferenciación retiniana en estadio adulto, entre las que se incluyen la reducción de la expresión de inhibidores del crecimiento axonal, el receptor de Nogo y el RhoA, mediante la administración de RNAs pequeños de interferencia (siRNAs), así como el tratamiento crónico con fluoxetina, antidepresivo asociado al incremento de los niveles del BDNF (Martínez-Turrillas et al., 2005; Castrén et al., 2007; Maya Vetencourt et al., 2008),

involucrado en la reinstauración de la plasticidad en el sistema visual maduro (Maya Vetencourt et al., 2008).

Además, se analizará el grado de inducción del gen temprano *c-fos* en los estratos visuales coliculares en respuesta a cambios en la polaridad del campo magnético, y sus posibles modificaciones debidas a la desaferenciación retiniana, y se estudiarán los efectos de la estimulación magnética en la organización de la vía corticocolicular visual de animales sometidos a desaferenciación retiniana en fase adulta.

## 2.2 Objetivos

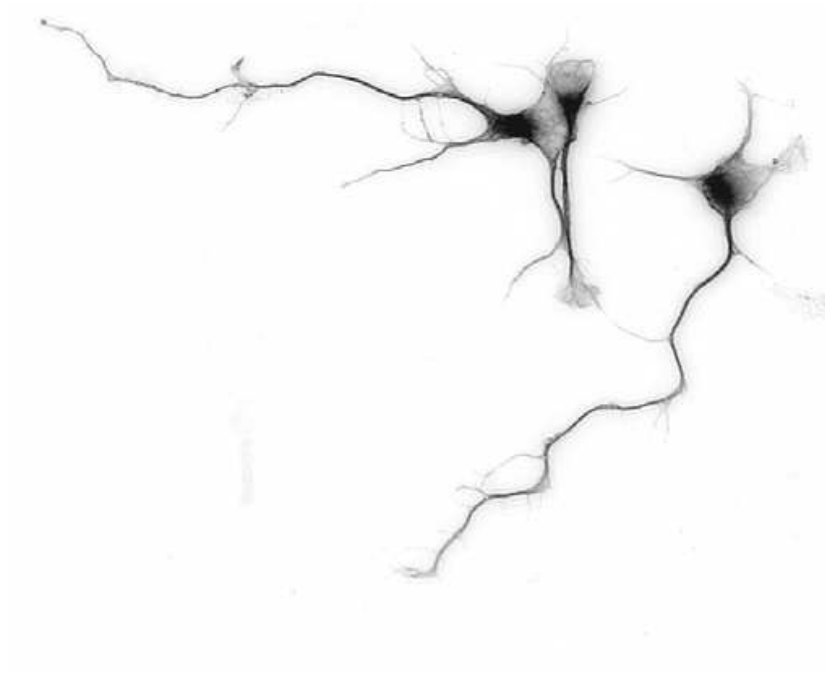
En base al planteamiento formulado en el apartado anterior los objetivos generales del presente trabajo de tesis fueron los siguientes:

1. Estudio de la organización de los campos terminales retinocoliculares en ratas adultas tras la desaferenciación retiniana y tras la ablación del colículo superior, así como el efecto conjunto de ambas lesiones, practicadas neonatalmente y en el estadio adulto.
2. Estudio de la organización de los campos terminales corticocoliculares visuales en ratas adultas tras la ablación del colículo superior neonatal.
3. Estudio del patrón de expresión en el colículo superior de ratas adultas de las proteínas ligantes de calcio, calbindina, calretinina y parvalbúmina, así como de la proteína ácida fibrilar glial tras la ablación del colículo superior neonatal, así como tras la desaferenciación retiniana y la ablación del colículo superior neonatal.
4. Estudio de la organización de los campos terminales corticocoliculares visuales tras la administración de pequeños RNAs de interferencia frente al receptor de Nogo y a RhoA en la corteza visual primaria en ratas sometidas a desaferenciación retiniana practicada en el estadio adulto.
5. Estudio de la organización de los campos terminales corticocoliculares visuales tras la administración crónica de fluoxetina en ratas sometidas a desaferenciación retiniana practicada en el estadio adulto.
6. Estudio de la expresión del gen temprano c-Fos en los estratos superficiales del colículo superior de ratas adultas en respuesta a alteraciones en la polaridad del campo

geomagnético y los posibles cambios tras la desaferenciación retiniana practicada neonatalmente y en el estadio adulto.

7. Estudio de la organización de los campos terminales corticocoliculares visuales en respuesta a alteraciones en la polaridad del campo geomagnético en ratas sometidas a desaferenciación retiniana practicada en el estadio adulto.
8. Estudio cuantitativo de la expresión de BDNF en el colículo superior y en la corteza visual de ratas adultas ilesas y sometidas a desaferenciación retiniana neonatal tras la exposición a un campo magnético con la polaridad alterada.





### **3. MATERIAL Y MÉTODOS**



### **3. MATERIAL Y MÉTODOS**

#### **3.1. Animal de experimentación**

El animal de experimentación empleado para la realización de este estudio fue la rata albina *Sprague-Dawley* procedente del Servicio de Animalario de la Universidad del País Vasco/Euskal Herriko Unibertsitatea (UPV/EHU) y la aprobación para llevar a cabo este trabajo fue concedida por el Comité de ética para el bienestar animal de la UPV/EHU. Los animales fueron manipulados de acuerdo con las directrices institucionales para el bienestar animal, tomando las medidas necesarias para minimizar tanto el sufrimiento de los animales, como para reducir el número de animales usados. Durante todo el tiempo de supervivencia, los animales se mantuvieron con bebida y comida suministrada *ad libitum*.

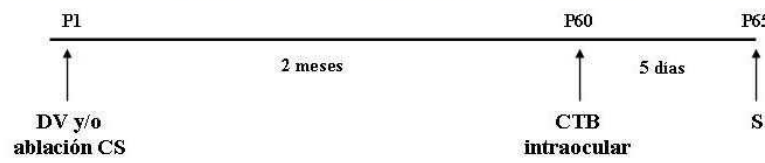
Para la realización de este estudio se emplearon un total de 88 ratas hembras. En la tabla 1, se muestra un resumen del plan de trabajo seguido en este trabajo indicando el número de animales empleado para cada condición experimental y análisis llevado a cabo. Asimismo, en la figura 1 se presenta un esquema indicativo del diseño experimental mostrando la edad en la que se practicaron las lesiones, se inyectaron los trazadores y se aplicaron los tratamientos.

**Tabla 1. Plan de trabajo.**

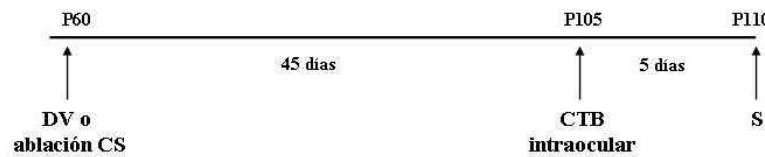
Nº animales	Lesión	Tratamiento	Trazador	Análisis
3	Control		CTB intraocular	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Anti-CTB</li> <li>• Anti-CB</li> <li>• Anti-CR</li> <li>• Anti-PV</li> <li>• Anti-GFAP</li> </ul>
3	DV neonatal		CTB intraocular	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Anti-CTB</li> </ul>
3	DV adulto		CTB intraocular	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Anti-CTB</li> </ul>
5	Ablación CS neonatal		CTB intraocular	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Anti-CTB</li> <li>• Anti-CB</li> <li>• Anti-CR</li> <li>• Anti-PV</li> <li>• Anti-GFAP</li> </ul>
5	Ablación CS + DV neonatal		CTB intraocular	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Anti-CTB</li> <li>• Anti-CB</li> <li>• Anti-CR</li> <li>• Anti-PV</li> <li>• Anti-GFAP</li> </ul>
3	Ablación CS adulto		CTB intraocular	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Anti-CTB</li> </ul>
3	Ablación CS neonatal		BDA en CV1	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Revelado BDA</li> </ul>
3	Control		BDA en CV1	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Revelado BDA</li> </ul>
3	DV adulto		BDA en CV1	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Revelado BDA</li> </ul>
3	DV adulto	siRNAs NgR en CV1	BDA en CV1	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Revelado BDA</li> </ul>
3	DV adulto	siRNAs RhoA en CV1	BDA en CV1	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Revelado BDA</li> </ul>
3	DV adulto	siRNAs NgR + RhoA en CV1	BDA en CV1	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Revelado BDA</li> </ul>
3	Control			<ul style="list-style-type: none"> <li>• Cuantificación mRNA NgR – qRT-PCR</li> <li>• Cuantificación mRNA RhoA – qRT-PCR</li> </ul>
6	Control	siRNAs NgR en CV1		<ul style="list-style-type: none"> <li>• Cuantificación mRNA NgR – qRT-PCR</li> </ul>
3	Control	siRNAs RhoA en CV1		<ul style="list-style-type: none"> <li>• Cuantificación mRNA RhoA – qRT-PCR</li> </ul>
3	Control	Fluoxetina	BDA en CV1	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Revelado BDA</li> </ul>
6	DV adulto	Fluoxetina	BDA en CV1	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Revelado BDA</li> </ul>
3	Control			<ul style="list-style-type: none"> <li>• Anti-c-Fos</li> <li>• Anti-VGluT1</li> </ul>
3	Control	EM 1 hora		<ul style="list-style-type: none"> <li>• Anti-c-Fos</li> </ul>
3	DV neonatal	EM 1 hora		<ul style="list-style-type: none"> <li>• Anti-c-Fos</li> <li>• Anti-VGluT1</li> <li>• Anti-c-Fos + anti-VGluT1</li> </ul>
3	DV adulto	EM 1 hora		<ul style="list-style-type: none"> <li>• Anti-c-Fos</li> <li>• Anti-VGluT1</li> </ul>
3	DV adulto	EM 11 días	BDA en CV1	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Revelado BDA</li> </ul>
3	Control			<ul style="list-style-type: none"> <li>• Cuantificación BDNF – ELISA</li> </ul>
3	DV neonatal			<ul style="list-style-type: none"> <li>• Cuantificación BDNF – ELISA</li> </ul>
3	Control	EM 11 días		<ul style="list-style-type: none"> <li>• Cuantificación BDNF – ELISA</li> </ul>
3	DV neonatal	EM 11 días		<ul style="list-style-type: none"> <li>• Cuantificación BDNF – ELISA</li> </ul>



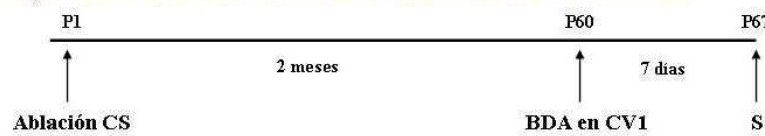
**Inyección de CTB intraocular en ratas con DV y/o ablación del CS neonatal**



**Inyección de CTB intraocular en ratas con DV o ablación del CS en estadio adulto**



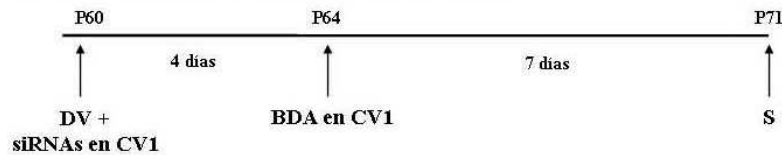
**Inyección de BDA en CV1 en ratas con ablación del CS neonatal**



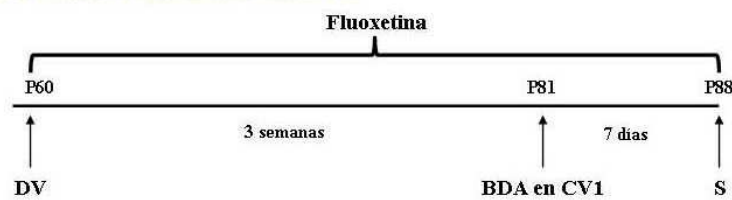
**Inyección de BDA en CV1 en ratas con DV en estadio adulto**



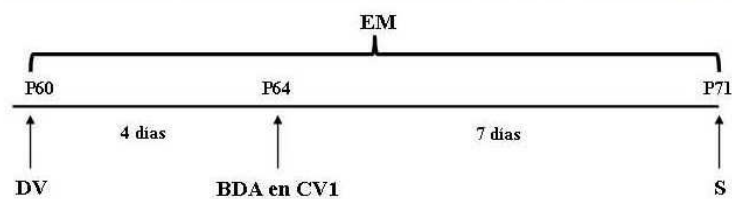
**Inyección de BDA en CV1 en ratas con DV en estadio adulto tratadas con siRNAs frente a NgR, RhoA o NgR+RhoA**



**Inyección de BDA en CV1 en ratas con DV en estadio adulto sometidas a tratamiento crónico con fluoxetina**



**Inyección de BDA en CV1 en ratas con DV en estadio adulto sometidas a EM**



**Fig. 1. Diseño experimental.** BDA, biotín dextranamina; CS, colículo superior; CTB, subunidad B de la toxina colérica; CV1, corteza visual primaria; DV, desafereciación visual; EM, estimulación magnética; NgR, receptor de Nogo; P, día postnatal; S, sacrificio; siRNAs, RNAs pequeños de interferencia.

## **3.2. Intervenciones quirúrgicas**

### **3.2.1. Anestesia y analgesia**

Todas las intervenciones quirúrgicas, incluyendo las lesiones, la inyección de trazadores y de siRNAs, así como la perfusión, practicadas a los animales adultos en el presente trabajo fueron llevadas a cabo bajo anestesia profunda. Para ello, se empleó una solución acuosa de clorhidrato de quetamina (36 mg/kg de masa corporal, Sigma-Aldrich Química S.A.) y xilacina (6,2 mg/kg de masa corporal, Rompún, Bayer) por vía intramuscular. Cuando la intervención tuvo lugar en animales neonatos, como ocurre en el caso de la desaferenciación retiniana y la ablación del CS en P1, el método utilizado fue la crioadestesia. Después de las intervenciones los animales se mantuvieron atemperados sobre una manta eléctrica hasta que se recuperaron de los efectos de la anestesia, tras lo cual fueron devueltos a sus jaulas, y en el caso de los neonatos con sus madres.

Los animales fueron tratados con los antibióticos, tanto en el preoperatorio como en el postoperatorio, cloranfenicol (30 mg/kg de masa corporal, intramuscular) y gentamicina (40 mg/kg de masa corporal, intramuscular), respectivamente. En el postoperatorio se empleó como analgésico la buprenorfina (0,03 mg/kg de masa corporal, intramuscular) durante 3 días.

### **3.2.2. Desaferenciación retiniana unilateral**

Para llevar a cabo la desaferenciación retiniana unilateral en ratas neonatas (P1), una vez que la crioadestesia hizo su efecto se procedió a la apertura de la hendidura palpebral del ojo derecho con ayuda de un bisturí, tras lo cual se aplicó una gota de anestésico oftálmico compuesto de clorhidrato de tetracaína (1 mg/ml) y oxibuprocaina (2 mg/ml) (Laboratorios Cursí S.A.). Posteriormente, se seccionó la musculatura extrínseca y el nervio óptico con unas tijeras finas y curvadas, lo que permitió la liberación del globo ocular. Seguidamente, se les suministró cloranfenicol en polvo en la cavidad ocular para evitar infecciones.

La enucleación unilateral en animales adultos (P60) fue practicada bajo anestesia profunda. Se administraron dos gotas del anestésico local sobre la conjuntiva y se seccionaron los músculos oculares extrínsecos y el nervio óptico, y se extrajo el globo ocular. Un pequeño trozo de esponja de gelatina absorbible (Spongostan, Jhonson & Jhonson) fue colocada en la órbita con el fin de favorecer la coagulación.

### 3.2.3. Ablación unilateral del colículo superior

Para practicar la ablación unilateral del CS de los animales neonatos (P1) se hizo una incisión con un bisturí en la piel de forma que se pudieron ver claramente delineados los colículos por los vasos sanguíneos, que eran fácilmente visualizables a través del hueso ya que a esa edad postnatal el cráneo es ligeramente transparente. Con ayuda de una tijeras finas y curvadas se recortó a modo de solapa la parte de cráneo localizada encima del CS izquierdo y se procedió cuidadosamente a su aspiración mediante una bomba de succión modelo ASPIT (Ordisi). Un pequeño trozo de esponja de gelatina absorbible (Spongostan, Jhonson & Jhonson) se colocó en el lugar lesionado para favorecer la coagulación y controlar el sangrado. A continuación se cerró la herida con pegamento quirúrgico.

A diferencia de la ablación practicada neonatalmente, los animales adultos (P60) fueron colocados en un marco estereotáxico para localizar la región correspondiente al CS empleando el atlas de Swanson (1996). Según esto el punto central del CS se encontraba situado a -6.5 mm caudalmente al punto craneométrico Bregma y a 1,5 mm respecto la línea media. Tras despejar la zona se hizo un trépano de un tamaño lo suficientemente grande como para poder llevar a cabo la aspiración del CS. En estos animales adultos fue necesaria la aspiración parcial de la corteza visual situada sobre el CS, puesto que a estas edades la corteza se encuentra recubriendo esta estructura mesencefálica a diferencia de los neonatos en los que la corteza todavía no recubre los colículos. Una vez expuesto, el CS izquierdo fue aspirado mediante la bomba de succión citada. Con el fin de favorecer la coagulación se puso un trozo de esponja de gelatina absorbible (Spongostan, Jhonson & Jhonson) en la zona lesionada. Para finalizar, la herida fue suturada.

La aspiración del CS, tanto en animales neonatos como en adultos abarcó los estratos superficiales y parte de los intermedios.

### 3.2.4. Inyección de trazadores

En todos los casos las inyecciones de los trazadores fueron llevadas a cabo en animales en estadio adulto, de entre 2 y 4 meses de edad, bajo anestesia profunda tal y como se indica en el apartado correspondiente.

#### *3.2.4.1. Inyección intraocular de la subunidad B de la toxina colérica*

Para el estudio de la organización del campo terminal retinocolicular se empleó la subunidad B de la cólera toxina (CTB) como trazador, ampliamente empleado para estudios de trazado anterógrado y retrógrado en el sistema nervioso (Dederen et al., 1994; Shimizu et al., 1994; Angelucci et al., 1996; Reiner et al., 1996; Wu et al., 1999). Concretamente, se ha demostrado que el empleo de CTB es muy adecuado para el trazado de las conexiones retinofugales (Shimizu et al., 1994; Angelucci et al., 1996; Reiner et al., 1996; Wu et al., 1999; Fleming et al., 2006; Prichard et al., 2007). La metodología seguida fue la siguiente.

Los animales anestesiados fueron situados en un marco estereotáxico con el fin de inmovilizarlos. Se realizó una incisión en el párpado superior del ojo desde donde se accedió al globo ocular para inocular un volumen total de 5µl de CTB (Molecular Probes) al 0,1% en agua destilada (H<sub>2</sub>O<sub>d</sub>) en el humor vítreo. La administración del trazador se realizó a través de una jeringa (Nanofil Srynge, Word Precission Instruments) equipada con una aguja 33G (Word Precission Instruments) conectada a un microinyector a presión (kds310, Kd Scientific) a una velocidad de 0,15 µl/min. Una vez finalizada la inyección se dejó un tiempo de espera de 5 minutos con el fin de evitar el reflujo del trazador. Los animales fueron perfundidos tras 5 días de supervivencia.

#### *3.2.4.2. Inyección de biotín-dextranamina en la corteza visual primaria*

El empleo de la biotín-dextranamina (BDA) como trazador anterógrado, surge como alternativa al uso de las dextranaminas fluorescentes, cuyo principal inconveniente es la rapidez con que pierden su capacidad de fluorescer. Este trazador se aplica tanto iontoforéticamente como a presión y se transporta desde la corteza hasta el mesencéfalo de la rata tras un periodo de supervivencia de 1 semana. De esta manera se consigue el relleno completo de los terminales axonales y de los botones sinápticos (Veenman et al., 1992), permitiendo un marcado muy sensible y detallado de los axones y los terminales (Reiner et al., 2000). En este trabajo la microinyección a presión de BDA nos permitió analizar la organización de la conexión visual corticocolicular de ratas adultas tras las diferentes situaciones experimentales estudiadas. A continuación se detalla la metodología usada para su administración.

Una vez anestesiados, los animales fueron colocados en un marco estereotáxico, se les realizó una incisión cutánea hasta exponer la zona craneal, y se realizó un pequeño trépano en el hueso situado encima de la zona de interés siguiendo las coordenadas estereotáxicas correspondientes las cuales se determinaron usando el atlas de Swanson (1996) teniendo en cuenta el punto craneométrico Bregma, la sutura media del cráneo y la profundidad. En el presente trabajo, el lugar de inyección del trazador BDA fue la CV1 y las correspondientes coordenadas, medidas en mm fueron Bregma -6 mm, lateral izquierdo 4 mm, profundidad 1 mm. Después de perforar la dura madre se inoculó 2  $\mu$ l de BDA 10000 (Sigma-Aldrich) disuelto al 7,5% (p/v) en tampón fosfato 0,1M, pH 7,4 (PB). El BDA se administró, al igual que la CTB, por medio de una jeringa (Nanofil Srynge, Word Precission Instruments) equipada con una aguja 33G (Word Precission Instruments) conectada a un microinyector a presión (kds310, Kd Scientific) a una velocidad constante de 0,15  $\mu$ l/min. Finalizada la inyección se dejó un tiempo de espera de 5 minutos para evitar el reflujó del trazador. Transcurrida la operación se suturó la piel y los animales se mantuvieron atemperados tal y como se ha explicado anteriormente. El tiempo de supervivencia desde la inyección del trazador hasta la perfusión fue de 7 días.

### 3.2.5. Administración de siRNAs

Con el fin de reducir la expresión de las moléculas inhibidoras del crecimiento axonal NgR y RhoA, en un intento de promover la plasticidad tras la desaferenciación retiniana en el adulto en la vía visual corticocolicular, se llevó a cabo la administración de siRNAs específicamente dirigidos frente a estas moléculas.

El fenómeno de interferencia mediada por RNA (RNAi) es un mecanismo de silenciamiento del RNA específico de secuencia. Observado por primera vez hace poco más de una década (Fire et al., 1998), parece estar involucrado en el mecanismo de defensa contra RNAs de doble cadena extraños. La ruta de RNAi en las células de mamíferos está dirigida por la presencia de RNAs de doble cadena o RNAs pequeños de interferencia (siRNAs) (Fire et al., 1998; Elbashir et al., 2001). Los siRNAs son moléculas que constan de dos hebras de 21 nucleótidos acopladas en un dúplex de 19 pares de bases, con dos colas de nucleótidos. Mediante el ensamblaje en el complejo de silenciamiento inducido por RNA (RISC) se produce el desenrollamiento del dúplex del siRNA. La degradación específica está guiada por la hebra antisentido del siRNA que hibrida con el mRNA a nivel de las unidades ribosómicas siendo allí degradado por las RNAsas e impidiéndose, por tanto, la posterior traducción a

proteínas (revisado por Rana, 2007). Desde su descubrimiento, se ha producido un rápido incremento del empleo de siRNAs para la investigación en diversas áreas y como agente terapéutico potencial (revisado por Ryther et al., 2005).

### 3.2.5.1. Diseño de siRNAs

En este trabajo se diseñaron siRNAs específicamente dirigidos frente a NgR y RhoA de *Rattus norvegicus*. Para ello, fueron diseñados de acuerdo a las indicaciones de la página web (<http://www.rockefeller.edu/labheads/tuschl/>) del laboratorio de RNA y Biología Molecular del Dr. Thomas Tuschl (Instituto Médico Howard Hughes, Universidad de Rockefeller, Nueva York). Por medio de esta página web se accede al programa bioinformático siRNA del Instituto de Investigación Biomédica Whitehead (<http://jura.wi.mit.edu/bioc/siRNAext/>) donde a partir de las secuencias nucleotídicas de interés obtenidas del GenBank, se facilitan las parejas de oligos de los siRNAs. Asimismo, se llevó a cabo el diseño de *scrambles* a modo de control negativo. Para ello, se diseñaron secuencias de la misma longitud y composición nucleotídica que sus respectivos siRNAs pero con al menos 4 o 5 nucleótidos desemparejados, y se comprobó que los *scrambles* diseñados no presentaran homología con otros genes mediante el programa BLAST (Basic Local Alignment Search Tool). El servicio de síntesis de los siRNAs y los respectivos *scrambles* fue llevado a cabo por la casa comercial Sigma-Aldrich. La tabla 2 muestra las secuencias de siRNAs empleadas frente a NgR y RhoA.

**Tabla 2. Secuencias de los siRNAs diseñados dirigidos frente a NgR y RhoA y sus respectivos scrambles.**

Gen	N° acceso GenBank	Secuencia siRNAs
NgR	AF462390.1	S5' [Btn] UGACUCUCCAUUUGGGACsUsUsU [Thiol C3]
		AS5' [Btn] AGUCCCAAUUGGAGAGUCsAsUsU [Thiol C3]
NgR <i>scramble</i>		S5' [Btn] UGACUCUGCAUUUCGGACsUsUsU [Thiol C3]
		AS5' [Btn] AGUCCCAUAUGGACAGUCsAsUsU [Thiol C3]
RhoA	NM_057132.3	S5' [Btn] GUGCUGUUUAUUAUCUUsAsUsU [Thiol C3]
		AS5' [Btn] UAAGAUUAAUAAACAGCAsCsUsU [Thiol C3]
RhoA <i>scramble</i>		S5' [Btn] GUGCUGUAUUAUUCUUsAsUsU [Thiol C3]
		AS5' [Btn] UAAGAUUUAUAAAGAGCAsCsUsU [Thiol C3]

\* S, secuencia sentido; AS, secuencia antisentido; [Btn], biotilado; [Thiol C3], tiofosforado.

### 3.2.5.2. Inyección de siRNAs en la corteza visual primaria

La administración de siRNAs frente a NgR en la CV1 se llevó a cabo del mismo modo que la microinyección a presión del trazador anterógrado BDA en la misma región (Bregma -6, lateral izquierdo 4, profundidad 1), tal y como se describe en el apartado correspondiente de esta sección. Los siRNAs fueron reconstituidos en agua libre de RNAasas a una concentración de 50  $\mu$ M y mezclados con el reactivo oligofectamina (Invitrogen) en una proporción 10:1, respectivamente. El volumen total de inyección fue de 3  $\mu$ l de la mezcla anterior que fue inyectado a una velocidad constante de 0,15  $\mu$ l/min.

El tiempo de supervivencia de los animales que fueron inyectados con siRNAs para su posterior análisis mediante qRT-PCR fue de 24 horas. Cuando los animales fueron procesados para el estudio de la conexión corticocolicular visual, 4 días después de la administración de los siRNAs se les inyectó BDA y tras 7 días se procedió al sacrificio para su posterior análisis.

### 3.3. Tratamiento crónico con fluoxetina

El tratamiento crónico con fluoxetina (fluoxetina hidrocloreto, Sigma-Aldrich) se llevó a cabo sistemáticamente iniciándose inmediatamente después de llevar a cabo la desafrenciación retiniana en ratas adultas de 2 meses de edad y finalizándolo el día de su sacrificio (4 semanas después). La administración se realizó por vía oral incluida en el agua suministrada *ad libitum* (0,2 mg de fluoxetina hidrocloreto/ml de agua).

### 3.4. Estimulación magnética

Como parte del presente trabajo de tesis algunos animales fueron sometidos a alteraciones en la polaridad del campo magnético. El diseño del equipo necesario para ejecutar estos experimentos ha sido llevado a cabo por el grupo de investigación dirigido por el Profesor Barandiarán (Departamento de Electricidad y Electrónica, Facultad de Ciencia y Tecnología, UPV/EHU). A modo aclaratorio, cuando se haga referencia a que los animales fueron estimulados magnéticamente se referirá a que fueron expuestos a las condiciones que se detallan en este apartado.

El campo magnético que se usó en los experimentos vino producido por un conjunto de tres pares de carretes de Helmholtz orientados en las direcciones X, Y y Z, respectivamente. El diseño de los carretes fue lo suficientemente grande como para alojar en su interior una jaula no magnética donde se alojó al animal durante los experimentos de estimulación (Fig. 2). Cada par de carretes se conectó a una alimentación independiente, todas ellas controladas por un ordenador mediante un programa escrito en LabVIEW. Este permitió programar la secuencia y duración de la excitación magnética a aplicar. Los carretes fueron convenientemente calibrados de forma que fueron capaces de compensar exactamente el campo geomagnético en el punto de operación, de forma que no fue necesario apantallar el sistema. Los campos que se aplicaron fueron del orden del campo geomagnético (campo magnético de la Tierra  $\approx 40 \mu\text{T}$ ) pero con la componente horizontal rotada  $120^\circ$ . En el diseño experimental un grupo de animales se expusieron a este campo magnético alterado durante 1 hora tras la cual los animales fueron sacrificados. El otro grupo de animales se sometió a cambios de la componente horizontal alterantes durante 11 días. Para este fin se programó un ciclo en el que la componente horizontal estaba rotada  $120^\circ$  durante 1 hora, y retornaba a las condiciones equivalentes al campo magnético terrestre durante 8 horas, así sucesivamente durante 11 días.





**Fig. 2. Fotografía del equipo de estimulación magnética.** Se observa que está formado por 3 pares de carretes Helmholtz, orientados en las direcciones X, Y y Z, respectivamente.

### 3.5. Preparación del tejido nervioso para histología

#### 3.5.1. Fijación

La fijación tiene como objetivo aumentar la consistencia del tejido mediante la desnaturalización de las proteínas tisulares e impedir la difusión, desde su ubicación *in vivo* en las estructuras objeto de estudio, de las moléculas que se pretenden detectar.

El animal anestesiado se fijó por perfusión percardíaca. Como solución fijadora se empleó paraformaldehído frío al 4 % (p/v) en PB, que se introdujo en el torrente sanguíneo de los animales mediante presión a través de una cánula introducida en el ventrículo izquierdo, con un volumen total por animal de 200 ml a un flujo de 10,5 ml/min regulado por medio de una bomba de perfusión (Masterflex, Modelo 7018.20).

#### 3.5.2. Extracción de cerebro y microtomía

Una vez profundido el animal se extrajo el encéfalo del cráneo con la ayuda de una gubia y se dejó en postfijación en la misma solución fijadora durante 12 horas a 4°C, excepto los bloques que fueron procesados para la detección inmunohistoquímica de c-Fos que se postfijaron 4 horas. Transcurrido este tiempo, se sumergió en una solución crioprotectora que contenía sacarosa al 30% (p/v) en tampón fosfato salino 0,1M, pH 7,4 (PBS) durante 24-72 horas a 4°C hasta su hundimiento, momento indicativo de una correcta crioprotección. Una

vez crioprotectados los bloques, se procedió a su microtomía mediante microtomo de congelación (Frigomobil, Leica) obteniéndose secciones histológicas de 60 µm de grosor.

### 3.6. Inmunohistoquímica

La técnica de inmunohistoquímica, utilizada para el estudio cualitativo de proteínas en secciones de tejido, se basa en la capacidad de los anticuerpos de unirse específicamente a un antígeno de la proteína contra la que van dirigidos. El complejo formado por el antígeno unido al anticuerpo puede visualizarse de forma indirecta utilizando un anticuerpo secundario capaz de unirse específicamente al anticuerpo primario. Para ello, el anticuerpo secundario debe estar previamente conjugado con alguna molécula, enzima o fluorocromo que permita su detección. Los anticuerpos primarios y secundarios empleados en esta técnica se encuentran descritos en las tablas 3 y 4, respectivamente.

**Tabla 3. Anticuerpos primarios utilizados para estudios de inmunohistoquímica.**

Anticuerpo primario	Huésped	Marcado	Dilución	Casa Comercial
Anti-CTB	Cabra	Conexión retinocolicular	1:10000	Calbiochem
Anti-CB	Ratón	Subpoblaciones neuronales	1:10000	Swant
Anti-CR	Conejo	Subpoblaciones neuronales	1:2000	Swant
Anti-PV	Conejo	Subpoblaciones neuronales	1:5000	Swant
Anti-GFAP	Conejo	Astroцитos	1:3000	Dako
Anti-c-Fos	Conejo	Actividad neuronal	1:10000	Calbiochem
Anti-VGluT1	Cobaya	Terminales presinápticos corticocoliculares	1 µg/ml	Frontier Institute

**Tabla 4. Anticuerpos secundarios utilizados para estudios de inmunohistoquímica.**

Anticuerpo secundario	Huésped	Conjugado	Dilución	Casa Comercial
Anti-IgG de conejo	Cabra	Biotina	1:200	Vector
Anti-IgG de cabra	Conejo	Biotina	1:200	Vector
Anti-IgG de ratón	Cabra	Biotina	1:200	Vector
Anti-IgG de cobaya	Asno	Biotina	1:200	Jackson ImmunoResearch
Anti-IgG de conejo	Cabra	Alexa Fluor 594 rojo	1:200	Invitrogen
Anti-IgG de ratón	Cabra	Alexa Fluor 594 rojo	1:200	Invitrogen
Anti-IgG de cobaya	Cabra	Alexa Fluor 594 rojo	1:200	Invitrogen
Anti-IgG de conejo	Cabra	Alexa Fluor 488 verde	1:200	Invitrogen

### 3.6.1. Protocolo de inmunohistoquímica

La aplicación de las técnicas inmunohistoquímicas para todos los casos estudiados fue llevado a cabo en secciones histológicas de 60  $\mu\text{m}$  en flotación y siempre en agitación continua. La detección de los diferentes antígenos se llevó a cabo mediante el método inmunohistoquímico de la avidina-biotina-peroxidasa (ABC) o mediante técnicas de inmunofluorescencia tanto simples como dobles.

Las secciones histológicas se trataron con agua oxigenada ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) al 1% (v/v) en PBS durante 30 minutos con el fin de inactivar las peroxidasas endógenas que permanecen activas en el tejido, y de ese modo eliminar el posible marcado artefactual, cuando fueron procesados para la técnica inmunohistoquímica ABC.

Las secciones se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente en una solución que bloquea las uniones inespecíficas del anticuerpo secundario. Estas soluciones de bloqueo empleadas eran sueros del mismo animal en el que estaba hechos los anticuerpos secundarios, excepto para el secundario anti-cobaya hecho en asno que se empleó albúmina de suero

bovino (BSA). Los sueros utilizados para bloquear fueron suero normal de cabra, suero normal de conejo (Vector) y BSA al 4% en PBS con Tritón X-100 al 0,5% (PBS-Tx). El tritón tiene como objetivo permeabilizar el tejido. A continuación, los cortes se incubaron 24 horas a 4°C con el anticuerpo primario correspondiente a la concentración detallada en la tabla 3 diluido en PBS-Tx. Tras tres lavados de 5 minutos en PBS, se incubaron con los anticuerpos secundarios, bien conjugados con biotina o combinados con el fluorocromo correspondiente, preparados al 1:200 en PBS-Tx durante una hora a temperatura ambiente. Los cortes se volvieron a lavar en PBS (3x5 min). Los cortes procesados para inmunofluorescencia doble se incubaron con un cóctel de los sueros, anticuerpos primarios y secundarios correspondientes. En la tabla 5 se muestra un resumen de los sueros, anticuerpos primarios y secundarios empleados.

Las secciones que fueron procesadas por el método ABC se incubaron en oscuridad con el complejo ABC (Vectastain kit, Vector Laboratories) al 1:200 en PBS-Tx durante 1 hora a temperatura ambiente. Previo al revelado, se realizaron otros dos lavados en PBS, y uno en Trizma base-HCl 0,05M, pH 7,4 (Tris-HCl). Para poner de manifiesto el inmunomarcado las secciones se revelaron incubando en una solución recién preparada y filtrada que contenía el cromógeno 3',3'-Diaminobenzidina (DAB) al 0,05% (p/v) y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 0,01% (v/v) en Tris-HCl. La reacción se controló al microscopio y se detuvo mediante lavados en PBS (3x5 min) cuando se alcanzó una coloración marrón indicativa de la detección de estructuras inmunopositivas. A continuación los cortes se montaron en portaobjetos gelatinizados. Se dejaron secar al aire, se deshidrataron en una batería de etanoles de concentración creciente (50%, 70%, 80%, 96% y 100%) y se aclararon en xileno. Se cubrieron con resina DPX (Fluka Química) quedando de esta manera listos para su estudio.

Las secciones reveladas con fluorocromos se montaron sobre portaobjetos gelatinizados y se cubrieron con Vectashield (Vector Laboratories) empleado como medio de montaje para preservación de la fluorescencia.

**Tabla 5. Resumen de los sueros, anticuerpos primarios y secundarios empleados para el procesamiento mediante inmunohistoquímica.**

Solución de bloqueo	Anticuerpo primario	Anticuerpo secundario
Suero normal de conejo	Cabra anti-CTB	Conejo anti-cabra
Suero normal de cabra	Ratón anti-CB	Cabra anti-ratón
Suero normal de cabra	Conejo anti-CR	Cabra anti-conejo
Suero normal de cabra	Conejo anti-PV	Cabra anti-conejo
Suero normal de cabra	Conejo anti-GFAP	Cabra anti-conejo
Suero normal de cabra	Conejo anti-c-Fos	Cabra anti-conejo
BSA	Cobaya anti-VGluT1	Asno anti-cobaya

### 3.7. Técnica neurohistoquímica para el revelado de la biotín-dextranamina

La detección del BDA se hizo siguiendo un protocolo basado en la afinidad de la avidina por la biotina. Al igual que para la inmunohistoquímica el protocolo se realizó en cortes de tejido de 60  $\mu\text{m}$  en flotación en continua agitación.

En primer lugar, las secciones histológicas se lavaron en PBS (2x10 min) y se preincubaron con  $\text{H}_2\text{O}_2$  al 1% en PBS, durante 30 minutos para inactivar las peroxididasas endógenas. A continuación, los cortes se lavaron de nuevo (3x10 min) y se incubaron en el complejo ABC al 1:200 en PBS-Tx durante 24 horas a 4°C. Después de lavar los cortes (3x10 min), los 2 primeros lavados en PBS y el tercero en Tris-HCl, con el objetivo de poner de manifiesto el marcado anterógrado de BDA, las secciones se incubaron en la solución de revelado recién preparada y filtrada de DAB al 0,05% (p/v) y  $\text{H}_2\text{O}_2$  al 0,01% (v/v) en Tris-HCl durante 10 minutos. La reacción se detuvo lavando las secciones con PBS (3x5 min). Por último los cortes se montaron en portaobjetos gelatinizados, se dejaron secar, se deshidrataron y se cubrieron con resina DPX tal y como se ha indicado anteriormente.

### **3.8. Técnica de Nissl**

Esta tinción se utilizó para delimitar las áreas cerebrales objeto de estudio, como fueron los estratos superficiales del CS, proporcionando una panorámica general y exhaustiva de la distribución, tamaño y morfología de los somas neuronales, así como posibles efectos no deseados de las intervenciones como pueden ser roturas de tractos nerviosos o lesiones necróticas. Se usa un colorante acidófilo que se une al RNA, tiñendo por tanto, el núcleo, el nucleolo y los ribosomas del retículo endoplasmático rugoso.

Los cortes de tejido se montaron en portaobjetos gelatinizados y se dejaron secar a temperatura ambiente tras lo cual se sumergieron en xileno durante 20-60 minutos. El xileno desestabiliza los lípidos y permite la mejor penetración del tinte azul de toluidina. Seguidamente se rehidrataron pasándolos por una batería de etanoles de concentraciones decrecientes (100%, 96%, 86%, 70% y 50%) hasta H<sub>2</sub>O y se tiñeron durante 1 minuto en azul de toluidina al 1% (v/v) en H<sub>2</sub>O. A continuación se enjuagaron en H<sub>2</sub>O y se diferenciaron y deshidrataron en otra serie de etanoles de concentración creciente conteniendo ácido acético glacial al 0,5%, con excepción del etanol absoluto. Finalmente los cortes se aclararon en xileno durante 20 min y se cubrieron utilizando la resina sintética DPX.

### **3.9. Análisis de la expresión génica mediante qRT-PCR**

Los cambios en la expresión génica en la corteza visual (CV) tras la inyección de siRNAs frente a NgR y RhoA fueron analizados mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa a tiempo real cuantitativa (qRT-PCR). La qRT-PCR a tiempo real es el método más preciso, reproducible y específico para determinar la cantidad inicial de mRNA en una muestra. Consiste en la detección y cuantificación de un reportero fluorescente capaz de unirse al DNA, ya que la cantidad de producto generado durante cada ciclo de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), es directamente proporcional a la cantidad de mRNA que contiene la muestra antes de comenzar el proceso de PCR.

La PCR permite generar copias de un DNA plantilla de forma exponencial. Con el tiempo, la formación de producto final deja de ser exponencial, alcanzando un plato debido a diversos factores como la limitación de los sustratos, la inactividad térmica o inhibición de la enzima y la destrucción del producto final por la actividad exonucleasa (Kainz, 2000). Ésta es la principal razón por la que no se puede cuantificar de forma fiable la cantidad de mRNA a

tiempo fijo. Es sólo durante la fase exponencial, en la cual los productos de la PCR se acumulan “a tiempo real”, en la que es posible determinar la cantidad inicial del mRNA de la muestra. En esta fase se puede determinar un umbral de señal fluorescente en el cual todas las muestras pueden ser comparadas. Este umbral se define como el punto en el cual la fluorescencia generada es significativamente superior a la fluorescencia basal y el número de ciclos de PCR para alcanzar este umbral se conoce como ciclo umbral (Ct). Estos valores de Ct son directamente proporcionales a la cantidad de mRNA inicial y pueden ser expresados como un resultado cuantitativo interpolándolos en una recta estándar.

### 3.9.1. Diseño de cebadores

En este estudio, para los genes de interés, se ha utilizado como reportero fluorescente el SYBR Green (Applied Biosystems), capaz de unirse al DNA de doble cadena, y bajo excitación, emitir luz. Por tanto, a medida que se acumula el producto amplificado, la fluorescencia aumenta. Puesto que el SYBR Green puede unirse a cualquier DNA de doble cadena presente en la reacción incluyendo dímeros de cebadores y otros productos no específicos de la reacción, se puede producir una sobrestimación de la cantidad de mRNA de la muestra por lo que la especificidad de la PCR depende fundamentalmente de los cebadores empleados.

Mediante el programa informático Primer3 (Whitehead Institute for Biomedical Research, Cambridge, MD, USA) de cada gen de interés se diseñó un par de cebadores, uno sentido y otro antisentido, en base a las secuencias de mRNA de la especie *Rattus norvegicus* obtenidas de la base de datos de GenBank, que abarcaban una región a amplificar de 50 a 150 pares de bases. De cada pareja de cebadores, al menos uno se diseñó en una región de la secuencia comprendida entre dos exones diferentes, con el fin de evitar la amplificación de DNA genómico no deseada que podría interferir en la posterior interpretación de los resultados. La determinación de la pareja de cebadores más idónea se realizó en base a las siguientes características: longitud de bases de 15 a 25; contenido G/C entre 30 y 60%, últimos 5 nucleótidos del extremo 3' con no más de 2 bases G y/o C; temperatura de hibridación entre 58 y 60°C; complementariedad entre y dentro de cada cebador  $\leq 1$ . Además se comprobó su especificidad mediante el programa BLAST. En la tabla 6 se muestran la secuencias de los cebadores escogidos para cada gen de interés, especificándose el número de acceso correspondiente con la secuencia del Genbank y el tamaño del amplicón amplificado.

**Tabla 6. Cebadores diseñados para amplificar por qRT-PCR los transcritos de interés.**

Gen	N° acceso GenBank	Secuencia cebador	Tamaño amplicón
NgR	AF462390.1	S 5'-gcagtacctgcgactcaatg-3'	91
		AS 5'-tgaggaacctcggaacttct-3'	
RhoA	NM_057132.3	S 5'-gacgggaagcaggtagagtt-3'	89
		AS 5'-tcagtgtctggtaggagagag-3'	

\* S, secuencia sentido; AS, secuencia antisentido.

### 3.9.2. Extracción del RNA de la corteza visual

Bajo anestesia profunda, los animales fueron decapitados y las cortezas visuales fueron disecadas con la mayor brevedad posible para evitar al máximo la degradación del mRNA. El tejido se puso inmediatamente en tubos autoclavados libres de RNAasas de 1,5 ml que contenían 350 µl RNA later (Quiagen) y se les mantuvo en esta solución 24 horas a 4°C. Transcurrido este tiempo se procedió a la extracción del RNA mediante el RNeasy Mini Kit (Qiagen) siguiendo el protocolo determinado por el kit. Además en el protocolo seguido se incluyó un paso adicional de tratamiento con DNAasas para evitar cualquier posible amplificación de DNA genómico que pueda interferir en la interpretación de los resultados. Este procedimiento se llevó a cabo en un área de trabajo libre de RNAasas tratado con RNAasa ZAP (Ambion).

### 3.9.3. Retrotranscripción

Previamente a la obtención del DNA complementario (cDNA), se procedió a determinar la calidad y la concentración del RNA extraído. Para ello, la concentración, dada en ng/µl se midió en un Nanodrop conectado al programa informático NanoDrop 3.0.0. que además proporcionaba el ratio de la absorbancia  $\lambda_{260/280}$  indicativo de la pureza del RNA. Todas las muestras analizadas mostraron un ratio mayor de 1,8 indicando que presentaban una calidad adecuada. Además, mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%, se corrieron 2µl de cada muestra de RNA a un voltaje de 100 voltios pudiéndose observar dos bandas claras de RNA correspondientes al RNA 18s y 28s, verificando la adecuada calidad del proceso de



extracción de RNA. Como agente intercalante se empleo Syber Safe (Invitrogen) en una proporción de 1  $\mu$ l por cada 100 ml del volumen de gel preparado lo que permitió hacer visible estas bandas mediante un transiluminador de radiación ultravioleta.

Previo al ensayo de qRT-PCR se llevó a cabo la retrotranscripción del RNA a su cDNA por el enzima transcriptasa inversa, de manera que se pudo utilizar como DNA molde. Para la obtención del cDNA se empleó el kit SuperScript III Reverse Transcriptase (Invitrogen). El protocolo seguido fue el siguiente.

Primeramente se añadió por muestra en un tubo de PCR de 0,5 ml 11  $\mu$ l de RNA, 1  $\mu$ l de oligo (dT)<sub>20</sub> y 1  $\mu$ l de dNTP Mix 10 mM, se mezcló pipeteando y se calentó durante 5 min a 65°C mediante el termociclador (ICycler-BioRad). Inmediatamente después se incubó durante al menos 1 minuto en hielo. Se recolectó todo el volumen por breve centrifugación y se añadió 4  $\mu$ l del tampón First Strand 5X, 1  $\mu$ l de DTT 0,1 M, 1  $\mu$ l de RNase OUT Recombinant RNase Inhibitor y 1  $\mu$ l de SuperScript III RT. Se mezcló por pipeteo y se incubó durante 1 hora a 50 °C. La reacción se inactivó por calentamiento a 70°C durante 15 minutos. De ahí se obtuvo el cDNA que se conservó a -20°C hasta su uso posterior.

#### 3.9.4. Protocolo de qRT-PCR

El análisis de qRT-PCR se llevó a cabo para los 2 genes de interés, NgR y RhoA mediante la química de SYBR Green. Además, dado que no existe ningún gen invariable que pueda actuar como control endógeno universal, se analizó la expresión de 3 controles endógenos candidatos para la normalización de la expresión, el Tbp, el Hprt1 y el Ywhaz. La detección de los controles endógenos se ha basado en el empleo de cebadores y sondas de hidrólisis específicos para cada gen (IDT). Las sondas de hidrólisis son sondas de doble *quencher* (5'FAM/ZEN/3'IBFQ), que contienen dos *quenchers* no fluorescentes, uno interno (ZEN) y otro en el extremo 3' (IBFQ), lo que reduce la fluorescencia basal y aumenta la sensibilidad del ensayo. Se han empleado ensayos PrimeTime prediseñados (PrimeTime pre-designed qPCR Assays, IDT). Estos ensayos contienen en un mismo tubo la sonda y los cebadores específicos para el gen (Tabla 7).

**Tabla 7. Ensayos PrimeTime prediseñados (IDT) empleados para los controles endógenos.**

Gen	Nombre del ensayo	Nº acceso GenBank
Ywhaz	Rn.PT.45.8368619	NM_013011
Hprt1	Rn.PT.45.8035974	NM_012583
Tbp	Rn.PT.45.50978194	NM_001004198

La qRT-PCR fue llevada a cabo por el Servicio de Genómica de los Servicios Generales de Investigación de la UPV/EHU mediante el sistema 7900HT Fast Real Time PCR System (Applied Biosystems) en placas de 96 pocillos. El volumen total de reacción fue de 20 µl conteniendo 20 ng de cDNA. Se migraron triplicados por cada muestra y gen. Las amplificaciones de los genes de interés y los controles endógenos se realizaron de manera independiente.

#### *3.9.4.1. Protocolo de qRT-PCR para la detección del receptor de Nogo y RhoA mediante la química SYBR Green*

Para llevar a cabo la reacción se utilizó el kit Fast SYBR Master Mix (Applied Biosystems) empleando el modo Fast de Applied Biosystem. Las concentraciones de los cebadores de NgR y RhoA empleadas fueron de 900 nM y 300 nM para el cebador sentido y antisentido, respectivamente. El protocolo de PCR seguido fue el siguiente:

- Ciclo 1 (1X): 95°C 20 minutos
- Ciclo 2 (40X):
  - Paso 1: 95°C 1 segundos
  - Paso 2: 60°C 20 segundos
- Ciclo 3 (1X): Curva de disociación: 60°C-95°C

Como se ha comentado previamente, el SYBR Green es un fluorocromo inespecífico que se une a ácidos nucleicos de doble cadena, por lo que si hay dímeros de cebadores o amplificación de productos inespecíficos también se une y proporciona fluorescencia, lo que se suma a la fluorescencia total que detecta el equipo. La curva de disociación se llevó a cabo para el análisis de la especificidad de los cebadores empleados con el objetivo de determinar

la temperatura de desnaturalización de los productos amplificados. En los casos estudiados se obtuvo una curva con un solo pico lo que era indicativo de un único amplicón y, por tanto, de la adecuada especificidad de los cebadores. Además, en todas las reacciones se incluyeron controles negativos sin DNA para comprobar que los productos obtenidos fueron específicos.

#### ***3.9.4.2. Protocolo de qRT-PCR para los controles endógenos mediante sondas de hidrólisis***

Para la reacción se empleó el kit TaqMan Fast Advanced Master Mix (Applied Biosystems). Las concentraciones finales de los cebadores utilizadas fueron de 500 nM, y de la sonda de hidrólisis de 250 nM. Se empleó el modo Fast de Applied Biosystem. A continuación se muestra el protocolo de PCR seguido:

- Ciclo 1 (1X): 50°C 2 minutos (incubación de enzima UNG, incluida)
- Ciclo 2 (1X): 95°C 20 segundos
- Ciclo 3 (40X):
  - Paso 1: 95°C 1 segundos
  - Paso 2: 60°C 20 segundos

Como se ha comentado no existe ningún gen que pueda ser empleado como control endógeno universal. Mediante el algoritmo NormFinder se analizó la variabilidad en la expresión de los genes endógenos candidatos en las muestras estudiadas. Según este algoritmo la combinación de los dos endógenos más estables para nuestro estudio correspondió con los genes Ywhaz y Tbp, por lo que fueron los seleccionados para la normalización de los valores obtenidos de las muestras de interés.

#### **3.9.5. Análisis de los resultados de qRT-PCR**

Mediante el programa de análisis SDS 2.4 (Applied Biosystems) se representó gráficamente la fluorescencia normalizada respecto al ciclo. Para el análisis se fijaron dos parámetros, bien automáticamente o bien manualmente: la línea base en la que la fluorescencia es basal, es decir, no hay amplificación detectable, y el nivel umbral, en el que la fluorescencia supera significativamente la línea base. Al migrar cada muestra y gen por triplicado, se calculó para cada muestra el Ct promedio y su desviación estándar, que en todos los casos fue inferior a 0.5, por lo que se pudo tomar como válido el resultado. Para la cuantificación de la expresión absoluta se empleó el método de la curva estándar, para poder

hacer el cálculo de la eficiencia de la reacción a partir de los datos de la pendiente de la recta estándar. Junto a las muestras se migraron cinco muestras estándar que se corresponden con diluciones seriadas con un factor de dilución 1/5 de la muestra estándar. A partir de las cantidades y los Cts obtenidos para las muestras estándar se determinó una recta patrón, a partir de la cual se obtuvo la expresión absoluta de las muestras de estudio. Los valores obtenidos de cada muestra para cada gen de estudio se normalizaron respecto al valor de la media geométrica de los dos endógenos elegidos, el Ywhaz y el Tbp, para cada muestra, y a continuación se determinó el porcentaje de expresión respecto a la media del grupo control.

### **3.10. Inmunoensayo para la cuantificación de la proteína BDNF mediante ELISA**

#### **3.10.1. Extracción y cuantificación de proteínas totales**

Para determinar los cambios en la expresión de la proteína BDNF en las regiones cerebrales de interés tras la exposición a un campo magnético alterado se llevó a cabo la cuantificación de esta neurotrofina empleando para ello el kit BDNF Emax ImmunoAssay System (Promega), que permitió la medición del BDNF libre total mediante el ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA). Para ello, previamente se disecó el tejido a analizar y de inmediato se sumergió en isopentano enfriado a -80°C lo que permitió que el tejido se congelara al instante evitando así su degradación. Una vez se extrajo el tejido éste se conservó a -80°C hasta su posterior utilización.

Siguiendo las recomendaciones del kit, la extracción de proteínas total se realizó mediante la homogenización mecánica del tejido con el tampón de lisis compuesto por NaCl 137 mM, Trizma base-HCl, 20 mM, pH 8, Nonidet P40 al 1%, glicerol al 10%, fluoruro de fenilmetilsulfonilo 1 mM, 10 µg/ml de aprotinina, 1 µg/ml de leupeptina y vanadato sódico 0,5 mM en H<sub>2</sub>O<sub>d</sub>. El homogeneizado se centrifugó 1 minuto a 12.000 rpm, para retirar los restos de tejido.

Una vez extraída la fracción proteica se procedió a determinar su concentración mediante un protocolo basado en el método Bradford (Bradford, 1976), donde se cuantificaron los cambios de color del azul brillante Coomassie como respuesta a la concentración de proteínas presentes. La medida de la concentración se realizó en cubetas de poliestireno de espectrofotómetro de 1,5 ml (Semi-Micro Cuvettes, BioRad), añadiendo por cada muestra a analizar 800 µl de agua destilada, 1 µl de suspensión de proteína

correspondiente y 200 µl de reactivo de Bradford. Se realizó la medición de las absorbancias a  $\lambda$  595 nm en el espectrofotómetro (LanOptics). Previamente se determinó un blanco, que marcó la concentración 0 de proteína y como estándar, de concentración conocida, se utilizó BSA a una concentración de 1µg/µl. Conocida la concentración de proteínas totales ésta se igualó en todas las muestras para poder comparar los cambios de concentración de BDNF.

### **3.10.2. Protocolo para la cuantificación de la proteína de BDNF mediante ELISA**

El procedimiento para la cuantificación de los niveles de proteína de BDNF fue realizado siguiendo el protocolo determinado por el kit BDNF Emax ImmunoAssay System (Promega). En base a este protocolo los ensayos se llevaron a cabo en placas de poliestireno para ELISA de 96 pocillos (Nunc-Immuno Maxisorp). La lectura de la placa fue llevada a cabo mediante un equipo de ELISA (Multiskan Ex, Thermo Electron Corporation) con el programa informático Ascent Software for Multiskan versión 2.6., a una absorbancia de 450 nm. En cada ensayo cada muestra se analizó por duplicado. Las concentraciones de BDNF (ng/µg de proteína total) se determinaron a partir de una recta patrón de concentración conocida.

### **3.11. Examen del material histológico**

El examen de los cortes y la documentación fotográfica se realizaron en un microscopio de luz transmitida Optiphot-2 (Nikon) equipado con fluorescencia, bajo diferentes aumentos (4x, 10x, 20x, 40x y 100x) acoplado a un sistema de microfotografía digital Nikon Digital Camera DMX 1200F mediante el programa informático ACT-1. Todas las imágenes se digitalizaron bajo la misma apertura de diafragma e iluminación.

Para el análisis de los cortes histológicos con inmunofluorescencia doble se obtuvieron imágenes de planos focales con un microscopio láser confocal LEICA LCS SP2 AOBs usando láseres de 488 nm y 594 nm mediante el programa informático Leica Confocal Software.

Los campos terminales corticocoliculares marcadas con BDA se dibujaron a cámara clara (Nikon 350x) bajo un objetivo de 10x. Asimismo los lugares de inyección en la CV1 y los lugares de proyección visual corticocolicular se delimitaron en dibujos a cámara clara de las secciones coronales objeto de estudio bajo un objetivo de 4x. A partir de estos dibujos se

hicieron reconstrucciones dorsales representando los lugares de inyección sobre mapas de la corteza cerebral (Zilles, 1985) y los de proyección sobre una vista dorsal del CS. Los dibujos a cámara clara y las reconstrucciones fueron digitalizados usando un escáner Perfection 3200 (Epson). Los contornos de los dibujos se perfilaron mediante el programa informático Freehand 10.

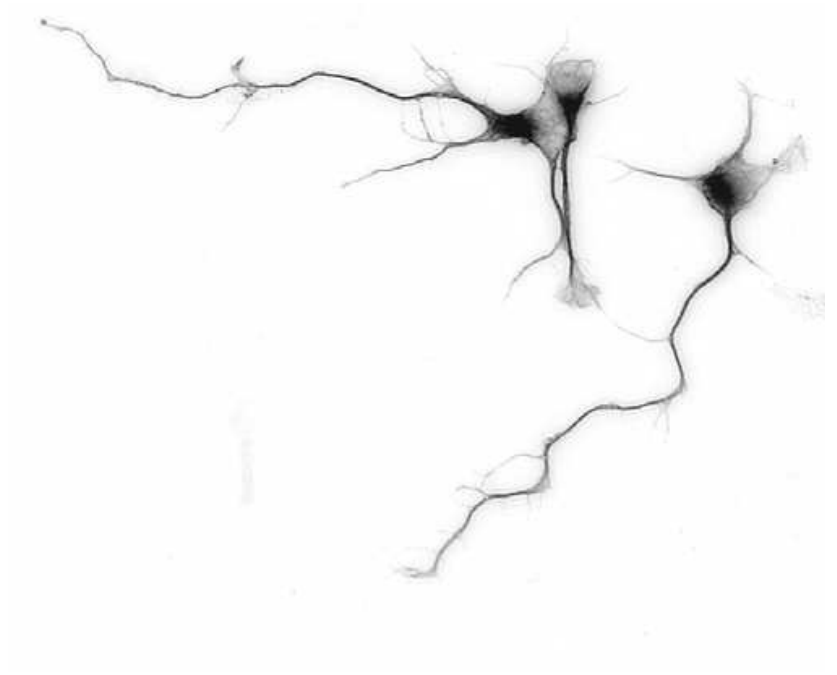
La delimitación e identificación de las diferentes áreas cerebrales estudiadas se realizó mediante la tinción de Nissl y con ayuda de los atlas de cerebro de rata de Swanson (1996).

Las figuras presentadas en este trabajo se procesaron y subtitularon digitalmente con el programa Adobe PhotoShop CS. El tratamiento tan sólo incluyó modificaciones del tamaño y/o la resolución, así como los ajustes necesarios de brillo y contraste para mejorar la calidad de las mismas.

### **3.12. Análisis estadístico**

Las células c-Fos inmunopositivas se contaron bajo un objetivo de 20x usando el programa informático Soft Imaging System AnaliSYS 2.11 (IZAES). Se determinó la densidad de células c-Fos inmunopositivas por  $\text{mm}^2$  a tres niveles rostrocaudales del CS (6; 6,7 y 7,3 mm caudal a Bregma) en el estrato gris superficial y en el estrato óptico en cada condición experimental. El análisis estadístico se llevó a cabo con los valores de densidad promedio obtenidos para cada estrato.

Los diferentes análisis estadísticos se llevaron a cabo mediante el programa informático GraphPad Prism 4. Se realizaron ANOVAs de 2 vías entre los diferentes condiciones experimentales. Los análisis *post hoc* para contrastar comparaciones múltiples se efectuaron mediante el test de Bonferroni. En todos los casos el nivel mínimo de significación se fijó en el 95%, es decir,  $p < 0,05$ . En este sentido, los niveles de significación estadística se indicaron como  $p < 0,05$  (\*);  $p < 0,01$  (\*\*) y  $p < 0,001$  (\*\*\*). Los valores en las tablas y gráficas estadísticas se expresaron como valores promedios  $\pm$  error típico estándar (SEM).



## **4. RESULTADOS**





## **4. RESULTADOS**

### **4.1. Organización del campo terminal retinocolicular en animales adultos tras lesiones del sistema visual**

El estudio de la organización de los campos terminales de la conexión retinocolicular en ratas adultas se llevó a cabo mediante la microinyección de la subunidad B de la toxina colérica (CTB) como trazador anterógrado en el humor vítreo del ojo. Las proyecciones al colículo superior (CS) provenientes de la retina muestran un patrón topográfico en el que los axones de las células ganglionares localizados en cada uno de los cuadrantes de la retina alcanzan un determinado sector en el CS (Siminoff et al., 1966). En este estudio y debido a que la inyección del trazador se realizó en el humor vítreo del globo ocular, potencialmente todas las células ganglionares de la retina pudieron captar el trazador de modo que los campos terminales retinocoliculares ocupaban la práctica totalidad de la superficie colicular presentando un marcado correspondiente a la totalidad de los axones retinianos. Así, en este estudio se han analizado tanto la conexión al CS ipsilateral como al contralateral respecto al ojo donde se inyectó el trazador.

#### **4.1.1. Animales control**

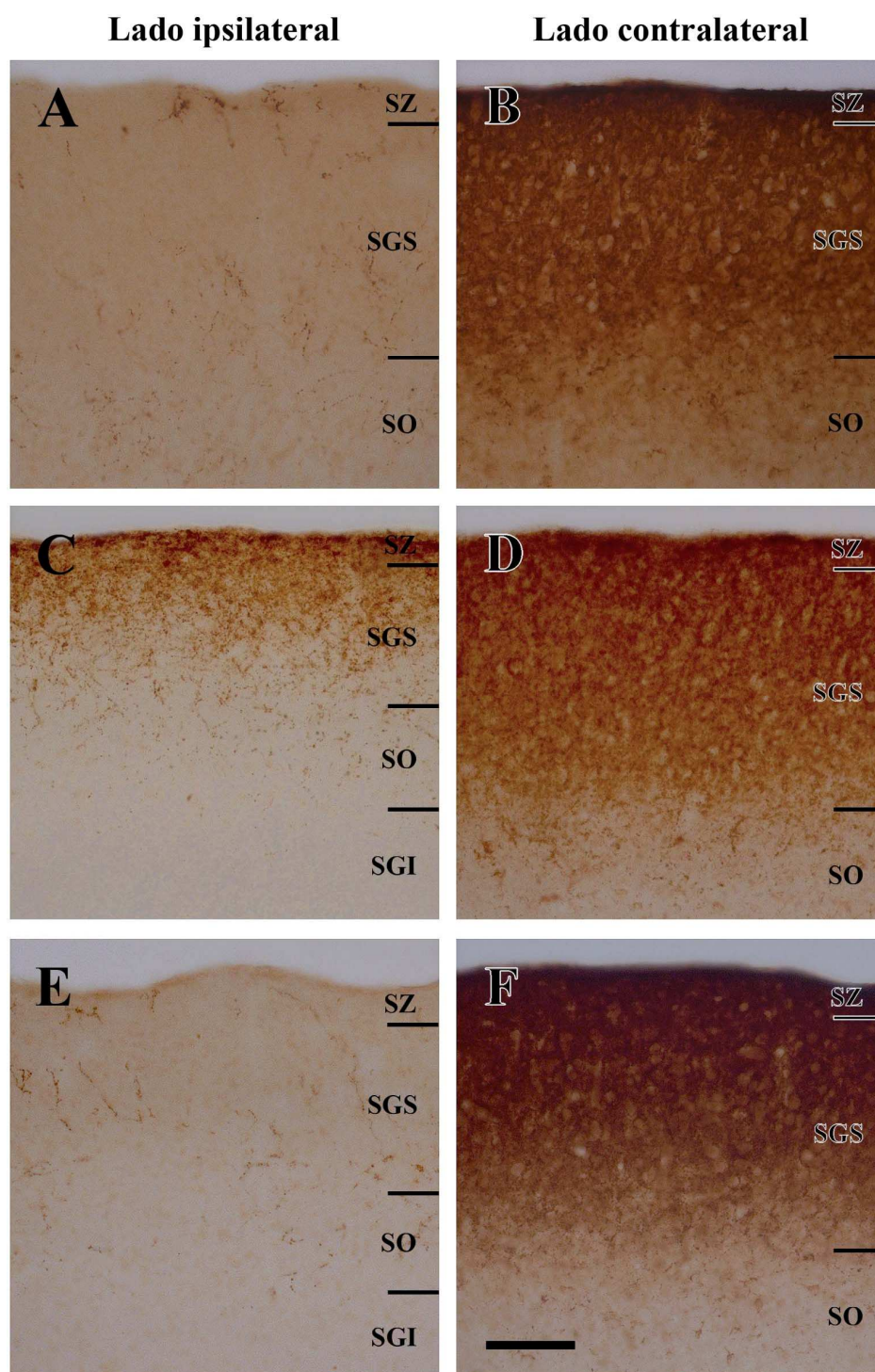
El campo terminal retinocolicular proveniente de la retina ipsilateral presentó una escasa inervación, principalmente localizada en la región anteromedial de los estratos superficiales del CS. Se observaron sólo algunos fragmentos cortos de fibras con botones sinápticos dispersos en el estrato óptico (SO) y en la región ventral del estrato gris superficial (SGS). En el estrato zonal (SZ) se vieron también fibras marcadas de pequeña longitud orientadas perpendicularmente a la superficie pial (Fig. 1A, 2A). Por el contrario, la conexión retinocolicular contralateral en ratas control abarcó la totalidad de los estratos superficiales del CS con una intensidad homogénea de marcado tanto en el eje rostrocaudal como lateromedial. La máxima densidad de inervación se observó en el SGS, en el que se marcaban numerosos botones sinápticos formando redes perineuronales, mientras que en el SO, los botones sinápticos marcados aparecían dispuestos de manera más dispersa (Fig. 1B, 2B).

#### **4.1.2. Animales sometidos a desaferenciación retiniana neonatal**

Trabajos previos han descrito que la desaferenciación retiniana neonatal da lugar a la aparición de una proyección retinocolicular ipsilateral aberrante (Chow et al., 1973; Lund et al., 1980; Insausti et al., 1985; Ostrach et al., 1986; Chan y Jen, 1988). Con el fin de confirmar la respuesta plástica de la conexión retinocolicular tras lesiones visuales en edades tempranas se llevó a cabo la desaferenciación retiniana neonatal unilateral. Una vez que las ratas alcanzaron la edad adulta se procedió a la administración del trazador CTB en el globo ocular intacto. Tal y como habían descrito dichos autores, como consecuencia de la enucleación neonatal el marcado de la proyección ipsilateral se vio notablemente incrementada comparándola con la observada en los animales control. Tanto el SO, y de forma más notable el SGS, presentaron una intensidad de inervación mucho mayor que los estratos superficiales ipsilaterales de animales control. Esta proyección se mostró en forma de abundantes botones sinápticos que abarcaban desde las regiones más dorsales del SO hasta el SZ, aumentando la densidad de marcado en sentido ventrodorsal (Fig. 1C). Por el contrario, la enucleación neonatal no provocó alteraciones en la conexión retinocolicular contralateral. La organización del campo terminal era similar al de los animales control ya que también se observaba una densa red de botones sinápticos rodeando los cuerpos celulares en el SO, y de manera más notable en el SGS (Fig. 1D).

#### **4.1.3. Animales sometidos a desaferenciación retiniana en fase adulta**

Para estudiar las posibles diferencias en la respuesta plástica de la conexión retinocolicular cuando la lesión se producía en animales adultos, se inyectó el trazador CTB en el humor vítreo del ojo intacto de animales adultos 45 días después de llevar a cabo la desaferenciación retiniana. Los resultados mostraron que la conexión ipsilateral difería con respecto a los animales desaferenciados neonatalmente, ya que la lesión practicada en ratas adultas no dio lugar a un incremento de esta proyección, como sucedía en las ratas lesionadas neonatalmente. En los animales enucleados en edad adulta el patrón de marcado era similar al encontrado en las ratas control. Se apreciaron pequeños fragmentos de fibras en el SO mientras que en el SGS se observaron fragmentos de fibras de longitudes variables dispuestos de forma dispersa, algunos con pequeñas ramificaciones, y orientados hacia la superficie pial (Fig. 1E). Tal y como ocurría en las ratas sometidas a desaferenciación visual neonatal, la conexión contralateral no se vio afectada por la lesión (Fig. 1F).



**Fig. 1. Organización de los campos terminales retinocoliculares ipsi- y contralaterales de ratas adultas sometidas a desafereñación retiniana.** Los estratos superficiales ipsilaterales al lugar de inyección en ratas control se muestran levemente inervados (A), mientras que la inervación procedente de la retina contralateral es intensa en los estratos visuales, y más notablemente en el SGS (B). En los animales sometidos a desafereñación retiniana neonatal se observa un incremento notable de la proyección ipsilateral abarcando desde la mitad superior del SO y aumentando su intensidad en sentido ventrodorsal (C), mientras que la conexión contralateral no se vio afectada (D). Por el contrario, los animales desafereñados en fase adulta presentan un patrón de organización del campo terminal retinocoliculaire similar al de los animales control tanto en el lado ipsilateral (E), como en el contralateral (F). SZ, estrato zonal; SGS, estrato gris superficial; SO, estrato óptico; SGI, estrato gris intermedio. Barra de escala: 100  $\mu$ m.

#### 4.1.4. Animales sometidos a ablación del colículo superior neonatal

En animales adultos sometidos a la ablación del CS en periodo neonatal se observó que había tenido lugar la regeneración de sus estratos hasta alcanzar un aspecto comparable a las ratas adultas sin lesionar. Observada la elevada capacidad de regeneración de los estratos superficiales del CS lesionado neonatalmente analizamos las posibles alteraciones en las conexiones retinocoliculares. Para ello, la administración del trazador en el ojo contralateral al CS lesionado se llevó a cabo una vez habían alcanzado la edad adulta y las conexiones ya estaban establecidas.

El campo terminal del CS intacto, ipsilateral al ojo inyectado, apenas presentó alteraciones respecto a los controles. Se observaron pequeños fragmentos de fibras con botones sinápticos de tamaño variable dispersos principalmente en la región más dorsal del SO y en el SGS (Fig. 2C).

A pesar de la lesión practicada, el CS, no sólo mostró una notable capacidad de regeneración, sino que además se mantuvo la conectividad procedente de la retina contralateral, aunque la organización del campo terminal sufrió una profunda alteración. La inervación de los estratos superficiales se vio disminuida. En la mitad dorsal del SO del CS dañado se observaron numerosas fibras que discurrían oblicuamente hacia la región ventral del SGS. En la mitad inferior del SO se marcaron fibras de tamaño pequeño, algunas ligeramente ramificadas y con abundantes botones sinápticos. El mayor descenso de inervación se localizó principalmente en el SGS y en el SZ, regiones más intensamente inervadas en los animales control. Como se ha comentado anteriormente, el SGS de los animales control presentaba abundantes botones sinápticos formando redes perineuronales, sin embargo, en el CS lesionado los botones sinápticos, aunque seguían siendo numerosos, perdieron su disposición alrededor de los cuerpos celulares. Además, en estos animales el estrato gris intermedio (SGI), en condiciones normales no inervado por aferencias de la retina, presentaba pequeños fragmentos de fibras con una orientación perpendicular a la superficie pial (Fig. 2D).

#### 4.1.5. Animales sometidos a ablación del colículo superior y a desaferenciación retiniana neonatal

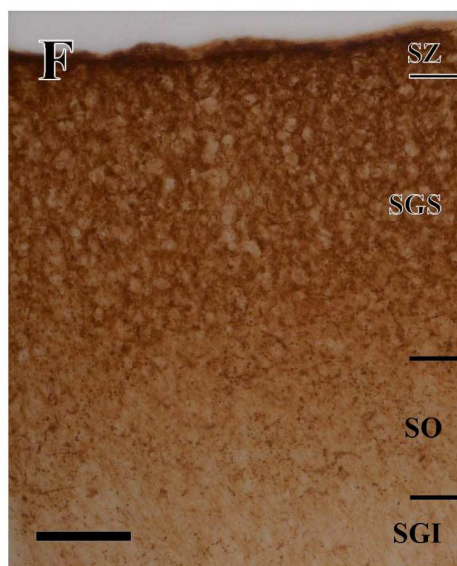
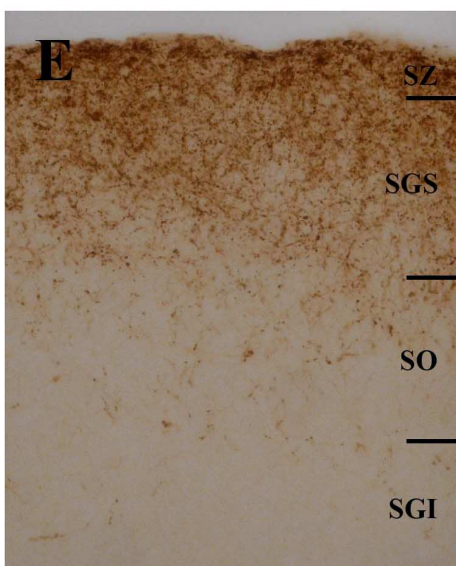
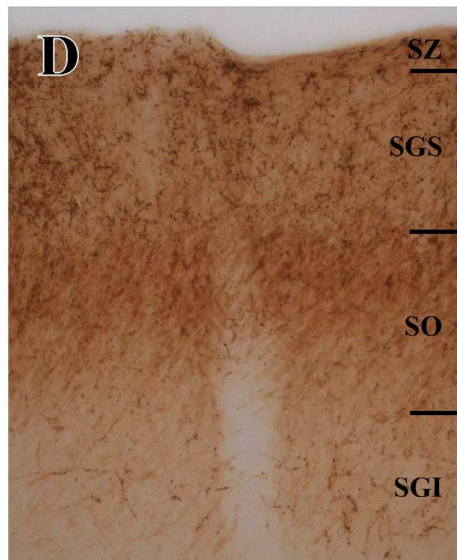
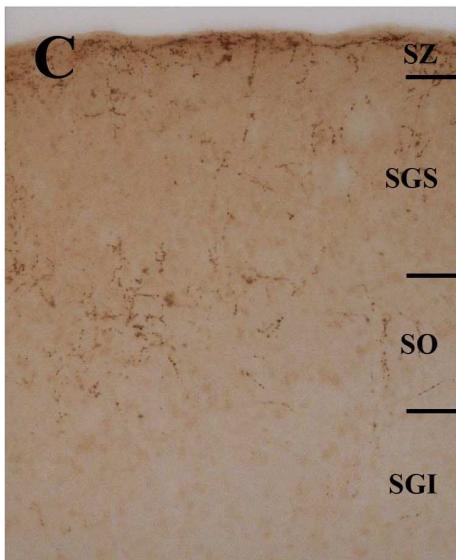
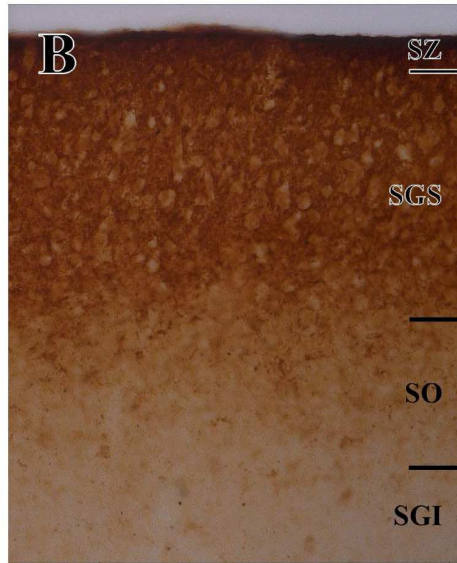
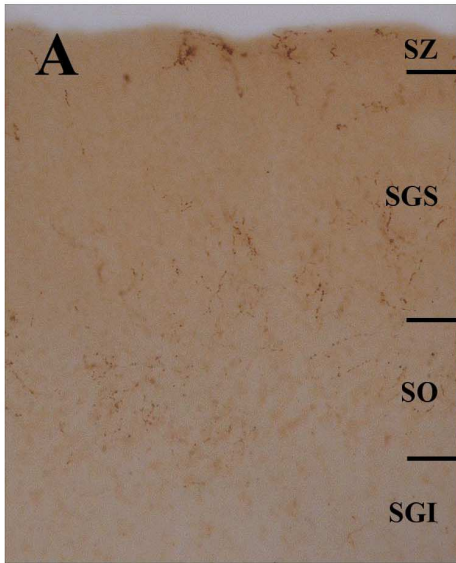
Por último en este trabajo se analizó el efecto de la combinación de los dos tipos de lesiones visuales anteriormente descritas sobre la conexión retinocolicular. Para ello, se llevó a cabo a ablación del CS junto con la enucleación del ojo contralateral en animales neonatos y cuando los animales alcanzaron la edad adulta se procedió a la inyección del trazador CTB en el globo ocular ipsilateral al CS lesionado.

Al igual que en la situación experimental anteriormente descrita, la ablación del CS junto con la enucleación practicadas neonatalmente no impidió el mantenimiento de la conexión retinocolicular en la rata adulta. El efecto conjunto de ambas lesiones dio lugar a un cambio drástico en el patrón del campo terminal ipsilateral observándose una proyección similar a la apreciada en los casos en los que se les había practicado la enucleación neonatal. En estos animales también se observaron numerosos botones sinápticos con una densidad incluso mayor que en los animales sometidos sólo a enucleación neonatal, formando cestas perineuronales desde la regiones más dorsales del SO hasta la superficie pial, con la máxima densidad en la región dorsal de SGS y en el SZ. También fueron encontrados pequeños fragmentos de fibras dispersos en el SO y en el SGS (Fig. 2E). Contrariamente, la inervación de los estratos superficiales del CS contralateral no presentó cambios respecto a las ratas control, observándose numerosos botones sinápticos con disposición perineuronal en el SO, y mas densamente en el SGS. Sin embargo, el SGI que en condiciones normales no recibe proyecciones directas de la retina, se encontraba ligeramente inervado, apareciendo botones sinápticos y fibras dispersas de pequeño tamaño (Fig. 2F).

**Fig. 2. Organización de los campos terminales retinocolicular ipsi- y contralateral de ratas adultas sometidas a ablación neonatal del colículo superior sola o combinada con la desaferenciación retiniana neonatal del ojo contralateral.** Conexión retinocolicular ipsi- (A) y contralateral (B) en ratas control. Tras la ablación neonatal del CS, la proyección retinocolicular ipsilateral, correspondiente con el CS no dañado, apenas se muestra alterada (C), mientras que la contralateral se ve notablemente alterada respecto a los controles (D). Se observa una disminución de la inervación en los estratos superficiales, y de forma más notoria en el SGS. Además destacan las fibras dispuestas oblicuamente en la mitad dorsal del SO, características de las aferencias de la retina, y la inervación del SGI (D). Como resultado de ambas lesiones la conexión ipsilateral se ve incrementada, sobre todo en el SGS (E), en cambio, la contralateral es similar a la de los controles en los estratos superficiales, sin embargo, a diferencia de los controles el SGI se muestra inervado (F). SZ, estrato zonal; SGS, estrato gris superficial; SO, estrato óptico; SGI, estrato gris intermedio. Barra de escala: 100  $\mu$ m.

**Lado ipsilateral**

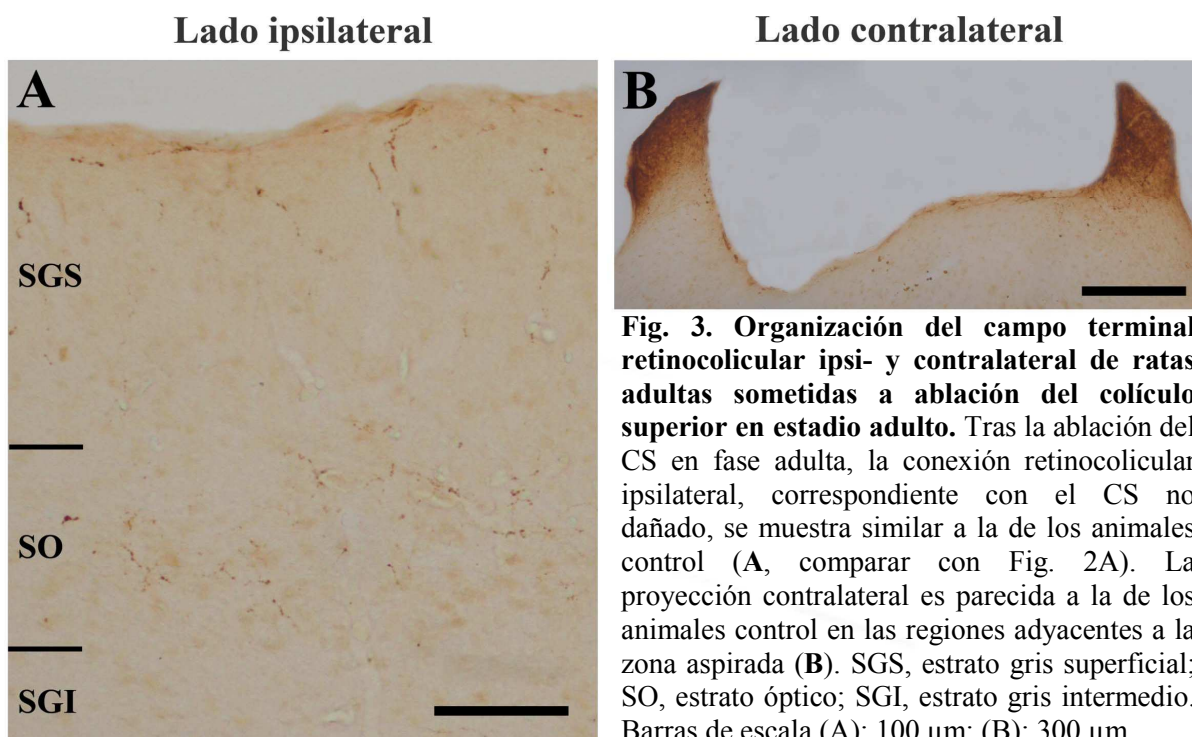
**Lado contralateral**



#### 4.1.6. Animales sometidos a ablación del colículo superior en fase adulta

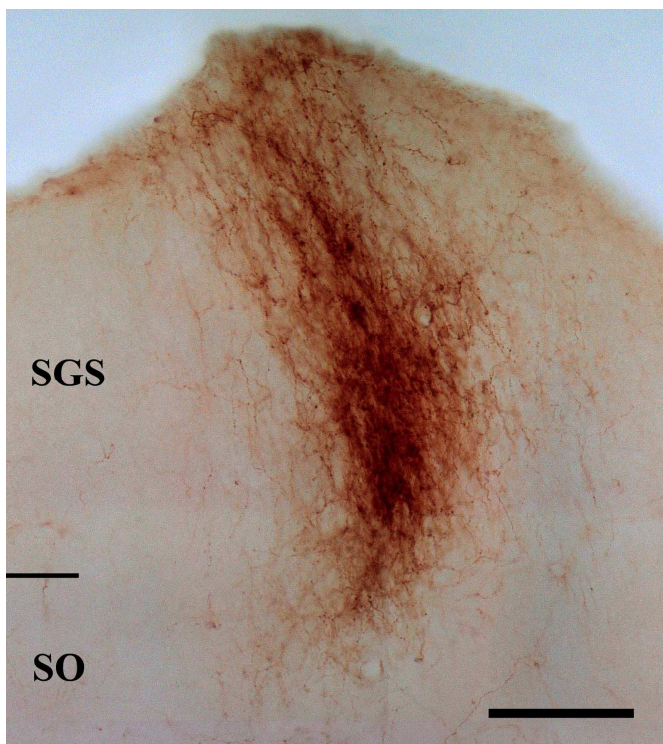
Para analizar la capacidad de regeneración y reorganización de la conexión retinocolicular tras la ablación del CS en edad adulta 45 días después de practicar la lesión se llevó a cabo la microinyección del trazador en el humor vítreo del ojo contralateral al CS lesionado.

En la conexión retinocolicular ipsilateral no se encontraron variaciones respecto a los animales control (Fig. 3A). Sin embargo, al contrario de lo sucedido en ratas con ablación del CS en periodo neonatal, esta lesión practicada en animales adultos generó un daño permanente, no observándose regeneración estructural de la zona aspirada, de modo que la ausencia de los estratos superficiales provocada por la aspiración impidió el establecimiento del campo terminal retinocolicular contralateral. Sólo en los casos en los que la aspiración de los estratos superficiales no había sido completa se pudo observar dicha conexión. En estos casos la proyección remanente se asemejaba a la encontrada en los animales control (Fig. 3B).



#### 4.2. Organización del campo terminal corticocolicular visual en animales adultos sometidos a ablación del colículo superior neonatal

Dado que tras la ablación neonatal del CS en el animal adulto observamos una regeneración casi total de los estratos superficiales, y que estos estratos mostraron un mantenimiento en la conexión retinocolicular nos planteamos analizar en qué medida esta lesión afectaría a la conexión que desde la corteza visual primaria (CV1) ipsilateral alcanza el CS. Para ello, se inyectó el trazador anterógrado biotín-dextranamina (BDA) 10000 en la CV1 de ratas adultas sometidas a ablación del CS en fase neonatal. Al comparar los resultados obtenidos en estos casos con los obtenidos previamente en nuestro grupo de investigación en animales control (García del Caño et al., 2002) observamos que la organización del campo terminal apenas difería de lo encontrado en los animales control, apreciándose la disposición columnar característica de este campo terminal (Fig. 4).



**Fig. 4. Organización del campo terminal corticocolicular visual de ratas adultas sometidas a ablación neonatal del colículo superior.** La conexión corticocolicular visual en estos casos presenta la disposición columnar y la distribución de fibras características de los animales control. SGS, estrato gris superficial; SO, estrato óptico. Barra de escala: 100  $\mu$ m.



### **4.3. Patrón de expresión de proteínas ligantes de calcio y de GFAP en los estratos superficiales del colículo superior de animales adultos sometidos a lesiones neonatales del sistema visual**

Trabajos previos desarrollados en nuestro laboratorio mostraron que la desaferenciación retiniana neonatal origina un cambio en el patrón de expresión de las proteínas ligantes de calcio, calbindina (CB), calretinina (CR) y parvalbúmina (PV), en el CS (Gerrickagoitia, 1998). Teniendo en cuenta estos antecedentes decidimos estudiar el efecto de la ablación neonatal del CS en el patrón de expresión de la CB, CR y PV en los estratos superficiales coliculares dañados neonatalmente de ratas adultas, así como el efecto de esta lesión unida a la enucleación neonatal del ojo contralateral. Además, analizamos las posibles alteraciones en la población astrogliar de animales adultos como consecuencia de estas lesiones practicadas neonatalmente. Para este fin llevamos a cabo la detección inmunohistoquímica de la proteína ácida fibrilar glial (GFAP), ampliamente empleada como marcador de astrocitos.

#### **4.3.1. Cambios en el patrón de expresión de la calbindina**

El análisis inmunohistoquímico de la expresión de la proteína ligante de calcio CB en los estratos superficiales del CS de ratas control mostró un patrón definido en todos los casos analizados. La característica más destacable fue la presencia de dos bandas claramente definidas. Una de las bandas se encontraba situada ocupando la totalidad del SO y presentaba células de tamaño medio-grande intensamente teñidas, muchas de las cuales mostraban un marcado intenso de las porciones proximales de sus dendritas, rodeadas por una compleja red de fibras. En la otra banda, localizada en la región media del SGS, se observaban células de tamaño más pequeño y de aspecto fusiforme orientadas perpendicularmente a la superficie pial. Además, en las regiones más dorsales del SGS se vieron células de pequeño tamaño con una distribución más aislada (Fig. 5A).

La ablación del CS en animales neonatos dio lugar a una leve reestructuración en el patrón de expresión de la CB en los estratos superficiales del CS. En el SO el inmunomarcado presentó una distribución similar a la observada en ratas control con células de mediano tamaño fuertemente teñidas inmersas en una densa red fibrilar. Sin embargo, en el SGS, a diferencia de los animales control, las células marcadas presentaban una apariencia más

redondeada y su disposición en banda no se mostraba tan definida (Fig. 5B). Como consecuencia de la doble lesión, la ablación del CS junto con la desaferenciación retiniana contralateral, la expresión de la CB mostró una alteración más evidente en el CS lesionado neonatalmente. Aunque el inmunomarcado de las células definidas en una sola banda abarcando la totalidad del SO se mantuvo, la densidad de neuropilo teñido en esta región se vio disminuida. En el SGS el patrón de expresión también varió, observándose un mayor número de cuerpos celulares de pequeño tamaño y de aspecto redondeado en la mitad superior de dicho estrato (Fig. 5C).

#### **4.3.2. Cambios en el patrón de expresión de la calretinina**

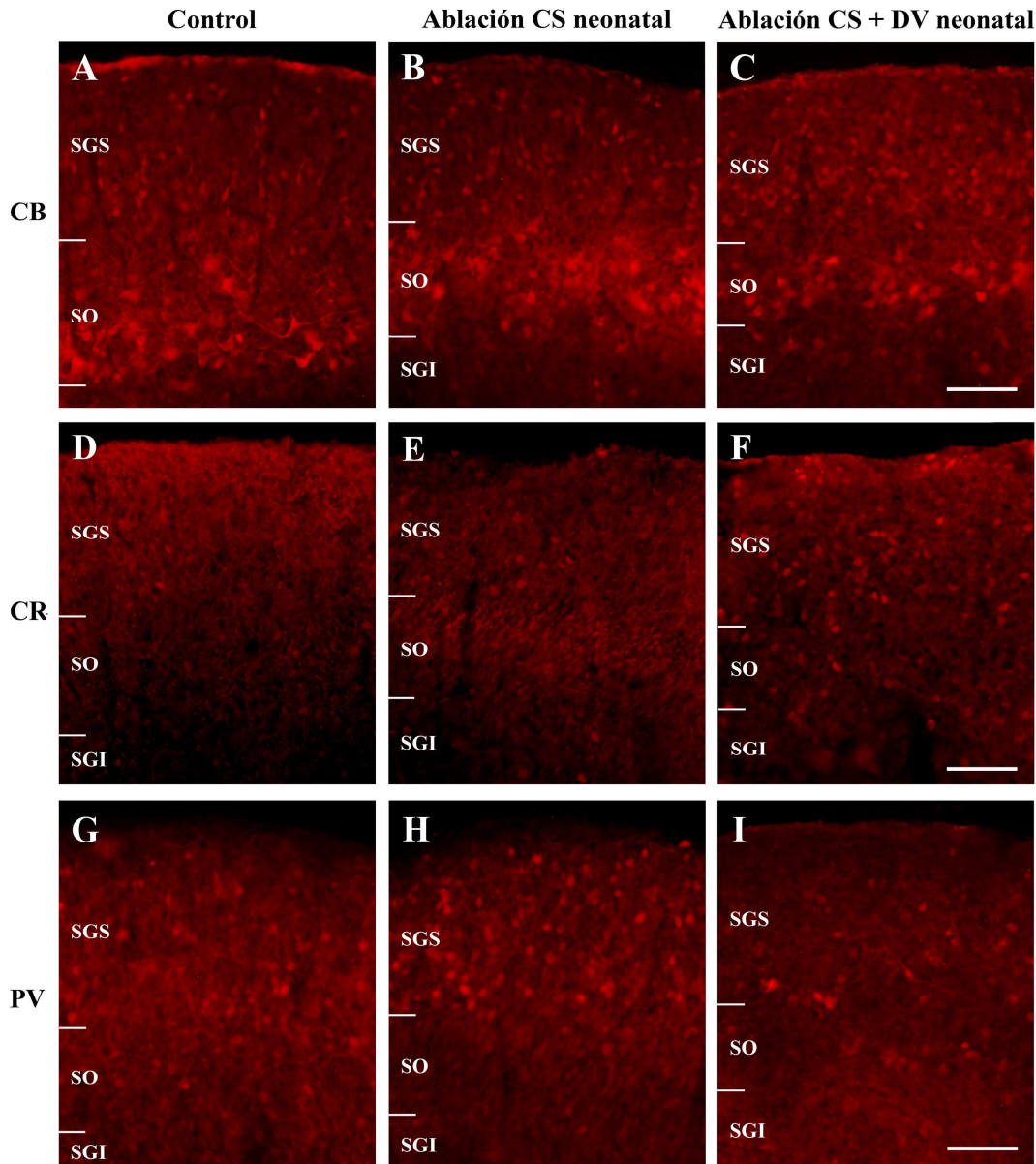
El patrón en la distribución de la CR se vio intensamente alterado tras las lesiones en el sistema visual llevadas a cabo neonatalmente. En las ratas control el neuropilo se mostraba intensamente teñido en los estratos superficiales del CS con un gradiente en aumento en sentido ventrodorsal, no apreciándose la presencia de cuerpos celulares teñidos (Fig. 5D).

La ablación del CS en fase neonatal provocó grandes cambios en la disposición de las estructuras inmunopositivas para la CR. El SO presentaba un marcado de fibras más intenso que en las ratas control. Estas fibras mostraban una disposición oblicua a la superficie colicular característica de los axones que llegan desde la retina al CS. A su vez, en el SGS el neuropilo sufrió una fuerte disminución en la intensidad del marcado, mientras que se observaron células de tamaño medio dispersas a lo largo de este estrato (Fig. 5E). En animales sometidos a desaferenciación visual y ablación colicular neonatalmente la expresión de la CR también se vio profundamente modificada, observándose una gran inmunopositividad de cuerpos celulares de tamaño pequeño en el SO, y más notablemente en el SGS, todos ellos inmersos en una red de fibras débilmente teñidas (Fig. 5F).

#### **4.3.3. Cambios en el patrón de expresión de la parvalbúmina**

La expresión de la proteína ligante de calcio PV también se vio alterada en el CS de animales adultos como consecuencia de las lesiones neonatales practicadas en el sistema visual. En los estratos visuales del CS de animales ilesos se observaron células inmunopositivas de tamaño medio en el SO, y más abundantemente en el SGS. Además, estas células estaban rodeadas por una intensa red de neuropilo y de manera más notoria en la mitad ventral del SGS. En la región más próxima a la superficie pial apenas se observó

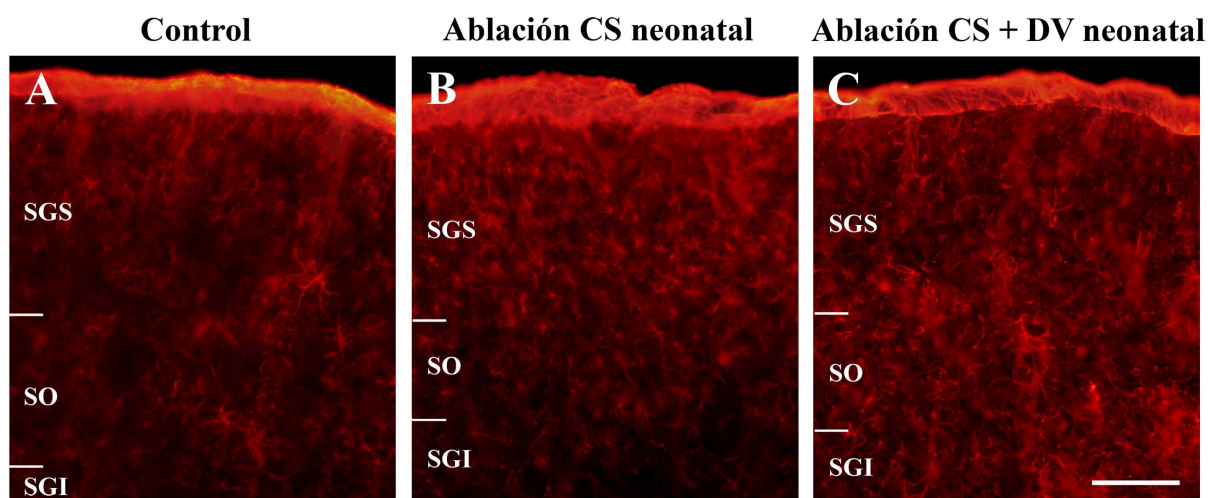
inmunorreactividad (Fig. 5G). A diferencia de lo que ocurría en los animales control, en los animales sometidos a ablación neonatal del CS, el SO presentaba un menor número de células inmunorreactivas, sin embargo, en el SGS aumentaba la densidad celular teñida. En este estrato el neuropilo seguía mostrándose intensamente teñido mientras que en el SO su marcado disminuyó ligeramente (Fig. 5H). Como consecuencia de la desaferenciación retiniana junto con la ablación del CS contralateral el patrón de expresión de la PV se encontraba también notablemente alterado. Los estratos superficiales del CS sufrieron una disminución drástica del marcado tanto del neuropilo como de cuerpos celulares, mostrando sólo alguna célula positiva de tamaño y morfología dispar en el SGS, principalmente en su mitad ventral (Fig. 5I).



**Fig. 5.** Cambios en el patrón de expresión de la calbindina, la calretinina y la parvalbúmina en ratas adultas sometidas a ablación neonatal del colículo superior sólo o combinada con la desafereñación retiniana neonatal del ojo contralateral. Se observan dos bandas definidas de células CB positivas, una de cuerpos celulares de tamaño medio-grande en el SO y otra de células más pequeñas de aspecto fusiforme en la región media del SGS (A). Tras la ablación del CS sólo (B) o junto con la desafereñación retiniana neonatal (C) en el SGS se desorganiza la banda y las células adquieren un aspecto más redondeado. En las ratas con ambas lesiones se observa la disminución de la densidad de neuropilo teñido. El patrón de expresión de la CR se ve profundamente alterado como consecuencia de las lesiones. En animales control se observa el neuropilo intensamente teñido (D), mientras que en los lesionados la intensidad se ve disminuida. Tras la ablación del CS destacan las fibras dispuestas oblicuamente en el SO y la aparición de algunos cuerpos celulares en el SGS (E). El efecto conjunto de ambas lesiones provocó un incremento notable de células CR positivas (F). Se observan células PV positivas en los estratos superficiales de los controles inmersas en una red de neuropilo (G). Tras ablación neonatal se observa una disminución de células teñidas y del neuropilo marcado en el SO, y un aumento de cuerpos celulares PV positivos en el SGS (H). La ablación colicular combinada con la enucleación neonatal da lugar a una reducción del marcado celular y del neuropilo PV positivo (I). CB, calbindina; CR, calretinina; PV, parvalbúmina; CS, colículo superior; DV, desafereñación visual; SGS, estrato gris superficial; SO, estrato óptico; SGI, estrato gris intermedio. Barra de escala: 100  $\mu$ m.

#### 4.3.4. Cambios en el patrón de expresión de GFAP

En animales control se observó un moderado número de células astrogiales GFAP positivas de tamaño medio dispersas en los estratos superficiales del CS (Fig. 6A). Como consecuencia de la ablación neonatal del CS el número de astrocitos marcados en los estratos superficiales coliculares aumentó notablemente aunque éstos eran de menor tamaño que los observados en los controles. Este incremento presentaba un gradiente de orden creciente en sentido ventrodorsal, de modo que la mayor densidad de células marcadas se localizaba próxima a la superficie pial. La morfología de las células gliales teñidas parecía indicar que se trataba de astrocitos reactivos como consecuencia de la lesión neonatal (Fig. 6B). Cuando se llevaron a cabo la ablación colicular combinada con la desaferenciación retiniana neonatal contralateral también se observó un aumento de astrocitos teñidos aunque de mayor tamaño y con una disposición diferente a la observada en los casos sometidos sólo a ablación del CS, ya que en los animales con doble lesión el incremento de astrocitos GFAP positivos era constante tanto en el SO como en el SGS (Fig. 6C).



**Fig. 6. Cambios en el patrón de expresión de la GFAP en ratas adultas sometidas a ablación neonatal del colículo superior sólo o combinada con la desaferenciación retiniana neonatal del ojo contralateral.** Los animales control mostraron astrocitos GFAP positivos de tamaño medio dispersos por los estratos superficiales coliculares (A). Se muestra un incremento de astrocitos teñidos de pequeño tamaño con un gradiente en aumento en sentido ventrodorsal como consecuencia de la ablación del CS neonatal (B). Como resultado de ambas lesiones se observa un aumento de astrocitos teñidos de tamaño medio-grande en los estratos superficiales coliculares (C). CS, colículo superior; DV, desaferenciación visual; SGS, estrato gris superficial; SO, estrato óptico; SGI, estrato gris intermedio. Barra de escala: 100  $\mu$ m.

#### **4.4. Organización del campo terminal corticocolicular visual tras diferentes estrategias para promover la plasticidad en animales sometidos a desaferenciación retiniana en fase adulta**

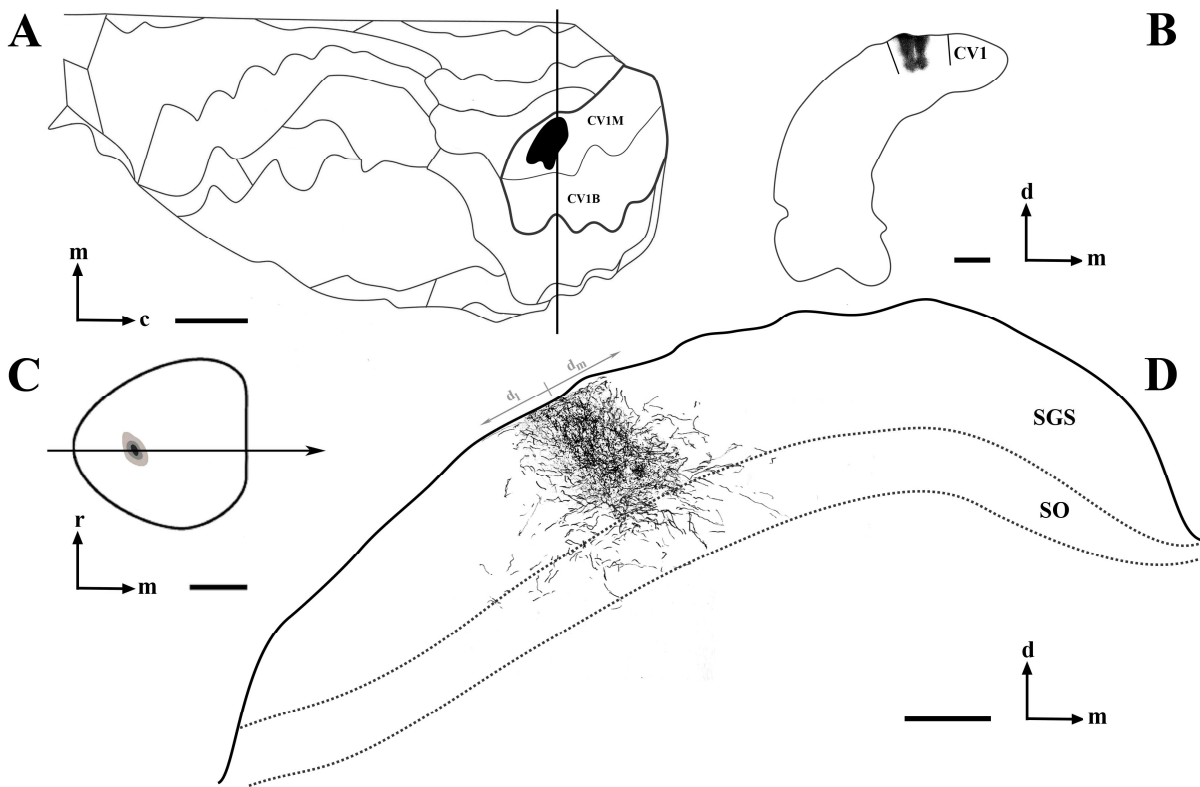
Anteriormente se han descrito los resultados que ponen de manifiesto la diferente capacidad de respuesta plástica del SNC frente a diferentes lesiones practicadas en el sistema visual dependiendo de la edad a la que se lleven a cabo dichas lesiones, neonatalmente o en estadio adulto. Se ha demostrado que cuando las lesiones se producen en los primeros días postnatales la capacidad para regenerar y reorganizar las conexiones es muy elevada. Sin embargo, esta capacidad se ve profundamente limitada en los sistemas maduros.

Similares resultados han sido descritos en trabajos previos desarrollados en este laboratorio que demuestran la expansión de la vía corticocolicular visual ipsilateral en respuesta a la desaferenciación retiniana neonatal contralateral (García del Caño et al., 1997, 2002) no observable cuando la lesión se practicaba en el adulto (García del Caño et al., 2002). En base a estos resultados hemos escogido como modelo de lesión la desaferenciación retiniana llevada a cabo en el estadio adulto para abordar diferentes estrategias con el fin de promover la plasticidad en la conexión corticocolicular visual en el sistema nervioso maduro.

Con el fin de estudiar el efecto de las diferentes condiciones experimentales en la conexión corticocolicular visual se inyectó el trazador anterógrado biotín-dextranamina (BDA) 10000 en la capa V de la CV1. En todos los casos analizados el lugar de inyección se encontraba situado en la región anteromedial de la CV1 donde el campo visual temporal inferior se haya representado (Thomas y Espinoza, 1987; Dreher et al., 1990). De acuerdo con la topografía establecida de la conexión, el campo terminal corticocolicular visual se encontró localizado en el cuadrante posterolateral del CS (Siminoff et al., 1966). En el lugar de inyección, la administración del trazador mostró un patrón de marcado cortical cilíndrico con una distribución uniforme que abarcó la totalidad de las capas de la CV1. Todos los casos estudiados mostraron un volumen similar de marcado del lugar de inyección (0,7-0,8 mm<sup>3</sup>).

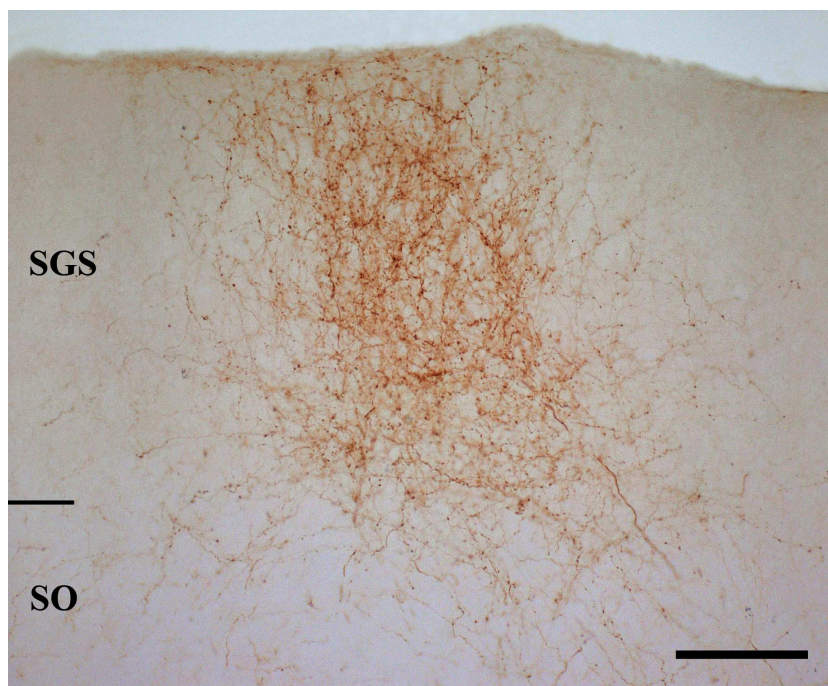
#### 4.4.1. Animales control

En los animales control las fibras que emergían del lugar de inyección discurrían rostrocaudalmente, mostrando abundantes axones que emergían de estas fibras y se ramificaban quedando restringidas a una región localizada en el cuadrante posterolateral del CS, tal y como se había observado en trabajos anteriores de nuestro laboratorio (García del Caño et al., 2002). En secciones coronales del CS se apreciaba que el campo terminal corticocolicular visual ipsilateral presentaba una morfología con disposición columnar que abarcaba la región comprendida entre el SO y la superficie pial. Se observaron fibras de calibre medio-grueso que ascendían desde el SO dando lugar a una densa red de axones en la mitad dorsal del SGS. En este nivel, las axones se mostraban orientados hacia diferentes direcciones, y algunos de ellos se encontraban ramificados dando lugar a axones de menor calibre que se disponían verticalmente. En la porción dorsal del SGS la mayoría de las fibras se orientaban perpendicularmente a la superficie pial, mientras que en el SGS discurrían en paralelo. A todos los niveles las fibras presentaban botones *en passant* a lo largo de su longitud. En estos animales las fibras se alejaban a una distancia de 200-300  $\mu\text{m}$  del centro del campo terminal tanto hacia el extremo lateral como hacia la línea media del CS (Fig. 7, 8 y 32).



**Fig. 7. Lugar de inyección del trazador y organización del campo terminal corticocolicular visual de ratas adultas control.** (A) Reconstrucción del lugar de inyección del trazador en la CV1, realizada sobre un mapa estereotáxico dorsal de la corteza de la rata (adaptado de Zilles, 1985). (B) Corte coronal mostrando el centro del lugar de inyección correspondiente al nivel de la línea vertical dibujada en A. (C) Localización del campo terminal en la superficie dorsal del CS. El área coloreada en negro corresponde a la zona de mayor densidad de fibras. Las áreas coloreadas en grises de intensidad decreciente corresponden a las zonas de densidad decreciente de axones. (D) Dibujo panorámico del campo terminal en una sección coronal del CS al nivel de la línea horizontal representada en C. La distancia a la que se alejan las fibras en sentido lateral (200-300  $\mu\text{m}$ ) y medial (200-300  $\mu\text{m}$ ) viene representada por “ $d_l$ ” y “ $d_m$ ”, respectivamente. CV1, corteza visual primaria; CV1B, corteza visual primaria binocular; CV1M, corteza visual primaria monocular; c, caudal; d, dorsal; m, medial; r, rostral; SGS, estrato gris superficial; SO, estrato óptico. Barras de escala (A): 2 mm; (B y C): 1 mm; (D): 250  $\mu\text{m}$ .

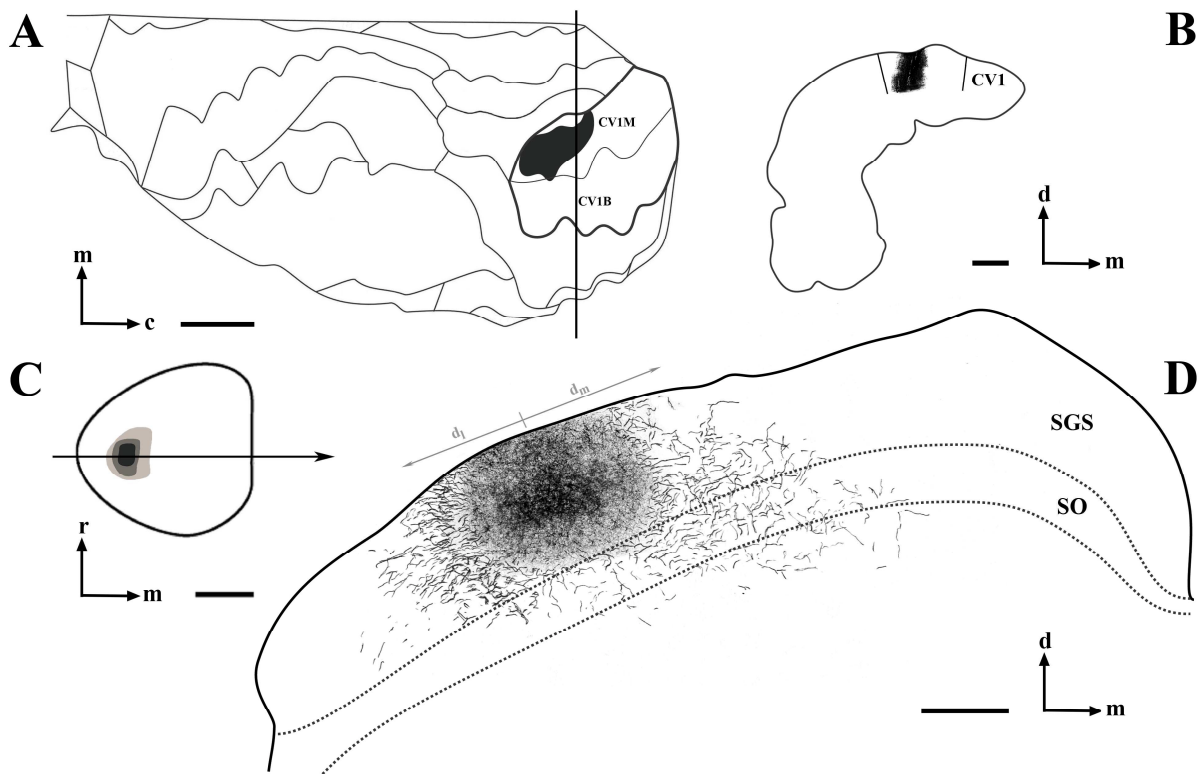




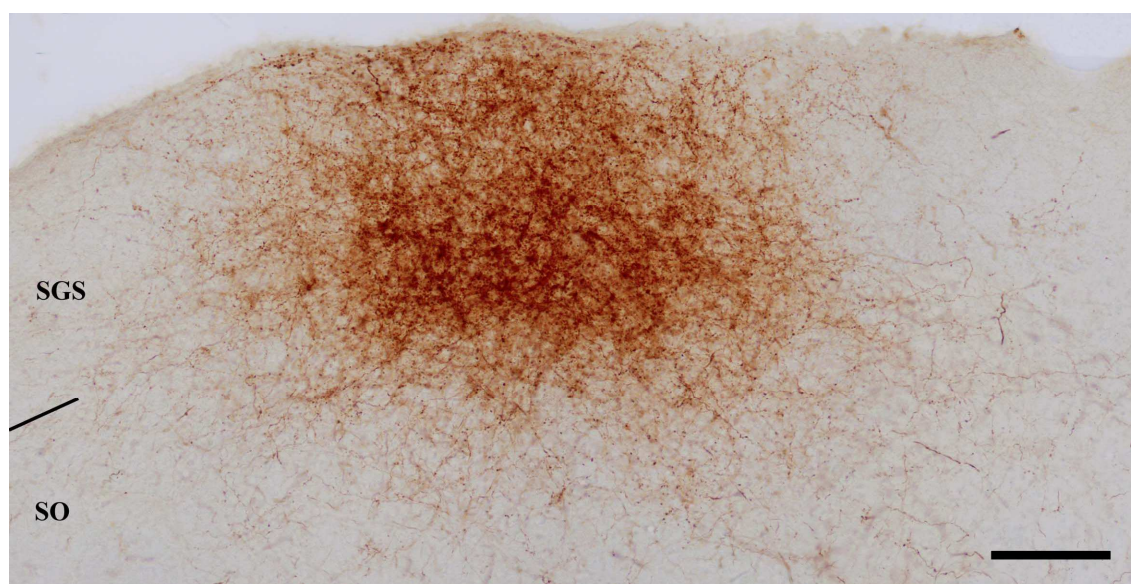
**Fig. 8. Microfotografía del campo terminal corticocolicular visual de ratas adultas control.** La conexión corticocolicular visual presenta una disposición columnar que se extiende desde el SO hasta la superficie pial. SGS, estrato gris superficial; SO, estrato óptico. Barra de escala: 100  $\mu\text{m}$ .

#### 4.4.2. Animales sometidos a desaferenciación retiniana en fase adulta

Tal y como fue descrito en el trabajo previo llevado a cabo en este laboratorio (García del Caño et al., 2002) el campo terminal corticocolicular visual de animales sometidos a desaferenciación retiniana en fase adulta presentó un patrón parecido al encontrado en las ratas control, mostrando una extensión similar. Además se mantenía la disposición columnar del centro del campo terminal característica de los animales control encontrándose localizada en el cuadrante posterolateral del CS en la región comprendida entre la mitad dorsal del SO y la superficie pial. En comparación con los animales ilesos, la tinción se mostró más intensa tanto en el SGS como en el SZ. En la mitad ventral del SGS las fibras, de calibre medio-grueso, no mostraron una orientación concreta, mientras que en la mitad dorsal se apreciaron fibras mayoritariamente orientadas de forma perpendicular a la superficie pial. En el SZ muchas de las fibras discurrían paralelamente orientadas a la superficie. En este estrato, así como en la mitad dorsal del SGS fue notable la presencia de fibras con botones *en passant* de grueso calibre indicativos de una sinaptogénesis reactiva. En estos animales las fibras se alejaban una distancia de 300-400  $\mu\text{m}$  del centro del campo terminal hacia la porción lateral y 350-450  $\mu\text{m}$  hacia la línea media colicular (Fig. 9, 10 y 32).



**Fig. 9. Lugar de inyección del trazador y organización del campo terminal corticocolicular visual de ratas sometidas a desafereñación retiniana en estadio adulto.** (A) Reconstrucción del lugar de inyección del trazador en la CV1, realizada sobre un mapa estereotáxico dorsal de la corteza de la rata (adaptado de Zilles, 1985). (B) Corte coronal mostrando el centro del lugar de inyección correspondiente al nivel de la línea vertical dibujada en A. (C) Localización del campo terminal en la superficie dorsal del CS. El área coloreada en negro corresponde a la zona de mayor densidad de fibras. Las áreas coloreadas en grises de intensidad decreciente corresponden a las zonas de densidad decreciente de axones. (D) Dibujo panorámico del campo terminal en una sección coronal del CS al nivel de la línea horizontal representada en C. La distancia a la que se alejan las fibras en sentido lateral (300-400  $\mu\text{m}$ ) y medial (350-450  $\mu\text{m}$ ) viene representada por “ $d_l$ ” y “ $d_m$ ”, respectivamente. CV1, corteza visual primaria; CV1B, corteza visual primaria binocular; CV1M, corteza visual primaria monocular; c, caudal; d, dorsal; m, medial; r, rostral; SGS, estrato gris superficial; SO, estrato óptico. Barras de escala (A): 2 mm; (B y C): 1 mm; (D): 250  $\mu\text{m}$ .



**Fig. 10. Microfotografía del campo terminal corticocolicular visual de ratas sometidas a desaferenciación retiniana en estadio adulto.** La conexión corticocolicular visual en animales desaferenciados de adulto se muestra densamente teñida presentando una disposición columnar que abarca una región comprendida entre el SO y la superficie pial. SGS, estrato gris superficial; SO, estrato óptico. Barra de escala: 100  $\mu$ m.

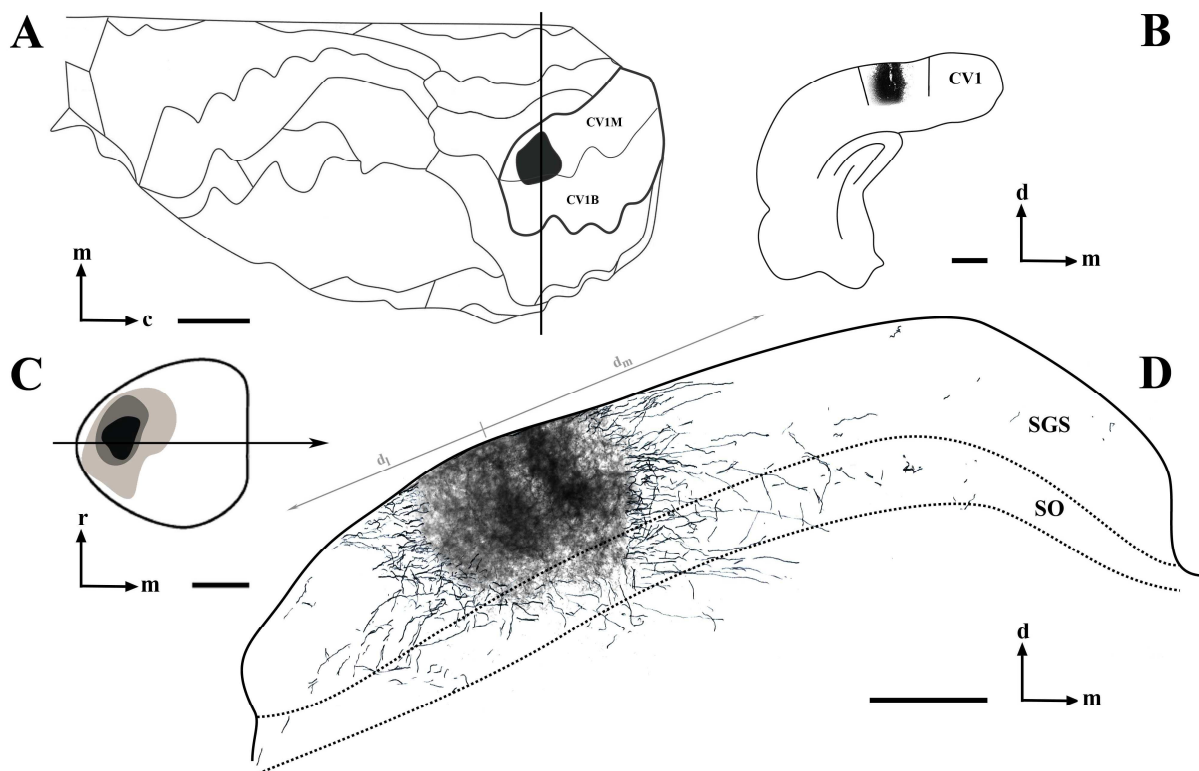
#### 4.4.3. Efecto de la administración de siRNAs frente a moléculas inhibitoras del crecimiento axonal en la corteza visual primaria

Entre las estrategias que se abordan en este trabajo para promover la plasticidad postlesional en el sistema visual adulto se encuentra la administración de siRNAs en la CV1, dirigidos frente a moléculas implicadas en la inhibición del crecimiento axonal, como son el NgR y el RhoA, en ratas sometidas a desaferenciación retiniana unilateral en estadio adulto. Los efectos se describen a continuación.

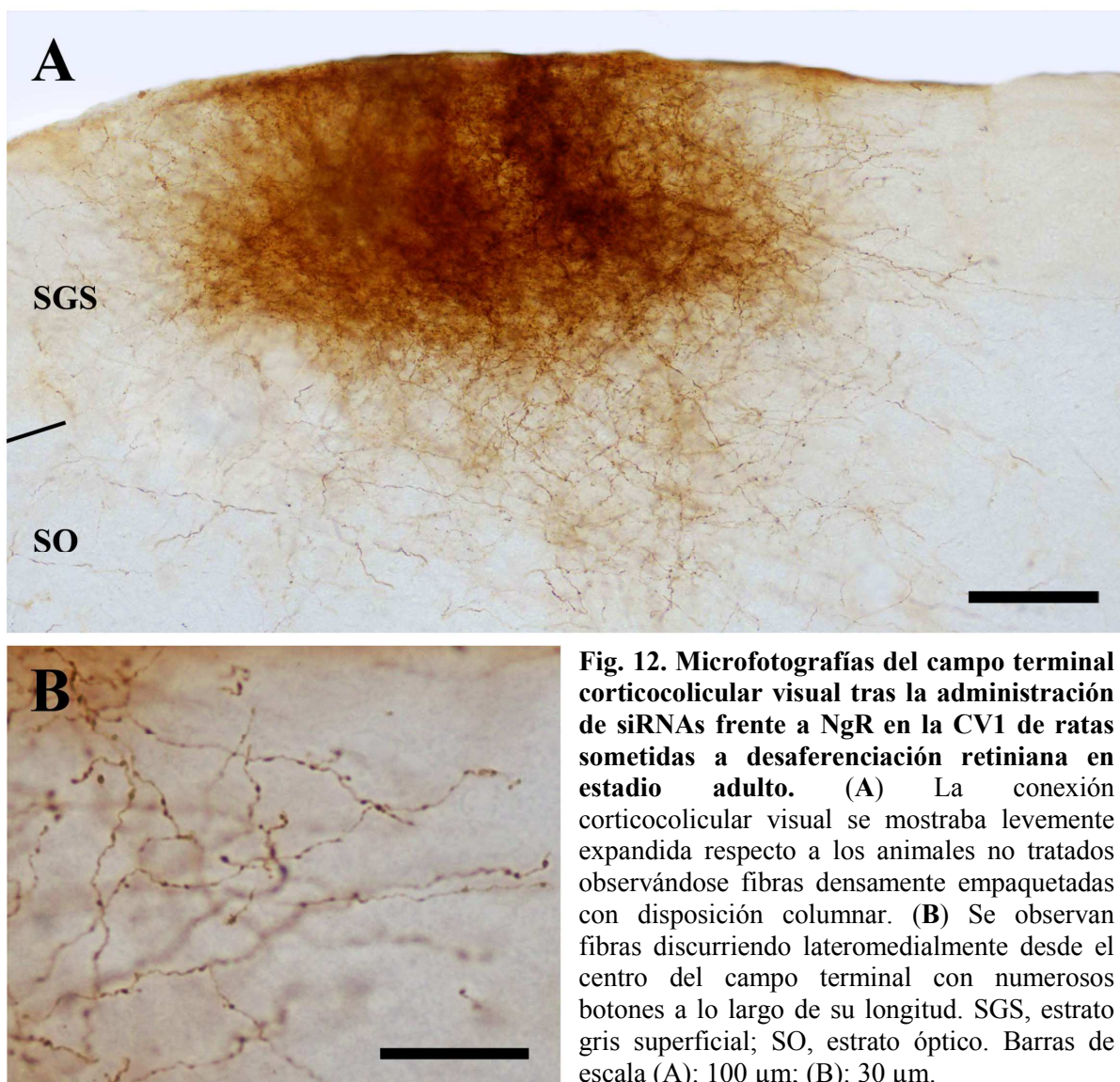
##### 4.4.3.1. Efecto de la microinyección de siRNAs frente al receptor de Nogo

La organización de la proyección corticocolicular visual tras la administración de siRNAs dirigidos frente a NgR se vio ligeramente alterada respecto a la observada en los animales sometidos a desaferenciación retiniana en edad adulta. Aunque la proyección, comprendida desde el SO hasta la superficie pial, mostró un patrón columnar semejante, la extensión del campo terminal se encontraba levemente incrementada. El centro del campo terminal, localizado en la región posterolateral del CS se encontraba densamente teñido. En secciones coronales, en el centro del campo terminal se observaban fibras de calibre medio que ascendían por el SO. La porción ventral del SGS presentaba una densa red fibrilar, en la

que los axones tomaban diferentes direcciones, mientras que en la mitad dorsal de este estrato muchas de los axones discurrían en dirección perpendicular a la superficie colicular. En la zona más superficial del CS muchas fibras adquirirían una orientación horizontal a la superficie pial. En todo el eje dorsoventral se observaban axones con abundantes botones *en passant*. Además, en estos animales se observaron fibras de grosor medio y longitud variable que se alejaban del centro del campo terminal para dirigirse a regiones más laterales y mediales del CS a distancias de 450-550  $\mu\text{m}$  y 650-750  $\mu\text{m}$ , respectivamente. Muchas de estas fibras, principalmente las localizadas en el SGS y el SZ, discurrían en paralelo a la superficie pial, presentando abundantes botones de calibre medio a lo largo de su trayectoria (Fig. 11, 12 y 32).



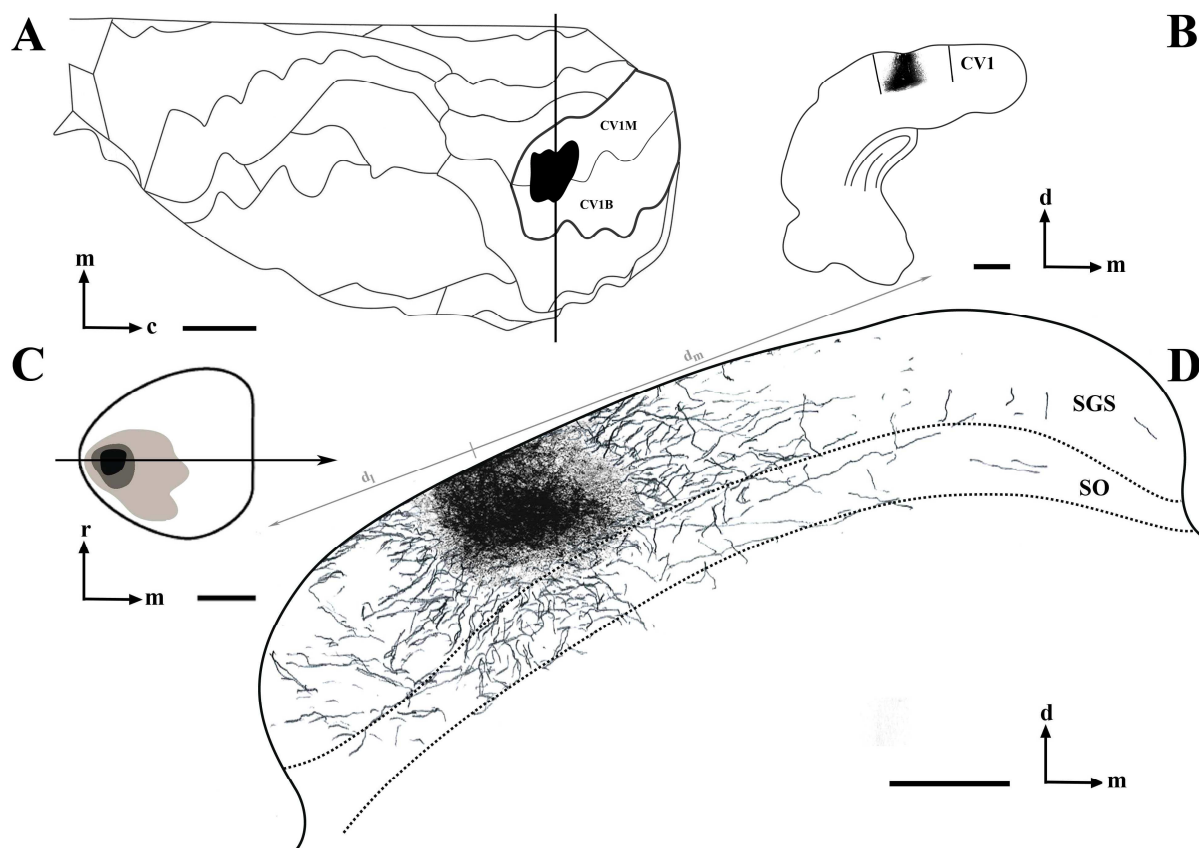
**Fig. 11. Lugar de inyección del trazador y efecto de la administración de siRNAs frente a NgR en la CV1 en la organización del campo terminal corticocolicular visual de ratas sometidas a desafereñación retiniana en estadio adulto.** (A) Reconstrucción del lugar de inyección del trazador en la CV1, realizada sobre un mapa estereotáxico dorsal de la corteza de la rata (adaptado de Zilles, 1985). (B) Corte coronal mostrando el centro del lugar de inyección correspondiente al nivel de la línea vertical dibujada en A. (C) Localización del campo terminal en la superficie dorsal del CS. El área coloreada en negro corresponde a la zona de mayor densidad de fibras. Las áreas coloreadas en grises de intensidad decreciente corresponden a las zonas de densidad decreciente de axones. (D) Dibujo panorámico del campo terminal en una sección coronal del CS al nivel de la línea horizontal representada en C. La distancia a la que se alejan las fibras en sentido lateral (450-550  $\mu\text{m}$ ) y medial (650-750  $\mu\text{m}$ ) viene representada por " $d_l$ " y " $d_m$ ", respectivamente. CV1, corteza visual primaria; CV1B, corteza visual primaria binocular; CV1M, corteza visual primaria monocular; c, caudal; d, dorsal; m, medial; r, rostral; SGS, estrato gris superficial; SO, estrato óptico. Barras de escala (A): 2 mm; (B y C): 1 mm; (D): 250  $\mu\text{m}$ .



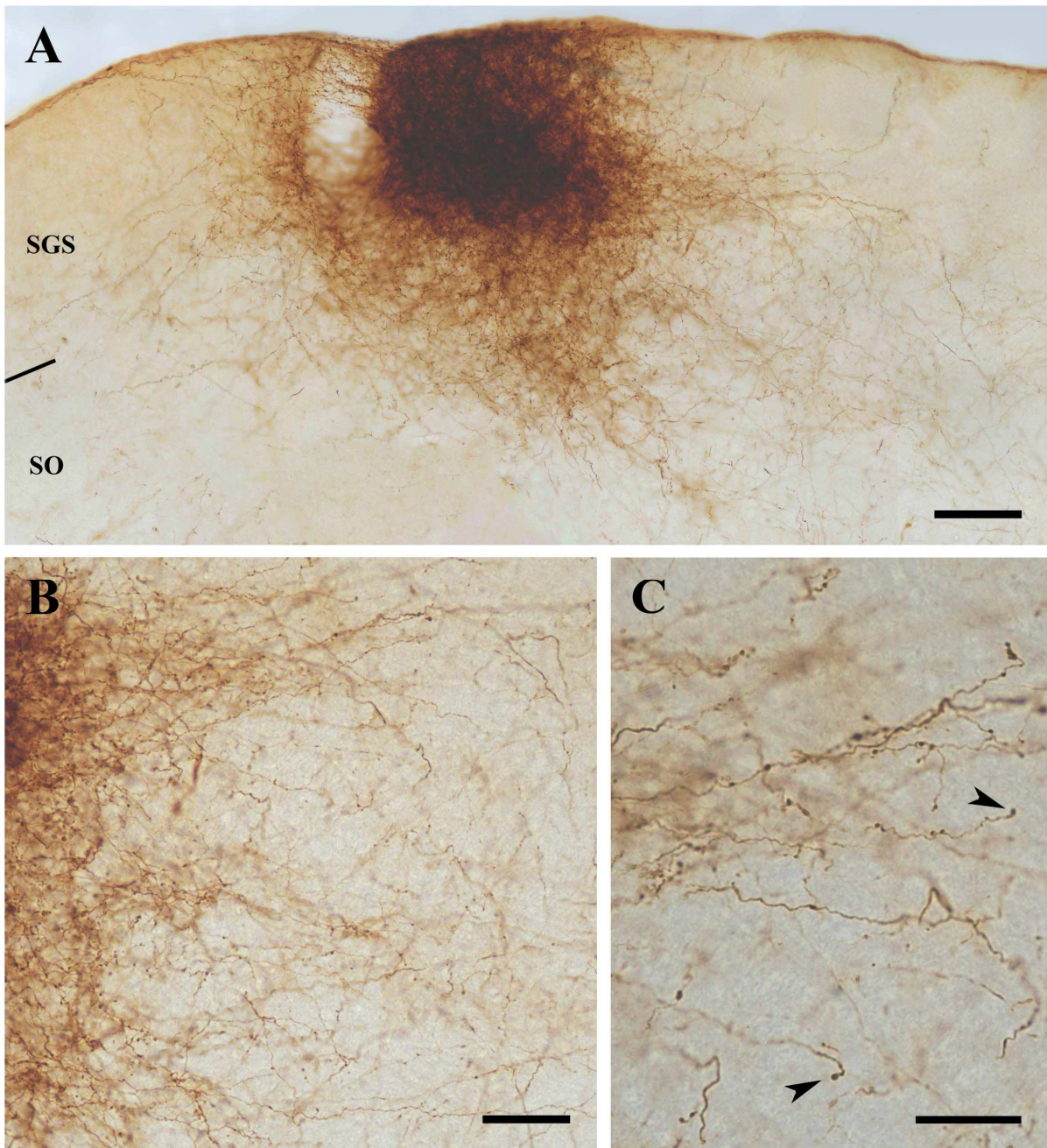
#### 4.4.3.2. Efecto de la microinyección de siRNAs frente a *RhoA*

La microinyección de siRNAs frente a *RhoA* en la CV1 produjo una notable expansión del campo terminal corticocolicular visual en sentido lateromedial, en animales desaferenciados monocularmente de adultos. Sin embargo, en el centro del campo terminal corticocolicular, que se encontraba intensamente marcado, las fibras mantuvieron la disposición columnar característica. Los axones, de calibre intermedio-fino, ascendían por el SO. En el SGS, se observaba una densa red de fibras donde los axones no mostraban una orientación concreta. En el SZ muchas fibras se disponían en paralelo con la superficie pial, tal y como ocurría en ratas no tratadas con siRNAs frente a *RhoA*. En el centro del campo terminal se apreciaban fibras con una densidad media de botones, de calibre intermedio-fino a

lo largo de su extensión. En estos animales numerosas fibras, de intermedia y larga longitud y calibre fino, principalmente situadas en el SGS ventral, se alejaban del centro del campo terminal para dirigirse al extremo lateral, y de manera mas notable, hacia la línea media del CS (450-550  $\mu\text{m}$  y 1100-1200  $\mu\text{m}$ , respectivamente). Muchos de estos axones, de apariencia rectilínea, discurrían paralelos a la superficie dorsal, aunque algunos de ellos cambiaban la dirección en su trayectoria para dirigirse hacia la superficie colicular. Algunos de estos axones presentaban botones *en passant*, aunque en menor medida que las fibras que se alejaban del centro del campo terminal en los animales tratados con siRNAs frente a NgR. Además se pudieron observar axones con engrosamientos terminales indicativos de posibles conos de crecimiento (Fig. 13, 14 y 32).



**Fig. 13. Lugar de inyección del trazador y efecto de la administración de siRNAs frente a RhoA en la CV1 en la organización del campo terminal corticocoliccular visual de ratas sometidas a desaferenciación retiniana en estadio adulto.** (A) Reconstrucción del lugar de inyección del trazador en la CV1, realizada sobre un mapa estereotáxico dorsal de la corteza de la rata (adaptado de Zilles, 1985). (B) Corte coronal mostrando el centro del lugar de inyección correspondiente al nivel de la línea vertical dibujada en A. (C) Localización del campo terminal en la superficie dorsal del CS. El área coloreada en negro corresponde a la zona de mayor densidad de fibras. Las áreas coloreadas en grises de intensidad decreciente corresponden a las zonas de densidad decreciente de axones. (D) Dibujo panorámico del campo terminal en una sección coronal del CS al nivel de la línea horizontal representada en C. La distancia a la que se alejan las fibras en sentido lateral (450-550  $\mu\text{m}$ ) y medial (1100-1200  $\mu\text{m}$ ) viene representada por “ $d_l$ ” y “ $d_m$ ”, respectivamente. CV1, corteza visual primaria; CV1B, corteza visual primaria binocular; CV1M, corteza visual primaria monocular; c, caudal; d, dorsal; m, medial; r, rostral; SGS, estrato gris superficial; SO, estrato óptico. Barras de escala (A): 2 mm; (B y C): 1 mm; (D): 250  $\mu\text{m}$ .

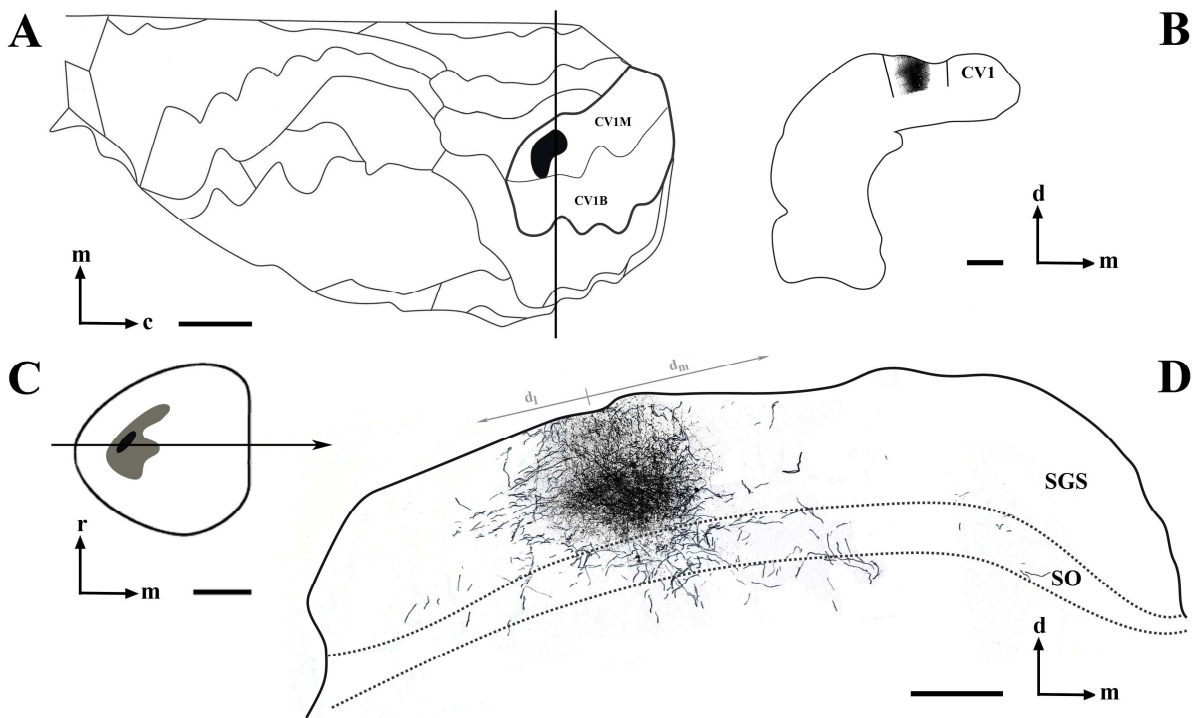


**Fig. 14. Microfotografías del campo terminal corticocolicular visual tras la administración de siRNAs frente a RhoA en la CV1 de ratas sometidas a desafereñación retiniana en estadio adulto. (A)** Como resultado del tratamiento con siRNAs frente a RhoA la proyección corticocolicular visual se vio ampliada, mostrándose fibras que discurrían hacia regiones más mediales y laterales del CS. **(B)** Fibras en la porción ventral del SGS discurriendo hacia la línea media del CS. **(C)** Fibras con engrosamientos terminales (cabeza de flecha). SGS, estrato gris superficial; SO, estrato óptico. Barras de escala (A): 100  $\mu$ m; (B): 50  $\mu$ m; (C): 30  $\mu$ m.

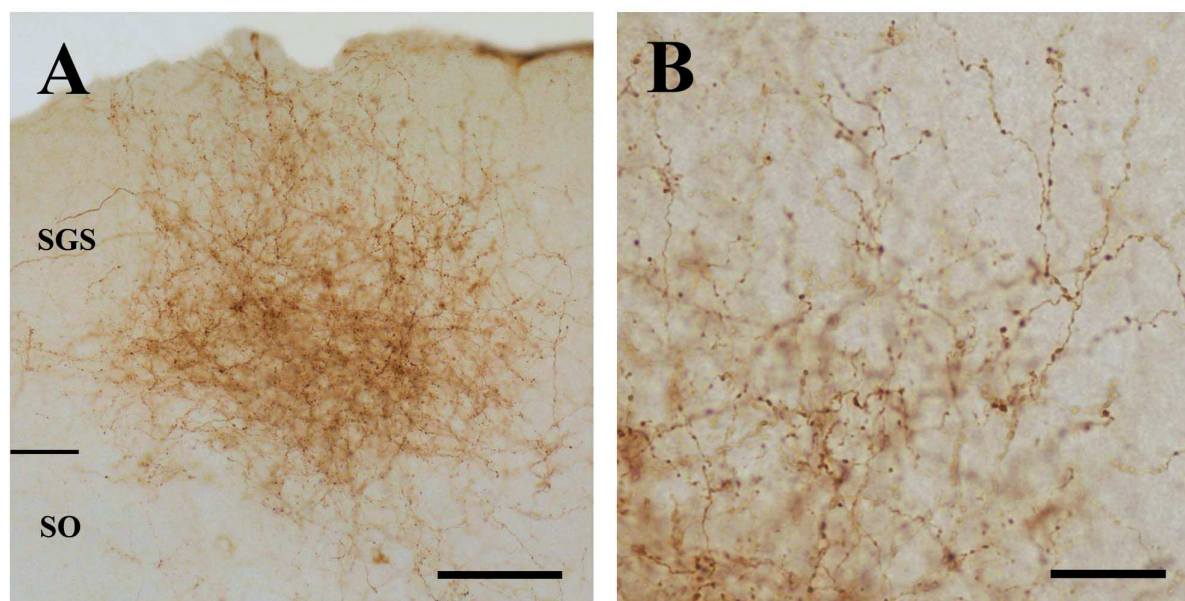


#### 4.4.3.3. Efecto de la microinyección de siRNAs frente al receptor de Nogo y a RhoA

El efecto conjunto de la inyección de siRNAs frente a NgR y RhoA apenas provocó expansión del campo terminal de las eferencias provenientes de la CV1 a los estratos superficiales del CS. El centro del campo terminal mostraba una distribución columnar al igual que en las ratas no tratadas. Las fibras, de calibre medio, ascendían por el SO, y en el SGS ventral se presentaban orientadas en diferentes direcciones. En la mitad dorsal del SGS se observaron fibras menos densamente empaquetadas con orientación vertical, muchas de ellas de aspecto curvilíneo, dirigiéndose hacia la superficie pial. En toda la extensión del centro del campo terminal se observaron axones con abundantes botones *en passant* de calibre medio-grueso a lo largo de su longitud. Las fibras apenas se alejaron del centro del campo terminal (250-350  $\mu\text{m}$  y 450-550  $\mu\text{m}$  hacia el extremo lateral y medial del CS, respectivamente) (Fig. 15, 16 y 32).



**Fig. 15. Lugar de inyección del trazador y efecto de la administración de siRNAs frente a NgR y RhoA en la CV1 en la organización del campo terminal corticocoliccular visual de ratas sometidas a desafereñación retiniana en estadio adulto.** (A) Reconstrucción del lugar de inyección del trazador en la CV1, realizada sobre un mapa estereotáxico dorsal de la corteza de la rata (adaptado de Zilles, 1985). (B) Corte coronal mostrando el centro del lugar de inyección correspondiente al nivel de la línea vertical dibujada en A. (C) Localización del campo terminal en la superficie dorsal del CS. El área coloreada en negro corresponde a la zona de mayor densidad de fibras. Las áreas coloreadas en grises de intensidad decreciente corresponden a las zonas de densidad decreciente de axones. (D) Dibujo panorámico del campo terminal en una sección coronal del CS al nivel de la línea horizontal representada en C. La distancia a la que se alejan las fibras en sentido lateral (250-350  $\mu\text{m}$ ) y medial (450-550  $\mu\text{m}$ ) viene representada por “ $d_l$ ” y “ $d_m$ ”, respectivamente. CV1, corteza visual primaria; CV1B, corteza visual primaria binocular; CV1M, corteza visual primaria monocular; c, caudal; d, dorsal; m, medial; r, rostral; SGS, estrato gris superficial; SO, estrato óptico. Barras de escala (A): 2 mm; (B y C): 1 mm; (D): 250  $\mu\text{m}$ .

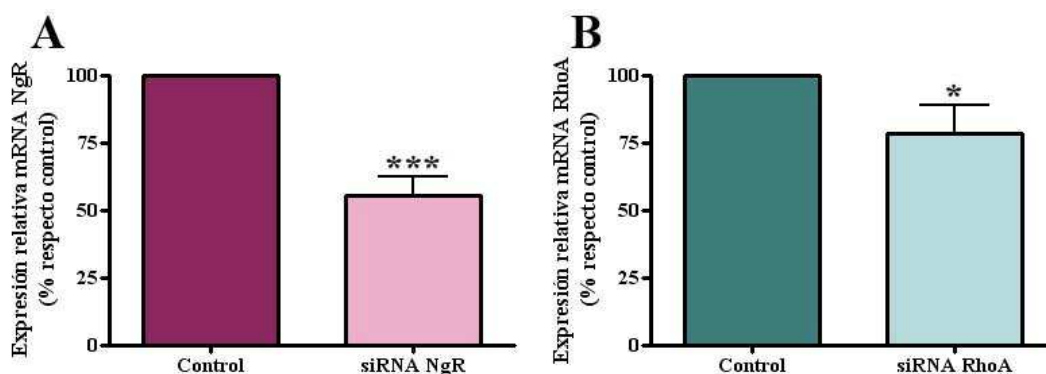


**Fig. 16. Microfotografías del campo terminal corticocolicular visual tras la administración combinada de siRNAs frente a NgR y a RhoA en la CV1 de ratas sometidas a desafereñación retiniana en estadio adulto.** (A) La administración conjunta de siRNAs frente a NgR y RhoA no provocó una expansión del campo terminal corticocolicular visual. La proyección mostró una disposición columnar semejante a la de los animales no tratados. (B) Fibras del SGS orientadas verticalmente hacia la superficie pial con abundantes botones *en passant* a lo largo de su longitud. SGS, estrato gris superficial; SO, estrato óptico. Barras de escala (A): 100  $\mu$ m; (C): 30  $\mu$ m.

#### 4.4.3.4. Cuantificación del mRNA del receptor de Nogo y del RhoA en la corteza visual primaria tras la administración de siRNAs

Para comprobar el efecto inhibitorio de la administración de siRNAs en la expresión de NgR y RhoA en la CV1 y, por tanto, la participación de dichos factores en la reorganización de los campos terminales corticocoliculares de animales desafereñados, se procedió a la cuantificación de los niveles de expresión relativa del mRNA de estos genes en la corteza visual tras su inyección.

La microinyección de siRNAs frente al NgR dio lugar a una reducción significativa de la expresión relativa de su mRNA del 44,8% ( $55,2\% \pm 7,3\%$  de expresión respecto al control) ( $n=6$ ;  $p<0,001$ ) (Fig. 17A). De igual modo la administración de siRNA frente a RhoA provocó un descenso significativo del 21,67% ( $78,33\% \pm 10,53\%$  de expresión respecto al control) ( $n=3$ ;  $p<0,05$ ) en la expresión del mRNA de esta molécula en la CV1 (Fig. 17B).



**Fig. 17. Gráficas que muestran la disminución de los niveles de expresión relativa del mRNA de NgR y RhoA tras la administración de siRNAs frente a dichas moléculas en la corteza visual primaria.** (A) La inyección de siRNAs frente a NgR provoca una reducción significativa ( $n=6$ ;  $p<0,001$ ) de los niveles de expresión de NgR en la CV1 ( $55,2\% \pm 7,3\%$  expresión respecto al control). (B) La inyección de siRNAs frente a RhoA disminuye los niveles de mRNA de RhoA ( $78,33\% \pm 10,53\%$  expresión respecto al control) siendo esta disminución significativa ( $n=3$ ;  $p<0,05$ ). Los datos se presentan como el porcentaje de la expresión relativa de mRNA respecto al control  $\pm$  SEM (\*  $p<0,05$ ; (\*\*\*)  $p<0,001$ ).

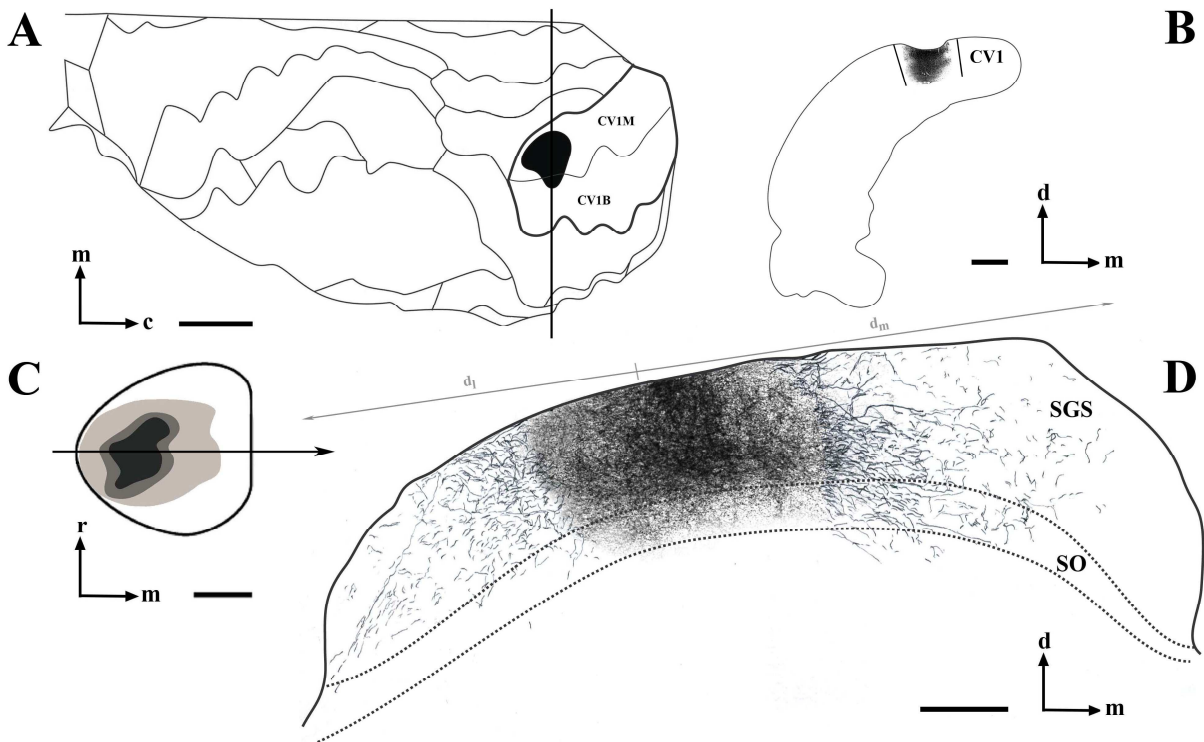
#### 4.4.4. Efecto del tratamiento crónico con fluoxetina

Como se ha señalado anteriormente, tomando como antecedente la publicación de Maya Vetencourt y colaboradores en la que postulaban que el tratamiento a largo plazo con el antidepresivo fluoxetina reinstaura la plasticidad de la dominancia ocular y promueve la recuperación de la función en animales ambliopes (Maya Vetencourt et al., 2008), decidimos analizar su posible efecto sobre la capacidad plástica de la proyección corticocolicular visual en ratas sometidas a desaferenciación retiniana en edad adulta.

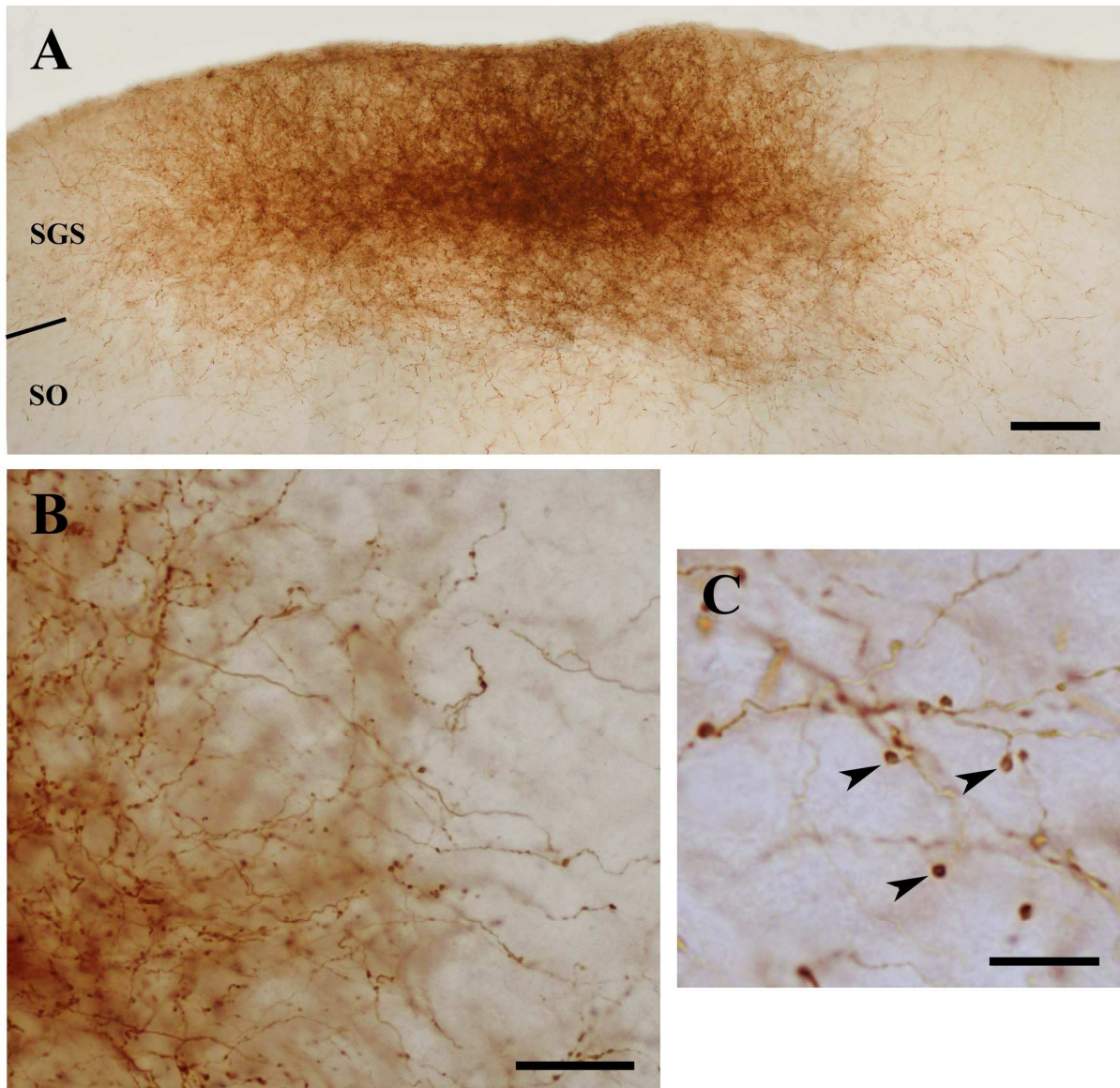
El tratamiento crónico con fluoxetina generó una profunda alteración en el patrón de organización del campo terminal de animales desaferenciados en edad adulta. Se observó un drástico incremento de la extensión del centro del campo terminal mostrando fibras muy densamente empaquetadas e intensamente teñidas que ocupaban el SO, y de forma más notable el SGS y el SZ, donde las fibras discurrían en diferentes direcciones. Las fibras del centro de la proyección eran finas, a diferencia de las anteriores condiciones experimentales, y presentaban abundantes botones *en passant* a lo largo de su longitud. Se observaron numerosos axones, principalmente en el SGS, alejándose largas distancias del centro del campo terminal tanto hacia posiciones más laterales, como hacia mediales ( $900-1000\ \mu\text{m}$  y  $1400-1500\ \mu\text{m}$ , respectivamente). Muchas de estas fibras seguían una trayectoria ondulante, y

algunas presentaban pequeñas ramas con engrosamiento terminal indicativo de un posible indicio de crecimiento axonal (Fig. 18, 19 y 32).

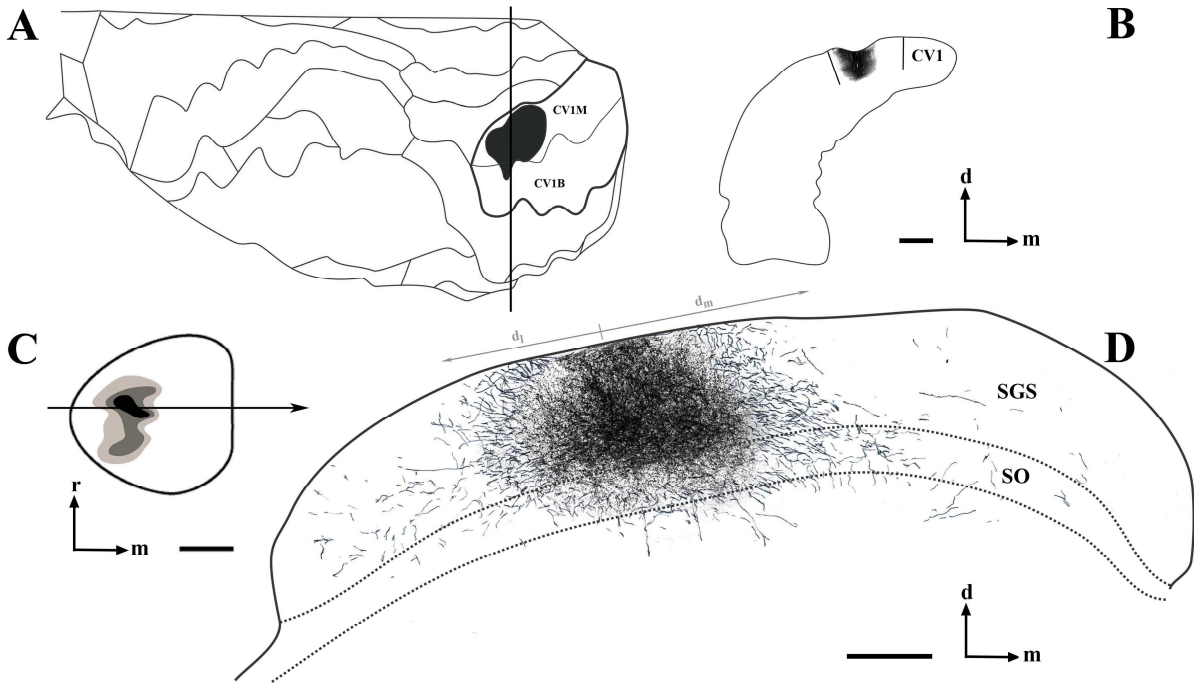
Cuando el tratamiento de fluoxetina se llevó a cabo en ratas control el centro de la proyección también se vio ligeramente expandido, pero en ningún caso fue comparable con lo observado en los animales sometidos a desafereciación retiniana en estadio adulto (Fig. 18, 19, 30). En general, el patrón fue similar a los animales enucleados tratados con fluoxetina, mostrándose una densa red de fibras de calibre fino con abundantes botones en toda su longitud. En estos animales los axones que se alejaban del centro del campo terminal lo hacían, mayoritariamente, en la región ventral del SGS, aunque la distancia tanto hacia la posición lateral como medial era menor (350-450  $\mu\text{m}$  y 600-700  $\mu\text{m}$ , respectivamente) (Fig. 20, 21 y 32).



**Fig. 18. Lugar de inyección del trazador y efecto del tratamiento crónico con fluoxetina en la organización del campo terminal corticocolicual visual de ratas sometidas a desafereñación retiniana en estadio adulto.** (A) Reconstrucción del lugar de inyección del trazador en la CV1, realizada sobre un mapa estereotáxico dorsal de la corteza de la rata (adaptado de Zilles, 1985). (B) Corte coronal mostrando el centro del lugar de inyección correspondiente al nivel de la línea vertical dibujada en A. (C) Localización del campo terminal en la superficie dorsal del CS. El área coloreada en negro corresponde a la zona de mayor densidad de fibras. Las áreas coloreadas en grises de intensidad decreciente corresponden a las zonas de densidad decreciente de axones. (D) Dibujo panorámico del campo terminal en una sección coronal del CS al nivel de la línea horizontal representada en C. La distancia a la que se alejan las fibras en sentido lateral (900-1000  $\mu\text{m}$ ) y medial (1400-1500  $\mu\text{m}$ ) viene representada por “ $d_l$ ” y “ $d_m$ ”, respectivamente. CV1, corteza visual primaria; CV1B, corteza visual primaria binocular; CV1M, corteza visual primaria monocular; c, caudal; d, dorsal; m, medial; r, rostral; SGS, estrato gris superficial; SO, estrato óptico. Barras de escala (A): 2 mm; (B y C): 1 mm; (D): 250  $\mu\text{m}$ .

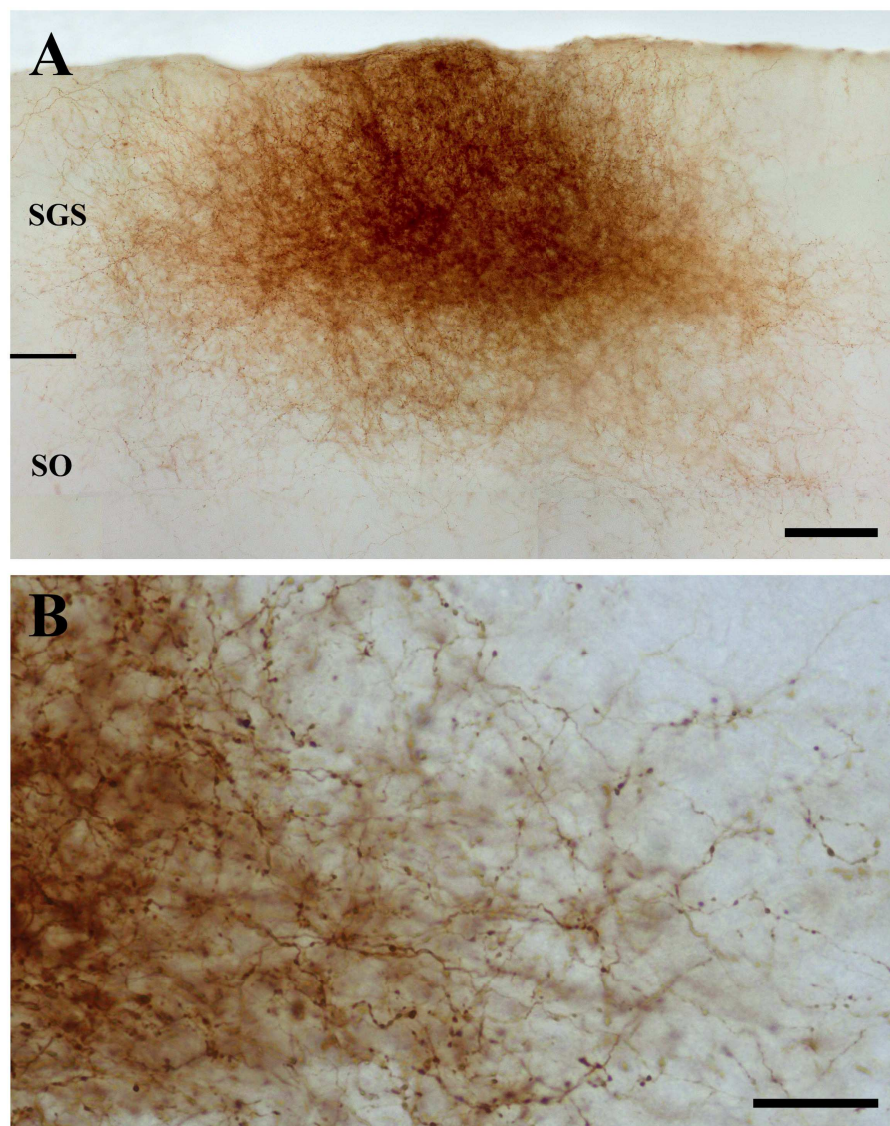


**Fig. 19. Microfotografías del campo terminal corticocolicular visual tras el tratamiento crónico con fluoxetina en ratas sometidas a desaferenciación retiniana en estadio adulto.** (A) Los animales enucleados en fase adulta como resultado del tratamiento crónico con fluoxetina muestran un incremento notable de la expansión del centro del campo terminal corticocolicular visual hacia regiones mas laterales y mediales del CS. (B) Fibras en el SGS dirigiéndose hacia la línea media del CS. (C) Fibras con pequeñas ramas con engrosamiento terminal indicativo de un posible fenómeno de crecimiento axonal. SGS, estrato gris superficial; SO, estrato óptico. Barras de escala (A): 100  $\mu\text{m}$ ; (B): 30  $\mu\text{m}$ ; (C): 10  $\mu\text{m}$ .



**Fig. 20. Lugar de inyección del trazador y efecto del tratamiento crónico con fluoxetina en la organización del campo terminal corticocolicular visual de ratas adultas control.** (A) Reconstrucción del lugar de inyección del trazador en la CV1, realizada sobre un mapa estereotáxico dorsal de la corteza de la rata (adaptado de Zilles, 1985). (B) Corte coronal mostrando el centro del lugar de inyección correspondiente al nivel de la línea vertical dibujada en A. (C) Localización del campo terminal en la superficie dorsal del CS. El área coloreada en negro corresponde a la zona de mayor densidad de fibras. Las áreas coloreadas en grises de intensidad decreciente corresponden a las zonas de densidad decreciente de axones. (D) Dibujo panorámico del campo terminal en una sección coronal del CS al nivel de la línea horizontal representada en C. La distancia a la que se alejan las fibras en sentido lateral (350-450  $\mu\text{m}$ ) y medial (600-700  $\mu\text{m}$ ) viene representada por “ $d_l$ ” y “ $d_m$ ”, respectivamente. CV1, corteza visual primaria; CV1B, corteza visual primaria binocular; CV1M, corteza visual primaria monocular; c, caudal; d, dorsal; m, medial; r, rostral; SGS, estrato gris superficial; SO, estrato óptico. Barras de escala (A): 2 mm; (B, C): 1 mm; (D): 250  $\mu\text{m}$ .





**Fig. 21. Microfotografías del campo terminal corticocolicular visual tras el tratamiento crónico con fluoxetina en ratas adultas control.** (A) Las ratas control también mostraron una ampliación del centro del campo terminal visual tras el tratamiento crónico con fluoxetina, aunque en ningún caso fue comparable al observado en ratas enucleadas de adulto sometidas a este mismo tratamiento. (B) Fibras en el SGS dirigiéndose hacia regiones más mediales del CS. SGS, estrato gris superficial; SO, estrato óptico. Barras de escala (A): 100  $\mu\text{m}$ ; (B): 30  $\mu\text{m}$ .

#### 4.5. Efecto de la estimulación magnética

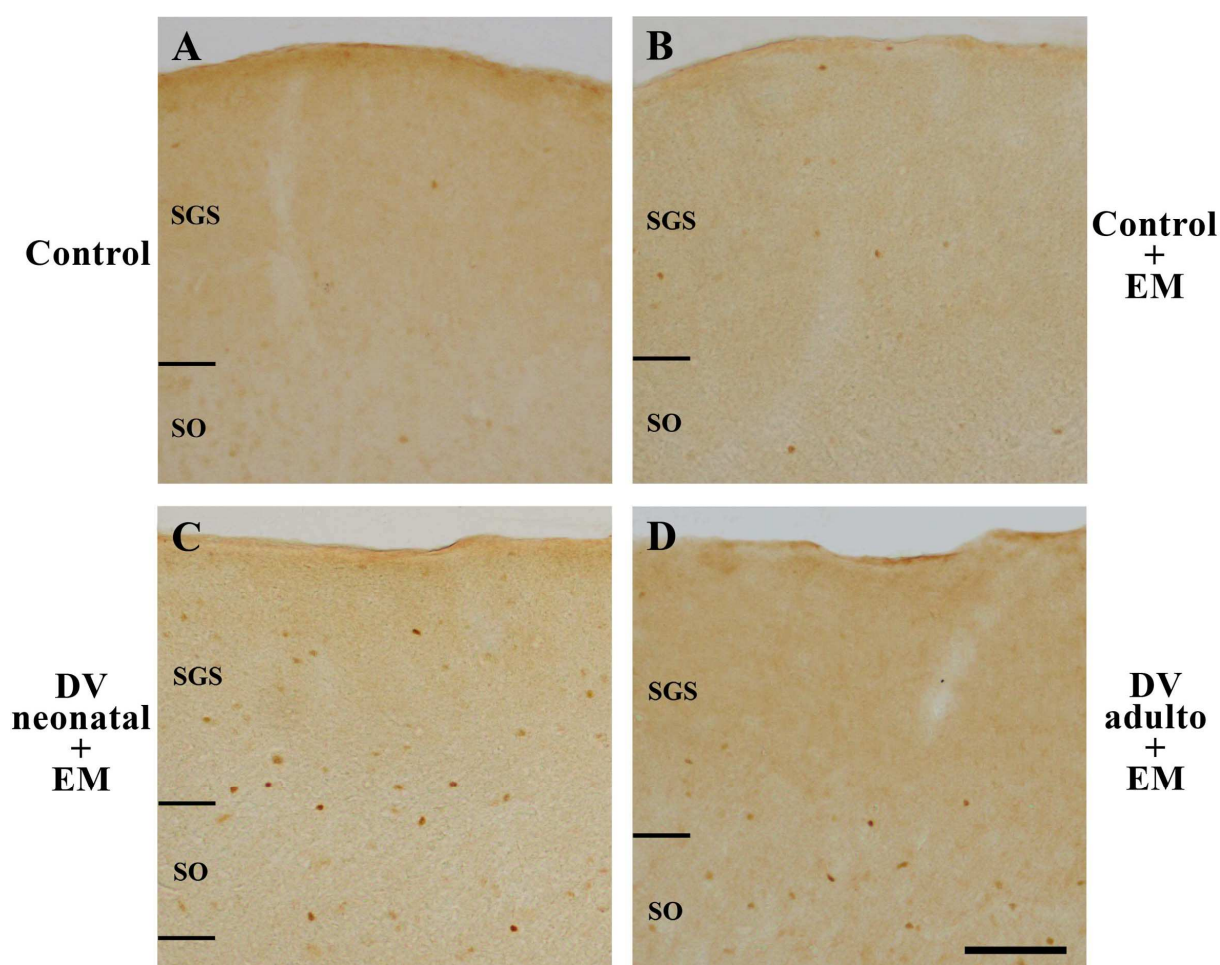
##### 4.5.1. Expresión de c-Fos en los estratos superficiales del colículo superior y posibles modificaciones debidas a la desaferenciación retiniana neonatal y en fase adulta

Es ampliamente conocido que el gen temprano c-Fos es inducido por estímulos externos de diversa procedencia. Némec y colaboradores evidenciaron mediante la expresión de esta proteína que las neuronas del CS del topo responden a alteraciones provocadas en la

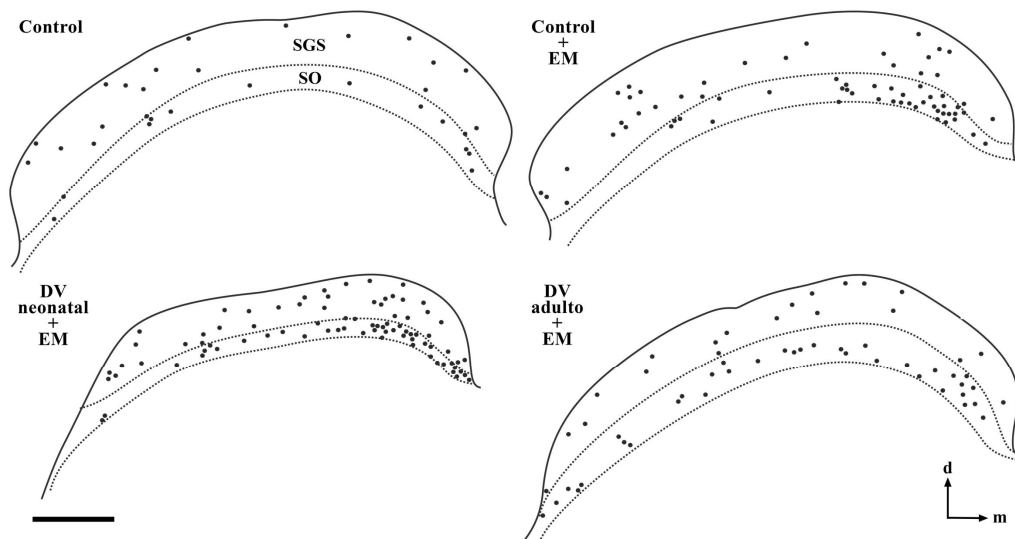
polaridad del campo magnético (Němec et al., 2001). En esta sección se describen los efectos de la exposición a cambios en la polaridad del campo magnético en la inducción de c-Fos en los estratos superficiales coliculares de ratas ilesas, así como de ratas sometidas a desaferenciación retiniana neonatalmente y en estadio adulto. Así, nos referiremos a animales sometidos a estimulación magnética para denotar aquellos expuestos a cambios en la polaridad del campo magnético terrestre con el procedimiento detallado en el apartado de “Material y métodos”.

La expresión de la proteína c-Fos, puesta de manifiesto mediante tinción inmunohistoquímica, se mostró a modo de depósitos teñidos de aspecto redondeado de pequeño tamaño con localización aparentemente nuclear. En todas las situaciones experimentales estudiadas, comparándolas con los animales control, se observó un incremento de células inmunopositivas en sentido lateromedial a lo largo del eje rostrocaudal de los estratos superficiales del CS, siendo más notable este gradiente en el SO (Fig. 22, 23). Los animales control, es decir, no sometidos a alteraciones en el campo geomagnético, mostraron una inmunorreactividad para el c-Fos muy baja en los estratos visuales, tanto en el SGS ( $10,36 \pm 1,33$  células c-Fos positivas/mm<sup>2</sup>), como en el SO ( $18,76 \pm 1,58$  células c-Fos positivas/mm<sup>2</sup>). Mientras que los animales ilesos pero expuestos al campo magnético modificado mostraron un mayor número de células inmunopositivas tanto en el SGS ( $12,96 \pm 0,79$  células c-Fos positivas/mm<sup>2</sup>), como en el SO ( $27,71 \pm 2,26$  células c-Fos positivas/mm<sup>2</sup>), aunque este ligero incremento no resultó estadísticamente significativo. En cambio, la estimulación magnética en animales sometidos a desaferenciación retiniana neonatal provocó una drástica alteración del nivel de expresión de la proteína c-Fos en los estratos superficiales del CS, y de forma más notoria en el SGS. Como resultado de la estimulación magnética, se observó un incremento significativo de la inducción del c-Fos en el SGS tanto en ratas enucleadas neonatalmente ( $26,68 \pm 2,35$  células c-Fos positivas/mm<sup>2</sup>) respecto a los controles con ( $n=3$ ;  $p<0,001$ ) y sin estimulación ( $n=3$ ;  $p<0,001$ ), como en edad adulta ( $23,78 \pm 1,23$  células c-Fos positivas/mm<sup>2</sup>) aunque en éstos las diferencias sólo resultaron significativas respecto a los controles ( $n=3$ ;  $p<0,01$ ). Además, al comparar el efecto de la desaferenciación retiniana neonatal respecto a la practicada en fase adulta, se observó que la estimulación magnética da lugar a mayores niveles de inducción de c-Fos en el SGS de animales lesionados neonatalmente ( $n=3$ ;  $p<0,01$ ). En el SO, aunque más levemente, también se pudieron observar cambios en la inducción de c-Fos en las distintas condiciones analizadas. Sin embargo, a diferencia del SGS, en el SO sólo se observó un incremento significativo en los animales

sometidos a desaferenciación visual neonatal ( $42,16 \pm 5,64$  células c-Fos positivas/ $\text{mm}^2$ ), cuando éstos se comparaban con los animales control no estimulados ( $n=3$ ;  $p<0,01$ ). La evisceración en el adulto, aunque presentó un aumento de c-Fos en el SO ( $33,25 \pm 2,04$  células c-Fos positivas/ $\text{mm}^2$ ), respecto a los controles con y sin estimulación, no mostró diferencias significativas. Asimismo al comparar los animales estimulados enucleados neonatalmente respecto a los enucleados en estadio adulto se observó que los primeros presentaban una mayor inducción de c-Fos, aunque las diferencias no fueron significativas (Fig. 24).

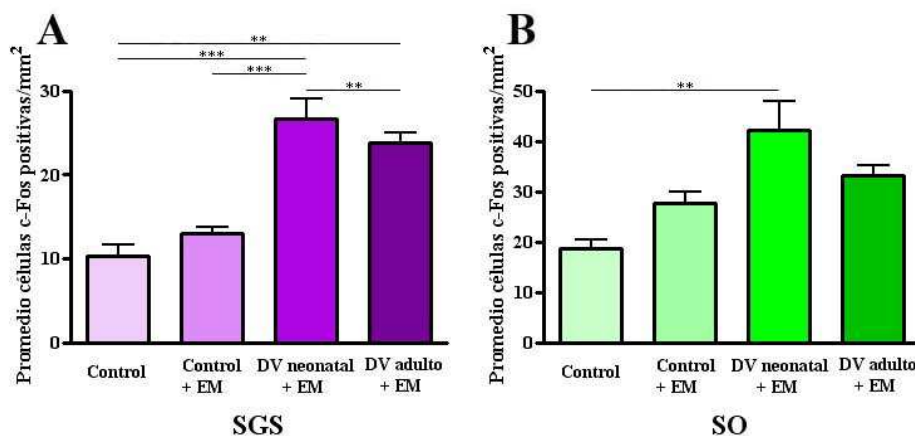


**Fig. 22. Estratos superficiales del CS de ratas adultas mostrando las diferencias de expresión de c-Fos en las distintas situaciones experimentales estudiadas.** (A) Los animales control apenas muestran células c-Fos positivas. (B) La estimulación magnética en los animales ilesos apenas afecta a la inducción de c-Fos en los estratos superficiales coliculares. (C) Los animales sometidos a desaferenciación visual neonatal presentan un incremento de la expresión de c-Fos tras la estimulación magnética tanto en el SO como en el SGS. (D) Los niveles de expresión de c-Fos en los animales con desaferenciación retiniana en fase adulta aumentan tras la estimulación magnética en los estratos superficiales aunque en menor medida en comparación con los lesionados neonatalmente. DV, desaferenciación visual; EM, estimulación magnética; SGS, estrato gris superficial; SO, estrato óptico; SGI, estrato gris intermedio. Barra de escala: 100  $\mu\text{m}$ .



**Fig. 23. Dibujo a cámara clara de cortes coronales representativos de los estratos superficiales del colículo superior de ratas adultas mostrando células c-Fos positivas en respuesta a la exposición a un campo magnético con la polaridad alterada.** Se observa que tras la estimulación magnética tanto los animales control como los desafiados visualmente presentan un incremento de la expresión de c-Fos en los estratos superficiales del CS. Los animales enucleados neonatalmente muestran una mayor inducción del c-Fos en comparación con el resto de situaciones experimentales. Cada punto corresponde con una célula c-Fos inmunopositiva. d, dorsal; DV, desafiado visualmente; EM, estimulación magnética; m, medial; SGS, estrato gris superficial. SO, estrato óptico. Barra de escala: 500µm.

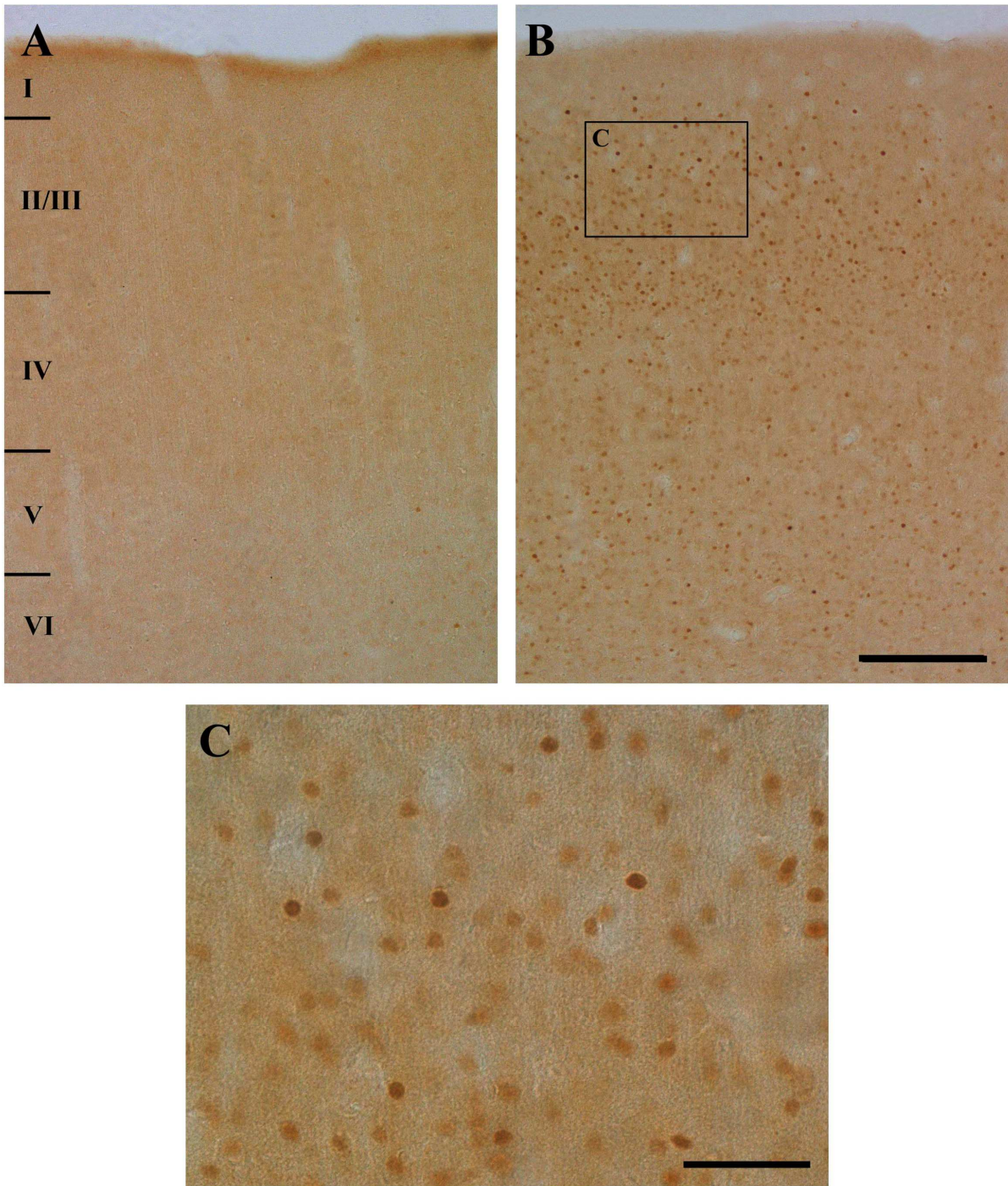
Promedio células c-Fos positivas/mm <sup>2</sup>	Control	Control + EM	DV neonatal + EM	DV adulto + EM
SGS	10,36 ± 1,33	12,96 ± 0,79	26,68 ± 2,35	23,78 ± 1,23
SO	18,76 ± 1,58	27,71 ± 2,26	42,16 ± 5,64	33,25 ± 2,04



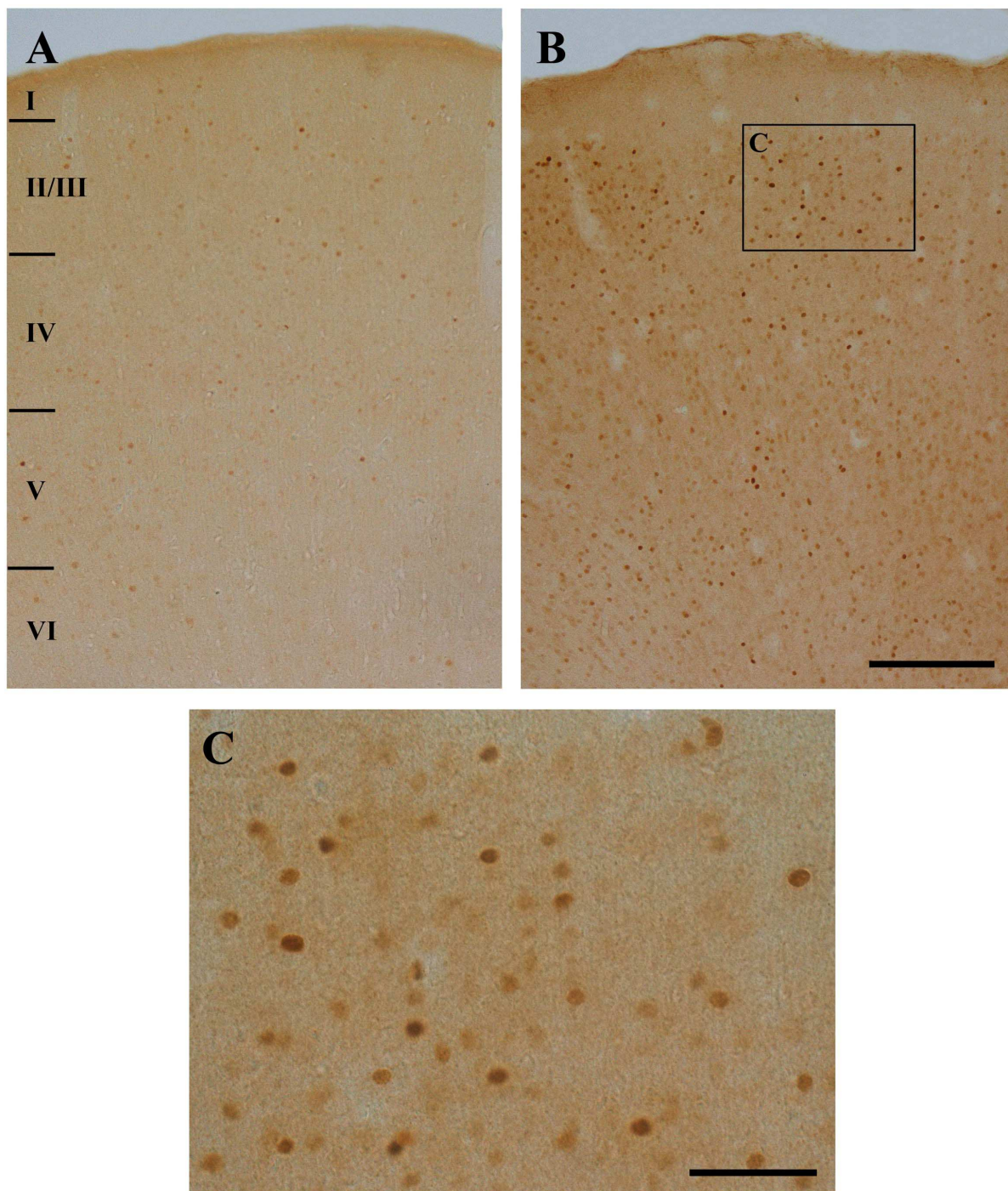
**Fig. 24. Tabla de datos y gráficas que muestran las diferencias en la expresión de c-Fos en el estrato gris superficial y en el estrato óptico en las distintas situaciones experimentales.** (A) En el SGS los animales estimulados magnéticamente sometidos a desafiado retiniano en fase neonatal y adulta muestran un incremento significativo de la inducción del c-Fos en comparación con los no estimulados. Además en este estrato cuando la desafiado tiene lugar neonatalmente la expresión de c-Fos es mayor que cuando se lleva a cabo en el adulto, siendo esta diferencia significativa. (B) En el SO, aunque en todos los casos experimentales la estimulación magnética provoca un aumento de células c-Fos positivas, sólo en los animales desafiados de recién nacido es significativo. DV, desafiado visualmente; EM, estimulación magnética; SGS, estrato gris superficial. SO, estrato óptico. Los datos se presentan como los promedios de las densidades celulares (número de células c-Fos positivas por mm<sup>2</sup>) ± SEM (\*\*  $p < 0,01$ ; (\*\*\*)  $p < 0,001$ ).

#### 4.5.2. Expresión de c-Fos en regiones corticales

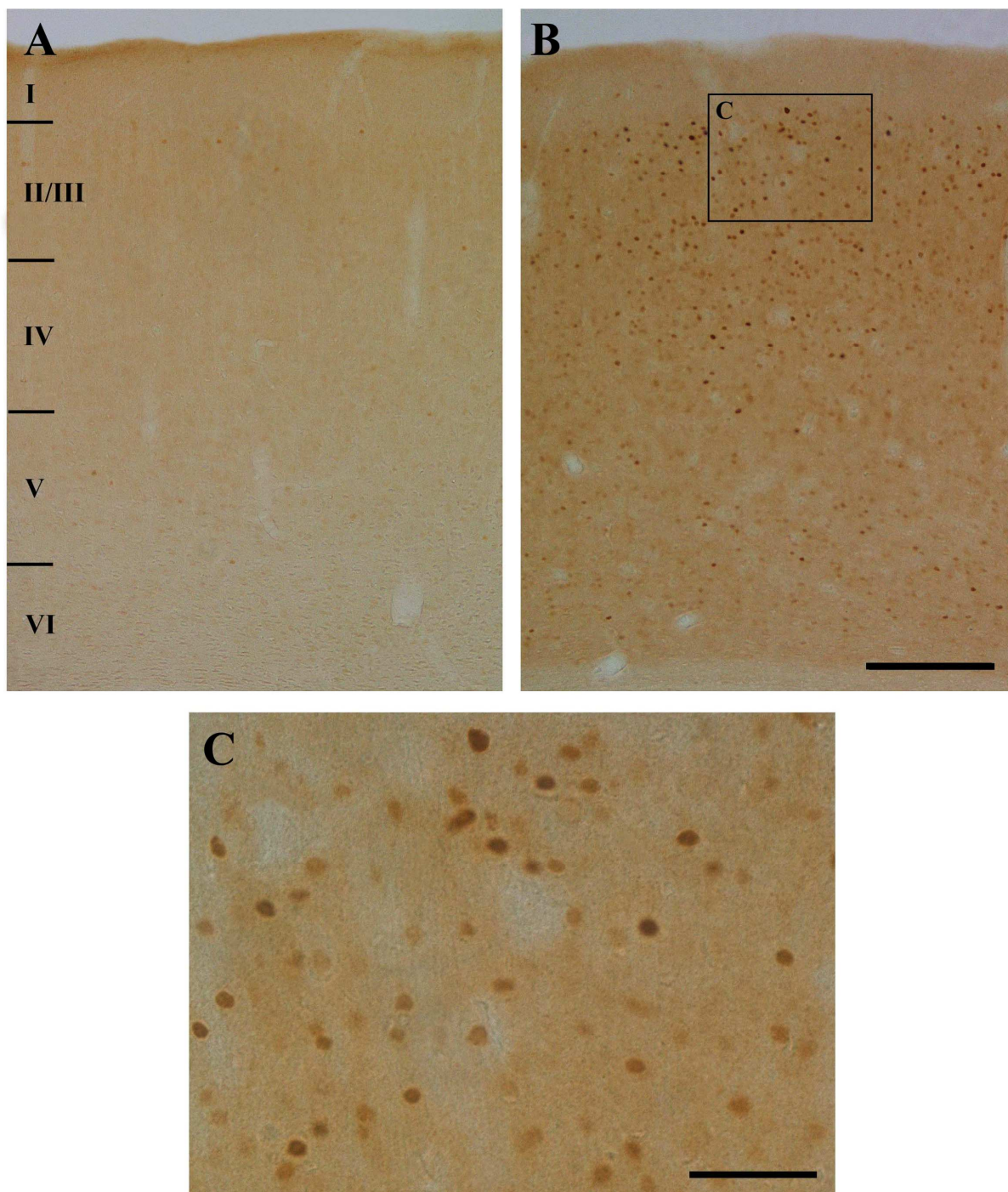
Tras observar los efectos de la alteración del campo magnético en la inducción del c-Fos en los estratos superficiales del CS, nos planteamos analizar su efecto en la activación de células de la CV1, así como de otras regiones corticales no implicadas con el procesamiento de la información visual, la corteza motora primaria (CM1) y la corteza auditiva primaria (CA1), en animales adultos control. Las tres regiones corticales estudiadas presentaron un elevado nivel de inducción del c-Fos tras estímulos magnéticos, en todas las capas con excepción de la capa I, en comparación con la expresión basal observada en los animales sin estimular. En la CV1 la mayor inducción de la proteína c-Fos se localizó en las capas II/III, donde las células se encontraron muy intensamente teñidas. En la capa IV también se vio una elevada densidad de células inmunomarcadas aunque levemente teñidas. En la capa V y VI se mostró una densidad de células c-Fos positivas intensamente teñidas elevada (Fig. 25). Tanto en la CM1 como en la CA1, la inducción del c-Fos fue similar a la observada en la CV1 siendo las capas II/III y IV las regiones que más intensa y densamente se encontraron marcadas, sin embargo, en la CA1 en la capa V tanto la densidad como la intensidad de la tinción fue moderada (Fig. 26 y 27).



**Fig. 25. Corteza visual primaria de animales control y sometidos a estimulación magnética mostrando la expresión de c-Fos.** Los animales control apenas presentan expresión de c-Fos en la CV1 (A), mientras que la estimulación magnética provoca un fuerte incremento de los niveles de c-Fos en todas las capas de la CV1, con excepción de la capa I (B). (C) Detalle del área encuadrada en B. CV1, corteza visual primaria. Barras de escala (A y B): 200  $\mu\text{m}$ ; (C): 50  $\mu\text{m}$ .



**Fig. 26. Corteza motora primaria de animales control y sometidos a estimulación magnética mostrando la expresión de c-Fos.** La expresión basal de c-Fos en las distintas capas de la CM1 de ratas control es moderada. (A) Como resultado de la estimulación magnética tiene lugar un incremento notable de los niveles de c-Fos en todas las capas de la CM1, con excepción de la capa I (B). (C) Detalle del área encuadrada en B. CM1, corteza motora primaria. Barras de escala (A y B): 200  $\mu\text{m}$ ; (C): 50  $\mu\text{m}$ .



**Fig. 27. Corteza auditiva primaria de animales control y sometidos a estimulación magnética mostrando la expresión de c-Fos.** Los animales control muestran un reducido nivel de expresión basal de células c-Fos positivas en la CA1 (A), mientras que la estimulación magnética provoca un fuerte incremento de los niveles de c-Fos, principalmente, en las capas II/III y IV de la CA1 (B). (C) Detalle del área encuadrada en B. CA1, corteza visual primaria. Barra de escala (A y B): 200  $\mu\text{m}$ ; (C): 50  $\mu\text{m}$ .

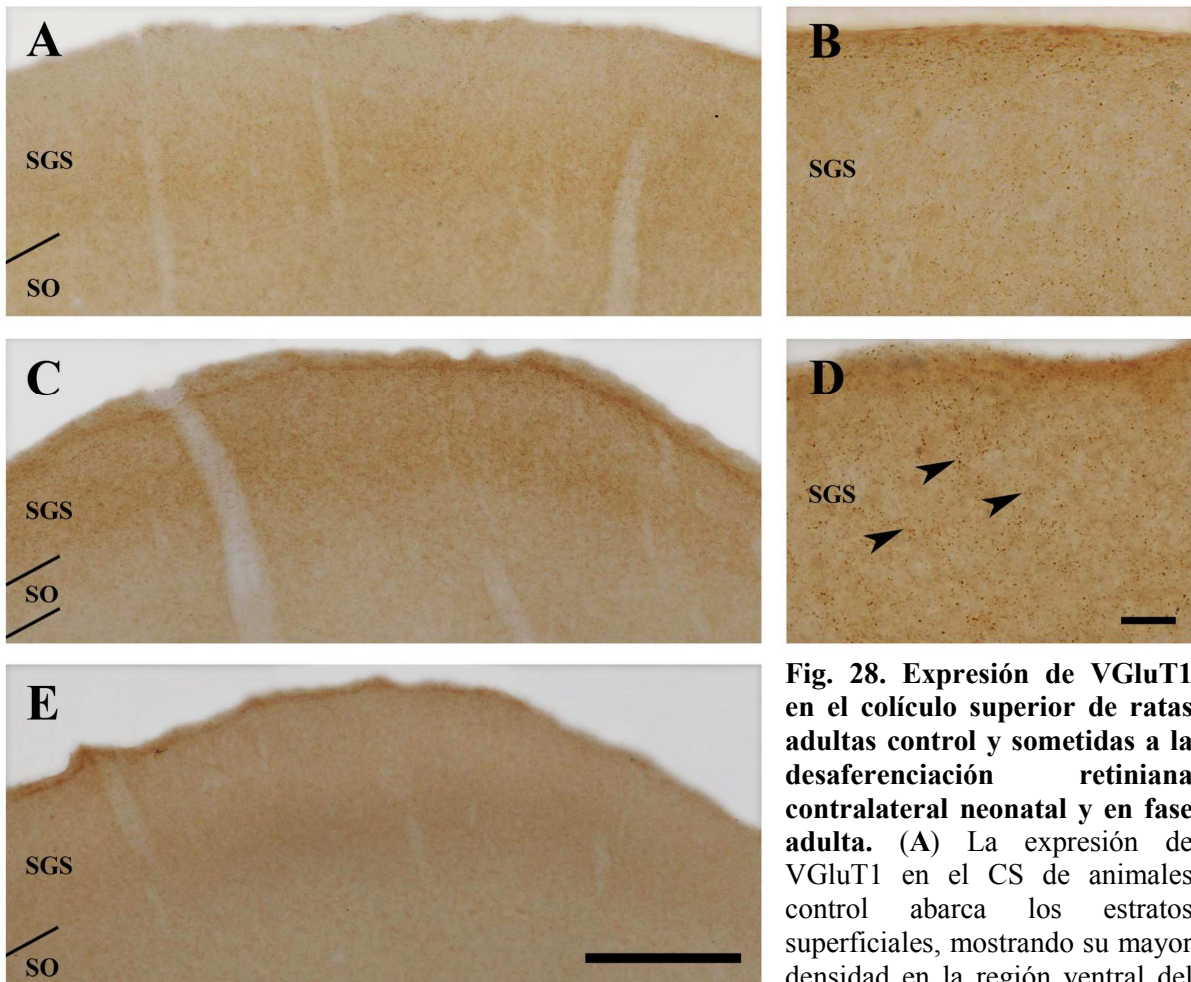


#### **4.5.3. Posible contribución de la conexión corticocolicular visual en la inducción de c-Fos en los estratos superficiales del colículo superior**

Teniendo en cuenta la expansión de la conexión corticocolicular tras la enucleación neonatal observada en trabajos previos de nuestro grupo de investigación (García del Caño et al., 1997, 2002), y dado que el transportador vesicular de glutamato (VGluT) de los terminales axónicos excitatorios provenientes de la CV1 es el VGluT1 (Fujiyama et al., 2003; revisado por Fremeau et al., 2004), analizamos los posibles cambios en el patrón de expresión de VGluT1 tras la desaferenciación practicada neonatalmente o en el adulto, con el fin de aclarar la posible contribución del aumento de este campo terminal en la activación de c-Fos en los estratos superficiales del CS inducida por alteraciones del campo magnético.

##### ***4.5.3.1. Patrón de expresión del transportador de glutamato vesicular 1 en animales adultos sometidos a desaferenciación retiniana neonatal o en fase adulta.***

Los estratos superficiales del CS de los animales control, presentaron en toda su extensión numerosos terminales de tamaño pequeño positivos para el VGluT1, aunque con una densidad de marcado diferencial. En la mitad ventral del SGS se observó la mayor densidad de terminales inmunorreactivos con una distribución más empaquetada que en el SGS dorsal y el SO que mostraban una menor densidad y una localización más dispersa de terminales. La retirada de estímulos provenientes de la retina provocó una profunda alteración del patrón de marcado del VGluT1 en los estratos visuales del CS contralateral cuando la lesión tuvo lugar neonatalmente. Los terminales inmunorreactivos en el SO y en la porción ventral del SGS mantuvieron la densidad y la distribución del marcado. Sin embargo, la densidad de terminales teñidos para VGluT1 en la región dorsal del SGS se vio muy incrementada, pudiéndose observar botones formando agrupaciones de tipo perineuronal. A diferencia de las ratas lesionadas neonatalmente, la evisceración en el adulto no dio lugar a diferencias detectables en comparación con los estratos visuales coliculares de los animales control (Fig. 28).



**Fig. 28. Expresión de VGluT1 en el colículo superior de ratas adultas control y sometidas a la desaférenciación retiniana contralateral neonatal y en fase adulta.** (A) La expresión de VGluT1 en el CS de animales control abarca los estratos superficiales, mostrando su mayor densidad en la región ventral del SGS. (B) Porción dorsal del SGS

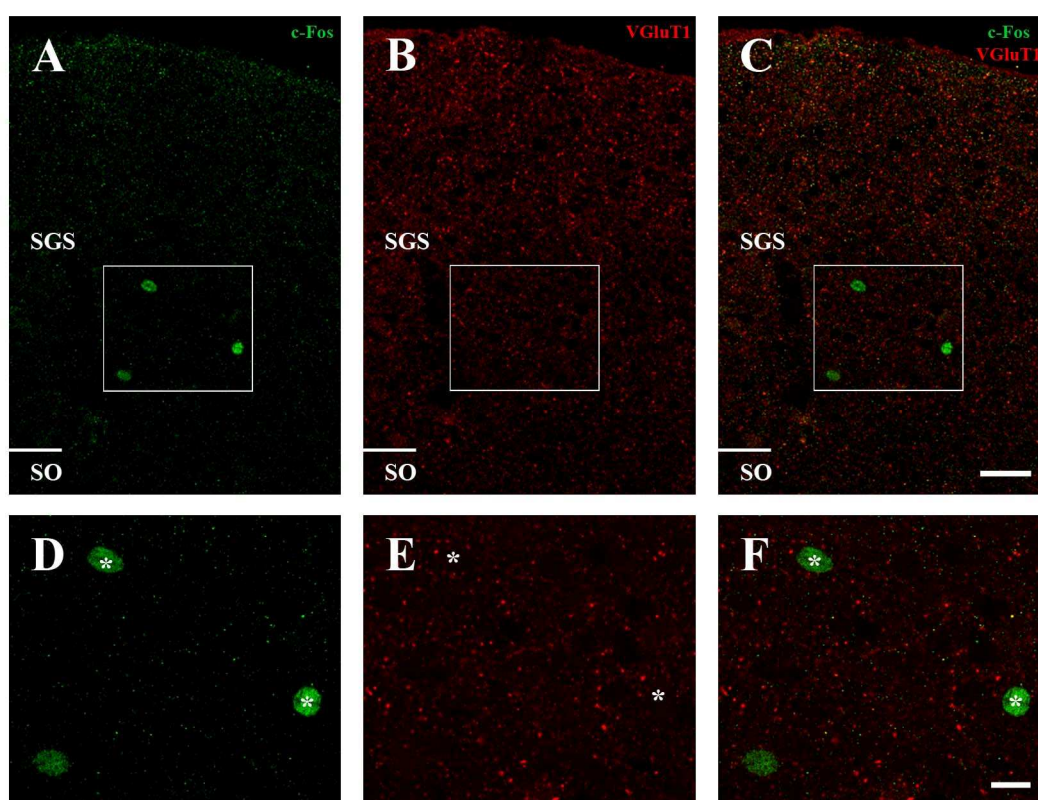
de animales control mostrando botones dispersos a lo largo de su extensión. (C) En el CS contralateral de los animales desaférenciados neonatalmente se observa un incremento notable de la expresión de VGluT1, principalmente en la mitad dorsal del SGS. (D) En la porción superior del SGS de los animales enucleados neonatalmente la densidad de botones se ve incrementada respecto a los animales control. Estos botones se disponen formando agrupaciones perineuronales (cabeza de flecha). (E) Cuando la desaférenciación retiniana tiene lugar en la fase adulta el patrón de expresión apenas se ve alterado en el lado contralateral a la lesión respecto a los animales control. SGS, estrato gris superficial. SO, estrato óptico. Barras de escala (A, C y E): 250 µm; (B y D): 30 µm.

#### *4.5.3.2. Expresión del transportador de glutamato vesicular 1 y de c-Fos mediante doble inmunofluorescencia en el estrato gris superficial del colículo superior de animales sometidos a desaférenciación retiniana neonatal*

Mediante doble inmunofluorescencia se analizó el patrón de marcado de VGluT1 y c-Fos con el fin de determinar si el aumento de terminales corticoculiculares visuales inmunorreactivos para VGluT1 observado en el SGS de ratas enucleadas neonatalmente podría estar mediando la inducción de la expresión de c-Fos, que se ve significativamente

incrementada en estos animales, tras la exposición a cambios en la polaridad del campo magnético.

El análisis de la distribución de VGluT1 y c-Fos, demostró que la disposición de los terminales VGluT1 inmunorreactivos formando agrupaciones de tipo perineuronal se encontraban rodeando células c-Fos inmunopositivas, lo que puede indicar que la activación transináptica del c-Fos en el SGS por estímulos magnéticos, al menos en parte, podría estar mediada por terminales corticocoliculares visuales (Fig. 29).

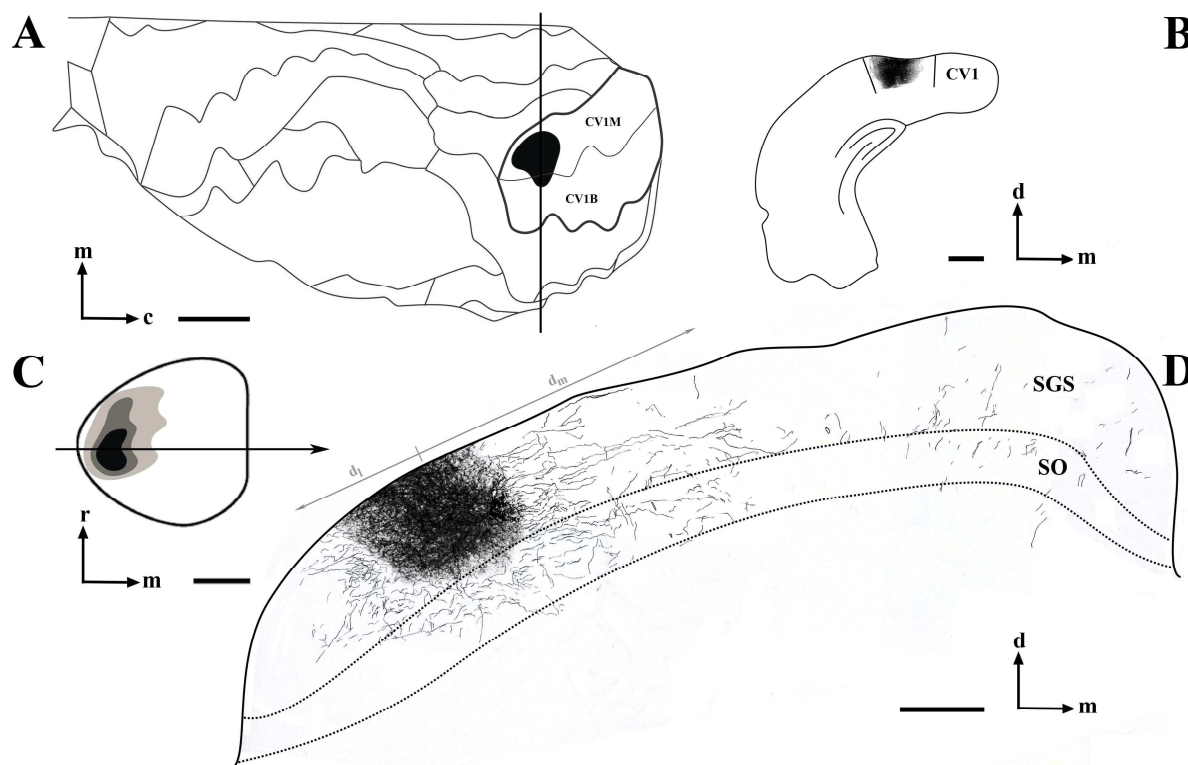


**Fig. 29. Marcado doble de VGluT1 y c-Fos en el estrato gris superficial del CS de ratas adultas desafereciadas neonatalmente.** (A) En verde se observa el marcado de c-Fos en el SGS. (B) En rojo se muestra el marcado de VGluT1 formando agrupaciones perineuronales en el SGS. (C) El marcado doble muestra agrupaciones de terminales VGluT1 presinápticos rodeando células c-Fos positivas. (D, E y F) Detalle del área encuadrada en A, B y C, respectivamente. SGS, estrato gris superficial. SO, estrato óptico. Barras de escala (A, B y C): 30  $\mu$ m; (D, E y F): 10  $\mu$ m.

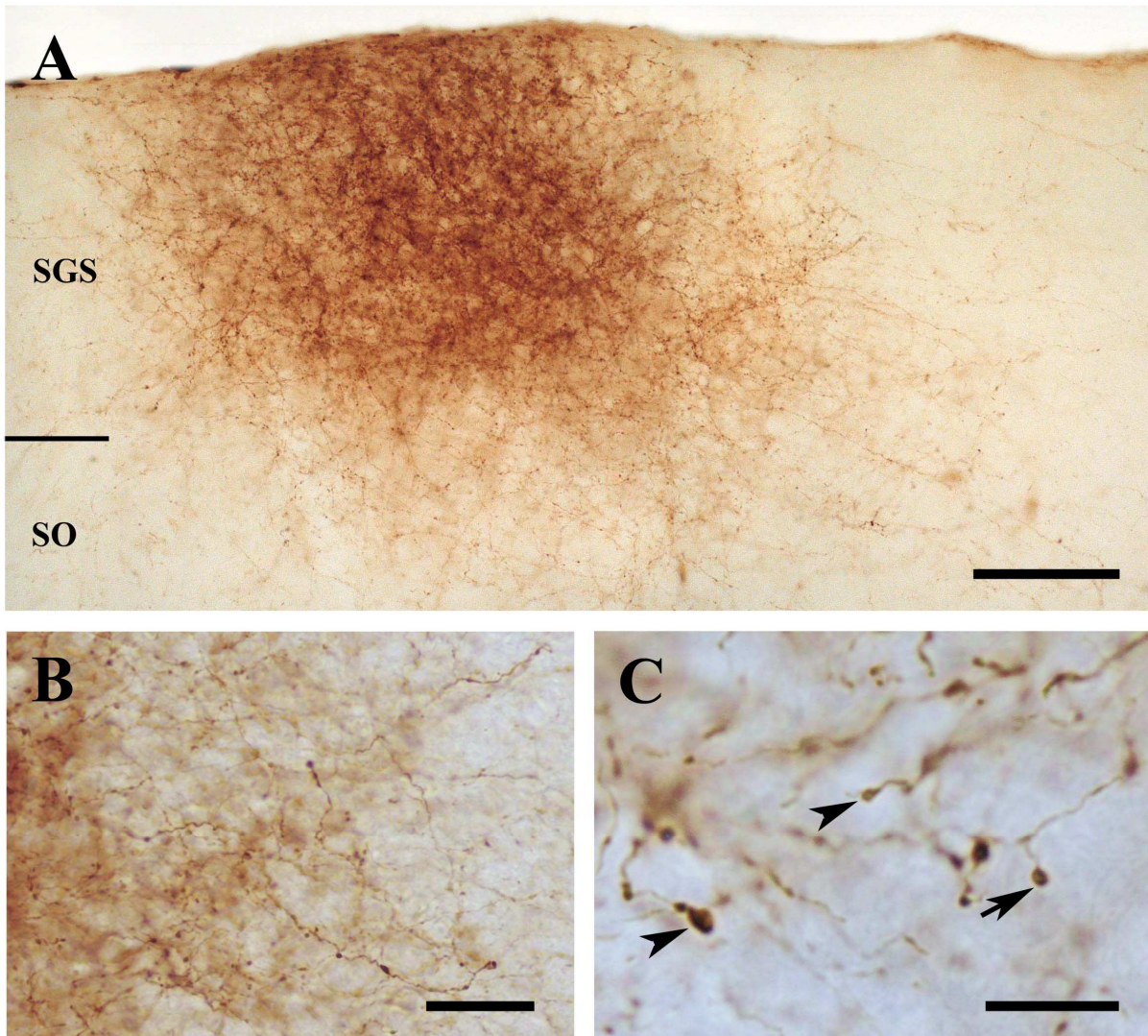
#### 4.5.4. Efecto de la exposición a un campo magnético con polaridad alternante en la organización del campo terminal corticocolicular visual de animales sometidos a desafereñación retiniana en fase adulta

Tras observar el importante efecto en la inducción del c-Fos que la alteración en la polaridad del campo geomagnético provocaba en el CS de los animales con lesiones visuales, y teniendo en cuenta que la expresión de estas moléculas de expresión temprana modulan la expresión de otras moléculas que pueden dar lugar a cambios a largo plazo (Sheng y Greenberg, 1990; Morgan y Curran, 1991), consideramos la posibilidad de que pudiera tener algún efecto en la alteración de la conexión corticocolicular visual de ratas lesionadas en fase adulta.

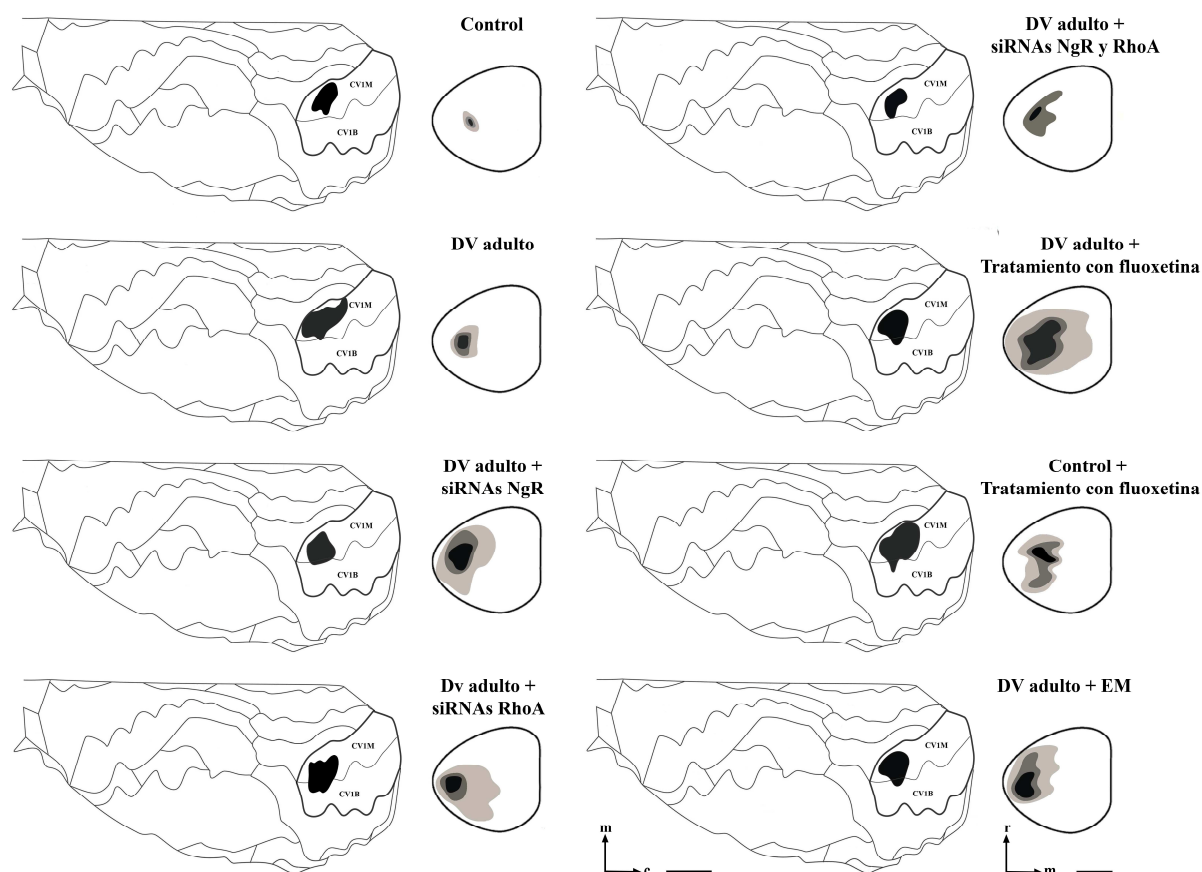
La exposición a un campo magnético alternante dio lugar a una leve expansión del campo terminal en sentido lateromedial. Sin embargo, no provocó un cambio notorio en la morfología del centro del campo terminal corticocolicular visual respecto a los animales eviscerados en fase adulta, manteniendo la forma columnar que abarcaba un área comprendida entre el SO dorsal y el SZ del CS. Las fibras de calibre medio-groeso procedentes de la CV1 alcanzaban el SO y formaban una densa red en el SGS. En el centro de la proyección los axones presentaban abundantes botones a lo largo de su trayectoria. Las ratas sometidas a estimulación magnética presentaban fibras de grosor y longitud intermedia, principalmente localizadas en el SGS, alejándose del centro del campo terminal hacia el extremo lateral, y en mayor medida hacia la línea media, del CS (450-550  $\mu\text{m}$  y 650-750  $\mu\text{m}$ , respectivamente). Muchos de estos axones, de apariencia rectilínea, se disponían paralelos a la superficie pial. La mayoría de las fibras que se alejaban presentaban numerosos botones *en passant* de muy pequeño tamaño a lo largo de su trayectoria. Además, se pudieron observar axones con engrosamientos terminales, así como axones con pequeñas ramas con engrosamiento terminal indicativos de un posible fenómeno de crecimiento axonal (Fig. 30, 31 y 32).



**Fig. 30.** Lugar de inyección del trazador y efecto de la exposición a un campo magnético con la polaridad cambiante en la organización del campo terminal corticocolicular visual de ratas sometidas a desafereñación retiniana en estadio adulto. (A) Reconstrucción del lugar de inyección del trazador en la CV1, realizada sobre un mapa estereotáxico dorsal de la corteza de la rata (adaptado de Zilles, 1985). (B) Corte coronal mostrando el centro del lugar de inyección correspondiente al nivel de la línea vertical dibujada en A. (C) Localización del campo terminal en la superficie dorsal del CS. El área coloreada en negro corresponde a la zona de mayor densidad de fibras. Las áreas coloreadas en grises de intensidad decreciente corresponden a las zonas de densidad decreciente de axones. (D) Dibujo panorámico del campo terminal en una sección coronal del CS al nivel de la línea horizontal representada en C. La distancia a la que se alejan las fibras en sentido lateral (450-550  $\mu\text{m}$ ) y medial (650-750  $\mu\text{m}$ ) viene representada por “ $d_l$ ” y “ $d_m$ ”, respectivamente. CV1, corteza visual primaria; CV1B, corteza visual primaria binocular; CV1M, corteza visual primaria monocular; c, caudal; d, dorsal; m, medial; r, rostral; SGS, estrato gris superficial; SO, estrato óptico. Barras de escala (A): 2 mm; (B y C): 1 mm; (D): 250  $\mu\text{m}$ .



**Fig. 31. Microfotografías del campo terminal corticocolicular visual tras la exposición a un campo magnético con la polaridad cambiante en ratas sometidas a desaferenciación retiniana en estadio adulto. (A)** Como consecuencia de la estimulación magnética se observa un incremento de fibras que se dirigen hacia regiones más laterales, y en mayor medida, mediales del CS. **(B)** Fibras alejándose del centro del campo terminal dirigiéndose hacia la línea media colicular. **(C)** Fibras con engrosamientos terminales (cabeza de flecha) y pequeñas ramas con engrosamiento terminal (flecha). SGS, estrato gris superficial, SO, estrato óptico. Barras de escala (A): 100  $\mu\text{m}$ ; (B): 30  $\mu\text{m}$ .; (C): 10  $\mu\text{m}$ .



**Fig. 32. Resumen del efecto de las diferentes condiciones experimentales en la organización del campo terminal corticocolicual visual de ratas adultas.** Para cada caso experimental: a la izquierda se muestra el área que abarca el lugar de inyección del trazador realizada sobre un mapa estereotáxico dorsal de la corteza cerebral de rata (adaptado de Zilles, 1985); a la derecha el campo terminal corticocolicual visual en la superficie dorsal del CS. La administración de siRNAs frente a NgR y, más notablemente frente a RhoA, en la CV1 de animales sometidos a desaferenciación retiniana en fase adulta da lugar a un incremento de fibras que se dirigen hacia regiones más laterales y mediales del CS. Asimismo, el tratamiento crónico con fluoxetina en animales desaferenciados provoca una considerable expansión de la proyección corticocolicual visual de estos animales, con un aumento de fibras localizadas en regiones más mediales y laterales del CS. La estimulación magnética también da lugar a la presencia de fibras en regiones más mediales y laterales. Las áreas coloreadas en grises de intensidad decreciente corresponden a las zonas de densidad decreciente de axones. CV1B, corteza visual primaria binocular; CV1M, corteza visual primaria monocular; c, caudal; m, medial; r, rostral. Barras de escala, vista dorsal de la corteza cerebral: 2 mm; vista dorsal del CS: 1 mm.

#### 4.5.5. Estudio cuantitativo de la expresión de BDNF tras la exposición a un campo magnético con polaridad alternante

El aumento de fibras que escapan de la región central de la proyección expuestas al campo geomagnético alterado en ratas enucleadas de adulto nos llevó a estudiar qué moléculas implicadas en el crecimiento axonal estaban mediando este fenómeno de reinstauración de la plasticidad tras la exposición a cambios en la polaridad del campo magnético. Puesto que el BDNF se ha demostrado que juega un papel significativo en el crecimiento de neuritas (Ahmed et al., 1995; Avwenagha et al., 2003) procedimos a analizar posibles cambios en la expresión de esta proteína en la corteza visual (CV) y en el CS de animales adultos control y sometidos a enucleación neonatal tras la exposición durante 11 días a un campo magnético con polaridad cambiante.

Los resultados mostraron que como consecuencia de la estimulación magnética los niveles de BDNF se encontraban incrementados significativamente en la CV tanto de animales ilesos ( $10,63 \pm 0,81$  ng/ $\mu$ g de proteína) ( $n=3$ ;  $p<0,05$ ) como de lesionados neonatalmente ( $17,65 \pm 1,40$  ng/ $\mu$ g de proteína) ( $n=3$ ;  $p<0,01$ ) respecto a los no estimulados ilesos ( $3,84 \pm 1,83$  ng/ $\mu$ g de proteína) y desaferenciados ( $9,37 \pm 0,70$  ng/ $\mu$ g de proteína), respectivamente. Además como consecuencia de la desaferenciación neonatal se produjo un incremento del BDNF respecto a los controles aunque las diferencias no resultaron significativas en los animales no estimulados. Sin embargo, sí se detectaron estas diferencias en los animales estimulados, observándose un aumento significativo de BDNF en los animales enucleados neonatalmente respecto a los ilesos ( $n=3$ ;  $p<0,05$ ). Las mayores diferencias de los niveles de BDNF en la CV se encontraron al comparar los animales control no estimulados con los desaferenciados visualmente de recién nacido y estimulados magnéticamente de adulto, situación experimental que mostró los niveles más elevados de BDNF en la CV ( $n=3$ ;  $p<0,001$ ) (Fig. 33).

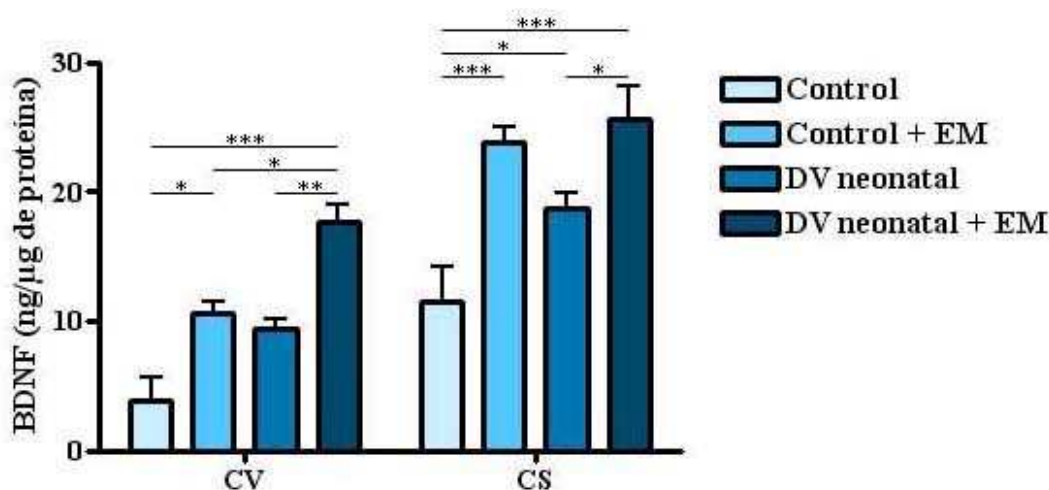
Los niveles proteicos de BDNF en el CS se vieron notablemente afectados tras la exposición al campo magnético alterado. Al igual que en la CV se produjo un incremento del BDNF tras la estimulación magnética tanto en los animales control ( $23,73 \pm 1,24$  ng/ $\mu$ g de proteína) ( $n=3$ ;  $p<0,001$ ) como en los sometidos a desaferenciación retiniana neonatal ( $25,61 \pm 2,61$  ng/ $\mu$ g de proteína) ( $n=3$ ;  $p<0,05$ ) en comparación con los animales sin estimular control ( $11,57 \pm 2,70$  ng/ $\mu$ g de proteína) y con los desaferenciados ( $18,71 \pm 1,22$  ng/ $\mu$ g de



proteína), respectivamente. Asimismo, en los animales no estimulados la enucleación provocó un aumento significativo del BDNF respecto a los controles ( $n=3$ ;  $p<0,05$ ), no observándose estas diferencias significativas tras la estimulación magnética de ambos grupos de animales. Tal y como ocurría en la CV, los animales enucleados neonatalmente y estimulados de adulto presentaron los niveles más altos de BDNF en el CS, siendo notablemente superiores a los observados en los animales control sin estimular ( $n=3$ ;  $p<0,001$ ) (Fig. 33).

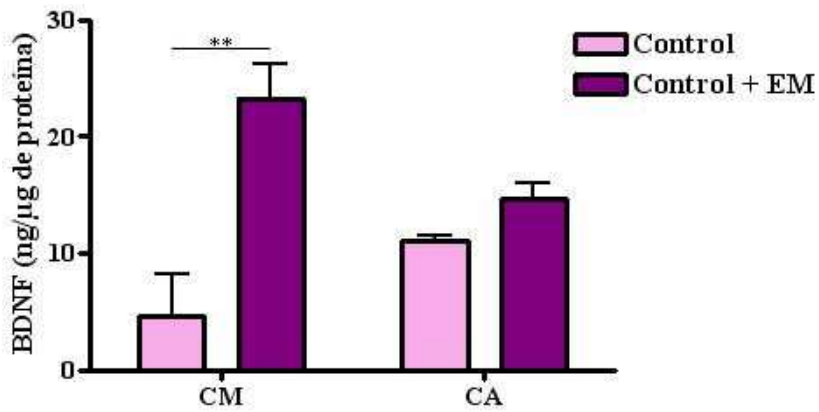
La exposición de los animales control a un campo magnético con la polaridad alternante provocó, también, un incremento significativo de los niveles BDNF en la corteza motora (CM) ( $23,27 \pm 2,92$  ng/ $\mu$ g de proteína) respecto a los no estimulados ( $4,54 \pm 3,66$  ng/ $\mu$ g de proteína) ( $n=3$ ;  $p<0,01$ ). Además se observó un ligero aumento del BDNF en la corteza auditiva (CA) en los animales sometidos a estimulación magnética ( $14,61 \pm 1,42$  ng/ $\mu$ g de proteína) en comparación con los no estimulados ( $11,10 \pm 0,47$  ng/ $\mu$ g de proteína), aunque estas diferencias no fueron significativas (Fig. 34).

BDNF (ng/ $\mu$ g de proteína)	Control	Control + EM	DV neonatal	DV neonatal + EM
CV	$3,84 \pm 1,83$	$10,63 \pm 0,81$	$9,37 \pm 0,70$	$17,65 \pm 1,40$
CS	$11,57 \pm 2,70$	$23,73 \pm 1,24$	$18,71 \pm 1,22$	$25,61 \pm 2,61$

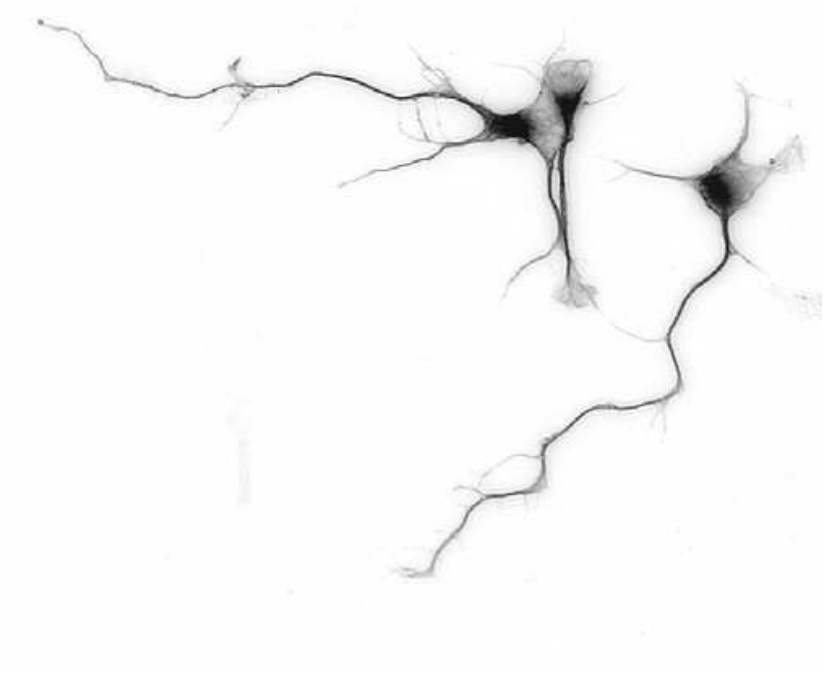


**Fig. 33.** Tabla de datos y gráfica que muestra los cambios en los niveles de la proteína BDNF en la corteza visual y el colículo superior en animales control y con desafereñación visual neonatal sometidos a un campo geomagnético con la polaridad alterada. Los animales enucleados neonatalmente presentaron un incremento de los niveles de BDNF en la CV, y de manera significativa en el CS, respecto a los controles. Tras la estimulación magnética, tanto los animales control como los enucleados neonatalmente mostraron un aumento significativo de los niveles de BDNF en la CV y en el CS en comparación con los no estimulados. CS, colículo superior; CV, corteza visual; DV, desafereñación visual; EM, estimulación magnética. Los datos se presentan como los promedios de la concentración de proteína (ng de BDNF/ $\mu$ g de proteína total)  $\pm$  SEM (\*)  $p<0,05$ ; (\*\*)  $p<0,01$ ; (\*\*\*)  $p<0,001$ .

BDNF (ng/μg de proteína)	Control	Control + EM
CM	4,54 ± 3,66	23,27 ± 2,92
CA	11,10 ± 0,47	14,61 ± 1,42



**Fig. 34. Tabla de datos y gráfica que muestra los cambios en los niveles de la proteína BDNF en la corteza motora y la corteza auditiva en animales control sometidos a un campo geomagnético con la polaridad alterada.** Tras la estimulación magnética los animales mostraron un aumento de los niveles de BDNF en la CA, y de manera significativa en la CM en comparación con los no estimulados. CA, corteza auditiva; CM, corteza motora; EM, estimulación magnética. Los datos se presentan como los promedios de la concentración de proteína (ng de BDNF/μg de proteína total) ± SEM (\*\*) $p < 0,01$ .



## ***5. DISCUSIÓN***



## 5. DISCUSIÓN

Los hallazgos obtenidos en el presente trabajo de tesis corroboran la disminución de la respuesta plástica de la conexión retinocolicular cuando el daño se produce en el sistema visual maduro, empleando como modelos de lesión la desaferenciación retiniana y/o la ablación del colículo superior (CS) en ratas neonatales y adultas. Además, se muestra la elevada capacidad de regeneración y reorganización estructural del CS durante el desarrollo postnatal temprano tras su ablación neonatal, consistente en la reorganización de las conexiones retino- y corticocoliculares aferentes, y en cambios en el patrón de distribución de las neuronas locales y de los astrocitos.

Por otro lado, basándonos en los resultados obtenidos en trabajos anteriores desarrollados en nuestro laboratorio en los que se ha demostrado que la desaferenciación retiniana neonatal da lugar a la expansión de la proyección visual corticocolicular ipsilateral, mientras que esta expansión no tiene lugar cuando la lesión se lleva a cabo en estadio adulto (García del Caño et al., 2002), se han abordado diferentes estrategias dirigidas a promover la plasticidad postlesional de esta conexión en el sistema nervioso maduro. En este sentido, ponemos de manifiesto la eficacia de la administración de RNAs pequeños de interferencia (siRNAs) frente a las moléculas inhibitoras del crecimiento axonal, el Nogo receptor (NgR) y el RhoA, en el origen de la vía visual corticocolicular, en la reducción de la expresión de dichas moléculas, y consecuentemente en la promoción del crecimiento axonal tras la desaferenciación retiniana en fase adulta. Asimismo, demostramos que el tratamiento crónico con fluoxetina favorece notablemente la respuesta plástica ante este tipo de lesión.

Mediante inmunodetección del gen temprano *c-fos*, mostramos que la exposición a un campo magnético alterado induce la activación de neuronas en los estratos superficiales del CS tras la privación de estímulos visuales. Además, vimos que diferentes regiones corticales, la corteza visual, la auditiva y la motora, presentan neuronas que responden ante estos estímulos magnéticos. Como consecuencia de la exposición de los animales enucleados en estadio adulto a un campo magnético con polaridad cambiante se produce un incremento de la respuesta plástica en la conexión visual corticocolicular, pudiendo estar mediada por el aumento de los niveles del factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) que tiene lugar tras la exposición de los animales a este campo magnético.

A continuación se procederá a discutir estos resultados teniendo en cuenta su relación con los hallazgos descritos por otros autores.

## **5.1. Alteraciones en la organización del campo terminal retinocolicular en animales adultos tras lesiones del sistema visual**

### **5.1.1. Animales control**

El análisis de la organización del campo terminal retinocolicular ipsilateral de ratas adultas control tras la inyección intraocular de la subunidad B de la toxina colérica (CTB) mostró una leve inervación, localizada principalmente en la región anteromedial del estrato óptico (SO), de la porción ventral del estrato gris superficial (SGS) y del estrato zonal (SZ), mientras que se observó una intensa inervación que aumentaba en sentido ventrodorsal de los estratos superficiales contralaterales al lugar de inyección. Estas observaciones coinciden con las mostradas por otros autores que describen que en condiciones normales en roedores adultos la proyección retiniana ipsilateral es reducida y está restringida a la parte rostral del CS, que representa la región binocular central del campo visual (Lund et al., 1980; Insausti et al., 1985; Prichard et al., 2007), y que recibe proyecciones directas de ambos ojos (Thompson, 1979; Frost et al., 1979; Chalupa y Rhoades, 1979). En ratas albinas en torno al 98% de los axones originados en la retina atraviesan el quiasma óptico al lado contralateral (Lund, 1965). En este sentido, trabajos previos han descrito que en ratas adultas ilesas el origen de la proyección retinocolicular ipsilateral está confinada a una región en forma de media luna en la retina inferior temporal, de manera que la conexión retinocolicular ipsilateral está restringida a unos pocos axones localizados en la región anteromedial del SO (Lund et al., 1973). Sin embargo, en ratas pigmentas, dado que el porcentaje de axones de las células ganglionares retinianas que cruzan el quiasma óptico es menor (en torno al 95%), esta proyección ipsilateral se encuentra incrementada (Lund, 1965).

Aunque se ha descrito que en roedores la proyección ipsilateral se localiza principalmente en el SO dentro de la región rostral del CS (Lund y Lund, 1976; Chalupa y Rhoades, 1979), y ocasionalmente en el SO del extremo posterior del CS (Lund y Lund, 1973), otros estudios muestran que la proyección se extiende a la región del SGS más profunda (Frost et al., 1979; Jen et al., 1984), mientras que otros autores describen que la proyección se presenta como axones terminales dispuestos en forma de pequeños parches en la región ventral del SGS (Land y Lund, 1979). A diferencia de estos trabajos, nosotros hemos

observado que no sólo el SO y la región ventral del SGS recibían aferencias ipsilaterales, sino que además el SZ estaba levemente inervado mostrándose como fibras dispersas de pequeña longitud dispuestas perpendicularmente hacia la superficie pial. Esta ligera inervación directa del SZ por fibras de la retina ipsilateral no había sido previamente descrita. Esta discrepancia podría explicarse por la diferente sensibilidad de los trazadores empleados. Varios estudios han demostrado que la inyección intraocular del trazador CTB es óptima para el trazado de las proyecciones retinofugales en mamíferos (Angelucci et al., 1996; Fleming et al., 2006; Prichard et al., 2007), aves (Shimizu et al., 1994; Wu et al., 1999) y reptiles (Reiner et al., 1996). Angelucci y colaboradores, mostraron que la CTB fue el más sensible de los trazadores que analizaron, que incluían la aglutinina del germen de trigo (WGA) y la WGA conjugada a la enzima peroxidasa de rábano (WGA-HRP), dado que permitió el marcado de todas las proyecciones retinianas conocidas, incluso de las ramificaciones terminales más finas, indicando que fue captado virtualmente por todas las células ganglionares retinianas (Angelucci et al., 1996). Además, en comparación con la CTB, la WGA y la WGA-HRP mostraron menos proyecciones a algunas dianas retinianas como es el caso del núcleo supraquiasmático del hipotálamo (Johnson et al., 1988; Mikkelsen y Servieré, 1992), y produjeron un marcado discontinuo y granular, haciéndolos inadecuados para el análisis en detalle de los terminales axónicos (Angelucci et al., 1996). Numerosos trabajos han estudiado las conexiones retinofugales tanto en animales ilesos como en animales sometidos a manipulaciones experimentales como son la desaferenciación retiniana y las lesiones de la retina y del nervio óptico. Sin embargo, la mayoría de estos estudios se han llevado a cabo mediante la inyección de los trazadores peroxidasa de rábano (HRP) (Lund et al., 1980; Serfaty y Linden, 1994; Serfaty et al., 2005) y WGA-HRP (Insausti et al., 1985, Thompson et al., 1995). En el presente trabajo, mediante el empleo de otro trazador, la CTB, corroboramos los resultados obtenidos por otros grupos de investigación y demostramos la alta sensibilidad de la CTB para el marcado anterógrado de la conexión retinocolicular.

Respecto a la proyección procedente de la retina al CS contralateral, nuestras observaciones concuerdan con las mostradas en otros trabajos desarrollados en roedores (Frost et al., 1979) donde se describe un marcado del campo terminal intenso que abarcaba la totalidad de los estratos superficiales coliculares. Beckstead y Frankfurter en animales control describen una conexión directa de la retina al estrato gris intermedio (SGI) contralateral en la rata, el gato y el mono, e ipsilateral en el gato y, de forma más evidente, en el mono (Beckstead y Frankfurter, 1983). En nuestro trabajo no hemos observado esta conexión

directa entre la retina y los estratos intermedios del CS en los animales ilesos. Para poner de manifiesto esta conexión estos autores introducen una modificación en el protocolo de inyección y revelado del trazador HRP, lo que permitió aumentar su sensibilidad (Beckstead y Frankfurter, 1983), por lo que es posible que las distintas sensibilidades de detección de los distintos trazadores empleados estén marcando estas diferencias. Hay que tener en cuenta que ciertos trazadores como el WGA-HRP tras periodos de supervivencia relativamente cortos pueden escapar de los axones y terminales axónicos generando un marcado secundario transneuronal de otras células y procesos (Gerfen et al., 1982) lo que puede dar lugar a una incorrecta interpretación de los resultados, a diferencia del marcado con CTB que no se transporta transinápticamente (Coolen et al., 1999).

### **5.1.2. Efecto de la desaferenciación retiniana neonatal**

Como consecuencia de la desaferenciación retiniana neonatal unilateral la proyección retinocolicular ipsilateral en el adulto se vio notablemente incrementada en todo el eje rostrocaudal de los estratos superficiales mostrando un gradiente creciente en sentido ventrodorsal, mientras que la contralateral no mostró diferencias respecto a los controles. Estas observaciones confirman los resultados obtenidos por otros autores los cuales describen la aparición de una conexión aberrante ipsilateral tras la enucleación neonatal que se encuentra expandida invadiendo regiones del CS que en condiciones normales están reservados para las aferencias contralaterales (Chow et al., 1973; Lund et al., 1980; Insausti et al., 1985; Ostrach et al., 1986; Chan y Jen, 1988).

Se ha observado que en los primeros días postnatales en ratas (Land y Lund, 1979) y hámsters (Insausti et al., 1985) la conexión retinocolicular ipsilateral es amplia y se distribuye a lo largo de toda la superficie de los estratos superficiales del CS alcanzando su región más caudal (Land y Lund, 1979; Insausti et al., 1985). Durante el desarrollo postnatal temprano, en los diez primeros días postnatales en el caso de la rata (Land y Lund, 1979), la mayor parte de la proyección ipsilateral se retrae hasta alcanzar el patrón adulto normal (Land y Lund, 1979; Insausti et al., 1985). Sin embargo, tal y como hemos observado en el presente trabajo, esta retracción se ve afectada si se lleva a cabo la enucleación neonatal del ojo contralateral dando lugar a la persistencia de una distribución ampliada inusual de la proyección ipsilateral (Chow et al., 1973; Lund et al., 1980; Insausti et al., 1985; Ostrach et al., 1986; Chan y Jen, 1988).



Trabajos previos han demostrado que el número de células ganglionares que proyectan ipsilateralmente se encuentra incrementado en animales enucleados neonatalmente tanto en la retina temporal como en la nasal (Sengelaub y Finaly, 1981; Jeffery, 1985) y, como consecuencia, la representación del campo visual ipsilateral se ve aumentada en el CS (Fukuda et al., 1984; Jeffery Thompson, 1986; Reese, 1986). Chan y colaboradores describen que en la rata el número de células ganglionares retinianas que proyectan ipsilateralmente decrece continuamente de más de 3000 en el día del nacimiento a cerca de 1000 en el día postnatal (P)5 (Chan et al., 1989). En contraste, en las ratas sometidas a enucleación neonatal unilateral el número de células ganglionares se ve aumentado siendo más de 4000 en P1, y de ahí decrece hasta alcanzar en P5 un nivel similar al del adulto que es de algo más de 2000 (Chan et al., 1989). Además estas observaciones concuerdan con el trabajo de Thompson y colaboradores en las que muestran en hurones adultos con desaferenciación retiniana unilateral, tanto albinos como pigmentados, un incremento del número de axones ganglionares retinianos procedentes del ojo intacto que proyectan ipsilateralmente (Thompson et al., 1993). Estas evidencias sugieren que como resultado de la enucleación unilateral neonatal no sólo podría producirse un aumento en la falta de retracción de los axones ganglionares retinianos que proyectan ipsilateralmente de forma transitoria en condiciones normales, sino que además podría haber un incremento de esta conexión por desorientación, reorientación y *sprouting* colateral de axones ópticos. Lund y colaboradores determinan que la capacidad de reorganización de los terminales del nervio óptico intacto está restringida a los diez primeros días, y proponen que la proyección aberrante ipsilateral es en buena parte debida a los axones que no han alcanzado el quiasma óptico en el momento de la lesión que son reorientados hacia el lado “incorrecto” (Lund et al., 1973). Existen evidencias que muestran que la aparición de esta conexión retinocolicular ipsilateral aberrante no sólo tiene lugar tras la desaferenciación retiniana, sino también tras otros tipos de manipulaciones experimentales como son las lesiones en la retina (Lund y Lund, 1973; Lund y Lund, 1976) y en el nervio óptico contralateral (Serfaty y Linden, 1994), e incluso en ratas con ausencia congénita de un ojo (Shen, 1987).

El incremento observado de la conexión ipsilateral retinocolicular en animales enucleados neonatalmente tiene una significación en la organización funcional, puesto que estudios electrofisiológicos han demostrado que estos animales mostraban un aumento en la frecuencia y en la respuesta de neuronas coliculares activadas visualmente por la entrada de estímulos de la retina ipsilateral. Además, las respuestas visuales a través del ojo ipsilateral

podían ser registradas en una región más amplia del CS que en los animales control (Thompson, 1979; Rhoades, 1980; Jeffery y Thompson, 1986).

La plasticidad observada en la conexión retinocolicular ipsilateral tras la desaferenciación retiniana neonatal unilateral podría resultar de la interrupción de la interacción binocular de las aferencias de ambas retinas (Serfaty et al., 1990). Como resultado, la retirada selectiva de estímulos desde los axones contralaterales podría reducir la eficacia de la transmisión sináptica global hasta un punto donde el *sprouting* axonal reactivo podría estar desencadenado. Esta hipótesis se apoya en diferentes estudios en los que la transmisión sináptica retinotectal se ve perturbada. En este sentido, se ha mostrado que la serotonina, el principal modulador inhibitorio de la transmisión retinocolicular (Malayev y Debski, 1998), está implicada en el *sprouting* y la reorganización axonal en el CS de mamíferos durante el desarrollo normal (Crnko-Hoppenjans et al., 2001) y tras lesiones de la retina (Bastos et al., 1999). Además, el bloqueo de las señales retrógradas como el óxido nítrico dan lugar a un *sprouting* similar de los axones retinianos ipsilaterales (Campello-Costa et al., 2000; Vercelli et al., 2000). Finalmente, el bloqueo crónico desde el nacimiento de receptores N-metil-D-aspartato (NMDA) mediante antagonistas liberados lentamente por medio del plástico Elvax implantado sobre el CS aumenta el *sprouting* de la proyección ipsilateral tras la desaferenciación parcial de la conexión retinocolicular contralateral (Colonnese y Constantine-Paton, 2001). Estas evidencias podrían sugerir que la perturbación de la señalización sináptica normal podrían estar mediando la expansión de la vía retinocolicular ipsilateral observada tras la desaferenciación retiniana neonatal.

### **5.1.3. Efecto de la desaferenciación retiniana en fase adulta**

Contrariamente a los resultados observados tras la desaferenciación retiniana neonatal, cuando esta lesión se lleva a cabo en ratas adultas no da lugar a una proyección ipsilateral aberrante. Tras la enucleación en el adulto tanto la conexión ipsi- como la contralateral mostraron un patrón de marcado del campo terminal retinocolicular similar al observado en las ratas control. Estos resultados son congruentes con otros trabajos que demuestran que con el aumento de la edad en la que se practica la lesión el incremento de la inervación procedente de la retina ipsilateral se ve reducido (Lund et al., 1973; Lund y Lund, 1976; Shen, 1987). Sin embargo, hay estudios que muestran que tras lesiones practicadas en la madurez se mantiene cierta capacidad de reorganización. Por ejemplo, Serfaty y colaboradores muestran evidencias de la existencia de plasticidad lenta y continua de los axones retinianos ipsilaterales en ratas

adultas con lesiones en la retina contralateral en ratas jóvenes (P21), lo que contrasta con la rápida respuesta plástica de las ratas neonatas en las que los fenómenos de plasticidad son observables a las 48 horas (Serfaty et al., 2005). Por otro lado, Kreutz y colaboradores demuestran en ratas adultas la reorganización en el CS de los axones retinianos intactos tras el aplastamiento parcial del nervio óptico, siendo dependiente de la infiltración de macrófagos en el lugar de la lesión con la subsecuente producción del factor de necrosis tumoral  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) (Kreutz et al., 2004).

#### 5.1.4. Efecto de la ablación del colículo superior neonatal

Con el fin de estudiar el efecto de la ablación neonatal del CS en la organización del campo terminal de la vía retinocolicular se llevó a cabo la aspiración neonatal de los estratos superficiales del CS. Una vez alcanzado el estadio adulto se procedió a la inyección intraocular del trazador CTB contralateral al CS aspirado. Los resultados mostraron que la conexión ipsilateral al lugar de inyección no se encontraba alterada, mientras que la contralateral, que correspondía con el CS dañado, no sólo presentó una elevada capacidad de regeneración estructural, sino que además, los estratos superficiales regenerados se encontraban inervados por axones procedentes de la retina contralateral, aunque con una disposición diferente respecto a la conexión retinocolicular contralateral de los controles. En estos animales en la porción superior del SO se observaron fibras dispuestas oblicuamente en dirección a la superficie pial, mientras que en el SGS y en el SZ la intensidad de inervación se encontraba disminuida en comparación con los controles. Además, el SGI presentaba fragmentos de fibras cortos orientados hacia la superficie colicular.

Nuestras observaciones ponen de manifiesto la elevada capacidad regenerativa de los estratos superficiales del CS tras su aspiración neonatal. Este fenómeno no ha sido descrito anteriormente por otros autores. Existen diversas publicaciones en las que analizan el efecto de lesiones del CS en mamíferos practicadas a edades postnatales tempranas que incluyen lesiones por transección lateromedial (Tan y Harvey, 1997; Dallimore et al., 2010) y por cauterización o daño por calor (Carman y Schneider, 1992; Wu et al., 1998, Dunlop et al., 2007), sin embargo, no mencionan que dicha regeneración tenga lugar. Las diferencias pueden ser debidas a los diferentes métodos de lesión empleados. Por ejemplo, como consecuencia del daño por calor de la superficie tectal el tejido se vuelve necrótico y se forma un quiste en la región lesionada (Wu et al., 1998) que es probable que impida la regeneración.

Cabe preguntarse si la regeneración de los estratos superficiales observada es debida a la formación de nuevas neuronas o a la redistribución de células localizadas en la proximidad del lugar de la lesión. Dado que existen evidencias que muestran que la neurogénesis en el CS de rata finaliza prenatalmente, concretamente entre el día embrionario (E)18 y E20 (Mustari et al., 1979; Altman y Bayer, 1981), postulamos que la regeneración observada tiene lugar por una redistribución de células cercanas a la región dañada, como son las de los estratos intermedios y profundos coliculares. En este sentido, Edwards y colaboradores determinaron que en el ratón tiene lugar la diferenciación del CS que subyace a un crecimiento radial importante y la sublamina arquitectónica de los estratos que avanza de forma secuencial de dentro a fuera desde E17 a P6 (Edwards et al., 1986). Es probable que este fenómeno de regeneración se produzca por una redistribución de las células jóvenes del CS, siendo guiadas en su migración vertical por procesos gliales alineados radialmente (Cooper y Rakic, 1983). Existen evidencias que muestran que la glia radial es abundante durante el desarrollo postnatal temprano en el CS (Pulido-Caballero et al., 1994), que podrían estar mediando esta redistribución.

Estudios anteriores han evidenciado el crecimiento axonal postlesional en diversas conexiones del sistema nervioso central (SNC), entre las que se incluye la ruta retinocolicular (So et al., 1981; Schneider et al., 1985). Trabajos previos han descrito que en ratas neonatales sometidas a transección mediolateral del CS rostral se produce la reinervación postlesional colicular por axones retinianos, pero sólo si la lesión es practicada con anterioridad a P6 (Gan y Harvey, 1986; Tan y Harvey, 1997). Otros estudios han mostrado que el grado de plasticidad está relacionado con el estado de maduración de las conexiones en el momento que tiene lugar la lesión (Schneider et al., 1985; Martin et al., 1994). Se ha determinado que las células ganglionares de la retina se generan entre E13 y E19 (Reese y Colello, 1992). Dallimore y colaboradores ponen de manifiesto que existe una correlación entre la génesis de las células ganglionares de la retina y el tiempo de inervación retinocolicular. En este sentido, muestran que la mayoría de los axones de las células nacidas en E16 han alcanzado el CS en el nacimiento, mientras que pocos axones de células ganglionares nacidas en E18/E19 han alcanzado el CS en P1. Estos últimos inervan el CS gradualmente durante la primera semana postnatal (Dallimore et al., 2002). Además, la inervación retiniana postnatal del CS también se ha observado en el ratón (Godement et al., 1984). Se ha evidenciado que en ratas sometidas a transección rostral del CS en P2 la proporción de axones que alcanzan el CS de forma tardía es mayor que en los animales ilesos, aunque la inervación en los animales lesionados parece

que también se produce por axones dañados que habían alcanzado el CS cuando la lesión fue practicada (Dallimore et al., 2010). En estudios de lesión de médula espinal la plasticidad de los axones corticoespinales resulta primariamente del crecimiento o redirección de axones de crecimiento tardío (Martin et al., 1994). Sin embargo, existen evidencias de que los axones en regeneración pueden también contribuir en la reconstrucción del circuito distal al lugar de transección en algunas de las vías supraespinales descendentes (Wang et al., 1998). Teniendo en cuenta estos datos, se podría interpretar que la inervación postlesional del CS por aferencias de la retina contralateral observada puede ser llevada a cabo por axones que no habían sido afectados por el daño inicial y que alcanzaban el CS tras la lesión, aunque no se puede descartar que sea por la regeneración de axones dañados, o una combinación de ambos.

Como se ha mencionado anteriormente, algunos trabajos han descrito la existencia de una conexión contralateral directa entre la retina y el SGI (Beckstead y Frankfurter 1983). En nuestro trabajo no hemos observado esta conexión directa en condiciones normales. Sin embargo, tras la ablación neonatal del CS, el SGI se encontraba ligeramente inervado por fibras procedentes de la retina. En consistencia con estos resultados, se ha observado que en el hámster como consecuencia de la lesión por calor bilateral de los estratos superficiales del CS los axones retinianos proyectan a los estratos intermedios y profundos remanentes así como a otros núcleos del sistema visual subcortical (Carman y Schneider, 1992). Asimismo, lesiones unilaterales del CS de marsupiales por cauterización daban lugar a una proyección anómala de los estratos coliculares no-retinorrecipientes del CS dañado (Dunlop et al., 2007).

#### **5.1.5. Efecto conjunto de la ablación del colículo superior y la desaferenciación retiniana neonatal**

Tras observar la alta capacidad regenerativa de los estratos superficiales coliculares y el mantenimiento de la conectividad retinocolicular tras la ablación neonatal del CS, analizamos el efecto combinado de esta lesión junto con la enucleación neonatal del ojo contralateral al CS dañado en la organización del campo terminal retinocolicular adulto mediante la inyección del trazador intraocular ipsilateral al CS lesionado. La organización del campo terminal ipsilateral al globo ocular inyectado, es decir, del CS dañado neonatalmente, presentó una densa inervación desde la región dorsal del SO aumentando en intensidad en dirección a la superficie pial. Esta conexión aberrante ipsilateral difería notablemente en comparación con la conexión ipsilateral de los controles, que a penas mostraban inervación retinocolicular. Sin embargo, presentaba una alta similitud con la conexión aberrante

observada en los animales con desaferenciación retiniana neonatal descrita anteriormente. Dado que estos animales fueron sometidos a la ablación de los estratos superficiales neonatalmente, la aparición de la conexión aberrante observada no pudo ser debida a la falta de retracción de los axones ganglionares retinianos que proyectan ipsilateralmente transitoriamente en animales ilesos (Land y Lund, 1979; Insausti et al., 1985). Esta invasión postlesional que da lugar a una proyección retinocolicular incrementada podría ser llevada a cabo por axones de las células ganglionares de nacimiento tardío (Dallimore et al., 2002) que no han alcanzado el quiasma óptico cuando la lesión fue practicada y son reorientados (Lund et al., 1973).

La vía retinocolicular contralateral en estadio adulto de estos animales sometidos a ambas lesiones neonatales, aunque no difería en los estratos superficiales coliculares respecto a los controles, presentaba invasión del SGI mostrándose como pequeños fragmentos de fibras dispuestos en su mayoría verticalmente hacia la superficie pial. De nuevo, esto concuerda con trabajos previos que demuestran que lesiones neonatales de los estratos superficiales del CS en mamíferos dan lugar a una invasión de los estratos intermedios coliculares (Carman y Schneider, 1992; Dunlop et al., 2007).

#### **5.1.6. Efecto de la ablación del colículo superior en fase adulta**

A diferencia de la alta capacidad regenerativa y de reorganización de las conexiones retinocoliculares tras la ablación neonatal del CS, la ablación en fase adulta del CS produjo un daño permanente que impidió la regeneración estructural del área aspirada y, consecuentemente, el reestablecimiento de la conexión retinocolicular. La conexión ipsilateral correspondiente con el CS no dañado no mostró diferencias en comparación con los animales control. En los casos en los que la aspiración practicada no fue completa, tras la inyección intraocular del trazador CTB contralateral al CS aspirado, el campo terminal contralateral remanente tampoco difería respecto a los controles. Es conocido que la respuesta regenerativa de las neuronas axotomizadas en los mamíferos adultos es muy reducida, restringiéndose a cambios de pequeña escala en la conectividad neuronal y la organización sináptica (Raisman, 1985). La formación de proyecciones aberrantes es una respuesta frecuente frente a lesiones del SNC que ocurren durante los estadios tempranos de desarrollo, pero no en lesiones en mamíferos adultos. Estas observaciones indican la limitada respuesta plástica ante este tipo de lesión demostrando la ya conocida reducción de la plasticidad tras lesiones practicadas en el SNC adulto.

En este trabajo no analizamos la significación funcional de este tipo de lesión, pero se ha determinado que cuando el CS es lesionado o denervado durante la fase adulta la función de orientación visual se ve profundamente dañada en cualquier región del campo visual (Carman y Schneider, 1992).

### **5.2. Organización del campo terminal corticocolicular visual en animales adultos sometidos a ablación del colículo superior neonatal**

En este trabajo ponemos de manifiesto que la ablación neonatal del CS no impidió el establecimiento normal de la organización visual corticocolicular ipsilateral, mostrándose innervación del CS dañado neonatalmente. La morfología observada presentaba una disposición columnar del campo terminal similar a la descrita en trabajos previos desarrollados en nuestro grupo de investigación en ratas control (García del Caño et al., 2002). Estas observaciones son consistentes con los resultados descritos por Tan y Harvey que muestran que ratas sometidas a la transección del CS en P2 presentan innervación postlesional del CS por axones corticales, observándose aferencias corticales incluso cuando la lesión se llevaba a cabo en P6 (Tan y Harvey, 1997). Se ha determinado que la llegada de las primeras aferencias corticocoliculares tiene lugar en P3/P4, y la organización del campo terminal visual corticocolicular característico del animal adulto se establece de P13 a P19 (Thong y Dreher, 1987). El hecho de que a pesar de que los animales fueran sometidos a esta lesión colicular mostraran innervación por fibras procedentes de la corteza visual con una organización similar a los animales ilesos podría ser debido a que la llegada de axones corticales a los estratos superficiales sea posterior a la regeneración estructural del CS observada.

### **5.3. Alteraciones en el patrón de expresión de proteínas ligantes de calcio y de GFAP en los estratos superficiales del colículo superior de animales adultos sometidos a lesiones neonatales del sistema visual**

Dada la elevada capacidad de regeneración estructural observada en las ratas sometidas a ablación neonatal del CS, nos planteamos estudiar el posible efecto de esta lesión sola, o combinada con la desaferenciación retiniana neonatal del ojo contralateral al CS dañado, en la alteración de la distribución de las poblaciones neuronales y de astroglia en los estratos superficiales de ratas adultas. Para ello, mediante inmunohistoquímica, analizamos el patrón de expresión de las proteínas ligantes de calcio, calbindina (CB), calretinina (CR) y parvalbúmina (PV), ampliamente empleadas como marcadores de poblaciones específicas de

neuronas del SNC de mamíferos (Celio, 1990; Rogers, 1992; Seress et al., 1993; Kevetter, 1996), y el patrón de expresión de la proteína ácida fibrilar glial (GFAP), como marcador de astrocitos. Los resultados que a continuación se discuten hacen referencia al patrón de expresión de estas moléculas en ratas adultas control y su alteración tras las lesiones practicadas neonatalmente, poniendo especial atención a los estratos superficiales, que corresponden con los estratos retinorreceptores del CS.

### **5.3.1. Cambios en el patrón de expresión de la calbindina**

El patrón de marcado de la CB en los estratos superficiales coliculares en animales adultos control se mostró como dos bandas bien definidas, una de células de tamaño medio-grande en el SO rodeadas por una densa red de neuropilo y otra de células de tamaño más pequeño y aspecto fusiforme orientadas verticalmente en la región media del SGS. Estas observaciones son similares a las descritas en trabajos previos realizados en nuestro laboratorio (Gerrikagoitia, 1998) así como los descritos por otros autores en ratas (Schmidt-Kastner et al., 1992; Lane et al., 1996; Cork et al., 1998) y en gatos (Mize et al., 1992). A diferencia de lo observado en el presente estudio, Schmidt-Kastner y colaboradores describen estas dos bandas pero con una localización más ventral (Schmidt-Kastner et al., 1992), mientras que otros autores coinciden nuestras observaciones (Lane et al., 1996; Cork et al., 1998; Gerrikagoitia, 1998). Además, trabajos previos describen la presencia de una tercera banda de células inmunopositivas para CB dispersas en los estratos profundos del CS tanto de la rata (Cork et al., 1998) como del gato (Mize et al., 1992). Aunque en nuestro estudio también detectamos esta tercera banda, como se ha comentado anteriormente, hemos centrado la atención en los estratos superficiales que reciben aferencias directas retinocoliculares y que pueden estar influenciados de manera directa por lesiones en el sistema visual.

Como consecuencia de la ablación neonatal del CS se observó una ligera reestructuración del patrón de marcado de la CB mostrando células de aspecto redondeado inmunorreactivas por todo el SGS a diferencia de los casos control en los que las células CB inmunomarcadas presentaban un aspecto fusiforme y se localizaban principalmente en la región media de este estrato. Cuando se estudió el efecto combinado de ambas lesiones neonatales se observó una leve disminución de la densidad de neuropilo CB inmunopositivo en el SO, así como un incremento de células de pequeño tamaño de forma redondeada en la mitad superior del SGS. Trabajos previos han evidenciado que tras la desaferenciación retiniana unilateral neonatal el patrón de CB en los estratos superficiales del CS de ratas



adultas apenas se ve modificado (Lane et al., 1996; Gerrikagoitia, 1998). Por otro lado, se ha observado que la enucleación monocular causaba una reducción de la inmunorreactividad para la CB en el GLD del mono (Mize et al., 1992) y que la muerte neuronal tras la denervación del nervio óptico está asociada a una disminución de la expresión de la CB en el núcleo geniculado lateral (González et al., 2005). En nuestro estudio tras analizar el efecto de las lesiones practicadas observamos un cambio, aunque ligero, del patrón de expresión de la CB, lo que indica que la ablación del CS neonatalmente produce un efecto a largo plazo en el patrón de expresión de esta proteína ligante de calcio.

### 5.3.2. Cambios en el patrón de expresión de la calretinina

El patrón de expresión de la CR en animales control se mostró como una densa red de neuropilo en los estratos superficiales del CS que aumentaba en intensidad en sentido ventrodorsal, coincidente con las observaciones descritas previamente en nuestro grupo de investigación (Gerrikagoitia, 1998).

La ablación neonatal del CS dio lugar a un patrón de expresión de la CR profundamente alterado. El SO presentó un marcado intenso de fibras dispuestas oblicuamente a la superficie colicular características de las aferencias provenientes de la retina, mientras que el SGS mostró un descenso de la intensidad del marcado del neuropilo acompañado de la presencia de células de pequeño tamaño inmuopositivas para CR. Asimismo, animales sometidos a la ablación del CS junto con la desaferenciación retiniana neonatal mostraron una fuerte modificación del patrón de marcado de la CR, observándose cuerpos celulares de pequeño tamaño en el SO, y más notablemente en el SGS, todos ellos inmersos en una red de neuropilo débilmente teñido. Es interesante el hecho de que como consecuencia de la desaferenciación retiniana neonatal el patrón de expresión de la CR en los estratos superficiales del CS de ratas adultas muestra una disminución del marcado del neuropilo y un incremento de los cuerpos celulares teñidos (Gerrikagoitia, 1998) similar al observado en este trabajo en el CS de animales con ablación neonatal de esta estructura y enucleación del ojo contralateral. Asimismo, tal y como se ha descrito anteriormente, el efecto de ambas lesiones da lugar a una conexión ipsilateral aberrante comparable a la que ocurre tras la desaferenciación retiniana neonatal. Teniendo en cuenta ésto, es posible que la expresión de la CR esté regulada por los mismos mecanismos que operan como consecuencia de distintas lesiones que afectan al sistema visual, aunque por el momento se desconocen.

### 5.3.3. Cambios en el patrón de expresión de la parvalbúmina

Los estratos superficiales de animales control mostraron células inmunopositivas para la PV de tamaño medio tanto en el SO, y de manera más notable en el SGS, rodeadas por una red de neuropilo, más intensa en la mitad ventral del SGS. Estos datos son similares a los descritos previamente (Schmidt-Kastner et al., 1992; Gerrikagoitia, 1998; Hada et al., 1999), aunque difieren ligeramente de los observados por otros autores que describen la presencia de una banda definida de células PV positivas en la mitad ventral del SGS (Illing et al., 1990; Cork et al., 1998). Probablemente estas diferencias sean debidas a la distinta especificidad de los anticuerpos empleados.

La lesiones practicadas neonatalmente provocaron un cambio en el patrón de marcado de la PV. Los cambios más notorios en animales sometidos a la ablación neonatal colicular fueron la disminución de los cuerpos celulares inmunopositivos, y levemente del neuropilo, en el SO, y el aumento de células PV positivas en el SGS. A diferencia de lo observado en los animales con ablación del CS, el efecto combinado de esta lesión con la enucleación neonatal contralateral, aunque también provocó una alteración del patrón de expresión de la PV esta alteración fue muy dispar, mostrándose como un reducción notable de cuerpos celulares inmunopositivos y del marcado del neuropilo. Evidencias previas han mostrado que tras la desafereciación retiniana el patrón de expresión de la PV en los estratos superficiales coliculares de ratas adultas se ve alterado. Gerrikagoitia describe que como consecuencia de la enucleación neonatal unilateral se produce un descenso sustancial del marcado PV positivo del neuropilo tras 2 meses de supervivencia en los estratos superficiales del CS contralateral (Gerrikagoitia, 1998). Asimismo, Hada y colaboradores observaron esta reducción del marcado del neuropilo PV positivo en ratas adultas enucleadas en P14 y un incremento del número de neuronas inmunorreactivas en el SGS del CS contralateral (Hada et al., 1999). Sin embargo, la enucleación ni fetal ni neonatal origina un incremento de la proporción relativa de células PV positivas en el SGS colicular contralateral (Lane et al., 1996; Gerrikagoitia, 1998). Como resultado de la deprivación monocular mediante sutura del párpado durante el periodo crítico se ha observado una reducción de la inmunoreactividad para la PV en la región binocular de la corteza visual primaria (CV1) tanto de células PV inmunopositivas como del neuropilo (Cellerino et al., 1992). Contrariamente, Hada y colaboradores no observaron cambios en la expresión de PV ni en la región binocular ni en la monocular de la CV1, ni en

el núcleo geniculado lateral dorsal (GLD) en ratas adultas enucleadas en P14 (Hada et al., 1999).

Relacionando la profunda modificación del patrón de expresión de la PV, así como de la CR, y en menor medida de la CB, que se produce tras distintas lesiones visuales llevadas a cabo en el desarrollo postnatal temprano y la alta capacidad de respuesta plástica existente en la vía retinocolicular tras estas lesiones, cabría pensar que las proteínas ligantes de calcio podrían estar involucradas en la mediación de los fenómenos de plasticidad de la conexión retinocolicular tras lesiones en el sistema visual durante el desarrollo temprano. Además, existen evidencias que demuestran que la denervación aumenta las concentraciones de calcio extracelular (Zirpel et al., 1995), lo que sugiere que estas proteínas ligantes de calcio podrían estar involucradas en la protección frente a la muerte neuronal modulando los niveles de calcio intracelular tras daño nervioso.

#### **5.3.4. Cambios en el patrón de expresión de GFAP**

En este trabajo se pone de manifiesto que como resultado de la ablación neonatal colicular el marcado de la GFAP se ve notablemente alterado mostrando en el SO, y de manera más notoria en el SGS, un incremento de células GFAP inmunopositivas aunque de menor tamaño en comparación con los animales control. Por el contrario, el efecto de ambas lesiones mostró un incremento de células GFAP positivas por todos los estratos superficiales.

Trabajos previos han demostrado que la expresión de GFAP se ve incrementada poco tiempo después de producirse daño nervioso (Hajós et al., 1990; Agarwala y Kalil, 1998). Por ejemplo, tras la aspiración de la corteza visual en ratas adultas se produce una intensa reacción astrogliar tanto en la zona dañada como en el CS, el núcleo geniculado lateral y el hipocampo ipsilateral una semana después de la lesión (Cerutti y Chadi, 2000). Sin embargo, es menos conocida la respuesta de los astrocitos a largo plazo. En este sentido, González y colaboradores estudiando el efecto de la enucleación monocular de adulto en la inmunorreactividad de GFAP en el núcleo geniculado lateral de rata observaron que el número de astrocitos GFAP positivos aumentaba desde la primera hasta la cuarta semana tras la lesión y decrecía gradualmente hasta la semana 48 después de la enucleación (González et al., 2006). Estos resultados son consistentes con otro trabajo en el que muestran que tras lesiones en la corteza visual el incremento de la inmunorreactividad para GFAP en el núcleo geniculado lateral se mantiene durante al menos 24 semanas después de la lesión (Agarwala y

Kalil, 1998). En nuestro estudio vemos que tras la ablación del CS, sólo o combinada con la desaferenciación retiniana neonatal, el incremento postlesional de astrocitos GFAP inmunorreactivos se mantiene durante al menos 3 meses.

Los astrocitos están involucrados en el control de la concentración extracelular de glutamato (Hösli et al., 1986; Swanson, 1992), en mantener la concentración de glutamato por debajo de los niveles neurotóxicos (Lehre et al., 1995), y en mediar la señalización celular vía receptores (Porter y McCarthy, 1996). Por otro lado, las aferencias principales que inervan los estratos superficiales del CS provienen de la retina contralateral y de la CV1 ipsilateral (Lund, 1966; Harvey y Worthington, 1990) y emplean glutamato como principal neurotransmisor (Ortega et al., 1995; Binns, 1999). Teniendo en cuenta ésto, y que se ha demostrado que el glutamato puede influenciar la comunicación intercelular e inducir cambios morfológicos en astrocitos (Hansson et al., 1994), es posible que las lesiones practicadas neonatalmente por medio de la alteración del balance de las aferencias coliculares, y por tanto de los niveles de glutamato, estén dando lugar a fenómenos de plasticidad astrocítica. Además, como se ha comentado anteriormente en este trabajo hemos observado que la ablación sólo o acompañada de la desaferenciación retiniana del ojo contralateral en el nacimiento da lugar a fenómenos de plasticidad en la conexión retinocolicular. En este sentido, se ha probado el potencial de la glía en la participación en la reorganización sináptica tanto en estudios *in vitro* (Pfrieger y Barres, 1997; Ullian et al., 2001) como *in vivo* (Dreher et al., 1985). Otros estudios han demostrado que los astrocitos reactivos facilitan la formación de nuevas sinapsis mediante la liberación de factores neurotróficos que promueven la supervivencia celular y el crecimiento de neuritas en el lugar de la lesión (Spranger et al., 1990; Kawaja y Gage, 1991). De este modo el incremento de astrocitos GFAP positivos observado podría estar involucrado en la respuesta plástica observada en la vía retinocolicular tras las lesiones llevadas a cabo en este trabajo.

#### **5.4. Organización del campo terminal corticocolicular visual tras diferentes estrategias para promover la plasticidad en animales sometidos a desaferenciación retiniana en fase adulta**

Como se ha comentado previamente, en anteriores investigaciones desarrolladas en nuestro laboratorio se ha demostrado que la enucleación cuando se lleva a cabo neonatalmente da lugar a una expansión de la proyección visual corticocolicular, asociada con la aparición de fibras que discurren paralelamente a la superficie colicular en dirección lateromedial

abarcando la casi totalidad de la superficie colicular (García del Caño et al., 1997, 2002). Sin embargo, cuando esta lesión se practica en ratas adultas está ampliación del campo terminal no tiene lugar (García del Caño et al., 2002). A diferencia de estos trabajos en los que la administración del trazador anterógrado BDA se realizó mediante iontoforesis, en el presente trabajo, el estudio de la organización de la vía visual corticocolicular se llevó a cabo mediante microinyección a presión del trazador. No obstante, los resultados observados confirman, como era de esperar, que tras la enucleación de adulto el patrón del campo terminal conserva un aspecto similar al observado en los animales ilesos, mostrándose como una red de axones densamente empaquetada de forma columnar, tal y como ocurría en estudios previos de nuestro grupo de investigación (García del Caño et al., 2002).

Se ha sugerido que los axones compiten continuamente entre ellos para ocupar los lugares postsinápticos en el SNC. Parece ser que durante el desarrollo esta competición es esencial para la formación y el refinamiento de las conexiones, mientras que en el SNC maduro, esta competición alcanza un equilibrio que lleva a la estabilización de las conexiones nerviosas (Purves y Lichtman, 1983; Chiaia et al., 1994). Sin embargo, se ha demostrado que algunos procesos fisiológicos, como por ejemplo la memoria y el aprendizaje, pueden alterar este equilibrio, llevando a la competición de los terminales en el estadio adulto dando lugar a fenómenos de *sprouting* y retracción hasta alcanzar el nuevo equilibrio (Vrensen y Nunes Cardozo, 1981; Cavazos et al., 1991; Geinisman et al., 1992). La desafereenciación llevada a cabo en nuestros experimentos es un ejemplo extremo de este desequilibrio que origina la aparición de lugares postsinápticos sin ocupar por la eliminación de las aferencias procedentes de la retina, y por tanto, terminales intactos procedentes de la corteza podrían ocupar los lugares vacantes. Los resultados obtenidos por García del Caño y colaboradores muestran que la enucleación neonatal da lugar al desplazamiento de los terminales corticocoliculares visuales hacia regiones más dorsales de los estratos superficiales del CS (García del Caño et al., 2002), donde los aferentes procedentes de la retina sinaptan en condiciones normales (Lund, 1965; Dreher et al., 1985). Además, aunque no observaron la expansión del campo terminal cuando la desafereenciación tenía lugar en el adulto como se ha comentado con anterioridad, sí demostraron un incremento de la densidad de los botones en la región más dorsal de los estratos superficiales del CS de estos animales (García del Caño et al., 2002). Por ello, sugieren que existe una interacción competitiva entre terminales retinianos y corticocoliculares visuales que participa en la plasticidad visual corticocolicular tanto en ratas neonatales como adultas, y que las fibras procedentes de la CV1 que se dirigen al CS están

dotadas con capacidad de reorganización en respuesta a la desaferenciación visual (García del Caño et al., 2002). Esta capacidad de respuesta plástica depende principalmente del estado funcional del sistema de transducción de la señal y la maquinaria de síntesis en las neuronas del origen de la conexión, así como del ambiente que rodea las fibras corticocoliculares visuales en el momento de la lesión. Diferencias en estos componentes entre los animales neonatales y los adultos parecen determinar estos factores, en las distintas características en la respuesta postlesional.

#### **5.4.1. Efecto de la microinyección de siRNAs frente al receptor de Nogo y a RhoA en la corteza visual primaria**

Es bien conocido la limitada capacidad de respuesta plástica frente al daño en el SNC adulto. En este trabajo se han evidenciado mediante diferentes tipos de lesiones del sistema visual esta limitada respuesta plástica en animales lesionados de adulto. Se han identificado algunos factores que influyen la respuesta diferencial ante las lesiones del SNC según su estado de madurez. Entre otras, la presencia de inhibidores del crecimiento axonal derivados de la mielina parecen jugar un papel crucial en esta limitación (revisado por Cao et al., 2010). Además la unión de estos inhibidores de crecimiento axonal a su receptor, el NgR, desencadena una cascada de señalización que activa el RhoA que da lugar al colapso de los conos de crecimiento y, como consecuencia, la inhibición del crecimiento axonal (Chaudhry y Filbin, 2006). Debido al papel crucial que juegan el NgR y el RhoA en la inhibición del crecimiento axonal, en el presente trabajo, mediante la administración de siRNAs específicamente dirigidos frente a estas moléculas en el origen de la conexión, la CV1, se ha analizado el posible efecto en la reorganización del campo terminal corticocolicular visual en animales enucleados en fase adulta. El tratamiento con siRNAs frente a NgR apenas mostró un cambio en la distribución del centro del campo terminal respecto a los animales enucleados sin tratar, sin embargo, se pudieron observar fibras que discurrían hacia posiciones más laterales y mediales del CS. Por otro lado, la administración de siRNAs frente a RhoA en la CV1 de ratas adultas promovió de forma más notoria la expansión lateromedial del campo terminal visual corticocolicular tras la desaferenciación retiniana llevada a cabo en el estadio adulto. Estos resultados sugieren que abolir el efecto de estas moléculas implicadas en la inhibición del crecimiento permite recuperar, al menos en parte, niveles de plasticidad más propios de estadios más jóvenes del desarrollo postnatal.

A pesar de la expansión observada tras la administración de siRNAs frente a NgR, y más notablemente frente a RhoA en la CV1, el centro del campo terminal se mantuvo en la misma localización que en los controles y en los enucleados sin tratar con siRNAs. Este fenómeno se ha observado en ratas enucleadas neonatalmente, que a pesar de que muestran una ampliación de la proyección visual corticocolicular, también mantienen la localización del centro del campo terminal (García del Caño et al., 2002). Estos resultados sugieren que la topografía general de esta conexión parece no ser dependiente de la presencia de aferencias de la retina, sino que se encuentra predeterminada por la presencia de indicadores de posicionamiento de las estratos superficiales del CS (O'Leary y Cowan, 1983; Wizenmann et al., 1993). Esta posibilidad se apoya en el hecho de que el orden topográfico de la conexión visual corticocolicular de ratones anolftálmicos no se ve alterada respecto a los ratones controles (Rhoades et al., 1985). Se ha propuesto que los indicadores de posicionamiento podrían estar determinados por factores moleculares que podrían guiar a los axones a su correcto territorio terminal (O'Leary y Cowan, 1983; Wizenmann et al., 1993). Con respecto a este fenómeno, los receptores de efrinas y sus ligandos, juegan un papel muy importante en el establecimiento de la topografía de la vía retinocolicular en roedores (Flenniken et al., 1996; Marcus et al., 1996; Frisén et al., 1998). Estas moléculas se expresan en la retina y en el CS antes de la llegada a los estratos superficiales coliculares de los axones de las células ganglionares retinianas (Marcus et al., 1996; Frisén et al., 1998) lo que puede sugerir que estas moléculas u otras moléculas relacionadas podrían estar predeterminando la formación del mapa topográfico visual corticocolicular, incluso en ausencia de aferencias retinianas. Además, se ha demostrado que los receptores de efrinas y sus ligandos que se expresan en la corteza motora y en la médula espinal, respectivamente, parecen jugar un papel crucial en la dirección de los axones corticoespinales hacia su correcto territorio terminal contralateral (Yokoyama et al., 2001), sugiriendo que los axones subcorticales podrían estar guiados por estas moléculas durante la búsqueda de las rutas.

#### *5.4.1.1. Comparación con otros estudios similares*

Como se ha comentado anteriormente en la sección de “Introducción” diferentes ligandos, el Nogo, la glicoproteína asociada a la mielina (MAG) y la glicoproteína mielínica del oligodendrocito (Omgp), pueden unirse al NgR y activar la cascada de señalización mediada por RhoA que da lugar a la inhibición del crecimiento axonal (Fournier et al., 2001; Domeniconi et al., 2002; Liu et al., 2002; Wang et al., 2002). Por este motivo, la estrategia

empleada en el presente trabajo se ha basado en el empleo de siRNAs frente a las dianas de la cascada de señalización inhibitoria, el NgR y el RhoA, en vez de frente a los ligandos inhibidores. Además el bloqueo de la expresión de los ligandos ha mostrado resultados contradictorios. Por ejemplo, *in vivo* la administración de anticuerpos monoclonales específicos para Nogo-A induce el *sprouting* en los axones de las células de Purkinje (Buffo et al., 2000) y la supresión de Nogo-A mediante siRNAs da lugar a una recuperación funcional mediante la promoción de la reparación axonal en un modelo murino de esclerosis múltiple (Yang et al., 2010). La delección de las isoformas Nogo-A y -B en ratones jóvenes resulta en un *sprouting* sustancial de los axones del tracto corticoespinal tanto por arriba como por debajo de la lesión de la médula espinal (Kim et al., 2003), mientras que en ratones *knockout* para Nogo-A se produce un fenómeno compensatorio con aumento del Nogo-B mostrando una regeneración menos pronunciada (Simonen et al., 2003). Además, en un modelo de hemisección dorsal tras la delección completa de las tres isoformas de Nogo, o de Nogo-A y -B, no se produjo regeneración (Zheng et al., 2003). Por otro lado, en ratones transgénicos deficientes para MAG se detectó nula (Zheng et al., 2003) o escasa regeneración axonal (David et al., 1995).

Los resultados presentados en este trabajo demuestran que la reducción de la expresión de moléculas relacionadas con el crecimiento axonal mediada por siRNAs frente a NgR y RhoA favorece la expansión de la vía visual corticocolicular tras la desaferenciación retiniana de adulto, siendo la promoción de la respuesta plástica más evidente cuando se administró siRNAs frente a RhoA. Estos datos son congruentes con otros estudios que han probado, empleando diferentes estrategias, que la reducción de estas moléculas, y otras involucradas en la señalización de la inhibición del crecimiento axonal, produce efectos beneficiosos en la recuperación del crecimiento axonal. La administración *in vivo* de anticuerpos monoclonales o del péptido antagonista del NgR aumenta la recuperación funcional y la promoción de la regeneración axonal en ratas con lesiones de médula espinal (GrandPré et al., 2002; Li y Strittmatter, 2003; Lee et al., 2004). Se ha observado que empleando un modelo de mutante doble negativo para NgR se veía incrementado el número de axones ganglionares retinianos regenerados que atravesaban y crecían más allá del nervio óptico dañado a través del ambiente inhibitorio putativo (Fischer et al., 2004). Asimismo, algunos trabajos recientes, empleando la tecnología de la interferencia mediada por RNA (RNAi) mediante la administración de siRNAs o *small hairpin* RNAs (shRNAs) frente a moléculas involucradas en la señalización por moléculas inhibitoras del crecimiento axonal,



demuestran una mejora en la recuperación del crecimiento axonal. Por ejemplo, se ha demostrado que la disminución de los niveles del receptor de neurotrofina p75 (p75<sup>NTR</sup>) mediado por siRNAs promueve el crecimiento de neuritas de las neuronas del ganglio de la raíz dorsal en presencia de MAG (Higuchi et al., 2003). Un trabajo llevado a cabo por Xu y colaboradores publicado este año ha mostrado que la administración de shRNAs frente a NgR mediante un vector lentiviral reducía la expresión de este receptor en cultivos neuronales facilitando el crecimiento axonal (Xu et al., 2011). Ahmed y colaboradores demostraron que el silenciamiento por siRNAs dirigidos frente a p75<sup>NTR</sup>, NgR y RhoA en neuronas del ganglio de la raíz dorsal estimuladas con el factor de crecimiento fibroblástico 2 daba lugar a la desinhibición del crecimiento de neuritas en presencia de la mielina del SNC inhibitoria (Ahmed et al., 2005).

La inhibición del crecimiento axonal está acompañada por cambios en el comportamiento y la morfología del cono de crecimiento, mediados principalmente por la acción de la familia Rho de las pequeñas GTPasas que modulan la señalización de la polimerización del citoesqueleto de actina (Luo et al., 1997; Luo, 2000). Los miembros de la familia Rho cambian de formas unidas a GDP inactivas a formas unidas a GTP activas. La activación de RhoA da lugar al colapso del cono de crecimiento y la inhibición del crecimiento de neuritas en una variedad de líneas celulares y cultivos de neuronas primarios (Tigyi et al., 1996; Kozma et al., 1997; Hirose et al., 1998). Estudios previos empleando estrategias alternativas han probado que la inactivación de RhoA incrementa el crecimiento de neuritas *in vitro* (Lehmann et al., 1999; Dergham et al., 2002; Niederöst et al., 2002; Fournier et al., 2003; Ahmed et al., 2005; Bryan et al., 2005) e *in vivo* (Lehmann et al., 1999; Dergham et al., 2002). Por ejemplo, mediante el uso de los antagonistas C3 transferasa e Y-27632, de RhoA y ROCK respectivamente, se promueve el crecimiento axonal en sustratos de mielina tanto *in vitro* (Lehmann et al., 1999; Dergham et al., 2002; Fournier et al., 2003) como *in vivo* (Lehmann et al., 1999; Dergham et al., 2002). Como se ha descrito con anterioridad, Ahmed y colaboradores evidenciaron que la disminución de la expresión de la molécula RhoA, p75<sup>NTR</sup>, y de NgR, por siRNAs desinhibía el crecimiento de neuritas en presencia de mielina en neuronas del ganglio de la raíz dorsal (Ahmed et al., 2005). Además, determinaron que el silenciamiento de RhoA mostraba el efecto más pronunciado en el crecimiento de neuritas de estos cultivos celulares (Ahmed et al., 2005). En nuestro trabajo confirmamos en un modelo de lesión del sistema visual *in vivo* que el silenciamiento de RhoA mediado por siRNAs ejerce un efecto más potente en la desinhibición del crecimiento que el del NgR. Las

moléculas inhibitoras del crecimiento axonal del SNC, aparte de los ligandos inhibidores derivados de la mielina que actúan mediante la unión al NgR, entre las que se incluyen las efrinas, las semaforinas y los condroitín sulfato proteoglicanos (CSPGs), también convergen en la ruta de señalización de RhoA dando lugar al colapso de los conos de crecimiento (Hunt et al., 2002; Sandvig et al., 2004). Nuestros resultados sugieren que la reducción de la expresión del NgR sólo estaría bloqueando la acción inhibitoria de los ligandos inhibidores derivados de la mielina, mientras que la influencia de otros ligandos inhibidores cuya señalización converge en RhoA persistiría. Sin embargo, el silenciamiento de RhoA estaría bloqueando la señalización convergente de todos los ligandos inhibidores, por lo que es razonable que se alcancen mayores niveles de desinhibición, y por tanto, mayor crecimiento axonal.

El presente trabajo de tesis confirma el potencial uso de los siRNAs como herramienta para silenciar la expresión de moléculas relacionadas con la inhibición del crecimiento axonal con el fin de promover la reorganización y el crecimiento axonal tras lesiones en el SNC adulto. Vista la eficacia en la promoción del crecimiento axonal de la administración de siRNAs frente a NgR, y de forma más notable frente a RhoA, nos planteamos si la administración conjunta de siRNAs frente a ambas moléculas incrementaría la respuesta plástica observada. Sin embargo, en contra de lo esperado, el efecto conjunto de los siRNAs no sólo no mejoró la respuesta plástica respecto a la administración de siRNAs frente a RhoA, si no que el campo terminal visual corticocolicular presentó un aspecto más semejante al efecto provocado por la inyección de siRNAs frente a NgR. Se ha demostrado la existencia de competición entre siRNAs y shRNAs cuando son co-transfectados en cultivos celulares (Koller et al., 2006; Castanotto et al., 2007). Esta competición parece estar correlacionada con la potencia del siRNA y se ha atribuido a la posible competición por su incorporación en el complejo de silenciamiento inducido por RNA (RISC) (Koller et al., 2006; Castanotto et al., 2007). Teniendo en cuenta que secuencias específicas de siRNAs pueden potencialmente dificultar la incorporación de otros siRNAs cuando se emplean de forma combinada (Castanotto et al., 2007), es probable que la disminución en la eficacia en la promoción de la respuesta plástica en este modelo de lesión en el adulto observada cuando los siRNAs frente a NgR y RhoA fueron inyectados conjuntamente esté mediada por la competición entre ambos siRNAs. Puesto que la topografía de la conexión visual corticocolicular mostrada se asemejaba a la que aparece tras la administración de siRNAs frente a NgR se puede sugerir que el siRNA diseñado frente a NgR es un competidor más potente para su ensamblaje en el

RISC y, por consiguiente, para disminuir la expresión de NgR, comprometiendo la efectividad de la incorporación del siRNA frente a RhoA en el complejo RISC y, por tanto, reprimiendo la inhibición de RhoA.

#### *5.4.1.2. Eficacia de los siRNAs en la supresión de la expresión del receptor de Nogo y de RhoA en la corteza visual*

En este trabajo de tesis confirmamos la eficacia en la disminución de los niveles de mRNA mediante la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (qRT-PCR) de dos moléculas implicadas en la inhibición del crecimiento axonal, el NgR y el RhoA, 24 horas después de la inyección local de siRNAs específicamente dirigidos en la CV1 frente a dichas moléculas. Existen evidencias del efecto de los siRNAs y shRNAs que demuestran la eficacia en la reducción de la expresión de las moléculas frente a las cuales van dirigidas tanto *in vitro* (Elbashir et al., 2001; Yang et al., 2010; Xu et al., 2011) como *in vivo* (Hérard et al., 2006; Taishi et al., 2007). Por ejemplo, Yang y colaboradores han demostrado que la transfección con siRNAs frente a Nogo-A de la línea celular de neuroblastoma reducía la expresión de esta molécula (Yang et al., 2010). En nuestro laboratorio se ha demostrado mediante inmunohistoquímica que la administración intraocular de siRNAs frente a VGluT2 produce una disminución de la expresión de este transportador en la retina 24 horas después de su inyección (resultados no publicados). Asimismo, la inyección intraocular de siRNAs frente a la proteína precursora amiloide resultó efectiva en la disminución de la expresión de esta molécula en los terminales retinianos en el CS (Hérard et al., 2006). Sin embargo, la eficacia de la administración intracerebral de los siRNAs no está tan extendida. Experimentos desarrollados por Taishi y colaboradores ponen de manifiesto que la administración de siRNAs frente al TNF $\alpha$  provoca un descenso del mRNA de esta molécula en cultivos celulares corticales (Taishi et al., 2007). Además la microinyección del siRNA frente al TNF $\alpha$  en la corteza somatosensorial primaria de ratas daba lugar a la disminución del mRNA del TNF $\alpha$  y a un descenso de la densidad de células inmunorreactivas para TNF $\alpha$  en la capa V de la corteza somatosensorial primaria (Taishi et al., 2007).

Se ha observado que el efecto de los siRNAs *in vivo* comienza aproximadamente al de 24 horas de su administración, y sus efectos persisten durante 2 o 3 días (Dillon et al., 2004; Ryther et al., 2005). Comparada con la tecnología antisentido los efectos de los siRNAs parecen ser más selectivos y duraderos (Hough et al., 2003; Miyagishi et al., 2003). En el presente trabajo observamos que un tiempo de 24 horas tras la microinyección de siRNAs

frente a NgR y RhoA fue efectiva en la reducción de la expresión de estas moléculas. Además, una única inyección fue suficiente para provocar un cambio en la reorganización del campo terminal visual corticocolicular postlesional 11 días tras la inyección. Todavía queda por dilucidar los efectos en la reorganización de la conexión como consecuencia de la administración de estos siRNAs a más largo plazo, por ejemplo, mediante la implantación de bombas osmóticas de lenta liberación.

#### **5.4.2. Efecto del tratamiento crónico con fluoxetina**

En este trabajo hemos demostrado que el tratamiento crónico por vía oral con el antidepresivo fluoxetina, a una dosis equiparable a la empleada para el tratamiento clínico en humanos, da lugar a una considerable expansión del campo terminal visual corticocolicular en el eje lateromedial, en ratas sometidas a desaferenciación retiniana practicada en el estadio adulto. Además, aunque de forma menos notoria, estos fenómenos fueron también observados en animales ilesos tratados con fluoxetina. Como se ha mencionado en apartados anteriores, este aumento de la extensión del campo terminal visual corticocolicular tiene lugar cuando la desaferenciación retiniana ha sido llevada a cabo neonatalmente (García del Caño et al., 1997, 2002). Los resultados obtenidos indican que la administración crónica de este antidepresivo promueve el crecimiento axonal en los estratos superficiales del CS de las fibras procedentes de la CV1 tras lesiones en el sistema nervioso adulto, lo que sugiere una reinstauración potencial de la plasticidad normalmente atribuida al sistema nervioso inmaduro.

##### **5.4.2.1. Comparación con otros estudios similares**

Los resultados observados son consistentes con trabajos recientemente publicados que ponen de manifiesto el efecto de los antidepresivos en la recuperación de la respuesta plástica del sistema nervioso maduro (Norrholm y Ouimet, 2001; Hajszan et al., 2005; Chen et al., 2008; Maya Vetencourt et al., 2008; Guirado et al., 2009; Hajszan et al., 2009; O'Leary et al., 2009; Ampuero et al., 2010). Maya Vetencourt y colaboradores evidenciaron a nivel electrofisiológico que el tratamiento crónico con fluoxetina por vía oral, empleando la misma dosis que en nuestro trabajo, en ratas adultas sometidas a deprivación monocular induce un cambio en la dominancia ocular a favor del ojo no privado, lo que sugiere la reactivación de la plasticidad similar a la que acontece durante el periodo crítico de la dominancia ocular en la corteza visual (Maya Vetencourt et al., 2008). A nivel de comportamiento, observaron que cuando las ratas eran monocularmente privadas desde el desarrollo temprano y en el estadio

adulto se revertía la deprivación visual, la agudeza visual del ojo ambliope se recuperaba tras el tratamiento crónico con fluoxetina combinado con rehabilitación mediante parche en el ojo abierto previamente dominante (Maya Vetencourt et al., 2008). Además, se ha demostrado que el tratamiento con fluoxetina induce la reorganización de axones retinocoliculares en ratas neonatas y jóvenes, y amplifica los fenómenos plásticos observados en la conexión retinocolicular ipsilateral tras lesiones retinianas en el desarrollo (Bastos, et al., 1999). Los resultados mostrados en nuestro trabajo en los que el tratamiento crónico con fluoxetina da lugar a un notable incremento del campo terminal visual corticocolicular tras la enucleación en estadio adulto, aunque en menor cuantía al observado previamente en nuestro grupo de investigación tras la enucleación neonatal (García del Caño et al., 1997, 2002), reafirman el efecto del tratamiento crónico con fluoxetina en la promoción de la reinstauración de la plasticidad en el sistema visual.

Además de los cambios plásticos observados en el sistema visual, varios trabajos han evidenciado fenómenos de plasticidad en otras regiones cerebrales promovidos por el tratamiento con antidepresivos (Norrholm y Ouimet, 2001; Hajszan et al., 2005; Chen et al., 2008; Guirado et al, 2009; Hajszan et al., 2009; O'Leary et al., 2009; Ampuero et al., 2010). Por ejemplo, Guirado y colaboradores muestran que la administración mediante inyección intraperitoneal de fluoxetina durante 14 días induce la activación de la corteza somatosensorial, mostrado por el aumento de la expresión de c-Fos, y da lugar a la remodelación de las espinas dendríticas de las neuronas piramidales de esta región cortical (Guirado et al, 2009). Además, varios trabajos muestran que el tratamiento con antidepresivos da lugar a un aumento de contactos sinápticos en el área CA1 del hipocampo (Hajszan et al., 2005; Chen et al., 2008; Hajszan et al., 2009; O'Leary et al., 2009) y a un incremento de la densidad de espinas dendríticas en el prosencéfalo (Ampuero et al., 2010). Contrariamente, se han descrito efectos opuestos en modelos animales de depresión como es el estrés crónico y la bulbectomía olfatoria. El estrés crónico decrece la ramificación dendrítica y la densidad de sinapsis en las neuronas piramidales de la corteza prefrontal medial (Cook y Wellman, 2004; Radley et al., 2004, 2005) y en el hipocampo (Sousa et al., 2000). Norrholm y Ouimet observaron una reducción de las espinas dendríticas en el hipocampo tras la bulbectomía olfatoria, fenómeno que se revertía tras el tratamiento crónico con el antidepresivo tricíclico amitriptilina (Norrholm y Ouimet, 2001).

#### *5.4.2.2. Posibles mecanismos involucrados*

La reinstauración de la respuesta plástica observada en este trabajo tras el tratamiento crónico con fluoxetina podría estar mediada por la señalización del BDNF, dado que existen numerosas evidencias que demuestran que la señalización del BDNF a través del receptor tirosina quinasa TrkB está involucrada en la acción que ejercen los tratamientos con antidepresivos (Castrén et al., 2007; Martinowich et al., 2007; revisado por Castrén y Rantamäki, 2010). La respuesta clínica de los antidepresivos se desarrolla lentamente a lo largo de las primeras semanas de tratamiento. Una posible explicación de esta respuesta retrasada podría ser el requerimiento del crecimiento de las conexiones nerviosas y reorganización de las redes neuronales, respuesta mediada por la señalización del BDNF (Castrén, 2004, 2005). Además, se ha demostrado que los antidepresivos aumentan la plasticidad neuronal a diferentes niveles estructurales, y esta respuesta está mediada, al menos en parte, por la señalización del BDNF (Krystal et al., 2009).

Varios grupos de investigación han demostrado que diferentes tratamientos antidepresivos aumentan la síntesis de BDNF (Coppell et al., 2003; Molteni et al., 2006; Castrén et al., 2007; Martinowich et al., 2007; Maya Vetencourt et al., 2008, 2011). En el trabajo desarrollado por Maya Vetencourt y colaboradores la reinstauración de la plasticidad de la dominancia ocular en el adulto y la recuperación de la función visual de ratas ambliopes tras el tratamiento crónico con fluoxetina vino acompañada por un incremento del BDNF en la corteza visual a nivel proteico (Maya Vetencourt et al., 2008) y a nivel de mRNA (Maya Vetencourt et al., 2011). Además, la administración local de BDNF en la corteza visual produjo un efecto similar al de la fluoxetina (Maya Vetencourt et al., 2008). Asimismo, parece que la activación de la cascada de señalización MAPK-ERK mediada por el BDNF y el receptor TrkB es necesaria para los efectos causados por la fluoxetina en la mediación de la plasticidad cortical visual (Maya Vetencourt et al., 2011). Puesto que la dosis y el modo de administración de la fluoxetina llevado a cabo en el presente trabajo se corresponden con la metodología seguida por Maya Vetencourt y colaboradores, es muy probable que el aumento de la expresión del BDNF en la corteza visual observado por estos investigadores, y su consiguiente cascada de señalización desencadenada por la unión a su receptor, esté jugando un papel crucial en la promoción del crecimiento axonal observado en la conexión corticocolicular visual de los animales sometidos a desafrenciación retiniana de adulto. Como se ha mencionado previamente, dado que muchos tratamientos antidepresivos

comparten la capacidad de incrementar los niveles del BDNF (Coppell et al., 2003; Molteni et al., 2006; Castrén et al., 2007; Martinowich et al., 2007; Maya Vetencourt et al., 2008, 2011) es probable que el tratamiento con otros antidepresivos puedan tener un efecto similar en la promoción de la respuesta plástica observada en el sistema visual maduro postlesional.

Aparte del papel que parece estar jugando la señalización mediada por el BDNF tras el tratamiento crónico con fluoxetina en la reinstauración de la plasticidad descrita en este trabajo, no se puede descartar el posible efecto del tratamiento con fluoxetina en la expresión de otras moléculas involucradas en este fenómeno de plasticidad estructural. Por ejemplo, el aumento de la densidad de espinas dendríticas en la corteza somatosensorial (Guirado et al., 2009) y de contactos sinápticos en el hipocampo (Hajszan et al., 2005; Chen et al., 2008; Hajszan et al., 2009; O'Leary et al., 2009) descrito anteriormente se ha relacionado con el incremento paralelo de la forma polisializada de la molécula de adhesión celular (PSA-NCAM) observado en estas regiones tras el tratamiento con fluoxetina (Varea et al., 2007), dado que la expresión de esta molécula, por medio de sus propiedades antiadhesivas, facilita la respuesta plástica estructural como son la remodelación de las espinas o neuritas y la sinaptogénesis (revisado por Bonfanti, 2006; Gascon et al., 2007; Rutishauser, 2008). Asimismo, se ha evidenciado que el tratamiento con fluoxetina produce un aumento de la PSA-NCAM en la corteza visual (Varea et al., 2007) lo que podría sugerir su posible relación con la promoción de la respuesta plástica observada en este trabajo.

Por otro lado, la fluoxetina, como se ha mencionado previamente, es un inhibidor selectivo de la recaptación de la serotonina que aumenta los niveles extracelulares de serotonina (van Harten, 1993), por lo que el incremento de la transmisión serotoninérgica a largo plazo como consecuencia del tratamiento crónico con fluoxetina puede estar jugando un papel importante en el reestablecimiento de la plasticidad en el adulto demostrado en este trabajo. En este sentido, se ha relacionado el efecto de la transmisión serotoninérgica con la plasticidad en el sistema visual inmaduro (Gu y Singer, 1995; Wang et al., 1997). Asimismo, la inyección local de serotonina en la corteza visual reinstaura la plasticidad de la dominancia ocular en el adulto y promueve la recuperación de la visión en animales ambliopes adultos (Maya Vetencourt et al., 2011) de manera similar a los fenómenos plásticos observados tras el tratamiento crónico con fluoxetina (Maya Vetencourt et al., 2008). Además, el receptor de la serotonina 5-HT<sub>1A</sub> parece jugar un papel clave en la reactivación de la plasticidad puesto que la administración cortical del antagonista de este receptor WAAY-100635 previene la

reinstauración de la inducción de la plasticidad en el adulto de la dominancia ocular mediada por la fluoxetina (Maya Vetencourt et al., 2011). Teniendo en cuenta estas evidencias, se podría sugerir que el aumento de la transmisión serotoninérgica provocado por la administración crónica de fluoxetina podría estar participando en la mediación de la plasticidad postlesional descrita en el presente trabajo.

## **5.5. Efecto de la estimulación magnética**

### **5.5.1. Inducción de c-Fos en animales adultos expuestos a un campo magnético con polaridad alterada**

La visualización inmunohistoquímica de la proteína c-Fos reguladora de la transcripción, empleada como marcador de la actividad neuronal, es un técnica neuroanatómica ampliamente utilizada en investigación sensorial (Dragunow y Faull, 1989; Morgan y Curran, 1991; Herdegen y Leah, 1998). En este trabajo mediante la detección inmunohistoquímica de c-Fos se ha demostrado que células del CS, centro integrador de la información multisensorial, son activadas ante cambios en la polaridad del campo magnético. Nĕmec y colaboradores estudiando la neuroanatomía de la magnetorrecepción en el topo muestran que el CS contiene neuronas que responden ante estímulos magnéticos. Sin embargo, la respuesta mostrada tras cambios en la polaridad del campo magnético en la rata y el topo fue distinta. Mientras que en nuestro trabajo vimos que la alteración del campo magnético inducía la expresión de c-Fos, en el topo la intensidad de la expresión de c-Fos decrecía aunque el área involucrada se expandía (Nĕmec et al., 2001). A pesar de estas diferencias, estas evidencias prueban que tanto el CS de la rata como del topo (Nĕmec et al., 2001) responden activamente, aunque de un modo diferencial, ante estímulos de tipo magnético, lo que nos sugiere la posible implicación de esta estructura mesencefálica en la integración de la información magnética con información motora y sensorial multimodal.

Además, hemos demostrado que diferentes regiones corticales, entre las que se incluyen la corteza visual, la auditiva y la motora responden ante cambios en la polaridad del campo magnético. Estos datos muestran por primera vez la posible implicación de la corteza cerebral en el procesamiento de la información magnética en la rata. Aparte de las regiones descritas en este trabajo activadas por estímulos magnéticos, en nuestro laboratorio hemos observado mediante la tinción inmunohistoquímica del c-Fos que cambios en la polaridad del campo magnético activan diversas áreas cerebrales tanto en la rata como en el ratón. Entre



éstas áreas destacan regiones corticales como la corteza somatosensorial y la piriforme, dado que presentan una intensa inducción del c-Fos tras este tipo de estímulos (resultados no publicados). Todavía queda por dilucidar que implicaciones funcionales conlleva la activación de estas regiones por cambios en la polaridad frente a estímulos magnéticos. Experimentos que combinen técnicas de detección de activación neuronal, como la expresión de c-Fos, con el marcado de conexiones mediante trazadores anterógrados y retrógrados serán necesarios para determinar los circuitos implicados en la magnetorrecepción. Asimismo, estudios electrofisiológicos podrán proveer una medida independiente de la actividad de las neuronas que responden a estímulos magnéticos y permitirán el análisis de la dinámica en respuesta a estos estímulos.

#### *5.5.1.1. Efecto de la desafereciación retiniana en la inducción de c-Fos en los estratos superficiales del colículo superior*

En este trabajo se muestra por primera vez, que regiones cerebrales de la rata implicadas en el procesamiento de la información visual, la CV1 y los estratos superficiales del CS, responden a cambios en la polaridad del campo geomagnético, lo que sugiere que estas estructuras son sensibles a cambios en el campo magnético débiles (del orden del campo magnético terrestre  $\approx 40 \mu\text{T}$ ). Además, la privación de la entrada de estímulos visuales mediante la desafereciación retiniana provoca alteraciones en la respuesta frente a estos estímulos magnéticos, respondiendo de manera diferencial cuando la lesión se lleva a cabo neonatalmente o en el adulto.

Estudios de comportamiento han demostrado que la magnetorrecepción es dependiente de la luz en aves y anfibios (revisado por Deutschlander et al., 1999; Ritz et al., 2002; Wiltschko y Wiltschko, 2002) y se ha observado que la retina está involucrada en la magnetorrecepción en aves (Wiltschko et al., 2002; Wiltschko et al., 2003), lo que sugiere que la privación de estímulos visuales podría afectar a la respuesta ante estímulos magnéticos. En este trabajo comprobamos que la eliminación de estímulos visuales mediante la desafereciación retiniana en ratas da lugar a la alteración de la respuesta ante cambios en la polaridad del campo magnético, activando poblaciones neuronales de los estratos superficiales del CS que en condiciones normales no respondían a estos estímulos magnéticos. Los resultados obtenidos demuestran que la exposición a cambios en la polaridad del campo geomagnético induce la activación de la proteína c-Fos en los estratos superficiales del CS cuando los animales han sido sometidos a la desafereciación visual. Además, este

incremento de la expresión de esta proteína se hace más notable cuando la desaferenciación tiene lugar neonatalmente. Sin embargo, los cambios de polaridad apenas tuvieron efecto en la inducción del c-Fos en los estratos superficiales del CS de animales ilesos.

Como se ha descrito anteriormente la desaferenciación retiniana neonatal da lugar a una variedad de cambios plásticos en las aferencias que llegan al CS (Rhoades et al., 1981; Gerrikagoitia et al., 2001; García del Caño et al., 2001, 2002, 2004; Mundiñano y Martínez-Millán, 2010). Se ha evidenciado que tras la privación de la entrada de estímulos visuales mediante enucleación neonatal los estratos superficiales del CS son inervados por fibras que normalmente proyectan a regiones más profundas del CS como es el caso de las fibras procedentes del núcleo cuneado de los núcleos de la columna dorsal (García del Caño et al., 2004), *inputs* somatosensoriales de la médula espinal y de la corteza somatosensorial donde se encuentran representadas las extremidades superiores (Rhoades et al., 1981), fibras procedentes de la corteza retrosplenial (García del Caño et al., 2001), y de los campos de barriles de la corteza somatosensorial primaria donde se encuentran representadas las vibrisas (Mundiñano y Martínez-Millán, 2010). Concretamente, en este último trabajo desarrollado en nuestro laboratorio, además del ascenso de fibras a los estratos superficiales del CS, se observó un aumento en la expresión de c-Fos en los estratos superficiales del CS tras dos tipos diferentes de estimulación de las vibrisas: el tratamiento con apomorfina y la exploración en un ambiente enriquecido (Mundiñano y Martínez-Millán, 2010). Asimismo, en nuestro grupo de investigación se ha observado que como consecuencia de la desaferenciación retiniana neonatal, la proyección al CS originada en la corteza externa del colículo inferior (CI) asciende ocupando estratos superficiales del CS (Mundiñano, 2008). Además, las neuronas de los estratos superficiales del CS de la rata adulta sometida a enucleación neonatal presentan un aumento significativo en la inducción de c-Fos ante diferentes tipos de estímulos auditivos (Mundiñano, 2008). Estos datos sugieren que el ascenso de las fibras, procedentes de áreas que en condiciones normales no inervan los estratos superficiales del CS tras la desaferenciación neonatal, podría estar reclutando neuronas coliculares superficiales para la participación en las respuestas de tipo no visual, representando una respuesta adaptativa compensatoria ante la ausencia de estímulos visuales. De modo similar, el incremento significativo mostrado en la inducción de c-Fos por la estimulación magnética en los estratos superficiales del CS tras la desaferenciación visual neonatal sugiere que estas neuronas podrían estar siendo reclutadas para el procesamiento de estímulos magnéticos ante la ausencia de estímulos de origen visual.

Sorprendentemente, aunque en menor medida que la enucleación neonatal, cuando la desaferenciación fue practicada en el adulto también se observó un incremento de los niveles de expresión de c-Fos en los estratos superficiales del CS, indicando el mantenimiento de cierta capacidad de respuesta plástica frente a estímulos magnéticos. De acuerdo con los resultados observados por García del Caño y colaboradores en los que la enucleación en el adulto, aunque no daba lugar a una expansión del campo terminal corticocolicular visual, producía un fenómeno de sinaptogénesis reactiva mostrándose como un incremento de la densidad de botones sinápticos en el SZ y el SGS, también observada cuando la enucleación tenía lugar en el recién nacido (García del Caño et al., 2002), podría estar indicando que la inducción de estas células c-Fos inmunopositivas activadas por estímulos magnéticos podría estar mediada por la conexión visual corticocolicular.

Hay estudios en los que se ha determinado que la vía corticocolicular expresa el transportador de glutamato vesicular (VGluT)1 en sus terminales (Fremeau et al., 2001; Varoqui et al., 2002). Con el fin de dilucidar la posible contribución de la conexión visual corticocolicular en la activación neuronal en los estratos superficiales del CS por estímulos magnéticos primero analizamos la expresión de VGluT1 mediante inmunohistoquímica en los estratos superficiales coliculares de ratas adultas y la comparamos con la expresión en ratas adultas sometidas a desaferenciación retiniana practicada neonatalmente y en estadio adulto. El inmunomarcado de los terminales con VGluT1 en animales control se localizó, principalmente, en la región comprendida entre la mitad superior del SO y, más notablemente, en la mitad inferior del SGS, región más densamente inervada por las fibras procedentes de la CV1 (Lund, 1964; Harvey y Worthington, 1990). Este patrón de marcado coincide con los resultados mostrados por otros autores (Fremeau et al., 2001; Varoqui et al., 2002). Como consecuencia de la enucleación neonatal se observó un aumento notorio de los terminales positivos para VGluT1 en la porción superior del SGS. Esta distribución se corresponde con la ampliación del campo terminal visual corticocolicular donde los terminales tienden a distribuirse más dorsalmente (García del Caño et al., 1997, 2002). Sin embargo, la desaferenciación retiniana practicada en el estadio adulto no dio lugar a cambios notables en el patrón de expresión de VGluT1 en los estratos superficiales coliculares tal y como Fujiyama y colaboradores habían descrito previamente (Fujiyama et al., 2003), lo que confirma la ausencia de expansión del campo terminal procedente de la CV1 en ratas con enucleación en fase adulta (García del Caño et al., 2002). A continuación, mediante doble inmunofluorescencia para c-Fos y VGluT1 observamos que en los estratos superficiales de

animales adultos con desaferenciación visual neonatal terminales VGluT1 inmunomarcados se mostraron distribuidos formando agrupaciones de tipo perineuronal rodeando células c-Fos positivas activadas por estímulos magnéticos. Estas observaciones sugieren que el aumento de la activación de células c-Fos positivas en los estratos superficiales coliculares inducidas por cambios en la polaridad del campo magnético tras la privación de estímulos visuales podría estar mediado, al menos en parte, por las fibras provenientes de la CV1. Sin embargo, el marcado de los terminales presinápticos con VGluT1 no permite discernir la procedencia exacta de éstos terminales, puesto que diversas áreas cerebrales, principalmente regiones corticales, emplean el VGluT1 como transportador vesicular del glutamato (revisado por Fremeau et al., 2004). Como se ha explicado anteriormente, el ascenso de fibras procedentes de la corteza somatosensorial y retrosplenial tras la enucleación neonatal (Rhoades et al., 1981; García del Caño et al., 2001; Mundiñano y Martínez-Millán, 2010) podría estar contribuyendo a este incremento de la inducción del c-Fos. No obstante, este ascenso no justificaría los niveles incrementados de c-Fos en los animales sometidos a desaferenciación retiniana de adulto. Futuras investigaciones serán necesarias para determinar la participación de otras posibles vías en la inducción del c-Fos tras estímulos de naturaleza magnética.

### **5.5.2. Efecto de la exposición a un campo magnético con polaridad alternante en la organización del campo terminal corticocolicular visual de animales sometidos a desaferenciación retiniana en fase adulta**

El aumento de fibras provenientes de la CV1 en regiones más mediales de los estratos superficiales del CS observado en animales con desaferenciación retiniana de adulto expuestos a un campo magnético con polaridad cambiante es indicativo de que la estimulación magnética repetida, asociada a la activación de c-Fos, confiere una cierta capacidad de reorganización postlesional en el adulto. En este sentido, un trabajo reciente desarrollado en *Drosophila*, ha evidenciado que la transcripción mediada por el factor de transcripción AP-1, constituido por la dimerización de miembros de la familia Fos y Jun, es importante para el crecimiento de dendritas, y que la actividad neuronal influye en el crecimiento dendrítico global a través de mecanismos dependientes de expresión de genes controlados por AP-1 (Hartwig et al., 2008). Además sugieren que la actividad nerviosa recluta el factor de transcripción AP-1 posiblemente a través de la síntesis *de novo* de proteínas Fos, para promover el crecimiento de neuritas (Hartwig et al., 2008).

### 5.5.3. Efecto de la exposición a un campo magnético con polaridad alternante en la expresión de BDNF

Con el fin de dilucidar los posibles mecanismos que pudieran estar mediando los fenómenos de plasticidad observados tras la estimulación magnética se analizaron los niveles proteicos del BDNF, neurotrofina involucrada en la promoción del crecimiento de neuritas, mediante el ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA). Los resultados demostraron que la exposición de los animales a un campo magnético con polaridad cambiante da lugar a un aumento significativo de los niveles de expresión de esta neurotrofina en la corteza visual y el CS, sugiriendo la implicación del BDNF en esta respuesta plástica. En el presente trabajo proponemos que el aumento del BDNF podría estar mediado por la inducción del c-Fos observado en el la corteza visual y el CS. Como se ha mencionado previamente, es conocido que la dimerización del c-Fos con miembros de la familia Jun constituye el factor de transcripción AP-1, que regula la transcripción de genes diana que contienen lugares de unión AP-1 (Sheng y Greenberg, 1990). Se ha demostrado que el análisis de los lugares de unión a factores de transcripción de la región promotora 5' terminal del gen BDNF de ratón mostraba predominancia de elementos AP-1 y C/EBP (Hayes et al., 1997) y que esta región presentaba una alta homología con la misma región del gen de BDNF de rata (Timmusk et al., 1993; Nakayama et al., 1994). La región promotora del NGF de ratón contiene varios lugares de unión AP-1 potenciales, necesarios para la actividad promotora del NGF (Hengerer et al., 1990). Aparte del mantenimiento de la expresión basal, estos elementos AP-1 se han visto involucrados en la modulación de la transcripción del factor de crecimiento nervioso (NGF) tras la estimulación por éster del forbol (D'Mello y Heinrich, 1991). El aumento del mRNA de *c-fos* y *c-jun* inducido por lesión resulta en la ocupación de lugares de unión AP-1 del promotor del NGF, que subsecuentemente está involucrado en el aumento de la transcripción del gen de NGF (Hengerer et al., 1990; D'Mello y Heinrich, 1991). La presencia de elementos AP-1 en la región promotora del BDNF y el hecho de que genes similares al BDNF, como es el NGF (Zheng y Heinrich, 1988), estén modulados por elementos reguladores AP-1 (Hengerer et al., 1990; D'Mello y Heinrich, 1991), nos sugiere que la modulación de la transcripción del BDNF por estímulos magnéticos podría estar regulada por la inducción del c-Fos constituyendo parte del factor de transcripción AP-1. Los niveles de inducción del c-Fos observados en los estratos superficiales del CS no justificarían esta hipótesis en el caso de los animales control, puesto que cuando fueron sometidos a estimulación magnética, aunque presentaron un ligero incremento de inmunopositividad para

el c-Fos respecto a los no estimulados, las diferencias no resultaron significativas. No obstante, es importante tener en cuenta que los niveles del BDNF fueron analizados en la fracción proteica de la totalidad del CS, incluyendo los estratos intermedios y profundos, dada las dificultades metodológicas para la disección exclusiva de los estratos superficiales. Aunque en este trabajo de tesis nos hemos centrado en el análisis de la inducción del c-Fos en los estratos superficiales del CS, estrechamente relacionados con la función visual, hemos observado que la estimulación magnética producía un incremento notable de la expresión de c-Fos en los estratos intermedios y profundos del CS en los animales estimulados, tanto enucleados como ilesos, respecto a los no estimulados (resultados no publicados). Teniendo en cuenta ésto, es razonable plantear que el aumento del BDNF pudiera estar mediado por la inducción del c-Fos en el CS. Además, los resultados obtenidos mostraron que la estimulación magnética producía un incremento del BDNF aún más notorio en los animales visualmente desafiados de recién nacido respecto a los ilesos, pudiendo explicarse por el aumento de la expresión del c-Fos en los estratos superficiales de los animales lesionados en comparación con los ilesos. Sin embargo, estas diferencias pueden ser consecuencia del propio efecto de la enucleación neonatal ya que, en ausencia de estímulos magnéticos, los niveles del BDNF se vieron incrementados en estos animales lesionados respecto a los controles no estimulados. En este sentido, se ha mostrado la inducción del mRNA del BDNF en el CS como consecuencia de la desafiación visual neonatal, aunque en contradicción con nuestras observaciones, esta respuesta es transitoria y desaparece en el adulto (Vizueté et al., 2001). Estas diferencias pueden ser debidas a que en el trabajo desarrollado por Vizueté y colaboradores, el estudio se llevó a cabo a nivel de mRNA, a diferencia de nuestro trabajo en el que se analizaron los niveles proteicos.

Por otro lado, cuando analizamos los niveles de proteína del BDNF tras la estimulación magnética de animales control en otras áreas corticales no directamente involucradas en la función visual, como son la corteza motora y la auditiva, observamos un incremento, especialmente en la corteza motora, de esta neurotrofina. Estas regiones fueron seleccionadas debido a que ambas, y de forma más intensa la corteza motora, mostraron una fuerte inducción del c-Fos tras la estimulación magnética, lo que de nuevo corrobora la hipótesis planteada acerca de que la inducción del BDNF pudiera estar mediada por el c-Fos.

Como se ha comentado, la estimulación magnética promueve la expresión del BDNF tanto en la corteza visual como en CS, lo que parece indicar que la recuperación de la

respuesta plástica está mediada por el incremento del BDNF. Estos resultados son congruentes con los detallados anteriormente en los que se describe una reinstauración de la plasticidad en este modelo de lesión tras el tratamiento con fluoxetina. En los animales tratados con fluoxetina proponemos que la plasticidad observada pueda estar mediada por un aumento de los niveles de expresión del BDNF en la corteza visual (Maya Vetencourt et al., 2008; 2011). Sin embargo, el tratamiento con fluoxetina resultó ser más eficaz que la estimulación magnética puesto que la promoción del crecimiento axonal fue más notorio, mostrándose como una considerable expansión del centro del campo terminal hacia regiones más laterales y más mediales. Estas diferencias pueden razonarse desde un punto de vista metodológico puesto que el tratamiento con fluoxetina tuvo una duración total de 4 semanas, mientras que los animales fueron estimulados magnéticamente durante 11 días. Aunque durante este periodo de estimulación fue suficiente para observar un incremento en la expresión de BDNF en la corteza visual y en el CS, es probable que los efectos del incremento del BDNF en los cambios en la reorganización de la conectividad estudiada requieran tiempos de supervivencia mayores para alcanzar el efecto observado tras el tratamiento con fluoxetina. No obstante, la observación de fibras en regiones más mediales y la presencia de engrosamientos terminales con apariencia de conos de crecimiento demuestran un proceso de reorganización postlesional que parece estar promovido por el aumento del BDNF tras la estimulación magnética.

Los mecanismos que participan en la promoción del crecimiento axonal mediado por el BDNF tras la estimulación magnética se desconocen. Es posible que la unión del BDNF al receptor desencadene la ruta de señalización MAPK-ERK como se ha demostrado en la reinstauración de la plasticidad de la corteza visual tras el tratamiento crónico con fluoxetina (Maya Vetencourt et al., 2011). Se ha documentado que la señalización por PKA y PI3K/Akt está involucrada en el crecimiento de neuritas inducido por BDNF *in vitro* (Williams et al., 2005). Además, se ha demostrado que la activación de CREB da lugar a la regeneración axonal *in vivo* (Gao et al., 2004), y el BDNF activa CREB vía PI3K/Akt y MAPK/ERK (Huang y Reichardt, 2003), por lo que cabe la posibilidad de que las rutas de señalización PI3K/Akt y MAPK/ERK estén involucradas en la acción del BDNF en la promoción de la regeneración axonal. También existen evidencias que demuestran que el BDNF aumenta la expresión de la proteína asociada al crecimiento GAP-43 (Kobayashi et al., 1997; Klocker et al., 2001; Kwon et al., 2002), proteína comúnmente relacionada con el crecimiento de neuritas y la regeneración axonal (Meiri et al., 1998; Gianola y Rossi, 2004). Sin embargo, futuras

investigaciones serán necesarias para identificar las cascadas de señalización, así como otros factores, que pudieran estar implicadas en estos fenómenos de plasticidad observados tras la estimulación magnética.

## **5.6. Recapitulación de resultados**

A lo largo del desarrollo postnatal disminuye la capacidad de regeneración y de reorganización de las conexiones nerviosas tras las lesiones que afectan al SNC. En el presente trabajo ponemos de manifiesto la alta capacidad de regeneración y reorganización estructural del CS durante el desarrollo postnatal temprano tras la ablación neonatal de sus estratos superficiales acompañada por el reestablecimiento de las conexiones retino- y corticocoliculares aferentes y por cambios en el patrón de expresión de las proteínas ligantes de calcio, CB, CR y PV, así como del GFAP. Sin embargo, esta lesión sola o combinada con la desaferenciación retiniana neonatal, da lugar a la aparición de una conexión retinocolicular aberrante. Proponemos que la reorganización estructural observada pueda estar mediada por la glia radial presente en los primeros días postnatales en el CS (Pulido-Caballero et al., 1994) mediante la redistribución de las células próximas al lugar de la lesión, y que el reestablecimiento de las conexiones se esté llevando a cabo por axones retino- y corticocoliculares que no habían alcanzado el CS en el momento en el que la lesión fue practicada, aunque no se puede descartar que sea por la regeneración de los axones dañados o por una combinación de ambos. Futuras investigaciones serán necesarias para responder a estas cuestiones.

Por otro lado, comprobamos que es posible incrementar la respuesta plástica tras lesiones practicadas en el SNC maduro analizando diferentes estrategias que pudieran favorecer la plasticidad en la vía corticocolicular visual en animales sometidos a la desaferenciación retiniana en edad adulta. En este sentido, tanto el empleo de siRNAs dirigidos frente a NgR y, de forma mas considerable frente a RhoA, moléculas ampliamente involucradas en la inhibición del crecimiento axonal, resulta eficaz en la ampliación de dicha conexión, normalmente atribuida a lesiones practicadas neonatalmente (García del Caño et al., 1997, 2002). El diseño de experimentos que permitan prolongar los efectos de estos siRNAs, como por ejemplo, mediante bombas osmóticas o inclusión en nanoesferas para su lenta liberación, permitirán determinar si la reducción mas mantenida de estas moléculas inhibitoras del crecimiento axonal mejora la respuesta plástica observada en este trabajo.



Son de notable interés los resultados obtenidos tras el tratamiento crónico con fluoxetina, medicamento ampliamente prescrito para el tratamiento de la depresión en humanos, que muestran una notable expansión de la conexión corticocolicular visual en ratas desafereciadas en estadio adulto. Además, reafirma su efecto en la reinstauración de la plasticidad en el sistema visual maduro observado previamente (Maya Vetencourt et al., 2008, 2011).

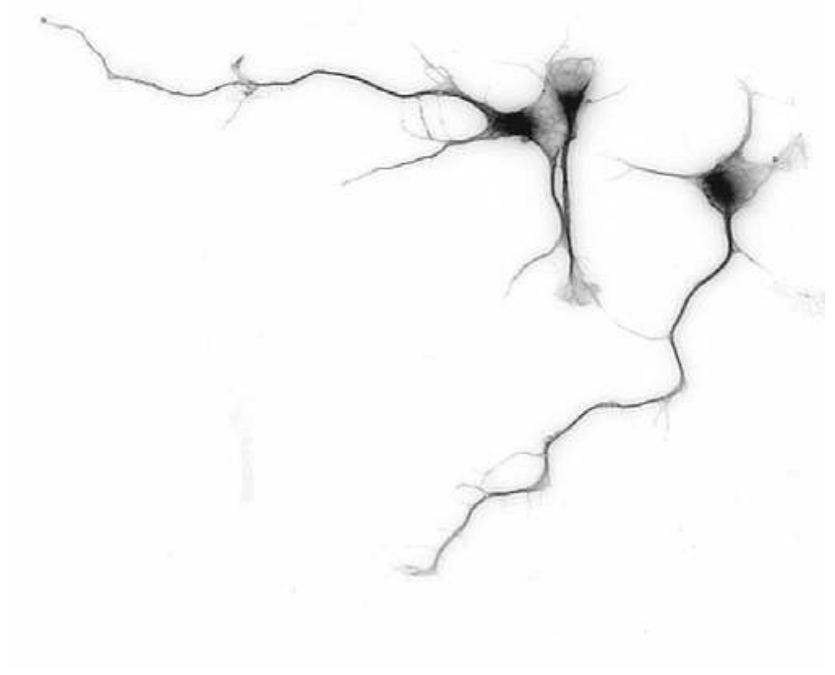
En este trabajo se ha determinado que la exposición a un campo magnético con la polaridad alterada da lugar a una activación diferencial, analizado mediante la inducción de c-Fos, de las neuronas de los estratos superficiales coliculares tras la privación visual consistente en un incremento significativo de neuronas que responden a estímulos magnéticos tras la desafereciación visual, principalmente neonatal, y en fase adulta. Sugerimos que estos hallazgos pueden ser indicativos de una respuesta compensatoria funcional ante la falta de estímulos visuales. Además, observamos que diferentes regiones corticales, la corteza visual, la auditiva y la motora, presentan neuronas que responden ante estos estímulos magnéticos. Con esto, ponemos de manifiesto, por primera vez, que en la rata diferentes regiones cerebrales responden ante cambios en el campo magnético débiles, lo que sugiere que estas regiones puedan estar implicadas en el procesamiento de estímulos de naturaleza magnética.

Asimismo, la estimulación magnética también mejoró la capacidad de respuesta plástica postlesional en animales adultos. La mejora de esta respuesta plástica tanto tras la exposición a un campo magnético con polaridad cambiante, como tras el tratamiento con fluoxetina parece estar mediada por la señalización desencadenada por el BDNF, puesto que hemos observado que los niveles de esta neurotrofina en la corteza visual y en el CS se ven incrementados tras la estimulación magnética, y aumentan en la corteza visual tras el tratamiento con dicho antidepresivo (Maya Vetencourt et al., 2008, 2011).

Acercamientos experimentales combinados, incluyendo el bloqueo de las rutas de señalización inhibitorias del crecimiento axonal, como es la administración de siRNAs frente a RhoA, junto con el incremento de neurotrofinas que favorecen el crecimiento axonal, como el BDNF mediante el tratamiento crónico con fluoxetina o la estimulación magnética podrían favorecer la respuesta plástica observada.

Todavía queda por dilucidar si el incremento del crecimiento axonal en la conexión visual corticocolicular en ratas enucleadas en edad adulta tras los diferentes tratamientos

llevados a cabo pueden ser explotados para facilitar la recuperación funcional tras lesiones llevadas a cabo en el sistema visual. Asimismo, cabe preguntarse en qué medida estos resultados pueden ser extrapolados a otros modelos de lesión en el SNC. No obstante, los resultados obtenidos en este trabajo de tesis, especialmente los obtenidos tras el tratamiento crónico con fluoxetina y tras la estimulación magnética dada la naturaleza no invasiva de ambas estrategias, las convierte en una estrategia terapéutica idónea, para el incremento de la plasticidad tras lesiones en el sistema visual adulto.



## **6. CONCLUSIONES**

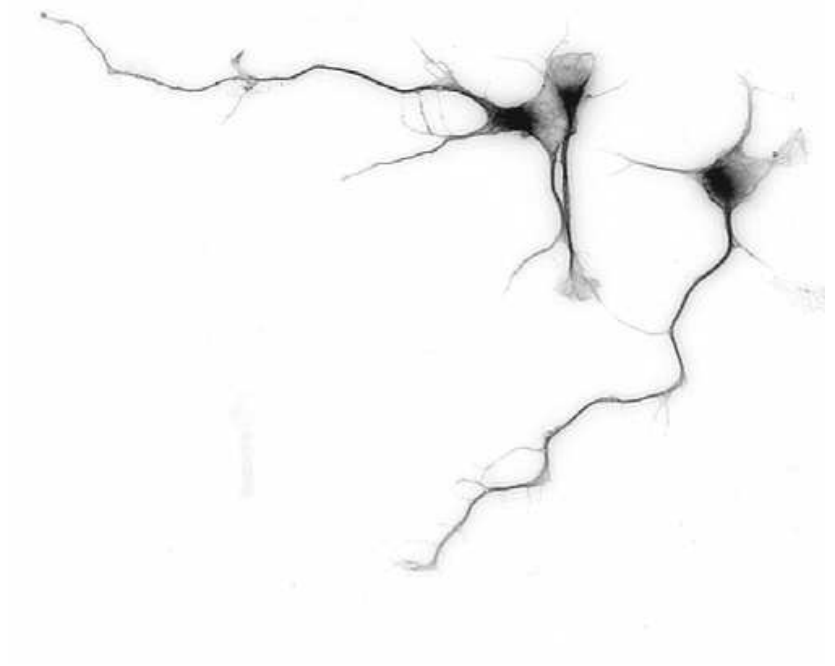


## **6. CONCLUSIONES**

1. En la rata adulta, como consecuencia de la ablación unilateral de los estratos superficiales coliculares neonatal, se produce un descenso de la inervación retinocolicular contralateral, así como una invasión del estrato gris superficial, normalmente no inervado por aferencias retinianas. Sin embargo, cuando la lesión se lleva a cabo en animales adultos esta reorganización no tiene lugar.
2. La ablación unilateral de los estratos superficiales coliculares combinada con la desaferenciación retiniana del ojo contralateral neonatal, en la rata adulta, da lugar a un campo terminal retinocolicular ipsilateral incrementado, así como la invasión del estrato gris intermedio del colículo superior contralateral por fibras axonales provenientes de la retina.
3. La ablación neonatal unilateral de los estratos superficiales del colículo superior no da lugar cambios notables de la organización del campo terminal corticocolicular visual de animales adultos.
4. Como consecuencia de la ablación neonatal unilateral de los estratos superficiales del colículo superior sólo, o combinada con la desaferenciación retiniana contralateral, en la rata adulta se observa una regeneración y reorganización estructural de los estratos superficiales dañados consistentes en cambios en la distribución de neuronas locales y astrocitos, observables mediante la alteración del patrón de expresión de proteínas ligantes de calcio y GFAP, respectivamente.
5. La administración de siRNAs frente al receptor de Nogo y de forma más notable frente a RhoA en la corteza visual primaria provoca una expansión de la proyección corticocolicular visual en ratas sometidas a desaferenciación retiniana en el estadio adulto. Sin embargo, la inyección combinada de siRNAs frente ambas moléculas apenas da lugar a esta expansión.
6. El tratamiento crónico con fluoxetina da lugar a una notable ampliación del campo terminal corticocolicular visual en animales enucleados en fase adulta.
7. La exposición de la ratas a un campo magnético con polaridad alterada provoca la inducción de c-Fos en los estratos superficiales del colículo superior de animales

desaferenciados visualmente, de forma más evidente cuando la lesión tiene lugar neonatalmente, pudiendo estar mediado, al menos en parte, por las fibras aferentes visuales corticocoliculares. Además, se produce un incremento de la expresión de c-Fos en las distintas áreas corticales estudiadas, la corteza visual, la motora y la auditiva, de ratas control.

8. El campo terminal corticocolicular visual se encuentra expandido tras la exposición a un campo magnético con polaridad alterada a los animales sometidos a desaferenciación retiniana en estadio adulto.
9. Tras la exposición de las ratas a un campo magnético con la polaridad alterada se observa un fuerte incremento de los niveles de expresión de BDNF en el colículo superior y en la corteza visual primaria de animales control y enucleados de recién nacido, que puede estar contribuyendo a la expansión del campo corticocolicular visual. Asimismo se produce un aumento significativo de BDNF en la corteza motora y, moderado, en la corteza auditiva.



## ***7. BIBLIOGRAFÍA***





## 7. BIBLIOGRAFÍA

- Agarwala S, Kalil RE. 1998. Axotomy-induced neuronal death and reactive astrogliosis in the lateral geniculate nucleus following a lesion of the visual cortex in the rat. *J Comp Neural*, 392: 252-263.
- Ahmed S, Reynolds BA, Weiss S. 1995. BDNF enhances the differentiation but not the survival of CNS stem cell-derived neuronal precursors. *J Neurosci*, 15: 5765-5778.
- Ahmed Z, Dent RG, Suggate EL, Barrett LB, Seabright RJ, Berry M, Logan A. 2005. Disinhibition of neurotrophin-induced dorsal root ganglion cell neurite outgrowth on CNS myelin by siRNA-mediated knockdown of NgR, p75NTR and Rho-A. *Mol Cell Neurosci*, 28: 509-523.
- Altman J, Bayer SA. 1981. Time of origin of neurons of the rat superior colliculus in relation to other components of the visual visuomotor pathways. *Exp Brain Res*, 42: 424-434.
- Ampuero E, Rubio FJ, Falcon R, Sandoval M, Diaz-Veliz G, González RE, Earle N, Dagnino-Subiabre A, Aboitiz F, Orrego F, Wyneken U. 2010. Chronic fluoxetine treatment induces structural plasticity and selective changes in glutamate receptor subunits in the rat cerebral cortex. *Neuroscience*, 169: 98-108.
- Angelucci A, Clascá F, Sur M. 1996. Anterograde axonal tracing with the subunit B of cholera toxin: a highly sensitive immunohistochemical protocol for revealing fine axonal morphology in adult and neonatal brains. *J Neurosci Methods*, 65: 101-112.
- Aronin N, Sagar SM, Sharp FR, Schwartz W. 1990. Light regulates expression of a Fos-related protein in the rat SCN. *Proc Natl Acad Sci USA*, 87: 5959-5962.
- Avwenagha O, Campbell G, Bird MM. 2003. The outgrowth response of the axons of developing and regenerating rat retinal ganglion cells in vitro to neurotrophin treatment. *J Neurocytol*, 32: 1055-75.
- Bandtlow C, Zachleder T, Schawb ME. 1990. Oligodendrocytes arrest neurite growth by contact inhibition. *J Neurosci*, 10: 3837-3848.
- Barbacid M. 1995. Neurotrophic factors and their receptors. *Curr Opin Cell Biol*, 7: 148-155.
- Barde YA, Edgar D, Thoenen H. 1982. Purification of a new neurotrophic factor from mammalian brain. *Embo J*, 1:549-553.
- Barrette B, Vallieres N, Dube M, Lacroix S. 2007. Expression profile of receptors for myelin-associated inhibitors of axonal regeneration in the intact and injured mouse central nervous system. *Mol Cell Neurosci*, 34: 519-538.
- Barth M, Hirsch HV, Meinertzhagen IA, Heisenberg M. 1997. Experience-dependent developmental plasticity in the optic lobe of *Drosophila melanogaster*. *J Neurosci*, 17: 1493-1504.
- Bastos EF, Marcelino JL, Amaral AR, Serfaty CA. 1999. Fluoxetine-induced plasticity in the rodent visual system. *Brain Res*, 824: 28-35.
- Beason RC, Semm P. 1987. Magnetic responses of the trigeminal system of the bobolink (*Dolichonyx oryzivorus*). *Neurosci Lett*, 80: 229-234.

- Beaver CJ, Mitchell DE, Robertson HA. 1993. Immunohistochemical study of the pattern of rapid expression of c-fos protein in the visual cortex of dark-reared kittens following initial exposure to light. *J Comp Neurol*, 333: 469-484.
- Beckstead RM, Frankfurter A. 1983. A direct projection from the retina to the intermediate gray layer of the superior colliculus demonstrated by anterograde transport of horseradish peroxidase in monkey, cat and rat. *Exp Brain Res*, 52: 261-268.
- Begall S, Cerveny J, Neef J, Vojtech O, Burda H. 2008. Magnetic alignment in grazing and resting cattle and deer. *Proc Natl Acad Sci USA*, 105: 13451-13455.
- Benfey M, Aguayo AJ. 1982. Extensive elongation of axons from rat brain into peripheral nerve grafts. *Nature*, 296: 150-152.
- Berardi N, Pizzorusso T, Maffei L. 2000. Critical periods during sensory development. *Curr Opin Neurobiol*, 10: 138-145.
- Berkelaar M, Clarke DB, Wang YC, Bray GM, Aguayo AJ. 1994. Axotomy results in delayed death and apoptosis of retinal ganglion cells in adult rats. *J Neurosci*, 14: 4368-4374.
- Berry M, Butt A, Logan A. 1998. *Cellular Responses to CNS Injury*. Ed: CRC Press, Boca, Raton, Florida, pp: 1-18.
- Berry M. 1982. Post-injury myelin-breakdown products inhibit axonal growth: an hypothesis to explain the failure of axonal regeneration in the mammalian central nervous system. *Bibl Anat*, 1-11.
- Bibel M, Barde YA. 2000. Neurotrophins: key regulators of cell fate and cell shape in the vertebrate nervous system. *Genes Dev*, 14: 2919-2937.
- Binns KE. 1999. The synaptic pharmacology underlying sensory processing in the superior colliculus. *Prog Neurobiol*, 59: 129-159.
- Bonfanti L. 2006. PSA-NCAM in mammalian structural plasticity and neurogenesis. *Prog Neurobiol*, 80: 129-164.
- Bradford MM. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 72: 248-254.
- Bregman BS, Kunkel-Bagden E, Schnell L, Dai HN, Gao D, Schwab ME. 1995. Recovery from spinal cord injury mediated by antibodies to neurite growth inhibitors. *Nature*, 378: 498-501.
- Bryan B, Cai Y, Wrighton K, Wu G, Feng XH, Liu M. 2005. Ubiquitination of RhoA by Smurf1 promotes neurite outgrowth. *Febs Lett*, 579: 1015-1019.
- Buffo A, Zagrebelsky M, Huber AB, Skerra A, Schwab ME, Strata P, Rossi F. 2000. Application of neutralizing antibodies against NI-35/250 myelin-associated neurite growth inhibitory proteins to the adult rat cerebellum induces sprouting of uninjured purkinje cell axons. *J Neurosci*, 20: 2275-2286.

- Buj-Bello A, Pinon LG, Davies AM. 1994. The survival of NGF-dependent but not BDNF-dependent cranial sensory neurons is promoted by several different neurotrophins early in their development. *Development*, 120: 1573-1580.
- Bundesen LQ, Scheel TA, Bregman BS, Kromer LF. 2003. Ephrin-B2 and EphB2 regulation of astrocyte-meningeal fibroblast interactions in response to spinal cord lesions in adult rats. *J Neurosci*, 23: 7789-7800.
- Bunge MB. 2002. Bridging the transected or contused adult rat spinal cord with Schwann cell and olfactory ensheathing glia transplants. *Prog Brain Res*, 137: 275-282.
- Burda H, Begall S, Cerveny J, Neef J, Němec P. 2009. Extremely low-frequency electromagnetic fields disrupt magnetic alignment of ruminants. *Proc Natl Acad Sci USA*, 106: 5708-5713.
- Burger T, Lucová M, Moritz RE, Oelschläger HH, Druga R, Burda H, Wiltschko W, Wiltschko R, Němec P. 2010. Changing and shielded magnetic fields suppress c-Fos expression in the navigation circuit: input from the magnetosensory system contributes to the internal representation of space in a subterranean rodent. *J R Soc Interface*, 7: 1275-1292.
- Campello-Costa P, Fosse Jr. AM, Ribeiro JC, Paes-De-Carvalho R, Serfaty CA. 2000. Acute blockade of nitric oxide synthesis induces disorganization and amplifies lesion-induced plasticity in the rat retinotectal projection. *J Neurobiol*, 44: 371-381.
- Cao X, Gao Y, Deng K, Williams G, Doherty P, Walsh FS. 2010. Receptors for myelin inhibitors: structures and therapeutic opportunities. *Mol Cell Neurosci*, 43: 1-14.
- Carim-Todd L, Escarceller M, Estivill X, Sumoy L. 2003. LRRN6A/LERN1 (leucine-rich repeat neuronal protein 1), a novel gene with enriched expression in limbic system and neocortex. *Eur J Neurosci*, 18: 3167-3182.
- Carman LS, Schneider GE. 1992. Aberrant retinal projections to midbrain targets mediate spared visual orienting function in hamsters with neonatal lesions of superior colliculus. *Exp Brain Res*, 90: 92-102.
- Carman LS, Schneider GE. 1992. Orienting behaviour in hamsters with lesions of superior colliculus, pretectum, and visual cortex. *Exp Brain Res*, 90: 79-91.
- Caroni P, Schwab ME. 1988. Antibody against myelin-associated inhibitor of neurite growth neutralizes nonpermissive substrate properties of CNS white matter. *Neuron*, 1: 85-96.
- Castanotto D, Sakurai K, Lingeman R, Li H, Shively L, Aagaard L, Soifer H, Gatignol A, Riggs A, Rossi JJ. 2007. Combinatorial delivery of small interfering RNAs reduces RNAi efficacy by selective incorporation into RISC. *Nucleic Acids Res*, 35: 5154-5164.
- Castrén E, Rantamäki T. 2010. The role of BDNF and its receptors in depression and antidepressant drug action: reactivation of developmental plasticity. *Dev Neurobiol*, 70: 289-297.
- Castrén E, Võikar V, Rantamäki T. 2007. Role of neurotrophic factors in depression. *Curr Opin Pharmacol*, 7: 18-21.
- Castrén E. 2004. Neurotrophic effects of antidepressant drugs. *Curr Opin Pharmacol*, 4: 58-64.

- Castrén E. 2005. Is mood chemistry?. *Nat Rev Neurosci*, 6: 241-246.
- Cavazos JE, Golarai G, Sutula TP. 1991. Mossy fiber synaptic reorganization induced by kindling: time course of development, progression, and permanence. *J Neurosci*, 11: 2794-2803.
- Celio MR. 1990. Calbindin D28k and parvalbumin in the rat nervous system. *Neuroscience*, 35:375-475.
- Cellerino A, Siciliano R, Domenici L, Maffei L. 1992. Parvalbumin immunoreactivity: a reliable marker for the effects of monocular deprivation in the rat visual cortex. *Neuroscience*, 51: 749-753.
- Cerutti SM, Chadi G. 2000. S100 immunoreactivity is increased in reactive astrocytes of the visual pathways following a mechanical lesion of the rat occipital cortex. *Cell Biol Int*, 24: 35-49.
- Chalupa LM, Rhoades RW. 1979. An autoradiographic study of the retinotectal projection in the golden hamster. *J Comp Neurol*, 186: 561-569.
- Chambille I, Doyle S, Serviere J. 1993. Photic induction and circadian expression of Fos-like protein. Immunohistochemical study in the retina and suprachiasmatic nuclei of hamster. *Brain Res*, 612: 138-150.
- Chan SO, Chow KL, Jen LS. 1989. Postnatal development of the ipsilaterally projecting retinal ganglion cells in normal rats and rats with neonatal lesions. *Dev Brain Res*, 49: 265-274.
- Chan SO, Jen LS. 1988. Enlargement of uncrossed retinal projections in the albino rat: additive effects of neonatal eye removal and thalamectomy. *Brain Res*, 461: 163-168.
- Chaudhry N, Filbin MT. 2006. Myelin-associated inhibitory signaling and strategies to overcome inhibition. *J Cereb Blood Flow Metab*, 27: 1096-1107.
- Chen F, Madsen TM, Wegener G, Nyengaard JR. 2008. Changes in rat hippocampal CA1 synapses following imipramine treatment. *Hippocampus*, 18: 631-639.
- Chen MS, Huber AB, van der Haar ME, Frank M, Schnell L, Spillmann AA, Christ F, Schwab ME. 2000. Nogo-A is a myelin-associated neurite outgrowth inhibitor and an antigen for monoclonal antibody IN-1. *Nature*, 403: 434-439.
- Chiaia NL, Zhang S, King TD, Rhoades RW. 1994. Evidence for prenatal competition among the central arbors of trigeminal primary afferent neurons: single axon analysis. *J Comp Neurol*, 345: 303-313.
- Chow KL, Mathers LH, Spear PD. 1973. Spreading of uncrossed retinal projection in superior colliculus of neonatally enucleated rabbits. *J Comp Neurol*, 151: 307-322.
- Cohen-Cory S, Fraser SE. 1995. Effects of brain-derived neurotrophic factor on optic axon branching and remodelling in vivo. *Nature*, 378: 192-196.
- Colonnese MT, Constantine-Paton M. 2001. Chronic NMDA receptor blockade from birth increases the sprouting capacity of ipsilateral retinocollicular axons without disrupting their early segregation. *J Neurosci*, 21: 1557-1568.
- Cook SC, Wellman CL. 2004. Chronic stress alters dendritic morphology in rat medial prefrontal cortex. *J Neurobiol*, 60: 236-248.

- Coolen LM, Jansen HT, Goodman RL, Wood RI, Lehman MN. 1999. A new method for simultaneous demonstration of anterograde and retrograde connections in the brain: co-injections of biotinylated dextran amine and the beta subunit of cholera toxin. *J Neurosci Methods*, 91: 1-8.
- Cooper ML, Rakic P. 1983. Gradients of cellular maturation and synaptogenesis in the superior colliculus of the fetal rhesus monkey. *J Comp Neurol*, 215: 165-86.
- Coppell AL, Pei Q, Zetterstrom TSC. 2003. Bi-phasic change in BDNF gene expression following antidepressant drug treatment. *Neuropharmacology*, 44: 903-910.
- Cork RJ, Baber SZ, Mize RR. 1998. CalbindinD28k- and parvalbumin- immunoreactive neurons form complementary sublaminae in the rat superior colliculus. *J Comp Neurol*, 394: 205-217.
- Correa-Lacárcel J, Pujante MJ, Terol FF, Almenar-García V, Puchades-Orts A, Ballesta JJ, Lloret J, Robles JA, Sánchez del Campo F. 2000. Stimulus frequency affects c-fos expression in the rat visual system. *J Chem Neuroanat*, 18: 135-146.
- Craner SL, Hoffman GE, Lund JS, Humphrey AL, Lund RD. 1992. cFos labelling in rat superior colliculus: activation by normal retinal pathways and pathways from intracranial retinal transplants. *Exp Neurol*, 117: 219-229.
- Crnko-Hoppenjans TA, Mooney RD, Rhoades RW. 2001. Neonatally elevated serotonin levels alter terminal arbors of individual retinal ganglion cells in superior colliculus of hamsters. *J Comp Neurol*, 432: 528-536.
- Curran T, Morgan JI. 1985. Superinduction of c-fos by nerve growth factor in the presence of peripherally active benzodiazepines. *Science*, 229: 1265-1268.
- D'Mello SR, Heinrich G. 1991. Nerve growth factor gene expression: involvement of a downstream AP-1 element in basal and modulated expression. *Mol Cell Neurosci*, 2: 157-167.
- Dallimore EJ, Cui Q, Beazley LD, Harvey AR. 2002. Postnatal innervation of the rat superior colliculus by axons of late-born retinal ganglion cells. *Eur J Neurosci*, 16: 1295-1304.
- Dallimore EJ, Park KK, Pollett MA, Taylor JSH, Harvey AR. 2010. The life, death and regenerative ability of immature and mature rat retinal ganglion cells are influenced by their birthdate. *Exp Neurol*, 225: 353-365.
- Danzer SC, Crooks KR, Lo DC, McNamara JO. 2002. Increased expression of brain-derived neurotrophic factor induces formation of basal dendrites and axonal branching in dentate granule cells in hippocampal explant cultures. *J Neurosci*, 22: 9754-9763.
- David S, Aguayo AJ. 1981. Axonal elongation into peripheral nervous system "bridges" after central nervous system injury in adult rats. *Science*, 214: 931-933.
- David S, Braun PE, Jackson DL, Kottis V, McKerracher L. 1995. Laminin overrides the inhibitory effects of peripheral nervous system and central nervous system myelin-derived inhibitors of neurite growth. *J Neurosci Res*, 42: 594-602.

- De Winter F, Oudega M, Lankhorst AJ, Hamers FP, Blits B, Ruitenberg MJ, Pasterkamp RJ, Gispens WH, Verhaagen J. 2002. Injury-induced class 3 semaphorin expression in the rat spinal cord. *Exp Neurol*, 175: 61-75.
- Dean P, Redgrave P, Westby GWM. 1989. Event of emergency? Two response systems in the mammalian superior colliculus. *Trends Neurosci*, 12: 137-147.
- Dederen PJ, Gribnau AA, Curfs MH. 1994. Retrograde neuronal tracing with cholera toxin B subunit: comparison of three different visualization methods. *Histochem J*, 26: 856-862.
- Deller T, Frotscher M. 1997. Lesion-induced plasticity of central neurons: sprouting of single fibers in the rat hippocampus after unilateral entorhinal cortex lesion. *Progr Neurobiol*, 53: 687-727.
- Demaine C, Semm P. 1985. The avian pineal gland as an independent magnetic sensor. *Neurosci Lett*, 62: 119-122.
- Dergham P, Ellezam B, Essagian C, Avedissian H, Lubell WD, McKerracher L. 2002. Rho signaling pathway targeted to promote spinal cord repair. *J Neurosci*, 22: 6570-6577.
- Deutschlander ME, Freake MJ, Borland SCH, Phillips JB, Madden RC, Anderson LE, Wilson BW. 2003. Learned magnetic compass orientation by the Siberian hamster *Phodopus sungorus*. *Anim Behav*, 65: 779-786.
- Deutschlander ME, Phillips JB, Borland SC. 1999. The case for light-dependent magnetic orientation in animals. *J Exp Biol*, 202: 891-908.
- Dillon CP, Sandy P, Nencioni A, Kissler S, Rubinson DA, Van Parijs L. 2004. RNAi as an experimental and therapeutic tool to study and regulate physiological and disease processes. *Annu Rev Physiol*, 67: 47-173.
- Dodd DA, Niederoest B, Bloechlinger S, Dupuis L, Loeffler JP, Schwab ME. 2005. Nogo-A, -B, and -C are found on the cell surface and interact together in many different cell types. *J Biol Chem*, 280: 12494-12502.
- Domeniconi M, Cao Z, Spencer T, Sivasankaran R, Wang KC, Nikulina E, Kimura N, Cai H, Deng K, Gao Y, He Z, Filbin MT. 2002. Myelin-associated glycoprotein interacts with the Nogo-66 receptor to inhibit neurite outgrowth. *Neuron*, 35: 283-290.
- Dragunow M, Faull R. 1989. The use of c-fos as a metabolic marker in neuronal pathway tracing. *J Neurosci Methods*, 29: 261-265.
- Dragunow M, Petersen MR, Robertson HA. 1987. Presence of c-fos like immunoreactivity in the adult rat brain. *Eur J Pharmacol*, 135: 113-114.
- Dragunow M, Robertson HA, Robertson GS. 1988. Amygdala kindling and c-Fos protein(s). *Exp Neurol*, 102: 261-263.
- Dragunow M, Robertson HA. 1987. Kindling stimulation induces c-Fos protein(s) in granule cells of the rat dentate gyrus. *Nature*, 329: 441-442.
- Dreher B, Dehay C, Bullier J. 1990. Bihemispheric collateralization of cortical afferents and subcortical efferents to the rat visual cortex. *Eur J Neurosci*, 2: 317-331.

- Dreher B, Sefton AJ, Ni SYK, Nisbett G. 1985. The morphology, number, distribution and central projections of class I retinal ganglion cells in albino and hooded rats. *Brain Behav Evol*, 26: 10-48.
- Dunlop SA, Rodger J, Beazley LD. 2007. Compensatory and transneuronal plasticity after early collicular ablation. *J Comp Neurol*, 500: 1117-1126.
- Edwards MA, Caviness VS Jr, Schneider GE. 1986. Development of cell and fiber lamination in the mouse superior colliculus. *J Comp Neurol*, 248: 395-409.
- Elbashir SM, Lendeckel W, Tuschl T. 2001. RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs. *Genes Dev*, 15: 188-200.
- Fagiolini M, Pizzorusso T, Beradi N, Domenici L, Maffei L. 1994. Functional postnatal development of the rat primary visual cortex and the role of visual experience: dark rearing and monocular deprivation. *Vision Res*, 34: 709-720.
- Fawcett JW, Asher RA. 1999. The glial scar and central nervous system repair. *Brain Res Bull*, 49: 377-391.
- Fawcett JW, Keynes RJ. 1990. Peripheral nerve regeneration. *Annu Rev Neurosci*, 13: 43-60.
- Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC. 1998. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, 391: 806-811.
- Fischer D, He Z, Benowitz LI. 2004. Counteracting the Nogo receptor enhances optic nerve regeneration if retinal ganglion cells are in an active growth state. *J Neurosci*, 24: 1646-1651.
- Fite KV, Wu PS, Bellemer A. 2005. Photostimulation alters c-Fos expression in the dorsal raphe nucleus. *Brain Res*, 1031: 245-252.
- Fleming MD, Benca RM, Behan M. 2006. Retinal projections to the subcortical visual system in congenic albino and pigmented rats. *Neuroscience*, 143: 895-904.
- Flenniken AM, Gale NW, Yankopoulos GD, Wilkinson DG. 1996. Distinct and overlapping expression patterns of ligands for Eph-related receptor tyrosine kinases during mouse embryogenesis. *Dev Biol*, 179: 382-401.
- Fournier AE, Gould GC, Liu BP, Strittmatter SM. 2002. Truncated soluble Nogo receptor binds Nogo-66 and blocks inhibition of axon growth by myelin. *J Neurosci*, 22: 8876-8883.
- Fournier AE, GrandPré T, Strittmatter SM. 2001. Identification of a receptor mediating Nogo-66 inhibition of axonal regeneration. *Nature*, 409: 341-346.
- Fournier AE, Takizawa BT, Strittmatter SM. 2003. Rho kinase inhibition enhances axonal regeneration in the injured CNS. *J Neurosci*, 23: 1416-1423.
- Freneau RT Jr, Kam K, Qureshi T, Johnson J, Copenhagen DR, Storm-Mathisen J, Chaudhry FA, Nicoll RA, Edwards RH. 2004. Vesicular glutamate transporters 1 and 2 target to functionally distinct synaptic release sites. *Science*, 304: 1815-1819.
- Freneau RT, Troyer MD, Pahner I, Nygaard GO, Tran CH, Reimer RJ. 2001. The expression of vesicular glutamate transporters defines two classes of excitatory synapses. *Neuron*, 31: 247-260.

- Freund P, Schmidlin E, Wannier T, Bloch J, Mir A, Schwab ME, Rouiller EM. 2006. Nogo-A-specific antibody treatment enhances sprouting and functional recovery after cervical lesion in adult primates. *Nat Med*, 12: 790-792.
- Frisén J, Yates PA, McLaughlin T, Friedman GC, O'Leary DDM, Barbacid M. 1988. Ephrin-A5 (AL-1/RAGS) is essential for proper retinal axon guidance and topographic mapping in the mammalian visual system. *Neuron*, 20: 235-243.
- Frost DO, So KF, Schneider GE. 1979. Postnatal development of retinal projections in Syrian hamster: A study using autoradiographic and anterograde degeneration techniques. *Neuroscience*, 4: 1649-1677.
- Fujiyama F, Hioki H, Tomioka R, Taki K, Takamaki N, Nomura S, Okamoto K, Kaneko T. 2003. Changes of immunocytochemical localization of vesicular glutamate transporters in the rat visual system after the retinofugal denervation. *J Comp Neurol* 465: 234-249.
- Fukuda Y, Hsiao CF, Saway H, Wakakuwa K. 1984. Retinotopic organizations of the expanded ipsilateral projection to the rat's superior colliculus; variations along its rostrocaudal axis. *Brain Res*, 321: 390-395.
- Galván A. 2010. Neural plasticity development and learning. *Hum Brain Mapp*, 31: 879-890.
- Gan SK, Harvey AR. 1986. Lack of ingrowth of retinal axons into the visually deafferented superior colliculus in young rats: a horseradish peroxidase study. *Neurosci Lett*, 70: 10-16.
- Gao Y, Deng K, Hou J, Bryson JB, Barco A, Nikulina E, Spencer T, Mellado W, Kandel ER, Filbin MT. 2004. Activated CREB is sufficient to overcome inhibitors in myelin and promote spinal axon regeneration in vivo. *Neuron*, 44: 609-621.
- García del Caño G, Gerrikagoitia I, Goñi O, Martínez-Millán L. 1997. Sprouting of the visual corticocollicular terminal field after removal of contralateral retinal inputs in neonatal rabbits. *Exp Brain Res*, 117: 399-410.
- García del Caño G, Gerrikagoitia I, Martínez-Millán L. 2001. Plastic response of the retrosplenicollicular connection after removal of retinal inputs in neonatal rats. An anterograde tracing study. *Exp Brain Res*, 138: 343-351.
- García del Caño G, Gerrikagoitia I, Martínez-Millán L. 2002. Plastic reaction of the rat visual corticocollicular connection after contralateral retinal deafferentation at the neonatal or adult stage: axonal growth versus reactive synaptogenesis. *J Comp Neurol*, 446: 166-178.
- García del Caño G, Uria I, Gerrikagoitia I, Martínez-Millán L. 2004. Connection from the dorsal column nuclei to the superior colliculus in the rat: topographical organization and somatotopic specific plasticity in response to neonatal enucleation. *J Comp Neurol*, 468: 410-424.
- García-Valenzuela E, Gorczyca W, Darzynkiewicz Z, Sharma SC. 1994. Apoptosis in adult retinal ganglion cells after axotomy. *J Neurobiol*, 25: 431-438.
- Gascon E, Vutskits L, Kiss JZ. 2007. Polysialic acid-neural cell adhesion molecule in brain plasticity: from synapses to integration of new neurons. *Brain Res Rev*, 56: 101-118.



- Geinisman Y, Morrell F, de Toledo-Morrell L. 1992. Increase of number of axiospinous synapses with segmented postsynaptic densities following hippocampal kindling. *Brain Res*, 569: 341-347.
- Gerfen CR, O'Leary DDM, Cowan WM. 1982. A note on the transneuronal transport of wheat germ agglutinin-conjugated horseradish peroxidase in the avian and rodent visual systems. *Exp Brain Res*, 48; 443-448.
- Gerrikagoitia I, García del Caño G, Martínez-Millán L. 2001. Changes of the cholinergic input to the superior colliculus following enucleation in neonatal and adult rats. *Brain Res*, 898: 61.
- Gerrikagoitia I. 1998. Distribución del péptido CGRP y de proteínas ligantes de calcio en el tubérculo cuadrigémino superior: desarrollo postnatal y cambios tras la desafección visual. Tesis Doctoral. Leioa: Universidad del País Vasco/Euskal Herriko Unibertsitatea.
- Gianola S, Rossi F. 2004. GAP-43 overexpression in adult mouse Purkinje cells overrides myelin-derived inhibition of neurite growth. *Eur J Neurosci*, 19: 819-830.
- Godement P, Salaün J, Imbert M. 1984. Prenatal and postnatal development of retinogeniculate and retinocollicular projections in the mouse. *J Comp Neurol*, 230: 552-575.
- González D, Satriotomo I, Miki T, Lee KY, Yokoyama T, Touge T, Matsumoto Y, Li HP, Kuriyama S, Takeuchi Y. 2006. Changes of parvalbumin immunoreactive neurons and GFAP immunoreactive astrocytes in the rat lateral geniculate nucleus following monocular enucleation. *Neurosci Lett*, 395: 149-154.
- González D, Satriotomo I, Miki T, Lee KY, Yokoyama T, Touge T, Matsumoto Y, Li HP, Kuriyama S, Takeuchi Y. 2005. Effects of monocular enucleation on calbindin-D 28k and c-Fos expression in the lateral geniculate nucleus in rats. *Okajimas Folia Anat Jpn*, 82: 9-18.
- GrandPré T, Li S, Strittmatter SM. 2002. Nogo-66 receptor antagonist peptide promotes axonal regeneration. *Nature*, 417: 547-551.
- GrandPré T, Nakamura F, Vartanian T, Strittmatter SM. 2000. Identification of the Nogo inhibitor of axon regeneration as a Reticulon protein. *Nature*, 403: 439-444.
- Greenberg ME, Ziff EB, Greene LA. 1986. Stimulation of neuronal acetylcholine receptors induces rapid gene transcription. *Science*, 234: 80-83.
- Gu Q, Singer W. 1995. Involvement of serotonin in developmental plasticity of kitten visual cortex. *Eur J Neurosci*, 7: 1146-1153.
- Guido ME, de Guido L, Goguen D, Robertson HA, Rusak B. 1999. Differential effects of glutamatergic blockade on circadian and photic regulation of gene expression in the hamster suprachiasmatic nucleus. *Brain Res Mol Brain Res*, 67: 247-257.
- Guirado R, Varea E, Castillo-Gómez E, Gómez-Climent MA, Rovira-Esteban L, Blasco-Ibañez JM, Crespo C, Martínez-Guijarro FJ, Nácher, J. 2009. Effect of chronic fluoxetine treatment on the rat somatosensory cortex: activation and induction of neuronal structural plasticity. *Neurosci Lett*, 457: 12-15.

- Hada Y, Yamada Y, Imamura K, Mataga N, Watanabe Y, Yamamoto M. 1999. Effects of monocular enucleation on parvalbumin in rat visual system during postnatal development. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 40: 2535-2545.
- Hagino S, Iseki K, Mori T, Zhang Y, Hikake T, Yokoya S, Takeuchi M, Hasimoto H, Kikuchi S, Wanaka A. 2003. Slit and glypican-1 mRNAs are coexpressed in the reactive astrocytes of the injured adult brain. *Glia*, 42: 130-138.
- Hajós F, Kálmán M, Zilles K, Schleicher A, Sótonyi P. 1990. Remote astrocytic response as demonstrated by glial fibrillary acidic protein immunohistochemistry in the visual cortex of dorsal lateral geniculate nucleus lesioned rats. *Glia*, 3: 301-310.
- Hajszan T, Dow A, Warner-Schmidt JL, Szigeti-Buck K, Sallam NL, Parducz A, Leranath C, Duman RS. 2009. Remodeling of hippocampal spine synapses in the rat learned helplessness model of depression. *Biol Psychiatry*, 65: 392-400.
- Hajszan T, MacLusky NJ, Leranath C. 2005. Short-term treatment with the antidepressant fluoxetine triggers pyramidal dendritic spine synapse formation in rat hippocampus. *Eur J Neurosci*, 21: 1299-1303.
- Hansson E, Johansson B, Westergren I, Rönnbäck L. 1994. Glutamate-induced swelling of single astroglial cells in primary culture. *Neuroscience*, 63: 1057-1066.
- Hartwig CL, Worrell J, Levine RB, Ramaswami M, Sanyal S. 2008. Normal dendrite growth in *Drosophila* motor neurons requires the AP-1 transcription factor. *Dev Neurobiol*, 68: 1225-1242.
- Harvey AR, Worthington DR. 1990. The projection from different visual cortical areas to the rat superior colliculus. *J Comp Neurol*, 298: 281-292.
- Hayes VY, Towner MD, Isackson PJ. 1997. Organization, sequence and functional analysis of a mouse BDNF promoter. *Brain Res Mol Brain Res*, 45: 189-198.
- Hengerer B, Lindholm D, Heumann R, Ruther U, Wagner EF, Thoenen H. 1990. Lesion-induced increase in nerve growth factor mRNA is mediated by c-fos. *Proc Natl Acad Sci*, 87: 3899-3903.
- Hensch TK. 2004. Critical period regulation. *Annu Rev Neurosci*, 27: 549-579.
- Hérard AS, Besret L, Dubois A, Dauguet J, Delzescaux T, Hantraye P, Bonvento G, Moya KL. 2006. siRNA targeted against amyloid precursor protein impairs synaptic activity in vivo. *Neurobiol Aging*, 27: 1740-1750.
- Herdegen T, Leah JD. 1998. Inducible and constitutive transcription factors in the mammalian nervous system: control of gene expression by Jun, Fos and Krox, and CREB/ATF proteins. *Brain Res Rev*, 28: 370-490.
- Herrera DG, Robertson HA. 1996. Activation of c-fos in the brain. *Prog Neurobiol*, 50: 83-107.
- Heyers D, Manns M, Luksch H, Gunturkun O, Mouritsen H. 2007. A visual pathway links brain structures active during magnetic compass orientation in migratory birds. *PLoS ONE* 2, e937.

- Hiebert GW, Khodarahmi K, McGraw J, Steeves JD, Tetzlaff W. 2002. Brain-derived neurotrophic factor applied to the motor cortex promotes sprouting of corticospinal fibers but not regeneration into a peripheral nerve transplant. *J Neurosci Res*, 69: 160-168.
- Higuchi H, Yamashita T, Yoshikawa H, Tohyama M. 2003. Functional inhibition of the p75 receptor using a small interfering RNA. *Biochem Biophys Res Commun*, 301: 804-809.
- Hirose M, Ishizaki T, Watanabe N, Uehata M, Kranenburg O, Moolenaar WH, Matsumura F, Maekawa M, Bito H, Narumiya S. 1998. Molecular dissection of the Rho-associated protein kinase (p160ROCK)-regulated neurite remodeling in neuroblastoma N1E-115 cells. *J Cell Biol*, 141: 1625-1636.
- Hisaoka T, Morikawa Y, Kitamura T, Senba E. 2003. Expression of a member of tumor necrosis factor receptor superfamily, TROY, in the developing mouse brain. *Brain Res Dev Brain Res*, 143: 105-109.
- Holland RA, Thorup K, Vonhof MJ, Cochran WW, Wikelski M. 2006. Navigation-bat orientation using Earth's magnetic field. *Nature*, 444: 702.
- Hösl E, Hosli L, Schousboe A. 1986. Amino acid uptake. Astrocytes; Biochemistry, Physiology, and Pharmacology of Astrocytes, Vol. 2. Ed: Academic Press, Orlando, Florida, pp: 133-149.
- Hough SR, Wiederholt KA, Burrier AC, Woolf TM, Taylor MF. 2003. Why RNAi makes sense. *Nat Biotechnol*, 21: 731-732.
- Huang EJ, Reichardt LF. 2003. Trk receptors: roles in neuronal signal transduction. *Annu Rev Biochem*, 72: 609-642.
- Hubel DH, Wiesel TN. 1970. The period of susceptibility to the physiological effects of unilateral eye closure in kittens. *J Physiol*, 206: 419-436.
- Huber AB, Weinmann O, Brosamle C, Oertle T, Schwab ME. 2002. Patterns of Nogo mRNA and protein expression in the developing and adult rat and after CNS lesions. *J Neurosci*, 22: 3553-3567.
- Huber GC, Crosby EC. 1943. A comparison of the mammalian and reptilian tecta. *J Comp Neurol*, 78: 133-160.
- Huerta MF, Harting JK. 1984. Connectional organization of the superior colliculus. *Trends Neurosci*, 7: 286-289.
- Hunt D, Coffin RS, Anderson PN. 2002. The Nogo receptor, its ligands and axonal regeneration in the spinal cord; a review. *J Neurocytol*, 31: 93-120.
- Hunt SP, Pini A, Evan G. 1987. Induction of c-fos-like protein in spinal cord neurons following sensory stimulation. *Nature*, 32: 632-634.
- Illing RB, Vogt DM, Spatz WB. 1990. Parvalbumin in rat superior colliculus. *Neurosci Lett*, 120: 197-200.

- Insausti R, Blakemore C, Cowan WM. 1985. Postnatal development of the ipsilateral retinocollicular projection and the effects of unilateral enucleation in the golden hamster. *J Comp Neurol*, 23: 393-409.
- Jeffery G, Thompson ID. 1986. The effects of prenatal and neonatal monocular enucleation on visual topography in the uncrossed retinal pathway to the rat superior colliculus. *Exp Brain Res*, 63: 351-363.
- Jeffery G. 1985. Early unilateral eye removal produces a regional gradient in soma sizes in the uncrossed projection from the remaining eye. *Dev Brain Res*, 19: 155-159.
- Jen LS, So KF, Woo HH. 1984. An anterograde HRP study of the retinocollicular projection in normal hamsters and hamsters with one eye enucleated at birth. *Brain Res*, 294: 169-173.
- Ji B, Li M, Wu WT, Yick LW, Lee X, Shao Z, Wang J, So KF, McCoy JM, Pepinsky RB, Mi S, Relton JK. 2006. LINGO-1 antagonist promotes functional recovery and axonal sprouting after spinal cord injury. *Mol Cell Neurosci*, 33: 311-320.
- Johnsen S, Lohmann K.J. 2008. Magnetoreception in animals. *Phys Today*, 61: 29-35.
- Johnsen S, Lohmann K.J. 2005. The physics and neurobiology of magnetoreception. *Nat. Rev Neurosci*, 6: 703-712.
- Johnson D, Lanahan A, Buck CR, Sehgal A, Morgan C, Mercer E, Bothwell M, Chao M. 1986. Expression and structure of the human NGF receptor. *Cell*, 47: 545-554.
- Johnson RF, Morin LP, Moore RY. 1988. Retinohypothalamic projections in the hamster and rat demonstrated using cholera toxin. *Brain Res*, 462: 301-312.
- Kainz P. 2000. The PCR plateau phase - towards an understanding of its limitations. *Biochim Biophys Acta*, 1494: 23-27.
- Kaneko S, Iwanami A, Nakamura M, Kishino A, Kikuchi K, Shibata S, Okano HJ, Ikegami T, Moriya A, Konishi O, Nakayama C, Kumagai K, Kimura T, Sato Y, Goshima Y, Taniguchi M, Ito M, He Z, Toyama Y, Okano H. 2006. A selective Sema3A inhibitor enhances regenerative responses and functional recovery of the injured spinal cord. *Nat Med*, 12: 1380-1389.
- Kang H, Schuman EM. 1995. Long-lasting neurotrophin induced enhancement of synaptic transmission in the adult hippocampus. *Science*, 267: 1658-1662.
- Kaplan DR, Hempstead BL, Martin-Zanca D, Chao MV, Parada LF. 1991. The trk proto-oncogene product: A signal transducing receptor for nerve growth factor. *Science*, 252:554-558.
- Kaplan DR, Miller FD. 2000. Neurotrophin signal transduction in the nervous system. *Curr Opin Neurobiol*, 10: 381-391.
- Kaplan IV, Guo Y, Mower GD. 1996. Immediate early gene expression in cat visual cortex during and after the critical period: differences between EGR-1 and Fos proteins. *Mol. Brain Res*, 36: 12-22.
- Kawaja MD, Gage FH. 1991. Reactive astrocytes are substrates for the growth of adult CNS axons in the presence of elevated levels of nerve growth factor. *Neuron*, 7: 1019-1030.

- Kevetter GA. 1996. Pattern of selected calcium-binding proteins in the vestibular nuclear complex of two rodent species. *J Comp Neurol*, 365: 575-584.
- Khodarahmi K, Tetzlaff W, Hiebert GW. 2001. BDNF infusion into the motor cortex promotes sprouting of intact corticospinal fibers within the cervical spinal cord. *Soc Neurosci, Abstr*: 802:8.
- Kim JE, Li S, GrandPré T, Qiu D, Strittmatter SM. 2003. Axon regeneration in young adult mice lacking Nogo-A/B. *Neuron*, 38: 187-199.
- Kiorpes L, Kiper DC, O'Keefe LP, Cavanaugh JR, Movshon JA. 1998. Neuronal correlates of amblyopia in the visual cortex of macaque monkeys with experimental strabismus and anisometropia. *J Neurosci*, 18: 6411-6424.
- Klein R, Jing SQ, Nanduri V, O'Rourke E, Barbacid M. 1991. The *trk* proto-oncogene encodes a receptor for nerve growth factor. *Cell*, 65: 189-197.
- Klocker N, Jung M, Stuermer CA, Bähr M. 2001. BDNF increases the number of axotomized rat retinal ganglion cells expressing GAP-43, L1, and TAG-1 mRNA—a supportive role for nitric oxide? *Neurobiol Dis*, 8: 103-113.
- Kobayashi NR, Fan DP, Giehl KM, Bedard AM, Wiegand SJ, Tetzlaff W. 1997. BDNF and NT-4/5 prevent atrophy of rat rubrospinal neurons after cervical axotomy, stimulate GAP-43 and  $\alpha$ -tubulin mRNA expression, and promote axonal regeneration. *J Neurosci*, 17: 9583-9595.
- Koistinaho J, Hicks KJ, Sagar SM. 1993. Tetrodotoxin enhances light-induced *cfos* gene expression in the rabbit retina. *Mol Brain Res*, 17: 179-183.
- Kojima T, Morikawa Y, Copeland NG, Gilbert DJ, Jenkins NA, Senba E, Kitamura T. 2000. TROY, a newly identified member of the tumor necrosis factor receptor superfamily, exhibits a homology with Edar and is expressed in embryonic skin and hair follicles. *J Biol Chem*, 275: 20742-20747.
- Koller E, Propp S, Murray H, Lima W, Bhat B, Prakash TP, Allerson CR, Swayze EE, Marcusson EG, Dean NM. 2006. Competition for RISC binding predicts in vitro potency of siRNA. *Nucleic Acids Res*, 34: 4467-4476.
- Kozma R, Sarner S, Ahmed S, Lim L. 1997. Rho family GTPases and neuronal growth cone remodelling: relationship between increased complexity induced by Cdc42Hs, Rac1, and acetylcholine and collapse induced by RhoA and lysophosphatidic acid. *Mol. Cell Biol*, 17: 1201-1211.
- Kreutz MR, Weise J, Dieterich DC, Kreutz M, Balczarek P, Bockers TM, Wittkowski W, Gundelfinger ED, Sabel BA. 2004. Rearrangement of the retino-collicular projection after partial optic nerve crush in the adult rat. *Eur J Neurosci*, 19: 247-257.
- Kristofikova Z, Cermak M, Benesova O, Klaschka J, Zach P. 2005. Exposure of postnatal rats to a static magnetic field of 0.14 T influences functional laterality of the hippocampal high-affinity choline uptake system in adulthood; in vitro test with magnetic nanoparticles. *Neurochem Res*, 30: 253-262.

- Krystal JH, Tolin DF, Sanacora G, Castner SA, Williams GV, Aikins DE, Hoffman RE, D'Souza DC. 2009. Neuroplasticity as a target for the pharmacotherapy of anxiety disorders, mood disorders, and schizophrenia. *Drug Discov Today*, 14: 690-697.
- Kwon BK, Liu J, Messerer C, Kobayashi NR, McGraw J, Oschipok L, Tetzlaff W. 2002. Survival and regeneration of rubrospinal neurons 1 year after spinal cord injury. *Proc Natl Acad Sci*, 99: 3246-3251.
- Lai H, Carino M, Horita A, Guy AW. 1993. Effects of a 60 Hz magnetic field on central cholinergic systems of the rat. *Bioelectromagnetics*, 14: 5-15.
- Lai H, Carino M. 1999. 60 Hz magnetic fields and central cholinergic activity: effects of exposure intensity and duration. *Bioelectromagnetics*, 20: 284-289.
- Lai H. 1996. Spatial learning deficit in the rat after exposure to a 60 Hz magnetic field. *Bioelectromagnetics*, 17: 494-496.
- Land PW, Lund RD. 1979. Development of the rat uncrossed retinotectal pathway and its relation to plasticity studies. *Science*, 205: 698-700.
- Lane RD, Allan DM, Bennett-Clarke CA, Rhoades RW. 1996. Differential age-dependent effects of retinal deafferentation on calbindin- and parvalbumin-immunoreactive neurons in the superficial layers of rat's superior colliculus. *Brain Res*, 740: 208-214.
- Lauren J, Airaksinen MS, Saarma M, Timmusk T. 2003. Two novel mammalian Nogo receptor homologs differentially expressed in the central and peripheral nervous systems. *Mol Cell Neurosci*, 24: 581-594.
- Lauren J, Hu F, Chin J, Liao J, Airaksinen MS, Strittmatter SM. 2007. Characterization of myelin ligand complexes with neuronal Nogo-66 receptor family members. *J Biol Chem*, 282: 5715-5725.
- Le Gros Clark WE. 1943. The problem of neuronal regeneration in the central nervous system: II. The insertion of peripheral nerve stumps into the brain. *J Anat*, 77: 251-259.
- Lee JK, Kim JE, Sivula M, Strittmatter SM. 2004. Nogo receptor antagonism promotes stroke recovery by enhancing axonal plasticity. *J Neurosci*, 24: 6209-6217.
- Lehmann M, Fournier A, Selles-Navarro I, Dergham P, Sebok A, Leclerc N, Tigyi G, McKerracher L. 1999. Inactivation of Rho signalling pathway promotes CNS axon regeneration. *J Neurosci*, 19: 7537-7547.
- Lehre KP, Levy LM, Ottersen OP, Storm-Mathisen J, Danbolt N. 1995. Differential expression of two glial glutamate transporters in the rat brain: quantitative and immunocytochemical observations. *J Neurosci*, 15: 1835-1853.
- Levi-Montalcini R. 1987. The nerve growth factor 35 years later. *Science*, 237: 1154-1162.
- Lewin GR, Barde YA. 1996. Physiology of the neurotrophins. *Annu Rev Neurosci*, 19: 289-317.
- Li S, Strittmatter SM. 2003. Delayed systemic nogo-66 receptor antagonist promotes recovery from spinal cord injury. *J Neurosci*, 23: 4219-4227.

- Li Y, Raisman G. 1995. Sprouts from cut corticospinal axons persist in the presence of astrocytic scarring in long-term lesions of the adult rat spinal cord. *Exp Neurol*, 134: 102-111.
- Li YX, Xu Y, Ju D, Lester HA, Davidson N, Schuman EM. 1998. Expression of a dominant negative TrkB receptor, T1, reveals a requirement for presynaptic signaling in BDNF-induced synaptic potentiation in cultured hippocampal neurons. *Proc Natl Acad Sci USA*, 95: 10884-10889.
- Liao DS, Krahe TE, Prusky GT, Medina AE, Ramoa AS. 2004. Recovery of cortical binocularity and orientation selectivity after the critical period for ocular dominance plasticity. *J Neurophysiol*, 92: 2113-2121.
- Liebscher T, Schnell L, Schnell D, Scholl J, Schneider R, Gullo M, Fouad K, Mir A, Rausch M, Kindler D, Hamers FP, Schwab ME. 2005. Nogo-A antibody improves regeneration and locomotion of spinal cord-injured rats. *Ann Neurol*, 58: 706-719.
- Liedvogel M, Maeda K, Henbest K, Schleicher E, Simon T, Timmel CR, Hore PJ, Mouritsen H. 2007. Chemical magnetoreception: bird cryptochrome 1a is excited by blue light and forms long-lived pair radicals. *PLoS One* 2, e1106.
- Linden R, Perry VH. 1983. Massive retinotectal projection in rats. *Brain Res*, 272: 145-149.
- Liu PB, Fournier A, GrandPré T, Strittmatter SM. 2002. Myelin-associated glycoprotein as a functional ligand for the Nogo-66 receptor. *Science*, 297: 1190-1193.
- Logan A, Berry M. 2002. Cellular and molecular determinants of glial scar formation. *Adv Exp Med Biol*, 513: 115-158.
- Lohmann KJ, Johnsen S. 2000. The neurobiology of magnetoreception in vertebrate animals. *Trends Neurosci*, 23: 153-159.
- Lu Y, Christian K, Lu B. 2008. BDNF: a key regulator for protein synthesis-dependent LTP and long-term memory? *Neurobiol Learn Mem*, 89: 312-323.
- Lund RD, Cunningham TJ, Lund JS. 1973. Modified optic projections after unilateral eye removal in young rats. *Brain Behav Evol*, 8: 51-72.
- Lund RD, Land PW, Boles J. 1980. Normal and abnormal uncrossed retinotectal pathways in rats: an HRP study in adults. *J Comp Neurol*, 189: 711-720.
- Lund RD, Lund JS. 1971a. Synaptic adjustment after deafferentation of the superior colliculus of the rat. *Science*, 171: 804-807.
- Lund RD, Lund JS. 1971b. Modifications of synaptic patterns in the superior colliculus of the rat during development and following deafferentation. *Vis Res Suppl*, 3: 281-298.
- Lund RD, Lund JS. 1973. Reorganization of the retinotectal pathway in rats after neonatal retinal lesions. *Exp Neurol*, 40: 377-390.
- Lund RD, Lund JS. 1976. Plasticity in the developing visual system: the effects of retinal lesions made in young rats. *J Comp Neur*, 169: 133-154.
- Lund RD. 1964. The terminal distribution in the superior colliculus of fibres originating in the visual cortex. *Nature*, 204: 1283-1285.

- Lund RD. 1965. Uncrossed visual pathways of hooded and albino rats. *Science*, 149: 1506-1507.
- Lund RD. 1966. The occipitotectal pathway of the rat. *J Anat*, 100: 51-62.
- Luo L, Jan LY, Jan YN. 1997. Rho family GTP-binding proteins in growth cone signalling. *Curr Opin Neurobiol*, 7: 81-86.
- Luo L. 2000. Rho GTPases in neuronal morphogenesis. *Nat Rev Neurosci*, 1: 173-180.
- Maekawa M, Ishizaki T, Boku S, Watanabe N, Fujita A, Iwamatsu A, Obinata T, Ohashi K, Mizuno K, Narumiya S. 1999. Signaling from Rho to the actin cytoskeleton through protein kinases ROCK and LIM-kinase. *Science*, 285: 895-898.
- Mai JK, Semm P. 1990. Pattern of brain glucose utilization following magnetic stimulation. *J. Hirnforsch*, 31: 331-336.
- Malayev AA, Debski, EA. 1998. Serotonin modulates induced synaptic activity in the optic tectum of the frog. *Brain Res*, 781: 167-181.
- Mansour-Robaey S, Clarke DB, Wang YC, Bray GM, Aguayo AJ. 1994. Effects of ocular injury and administration of brain-derived neurotrophic factor on survival and regrowth of axotomized retinal ganglion cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 91: 1632-1636.
- Marcus RC, Gale NW, Morrison ME, Mason CA, Yancopoulos GD. 1996. Eph family receptors and their ligands distribute in opposing gradients in the developing mouse retina. *Dev Biol*, 180: 786-789.
- Martin GF, Ghooray GT, Wang XM, Xu XM, Zou XC. 1994. Models of spinal cord regeneration. *Prog Brain Res*, 103: 175-201.
- Martínez-Turrillas R, del Río J, Frechilla D. 2005. Sequential changes in BDNF mRNA expression and synaptic levels of AMPA receptor subunits in rat hippocampus after chronic antidepressant treatment. *Neuropharmacology*, 49: 1178-1188.
- Martinowich K, Manji H, Lu B. 2007. New insights into BDNF function in depression and anxiety. *Nat Neurosci*, 10: 1089-1093.
- Maya Vetencourt JF, Sale A, Viegi A, Baroncelli L, De Pasquale R, O'Leary OF, Castrén E, Maffei L. 2008. The antidepressant fluoxetine restores plasticity in the adult visual cortex. *Science*, 320: 385-388.
- Maya Vetencourt JF, Tiraboschi E, Spolidoro M, Castrén E, Maffei L. 2011. Serotonin triggers a transient epigenetic mechanism that reinstates adult visual cortex plasticity in rats. *Eur J Neurosci*, 33: 49-57.
- McAllister AK, Lo DC, Katz LC. 1995. Neurotrophins regulate dendritic growth in developing visual cortex. *Neuron*, 15: 791-803.
- McKerracher L, David S, Jackson DL, Kottis V, Dunn RJ, Braun PE. 1994. Identification of myelin-associated glycoprotein as a major myelin derived inhibitor of neurite growth. *Neuron*, 13: 805-811.
- McKerracher L, Winton MJ. 2002. Nogo on the go. *Neuron*, 36: 345-348.



- Meiri KF, Saffell JL, Walsh FS, Doherty P. 1998. Neurite outgrowth stimulated by neural cell adhesion molecules requires growth associated protein-43 (GAP-43) function and is associated with GAP-43 phosphorylation in growth cones. *J Neurosci*, 18: 10429-10437.
- Mi S, Lee X, Shao Z, Thill G, Ji B, Relton J, Levesque M, Allaire N, Perrin S, Sands B, Crowell T, Cate RL, McCoy JM, Pepinsky RB. 2004. LINGO-1 is a component of the Nogo-66 receptor/p75 signaling complex. *Nat Neurosci*, 7: 221-228.
- Mikkelsen JD, Servi re J. 1992. Demonstration of a direct projection from the retina to the hypothalamic supraoptic nucleus of the hamster. *Neurosci Lett*, 139: 149-152.
- Miyagishi M, Hayashi M, Taira K. 2003. Comparison of the suppressive effects of antisense oligonucleotides and siRNAs directed against the same targets in mammalian cells. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev*, 13: 1-7.
- Mize RR, Luo Q, Butler G, Jeon CJ, Nabors B. 1992. The calcium binding proteins parvalbumin and calbindin-D28k form complementary patterns in the cat superior colliculus. *J Comp Neurol*, 320: 243-256.
- Molteni R, Calabrese F, Bedogni F, Tongiorgi E, Fumagalli F, Racagni G, Riva MA. 2006. Chronic treatment with fluoxetine up-regulates cellular BDNF mRNA expression in rat dopaminergic regions. *Int J Neuropsychopharmacol*, 9: 307-317.
- Monnier PP, Sierra A, Schwab JM, Henke-Fahle S, Mueller BK. 2003. The Rho/ROCK pathway mediates neurite growth-inhibitory activity associated with the chondroitin sulfate proteoglycans of the CNS glial scar. *Mol Cell Neurosci*, 22: 319-330.
- Montero VM, Jian S. 1995. Induction of c-fos protein by patterned visual stimulation in central visual pathways of the rat. *Brain Res*, 690: 189-199.
- Moorman SJ. 1996. The inhibition of motility that results from contact between two oligodendrocytes in vitro can be blocked by pertussis toxin. *Glia*, 16: 257-265.
- Morgan JI, Cohen DR, Hempstead JL, Curran T. 1987. Mapping patterns of c-fos expression in the central nervous system after seizure. *Science*, 237: 192-197.
- Morgan JI, Curran T. 1986. Role of ion flux in the control of c-fos expression. *Nature*, 322: 552-555.
- Morgan JI, Curran T. 1991. Stimulus-transcription coupling in the nervous system: involvement of the inducible proto-oncogenes fos and jun. *Annu Rev Neurosci*, 14: 421-451.
- Morgenstern DA, Asher RA, Fawcett JW. 2002. Chondroitin sulphate proteoglycans in the CNS injury response. *Prog Brain Res*, 137: 313-332.
- Moritz RE, Burda H, Begall S, N mec P. 2007. Magnetic compass: a useful tool underground. In *Subterranean rodents: news from underground*. Ed: Springer Heidelberg, Germany, pp: 161-174.
- Mouritsen H, Feenders G, Liedvogel M, Wada K, Jarvis ED. 2005. Night-vision brain area in migratory songbirds. *Proc Natl Acad Sci USA*, 102: 8339-8344.
- Mower GD. 1994. Differences in the induction of Fos protein in cat visual cortex during and after the critical period. *Mol Brain Res*, 21: 47-54.

- Muheim R, Edgar NM, Sloan KA, Phillips JB. 2006. Magnetic compass orientation in C57BL/6J mice. *Learn. Behav*, 34: 366-373.
- Mukhopadhyay G, Doherty P, Walsh FS, Crocker PR, Filbin MT. 1994. A novel role for myelin-associated glycoprotein as an inhibitor of axonal regeneration. *Neuron*, 13: 757-767.
- Mullner A, Gonzenbach RR, Weinmann O, Schnell L, Liebscher T, Schwab ME. 2008. Lamina-specific restoration of serotonergic projections after Nogo-A antibody treatment of spinal cord injury in rats. *Eur J Neurosci*, 27: 326-333.
- Mundiñano IC, Martínez-Millán L. 2010. Somatosensory cross-modal plasticity in the superior colliculus of visually deafferented rats. *Neurosci*, 165: 1457-1470.
- Mundiñano IC. 2008. Reorganización de las conexiones nerviosas visuales, auditivas y somatosensoriales en la rata tras la desaferenciación retiniana neonatal. Tesis Doctoral. Leioa: Universidad del País Vasco/Euskal Herriko Unibertsitatea.
- Mustari MJ, Lund RD, Graubard K. 1979. Histogenesis of the superior colliculus of the albino rat: a tritiated thymidine study. *Brain Res*, 164: 39-52.
- Nakayama M, Gahara Y, Kitamura T, Ohara O. 1994. Distinctive four promoters collectively direct expression of brain-derived neurotrophic factor gene. *Brain Res Mol Brain Res*, 21: 206-218.
- Nakazawa T, Tamai M, Mori N. 2002. Brain-derived neurotrophic factor prevents axotomized retinal ganglion cell death through MAPK and PI3K signaling pathways. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 43: 3319-3326.
- Navarro X, Vivó M, Valero-Cabré A. 2007. Neural plasticity after peripheral nerve injury and regeneration. *Prog Neurobiol*, 82: 163-201.
- Němec P, Altmann J, Marhold S, Burda H, Oelschläger HHA. 2001. Neuroanatomy of magnetoreception: the superior colliculus involved in magnetic orientation in a mammal. *Science*. 294: 366-368.
- Němec P, Cveková P, Benada O, Wielkopolska E, Olkowitz S, Turlejski K., Burda H., Bennett NC, Peichl L. 2008. The visual system in subterranean African mole-rats (Rodentia, Bathyergidae): retina, subcortical visual nuclei and primary visual cortex. *Brain Res Bull*, 75: 356-364.
- Niederöst B, Oertle T, Fritsche J, McKinney RA, Bandtlow CE. 2002. Nogo-A and myelin-associated glycoprotein mediate neurite growth inhibition by antagonistic regulation of RhoA and Rac1. *J Neurosci*, 22: 10368-10376.
- Norrholm SD, Ouimet CC. 2001. Altered dendritic spine density in animal models of depression and in response to antidepressant treatment. *Synapse*, 42: 151-163.
- Nyatia E, Lang DM. 2007. Localisation and expression of a myelin associated neurite inhibitor, Nogo-A and its receptor Nogo-receptor by mammalian CNS cells. *Res Vet Sci*, 83: 287-301.
- Oertle T, van der Haar M, Bandtlow CE, Robeva A, Burfeind P, Buss A, Huber AB, Simonen M, Schnell L, Brösamle C, Kaupmann K, Vallon R, Schwab ME. 2003. Nogo-A inhibits neurite outgrowth and cell spreading with three discrete regions. *J Neurosci*, 23: 5393-5406.

- O'Leary DDM, Cowan WM. 1983. Topographic organization of certain tectal afferent and efferent connections can develop normally in the absence of retinal input. *Proc Natl Acad Sci USA*, 80: 6131-6135.
- O'Leary OF, Wu X, Castrén E. 2009. Chronic fluoxetine treatment increases expression of synaptic proteins in the hippocampus of the ovariectomized rat: role of BDNF signalling. *Psychoneuroendocrinology*, 34: 367-381.
- Ortega F, Hennequet L, Sarría R, Streit P, Grandes P. 1995. Changes in the pattern of glutamate-like immunoreactivity in rat superior colliculus following retinal and visual cortical lesions. *Neuroscience*, 67: 125-134.
- Ostrach LH, Crabtree JW, Chow KL. 1986. The ipsilateral retinocollicular projection in the rabbit: an autoradiographic study of neonatal development and effects of unilateral enucleation. *J Comp Neurol*, 254: 369-381.
- Park JB, Yiu G, Kaneko S, Wang J, Chang J, He XL, García KC, He Z. 2005. A TNF receptor family member, TROY, is a coreceptor with Nogo receptor in mediating the inhibitory activity of myelin inhibitors. *Neuron*, 45: 345-351.
- Park JT, Kenneth, CC, Samaan D, Comer CH. 2007. Adaptive neural organization of naked mole-rat somatosensation (and those similarly challenged). *Subterranean rodents: news from underground*. Ed: Springer, Heidelberg, Germany, pp: 175-193.
- Pasterkamp RJ, Anderson PN, Verhaagen J. 2001. Peripheral nerve injury fails to induce growth of lesioned ascending dorsal column axons into spinal cord scar tissue expressing the axon repellent Semaphorin3A. *Eur J Neurosci*, 13: 457-471.
- Patel MN, McNamara JO. 1995. Selective enhancement of axonal branching of cultured dentate gyrus neurons by neurotrophic factors. *Neurosci*, 69: 763-770.
- Patterson SL, Abel T, Deuel TA, Martin KC, Rose JC, Kandel ER. 1996. Recombinant BDNF rescues deficits in basal synaptic transmission and hippocampal LTP in BDNF knockout mice. *Neuron*, 16: 1137-1145.
- Peinado-Ramón P, Salvador M, Villegas-Pérez MP, Vidal-Sanz M. 1996. Effects of axotomy and intraocular administration of NT-4, NT-3, and brain-derived neurotrophic factor on the survival of adult rat retinal ganglion cells. A quantitative in vivo study. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 37: 489-500.
- Perry VH. 1980. A tectocortical visual pathway in the rat. *Neurosci*, 5: 915-927.
- Pfrieger FW, Barres BA. 1997. Synaptic efficacy enhanced by glial cells in vitro. *Science*, 277: 1684-1687.
- Pignot V, Hein AE, Barske C, Wiessner C, Walmsley AR, Kaupmann K, Mayeur H, Sommer B, Mir AK, Frentzel S. 2003. Characterization of two novel proteins, NgRH1 and NgRH2, structurally and biochemically homologous to the Nogo-66 receptor. *J Neurochem*, 85: 717-728.
- Poo MM. Neurotrophins as synaptic modulators. *Nat Rev Neurosci*, 2: 24-32.

- Porter JT, McCarthy KD. 1996. Hippocampal astrocytes in situ respond to glutamate released from synaptic terminals. *J Neurosci*, 16: 5073-5081.
- Pot C, Simonen M, Weinmann O, Schnell L, Christ F, Stoeckle S, Berger P, Rulicke T, Suter U, Schwab ME. 2002. Nogo-A expressed in Schwann cells impairs axonal regeneration after peripheral nerve injury. *J Cell Biol*, 159: 29-35.
- Poveda A, Kretz R. 2009. c-Fos expression in the visual system of the tree shrew (*Tupaia belangeri*). *J Chem Neuroanat*, 37: 214-228.
- Prichard JR, Armacanqui HS, Benca RM, Behan M. 2007. Light-dependent retinal innervation of the rat superior colliculus. *Anat Rec*, 290: 341-348.
- Prinjha R, Moore SE, Christie G, Michalovich D, Simmons DL, Walsh FS. 2000. Inhibitor of neurite outgrowth in humans. *Nature*, 403: 383-384.
- Prusky GT, Douglas RM. 2003. Developmental plasticity of mouse visual acuity. *Eur J Neurosci*, 17: 167-173.
- Pulido-Caballero J, Jiménez-Sampedro F, Echevarría-Aza D, Martínez-Millán L. 1994. Postnatal development of vimentin-positive cells in the rabbit superior colliculus. *J Comp Neurol*, 343: 102-12.
- Purves D, Lichtman JW. 1983. Specific connections between nerve cells. *Annu Rev Physiol*, 45: 553-565.
- Radeke MJ, Misko TP, Hsu C, Herzenberg LA, Shooter EM. 1987. Gene transfer and molecular cloning of the rat nerve growth factor receptor. *Nature*, 325: 593-597.
- Radley JJ, Rocher AB, Miller M, Janssen WG, Liston C, Hof PR, McEwen BS, Morrison JH. 2005. Repeated stress induces dendritic spine loss in the rat medial prefrontal cortex. *Cereb Cortex*, 16: 313-320.
- Radley JJ, Sisti HM, Hao J, Rocher AB, McCall T, Hof PR, McEwen BS, Morrison JH. 2004. Chronic behavioral stress induces apical dendritic reorganization in pyramidal neurons of the medial prefrontal cortex. *Neuroscience*, 125: 1-6.
- Raisman G. 1985. Synapse formation in the septal nuclei of adult rats. *Synaptic Plasticity*. Ed: CW Cotman, Guilford, New York, pp: 13-38.
- Ramón y Cajal S. 1928. *Degeneration and Regeneration of the Nervous System*. Ed: Oxford University Press.
- Ramón-Cueto A, Cordero MI, Santos-Benito FF, Avila J. 2000. Functional recovery of paraplegic rats and motor axon regeneration in their spinal cords by olfactory ensheathing glia. *Neuron*, 25: 425-435.
- Rana TM. Illuminating the silence: understanding the structure and function of small RNAs. 2007. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 8: 23-36.
- Reese BE, Colello RJ. 1992. Neurogenesis in the retinal ganglion cell layer of the rat. *Neuroscience*, 46: 419-429.

- Reese BE, Jeffery G. 1983. Crossed and uncrossed visual topography in dorsal lateral geniculate nucleus of the pigmented rat. *J Neurophysiol*, 49: 877-883.
- Reese BE. 1986. The topography of expanded uncrossed retinal projections following neonatal enucleation of one eye: Differing effects in dorsal lateral geniculate nucleus and superior colliculus. *J Comp Neurol*, 250: 8-32.
- Reiner A, Veenman CL, Medina L, Jiao Y, Del Mar N, Honig MG. 2000. Pathway tracing using biotinylated dextran amines. *J Neurosci Methods*, 103: 23-37.
- Reiner A, Zhang D, Eldred WD. 1996. Use of cholera toxin tracer reveals new details of the central retinal projections in turtles. *Brain Behav Evol*, 48:307-37.
- Reynolds AJ, Bartlett SE, Hendry IA. 2000. Molecular mechanisms regulating the retrograde axonal transport of neurotrophins. *Brain Res Brain Res Rev*, 33: 169-178.
- Rhoades RW, Chalupa LM. 1978. Functional and anatomical consequences of neonatal visual cortical damage in the superior colliculus of the golden hamster. *J Neurophysiol*, 41: 1466-1494.
- Rhoades RW, DellaCroce DD, Meadows I. 1981. Reorganization of somatosensory input to superior colliculus in neonatally enucleated hamsters: anatomical and electrophysiological experiments. *J Neurophysiol*, 46: 855-877.
- Rhoades RW, Hess A. 1983. Altered catecholaminergic innervation of superior colliculus after enucleation in adult and neonatal hamsters. *Brain Res*, 261: 353-357.
- Rhoades RW, Mooney RD, Chiaia NL, Bennett-Clarke CA. 1990. Development and plasticity of the serotonergic projection to the hamster's superior colliculus. *J Comp Neurol*, 299: 151-166.
- Rhoades RW, Mooney RD, Fish SE. 1985. Subcortical projections of area 17 in the anophthalmic mouse. *Dev Brain Res*, 17: 171-181.
- Rhoades RW. 1980. Effects of neonatal enucleation on the functional organization of the superior colliculus in the golden hamster. *J Physiol*, 301: 383-399.
- Rhoades RW. 1981. Expansion of the ipsilateral visual corticotectal projection in hamsters subjected to partial lesions of the visual cortex during infancy: anatomical experiments. *J Comp Neurol*, 197: 425-445.
- Ritz T, Dommer DH, Philips JB. 2002. Shedding light on vertebrate magnetoreception. *Neuron*, 34: 503-506.
- Rogers JH. 1992. Immunohistochemical markers in rat cortex: colocalization of calretinin and calbindin-D28k with neuropeptides and GABA. *Brain Res*, 587: 147-157.
- Rudge JS, Silver J. 1990. Inhibition of neurite outgrowth on astroglial scars in vitro. *J Neurosci*, 10: 3594-3603.
- Rutishauser U. 2008. Polysialic acid in the plasticity of the developing and adult vertebrate nervous system. *Nat Rev Neurosci*, 9: 26-35.
- Ryther RC, Flynt AS, Phillips JA 3rd, Patton JG. 2005. siRNA therapeutics: big potential from small RNAs. *Gene Ther*, 12: 5-11.

- Sabel BA. 2008. Plasticity and restoration of vision after visual system damage: an update. *Restor Neurol Neurosci*, 26: 243-247.
- Sagar SM, Sharp FR, Curran T. 1988. Expression of c-fos protein in brain: metabolic mapping at the cellular level. *Science*, 240: 1328-1331.
- Sagar SM, Sharp FR. 1990. Light induces a Fos-like nuclear detected by in situ hybridization. *Mol. Brain Res*, 3: 89-93.
- Sandvig A, Berry M, Barrett LB, Butt A, Logan, A. 2004. Myelin-, reactive glia-, and scar-derived CNS axon growth inhibitors: expression, receptor signaling, and correlation with axon regeneration. *Glia*, 46: 25-251.
- Sato MT, Tokunaga A, Kawai Y, Shimomura Y, Tano Y, Senba E. 2000. The effects of binocular suture and dark rearing on the introduction of c-fos protein in the rat visual cortex during and after the critical period. *Neurosci Res*, 36: 227-233.
- Savio T, Schwab ME. 1989. Rat CNS white matter, but not gray matter, is nonpermissive for neuronal cell adhesion and fiber outgrowth. *J Neurosci*, 9: 1126-1133.
- Sawai H, Clarke DB, Kittlerova P., Bray GM, Aguayo AJ. 1996. Brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-4/5 stimulated growth of axonal branches from regenerating retinal ganglion cells. *Journal of Neuroscience*, 16: 3887-3894.
- Schäbitz WR, Sommer C, Zoder W, Kiessling M, Schwaninger M, Schwab S. 2000. Intravenous brain-derived neurotrophic factor reduces infarct size and counterregulates Bax and Bcl-2 expression after temporary focal cerebral ischemia. *Stroke*, 31:2212-2217.
- Schmidt-Kastner R, Meller D, Eysel UT. 1992. Immunochemical changes of neuronal calcium-binding proteins parvalbumin and calbindin- D-28k following unilateral deafferentation in the rat visual system. *Exp Neurol*, 117: 230-246.
- Schneider GE, Jhaveri S, Edwards MA, So K-F. 1985. Regeneration, re-routing, and redistribution of axons after early lesions: Changes with age, and functional impact. In *Recent Achievements in Restorative Neurology 1: Upper Motor Neuron Functions and Dysfunctions*. Ed: Karger, Basel, pp: 291-310.
- Schnell L, Schwab ME. 1990. Axonal regeneration in the rat spinal cord produces by an antibody against myelin-associated neurite growth inhibitors. *Nature*, 343: 269-272.
- Schwab ME. 2004. Nogo and axon regeneration. *Curr Opin Neurobiol*, 14: 118-124.
- Sefton AJ, Dreher B, Harvey A. 1998. Visual system. *The Rat Nervous System*. Ed: Elsevier Academic Press, pp: 1083-1165.
- Semm P, Beason RC. 1990. Responses to small magnetic field variations by the trigeminal system of the bobolink. *Brain Res Bull*, 25: 735-740.
- Semm P, Demaine C. 1986. Neurophysiological properties of the magnetic cells in the pigeon's visual system. *J Comp Physiol A*, 159: 619-625.

- Semm P, Nohr D, Demaine C, Wiltschko W. 1984. Neural basis of the magnetic compass: interactions of visual, magnetic and vestibular inputs in the pigeon's brain. *J Comp Physiol A*, 155: 283-288.
- Sendtner M, Holtmann B, Kolbeck R, Thoenen H, Barde YA. 1992. Brain-derived neurotrophic factor prevents the death of motoneurons in newborn rats after nerve section. *Nature*, 360: 757-759.
- Sengelaub DR, Finlay BL. 1981. Early removal of one eye reduces normally occurring cell death in the remaining eye. *Science*, 213: 573-574.
- Seress L, Gulyás AI, Ferrer I, Tunon T, Soriano E, Freund TF. 1993. Distribution, morphological features, and synaptic connections of parvalbumin- and calbindin D28k-immunoreactive neurons in the human hippocampal formation. *J Comp Neurol*, 337: 208-230.
- Serfaty CA, Campello-Costa P, Linden R. 2005. Rapid and long-term plasticity in the neonatal and adult retinotectal pathways following a retinal lesion. *Brain Res Bull*, 66: 128-134.
- Serfaty CA, Linden R. 1994. Development of abnormal lamination and binocular segregation in the retinotectal pathways of the rat. *Dev. Brain Res*, 82: 35-44.
- Serfaty CA, Reese BE, Linden R. 1990. Cell death and interocular interactions among retinofugal axons: lack of binocularly matched specificity. *Dev Brain Res*, 56: 198-204.
- Shao Z, Browning JL, Lee X, Scott ML, Shulga-Morskaya S, Allaire N, Thill G, Levesque M, Sah D, McCoy JM, Murray B, Jung V, Pepinsky RB, Mi S. 2005. TAJ/TROY, an orphan TNF receptor family member, binds Nogo-66 receptor 1 and regulates axonal regeneration. *Neuron*, 45: 353-359.
- Shen CL. 1987. Retinofugal sprouting of ipsilateral projections in rat. *Proc Natl Sci Counc Repub China B*, 11: 282-288.
- Sheng M, Greenberg ME. 1990. The regulation of c-fos and other immediate early genes in the nervous system. *Neuron*, 4: 477-485.
- Shibayama E, Koizumi H. 1996. Cellular localization of the Trk neurotrophin receptor family in human non-neuronal tissues. *Am J Pathol*, 148: 1807-1818.
- Shimizu T, Bowers AN, Budzynski CA, Kahn MC, Bingman VP. 2004. What does a pigeon (*Columba livia*) brain look like during homing? selective examination of ZENK expression. *Behav Neurosci*, 118: 845-851.
- Shimizu T, Cox K, Karten HJ, Britto LRG. 1994. Cholera toxin mapping of retinal projections in pigeons (*Columba livia*), with emphasis on retinohypothalamic connections. *Vis Neurosci*, 11: 441-446.
- Shooter EM. 2001. Early days of the nerve growth factor proteins. *Annu Rev Neurosci*, 24: 601-629.
- Silver J, Miller JH. 2004. Regeneration beyond the glial scar. *Nat Rev Neurosci*, 5: 146-156.
- Siminoff R, Schwassman HO, Kruger L. 1966. An electrophysiological study of the visual projection to the superior colliculus of the rat. *J Comp Neurol*, 127: 435-444.
- Simon DK, O'Leary DDM. 1992. Development of topographic order in the mammalian retinocollicular projection. *J Neurosci*, 12: 1212-1232.

- Simonen M, Pedersen V, Weinmann O, Schnell L, Buss A, Ledermann B, Christ F, Sansig G, van der PH, Schwab ME. 2003. Systemic deletion of the myelin-associated outgrowth inhibitor Nogo-A improves regenerative and plastic responses after spinal cord injury. *Neuron*, 38: 201-211.
- So K-F, Schneider GE, Ayres S. 1981. Lesions of the brachium of the superior colliculus in neonate hamsters: Correlation of anatomy with behaviour. *Exp Neurol*, 72: 379-400.
- Sofroniew MV, Howe CL, Mobley WC. 2001. Nerve growth factor signaling, neuroprotection, and neural repair. *Annu Rev Neurosci*, 24: 1217-1281.
- Soppet D, Escandon E, Maragos J, Middlemas DS, Reid SW, Blair J, Burton LE, Stanton BR, Kaplan DR, Hunter T, Nikolics K, Parada LF. 1991. The neurotrophic factors brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3 are ligands for the trkB tyrosine kinase receptor. *Cell*, 65: 895-903.
- Sousa N, Lukoyanov NV, Madeira MD, Almeida OF, Paula-Barbosa MM. 2000. Reorganization of the morphology of hippocampal neurites and synapses after stress-induced damage correlates with behavioral improvement. *Neuroscience*, 97: 253-266.
- Spalding KL, Cui Q, Harvey AR. 1998. The effects of central administration of neurotrophins or transplants of fetal tectal tissue on retinal ganglion cell survival following removal of the superior colliculus in neonatal rats. *Brain Res Dev Brain Res*, 107: 133-142.
- Spranger M, Lindholm D, Bandtlow C, Heumann R, Gnahn H, Naher-Noe M, Thoenen H. 1990. Regulation of nerve growth factor (NGF) synthesis in rat central nervous system: comparison between the effects of Interleukin-1 and various growth factors in astrocytes culture and in vivo. *Eur J Neurosci*, 2: 69-76.
- Stein BE, Gaither NS. 1983. Receptive-field properties in reptilian optic tectum: some comparisons with mammals. *J Neurophysiol*, 50: 102-124.
- Stein BE, Meredith MA. 1993. Multisensory convergence patterns. *The Merging of the Senses*. Ed: The MIT Press, pp: 117-122.
- Stein BE. 1981. Organization of the rodent superior colliculus: Some comparisons with other mammals. *Behav Brain Res*, 3: 175-188.
- Su Y, Wang F, Zhao SG, Pan SH, Liu P, Teng Y, Cui H. 2008. Axonal regeneration after optic nerve crush in Nogo-A/B/C knockout mice. *Mol Vis*, 14: 268-273.
- Sutin EL, Kilduff TS. 1992. Circadian and light-induced expression of immediate early gene mRNAs in the rat suprachiasmatic nucleus. *Brain Res Mol Brain Res*, 15: 281-290.
- Swanson LW. 1996. *Brain maps: structure of the brain*. Ed: Elsevier Science Publishers BV, Amsterdam, 2<sup>a</sup> edición.
- Swanson RA. 1992. Astrocyte glutamate uptake during chemical hypoxia in vitro. *Neurosci Lett*, 147: 143-146.
- Taishi P, Churchill L, Wang M, Kay D, Davis CJ, Guan X, De A, Yasuda T, Liao F, Krueger JM. 2007. TNF $\alpha$  siRNA reduces brain TNF and EEG delta wave activity in rats. *Brain Res*, 1156: 125-132.



- Tan MML, Harvey AR. 1997. A comparison of postlesion growth of retinotectal and corticotectal axons after superior colliculus transections in neonatal rats. *J Comp Neurol*, 386: 681-699.
- Tang BL. 2003. Inhibitors of neuronal regeneration: mediators and signaling mechanisms. *Neurochem Int*, 42: 189-203.
- Thallmair M, Metz GAS, Z'Graggen WJ, Raineteau O, Kartje GL, Schwab ME. 1998. Neurite growth inhibitors restrict structural plasticity and functional recovery following corticospinal tract lesions. *Nat Neurosci*, 1: 124-131.
- Thomas HC, Espinoza SG. 1987. Relationships between interhemispheric cortical connections and visual areas in hooded rats. *Brain Res*, 417: 214-224.
- Thompson ID, Cordery P, Holt CE. 1995. Postnatal changes in the uncrossed retinal projection of pigmented and albino Syrian hamsters and the effects of monocular enucleation. *J Comp Neurol*, 357: 181-203.
- Thompson ID, Morgan JE, Henderson Z. 1993. The effects of monocular enucleation on ganglion cell number and terminal distribution in the ferret's retinal pathway. *Eur J Neurosci*, 5: 357-367.
- Thompson ID. 1979. Changes in the uncrossed retinotectal projection after removal of the other eye at birth. *Nature*, 279: 63-66.
- Thong IG, Dreher B. 1987. The development of the corticotectal pathway in the albino rat: Transient projections from the visual and motor cortices. *Neurosci Lett*, 80: 275-282.
- Tigyi G, Fischer DJ, Sebok A, Yang C, Dyer DL, Miledi R. 1996. Lysophosphatidic acid-induced neurite retraction in PC12 cells: control by phosphoinositide-Ca<sup>2+</sup> signaling and Rho. *J Neurochem*, 66: 537-548.
- Timmusk T, Palm K, Metsis M, Reintam T, Paalme V, Saarma M, Persson H. 1993. Multiple promoters direct tissue specific expression of the rat BDNF gene. *Neuron*, 10: 475-89.
- Toldi J, Fehér O, Wolff JR. 1996. Neuronal plasticity induced by neonatal monocular (and binocular) enucleation. *Prog Neurobiol*, 48: 191-218.
- Tucker KL, Meyer M, Barde YA. 2001. Neurotrophins are required for nerve growth during development. *Nat Neurosci*, 4: 29-37.
- Ullian EM, Sapperstein SK, Christopherson KS, Barres BA. 2001. Control of synapse number by glia. *Science*, 291: 657-661.
- Van Harten J. 1993. Clinical pharmacokinetics of selective serotonin reuptake inhibitors. *Clin Pharmacokinet*, 24: 203-220.
- Varea E, Blasco-Ibáñez JM, Gómez-Climent MA, Castillo-Gómez E, Crespo C, Martínez-Guijarro FJ, Nacher J. 2007. Chronic fluoxetine treatment increases the expression of PSA-NCAM in the medial prefrontal cortex. *Neuropsychopharmacology*, 32: 803-812.
- Vargas JP, Siegel JJ, Bingman VP. 2006. The effects of a changing ambient magnetic field on single-unit activity in the homing pigeon hippocampus. *Brain Res Rev*, 70: 158-164.

- Varoqui H, Schafer MK-H, Zhu H, Weihe E, Erickson D. 2002. Identification of the differentiation-associated Na/Pi transporter as a novel vesicular glutamate transporter expressed in a distinct set of glutamatergic synapses. *J Neurosci*, 22: 142-155.
- Veenman CL, Reiner A, Honig MG. 1992. Biotinylated dextran amine as an anterograde tracer for single- and double-labeling studies. *J Neurosci Methods*, 41: 239-254.
- Venkatesh K, Chivatakarn O, Lee H, Joshi PS, Kantor DB, Newman BA, Mage R, Rader C, Giger RJ. 2005. The Nogo-66 receptor homolog NgR2 is a sialic acid dependent receptor selective for myelin-associated glycoprotein. *J. Neurosci*, 25: 808-822.
- Vercelli A, Garbossa D, Biasiol S, Repici M, Jhaveri S. 2000. NOS inhibition during postnatal development leads to increased ipsilateral retinocollicular and retinogeniculate projections in rats. *Eur J Neurosci*, 12: 473-490.
- Vizuete ML, Venero JL, Vargas C, Revuelta M, Machado A, Cano J. 2001. Potential role of endogenous brain-derived neurotrophic factor in long-term neuronal reorganization of the superior colliculus after bilateral visual deprivation. *Neurobiol Dis*, 8: 866-880.
- Von Bartheld CS, Wang X, Butowt R. 2001. Anterograde axonal transport, transcytosis, and recycling of neurotrophic factors: the concept of trophic currencies in neural networks. *Mol Neurobiol*, 24: 1-28.
- Vrensén G, Nunes Cardozo J. 1981. Changes in size and shape of synaptic connections after visual training: an ultrastructural approach of synaptic plasticity. *Brain Res*, 218: 79-97.
- Walker MM, Diebel CE, Haugh CV, Pankhurst PM, Montgomery JC, Green CR. 1997. Structure and function of the vertebrate magnetic sense. *Nature*, 390: 371-376.
- Wang KC, Koprivica V, Kim JA, Sivasankaran R, Guo Y, Neve RL, He Z. 2002. Oligodendrocyte-myelin glycoprotein is a Nogo receptor ligand that inhibits neurite outgrowth. *Nature*, 417: 941-944.
- Wang XM, Terman JR, Martin GF. 1998. Regeneration of supraspinal axons after transection of the thoracic spinal cord in the developing opossum, *Didelphis virginiana*. *J Comp Neurol*, 398: 83-97.
- Wang Y, Gu Q, Cynader MS. 1997. Blockade of serotonin-2C receptors by mesulergine reduces ocular dominance plasticity in kitten visual cortex. *Exp Brain Res*, 114: 321-328.
- Wang Y, Pan Y, Parsons S, Walker MM, Zhang S. 2007. Bats respond to polarity of a magnetic field. *Proc Biol Sci*, 274: 2901-2905.
- Williams G, Williams EJ, Maison P, Pangalos MN, Walsh FS, Doherty P. 2005. Overcoming the inhibitors of myelin with a novel neurotrophin strategy. *J Biol Chem*, 280: 5862-5869.
- Willson CA, Irizarry-Ramírez M, Gaskins HE, Cruz-Orengo L, Figueroa JD, Whittemore SR, Miranda JD. 2002. Upregulation of EphA receptor expression in the injured adult rat spinal cord. *Cell Transplant*, 11: 229-239.
- Wiltshcko R, Wiltshcko W. 2006 . Magnetoreception. *BioEssays*, 28: 157-168.

- Wiltschko W, Munro U, Ford H, Wiltschko R. 2003. Magnetic orientation in birds: non-compass responses under monochromatic light of increased intensity. *Proc Biol Sci*, 279: 2133-2140.
- Wiltschko W, Traudt J, Güntürkün O, Prior H, Wiltschko R. 2002. Lateralization of magnetic compass orientation in a migratory bird. *Nature*, 419: 467-470.
- Wiltschko W, Wiltschko R. 2002. Magnetic compass orientation in birds and its physiological basis. *Naturwissenschaften*, 89: 445-452.
- Wizenmann A, Thies E, Klostermann S, Bonhoeffer F, Bähr M. 1993. Appearance of target-specific guidance information for regenerating axons after CNS lesions. *Neuron*, 11: 975-983.
- Wong ST, Henley JR, Kanning KC, Huang KH, Bothwell M, Poo MM. 2002. A p75 (NTR) and Nogo receptor complex mediates repulsive signaling by myelin associated glycoprotein. *Nat Neurosci*, 5: 1302-1308.
- Worter V, Schweigreiter R, Kinzel B, Mueller M, Barske C, Bock G, Frentzel S, Bandtlow CE. 2009. Inhibitory activity of myelin-associated glycoprotein on sensory neurons is largely independent of NgR1 and NgR2 and resides within Ig-Like domains 4 and 5. *PLoS ONE*, 4: e5218.
- Wu CC, Russell RM, Karten HJ. 1999. The transport rate of cholera toxin B subunit in the retinofugal pathways of the chick. *Neuroscience*, 92: 665-676.
- Wu D, Pardridge WM. 1999. Neuroprotection with noninvasive neurotrophin delivery to the brain. *Proc Natl Acad Sci USA*, 96: 254-259.
- Wu D. 2005. Neuroprotection in experimental stroke with targeted neurotrophins. *NeuroRx*, 2: 120-128.
- Wu DY, Schneider GE, Silver J, Poston M, Jhaveri S. 1998. A role for tectal midline glia in the unilateral containment of retinocollicular axons. *J Neurosci*, 18: 8344-8355.
- Xu G, Nie DY, Chen JT, Wang CY, Yu FG, Sun L, Luo XG, Ahmed S, David S, Xiao ZC. 2004. Recombinant DNA vaccine encoding multiple domains related to inhibition of neurite outgrowth: a potential strategy for axonal regeneration. *J Neurochem*, 91: 1018-1023.
- Xu S, Liu M, Zhang T, Lv B, Liu B, Yuan W. 2011. Effect of lentiviral shRNA of Nogo receptor on rat cortex neuron axon outgrowth. *Can J Neurol Sci*, 38: 133-138.
- Yagi F, Sakai M, Ikeda Y, Okutani F, Takahashi S, Fukata J. 2001. Reorganization of the uncrossed visual pathways as revealed by Fos-like immunoreactivity in rats with neonatal monocular enucleation. *Neurosci Lett*, 304: 53-56.
- Yamashita T, Higuchi H, Tohyama M. 2002. The p75 receptor transduces the signal from myelin-associated glycoprotein to Rho. *J Cell Biol*, 157: 565-570.
- Yang Y, Liu Y, Wei P, Peng H, Winger R, Hussain RZ, Ben LH, Cravens PD, Gocke AR, Puttapparthi K, Racke MK, McTigue DM, Lovett-Racke AE. 2010. Silencing Nogo-A promotes functional recovery in demyelinating disease. *Ann Neurol*, 67: 498-507.

- Yokoyama N, Romero MI, Cowan CA, Galvan P, Helmbacher F, Charnay P, Parada LF, Henkemeyer M. 2001. Forward signaling mediated by ephrin-B3 prevents contralateral corticospinal axons from recrossing the spinal cord midline. *Neuron*, 29: 85-97.
- Zapka M, Heyers D, Hein CM, Engels S, Schneider NL, Hans J, Weiler S, Dreyer D, Kishkinev D, Wild JM, Mouritsen H. 2009. Visual but not trigeminal mediation of magnetic compass information in a migratory bird. *Nature*, 461: 1274-1277.
- Zheng B, Ho C, Li S, Keirstead H, Steward O, Tessier-Lavigne M. 2003. Lack of enhanced spinal regeneration in Nogo-deficient mice. *Neuron*, 38: 213-224.
- Zheng M, Heinrich G. 1988. Structural and functional analysis of the promoter region of the nerve growth factor gene. *Mol Brain Res*, 3: 133-140.
- Zilles K. 1985. *The cortex of the rat. A stereotaxic atlas*. Ed: Springer-Verlag, Berlin, Germany.
- Zirpel L, Lachica EA, Lippe WR. 1995. Deafferentation increases the intracellular calcium of cochlear nucleus neurons in the embryonic chick. *J Neurophysiol*, 74: 1355-1357.