

eman ta zabal zazu



Universidad
del País Vasco

Euskal Herriko
Unibertsitatea

**Efectos neurovasculares y cognitivos
de la administración intracortical del VEGF
y el enriquecimiento ambiental
durante el desarrollo postnatal
de ratas Long Evans**

TESIS DOCTORAL

Naiara Ortuzar Markes

Leioa, 2012

eman ta zabal zazu



Universidad
del País Vasco

Euskal Herriko
Unibertsitatea



NEUROZIENTZIEN SAILA
DEPARTAMENTO DE NEUROCIENCIAS

MEDIKUNTZA ETA ODONTOLOGIA FAKULTATEA
FACULTAD DE MEDICINA Y ODONTOLÓGIA

**Efectos neurovasculares y cognitivos de la
administración intracortical del VEGF
y el enriquecimiento ambiental
durante el desarrollo postnatal de ratas**

Long Evans

TESIS DOCTORAL

Naiara Ortuzar Markes

2012

Figura portada: Imagen de inmunofluorescencia de VEGF/GFAP/Hoechst en la zona de la lesión inducida por la implantación de la bomba osmótica.

Este trabajo ha sido financiado por:

- Una beca predoctoral del programa de Formación de Profesores Universitarios (FPU) del Ministerio de Educación.
- Ayuda a grupos consolidados del Gobierno Vasco (IT 491-10).
- Fundación Jesús Gangoiti de Barrera.

ESKERTZAK

Heldu da eskertzak idazteko ordua. Tesia bukatuta dagoenaren seinale. Luzea izan da bidea, momentu on askorekin eta momentu txar bat baino gehiagorekin baina 6 urtek danetik bizitzeko lain ematen dute.

En primer lugar me gustaría agradecer a mis directores, José Vicente y Enrike, tan diferentes y necesarios a la vez. Gracias por haberme dado la oportunidad de realizar la tesis doctoral, apoyando siempre mi formación y respetando el plano personal. A José Vicente porque cada pregunta termina siendo una lección de algo que todavía me queda por aprender. Enrikeri hasieratik emandako laguntza guztiagatik, eskerrik asko.

Además, me gustaría mostrar mi agradecimiento al departamento de Neurociencias y a su director por haberme permitido llevar a cabo este trabajo en el mismo. Era berean eskerrak Delbiri, hainbeste urte eta gero, bekadunoi burokraziarekin beti laguntzeko prest egotearren. Eskerrak ere Inmari, hasierako urteetan goiko laborategian hasi eta gaurdaino emandako laguntza guztiagatik. Eta Juan Bilbaori, zenbaki artean galduta gaudenean biderik egokiena zein den adierazteagatik, eskerrik asko.

Eskerrik asko nire taldekide diren Harkaitz, Susana, Iran, Alvaro, Hodei eta Catari. Prozesu luze honetan bakoitzaren partehartzea desberdina izan bada ere, eskerrik asko danoi. Bereziki Harkaitzi, urte guzti hauetan erakutsi didazun guztiagatik, zure irudien eskubideak nirekin konpartitzeagatik eta Enrikerekin batera pasa ditugun “viernes del humor” hoiengatik. Eta nola ez, Irani hain gogorra izan den azken urte honetan emandako laguntza guztiagatik. Morrisetea...hainbeste buruko min eta konfesio momenturen erantzule. Egunen baten itzuliko dizudan esperantzarekin, eskerrik asko benetan!

Ezin ahaztu Olatz. Bi urte elkarren ondoan pipeteatzen, nire hasieratan eta zure azken txanpan. Ordutik denbora pasa bada ere, orduko gure poyata zein kafe, eta oraingo telefono momentuengatik, irakatsitakoagatik eta zuk orain dela 4 urte idatzi zenuen bezala, lotzen gaituen guztiagatik, eskerrik asko.

Eskerrik asko departamentuko gainontzeko lankide guztieei, hemen jarraitzen duzuenoi eta beste bide bat jarraitzea erabaki duzuenoi. Urte luze hauetan jende desberdin asko ezagutzeko aukera izan dut eta laborategiko elkarbizitzan ikasitako guztiagatik, eskerrik asko.

Bereziki Onin, azken etapa honetan gurekin egon ez zaren arren, elkarrekin pasatako momentu guztiengatik eta laguna zaitudalako, eskerrik asko. Eta Nuriari, konpartitu dugunagatik eta horren desberdinak izan arren hasieratik elkar ulertu garelako, milesker. Gainontzeko lankide guztiei, Laura, Bárbara, Belén eta Fátima (“Luisak”); Fede, Silvia, Esti, Anita, Hazel, Ane, Saioa

eta Manu ("Matuteak"); Leire eta Iani (Pedroren neskek)... eskerrik asko elkarrekin pasatako momentu guztiengatik. Zuen alaitasunak lan egunak arintzen dituelako eta beste edozeinek nahiko lituzkeen hizketaldiak izan ditugulako bai laborategi, jantoki zein kafe orduetan, eskerrik asko. Ezin ahaztu Elsita, labur esanda, teknikari lanaz gain gurekin egiten duzun lana edozelakoa ez delako, eskerrik asko.

Eskerrik asko Ainara, Eider, Ekaitz eta Leio, nire kimikariak. Denbora eta distantzia laguntasunaren oztopo ez izatea lortu dugulako.

Itzi eta Iraia, elkarrekin hazi, hezi eta heldu garelako, momentu on eta txarretan beti hor zaudetelako eta ikerkuntza mundua zuentzako ezezaguna izan arren, tesiaren prozesuan emandako laguntza guztiagatik eta izandako pazientziagatik, eskerrik asko neskek.

Eta etxeko atea zeharkatzen hasita, Asi, nire etxeko tesi zuzendariari. Lankidiak ginala ezagutu eta gitxi aitxik zure lehenengo predoc-a bihurtu naz, nor esango eban! Eskerrik asko nire keja danak daukozun pazientzia guzti horreaz aguantatien, eskerrik asko erakutsi nazun dana aitxik, eta tesiko momenturik txarretan aurrera eitxen bultzatu izana aitxik. Lagun, konfidente eta idatzi ezin dan dana zarelako, eskerrik asko.

Nire gizonei...aitxa eta Iraitz, zuek aitxik izango ez bazan, hemen egongo ez nitzalako. Eskerrik asko aitxa zailtasun danen aurretik gure formaziñua ipini izana aitxik, apostu hori mantendu izana aitxik eta zure alabien lana ondo ulertu ez arren, emondako laguntza inkondizional horre aitxik. Eta Iraitzeri neba gaztia izan arren, arreba nagusiari beti asko lagundu dotzazulako, eskerrik asko. Ainhori be eskerrak, familien parte izatiaz gain laguna zarelako eta beti hor zagozelako.

Eta amaitzeko, amari. Hamen egon ezin bazara be, lortu doun dana zuk eta aitxak alkarreaz sortutako horretan oinarritu dalako, erakutsi uztazun dana aitxik eta zure berbak beti niaz datozelako, eskerrik asko. Zuek emondako danaren parte bat bueltatzen dotzuetelakuan...

Amari eta aitxari

ÍNDICE

1. Introducción	1
1.1. Sistema visual.....	3
1.1.1. Desarrollo postnatal de la corteza visual	4
1.2. Unidad Neuroglivascular (NVU).....	8
1.3. Factor de Crecimiento Vascular Endotelial (VEGF).....	9
1.3.1. Funciones del VEGF (VEGF/VEGFR).....	11
1.3.2. Papel terapéutico del VEGF	14
1.4. Entorno Enriquecido (EE).....	15
1.4.1. Papel terapéutico del entorno enriquecido	19
1.5. Aprendizaje y Memoria	19
1.5.1. Anatomía del hipocampo.....	20
1.5.2. Sistema visual y memoria visuoespacial	22
1.5.3. VEGF, entorno enriquecido y memoria visuoespacial	25
2. Hipótesis	27
3. Objetivos	31
3.1. Objetivo general	33
3.2. Objetivos operativos.....	33
4. Material y Métodos	35
4.1. Animales y condiciones de cría	37
4.1.1. Edades estudiadas	37
4.1.2. Condiciones de cría.....	37
4.2. Grupos experimentales.....	37
4.3. Preparación de las bombas osmóticas	38
4.4. Procedimiento quirúrgico	39
4.5. Obtención y procesamiento del material	40
4.5.1. Zona de obtención del material	40
4.5.2. Procesamiento del material para estudios histológicos, histoquímicos e inmunohistoquímicos	41
4.5.3. Procesamiento del material para Western blot.....	42
4.6. Corte del material	42
4.7. Técnicas histológicas.....	42
4.8. Técnicas histoquímicas	43
4.8.1. Butiril Colinesterasa.....	43
4.8.2. Histoquímica lectinas.....	44
4.9. Técnicas inmunohistoquímicas.....	44

4.10. Valoración macroscópica	46
4.11. Estereología	47
4.12. Western blot	48
4.13. Laberinto acuático de Morris.....	49
4.14. Estadística.....	52
5. Resultados	54
5.1. Administración del péptido VEGF durante 1 semana (P25).....	56
5.1.1. Efectos morfológicos de la implantación de la bomba osmótica	56
5.1.2. Co-expresión del VEGF en la corteza visual primaria.....	58
5.1.3. Efecto de la administración del VEGF sobre la densidad neuronal y la red vascular de la corteza visual primaria.....	59
5.1.4. Análisis del efecto de la administración del VEGF sobre la expresión de ERK1/2 fosforilado	65
5.2. Administración del péptido VEGF durante 4 semanas (P46).....	67
5.2.1. Efectos morfológicos de la implantación de la bomba osmótica	68
5.2.2. Co-expresión del VEGF en la corteza visual primaria.....	68
5.2.3. Co-expresión del VEGF en el giro dentado.....	69
5.2.4. Efecto de la administración del VEGF sobre la densidad neuronal y la red vascular de la corteza visual primaria.....	72
5.2.5. Análisis del efecto de la administración del VEGF en la expresión de ERK1/2 fosforilado	79
5.2.6. Efecto de la administración del VEGF sobre la densidad neuronal y la red vascular del giro dentado.....	80
5.2.7. Efecto de la administración del VEGF sobre el aprendizaje y la memoria visuoespacial.....	86
6. Discusión.....	94
6.1. Efecto morfológico de la implantación: Reacción astrogliar.....	96
6.2. Co-expresión del VEGF	97
6.3. Efectos sobre la corteza visual primaria de la administración de VEGF durante 1 semana (P25).....	98
6.4. Efecto sobre la corteza visual primaria de la administración de VEGF durante 4 semanas (P46)	101
6.5. Efecto sobre el giro dentado de la administración de VEGF durante 4 semanas (P46).....	103
6.6. Efectos sobre el aprendizaje y memoria de la administración de VEGF durante 4 semanas (P46).....	104
6.7. Conexión corteza visual primaria-giro dentado	105

6.8. Efectos contralaterales.....	106
6.9. Efecto del entorno enriquecido.....	106
6.10. Perspectivas de futuro	110
7. Conclusiones.....	113
8. Bibliografía	117
9. Anexos.....	139

1. INTRODUCCIÓN

El desarrollo postnatal del Sistema Nervioso Central (SNC), y especialmente, el de los sistemas sensoriales, se encuentra modulado por la experiencia, cuyos efectos inducen un aumento de la actividad neuronal. Esto conlleva un crecimiento de la actividad metabólica junto con un incremento en los requerimientos de energía, lo que implica el establecimiento de cambios adaptativos para satisfacer la demanda de la nueva situación.

El sistema visual es un sistema sensorial bien definido. La accesibilidad a las estructuras que lo forman y el hecho de que su desarrollo se divida en dos etapas bien definidas en el tiempo (una primera predeterminada genéticamente y una segunda mediada por la experiencia), hace que sea uno de los sistemas más utilizados para el estudio de las modificaciones inducidas por la experiencia, tanto debidas al aumento de los estímulos visuales como a la privación de los mismos.

1.1. Sistema visual

La estructura del sistema visual sigue el esquema básico de funcionamiento de los sistemas sensoriales. Se trata por tanto de un sistema jerarquizado formado por un receptor sensitivo (retina), estaciones intermedias de relevo (núcleo geniculado lateral del tálamo, núcleo lateral posterior del tálamo y colículo superior) y un área específica en la corteza cerebral (áreas 17, 18 y 18a). Se trata de una vía bien conocida, con unas estaciones intermedias bien definidas, estructuradas y que presentan buena accesibilidad a cada uno de sus componentes, constituyendo el sistema de elección en muchos de los estudios sobre sistemas sensoriales (Bakkum y cols., 1991).

La luz se transforma en energía bioeléctrica en la capa nuclear externa de la retina, desde donde se transmite a la capa nuclear interna formada por las células ganglionares. De los cuerpos de éstas células parten los axones que confluyen originando el tracto óptico. El cruce o decusación de los tractos ópticos de ambos lados se produce en el quiasma óptico y el número de fibras que se decusan es diferente según la especie estudiada. Mientras que en el humano únicamente se decusan la mitad de las fibras (las procedentes de la mitad medial de la retina), en la rata se decusan el 85-90% de las fibras.

Cada tracto óptico distribuye sus fibras en dos zonas terminales: la vía visual principal que pasa por el núcleo geniculado lateral del tálamo para acabar en la corteza visual primaria (área 17), y la vía que se dirige al colículo superior desde donde las fibras proyectan al tálamo (al núcleo lateral posterior) y de aquí al área periestriada de la corteza cerebral (áreas 18 y 18a) (Peters, 1985).

En el caso de la rata, el núcleo geniculado lateral talámico no se encuentra organizado en capas como ocurre en otros animales (Peters, 1985). Pese a que esta estructura constituye la principal estación de relevo subcortical, la mayoría de las sinapsis que en ella se efectúan no proceden de las células ganglionares, sino de otras áreas corticales. La función de estas conexiones es la regulación del flujo de información visual que llega a la corteza visual primaria.

1.1.1. Desarrollo postnatal de la corteza visual

Durante el desarrollo prenatal del sistema visual, los axones que parten de las células ganglionares de la retina llegan al núcleo geniculado lateral, donde forman sinapsis con las células del mismo (Sherman y Spear, 1982). En la primera semana de vida postnatal las fibras procedentes del geniculado alcanzan la capa IV cortical donde establecen conexiones de forma desordenada. La influencia de la experiencia visual comienza a partir de la apertura de los ojos, que en las ratas se produce en la segunda semana de vida postnatal (Cancedda y cols., 2004), y es a partir de este momento cuando se produce una gran reorganización de todo el sistema visual mediada por los estímulos visuales que comienzan a percibirse.

El desarrollo postnatal del sistema visual por lo tanto, cursa en dos etapas: una primera predeterminada genéticamente y que es responsable de la formación de la arquitectura cortical, y otra posterior mediada por la experiencia. Es en ésta última, y sobre todo durante el lapso de tiempo denominado **periodo crítico**, cuando se produce la máxima reorganización debida a la experiencia. El término periodo crítico engloba una cascada de eventos, tanto funcionales como anatómicos que finalizan con la consolidación de las conexiones sinápticas, dando lugar al patrón definitivo.

El concepto del periodo crítico en el desarrollo del sistema visual en mamíferos fue introducido por Wiesel y Hubel (1963) en estudios llevados a cabo en gato. Posteriormente, la existencia del periodo crítico se ha demostrado y datado en otros sistemas como son el auditivo o el somatosensorial, y en infinidad de especies, desde la *Drosophila* hasta el humano (Berardi y cols., 2000).

La **plasticidad** cerebral se define como la capacidad del sistema nervioso de adaptar su organización estructural a situaciones funcionales cambiantes. Esta capacidad es resultado del desarrollo y de los estímulos externos del entorno. Es por ello por lo que los efectos de la modificación en los estímulos sensoriales son más evidentes cuando éstos se manipulan durante

el periodo crítico, ya que modificaciones similares en animales adultos no tienen el mismo efecto. A pesar de que durante mucho tiempo se pensó que la plasticidad del cerebro se perdía con el cierre del periodo crítico, hoy sabemos que el cerebro adulto mantiene cierto grado de plasticidad a lo largo de toda la vida (Fu y Zuo, 2011; Gu y cols, 2012; Tognini y cols., 2012). Recientemente, Scali y cols. (2012) han demostrado que los procesos plásticos pueden ser estimulados mediante el entorno enriquecido en un modelo de envejecimiento.

La plasticidad dependiente de la experiencia durante el periodo crítico, está estrechamente ligada a la maduración de las funciones sensoriales. Así, la experiencia es determinante en la duración del periodo crítico: mientras que la ausencia total de experiencia prolonga el periodo crítico y retrasa el maduración de las funciones sensoriales (Berardi y cols., 2000), el entorno enriquecido produce una aceleración en el desarrollo del sistema visual (Cancedda y cols., 2004). En el caso del **sistema visual** de la rata, se ha observado que este periodo crítico no empieza hasta la apertura de los ojos, tiene su pico a las 4 semanas de vida postnatal y declina en varias semanas a partir de ésta (Fagiolini y cols., 1994; Gordon y Stryker, 1996; Fagiolini y Hensch, 2000).

El desarrollo del sistema visual es gradual durante las primeras semanas de vida postnatal. Durante este periodo se produce una reorganización anatómica de las conexiones en la corteza visual, donde las neuronas visuales alcanzan la madurez funcional en respuesta a estímulos. Tanto el desarrollo anatómico como funcional dependen en parte de la experiencia visual adquirida durante el periodo crítico. La influencia de la experiencia por consiguiente, comienza a partir de la segunda semana de vida postnatal. A los 17 días de vida postnatal (P17), la corteza visual de la rata es completamente inmadura tanto estructural como funcionalmente y las propiedades funcionales de las neuronas corticales se desarrollan gradualmente durante el primer mes del desarrollo postnatal mediante el equilibrio de señales inhibitorias y excitatorias de las interneuronas GABAérgicas, fundamentalmente de las subpoblaciones que expresan parvalbúmina y somatostatina, que son las responsables del cierre del periodo crítico con el establecimiento de las redes perineuronales que cierran físicamente dicho periodo (Pizzorusso y cols., 2002; Hensch, 2005; Lazarus y Huang, 2011).

En los últimos años, se ha establecido que existen factores determinantes en la plasticidad del periodo crítico de la corteza visual durante el desarrollo, de los cuales caben destacar las neurotrofinas como el BDNF o el VEGF, los neurotransmisores (NMDA, GABA, NE, Ach, serotonina), los neuropéptidos (Ranc y cols., 2012) y otras moléculas de señalización como ERK y CREB entre otras (Hensch, 2005; Taha y Stryker., 2005; Yang y cols., 2006; Bengoetxea y cols., 2008).

Desarrollo postnatal de la vascularización

El patrón fisiológico del desarrollo de la vascularización de la rata se divide en distintas fases. Durante la primera fase del desarrollo vascular, se establece un esquema básico que se adapta a las necesidades de cada área cortical. Se inicia con el desarrollo de troncos vasculares radialmente penetrantes, perpendiculares a la superficie cortical que alcanzan mayor profundidad a mayor antigüedad (Fig. 1). En la rata, a partir de la segunda semana de vida postnatal disminuyen drásticamente las proliferaciones vasculares que penetren perpendicularmente en el córtex. El volumen y el área superficial de la corteza cerebral siguen incrementándose, por lo que la densidad de los vasos penetrantes perpendiculares desciende en relación a la superficie cortical (Argandoña y Lafuente-Sánchez, 2002).

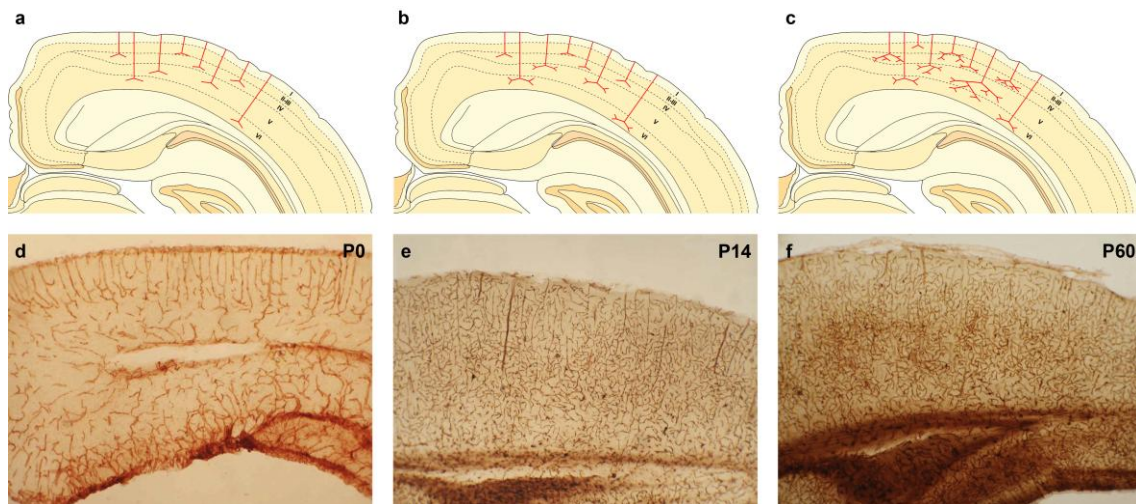


Figura 1. Representación esquemática de las fases del desarrollo postnatal de la vascularización de la corteza visual de la rata: primera fase (a, d), segunda fase (b, e) y tercera fase (c, f).

Durante la segunda fase de la vascularización se produce un gran aumento de la densidad del lecho vascular terminal que se corresponde con un gran incremento de la superficie capilar estrechamente asociado al incremento de la demanda metabólica de la corteza cerebral (Fig. 1). Entre los 8 y 20 días de vida postnatal, las células endoteliales de la microvascularización proliferan rápidamente. Es durante este periodo cuando se forma gran parte de la arborización vascular. La actividad mitótica de las células endoteliales desciende bruscamente durante la tercera semana de vida postnatal.

La tercera fase de desarrollo vascular consiste en la elongación de las ramas existentes (Fig. 1). Primero se establecen sucesivas divisiones vasculares y posteriormente los vasos

proliferan en longitud para abarcar la totalidad del territorio que les corresponde. Esta fase de elongación de los capilares preexistentes se extiende desde el día 20 hasta la edad adulta (Bär, 1980).

En animales criados en condiciones normales el patrón adulto de la vascularización se culmina en la tercera semana de vida postnatal (Rowan y Maxwell, 1981). Posteriores cambios en las demandas metabólicas locales transitorias son suplidos mediante cambios en el flujo local, pero existen circunstancias especiales en las que se producen incrementos definitivos de demanda metabólica que son compensados mediante la ampliación o adaptación del patrón normal de desarrollo, como pueden ser el entorno enriquecido o la hipoxia (Black y cols., 1987; Sirevaag y cols., 1988; Black y cols., 1991).

El desarrollo de la vascularización se encuentra regulado por una variedad de factores tróficos entre los que cabe destacar el Factor de Crecimiento del Endotelio Vascular (VEGF) que describiremos más adelante.

Evolución postnatal de la población neuronal

El desarrollo embrionario del sistema nervioso implica la generación de una sobreabundancia de neuronas y células gliales que conlleva la muerte celular programada de las células superfluas (Buss y cols., 2006). Mediante este proceso de muerte celular fisiológica, hasta un 50% de las células son eliminadas sin interferir por ello en el desarrollo de las que permanecen, tratándose por tanto de un proceso determinante para el correcto desarrollo del SNC (Finlay, 1992; Voyvodic, 1996). Con el fin de formar y mantener la arquitectura funcional del sistema nervioso, la muerte neuronal se regula con precisión durante el desarrollo y se mantiene bajo un estricto control en el adulto (Repici y cols., 2007).

Hamburger y Levi-Montalcini describieron en los años cuarenta la muerte celular de las motoneuronas y su regulación mediante factores situados en la región inervada por éstas durante el desarrollo del embrión del pollo. Este trabajo sentó las bases del concepto de un exceso de producción de precursores neuronales que más tarde serían seleccionados para sobrevivir o morir dependiendo de procesos extra- e intracelulares. En algunas regiones cerebrales, más de la mitad de las neuronas inicialmente formadas mueren durante el desarrollo normal, pero el alcance y las características de la muerte celular programada de las neuronas en desarrollo, varía dependiendo de la etapa de desarrollo del área, de la población neuronal (Blomgren y cols., 2007) y de la propia actividad local (Alladi y cols., 2005).

1. Introducción

En sistemas que se caracterizan por una modulación postnatal, como el sistema visual, se describe un periodo postnatal relativamente prolongado antes de adquirir una población neuronal estable (Papadopoulos y Michaloudi, 1999).

1.2. Unidad Neuroglivascular (NVU)

Las investigaciones sobre el SNC se centraron primeramente en las neuronas. Posteriormente fueron adquiriendo relevancia las investigaciones dirigidas a esclarecer el papel de los diferentes tipos de células gliales. Así, en los últimos años se ha avanzado en la importancia de las interacciones que existen entre los distintos tipos celulares del cerebro, tanto en situaciones fisiológicas como patológicas. El concepto de **unidad neuroglivascular** propone la integración de neuronas, células gliales y componentes vasculares en un mismo contexto. Por tanto, se trata de una unidad funcional formada por neuronas, células endoteliales, pericitos, células musculares de la pared vascular, y las células gliales (astrocitos, microglia y oligodendrocitos) (Lo y cols., 2003; Lok y cols., 2007; Zlokovic, 2008) (Fig. 2).

La señalización e interacción entre los distintos tipos celulares son fundamentales para la función correcta del SNC (Deane y Zlokovic, 2007; Lok y cols., 2007). Las células endoteliales, la membrana basal, los pericitos y los astrocitos son los componentes celulares más importantes que forman la Barrera Hematoencefálica (BHE), un sistema de permeabilidad selectiva entre la sangre y el tejido nervioso que en base a un substrato anatómico, bioquímico e inmune mantiene un entorno químico y celular adecuado para el funcionamiento correcto de las sinapsis neuronales y todos los procesos neurobiológicos.

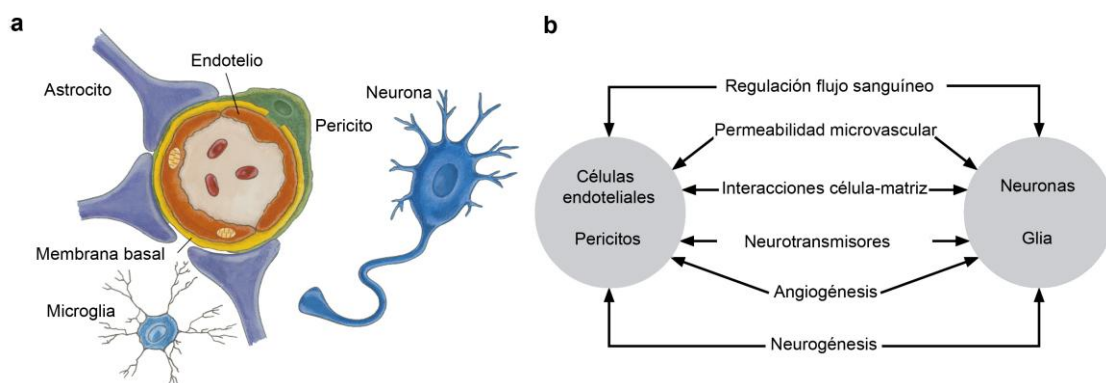


Figura 2. (a) Representación esquemática de la unidad neuroglivascular. (b) La regulación coordinada de las funciones neurovasculares dependen de las células endoteliales, los pericitos, las neuronas y los astrocitos. Tomado y adaptado de Zlokovic (2008).

La membrana basal endotelial es la matriz extracelular que rodea la pared capilar, separando así las células endoteliales de las células que la rodean, es decir, de los pericitos y los astrocitos. Asimismo, las células endoteliales, los pericitos y los astrocitos cooperan para generar y mantener la membrana basal. Los pericitos son células especializadas que comparten la membrana basal con las células endoteliales y contribuyen al mantenimiento de la integridad estructural y la función de los capilares (Armulik y cols., 2005; von Tell y cols., 2006).

Los astrocitos se encuentran posicionados entre las neuronas, los pericitos y las células endoteliales, y se comunican con los demás tipos celulares a través de sus prolongaciones o pies de astrocitarios (podocitos). Además de tomar parte en la modulación de la transmisión sináptica (Newman, 2003; Perea y cols., 2009) y la plasticidad neuronal (Nedergaard y cols., 2003), la interacción astrocito-célula endotelial regula el metabolismo del agua y de los electrolitos en el cerebro tanto en condiciones normales como situaciones patológicas (Abbott y cols., 2006). Así, la integridad de la BHE depende de la interacción de los astrocitos con las células endoteliales. Por último, la microglia juega un papel importante en la respuesta inmune innata y adaptativa en el SNC (Acarin y cols., 1999).

Por otro lado, los nichos vasculares han sido definidos como microentornos generados por las células endoteliales y que afectan a las células adyacentes (Nikolova y cols., 2007). De esta forma, dentro de las interacciones existentes entre los distintos componentes de la NVU, se ha descrito que la actividad neuronal produce una respuesta vascular que permite adecuar el flujo sanguíneo a la demanda metabólica, y la transducción de la señal requiere la interacción entre las neuronas y los astrocitos para la liberación y la recaptación de los neurotransmisores en la sinapsis. El establecimiento previo del nicho vascular es imprescindible para facilitar los procesos de neurogénesis (Louissaint y cols., 2002).

El estudio de la unidad neuroglivascular como unidad funcional y como diana terapéutica se ha convertido en una estrategia clave para la comprensión de múltiples procesos fisiológicos y para el tratamiento de distintas patologías (Hawkins y Davis, 2005; Zacchigna y cols., 2008).

1.3. Factor de Crecimiento Vascular Endotelial (VEGF)

Los factores de crecimiento y sus respectivos receptores son claves tanto en la regulación durante el desarrollo como en la homeostasis del SNC. El Factor de Crecimiento Vascular Endotelial (VEGF) actúa de forma compartida en el desarrollo vascular y neural. Algunos autores han acuñado el concepto de **angioglioneurina** para aquellas moléculas que ejercen efectos sobre los principales componentes de la unidad neuroglivascular como son los vasos

1. Introducción

(efectos angiogénicos), las neuronas (neurogénicos) y la glia (gliogénicos) (Zacchigna y cols., 2008; Argandoña y cols., 2012a). Además del ejemplo paradigmático del VEGF, no se pueden obviar las propias neurotrofinas, como el BDNF, con importantes funciones angiogénicas o moléculas plurifuncionales como el IGF-1 o el EPO (Zacchigna y cols., 2008).

El VEGF forma parte de una familia de 6 factores homólogos: VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E y el factor de crecimiento placentario (PIGF) (Raab y Plate, 2007). El VEGF-A (citoquina objeto de nuestro estudio) es la llave mediadora del crecimiento vascular y el principal factor implicado en la angiogénesis, mientras que el papel del VEGF-C y del VEGF-D se centra en la angiogénesis linfática.

El VEGF-A es la forma predominante, tratándose de una glicoproteína homodímera de 45 kDa. El gen del VEGF reside en el cromosoma 6 y consta de 8 exones. Además, presenta diferentes isoformas debidos al proceso de corte y empalme alternativo (*splicing*): VEGF₁₂₁, VEGF₁₄₅, VEGF₁₄₈, VEGF₁₆₅, VEGF₁₈₃, VEGF₁₈₉ y VEGF₂₀₆.

La isoforma VEGF₁₆₅, además de ser la primera isoforma descrita (Ferrara y Henzel, 1989), es la más abundante en el cerebro. Se expresa de forma soluble o unido a la superficie celular y a la matriz extracelular (Herrera y cols., 2009), y es la isoforma de mayor actividad mitogénica. Las isoformas en ratas y ratones tienen un aminoácido menos (Shima y cols., 1996). En 2002 se identificó la isoforma VEGF_{165b} dentro de la subfamilia del VEGF_{xxx}b (Bates y cols., 2002) producto del *splicing* alternativo del exon 8 (exon 8a y 8b). La diferencia entre los dos subexones se encuentra en 6 aminoácidos del terminal-COOH que producen cambios en la estructura, en la señalización, en la unión a receptores y por lo tanto, en las propiedades funcionales.

Durante el desarrollo cerebral de la rata, el VEGF es expresado por las neuronas hasta el P13 (Ogunshola y cols., 2000). En ese momento, la expresión neuronal de VEGF disminuye y la expresión astrocítica de VEGF aumenta hasta ser predominante en P24 (Bengoetxea y cols., 2008). A pesar de ello, en condiciones de hipoxia se mantienen niveles altos tanto de expresión neuronal como glial hasta el P33 (Ogunshola y cols., 2000).

La mayoría de las actividades biológicas del VEGF están mediadas por dos receptores tirosin kinasa (RTKs), el VEGFR-1 (Flt-1) y el VEGFR-2 (Flk-1/KDR) (Herrera y cols., 2009) (Fig. 3). El VEGFR-1 y el VEGFR-2 son glicoproteínas transmembranales de 180 y 200 kDa respectivamente. Ambos presentan 7 dominios extracelulares del tipo Ig, una región transmembranal simple y el correspondiente dominio efector tirosin kinasa (TK) (Shibuya, 2006; Ruhrberg, 2008). El lugar de unión del VEGF está situado en el segundo dominio del

tipo Ig en el VEGFR-1 y en los dominios 2/3 del tipo Ig en el VEGFR-2. La función de los dominios 4/7 está relacionada con la dimerización del receptor.

Además de estos receptores, el VEGF se une a una familia de co-receptores: las neuropilinas (Gluzman-Poltorak y cols., 2000; Neufeld y cols., 2002; Ferrara y cols., 2003) (Fig. 3). La neuropilina-1 (NP-1) y la neuropilina-2 (NP-2) son glicoproteínas transmembranales simples que inicialmente fueron descritas como receptores de semaforinas (Gu y cols., 2002). Las neuropilinas son moléculas que actúan de forma paralela en el crecimiento vascular y axonal. Estudios posteriores han demostrado que las neuropilinas mejoran la unión VEGF/VEGFR-2 y amplifican la fosforilación del receptor, aumentando así la efectividad en la transducción de la señal por parte del VEGFR-2 (Soker y cols., 1998). Por último, se ha descrito que las isoformas de la familia VEGF_{xxx}b, como el VEGF_{165b} no se unen a la NP-1 (Kawamura y cols., 2008), por lo que la diferencia existente en el terminal COOH de las isoformas VEGF₁₆₅ y VEGF_{165b} es determinante para la unión con el receptor NP-1.

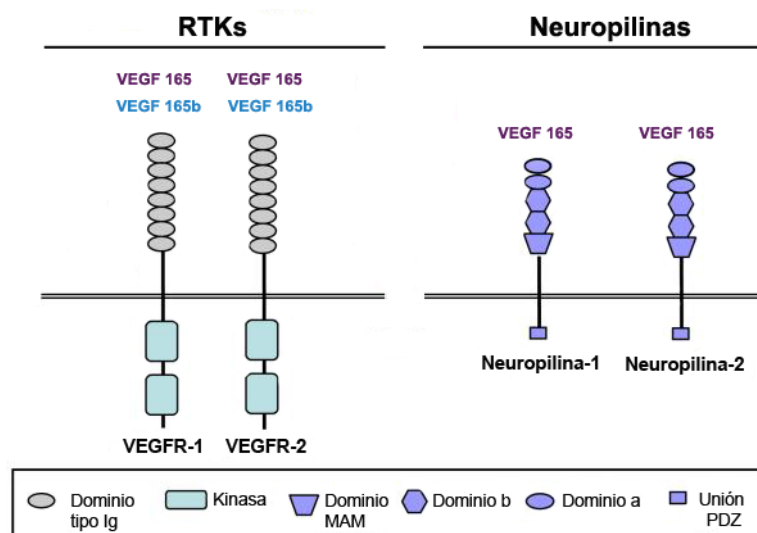


Figura 3. Receptores de la familia del VEGF. Los receptores del tipo tirosina kinasa (RTK) (VEGFR-1, VEGFR-2) y las neuropilinas (NRP-1 y NRP-2). Tomado y adaptado de Woolard y cols., 2009.

1.3.1. Funciones del VEGF (VEGF/VEGFR)

Como se ha mencionado anteriormente, el VEGF lleva a cabo sus funciones a través de la unión con los receptores VEGFR-1 y VEGFR-2. Aunque se une con una afinidad similar a ambos receptores, la actividad tirosina kinasa del VEGFR-1 es menor que la del VEGFR-2 (Ito y cols., 1998).

1. Introducción

El VEGF fue descrito inicialmente en 1983 como VPF, factor de permeabilidad vascular (Dvorak, 2006). Desde entonces ha sido objeto de infinidad de estudios para determinar además de su papel en la vascularización y su efecto sobre las células endoteliales (Thomas, 1996; Ferrara, 2001), su función neuroprotectora y neurogénica (Jin y cols., 2002; Sun y Guo, 2005) (Fig. 4).

El VEGF es el principal factor angiogénico liberado tanto en el desarrollo (Ferrara y cols., 2003) como en situaciones patológicas (Lafuente y cols., 1999; Marti y cols., 2000; Bulnes y Lafuente, 2007). El VEGFR-2 juega un papel importante en la diferenciación y organización de las células endoteliales en lechos vasculares, siendo el principal mediador de la proliferación de éstas células (Olsson y cols., 2006). La unión del VEGF a los receptores de la superficie de las células endoteliales, provoca una señal de transducción que da lugar a la producción de moléculas para la degradación de la matriz extracelular y el aumento de la permeabilidad vascular, facilitando así la proliferación celular, la supervivencia y la migración de las células endoteliales (Neufeld y cols., 1999). La función angiogénica del VEGF también implica una acción antiapoptótica mediada por el VEGFR-2 que promueve la supervivencia de células endoteliales vía PI3-K/Akt (Gerber y cols., 1998; Jin y cols., 2000).

La función de la unión con el VEGFR-1 es menos conocida. Se cree que regula de forma negativa la angiogénesis durante el desarrollo, compitiendo con el receptor VEGFR-2, previniendo la unión de éste con el VEGF y regulando así la función mitogénica del mismo (Park y cols., 1994; Olsson y cols., 2006). Además, también se ha descrito que este receptor es fundamental durante la formación de la red vascular. Embriones VEGFR1^{-/-} mueren hacia el día embrionario 8 debido a la obstrucción de los vasos por un crecimiento masivo de las células endoteliales (Fong y cols., 1995).

No obstante, el VEGF cumple una función más extensa en el SNC. Diversos estudios han demostrado propiedades neuroprotectoras, neurotróficas y neurogénicas del mismo. Se postula que el efecto neuroprotector se lleva a cabo sobre todo mediante el VEGFR-2 (Raab y Plate, 2007) activando las vías de señalización PI3-K/Akt y MEK/ERK (Matsuzaki y cols., 2001; Kaya y cols., 2005), y se cree que puede ser debida a la combinación de un efecto neuroprotector directo y a la estimulación de la angiogénesis, ya que el aumento del flujo proporciona un mayor aporte de energía.

En lo que a las propiedades neurogénicas se refiere, se ha visto que el VEGF está implicado en la neurogénesis de la zona subventricular rostral (SVZ) (Sun y cols., 2006) y la zona subgranular (SGZ) del giro dentado del hipocampo en el adulto (Kempermann y cols., 1997). Estas áreas neurogénicas se han caracterizado como **nichos vasculares**, es decir, áreas

en las que la vascularización es un factor determinante y donde tanto la neurogénesis como la angiogénesis están co-reguladas y se señalizan de forma recíproca. Las células endoteliales modulan la neurogénesis a través de la secreción de factores de crecimiento entre los que se encuentra el VEGF (Li y cols., 2006), y éste podría establecer el nicho vascular favoreciendo la proliferación y la diferenciación de los precursores neuronales (Palmer y cols., 2000). Por otro lado, también se ha descrito una función mitogénica directa del VEGF sobre dichos precursores (Greenberg y Jin, 2005).

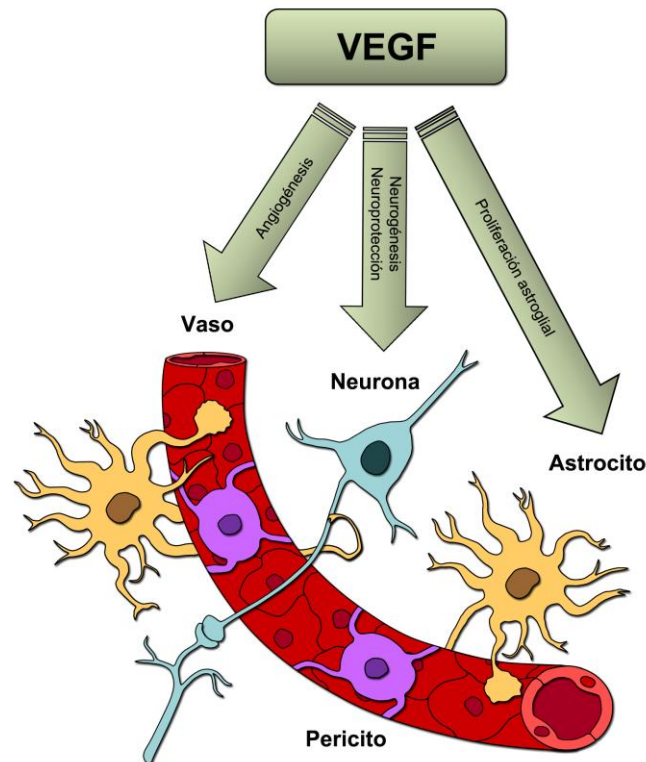


Figura 4. Representación esquemática de las funciones del VEGF sobre las distintas poblaciones celulares en el SNC. Tomado y adaptado de Argandoña y cols., 2012a.

El VEGF también influye sobre otros tipos celulares del SNC. Además del efecto que presenta sobre las células endoteliales, el VEGF actúa sobre los pericitos, los astrocitos, los oligodendrocitos y la microglía. El VEGF induce la proliferación y la migración de pericitos y a su vez, el VEGF liberado por los pericitos promueve la supervivencia de las células endoteliales (Ribatti y cols., 2011). Por otra parte, se ha descrito un papel regulador del VEGF sobre la población astrocítica mediado por el VEGFR-1 (Silverman y cols., 1999; Krum y cols., 2002). La astrogliia actúa en respuesta a una variedad de factores de crecimiento entre los que se encuentra el VEGF como factor de supervivencia y proliferación (Rabchevsky y cols., 1998; Krum y Khaibullina, 2003). Asimismo, se ha demostrado que la infusión exógena de este factor

podría estimular la producción de otros factores mitogénicos astrogliales como el bFGF, aumentando así los efectos proliferativos que presenta el VEGF por sí solo (Krum y cols., 2002). En el caso de los oligodendrocitos, se ha descrito que el VEGF promueve la migración de las células precursoras de oligodendrocitos (Hayakawa y cols., 2011). Por último, la unión del VEGF con el VEGFR-1 induce la proliferación de la microglía (Forstreuter y cols., 2002).

En cuanto a la unión con los receptores NP-1 y NP-2, ésta podría estar relacionada con la guía axonal (Neufeld y cols., 2002), mientras que la coexpresión de VEGFR-2 y las neuropilinas aumenta la quimiotaxis mediada por el VEGF (Soker y cols., 1998).

La isoforma VEGF_{165b} por su parte, cumple una función muy importante mediante la unión a los receptores tirosina kinasa (Cebe-Suárez y cols., 2006). Esta isoforma ha sido descrita como antiangiogénica (Woolard y cols., 2004), siendo su expresión dependiente de la capacidad angiogénica del tejido. Por lo tanto, la incapacidad de unión del VEGF_{165b} al receptor NP-1 contribuye a la propiedad antiangiogénica de dicho factor (Kawamura y cols., 2008). Así, se ha descrito que el VEGF_{165b} inhibe la proliferación y la migración de las células endoteliales mediado por el VEGF₁₆₅ y la vasodilatación *in vitro* (Bates y cols., 2002). Diversos modelos *in vivo* también han demostrado que dicha isoforma puede inhibir de forma específica la angiogénesis producida por el VEGF₁₆₅ (Woolard y cols., 2004; Cebe-Suárez y cols., 2006) o la proliferación y migración de las células endoteliales (Varey y cols., 2008).

1.3.2. Papel terapéutico del VEGF

El rol terapéutico del VEGF en el SNC ha sido estudiado en distintos modelos animales y además, se ha demostrado que la vía de administración y la duración del tratamiento son factores que pueden determinar el resultado de la terapia.

Mientras que la administración tópica del VEGF reduce el tamaño de la lesión en modelos animales de infarto (Hayashi y cols., 1998; Sun y cols., 2003), la administración intravenosa produce un aumento de la permeabilidad vascular (Zhang y cols., 2000). En cambio, diversos estudios han demostrado que la administración intracerebroventricular del VEGF produce efectos neuroprotectores, neurogénicos y angiogénicos en modelos animales de isquemia y traumatismos (Wick y cols., 2002; Sun y cols., 2003; Kaya y cols., 2005; Kilic y cols., 2006; Feng y cols., 2008; Thau-Zuchman y cols., 2012b). Asimismo, se ha descrito que la administración del VEGF mediante vectores adenovirales también induce neuroprotección en ratas neonatales tras una isquemia (Zheng y cols., 2010) y que la administración intranasal del VEGF induce angiogénesis en modelos de isquemia cerebral en rata (Yang y cols., 2010).

El VEGF también se ha considerado como posible diana terapéutica en enfermedades neurodegenerativas. Oosthuysen y cols. (2001) fueron los primeros en describir la relación del VEGF con la esclerosis lateral amiotrófica. Estudios posteriores han demostrado que la administración de VEGF protege a las motoneuronas y retrasa la progresión de la enfermedad (Oosthuysen y cols., 2001; Lambrechts y cols., 2003; Morrison y cols., 2003; Yasuhara y cols., 2004). En el caso de la enfermedad de Alzheimer, se ha descrito que el VEGF se acumula en las placas de β -amiloide durante la progresión de la enfermedad, hecho que conlleva a una disminución en la disponibilidad del factor y contribuye por tanto a la hipoperfusión característica de esta patología (Girouard y Iadecola, 2006; Zlokovic, 2011). Un estudio reciente ha descrito que la función angiogénica inducida por el VEGF mejora la memoria en modelo animal de ratones transgénicos APP (Wang y cols., 2011). En modelos de enfermedades neurodegenerativas como el Parkinson, se han descrito efectos neurorescatadores del VEGF sobre las neuronas dopaminérgicas tanto *in vitro* como *in vivo* (Yasuhara y cols., 2005; Tian y cols., 2007). Por último, se postula que la vascularización podría estar relacionada con la esclerosis múltiple. Tan y cols. (2000) han descrito un aumento en la permeabilidad y perfusión de los vasos de la sustancia gris, mientras que Kirk y cols. (2004) sugieren un tratamiento antiangiogénico para disminuir los signos clínicos y patológicos de la enfermedad. Además, en el modelo de encefalomiелitis autoinmune experimental (EAE) la administración intracerebral de VEGF, a pesar de que empeora la formación de las placas, reduce la severidad de la enfermedad (Proescholdt y cols., 2002), hecho que sugiere que el VEGF juega un papel doble en la esclerosis múltiple. Por lo tanto, se requiere un mayor número de estudios que analicen el papel del VEGF en las enfermedades neurodegenerativas.

1.4. Entorno Enriquecido (EE)

El estudio de los efectos producidos por cambios en el entorno se han llevado a cabo en dos direcciones opuestas: la privación y el enriquecimiento.

Numerosos trabajos inciden en los cambios producidos por un entorno enriquecido (EE) en el desarrollo del SNC, tanto en condiciones normales como en condiciones patológicas (van Praag y cols., 2000; Nithianantharajah y Hannan, 2006; Bengoetxea y cols., 2008).

Los primeros estudios realizados por Donald Hebb (1947) describieron el entorno enriquecido como un paradigma que tiene influencia sobre la corteza visual por el aumento de la estimulación visual debida al entorno de cría. En sus resultados encontró un incremento en la capacidad de aprendizaje de animales criados en dicho entorno, que consistía en llevar las

1. Introducción

ratas a casa y criarlas como mascotas (Hebb, 1947). Posteriormente, en la década de los 60 sus discípulos Kresh, Bennett, Rosenzweig y Diamond estandarizaron el concepto de entorno enriquecido definiéndolo como aquel en el que se combinan objetos inanimados y la estimulación social (Rosenzweig y cols., 1978).

El paradigma experimental del entorno enriquecido se define como aquel que está enriquecido respecto a las condiciones estándar de estabulación. Generalmente, un entorno estándar de cría se considera aquel que proporciona un lecho, comida y agua *ad libitum*, y cría en grupos de animales con separación de sexos. En algunos casos la cría de los animales en solitario (aislamiento) se ha llegado a considerar como un entorno estándar, por lo que la elección del entorno es importante para poder interpretar los resultados obtenidos. El espacio de alojamiento requerido por cada animal es por tanto una variable muy importante que determina el tamaño requerido para la jaula de estabulación. En los últimos años, se han modificado los valores de las dimensiones recomendadas por normativas anteriores del Consejo Europeo. Así, en el caso de la rata, se recomiendan 200 cm² de superficie por animal (Manteca y Zúñiga, 2008).

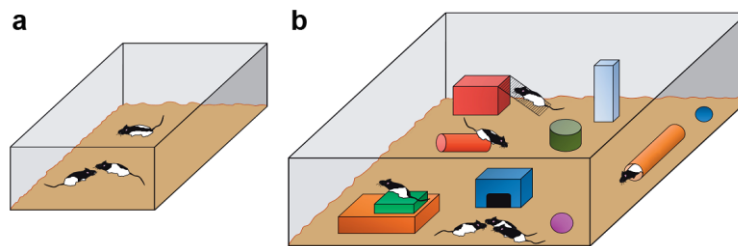


Figura 5. Condiciones de cría de diferentes grupos experimentales. Condiciones estándar de laboratorio (a) y entorno enriquecido (sin rueda de ejercicio) (b). Tomado de Ortuzar y cols., 2011.

En el caso del entorno enriquecido, las características del entorno pueden variar mucho entre laboratorios, no habiendo llegado todavía a una estandarización de la condición de estabulación. En general, se trata de un entorno de mayores dimensiones que el estándar que cuenta con una variedad de objetos (túneles, juguetes, refugios, plataformas, cambio del lugar de la comida, material para hacer el nido) que se cambian cada cierto periodo de tiempo. Los objetos suelen variar en composición, forma, tamaño, textura y color. Además, es un entorno que permite una mayor interacción social, ya que el tamaño de la jaula permite criar más individuos que en las jaulas estándar, siendo uno de los factores más relevantes y menos estudiados del entorno enriquecido. Asimismo, tanto la complejidad propia del entorno como la novedad que constituyen los cambios periódicos del entorno para el animal, se consideran

factores importantes para la estimulación. Una mayor complejidad y novedad del entorno conlleva un mayor nivel de estimulación y la actividad física asociada a ésta (Fig. 5).

El ejercicio físico (que se fomenta con acceso a una rueda de ejercicios) como elemento propio del entorno enriquecido (van Praag y cols., 2000; Will y cols., 2004) es otra variable importante de este paradigma. En los estudios de las últimas décadas se han expuesto diversas opiniones sobre la conveniencia o no de incluir este factor. El aumento del ejercicio voluntario por sí solo, conlleva cambios difusos en todo el cerebro, de tal manera que los efectos que tiene en sí el aumento de los estímulos visuales pueden verse modificados por la inclusión de un nuevo factor como es el ejercicio físico. Pese a que varios estudios han mostrado la importancia del ejercicio físico en el enriquecimiento ambiental (Argandoña y cols., 2009; Kobiló y cols., 2011), algunos autores han desestimado el papel del ejercicio físico en el paradigma de enriquecimiento ambiental en modelos cognitivos (Pietropaolo y cols., 2006).

Otro parámetro importante es la edad en la que se aplica el EE y la duración del mismo. Si el EE se aplica antes de alcanzar la edad adulta (8 semanas en el caso de la rata), podría tener efectos adicionales comparados con aquellos que se obtienen en adultos. Además, en los estudios iniciales se desconocía la duración necesaria del enriquecimiento para provocar cambios en el cerebro. Diamond (2001) describió cambios corticales a partir del 4º día de exposición, con un pico en 30 días.

El enriquecimiento permite por tanto, un aumento de la estimulación sensorial, cognitiva y motora (Fig. 6). Promueve y estimula la activación, la señalización y la plasticidad neuronal en distintas regiones cerebrales. Un aumento de la estimulación sensorial que incluye un aumento de los estímulos somatosensoriales y visuales, activa la corteza somatosensorial y visual. En cambio, un aumento de la estimulación cognitiva activa el hipocampo y otras áreas corticales, y por último, el aumento de la actividad motora estimula áreas en todo el cerebro (Nithianantharajah y Hannan, 2006; 2009).

Así, el entorno enriquecido produce desde efectos celulares y moleculares, hasta modificaciones en el comportamiento. Los primeros estudios realizados mostraron que modifica el peso y el grosor cortical (Bennett y cols., 1969; Diamond y cols., 1976) y estudios posteriores han demostrado que aumenta el tamaño del soma y del núcleo de las neuronas (Diamond, 2001), la ramificación y la longitud dendrítica (Holloway, 1966; Greenough y cols., 1973), el número de espinas dendríticas y el tamaño de las sinapsis en algunas poblaciones neuronales (Rosenzweig, 1969; Sirevaag y Greenough, 1987; Faherty y cols., 2003; Leggio y cols., 2005). Además, el enriquecimiento aumenta la neurogénesis del hipocampo, acción en la que se cree está involucrado el VEGF (During y Cao, 2006). Asimismo, se han descrito efectos

1. Introducción

sobre las células gliales, produciendo un aumento de la densidad oligodendroglial y astrogliar, un descenso de la microglía (Szeligo y Leblond, 1977), y un aumento del diámetro capilar (Diamond, 2001).

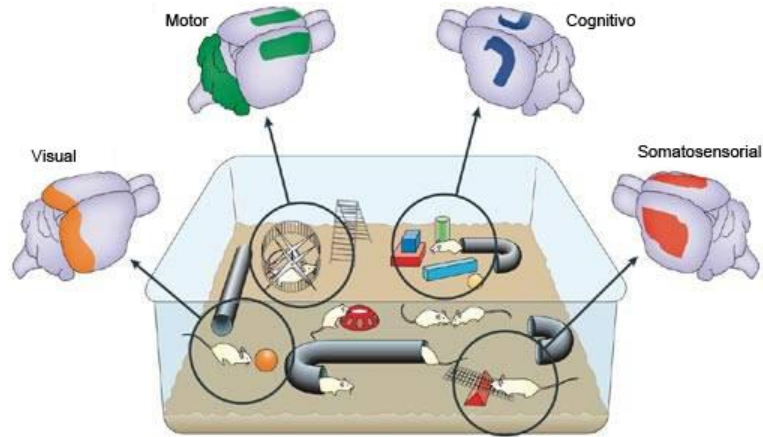


Figura 6. Representación esquemática de los efectos que produce el entorno enriquecido en diferentes áreas cerebrales (la corteza visual, motora, somatosensorial y cognitiva) debido a la estimulación sensorial, cognitiva y motora. Tomado y adaptado de Nithianantharajah y Hannan, 2006.

Además del incremento de algunos elementos tisulares, estudios posteriores han relatado la aceleración del desarrollo del sistema visual como efecto del entorno enriquecido. Se ha visto que la cría de los animales en un entorno enriquecido provoca la apertura más temprana de los ojos y también tiene efectos electrofisiológicos como el desarrollo precoz de la agudeza visual (Cancedda y cols., 2004).

Muchos de estos cambios concuerdan con cambios que induce el enriquecimiento ambiental en la expresión de genes involucrados en la función sináptica y en la plasticidad celular. El enriquecimiento puede aumentar los niveles de neurotrofinas como el BDNF (Factor Neurotrófico derivado del cerebro), el NGF (Factor de Crecimiento Nervioso) y el VEGF, que juegan un papel importante en la señalización neuronal (Ickes y cols., 2000; Pham y cols., 2002). Por otro lado, también aumenta la expresión de proteínas sinápticas e induce cambios en la expresión de las subunidades que forman los receptores del tipo NMDA y AMPA del glutamato (Naka y cols., 2005).

1.4.1. Papel terapéutico del entorno enriquecido

Los efectos del entorno enriquecido descritos hasta el momento han hecho que en las últimas décadas se hayan llevado a cabo diversos estudios empleando el EE como herramienta terapéutica tras distintos tipos de lesión cerebral.

Modelos animales transgénicos de la enfermedad de Huntington (van Dellen y cols., 2000; Schilling y cols., 2004; Spires y cols., 2004; Lazic y cols., 2006) y Alzheimer (Feng y cols., 2001; Jankowsky y cols., 2003; Wen y cols., 2004; Lazarov y cols., 2005) han abierto el camino para estudiar la interacción gen-entorno en enfermedades neurodegenerativas. También se han estudiado los efectos del enriquecimiento en la enfermedad de Parkinson (Bezard y cols., 2003; Jadavji y cols., 2006), la epilepsia (Young y cols., 1999; Rutten y cols., 2002) o el síndrome down (Dierssen y cols., 2003; Martínez-Cue y cols., 2005). En todos ellos se han descrito efectos beneficiosos del entorno enriquecido aplicando distintos protocolos de dicho paradigma en cuanto a la duración del mismo y la edad de los animales.

Asimismo, en modelos experimentales de ictus (Ohlsson y Johansson, 1995; Dahlqvist y cols., 2004; Komitova y cols., 2005; Hicks y cols., 2009) o traumatismos (TBI) (Kolb y Gibb, 1991; Passineau y cols., 2001; Wagner y cols., 2005; Loukavenko y cols., 2007) el enriquecimiento ambiental induce una mejora las funciones neurológicas.

1.5. Aprendizaje y Memoria

Tanto el entorno enriquecido como el VEGF son factores que en los últimos años han sido relacionados con el aprendizaje y la memoria dependiente de hipocampo (Kempermann y cols., 1997; Cao y cols., 2004; Will y cols., 2004).

Desde que en 1953 a H.M se le realizará una extirpación bilateral del lóbulo temporal como tratamiento de su epilepsia, y ésta le provocara una amnesia anterógrada (Scoville y Milner, 1957), la relevancia de la formación hipocampal en la memoria espacial ha sido demostrada mediante diferentes estudios. En humanos, estudios de imagen funcional y estructural del cerebro con lesiones en la formación hipocampal, han demostrado que las estructuras que lo forman están relacionadas con la orientación espacial y la navegación (Maguire y cols., 1996; Kessels y cols., 2001; Spiers y cols., 2001; Astur y cols., 2002). Asimismo, estudios realizados en roedores han mostrado que las lesiones en el hipocampo producen déficits en la memoria espacial (Moser y cols., 1993; Pothuizen y cols., 2004; Kim y Frank, 2009), mientras que las técnicas electrofisiológicas han confirmado que el hipocampo

1. Introducción

juega un rol importante en el procesamiento de la información espacial en monos (Colombo y cols., 1998).

La capacidad plástica del hipocampo ha sido propuesta como uno de los factores más importantes relacionado con la memoria. Así, el mecanismo fisiológico que subyace al proceso de aprendizaje y memoria se conoce como potenciación a largo plazo (LTP). Donald Hebb (1949) sugirió que la activación repetida de una neurona por parte de otra a través de la comunicación sináptica podría producir un aumento o la facilitación de la comunicación entre ambas células. Pero no fue hasta 1973 cuando Bliss y Lømo observaron cambios sinápticos duraderos (Bliss y Lømo, 1973; Bliss y Collingridge, 1993). El estudio de la potenciación a largo plazo se concibió entonces como un aumento duradero en la comunicación entre dos neuronas inmediatamente posterior a la aplicación de un tren de estimulación eléctrica de alta frecuencia (Teyler y DiScenna, 1987). Por lo tanto, la LTP estimula la transmisión sináptica, mejorando así la capacidad de comunicación entre dos neuronas. A pesar de que el mecanismo molecular no se conoce con exactitud, se ha demostrado un aumento de la sensibilidad de la neurona postsináptica al neurotransmisor debido al incremento tanto de la actividad de los receptores ya existentes como del número de receptores de la célula postsináptica (Malenka y Bear, 2004).

1.5.1. Anatomía del hipocampo

La formación hipocampal (HF) de la rata es una estructura en forma de C que se sitúa en la parte caudal del cerebro. Está formada por 3 subregiones: el giro dentado (DG), el cuerno de Amón (CA) del hipocampo (que a su vez está formado por CA1, CA2 y CA3) y el subículo. La corteza de la formación hipocampal se divide en 3 capas, mostrando una organización típica del arquicórtex. La capa más profunda se denomina hilus en el giro dentado y capa polimórfica en las regiones CA del hipocampo. La capa celular está formada por la mayoría de las células e interneuronas y es conocida como la capa granular o la capa piramidal en el DG y CA respectivamente. Por último, la capa más superficial se conoce como la capa molecular (van Strien y cols., 2009).

La región parahipocampal (PHR) se encuentra adyacente a la formación hipocampal. Está dividido en 5 subregiones: el presubículo (PrS), el parasubículo (PaS), la corteza entorrinal (EC) que consiste en el área medial (MEA) y lateral (LEA), la corteza perirrinal (PER) y la corteza postrrinal (POR). La región parahipocampal muestra una organización más compleja que la HF y está formada por 6 capas: la capa I o capa plexiforme externa, la capa II o capa granular externa, la capa III o capa piramidal externa, la capa IV o capa granular interna, la capa V o capa piramidal interna, y la capa VI o capa multiforme. Por lo tanto, entre la

formación hipocampal y la región parahipocampal se da la transición de arquicórtex a neocórtex.

La visión estándar del circuito PHR-HF describe que las proyecciones neocorticales alcanzan la región parahipocampal, y que ésta a su vez constituye la mayor vía de entrada a la formación hipocampal (Fig. 7). En la formación parahipocampal se dividen dos vías paralelas de proyecciones: por un lado, la corteza perirrinal (PER) proyecta a la corteza lateral entorrinal (LEA), y por otro lado, la corteza postrinal (POR) proyecta a la corteza entorrinal medial (MEA). Asimismo, la corteza entorrinal intercambia dichas conexiones de forma recíproca tanto con la corteza perirrinal como con la corteza postrinal. Además, la corteza entorrinal recibe señales del presubículo y proyecta a todas las subregiones de la formación hipocampal. La capa II proyecta al DG y al CA3, mientras que la capa III proyecta al CA1 y al subículo (Fig. 7). Por lo tanto, se considera que el giro dentado controla el flujo de información que alcanza el hipocampo ya que recibe proyecciones del neocórtex para integrarlos después en la subregión CA3 del hipocampo.

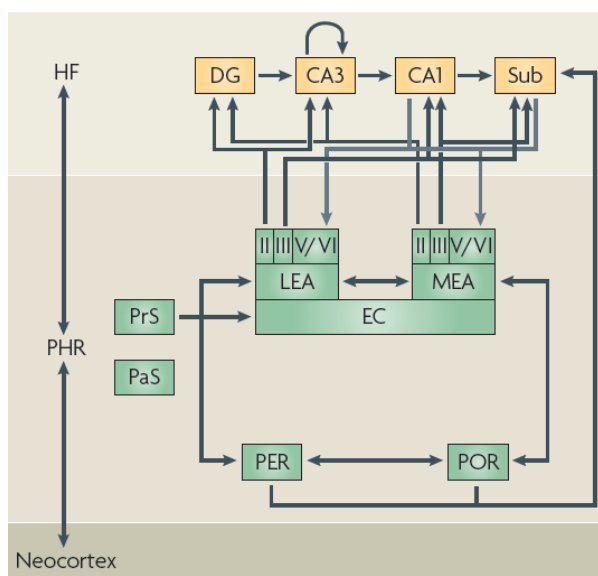


Figura 7. Esquema de las conexiones entre la formación hipocampal (HF) y la región parahipocampal (PHR). La corteza perirrinal (PER) proyecta a la corteza entorrinal lateral (LEA), y la corteza postrinal (POR) a la corteza entorrinal medial (MEA). Además, la corteza entorrinal (EC) recibe proyecciones del presubículo (PrS). Desde la EC salen conexiones a todas las subregiones de la formación hipocampal: el giro dentado (DG), CA1, CA3 y el subículo (Sub). Tomado de van Strien y cols., 2009.

Una vez en la formación hipocampal, se han descrito circuitos que conectan todas las subregiones de la misma de forma secuencial: trisinápticos (corteza entorrinal-DG-CA3-CA1), bisinápticos (corteza entorrinal-CA3-CA1) y monosinápticos (corteza entorrinal-CA1) (Xavier y Costa, 2009). La salida de la formación hipocampal se produce en el CA1 y en el subículo en dirección a la región parahipocampal, más concretamente a las capas profundas de la corteza entorrinal (Fig. 7).

Vascularización del hipocampo

En el hipocampo, las neuronas están rigurosamente organizadas en capas y reciben el aporte de oxígeno necesario mediante la red vascular que las irriga (Lindhorst y cols., 2012).

La vascularización del hipocampo se divide en vasos superficiales (leptomeningeos) y en vasos intrahipocampales (profundos). Tres arterias principales vascularizan el hipocampo: la arteria anterior, medial y posterior del hipocampo. La arteria anterior y la arteria medial provienen de la arteria cerebral posterior, mientras que la arteria posterior del hipocampo proviene de una rama de la arteria cerebral posterior. Asimismo, las arterias superficiales del hipocampo se dividen para formar las arterias intrahipocampales (arterias grandes ventrales, arterias grandes dorsales, arterias pequeñas ventrales y arterias pequeñas dorsales). Estas arterias intrahipocampales, como su propio nombre indica, irrigan tanto el cuerno de Amón (CA) como el giro dentado (DG) (Duvernoy, 2005).

En el hipocampo, al igual que las neuronas, la red vascular también muestra una distribución por capas, siendo la capa molecular la que mayor densidad vascular presenta (Duvernoy, 2005). Además, se ha demostrado que la red vascular del hipocampo de la rata no es homogénea a lo largo del eje dorsoventral. En general, el hipocampo ventral muestra una mayor densidad vascular que el hipocampo dorsal, excepto en el caso del giro dentado donde no se encuentran diferencias (Grivas y cols., 2003).

Si bien en general la densidad neuronal está relacionada con la red vascular de esa zona, en el caso del hipocampo ocurre lo contrario. Mientras que las capas granulares, tanto del CA como del giro dentado, son las capas con mayor densidad neuronal, son las capas moleculares, que apenas muestran neuronas, las que mayor densidad vascular presentan. Esto sustenta la hipótesis de que la densidad vascular se corresponde más con la densidad de sinapsis que con la densidad de somas neuronales (Duvernoy y cols., 1981).

1.5.2. Sistema visual y memoria visuoespacial

A pesar de que las conexiones anatómicas entre el sistema visual y la formación hipocampal han sido menos estudiadas, la memoria espacial y la navegación requieren estímulos sensoriales procedentes del sistema visual y vestibular. La corteza visual es un componente necesario para la formación de la memoria espacial y proporciona una vía crucial de señales de entrada al hipocampo (Tsanov y Manahan-Vaughan, 2008).

Además de las conexiones entre el hipocampo y la región parahipocampal, la corteza perirrinal recibe información de otras áreas corticales, entre las que se encuentra la corteza visual (Burwell y Amaral, 1998). La corteza perirrinal a su vez, proyecta a la corteza visual (Miller y Vogt, 1984), mostrando mayor conectividad con las áreas de asociación visual que con la corteza visual primaria (Burwell y Amaral, 1998). A pesar de ello, la inyección con un trazador anterógrado en la corteza visual primaria mostraba un suave marcado en la corteza perirrinal (McDonald y Mascagni, 1996). Por otro lado, cabe destacar que la corteza postrinal recibe información importante procedente de la corteza visual (Burwell y Amaral, 1998), mostrando mayor respuesta electrofisiológica a la estimulación de la corteza visual que la corteza perirrinal (Naber y cols., 2000) (Fig. 8).

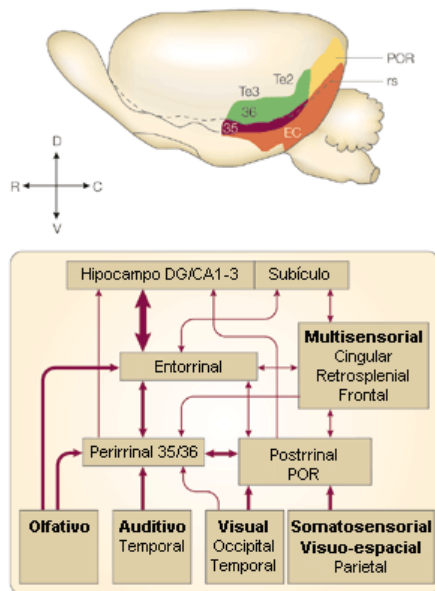


Figura 8. Esquema de la corteza perirrinal, postrinal, entorrinal y parahipocampal del cerebro de ratona. Las conexiones muestran las vías de información sensorial que llegan a las regiones corticales procedentes del hipocampo y viceversa. El grosor de las conexiones indica la densidad de la conexión. Tomado y adaptado de Brown y Aggleton, 2001.

Para establecer la interacción entre el sistema visual y el hipocampo, se han utilizado distintas metodologías. Experimentos llevados a cabo con trazadores en ratas y aves demostraron la transmisión de información visual desde la retina al núcleo anterior del tálamo, que a su vez proyecta a la región CA1 del hipocampo (Repérant y cols., 1987; Trottier y cols., 1995).

En roedores y primates, es la corteza entorrinal lateral la que recibe la mayor parte de estímulos visuoespaciales (Burwell, 2000; Mohedano-Moriano y cols., 2007). En el caso de una lesión de la corteza visual, se han descrito alteraciones en los registros eléctricos del hipocampo (Paz-Villagràn y cols., 2002). Además, alteraciones en el ciclo luz/oscuridad de las ratas provocan cambios en la LTP del hipocampo (Talaie y cols., 2010) y la privación visual

1. Introducción

en ratones produce cambios en la expresión de proteínas como la GFAP en diferentes áreas del cerebro, entre ellas el hipocampo (Corvetti y cols., 2006).

A pesar de todos los estudios llevados a cabo hasta el momento, no se conoce aún con exactitud cómo afecta la plasticidad sináptica de la corteza visual al procesamiento de la información visuoespacial en el hipocampo.

La corteza retrosplenial (RSC) de la rata, también juega un papel importante en la conexión de la información visual y la memoria espacial (Fig. 9). En la última década se ha demostrado la contribución de este área cortical a la memoria y navegación mediante la descripción de conexiones recíprocas con la formación hipocampal, la región parahipocampal y el núcleo talámico (van Groen y Wyss, 1992; 2003). Además, la región disgranular (R_{dg}) de la corteza retrosplenial también muestra conexiones recíprocas con las áreas visuales 18b y 17 (Vogt y Miller, 1983; van Groen y Wyss, 2003).

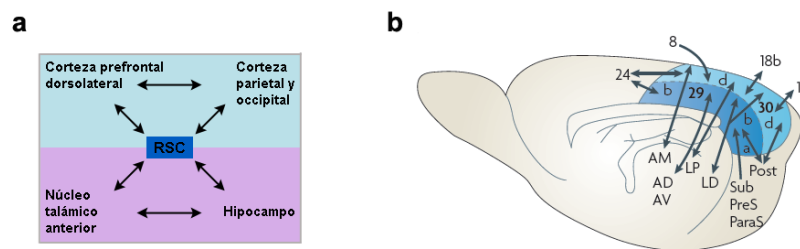


Figura 9. Localización de las principales conexiones de la corteza retrosplenial (RSC). (a) Esquema de la participación de la corteza retrosplenial en la integración de la información en la corteza somatosensorial y en la corteza prefrontal (parte superior esquema) con áreas subcorticales relacionados con la memoria (parte inferior esquema). (b) La localización de la corteza retrosplenial en la rata y las principales conexiones de la misma. “d” corresponde a la corteza disgranular (area 30); “a” y “b” hacen referencia a las divisiones de la corteza granular R_{ga} y R_{gb} respectivamente. AD, núcleo anterior dorsal del tálamo; AM, núcleo anterior medial del tálamo; AV, núcleo anterior ventral del tálamo; HF, formación hipocampal; LD, núcleo laterodorsal talámico; LP, núcleo lateroposterior talámico; ParaS, parasubículo; Post, postsubículo; PreS, presubículo; Sub, subículo. Tomado y adaptado de Vann y cols., 2009.

Estudios llevados a cabo para determinar la relevancia funcional de dichas conexiones demostraron que todas las estructuras eran necesarias para el correcto funcionamiento de la memoria espacial (Sutherland y cols, 1993; Warburton y cols., 2001). Asimismo, se ha demostrado que las lesiones en la corteza retrosplenial de la rata inducen un empeoramiento de la memoria espacial (Aggleton y Vann, 2004; Harker y Whishaw, 2004), a pesar de que la repercusión en la memoria es menor que en el caso de lesiones de hipocampo o del núcleo talámico anterior (Vann y cols., 2009).

1.5.3. VEGF, entorno enriquecido y memoria visuoespacial

La neurogénesis se ha descrito en dos regiones del cerebro adulto: la zona subventricular (SVZ) del ventrículo lateral y en la zona subgranular (SGZ) del giro dentado en el hipocampo. Las nuevas neuronas granulares que nacen en el SGZ se diferencian y se integran en el circuito neural hipocampal existente pudiendo afectar a los procesos de aprendizaje y memoria dependientes de hipocampo (Kempermann y Gage, 1999; van Praag y cols., 2002; Kee y cols., 2007).

La neurogénesis se inicia con la diferenciación de las células neurales progenitoras en células granulares del giro dentado en el SGZ. Es un proceso largo de maduración morfológica y fisiológica de alrededor de 4-6 semanas de duración (Zhao y cols., 2006).

La neurogénesis en el giro dentado, requiere un entorno extracelular que está estrechamente relacionado con la vascularización ya que éste mantiene el aporte de oxígeno de las células granulares del giro dentado (Palmer y cols., 2000; Greenberg y Jin, 2005). Se ha descrito que las células endoteliales estimulan las células madre neuronales para generar nuevas neuronas (Shen y cols., 2004). Por lo tanto, los cambios producidos en la red vascular del DG pueden ser un factor que afecte al ratio de proliferación de las células madre neuronales adultas (Lindhorst y cols., 2012). Así, mientras que la inhibición de la neurogénesis no impide el proceso normal de aprendizaje y memoria, la inhibición de la angiogénesis lo impide (Kerr y cols., 2010).

Además de la vascularización, en la regulación de la neurogénesis toman parte otros factores. El aprendizaje dependiente de hipocampo es uno de los factores más importantes en la regulación de la neurogénesis hipocampal asociada al comportamiento del animal (Gould y cols., 1999). El laberinto acuático de Morris o Morris Water Maze (MWM), regula de forma muy precisa la neurogénesis: promueve la supervivencia de las células granulares del giro dentado nacidas 7 días antes del inicio de la prueba, pero induce la apoptosis de las que nacieron 3 días antes (Dupret y cols., 2007). Las células nacidas 7 días antes forman sinapsis GABAérgicas y pueden ser reclutadas para la formación de la memoria. En cambio, el hecho de que en la última fase de la prueba los animales muestren muy poca mejora del aprendizaje, está asociado con el aumento de la apoptosis en el giro dentado de aquellas células que nacieron en la fase inicial de la prueba (Dupret y cols., 2007). Por lo tanto, el proceso de aprendizaje añade o elimina de forma selectiva las nuevas neuronas en relación a su madurez y relevancia funcional.

La cría en un entorno enriquecido también aumenta la neurogénesis en el hipocampo, incrementando la supervivencia de las células granulares del giro dentado (Kempermann y cols., 1997). Se ha sugerido que el EE incrementa la supervivencia de las células granulares del giro dentado de menos de 3 semanas, pero no así de las que son anteriores (Tashiro y cols., 2007). Además, diversos estudios han demostrado que el entorno enriquecido mejora el aprendizaje y la memoria en la prueba del laberinto de Morris (Kempermann y cols., 1997; Bruel-Jungerman y cols., 2005), disminuye el deterioro de la memoria debido al envejecimiento (Bennett y cols., 2006), la ansiedad, y aumenta la actividad exploratoria (Benaroya-Milshtein y cols., 2004). Por otro lado, Cao y cols. (2004) demostraron que la cría en un entorno enriquecido y la realización del test MWM induce un aumento de la expresión endógena de VEGF.

En los últimos años el VEGF ha sido descrito como uno de los factores involucrados en el aprendizaje dependiente de hipocampo. El VEGF es un factor que controla tanto el crecimiento microvascular como la migración neuronal (Shen y cols., 2008). Diversos estudios han descrito la proliferación de las células madre neurales mediada por el VEGF (Studer y cols., 2000; Shingo y cols., 2001; Maurer y cols., 2003) y una mayor neurogénesis en la SGZ del hipocampo relacionada con una mejora del rendimiento en los test que exploran la cognición (Jin y cols., 2002; Cao y cols., 2004). Una mayor expresión de dicho factor tanto en el hipocampo (Doring y Cao, 2006) como en el cerebro (Plaschke y cols., 2008) ha sido relacionado con una mejora en la cognición en roedores, mientras que el bloqueo del VEGFR-2 provoca un empeoramiento de la memoria espacial (Patì y cols., 2009). Asimismo, la administración cerebroventricular del VEGF mejora la recuperación de déficits cognitivos y motores (Wang y cols., 2006). No obstante, un estudio reciente ha demostrado mediante el uso de ratones transgénicos en los que el VEGF es sobreexpresado o bloqueado de forma reversible, que este factor promueve la memoria dependiente de hipocampo reforzando la sinapsis, siendo ésta independiente de sus efectos sobre la neurogénesis y la angiogénesis (Licht y cols., 2011). Mientras que la sobreexpresión de VEGF produce un aumento de la vascularización y de la población neuronal del hipocampo acompañado de una mejora en la memoria, el bloqueo de la expresión de VEGF empeora la memoria sin afectar a la vascularización y a la neurogénesis en el hipocampo. Por tanto, se postula que la neurogénesis no es suficiente por sí sola para producir una mejora en la memoria y que principalmente pudiera ser el resultado de un incremento de la plasticidad de las neuronas maduras inducida por el VEGF, y no tanto por la contribución de las neuronas incorporadas al circuito hipocampal tras la neurogénesis (Licht y cols., 2011). Estos resultados por tanto, sugieren una clara implicación del VEGF en la memoria y en la plasticidad del hipocampo (Plaschke y cols., 2008).

2. HIPÓTESIS

El periodo crítico es la ventana temporal de máxima reorganización cortical que engloba una cascada de eventos funcionales y anatómicos, dando lugar a la consolidación de las conexiones sinápticas.

Tanto los factores de crecimiento como la experiencia juegan un papel importante en el desarrollo postnatal. El factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) actúa tanto sobre el desarrollo vascular como sobre el desarrollo neural. Es el principal factor implicado en la angiogénesis durante el desarrollo, y presenta efectos neuroprotectores, neurogénicos y neurotróficos. También hay evidencias de su papel en el proceso de aprendizaje.

La cría en entorno enriquecido induce cambios relevantes en el desarrollo del SNC. Aumenta la expresión de genes involucrados en la función sináptica y en la neuroprotección, y aumenta los niveles de neurotrofinas, entre otras el VEGF. Además, el enriquecimiento ambiental mejora el aprendizaje y la memoria.

Por lo tanto, hipotetizamos que la aplicación de estas estrategias durante el periodo crítico aumentará la densidad de neuronas y la red microvascular de la corteza visual y otras regiones anatómicamente conectadas con ésta e implicadas en el aprendizaje y la memoria visuoespacial.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo general

Estudiar los efectos de la administración intracortical de VEGF y el enriquecimiento ambiental sobre la densidad microvascular y neuronal en la corteza visual primaria y en el Giro Dentado durante el desarrollo postnatal de ratas Long Evans, y poner de manifiesto su relación con el aprendizaje y la memoria visuoespacial.

3.2. Objetivos operativos

1. Analizar los efectos histopatológicos de la implantación intracortical de la bomba osmótica.
2. Describir la coexpresión del VEGF con distintos tipos celulares en la corteza visual primaria y en el giro dentado.
3. Cuantificar los efectos de la administración intracortical del VEGF durante 1 semana sobre la densidad vascular y neuronal de la corteza visual primaria en condiciones estándar y en condiciones de entorno enriquecido.
4. Cuantificar los efectos de la administración intracortical del VEGF durante 4 semanas sobre la red microvascular y en la densidad neuronal de la corteza visual primaria en condiciones estándar y en condiciones de entorno enriquecido.
5. Analizar los efectos de la administración intracortical del VEGF durante 4 semanas sobre la densidad vascular y neuronal del giro dentado en condiciones estándar y en condiciones de entorno enriquecido.
6. Estudiar los efectos de la administración intracortical del VEGF en el aprendizaje y memoria en condiciones estándar y en condiciones de entorno enriquecido.
7. Cuantificar los cambios en la red microvascular y en la población neuronal de la corteza visual primaria debidos a la cría en entorno enriquecido durante 1 semana.
8. Cuantificar la densidad vascular y neuronal de la corteza visual primaria y del giro dentado en ratas criadas en entorno enriquecido durante 4 semanas.
9. Estudiar los efectos de la cría en entorno enriquecido en el aprendizaje y memoria.

4. MATERIAL Y MÉTODOS

4.1. Animales y condiciones de cría

Se utilizaron 12 ratas Long Evans (Harlan, Barcelona) por cada una de las condiciones experimentales y tratamientos estudiados, en un total de 144 ratas.

4.1.1. Edades estudiadas

Se han estudiado dos edades: P25 y P46. La implantación de la bomba osmótica se llevó a cabo el día 18 postnatal (P18), inmediatamente antes del comienzo del periodo crítico (P21), y tras la implantación de la bomba osmótica, la mitad de los animales fueron sacrificados el día 25 postnatal (P25) y la otra mitad el día 46 postnatal (P46).

4.1.2. Condiciones de cría

- **Condiciones estándar (SC):** las ratas se criaron en condiciones estándar de estabulación, es decir, en jaulas de tamaño 500 mm x 280 mm x 140 mm con ciclos de 12 horas de luz/oscuridad con 3-4 animales por jaula.
- **Entorno enriquecido (EE):** las ratas se criaron en jaulas de un tamaño mayor que las estándar (720 mm x 550 mm x 300 mm) en ciclos de 12 horas de luz/oscuridad y con 8-10 animales por jaula. Estas jaulas están dotadas de objetos de diferentes tamaños y colores (túneles, refugios, juguetes, plataformas) que se cambian cada dos días, para proporcionar a los animales nuevos estímulos visuales.

Los animales dispusieron de agua y comida *ad libitum* durante todo el periodo de experimentación, y el cambio de lecho y la limpieza de jaulas se hizo dos veces por semana en todos los grupos utilizados, coincidiendo con el cambio de objetos.

4.2. Grupos experimentales

Para llevar a cabo el estudio, los animales fueron divididos en diferentes grupos experimentales (Fig. 11):

1. **Control** (sin operar)
2. Infusión de **PBS** (vehículo)
3. Infusión de **VEGF**

La administración de VEGF se llevó a cabo durante una semana, entre P18 y P25, o durante cuatro semanas, entre P18 y P46. El péptido de VEGF (Ref: sc-4571, Santa Cruz Biotechnology, EEUU) se administró a 0.5 µl/h y a 0.11 µl/h respectivamente. En el caso de la

4. Material y Métodos

infusión de 1 semana, se administraron 2.5 ng del péptido VEGF (25 ng/ml), y en el caso de la infusión de 4 semanas, se administraron 10 ng (100 ng/ml), 2.5 ng por semana.

En cada uno de los grupos referidos, se estudiaron diferentes condiciones de estabulación (Fig. 10):

- **SC-SC:** Animales criados en condiciones estándar (SC) antes y después de la implantación de la bomba osmótica.
- **SC-EE:** Animales criados en condiciones estándar (SC) hasta P18 y en un entorno enriquecido (EE) tras la implantación de la bomba osmótica, hasta P25 o P46, dependiendo del grupo experimental.

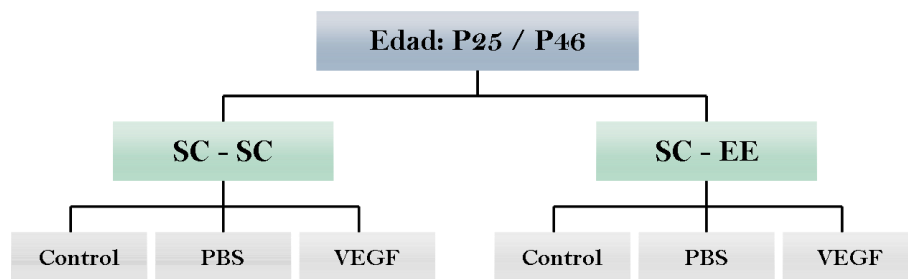


Figura 10. Representación esquemática de los grupos experimentales objeto de estudio. Edades estudiadas: P25 y P46. Los animales han sido criados en dos condiciones de estabulación: condiciones estándar (SC-SC) y entorno enriquecido a partir de P18 (SC-EE). En cada una de las condiciones, los grupos experimentales estudiados han sido: grupo control (sin operar), grupo con infusión de PBS (vehículo) y el grupo con infusión de VEGF.

4.3. Preparación de las bombas osmóticas

Las bombas osmóticas Alzet, diseñadas para su implantación en animales de laboratorio, permiten la infusión continua y prolongada de sustancias sin la necesidad de mantener una conexión externa evitando el manejo repetido del animal.

Las bombas osmóticas constan de tres partes: el reservorio o bomba propiamente dicha, el moderador de flujo y el infusor (Fig. 11). Una vez determinado el lugar de infusión, se calcula la profundidad a la que se va a llevar a cabo la administración. La profundidad de la canula del infusor se regula mediante espaciadores. Posteriormente, se une el tubo catéter al infusor por un lado, y al moderador de flujo por otro, es decir, el tubo va a permitir la unión del infusor con el moderador de flujo de la bomba osmótica. El reservorio de la bomba osmótica se carga con la ayuda de una jeringuilla. Para finalizar, se une el kit de infusión con la bomba osmótica y ésta se embebe con solución salina a 37°C entre 24 o 48 horas antes de su uso, dependiendo del

modelo. El volumen del reservorio y la ratio de administración vienen determinadas por el modelo utilizado.

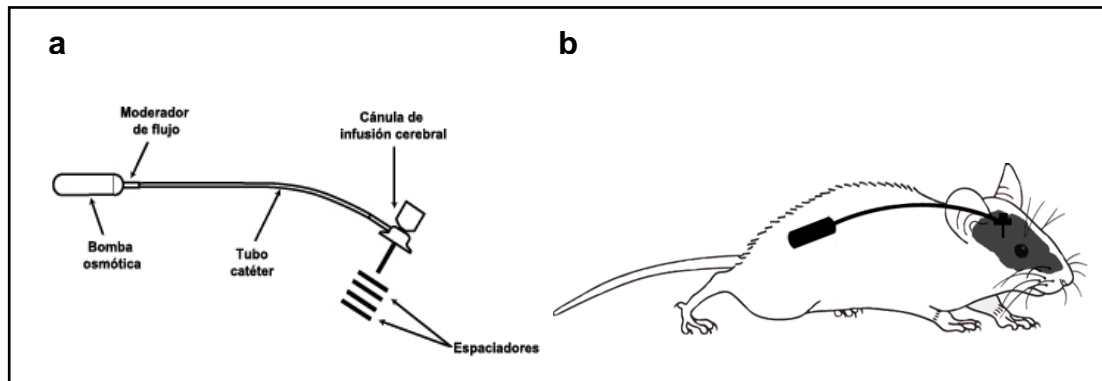


Figura 11. Representación esquemática de los componentes de la bomba osmótica (a) y de la implantación intracraneal de la misma en rata (b).

En este estudio se ha utilizado un único modelo de kit de infusión (Mod. Alzet Brain Infusion Kit III, Alzet) y dos modelos de bomba osmótica, ambos con un volumen de 100 μ l (Mod. 1007D y Mod. 1004, Alzet, Cupertino, CA), para llevar a cabo la administración de una semana y la administración de 4 semanas respectivamente.

4.4. Procedimiento quirúrgico

Para la implantación de la bomba osmótica, las ratas fueron anestesiadas intraperitonealmente con avertina (tribromoetanol) (Ref: T-48402, Sigma-Aldrich, España; Ref: A-1685, Sigma-Aldrich), 1 ml/100 g. Tras anestesiarse a los animales, se realizó una incisión sagital medial en la piel de la cabeza. En primer lugar se retrae la piel y después el periostio. El siguiente paso es abrir una cavidad subcutánea en la espalda del animal, donde se coloca la bomba osmótica. La cánula de infusión se implantó a 1 mm lateral a la sutura sagital y 1 mm anterior a lambda. Este punto es inmediatamente anterior a la corteza visual primaria del hemisferio izquierdo, y la cánula alcanza las capas corticales medias (Fig. 12). El kit de infusión se fijó con cianoacrilato en el cráneo y se cerró la piel con puntos de seda. El procedimiento quirúrgico se prolonga aproximadamente durante 25 minutos.

Las bombas osmóticas se mantuvieron a lo largo de una semana o cuatro semanas, hasta el P25 o P46 respectivamente.

4. Material y Métodos

Todos los experimentos realizados con animales se llevaron a cabo de acuerdo con la Directiva 2010/63/EU del Consejo de la Unión Europea y con la normativa del CEBA (Comité de Ética para el Bienestar Animal) de la UPV/EHU.

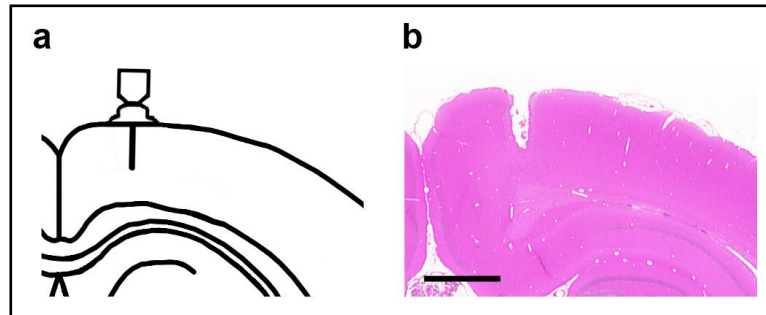


Figura 12. (a) Representación esquemática de la implantación de la bomba osmótica, rostral a la corteza visual. (b) Tinción de Hematoxilina-Eosina en el lugar de implantación. Barra de escala = 100 µm.

4.5. Obtención y procesamiento del material

De un total de 144 ratas, 84 (7 por cada edad y condición experimental) fueron anestesiadas intraperitonealmente con hidrato de cloral (Ref: 141975, Panreac Química SA, Barcelona, España) al 6% (1 ml/100 g) y posteriormente perfundidas transcárdiacamente para los estudios histológicos, histoquímicos e inmunohistoquímicos. El resto de las 60 ratas (5 por cada edad y condición) fueron anestesiadas y decapitadas para el análisis de proteínas por Western blot.

4.5.1. Zona de obtención del material

La corteza visual primaria de la rata es una región localizada en la superficie dorsal de la porción occipital del hemisferio cerebral, que corresponde con el área 17 de Brodman. El giro dentado del hipocampo se localiza en el interior de la parte medial o interna del lóbulo temporal bajo la superficie cortical (Fig. 13).

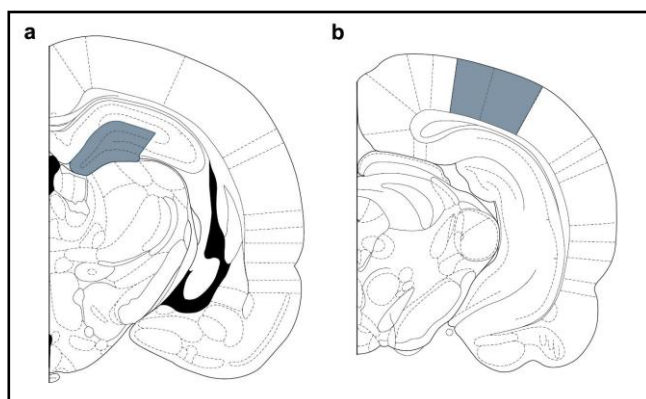


Figura 13. El esquema muestra la localización del giro dentado del hipocampo (a) y la corteza visual primaria (b) en dos secciones coronales del cerebro de rata, áreas objeto de nuestro estudio. Tomado y modificado de Paxinos y Watson, 2007.

4.5.2. Procesamiento del material para estudios histológicos, histoquímicos e inmunohistoquímicos

Las ratas fueron anestesiadas, para después ser perfundidas transcárdicamente mediante una solución de lavado, compuesto por suero fisiológico (cloruro sódico al 0,9% en agua destilada) con el fin de limpiar los hematíes del sistema vascular. Después del lavado, los animales fueron perfundidos transcárdicamente con una solución de fijación compuesta por paraformaldehído al 4% en tampón fosfato salino (PBS) 0,1M a pH 7,4. Tanto la perfusión como el lavado se llevaron a cabo con una bomba de perfusión, a una presión constante de 12 mm de mercurio.

Tras la perfusión, se realizó una craniectomía para extraer los cerebros del interior de los cráneos y se llevó a cabo la postfijación de los mismos manteniéndolos durante 24 horas a 4°C en la misma solución de perfusión. Una vez postfijados los cerebros y tras varios lavados en solución PBS 0,1M, se cortaron bloques coronales que contenían la corteza occipital.

Una vez obtenidos los bloques coronales, se utilizaron dos protocolos diferentes:

- a) Inclusión del material en parafina. Para ello, se deshidrata el tejido mediante la inmersión de los bloques primero en una batería de alcoholes crecientes (50°, 70°, 96° y 100°), y posteriormente en cloroformo y en xileno. Este proceso ha de ser gradual y se realiza siempre en agitación y durante 48 horas. El siguiente paso es la inmersión de los bloques en baños de xileno-parafina al 50% y posteriormente en parafina a 56°C. Por último, los bloques se colocan sobre moldes de acero inoxidable y se vierte parafina líquida sobre la misma. Cuando la parafina se solidifica, se desmolda el casete que se ajustará al soporte del microtomo.
- b) Los bloques se introducen en una solución de sacarosa (Ref: 131621, Panreac Química SA) al 30% en PBS 0,1M hasta su total hundimiento y posteriormente, son utilizados para la obtención de cortes gruesos en el criotomo.

4.5.3. Procesamiento del material para Western blot

Tras la anestesia, las ratas fueron decapitadas mediante guillotina. Se extrajeron los cerebros del interior de los cráneos realizando una craniectomía. Se cortaron secciones coronales de la corteza occipital, conteniendo la totalidad de la corteza visual. Con la utilización de un bisturí y bajo la lupa, se diseccionó la corteza visual para su posterior homogeneización. Para ello, los lisados se mantuvieron en hielo durante media hora para después ser centrifugados y obtener así el sobrenadante con las proteínas de corteza visual.

4. Material y Métodos

La concentración de proteínas de cada muestra se midió mediante la cuantificación por el método de Bradford.

4.6. Corte del material

Se utilizaron dos procedimientos de corte con el fin de llevar a cabo las diferentes técnicas histológicas, histoquímicas e inmunohistoquímicas.

El microtomo de deslizamiento (Modelo: HM440 E, Microm International, Alemania) se utilizó para la obtención de cortes de 4 μm de grosor. Los cortes se estiran en agua a temperatura ambiente y después se transportan a un baño histológico (Ref: B-I, FALC Instruments, Italia) de agua destilada a 42°C con el fin de expandir el tejido. Los cortes obtenidos se montan sobre portaobjetos previamente tratados con 3-aminopropiltriethoxilano (Ref: A-3648; Sigma-Aldrich, España) y son empleados en técnicas histológicas.

Por otro lado, utilizamos el criotomo (Modelo: 1325, Leica Instruments, Alemania) para la obtención de cortes de 50 μm de grosor. Las rodajas occipitales se colocan en el soporte de corte que se enfría hasta los -20°C para que así, la pieza se congele y adquiera la consistencia adecuada para su corte. Los cortes se recogen en una solución isotónica (PBS 0,1M) con azida sódica para una mejor conservación del tejido y evitar el crecimiento de microorganismos. Este material es utilizado en técnicas histoquímicas e inmunohistoquímicas.

4.7. Técnicas histológicas

Con el fin de estudiar la estructura general de la corteza visual de la rata y la zona de implantación de la bomba osmótica, utilizamos la tinción histológica hematoxilina-eosina. Esta técnica permite delimitar las áreas cerebrales que son objeto de estudio.

El protocolo utilizado es el siguiente:

- a) Desparafinar los cortes con dos inmersiones de 10 minutos en xileno.
- b) Hidratar mediante inmersiones de 5 minutos en una batería de alcoholes de concentraciones decrecientes: 100°, 96°, 80°, 70°, 50° y agua destilada.
- c) Teñir con hematoxilina de Harris durante 2-3 minutos.
- d) Lavar durante unos segundos en agua destilada.
- e) Diferenciar en ácido clorhídrico (HCl) (Ref: 131020.1611, Panreac Química SA) al 1% en etanol absoluto durante unos segundos.
- f) Lavar en agua corriente durante unos segundos.
- g) Teñir con eosina durante 20 segundos.

- h) Deshidratar a partir de etanol 70° mediante inmersiones en cadena de alcoholes crecientes: 70°, 80°, 96°, 100°.
- i) 2 inmersiones de 5 minutos en xileno.
- j) Cubrir los cortes con los cubre-objetos (Menzer-Glaser), utilizando la resina sintética DPX (Ref: 44581, Sigma-Aldrich, España).

4.8. Técnicas histoquímicas

Las técnicas histoquímicas descritas a continuación permiten la visualización de la microvascularización de las áreas de interés, tanto para microscopía óptica (Butiril Colinesterasa) como para microscopía confocal (histoquimia de lectina).

4.8.1. Butiril Colinesterasa

La enzima butiril colinesterasa se encuentra en las células endoteliales que forman la Barrera Hematoencefálica de la rata, permitiendo la visualización del patrón microvascular de la corteza (Trancard y cols., 1989). Mediante esta técnica se han estudiado los cambios provocados en la microvascularización debidos a la infusión del VEGF o la cría en entorno enriquecido, tanto en la corteza visual como en el giro dentado.

El protocolo utilizado es el siguiente:

- a) Lavar los cortes con tampón Tris Maleato 0,1 M (pH 6).
- b) Inhibir la acetilcolinesterasa con BW284CS1 (1,5-bis (4-allyldimethylammoniumphenyl)-pentan-3-one dibromide) (Ref: A-9013, Sigma-Aldrich, España) 0,05 M.
- c) Incubar durante una noche con solución de incubación, a temperatura ambiente y cubierto con papel aluminio en agitación.
 - Solución de Incubación: Tris maleato (0,1M, pH 6), Ioduro Butiril Tiocolina (1 mg/ml), citrato sódico (0,1 M), sulfato cúprico 30 mM y ferricianuro potásico (5 mM).
- d) Lavar con tampón.
- e) Montar los cortes y secar al aire durante 48 h en oscuridad.
- f) Deshidratar con xilol y cubrir los cortes utilizando resina sintética DPX.

4.8.2. Histoquimia lectina

Las lectinas son glicoproteínas de origen vegetal con capacidad para identificar y unirse de forma selectiva a restos o terminales glucídicos presentes en los glicoconjugados. Cada lectina presenta especificidad por un azúcar en concreto. Varias de estas lectinas han

4. Material y Métodos

demostrado su utilidad como marcadores de la pared vascular, aportando una visión morfofuncional del estado de la pared (integridad y permeabilidad entre otros).

Para este trabajo hemos seleccionado la lectina del tomate (LEA: *Lycopersicon esculentum*) como marcador del endotelio vascular. La unión lectina-azúcar en este caso es entre la lectina LEA y el radical glucídico de la poly-N-acetyl lactosamina, azúcar presente en la superficie de las células endoteliales de los vasos.

El protocolo utilizado es el siguiente:

- a) Lavar los cortes con tampón fosfato salino (PBS 0,1M, pH 7,4).
- b) Bloquear las regiones inespecíficas. Incubar con PBS 0,1M con tritón (Tritón X-100, octylphenoxy polyethoxyethanol) (Ref: T-6878, Sigma-Aldrich) al 0,5% y BSA al 4% en agitación. Por un lado, el tritón proporciona una permeabilidad adecuada del tejido a los reactivos inmunoquímicos y por otro lado, el BSA bloquea las posibles uniones inespecíficas.
- c) Incubar las secciones con la lectina unida al fluorocromo LEA-TRICT (Ref: L9511, Sigma-Aldrich, 1:200) durante toda la noche.
- d) Lavar con tampón.
- e) Montar los cortes y cubrir con el medio de montaje para fluorescencia Vectashield (Ref: x-0517; Vector Laboratories, Inc., CA, EEUU).
- f) Controles. Con el fin de desenmascarar posibles reacciones cruzadas inespecíficas que nos produjeran falsas positividades, en cada experimentación con la lectina LEA, se incuban secciones control siguiendo los mismos pasos que el resto pero en el que omitimos la incubación con la lectina, incubándolo con suero toda la noche y siguiendo los demás pasos con normalidad.

4.9. Técnicas inmunohistoquímicas

Las técnicas inmunohistoquímicas se llevaron a cabo por medio de dos sistemas diferentes. Por un lado, utilizamos un sistema enzimático que utiliza la peroxidasa y que en presencia de una sustancia que actúa como cromógeno, cambia de color en el lugar de reacción, manifestando así las estructuras a estudiar mediante microscopía óptica (Ref: BH-2, Olympus Optical SA, España). Por otro lado, utilizamos anticuerpos secundarios conjugados con complejos fluorescentes, como son los Alexa, los cuales se visualizan en el microscopio de fluorescencia (Ref: BX-41, Olympus Optical SA) o bien en el microscopio confocal (Ref: Olympus Fluoview FV 500, Olympus Optical SA).

Para estudiar el efecto del VEGF y del entorno enriquecido sobre la población neuronal, utilizamos la inmunexpresión del antígeno NeuN (Neuronal Nuclei) (Ref: MAB377,

Chemicon International Inc, España). En los estudios inmunohistoquímicos de fluorescencia, realizamos dobles marcajes frente a los antígenos VEGF (Ref: sc-152, Santa Cruz Biotechnology, Inc., EEUU) y GFAP (Ref: G-3893, Sigma-Aldrich, España), VEGF y NeuN, y VEGF y LEA (referido en el apartado 4.8.2), para determinar así la colocalización del VEGF con distintos tipos celulares de la unidad neuroglivascular: astrocitos, neuronas y células endoteliales respectivamente.

El protocolo utilizado es el siguiente:

- a) Lavar los cortes con tampón fosfato salino (PBS 0,1M, pH 7,4).
- b) Bloquear la actividad peroxidasa endógena con H₂O₂ al 3% en PBS 0,1M en el caso del antígeno NeuN (microscopía óptica). Dado que la visualización de la unión antígeno-anticuerpo se basa en una reacción en la que interviene la enzima peroxidada, se requiere el bloqueo de la actividad peroxidasa endógena del propio tejido. Este paso asegura que la reacción de coloración observada en último término corresponde única y exclusivamente a la actividad de las peroxidases introducidas intencionadamente en el sistema.
- c) Lavar con tampón.
- d) Bloquear las regiones inespecíficas. Incubar con PBS 0,1M con tritón (Tritón X-100, octylphenoxy polyethoxyethanol) al 0,5% y BSA al 4% en agitación
- e) Incubar con el anticuerpo primario en PBS 0,1M en tritón al 0,5% y BSA al 4% en agitación durante toda la noche a 4°C. En cada ensayo se utiliza un anticuerpo específico frente al antígeno que se quiere detectar (Tabla 1).
- f) Lavar con tampón.
- g) Incubar con el anticuerpo secundario en PBS 0,1M con Tritón al 0,5% y BSA al 4% en agitación durante 1 hora a temperatura ambiente. En este estudio se han empleado anticuerpos secundarios marcados con moléculas de biotina (Ref: PK-6102; Vecstain ABC Kit, Vector Laboratories), para los estudios de microscopía óptica y anticuerpos secundarios unidos a complejos fluorescentes para los estudios de microscopía de fluorescencia y microscopía confocal (Tabla 1).
- h) Lavar con tampón.
- i) Llegados a este punto, los pasos serán diferentes en el caso del estudio de microscopía óptica y en el caso del estudio mediante microscopía de fluorescencia:
 1. Microscopía óptica: incubar durante 45 minutos con el complejo de Avidina-Peroxidasa (Ref: Elite PK-6100, Standard Vecstain ABC Kit, Vector Laboratories) en agitación a temperatura ambiente. Una de las características de la Avidina es su elevada afinidad por las moléculas de Biotina. Cuando las moléculas de Avidina se unen a los anticuerpos secundarios biotinilados se consigue la formación de un complejo Avidina-Biotina-peroxidasa.

4. Material y Métodos

2. Microscopía de fluorescencia: al estar los anticuerpos secundarios unidos a complejos fluorescentes, el siguiente paso será cubrirlos mediante cubre-objetos con la resina adecuada.
- j) Lavar con tampón (para cortes utilizados en microscopia óptica).
- k) Revelar la reacción. El revelado de estos complejos se realiza utilizando la especificidad de la reacción de peroxidación en presencia del cromógeno 3,3'-Diaminobenzidina (DAB). Añadiendo peróxido de hidrógeno (H_2O_2) como sustrato de la peroxidasa se produce su descomposición en O^- y H_2O . La reacción de oxidación de la diaminobenzidina se manifiesta como depósitos de color marrón pardo en los lugares específicos en los que haya tenido lugar la unión entre antígeno y anticuerpo.
- l) Montar los cortes y secar al aire durante 48 h.
- m) Deshidratar con xilol y cubrir los cortes utilizando resina sintética DPX.
- n) Controles. Con el fin de descartar los falsos positivos consecuencia de una reactividad inespecífica, utilizamos secciones de control en los que sustituimos el anticuerpo primario por una solución tampón, siguiendo el resto de los pasos del mismo modo que lo hacemos con las secciones experimentales.

Tabla 1. Los anticuerpos primarios y los correspondientes anticuerpos secundarios utilizados para la inmunohistoquímica.

Anticuerpos primarios	Anticuerpos secundarios
Mouse anti-NeuN, 1:400; Chemicon Int	Anti-mouse Vecstain ABC Kit (mouse IgG); 1:200; Vector Laboratories
Mouse anti-GFAP, 1:400; Sigma-Aldrich	Goat anti-mouse Alexa Fluor® 488-conjugated IgG, 1:400; Invitrogen
Rabbit anti-VEGF, 1:400; Santa Cruz Biotech	Goat anti-rabbit Alexa Fluor® 568-conjugated IgG, 1:400; Invitrogen

4.10. Valoración microscópica

Una vez procesado el material mediante las diferentes técnicas utilizadas, se llevó a cabo el estudio del mismo mediante microscopia. Se analizaron los diferentes marcajes para determinar su homogeneidad, intensidad y localización.

4.11. Estereología

Los resultados cuantitativos se obtuvieron mediante un estudio estereológico de la densidad vascular y la densidad neuronal con la ayuda de un microscopio con cámara, pletina motorizada y el método del disector óptico incorporado al software Mercator (Explora-Nova, La Rochelle, Francia). El método del disector óptico se basa en un muestreo sistemático que distribuye unas sondas o cuadrantes en un área previamente seleccionada. Para ello, primero delimitamos la capa IV de la corteza visual primaria, donde el software distribuye unas sondas de $50\ \mu\text{m} \times 50\ \mu\text{m}$, con una distancia de $100\ \mu\text{m}$ entre cada una de las sondas. El recuento se llevó a cabo en 10 secciones por animal y en 5 animales por cada grupo experimental, cuantificando las neuronas o intersecciones vasculares que estuvieran dentro de la sonda o que cruzaran la línea permitida, y obviando aquellas que cruzaran la línea prohibida (Fig. 14).

Tras efectuar las medidas de todas las secciones de cada animal (diferenciando las medidas en los dos hemisferios de cada sección), obtuvimos el número de neuronas o vasos/ mm^3 , es decir, la densidad para cada uno de los grupos experimentales estudiados, considerando ambos hemisferios por separado (ipsilateral y contralateral).

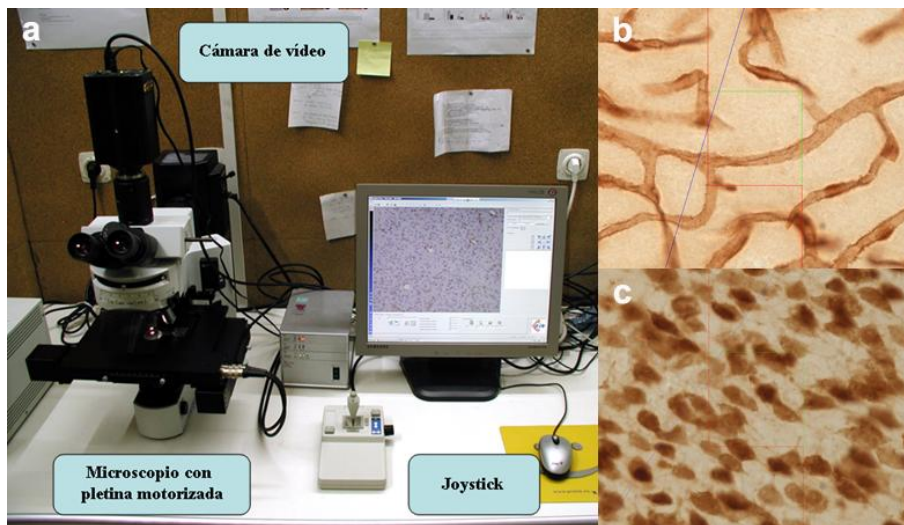


Figura 14. (a) Equipo utilizado para el análisis morfométrico de la histoquímica Butiril Colinesterasa (b) y de la inmunohistoquímica frente al antígeno NeuN (c).

4.12. Western blot

Hemos utilizado la técnica del Western blot para relacionar los cambios derivados de la administración del VEGF a nivel morfológico en la corteza visual con los niveles de moléculas que se activan tras la unión con su receptor. Para ello realizamos el inmunoblotting frente al

4. Material y Métodos

antígeno phospho-44/42 MAPK (ERK1/2) (Ref: 9101; Cell Signaling Technology, Inc., EEUU), y la normalización se llevó a cabo respecto al p44/42 MAPK (ERK1/2) (Ref: 9102; Cell Signaling Technology, Inc.).

El protocolo utilizado es el siguiente:

- a) Preparar las muestras. Para ello, se diluye la cantidad de proteína necesaria en el tampón para muestras (sample buffer). Este tampón tiene 2 sustancias esenciales: el detergente SDS que desnaturaliza las proteínas y rompe las interacciones no covalentes que determinan la estructura terciaria y cuaternaria, y el beta mercaptoetanol (β ME) o el DTT, agentes reductores de los puentes disulfuro, que rompen la proteína en las subunidades que la componen.
- b) Hervir las muestras. Las muestras se hierven a 95-100°C durante 10 minutos para la formación de enlaces estables SDS-proteína en presencia de EDTA y en condiciones reductoras. Así, debido a la carga del SDS y su unión a las proteínas, se consigue que la relación carga/masa sea aproximadamente igual para todas las proteínas de la muestra, de modo que el factor que influye en la separación y migración solo es el tamaño, y no la carga.
- c) Cargar el gel. Se coloca el gel en la cubeta de electroforesis y se cargan las muestras en las calles. Se han utilizado geles Criterion TGX del 12% (Ref: 567-1045; BioRad Laboratories, Inc., España). Junto con las muestras, pondremos en una de las calles, el marcador de pesos moleculares (Ref: 161-0318, BioRad Laboratories, Inc.), para poder saber el peso molecular al que migra la proteína de interés. El gel actúa de tamiz molecular y las subunidades proteicas se separan en función de su tamaño molecular al aplicarle una corriente eléctrica.
- d) Transferencia del gel a la membrana. Tras correr el gel, las proteínas se transfieren a una membrana de PVDF (Ref: 170-4157; Transfer Pack Trans-Blot Turbo, BioRad Laboratories, Inc.). La transferencia se realiza mediante un campo eléctrico que se aplica perpendicularmente al plano del gel (electrotransferencia). El gel y la membrana se sitúan a modo de sándwich entre un conjunto de hojas de papel de filtro. Se aplica un voltaje de tal manera que mediante este proceso las proteínas se unen a la membrana de forma no covalente quedando accesibles para interactuar con las moléculas que permitirán su reconocimiento. La transferencia se ha llevado a cabo mediante el Trans-Blot Turbo System (BioRad).
- e) Bloquear las uniones inespecíficas. Una vez que las proteínas se han transferido a la membrana, se bloquean las uniones inespecíficas con leche en polvo al 5% diluido en tampón (TBS-T).
- f) Lavar con tampón.

- g) Incubar con el anticuerpo primario a 4°C durante toda la noche. Se utiliza un anticuerpo específico frente al antígeno que se quiere detectar (Tabla 2).
- h) Lavar con tampón.
- i) Incubar con el anticuerpo secundario durante 2 horas a temperatura ambiente. El anticuerpo secundario está unido a la peroxidasa (Hrp) (Ref: A-6154; Sigma-Aldrich).
- j) Lavar con tampón.
- k) Situar la membrana sobre el papel de transparencia y verter sobre la membrana el sustrato quimioluminiscente (Ref: RPN 2232; GE Healthcare Life Sciences, UK). La enzima cataliza la oxidación del compuesto luminol en presencia de peróxido de hidrógeno con emisión de fotones. Estos impresionan la placa fotográfica (que se sitúa sobre el sándwich de papel de transparencia-membrana-papel de transferencia en el casete de revelado).
- l) Revelar. Se revela la placa en revelador, se lava con agua, se fija en fijador y se vuelve a lavar.
- m) Secar la placa.
- n) Una vez revelada la membrana, se saca del sándwich y se lava.
- o) Incubar la membrana con una solución para el lavado de anticuerpos unidos a la membrana (stripping) (Ref: 21059; Thermo Fisher Scientific, EEUU) durante 20 minutos a temperatura ambiente.
- p) Lavar con tampón.
- q) Incubar la misma membrana con el anticuerpo primario. Se vuelven a repetir todos los pasos a partir del paso h.

Tabla 2. Anticuerpos utilizados para el Western blot.

Anticuerpos primarios

Rabbit anti-phospho p44/p42 MAPK (ERK1/2), 1:1000; Cell Signaling

Rabbit anti-p44/p42 MAPK (ERK1/2), 1:1000; Cell Signaling

La cuantificación se llevó a cabo mediante el software Image-J (NIH, MA, EEUU). Los valores de la densidad óptica fueron representados como porcentajes de la ratio ERK1/2 fosforilado frente a ERK1/2 total.

4.13. Laberinto acuático de Morris (Morris Water Maze)

El laberinto acuático de Morris se ha empleado para el estudio del efecto de la administración del VEGF y el enriquecimiento ambiental sobre el aprendizaje y la memoria.

4. Material y Métodos

Al tratarse de una prueba que requiere un adiestramiento de días, este estudio sólo se ha llevado a cabo a la edad de P46, es decir, con una administración de 4 semanas, ya que con la administración de una semana no era posible aplicar este tipo de protocolo.

Existen varios protocolos para el test. En nuestro caso, la combinación elegida ha sido el siguiente: 5 días de adquisición para estudiar el aprendizaje, seguido de 1 día sin plataforma para estudiar la memoria, y 3 días de adquisición con una nueva ubicación de la plataforma para estudiar el proceso de reaprendizaje (reversal learning) (Fig. 15). Esta prueba se realizó en 10 animales por cada grupo experimental.

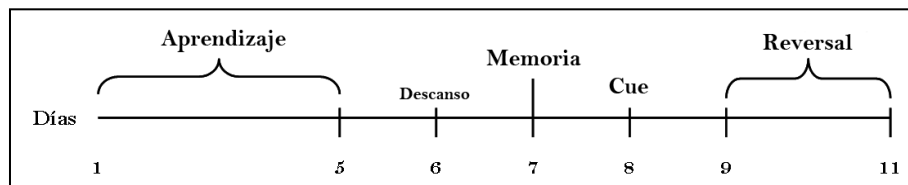


Figura 15. Esquema del protocolo utilizado para el test de Morris Water Maze.

La piscina, de 170 cm de diámetro y 0.6 m de alto, se llena de agua ($24 \pm 1^\circ\text{C}$) y se tiñe de pintura blanca no tóxica para volverla opaca. En cada uno de los cuadrantes de la piscina (norte, sur, este y oeste) se coloca una pista de forma visible para el animal.

Durante los primeros 5 días de adquisición se estudió el aprendizaje de los animales colocando la plataforma de escape (11 cm de diámetro y 47 cm de alto) en medio del cuadrante sudeste y 1 cm por debajo del nivel del agua. Cada día se llevaron a cabo cuatro ensayos (30 minutos entre cada ensayo), introduciendo la rata por cada uno de los cuadrantes de la piscina de forma aleatoria, y permitiéndoles nadar hasta que encontraran la plataforma. Los animales que no encontraban dicha plataforma en un tiempo máximo de 120 segundos, se colocaban en la plataforma durante 60 segundos, al igual que los animales que encontraban la plataforma. Pasados estos segundos, se retiró al animal de la plataforma y se le dejó descansar en su jaula habitual antes de iniciar el siguiente ensayo. La capacidad del animal para localizar eficientemente la plataforma depende de la utilización de las claves que rodean a la piscina.

Después de la fase de aprendizaje, se realizó una prueba de retención de la memoria. Se retiró la plataforma de la piscina y se llevaron a cabo cuatro ensayos en los que se midió por un lado, el tiempo que pasa cada uno de los animales en el cuadrante de la plataforma y por otro lado, en cada uno de los demás cuadrantes. Si el animal ha aprendido a localizar la plataforma en base a las claves distales del laberinto, nadará más tiempo en el cuadrante en el que debiera estar situada la plataforma.

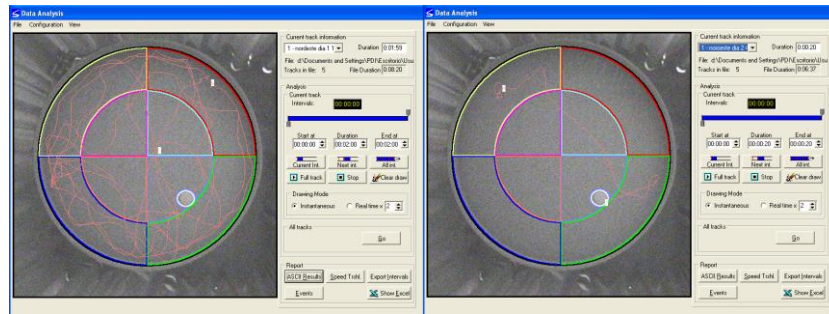


Figura 16. El software SMART, utilizado para el análisis de imagen del test de Morris Water Maze.

El octavo día, se realizó una sesión con la plataforma descubierta (1 cm por encima del nivel del agua) y ésta se señaló con un banderín para descartar así deficiencias tanto visuales como motoras de los animales analizados.

Por último, durante los días 9-11 se llevó a cabo el reversal test. Se cambió la posición de la plataforma (de sudeste a nordeste) para analizar la capacidad de reaprender una nueva ubicación de la plataforma. Ésta se volvió a colocar 1 cm por debajo del agua y se evaluaron 4 ensayos por día. El protocolo utilizado es el mismo que se utilizó durante el aprendizaje.

Todos los ensayos se registraron mediante un sistema de grabación por video (SMART, Panlab SL, Barcelona, España) que a su vez está conectado a una cámara situada encima de la piscina (Fig. 16).

4.14. Estadística

Realizamos el test de Kolmogorov-Smirnov para examinar la distribución normal de los datos obtenidos y el test de Levene para la homogeneidad de las varianzas. Los efectos de las condiciones experimentales se evaluaron mediante el análisis de ANOVA de una vía con las correcciones posthoc de Bonferroni para las varianzas homogéneas o Tamhane T2 para varianzas heterogéneas, determinando así las diferencias significativas entre los grupos estudiados.

La n utilizada varía dependiendo del experimento, pero las diferentes técnicas estadísticas se realizaron con un nivel de significancia del 95% empleando el programa informático estadístico SPSS 19.0 (IBM, España).

5. RESULTADOS

Los resultados se han dividido en dos apartados principales: la administración de 1 semana del péptido VEGF durante los primeros días del periodo crítico del sistema visual (P25), y la administración más prolongada de 4 semanas durante todo el periodo crítico (P46). La implantación de la cánula de la bomba osmótica produce una lesión cortical de unos 0.8 mm de profundidad rostral a la corteza visual primaria (Fig. 12). La lesión se comporta como un microtrauma, presentando en el tejido circundante un grado variable de necrosis y espongiosis dependiendo de la sustancia administrada (Argandoña y cols., 2012b). En los siguientes apartados se analizan los efectos debidos al tiempo de permanencia de la bomba osmótica y la infusión del péptido VEGF.

5.1. Administración del péptido VEGF durante 1 semana (P25)

En este apartado, se estudian los efectos de la implantación de la bomba osmótica y los efectos de la administración del VEGF sobre la vascularización y la población neuronal de la corteza visual primaria una semana después de llevar a cabo la implantación.

5.1.1. Efectos morfológicos de la implantación de la bomba osmótica

En la zona de la lesión, realizamos una doble inmunofluorescencia frente al VEGF/GFAP para estudiar la reacción astrogliar provocada por la implantación de la bomba osmótica.

La herida producida por el infusor de la bomba osmótica es muy pequeña pero como toda agresión en el sistema nervioso central, induce una reacción glial. En este caso se aprecia un aumento de la positividad de GFAP alrededor de la trayectoria del infusor en los grupos con implantación (Fig. 17 d-f), siendo más destacada en el grupo en el que se ha administrado el péptido VEGF (Fig. 17f).

La expresión del antígeno VEGF es mayor en el grupo que se ha administrado el péptido VEGF (Fig. 17 a-c). Si comparamos la expresión de VEGF en el grupo PBS con el grupo control, el primero también presenta una mayor expresión de VEGF debido a la reacción astrogliar que se produce tras la implantación de la bomba osmótica, pero la expresión es menor que en el grupo VEGF (Fig. 17 a-c).

Por lo tanto, el patrón de expresión de GFAP y VEGF es similar en los grupos en los que se ha llevado a cabo la implantación, encontrando una mayor expresión de ambos antígenos en el grupo VEGF debido a la lesión inducida por la implantación de la bomba osmótica y la administración del péptido VEGF en P25.

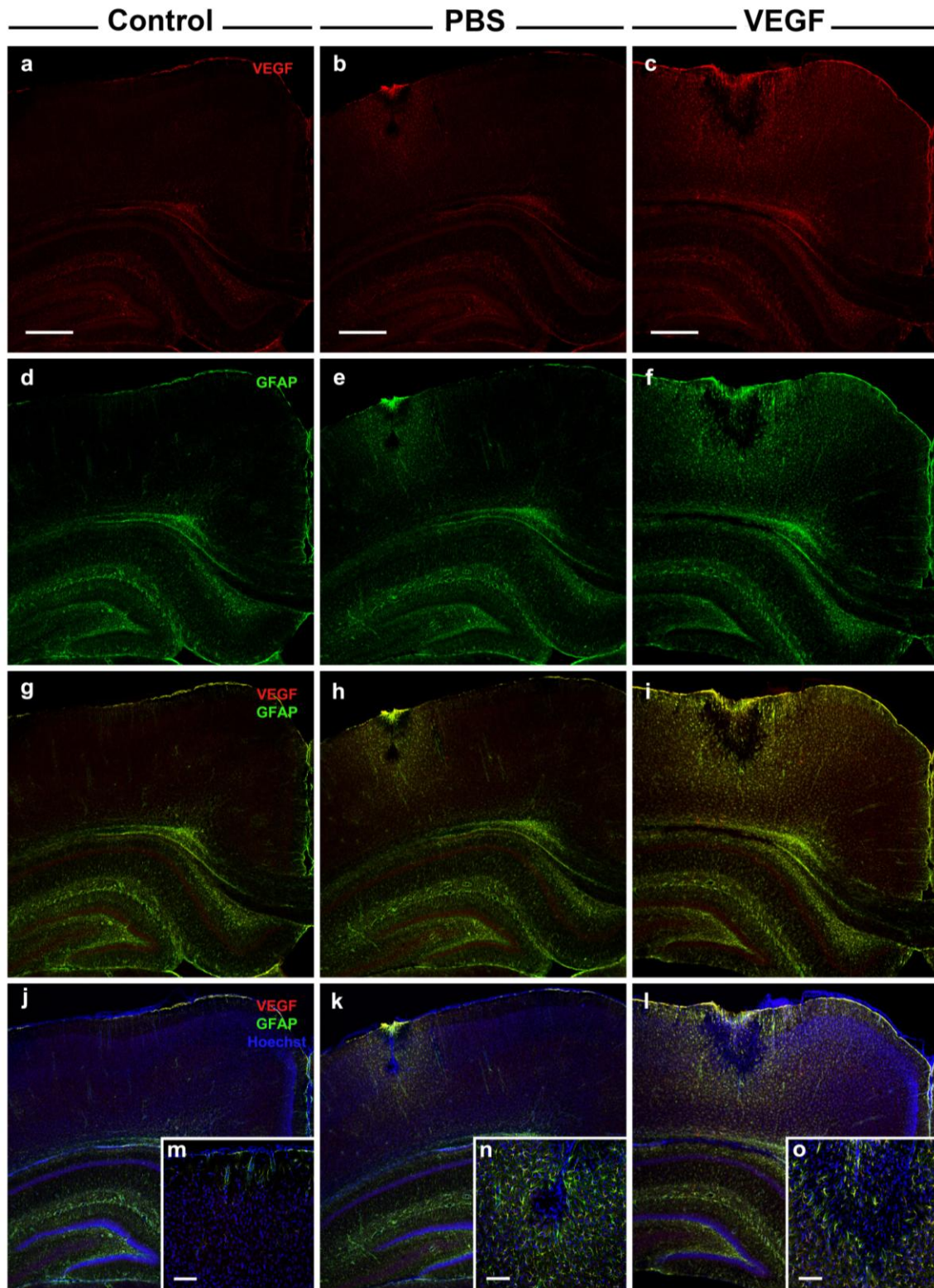


Figura 17. Imágenes de inmunofluorescencia frente al VEGF (a, b, c), GFAP (d, e, f), doble marcaje VEGF/GFAP (g, h, i) y VEGF/GFAP/Hoechst (j, k, l, m, n, o) en la zona de implantación de la bomba osmótica de los grupos experimentales estudiados (Control, PBS y VEGF) en P25. Barra de escala = 500 μm (a-l) y 100 μm (m-o).

5.1.2. Co-expresión del VEGF en la corteza visual primaria

Por otro lado, llevamos a cabo dobles inmunofluorescencias frente a VEGF/GFAP, VEGF/NeuN y VEGF/Lea en la corteza visual primaria para determinar en qué tipo celular, astrocitos, neuronas o células endoteliales respectivamente, encontramos expresión del Factor de Crecimiento del Endotelio Vascular (VEGF).

En el grupo control no operado, la expresión de GFAP corresponde sobre todo a astrocitos que rodean los vasos sanguíneos, además de encontrar cierta positividad en las capas más profundas (capas V-VI) de la corteza. En los grupos PBS y VEGF, si bien la distribución es similar a la encontrada en el grupo control, también se observa positividad frente al GFAP en las capas superiores (capas II-III), siendo mayor en el grupo con infusión de VEGF (Fig. 18 a-c).

El marcaje de NeuN delimita el núcleo de las neuronas, y muestra un patrón de expresión y una distribución homogénea en todos los grupos experimentales. Es un marcaje que permite diferenciar las capas de la corteza cerebral, no encontrándose diferencias en la expresión del mismo entre los grupos estudiados (Fig. 18 d-f).

En cuanto al marcaje de LEA, encontramos una distribución homogénea a lo largo de toda la corteza. El marcaje de las células endoteliales pone de manifiesto la microvascularización, no encontrando diferencias entre los grupos experimentales estudiados (Fig. 18 g-i).

Por último, la expresión de VEGF muestra positividad en las distintas capas de la corteza visual. Esta expresión es mayor en el grupo con infusión de VEGF comparada con los grupos de infusión de PBS y el grupo control no operado. El VEGF colocaliza con las células GFAP positivas mostrando un patrón de expresión similar al de GFAP (Fig. 18 a''-c''). En la capa IV, objeto de nuestro estudio, la presencia de GFAP es escasa, y en cambio, se ponen de manifiesto neuronas con positividad nuclear para NeuN y citoplasmática para el VEGF (Fig. 18 d''-f''). Asimismo, el marcaje de LEA no muestra colocalización con el VEGF en ninguno de los grupos experimentales estudiados (Fig. 18 g''-i'').

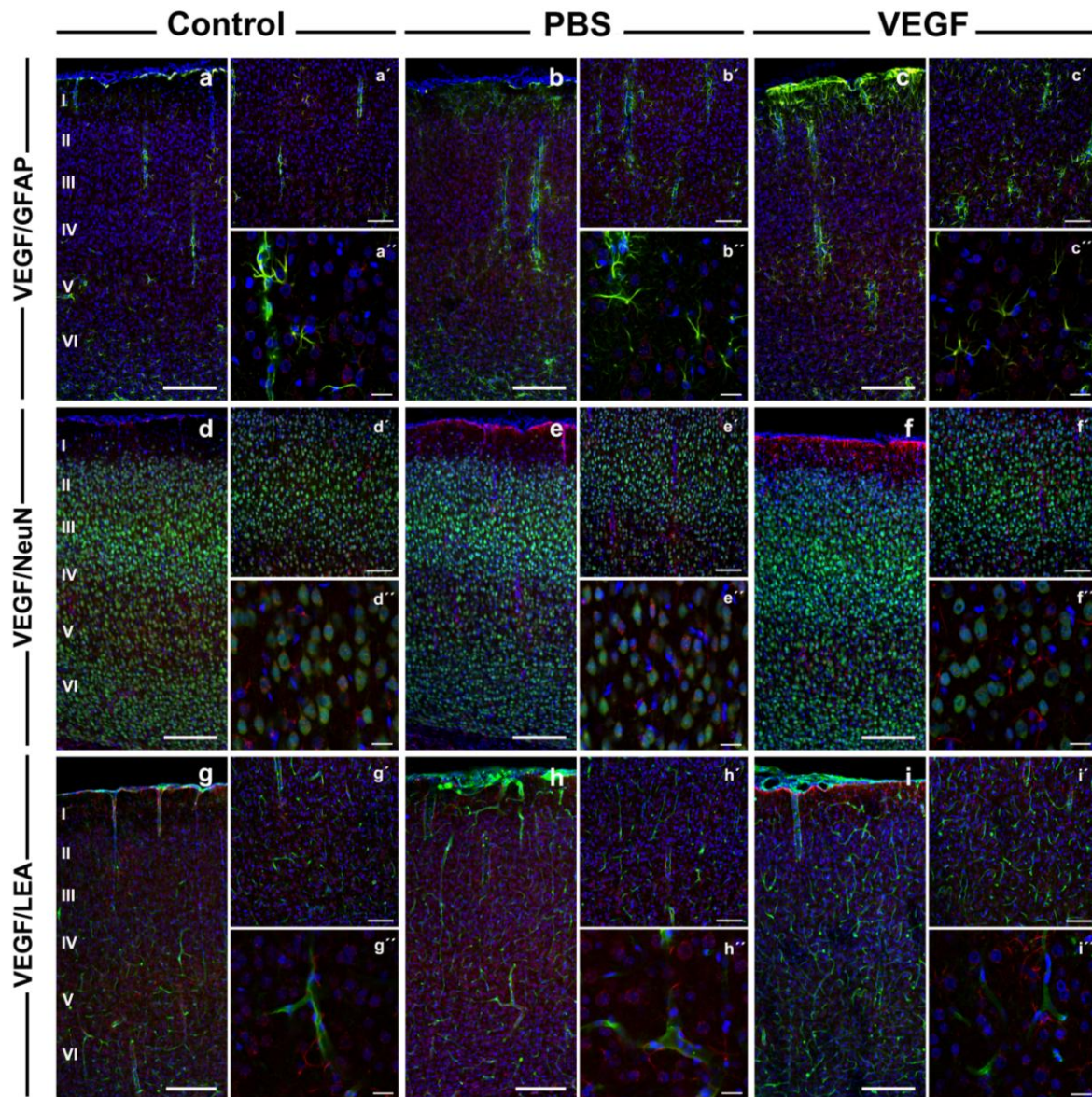


Figura 18. Imágenes de doble inmunofluorescencia frente al VEGF/GFAP (a, b, c), VEGF/NeuN (d, e, f) y VEGF/LEA (g, h, i) en la corteza visual primaria de los grupos experimentales estudiados (Control, PBS y VEGF) en P25. Barra de escala = 200 μm (a-i). Barra de escala = 100 μm (a'-i'). Barra de escala = 20 μm (a''-i'').

5.1.3. Efecto de la administración del VEGF sobre la densidad neuronal y la red vascular de la corteza visual primaria

En el siguiente apartado exploramos el efecto de la administración intracortical de VEGF en la población neuronal y en la red microvascular de la corteza visual primaria tanto en animales criados en condiciones estándar (SC-SC) como en entorno enriquecido (SC-EE). Al mismo tiempo analizamos el efecto del entorno enriquecido en animales no operados y en los grupos con administración del péptido VEGF y PBS (vehículo).

La histoquímica de **Butiril Colinesterasa** es un método reproducible y fiable (Argandoña y Lafuente, 1996) que pone de manifiesto la totalidad de la red capilar (vasos entre 5-50 μm) de una forma homogénea en todas las áreas cerebrales en corte grueso, siendo óptimo para ser cuantificado por estereología. El marcaje es constante dibujando la angioarquitectura cortical y presenta una mayor densidad de vasos en la capa IV de la corteza (Fig. 19a).

El marcado inmunohistoquímico de **NeuN** también es homogéneo en las diferentes áreas corticales y permite diferenciar las distintas capas corticales. En este caso, son las capas corticales medias las que mayor densidad neuronal presentan (Fig. 19b).

Todas las condiciones experimentales estudiadas muestran con la histoquímica para Butiril Colinesterasa y con el inmunomarcado para NeuN un patrón de expresión y distribución homogéneo.

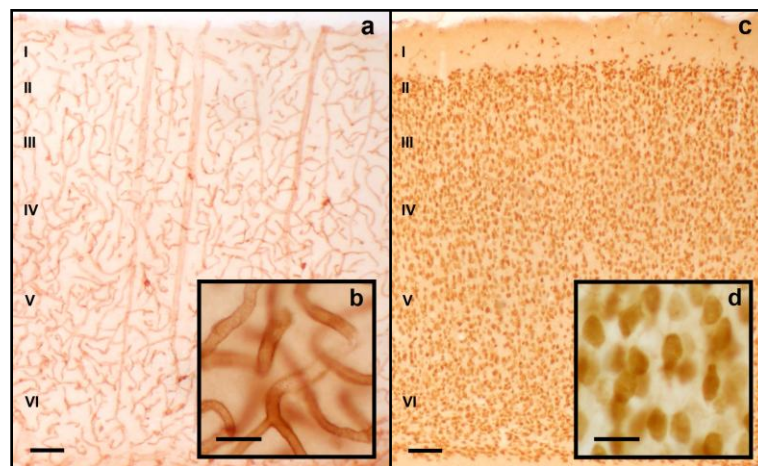


Figura 19. Imágenes de la corteza visual primaria de la rata en P25. Butiril colinesterasa (a, b) y NeuN (c, d). Barra de escala=100 μm (a, b) y 20 μm (c, d).

Los resultados obtenidos de la cuantificación tanto de la Butiril Colinesterasa (densidad vascular) y de la inmunotinción con NeuN (densidad neuronal), han sido comparados utilizando el análisis de ANOVA de una vía con las correcciones posthoc de Bonferroni para las varianzas homogéneas o T2 de Tamhane para varianzas heterogéneas con los siguientes resultados:

a. Condiciones estándar (SC-SC)

En la **densidad vascular** en P25, no se observan diferencias significativas entre el grupo control y los grupos con infusión de VEGF y PBS. En el hemisferio ipsilateral (IL), estos grupos presentan una densidad menor que el grupo control, siendo la diferencia del 10% en el

5. Resultados

grupo PBS y del 5% en el grupo VEGF. Por otro lado, tampoco se observan diferencias significativas entre el grupo PBS y VEGF, aunque este último grupo presenta una densidad un 5% mayor que el grupo PBS (Fig. 20a; Tabla 3).

Los resultados obtenidos son similares en ambos hemisferios. En el hemisferio contralateral (CL) tampoco se observan diferencias significativas entre los grupos experimentales. La densidad del grupo con infusión de PBS es un 3% mayor que en el grupo control. La diferencia observada entre el grupo VEGF y control es del 3%, siendo la densidad mayor en el grupo VEGF. Por último, no hay diferencia entre la densidad vascular del grupo PBS y el grupo VEGF (Fig. 20a; Tabla 3).

Por lo tanto, la densidad vascular en condiciones estándar es similar en todos los grupos estudiados a la edad de P25.

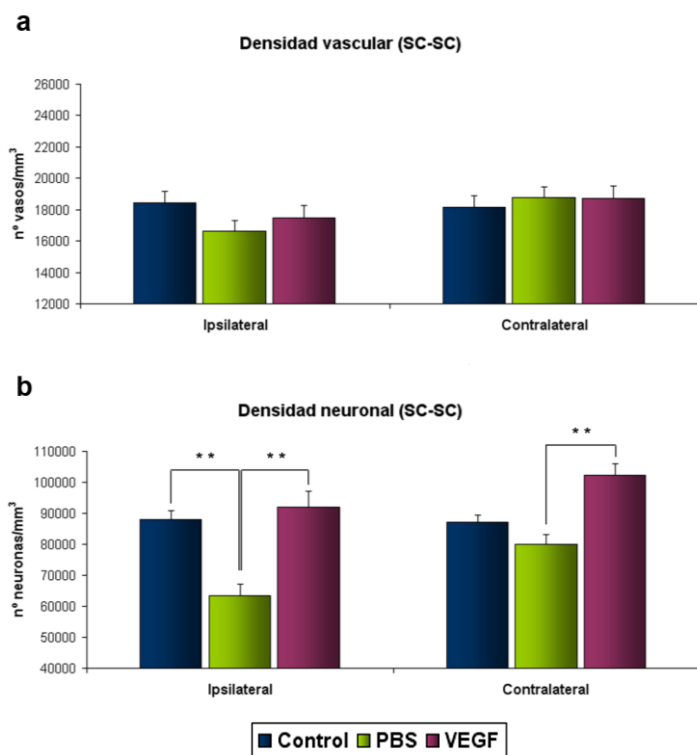


Figura 20. Estudio cuantitativo de los diferentes grupos experimentales (Control, PBS, VEGF) en condiciones estándar (SC-SC) en P25. El eje horizontal muestra los hemisferios ipsilateral (IL) y contralateral (CL). El eje vertical muestra el número de vasos/mm³ (a) y número de neuronas/mm³ (b) de la capa IV de la corteza visual primaria. Media \pm SEM. ** p<0,01.

La **densidad neuronal** del grupo PBS es un 28% menor que en el grupo control en el hemisferio ipsilateral, tratándose de una diferencia significativa. En cambio, el grupo con infusión de VEGF presenta una mayor densidad (4%) que el grupo control, diferencia no significativa (Fig. 20b; Tabla 4). En el hemisferio contralateral, aunque la tendencia es la misma, no se observan diferencias significativas. La diferencia entre el grupo control y el grupo PBS es del 8%, y en cambio, entre el grupo control y el grupo VEGF la diferencia es del 17%, observándose una mayor densidad en el grupo con infusión de VEGF (Fig. 20b; Tabla 4). Por

otro lado, si comparamos el grupo PBS y el grupo VEGF encontramos la misma tendencia en ambos hemisferios. El grupo VEGF presenta una densidad neuronal significativamente mayor en ambos casos, un 45% en el hemisferio ipsilateral y un 27% en el hemisferio contralateral (Fig. 20b; Tabla 4).

Así, los resultados obtenidos muestran que la densidad neuronal, en condiciones estándar y a la edad de P25, mantiene la misma tendencia en ambos hemisferios, donde el grupo VEGF recupera la densidad neuronal hasta niveles fisiológicos.

Tabla 3. Porcentaje de diferencia de la densidad vascular de la corteza visual primaria y el valor p de los grupos estudiados en el hemisferio ipsilateral (IL) y contralateral (CL) en condiciones estándar en P25.

	PBS vs. Control		VEGF vs. Control		VEGF vs. PBS	
	<i>IL</i>	<i>CL</i>	<i>IL</i>	<i>CL</i>	<i>IL</i>	<i>CL</i>
% Dif.	-9.74	3.37	-5.08	3	5.15	- 0.30
P	0,973	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000

Tabla 4. Porcentaje de diferencia de la densidad neuronal de la corteza visual primaria y el valor p de los grupos estudiados en el hemisferio ipsilateral (IL) y contralateral (CL) en condiciones estándar en P25.

	PBS vs. Control		VEGF vs. Control		VEGF vs. PBS	
	<i>IL</i>	<i>CL</i>	<i>IL</i>	<i>CL</i>	<i>IL</i>	<i>CL</i>
% Dif.	-27,79	-8,28	4.57	17,04	44,83	27,60
P	0,000	0,703	1,000	0,092	0,000	0,000

b. Entorno Enriquecido (SC-EE)

Los resultados obtenidos en la **densidad vascular** de ambos hemisferios son similares. Si comparamos el grupo con infusión de PBS respecto al grupo control, la densidad del grupo PBS es significativamente menor en el hemisferio ipsilateral y en el hemisferio contralateral (22% y 18% menor respectivamente) (Fig. 21a; Tabla 5). La tendencia del grupo VEGF respecto al grupo control es la misma, encontrando diferencias del 14% en el hemisferio ipsilateral (significativo) y del 12% en el hemisferio contralateral. En cambio, no se observan

5. Resultados

diferencias significativas entre los grupos PBS y VEGF, aunque el grupo con infusión de VEGF muestra una mayor densidad (9% en hemisferio IL; 8% en hemisferio CL) que el grupo PBS (Fig. 21a; Tabla 5).

Por tanto, en condiciones de entorno enriquecido en P25 es el grupo control quien mayor densidad vascular muestra, seguida por el grupo VEGF en ambos hemisferios.

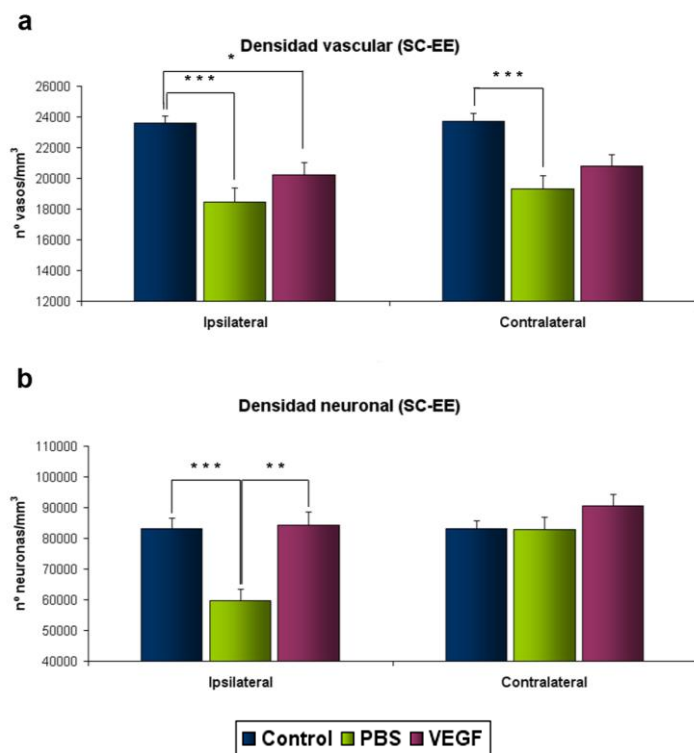


Figura 21. Estudio cuantitativo de los diferentes grupos experimentales (Control, PBS, VEGF) en condiciones de entorno enriquecido (SC-EE) en P25. El eje horizontal muestra los hemisferios ipsilateral (IL) y contralateral (CL). El eje vertical muestra el número de vasos/mm³ (a) y el número de neuronas/mm³ (b) de la capa IV de la corteza visual primaria. Media \pm SEM. * p<0,05. ** p<0,01. *** p<0,001.

Tabla 5. Porcentaje de diferencia de la densidad vascular de la corteza visual primaria y el valor p de los grupos estudiados en el hemisferio ipsilateral (IL) y contralateral (CL) en condiciones de entorno enriquecido en P25.

	PBS vs. Control		VEGF vs. Control		VEGF vs. PBS	
	<i>IL</i>	<i>CL</i>	<i>IL</i>	<i>CL</i>	<i>IL</i>	<i>CL</i>
% Dif.	-21,76	-18,46	-14,30	-12,13	9,52	7,77
<i>P</i>	0,000	0,000	0,012	0,057	0,967	0,982

En cuanto a la **densidad neuronal**, en el hemisferio ipsilateral el grupo PBS presenta una densidad menor (28%) respecto al grupo control, siendo ésta una diferencia significativa (Fig. 21b; Tabla 6). En cambio, si comparamos el grupo VEGF con el control no operado, no encontramos diferencia entre ambos grupos (la densidad es un 1% mayor en el grupo VEGF).

Por otro lado, el grupo VEGF muestra una densidad significativamente mayor (41%) que el grupo con infusión de PBS (Fig. 21b; Tabla 6).

En el hemisferio contralateral, no se encuentran diferencias significativas. El grupo PBS no muestra diferencia respecto al control (0,5%). En cambio, el grupo VEGF muestra una tendencia similar al hemisferio ipsilateral, siendo la densidad un 9% mayor que el grupo control (Fig. 21b; Tabla 6). Por último, si comparamos el grupo VEGF respecto al grupo PBS, aunque la diferencia no es significativa, el grupo VEGF muestra una densidad un 9% mayor que el grupo PBS (Fig. 21b; Tabla 6).

Por lo tanto, el grupo VEGF en condiciones de entorno enriquecido recupera la densidad neuronal hasta los niveles fisiológicos en ambos hemisferios a la edad de P25.

Tabla 6. Porcentaje de diferencia de la densidad neuronal de la corteza visual primaria y el valor p de los grupos estudiados en el hemisferio ipsilateral (IL) y contralateral (CL) en condiciones de entorno enriquecido en P25.

	PBS vs. Control		VEGF vs. Control		VEGF vs. PBS	
	<i>IL</i>	<i>CL</i>	<i>IL</i>	<i>CL</i>	<i>IL</i>	<i>CL</i>
% Dif.	-28,09	-0,46	1,35	8,82	40,96	9,33
P	0,000	1,000	1,000	0,642	0,007	0,641

c. Efecto del entorno enriquecido (SC-EE vs. SC-SC)

Tras el estudio de la administración de VEGF en condiciones estándar y entorno enriquecido, procedimos a estudiar los efectos de la cría en entorno enriquecido (desde el día P18 hasta el día P25) sobre la población neuronal y la red vascular de la corteza visual primaria en cada uno de los grupos experimentales estudiados.

En el grupo control no operado, observamos una **densidad vascular** mayor en el grupo criado en entorno enriquecido en ambos hemisferios. Los resultados obtenidos muestran una diferencia significativa del 28% y 30% del grupo SC-EE respecto al grupo SC-SC en el hemisferio ipsilateral y contralateral respectivamente (Fig. 22a; Tabla 7). En el grupo con infusión de PBS la densidad del grupo SC-EE es un 11% mayor que en el grupo SC-SC en el hemisferio ipsilateral y un 3% mayor en el hemisferio contralateral, tratándose en ambos casos de diferencias no significativas (Fig. 22c; Tabla 7).

5. Resultados

En cambio, el grupo con infusión del péptido VEGF muestra una densidad significativamente mayor (15%) en el hemisferio ipsilateral, mientras que en el hemisferio contralateral la diferencia (11%) no es estadísticamente significativa (Fig. 22e; Tabla 7).

Por lo tanto, el grupo de entorno enriquecido muestra una densidad vascular mayor que el grupo criado en condiciones estándar, encontrando diferencias significativas en el grupo control no operado y en el grupo VEGF en la edad de P25.

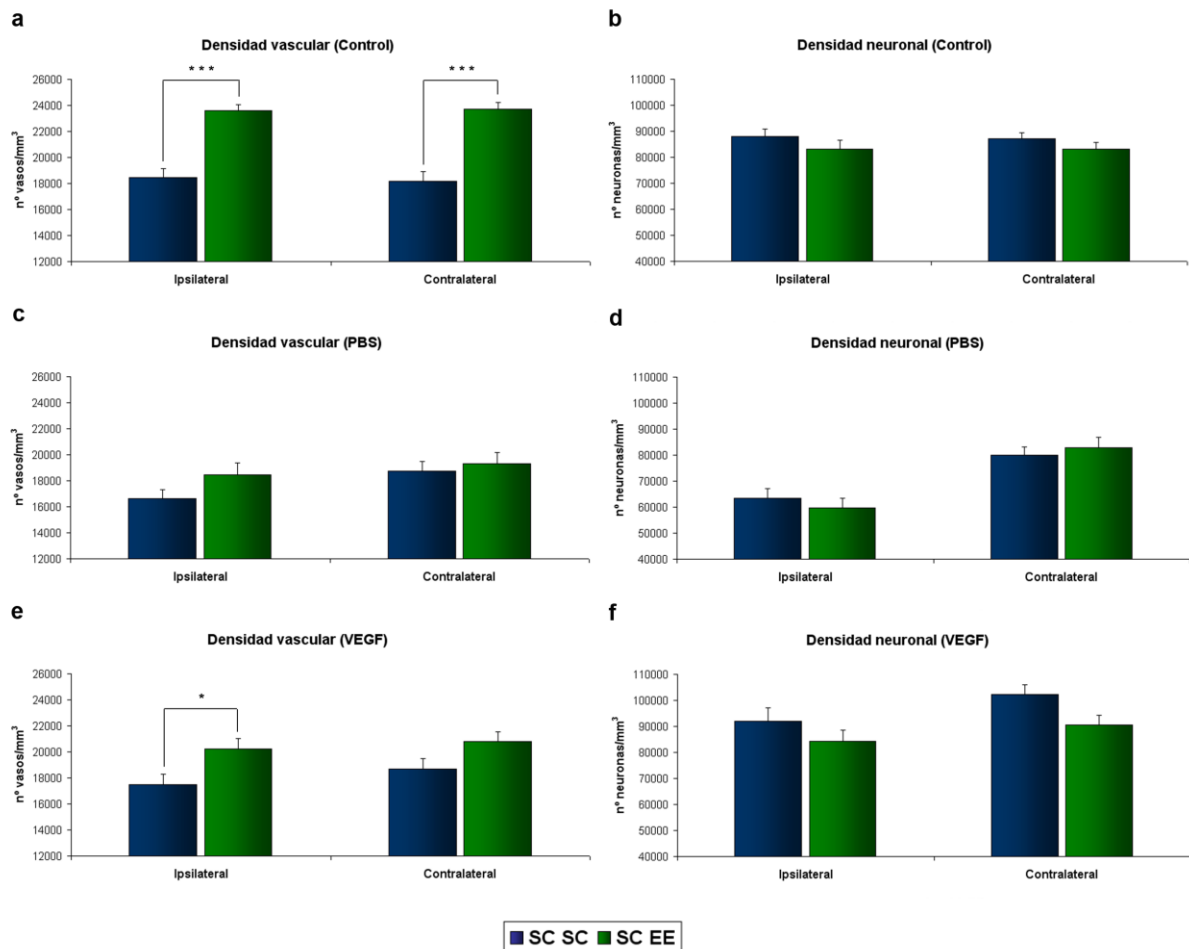


Figura 22. Estudio cuantitativo de las distintas condiciones visuales (SC-SC, SC-EE) en la corteza visual primaria P25. El eje horizontal muestra los hemisferios (ipsilateral y contralateral). El eje vertical muestra el número de vasos/mm³ (a, c, e) y el número de neuronas/mm³ (b, d, f) de la capa IV de la corteza visual primaria. Media \pm SEM. * p<0,05. *** p<0,001.

La **densidad neuronal** no muestra diferencias significativas entre las dos condiciones de cría en ninguno de los grupos estudiados. En el grupo control, los animales criados en SC-EE muestran una densidad neuronal un 5% menor que en el grupo SC-SC tanto en el hemisferio ipsilateral como en el hemisferio contralateral (Fig. 22b; Tabla 8). La tendencia se mantiene en los grupos PBS y VEGF, donde la densidad neuronal es un 6% y un 8% menor en el hemisferio

ipsilateral, y un 3% mayor y un 11% menor en el lado contralateral respectivamente (Fig. 22d, f; Tabla 8).

De esta manera, la exposición al enriquecimiento ambiental durante 1 semana no afecta a la densidad neuronal en P25, encontrando resultados similares en ambas condiciones de estabulación.

Tabla 7. Porcentaje de diferencia de la densidad vascular de la corteza visual primaria y el valor p de los animales criados en entorno enriquecido (SC-EE) y en condiciones estándar (SC-SC) en el hemisferio ipsilateral (IL) y contralateral (CL) en P25.

	SC-EE vs. SC-SC					
	Control		PBS		VEGF	
	<i>IL</i>	<i>CL</i>	<i>IL</i>	<i>CL</i>	<i>IL</i>	<i>CL</i>
% Dif.	27,88	30,58	10,84	2,98	15,45	11,31
P	0,000	0,000	0,918	1,000	0,039	0,546

Tabla 8. Porcentaje de diferencia de la densidad neuronal de la corteza visual primaria y el valor p de los animales criados en entorno enriquecido (SC-EE) y en condiciones estándar (SC-SC) en el hemisferio ipsilateral (IL) y contralateral (CL) en P25.

	SC-EE vs. SC-SC					
	Control		PBS		VEGF	
	<i>IL</i>	<i>CL</i>	<i>IL</i>	<i>CL</i>	<i>IL</i>	<i>CL</i>
% Dif.	-5,52	-4,73	-5,92	3,38	-8,43	-11,44
P	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000

5.1.4. Análisis del efecto de la administración del VEGF sobre la expresión de ERK1/2 fosforilado

En el siguiente apartado se estudia el efecto de la administración del VEGF en la expresión de ERK1/2, una de las vías de señalización que se activan tras la unión del VEGF al receptor VEGFR-2.

5. Resultados

a. Condiciones estándar (SC-SC)

La cuantificación del ERK1/2 fosforilado muestra una disminución significativa en el grupo con infusión de PBS (54%) frente al grupo control no operado ($p=0,019$). El grupo con administración de VEGF (103%) también presenta unos niveles significativamente mayores que el grupo PBS ($p=0,041$), alcanzando valores similares al control no operado (Fig. 23).

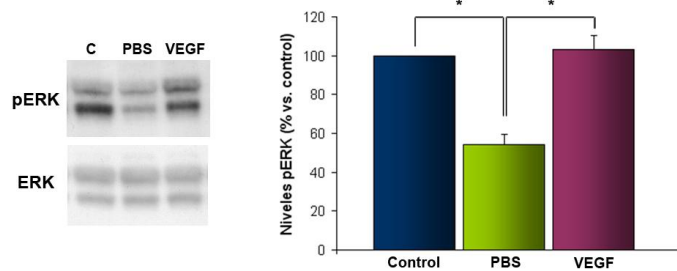


Figura 23. Niveles de ERK1/2 fosforilado en P25. El eje vertical muestra el porcentaje de los niveles de fosforilación de los grupos experimentales frente al control. El eje horizontal muestra los distintos grupos estudiados (Control, PBS y VEGF). Media \pm SEM. * $p<0,05$.

b. Entorno enriquecido (SC-EE)

En el caso de los animales criados en un entorno enriquecido, se observa una tendencia similar respecto a aquellos criados en condiciones estándar. El grupo PBS (73%) muestra una disminución de los niveles frente al grupo control y el grupo VEGF (106%), aunque en este caso no se han encontrado diferencias significativas ($p=0,988$ y $p=0,953$ respectivamente) (Fig. 24).

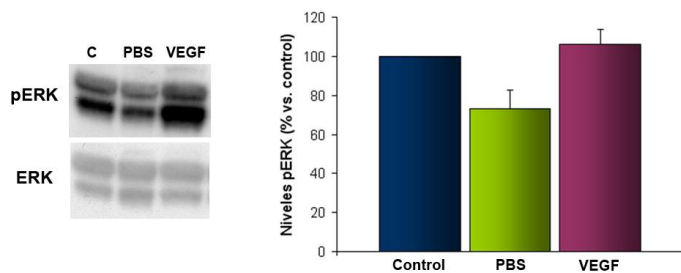


Figura 24. Niveles de ERK1/2 fosforilado en P25. El eje vertical muestra el porcentaje de los niveles de fosforilación de los grupos experimentales frente al control. El eje horizontal muestra los distintos grupos estudiados (Control, PBS y VEGF). Media \pm SEM.

5.2. Administración del péptido VEGF durante 4 semanas (P46)

En este apartado, además de estudiar los efectos de la implantación de la bomba osmótica y los efectos de la administración de VEGF sobre la vascularización, la población neuronal de la corteza visual primaria y del giro dentado, analizamos los efectos de dicha administración sobre el aprendizaje 4 semanas después de llevar a cabo la implantación.

5.2.1. Efectos morfológicos de la implantación de la bomba osmótica

Como se ha descrito en el apartado 5.1.1, en este caso también se llevó a cabo una doble inmunofluorescencia frente VEGF/GFAP en la zona de implantación de la bomba osmótica.

Si bien la lesión inducida por la implantación de la bomba osmótica es pequeña, produce una reacción astrogliar alrededor de la trayectoria del infusor donde se aprecia un aumento de la positividad de GFAP. En este caso, el infusor permanece implantado durante 4 semanas, lo y tanto el grupo con infusión de PBS como con infusión del péptido VEGF muestran un patrón similar en la expresión de GFAP. La positividad frente al GFAP es mayor en los grupos con implantación de la bomba osmótica que en el grupo control no operado (Fig. 25 d-f).

En cuanto a la expresión de VEGF, el grupo con infusión del péptido VEGF muestra una expresión ligeramente mayor que el grupo con infusión de PBS. Ambos grupos presentan una expresión mayor de VEGF respecto al grupo control no operado (Fig. 25 a-c).

Por lo tanto, tanto el grupo PBS como el grupo VEGF muestran un patrón similar alrededor de la lesión debido a la administración prolongada que se lleva a cabo. No obstante, la expresión de VEGF es ligeramente mayor en el grupo VEGF en la edad P46.

5.2.2. Co-expresión del VEGF en la corteza visual primaria

Además, se realizaron dobles marcajes frente a los antígenos VEGF/GFAP, VEGF/NeuN y VEGF/LEA en la corteza visual primaria y en el giro dentado para determinar en qué tipo celular, astrocitos, neuronas o células endoteliales respectivamente, encontramos co-expresión con el VEGF.

La expresión de GFAP en la corteza visual primaria en la edad de P46 es mayor que en la edad de P25 en todos los grupos experimentales. El grupo PBS y el grupo VEGF muestran una positividad frente al GFAP que el grupo control no operado, presentando mayor expresión el grupo con infusión del péptido VEGF. En los grupos operados la distribución de dicha positividad es homogénea en todas las capas de la corteza, no así en el grupo control (Fig. 26 a-c).

En el caso del marcaje neuronal, éste presenta un patrón de expresión y una distribución homogénea en todos los grupos experimentales. Es un marcaje que pone de manifiesto las capas corticales neuronales, no encontrando diferencias entre los grupos estudiados (Fig. 26 d-f).

La distribución del marcaje del LEA también es homogénea a lo largo de toda la corteza. Al igual que en el caso del marcaje neuronal, no se encuentran diferencias en la positividad entre los grupos experimentales estudiados (Fig. 26 g-i).

Por último, la expresión de VEGF es mayor en el grupo con infusión del péptido VEGF comparando tanto con el grupo PBS como con el grupo control no operado. El marcaje del VEGF se muestra en todas las capas corticales, colocalizando en su mayoría, con los astrocitos GFAP positivos. Además, esta colocalización VEGF/GFAP alcanza la capa IV de la corteza visual primaria (Fig. 26 a''-c'') y es el grupo con infusión de VEGF el que mayor expresión muestra. Asimismo, ni el marcaje de LEA ni el marcaje de NeuN muestran colocalización con el VEGF en ninguno de los grupos experimentales estudiados (Fig. 26 d''-i'').

Por lo tanto, la expresión de VEGF en la capa IV de la corteza visual primaria corresponde en su mayoría a astrocitos a la edad de P46.

5.2.3. Co-expresión del VEGF en el giro dentado

En el giro dentado, la expresión de GFAP es similar en todos los grupos experimentales, correspondiéndose en su mayoría con astrocitos de la capa polimórfica (Fig. 27 a-c).

En cuanto al marcaje neuronal, al igual que en la corteza visual, éste presenta un patrón de expresión homogéneo en todos los grupos experimentales, poniendo de manifiesto las distintas capas del giro dentado. La capa con mayor densidad neuronal corresponde a la capa granular del giro dentado, a pesar de que también se observan las neuronas de la capa polimórfica (Fig. 27 d-f).

La positividad del marcaje de LEA tampoco muestra diferencias entre los grupos estudiados, aunque en este caso se observa una mayor densidad de células endoteliales positivas en la capa polimórfica comparando con la capa granular (Fig. 27 g-i).

En cuanto a la expresión del antígeno VEGF, éste esta presenta en las diferentes capas del giro dentado, correspondiéndose en su mayoría con astrocitos GFAP positivos (Fig. 27 a''-c''). Asimismo, la expresión del VEGF también se corresponde con algunas células NeuN positivas (Fig. 27 d''-f''). En cambio, el marcaje de LEA no presenta colocalización con el VEGF en ninguno de los grupos estudiados (Fig. 27 g''-i''). Por último, no se observan diferencias en la expresión del VEGF entre el grupo control y los grupos con infusión de PBS y VEGF. Por lo tanto, la expresión de VEGF en el giro dentado corresponde en su mayoría a astrocitos aunque también se observa expresión neuronal.

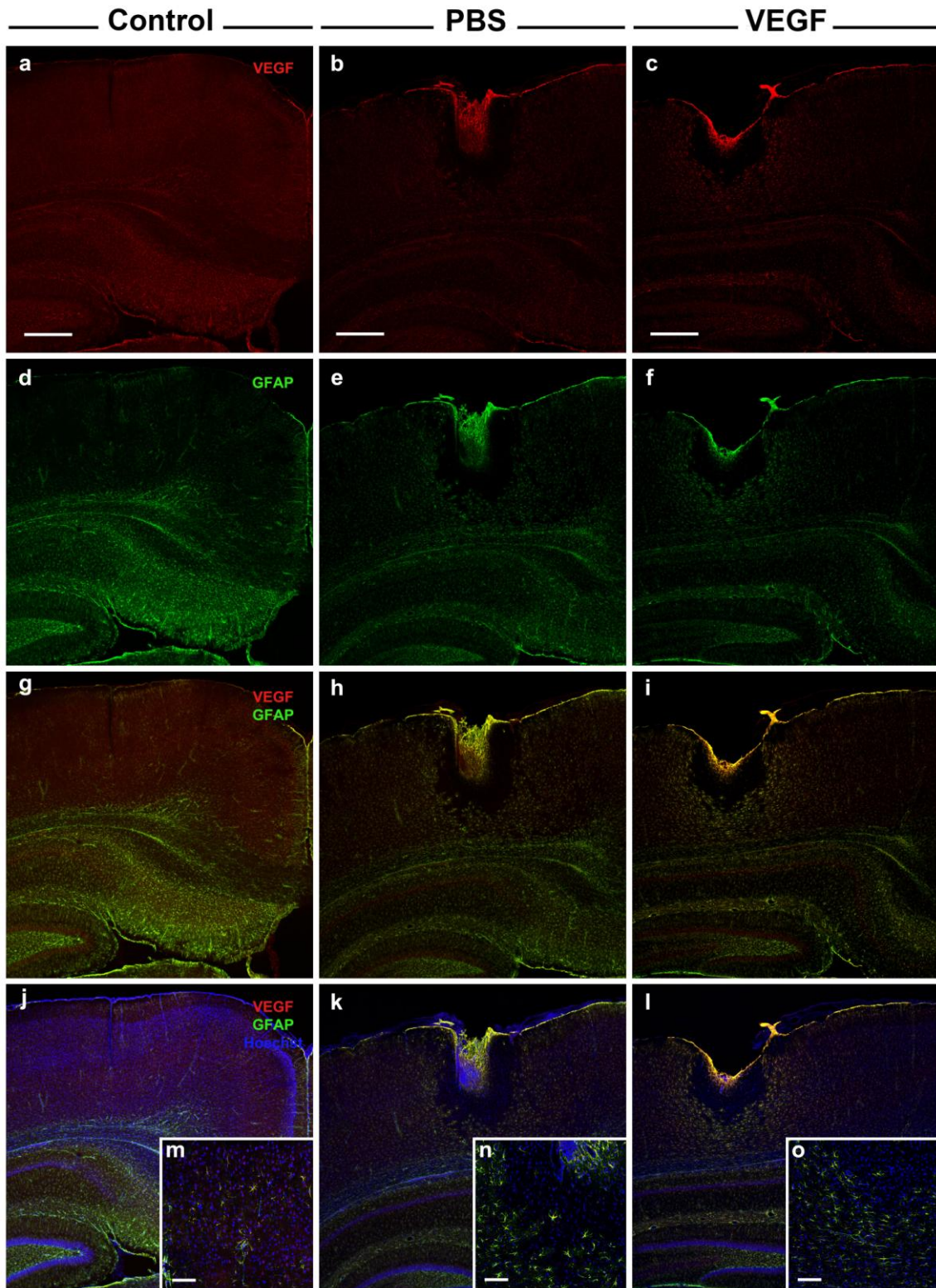


Figura 25. Imágenes de inmunofluorescencia frente al VEGF (a, b, c), GFAP (d, e, f), doble marcaje VEGF/GFAP (g, h, i) y VEGF/GFAP/Hoechst (j, k, l, m, n, o) en la zona de implantación de la bomba osmótica de los grupos experimentales estudiados (Control, PBS y VEGF) en P46. Barra de escala = 500 μm (a-l) y 100 μm (m-o).

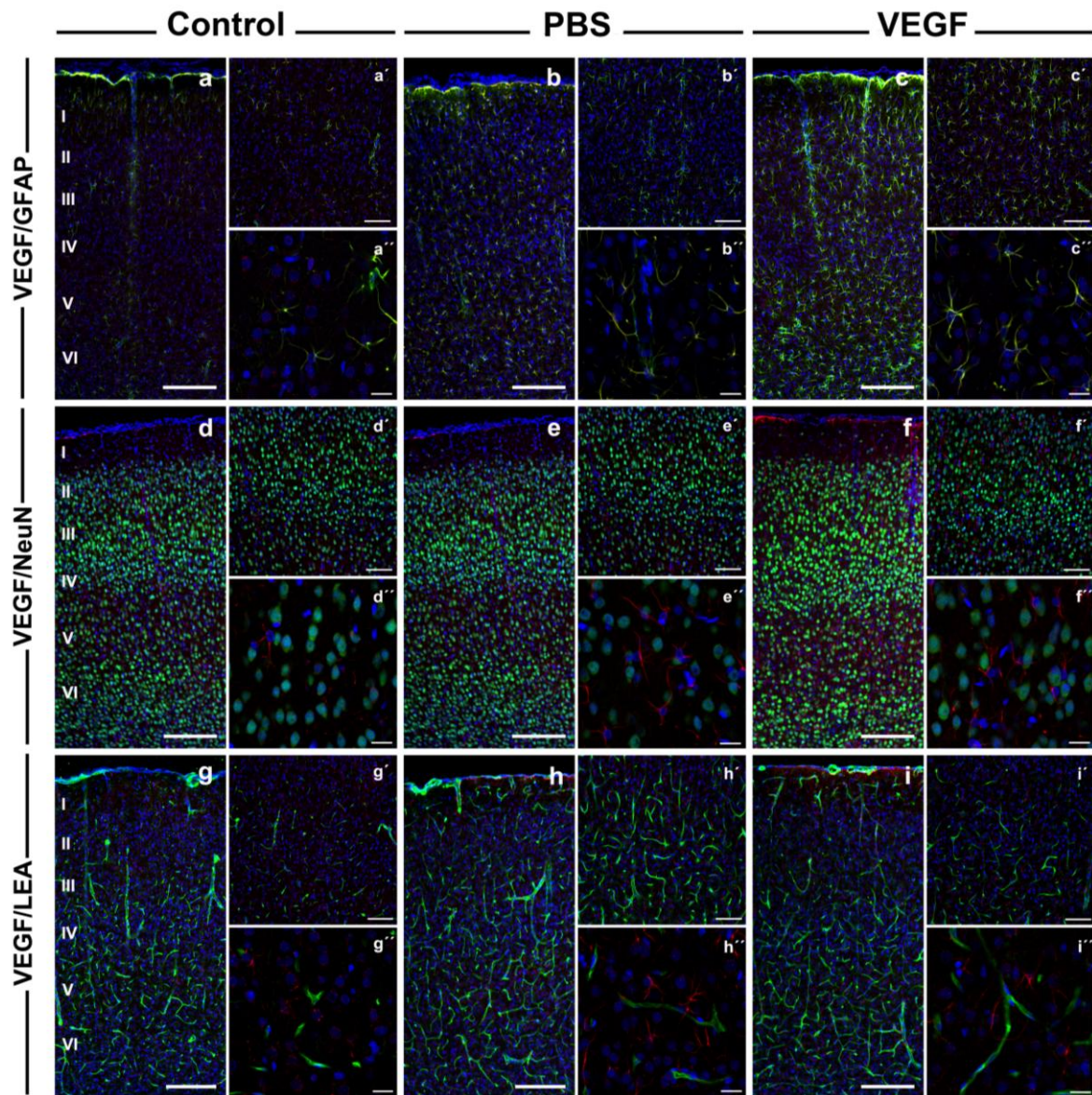


Figura 26. Imágenes de doble inmunofluorescencia frente al VEGF/GFAP (a, b, c), VEGF/NeuN (d, e, f) y VEGF/LEA (g, h, i) en la corteza visual primaria de los grupos experimentales estudiados (Control, PBS y VEGF) en P46. Barra de escala = 200 μm (a-i). Barra de escala = 100 μm (a'-i'). Barra de escala = 20 μm (a''-i'').

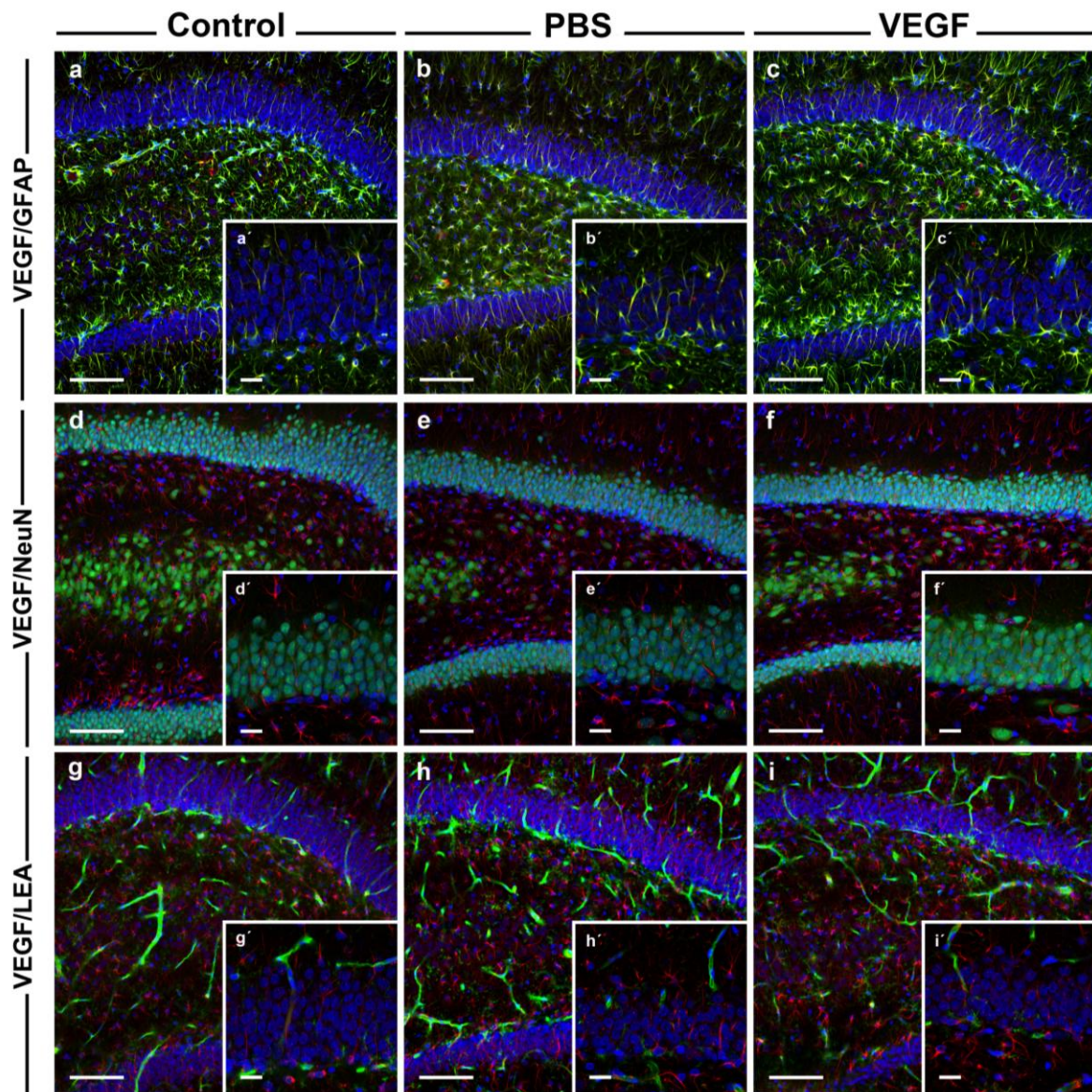


Figura 27. Imágenes de doble inmunofluorescencia frente al VEGF/GFAP (a, b, c), VEGF/NeuN (d, e, f) y VEGF/LEA (g, h, i) en el giro dentado de los grupos experimentales estudiados (Control, PBS y VEGF) en P46. Barra de escala = 100 μm (a-i). Barra de escala = 20 μm (a'-i').

5.2.4. Efecto de la administración del VEGF sobre la densidad neuronal y la red vascular de la corteza visual primaria

En el siguiente apartado se analiza el efecto de la administración intracortical de VEGF en la población neuronal y en la red vascular de la corteza visual primaria tanto en animales criados en condiciones estándar (SC-SC) como en entorno enriquecido (SC-EE). Además, estudiamos el efecto del entorno enriquecido en animales no operados con el fin de conocer los efectos que produce respecto al control.

5. Resultados

Como ya se ha descrito anteriormente, el marcaje de la histoquímica de **Butiril Colinesterasa** es constante dibujando la angioarquitectura de las capas corticales. En este caso también se observa una mayor densidad de vasos en la capa IV (Fig. 28a).

En el marcado inmunohistoquímico de **NeuN** son las capas corticales medias las que mayor densidad muestran (Fig. 28b).

Tanto para la Butiril Colinesterasa como para el marcado de NeuN, todas las condiciones experimentales estudiadas presentan el mismo patrón de expresión.

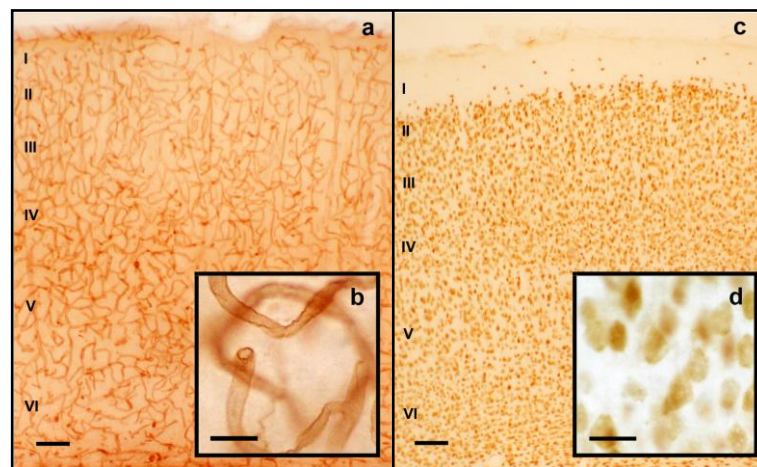


Figura 28. Imágenes de la corteza visual primaria de la rata en P46. Butiril colinesterasa (a, b) y NeuN (c, d).
Barra de escala=100 μm (a, b) y 20 μm (c, d).

El análisis cuantitativo de los resultados se llevó a cabo como se ha descrito en el apartado 5.1.3.

a. Condiciones estándar (SC-SC)

La **densidad vascular** en P46 no presenta diferencias significativas entre los grupos experimentales estudiados. El grupo PBS muestra una densidad un 5% menor que el grupo control en el hemisferio ipsilateral, mientras que el grupo VEGF presenta una densidad un 5% y un 10 % mayor que el grupo control y el grupo PBS respectivamente (Fig. 29a; Tabla 9).

En el hemisferio contralateral la tendencia es similar. La densidad vascular del grupo PBS es un 1% menor que el grupo control. El grupo con infusión de VEGF por su lado, muestra una densidad mayor tanto respecto al grupo control (4%) como al grupo PBS (5%), tratándose todas ellas de diferencias no significativas (Fig. 29a; Tabla 9).

Por lo tanto, la densidad vascular en condiciones estándar en P46 es similar en todos los grupos experimentales.

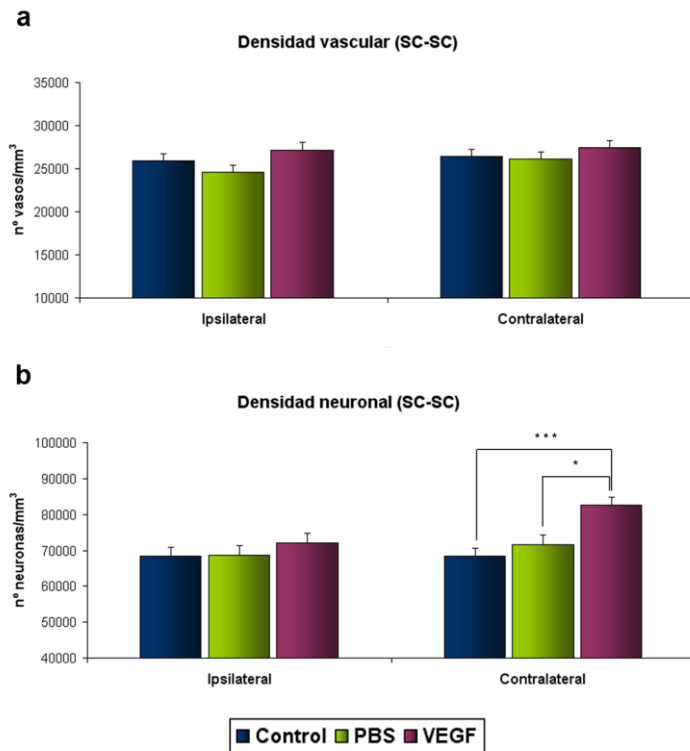


Figura 29. Estudio cuantitativo de los diferentes grupos experimentales (Control, PBS, VEGF) en condiciones estándar (SC-SC) en P46. El eje horizontal muestra los hemisferios ipsilateral (IL) y contralateral (CL). El eje vertical muestra el número de vasos/mm³ (a) y número de neuronas/mm³ (b) de la capa IV de la corteza visual primaria. Media \pm SEM. * p<0.05. *** p<0,001.

Tabla 9. Porcentaje de diferencia de la densidad vascular de la corteza visual primaria y el valor p de los grupos estudiados en el hemisferio ipsilateral (IL) y contralateral (CL) en condiciones estándar en P46.

	PBS vs. Control		VEGF vs. Control		VEGF vs. PBS	
	<i>IL</i>	<i>CL</i>	<i>IL</i>	<i>CL</i>	<i>IL</i>	<i>CL</i>
% Dif.	-5,16	-1,16	4,67	3,67	10,37	4,89
P	1,000	1,000	1,000	1,000	0,464	0,998

En cuanto a la **densidad neuronal**, ésta no muestra diferencias significativas entre los grupos estudiados en el hemisferio ipsilateral. Mientras que el grupo PBS no muestra diferencia respecto al grupo control (0,38%), el grupo VEGF presenta una densidad un 5% mayor que el grupo control y el grupo PBS (Fig. 29b; Tabla 10).

En el hemisferio contralateral, las diferencias encontradas son mayores que en el hemisferio ipsilateral. En este caso, el grupo PBS muestra una densidad un 5% mayor que el grupo control, tratándose de una diferencia no significativa. En cambio, el grupo VEGF

5. Resultados

presenta diferencias significativas respecto al grupo control y al grupo PBS (20% y 15% respectivamente) (Fig. 29b; Tabla 10).

Por lo tanto, al igual que en el caso de la densidad vascular, la densidad neuronal en condiciones estándar en P46 es similar en todos los grupos estudiados.

Tabla 10. Porcentaje de diferencia de la densidad neuronal de la corteza visual primaria y el valor p de los grupos estudiados en el hemisferio ipsilateral (IL) y contralateral (CL) en condiciones estándar en P46.

	PBS vs. Control		VEGF vs. Control		VEGF vs. PBS	
	<i>IL</i>	<i>CL</i>	<i>IL</i>	<i>CL</i>	<i>IL</i>	<i>CL</i>
% Dif.	0,38	4,59	5,39	20,53	4,98	15,24
<i>P</i>	0,977	1,000	0,998	0,000	1,000	0,030

b. Entorno Enriquecido (SC-EE)

La **densidad vascular** en el hemisferio ipsilateral es un 40% menor en el grupo PBS que en el grupo control no operado, tratándose de una diferencia significativa (Fig. 30a; Tabla 11). En cambio, el grupo VEGF muestra una densidad similar a la del grupo control, siendo ésta un 7% mayor en el grupo VEGF. Asimismo, la densidad vascular es significativamente mayor (79%) en el grupo VEGF comparando con el grupo PBS (Fig. 30a; Tabla 11).

La tendencia del hemisferio contralateral es similar a los resultados obtenidos en el hemisferio ipsilateral. La diferencia entre el grupo PBS y el grupo control es del 37%, siendo ésta una diferencia significativa. El grupo VEGF por su lado, muestra una densidad significativamente mayor que el grupo control (15%) y que el grupo PBS (83%) (Fig. 30a; Tabla 11).

Así, los resultados muestran que en condiciones de entorno enriquecido en P46 el grupo VEGF recupera la densidad vascular hasta los niveles del grupo control.

En cuanto a la **densidad neuronal**, los resultados obtenidos en el hemisferio ipsilateral muestran una densidad significativamente menor en el grupo PBS frente al grupo control (20%). El grupo con infusión de VEGF también muestra una densidad un 19% menor que el grupo control, diferencia no significativa. Asimismo, los grupos PBS y VEGF muestran una densidad similar, con una diferencia del 2% (Fig. 30b; Tabla 11) entre sí.

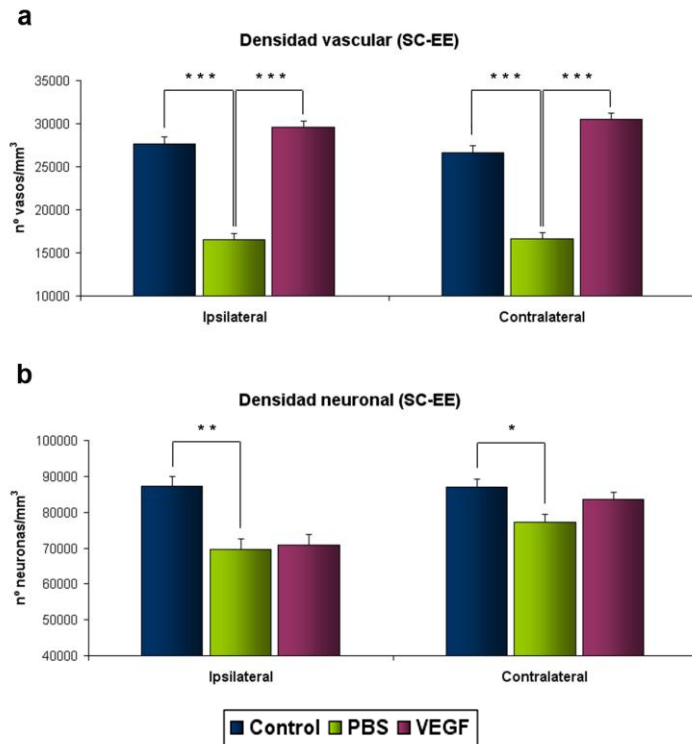


Figura 30. Estudio cuantitativo de los diferentes grupos experimentales (Control, PBS, VEGF) en condiciones de entorno enriquecido (SC-EE) en P46. El eje horizontal muestra los hemisferios ipsilateral (IL) y contralateral (CL). El eje vertical muestra el número de vasos/mm³ (a) y número de neuronas/mm³ (b) de la capa IV de la corteza visual primaria. Media \pm SEM. * p<0,05. ** p<0,01. *** p<0,001.

En el hemisferio contralateral, el grupo PBS muestra una densidad significativamente menor (11%) que el grupo control no operado, diferencia que se reduce hasta el 3% en el caso del grupo VEGF, siendo ésta una diferencia no significativa. Por último, la densidad del grupo con infusión de VEGF, aunque un 8% mayor que en el grupo PBS, no es estadísticamente significativa (Fig. 30b; Tabla 11).

Por tanto, el grupo control es el que mayor densidad neuronal muestra seguido por el grupo VEGF en condiciones de entorno enriquecido en P46.

Tabla 11. Porcentaje de diferencia de la densidad vascular de la corteza visual primaria y el valor p de los grupos estudiados en el hemisferio ipsilateral (IL) y contralateral (CL) en condiciones de entorno enriquecido en P46.

	PBS vs. Control		VEGF vs. Control		VEGF vs. PBS	
	<i>IL</i>	<i>CL</i>	<i>IL</i>	<i>CL</i>	<i>IL</i>	<i>CL</i>
% Dif.	-40,39	-37,11	6,84	15,37	79,26	83,46
P	0,000	0,000	1,000	0,014	0,000	0,000

5. Resultados

Tabla 12. Porcentaje de diferencia de la densidad neuronal de la corteza visual primaria y el valor p de los grupos estudiados en el hemisferio ipsilateral (IL) y contralateral (CL) en condiciones de entorno enriquecido en P46.

	PBS vs. Control		VEGF vs. Control		VEGF vs. PBS	
	<i>IL</i>	<i>CL</i>	<i>IL</i>	<i>CL</i>	<i>IL</i>	<i>CL</i>
% Dif.	-20,34	-11,31	-18,90	-3,93	1,81	8,31
P	0,001	0,044	0,074	1,000	1,000	0,477

c. Efecto del entorno enriquecido (SC-EE vs. SC-SC)

Los resultados obtenidos en la **densidad vascular** en P46 muestran que el grupo de entorno enriquecido presenta una densidad algo mayor frente al grupo de condiciones estándar en los grupos control (7% en el hemisferio IL y 0.60% en el contralateral) y VEGF (9% y 11% en el hemisferio IL y CL respectivamente), tratándose todas ellas de diferencias no significativas (Fig. 31 a, e; Tabla 13). En cambio, en el grupo PBS la densidad vascular del grupo criado en entorno enriquecido muestra una densidad significativamente menor en ambos hemisferios (33% en el hemisferio IL y 36% en el hemisferio CL) (Fig. 31 c; Tabla 13).

En cuanto a la **densidad neuronal**, la aplicación del entorno enriquecido en el grupo control produce un aumento significativo en el grupo control no operado (28% en el hemisferio ipsilateral y 27% en el hemisferio contralateral) (Fig. 31b; Tabla 14). En el caso de los grupos con implantación de bomba osmótica, no se han encontrado diferencias estadísticamente significativas entre las dos condiciones de cría. En el hemisferio ipsilateral, el grupo SC-EE muestra una densidad un 1% mayor en el caso del grupo PBS y un 1% menor en el caso del grupo con infusión del péptido VEGF. En el hemisferio contralateral, la densidad neuronal es un 7% y un 1% mayor en el grupo criado en condiciones de entorno enriquecido en el grupo PBS y VEGF respectivamente (Fig. 31 d, f; Tabla 14).

Por lo tanto, el enriquecimiento ambiental sólo produce cambios significativos en la densidad neuronal del grupo control no operado tras aplicarlo durante 4 semanas.

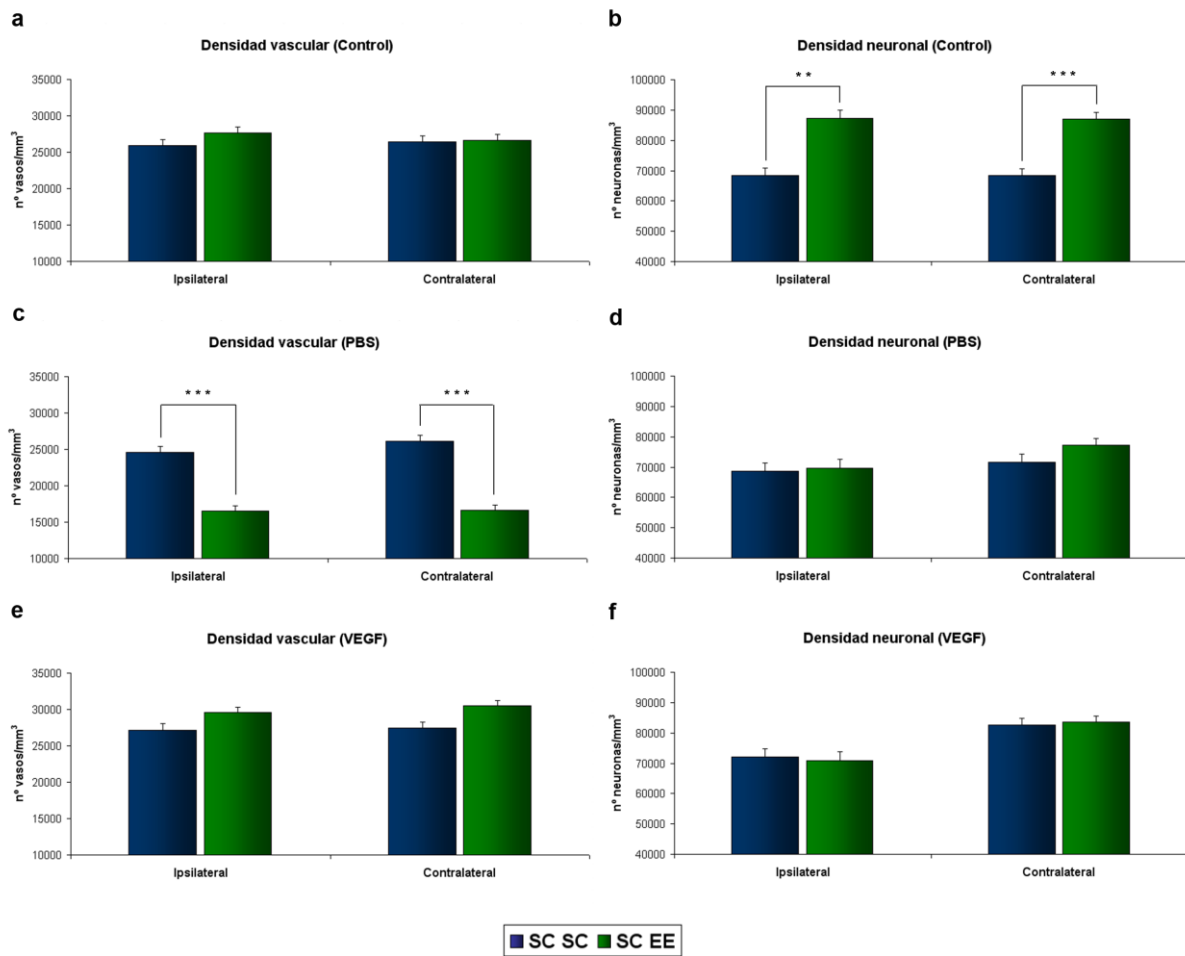


Figura 31. Estudio cuantitativo de las distintas condiciones visuales (SC-SC, SC-EE) en la corteza visual primaria en P46. El eje horizontal muestra los hemisferios ipsilateral y contralateral. El eje vertical muestra el número de vasos/mm³ (a) y el número de neuronas/mm³ (b) de la capa IV de la corteza visual primaria. Media \pm SEM. ** p<0,01. *** p<0,001.

Tabla 13. Porcentaje de diferencia de la densidad vascular de la corteza visual primaria y el valor p de los animales criados en entorno enriquecido (SC-EE) y en condiciones estándar (SC-SC) en el hemisferio ipsilateral (IL) y contralateral (CL) en P46.

	SC-EE vs. SC-SC					
	Control		PBS		VEGF	
	<i>IL</i>	<i>CL</i>	<i>IL</i>	<i>CL</i>	<i>IL</i>	<i>CL</i>
% Dif.	6,69	0,60	-32,94	-36,36	8,90	11,28
P	1,000	1,000	0,000	0,000	0,564	0,179

5. Resultados

Tabla 14. Porcentaje de diferencia de la densidad neuronal de la corteza visual primaria y el valor p de los animales criados en entorno enriquecido (SC-EE) y en condiciones estándar (SC-SC) en el hemisferio ipsilateral (IL) y contralateral (CL) en P46.

	SC-EE vs. SC-SC					
	Control		PBS		VEGF	
	<i>IL</i>	<i>CL</i>	<i>IL</i>	<i>CL</i>	<i>IL</i>	<i>CL</i>
% Dif.	27,64	26,99	1,42	7,68	-1,63	1,21
P	0,001	0,000	1,000	1,000	1,000	1,000

5.2.5. Análisis del efecto de la administración del VEGF en la expresión de ERK1/2 fosforilado

En el siguiente apartado analizamos el efecto de la administración del VEGF en la expresión de ERK1/2.

a. Condiciones estándar

En animales criados en condiciones estándar, no se observan diferencias significativas los niveles de ERK1/2 fosforilado de los grupos experimentales estudiados. Tanto el grupo con infusión de PBS (98%) como el grupo con infusión de VEGF (106%) muestran niveles similares al grupo control no operado ($p=1,000$ en todos los grupos) (Fig. 32).

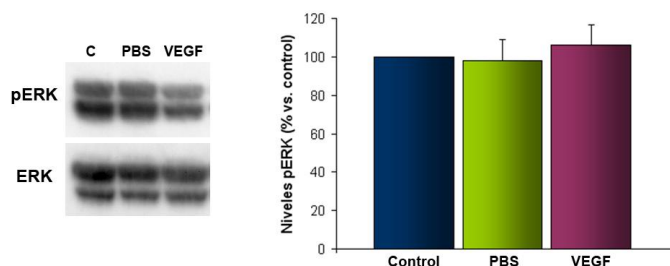


Figura 32. Niveles de ERK1/2 fosforilado en P46. El eje vertical muestra el porcentaje de los niveles de fosforilación de los grupos experimentales frente al control. El eje horizontal muestra los distintos grupos estudiados (Control, PBS y VEGF). Media \pm SEM.

b. Entorno enriquecido

En animales criados condiciones de enriquecimiento ambiental no se han encontrado diferencias estadísticamente significativas en los niveles de ERK1/2 fosforilado. A pesar de

ello, los resultados muestran una disminución de los niveles de fosforilación en el grupo con infusión de PBS (62%) frente al grupo control ($p=0,164$) y al grupo VEGF (109%) ($p=0,154$). Los niveles del grupo con infusión de VEGF permanecen similares al grupo control ($p=1,000$) (Fig. 33).

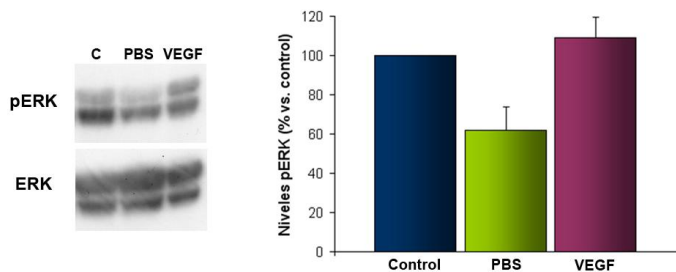


Figura 33. Niveles de ERK1/2 fosforilado en P46. El eje vertical muestra el porcentaje de los niveles de fosforilación de los grupos experimentales frente al control. El eje horizontal muestra los distintos grupos estudiados (Control, PBS y VEGF). Media \pm SEM.

5.2.6. Efecto de la administración del VEGF sobre la densidad neuronal y la red vascular del giro dentado

En el siguiente apartado se analiza el efecto de la administración intracortical del VEGF en la población neuronal y en la red vascular del giro dentado del hipocampo tanto en animales criados en condiciones estándar (SC-SC) como en entorno enriquecido (SC-EE).

El marcado de la histoquímica de **Butiril Colinesterasa** pone de manifiesto las capas del giro dentado. Si bien el marcaje es constante, se observa una mayor densidad de vasos en la capa molecular (Fig. 34a).

El marcado neuronal mediante la inmunohistoquímica frente al antígeno **NeuN** muestra la distribución por capas, observándose una mayor densidad en la capa granular seguida por la capa polimórfica y por último, la capa molecular del giro dentado (Fig. 34b).

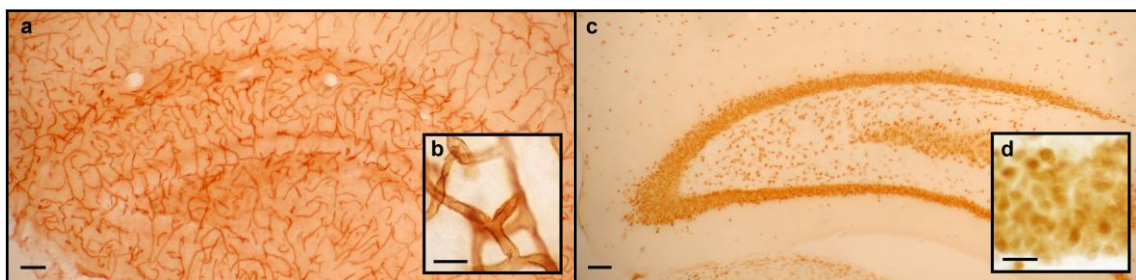


Figura 34. Imágenes del giro dentado de la rata en P46. Butiril colinesterasa (a, b) y NeuN (c, d). Barra de escala=100 μ m (a, b) y 20 μ m (c, d).

5. Resultados

a. Condiciones estándar (SC-SC)

La **densidad vascular** del giro dentado no muestra diferencias significativas entre los grupos experimentales estudiados en condiciones estándar. En el hemisferio ipsilateral, el grupo con infusión de PBS muestra una densidad un 3% menor que el grupo control (no operado), mientras el grupo VEGF muestra una densidad un 3% mayor que el grupo control. La diferencia entre el grupo VEGF y PBS es del 7%, siendo el grupo VEGF el que mayor densidad vascular presenta (Fig. 35a; Tabla 15).

Los resultados son similares en el hemisferio contralateral. El grupo PBS es el grupo que menor densidad muestra, un 5% y un 11% menor que el grupo control y el grupo con infusión de VEGF respectivamente. Por último, el grupo VEGF muestra una densidad vascular un 6% mayor que el grupo no operado (Fig. 35a; Tabla 15).

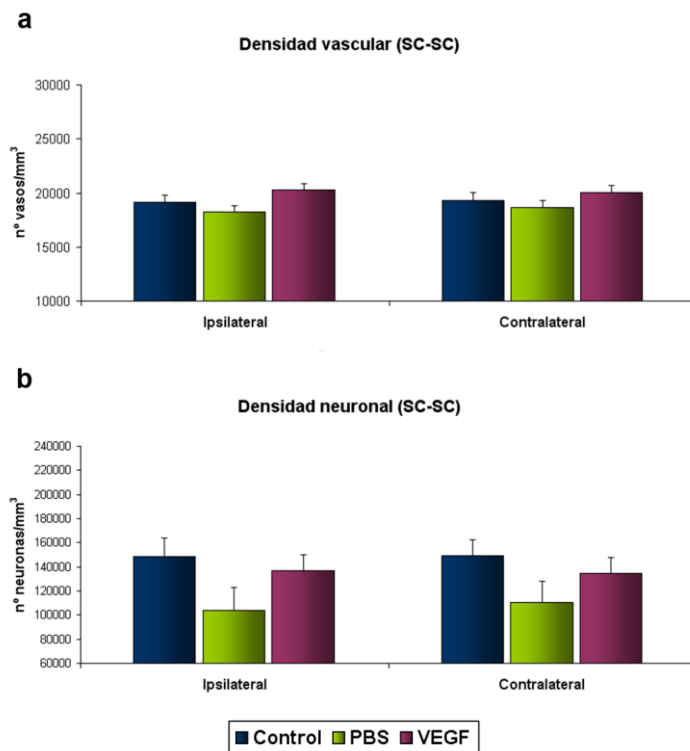


Figura 35. Estudio cuantitativo de los diferentes grupos experimentales (Control, PBS, VEGF) en condiciones estándar (SC-SC) en P46. El eje horizontal muestra los hemisferios ipsilateral (IL) y contralateral (CL). El eje vertical muestra el número de vasos/mm³ (a) del giro dentado y número de neuronas/mm³ (b) de la capa granular. Media \pm SEM.

La **densidad neuronal** se cuantificó en la capa granular del giro dentado. Los resultados si bien no muestran diferencias significativas entre los grupos experimentales estudiados, presentan una misma tendencia en los dos hemisferios. En el lado ipsilateral, el grupo PBS muestra una densidad neuronal un 30% y un 31% menor que el grupo control y el grupo VEGF respectivamente, mientras que en el hemisferio contralateral las diferencias son del 26% y 22%. Por último, la densidad neuronal del grupo VEGF es un 8% menor en el hemisferio IL y un 9% menor en el hemisferio CL que el grupo control no operado (Fig. 35b, Tabla 16).

Por lo tanto, si bien no se han encontrado diferencias significativas entre los grupos experimentales, se observa una clara tendencia en la capa granular del giro dentado, siendo el grupo PBS el que menor densidad neuronal presenta.

Tabla 15. Porcentaje de diferencia de la densidad vascular del giro dentado y el valor p de los grupos estudiados en el hemisferio ipsilateral (IL) y contralateral (CL) en condiciones estándar en P46.

	PBS vs. Control		VEGF vs. Control		VEGF vs. PBS	
	<i>IL</i>	<i>CL</i>	<i>IL</i>	<i>CL</i>	<i>IL</i>	<i>CL</i>
% Dif.	-3,39	-4,87	3,72	5,82	7,37	11,24
P	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	0,162

Tabla 16. Porcentaje de diferencia de la densidad neuronal de la capa granular del giro dentado y el valor p de los grupos estudiados en el hemisferio ipsilateral (IL) y contralateral (CL) en condiciones estándar en P46.

	PBS vs. Control		VEGF vs. Control		VEGF vs. PBS	
	<i>IL</i>	<i>CL</i>	<i>IL</i>	<i>CL</i>	<i>IL</i>	<i>CL</i>
% Dif.	-29,84	-25,80	-7,93	-9,5	31,2	21,9
P	0,131	1,000	1,000	1,000	0,843	1,000

b. Entorno Enriquecido (SC-EE)

Los resultados obtenidos sobre la **densidad vascular** muestran diferencias entre los grupos experimentales estudiados. El grupo PBS muestra una densidad un 34% menor que el grupo control en ambos hemisferios, tratándose de diferencias estadísticamente significativas (Fig. 36a; Tabla 17). En cambio, el grupo con infusión de VEGF presenta una densidad vascular similar al grupo control, un 2% y un 1% mayor en el hemisferio ipsilateral y contralateral respectivamente. Por último, la diferencia entre el grupo VEGF y el grupo PBS también es significativa, siendo ésta un 56% mayor en el hemisferio ipsilateral y un 52% mayor en el hemisferio contralateral del grupo VEGF (Fig. 36a; Tabla 17).

Así, el grupo PBS muestra una densidad vascular significativamente menor que el grupo control y el grupo VEGF en condiciones de entorno enriquecido.

5. Resultados

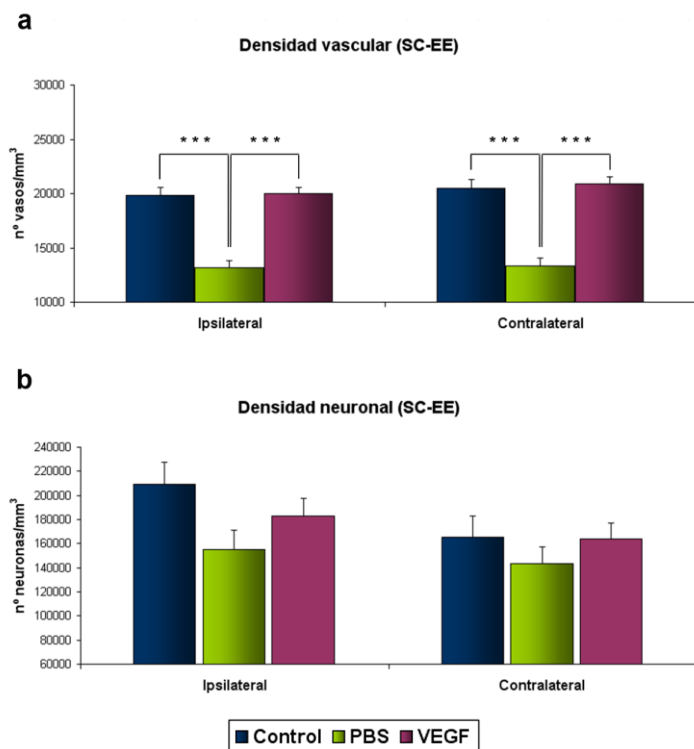


Figura 36. Estudio cuantitativo de los diferentes grupos experimentales (Control, PBS, VEGF) en condiciones de entorno enriquecido (SC-EE) en P46. El eje horizontal muestra los hemisferios ipsilateral (IL) y contralateral (CL). El eje vertical muestra el número de vasos/mm³ (a) del giro dentado y el número de neuronas/mm³ (b) de la capa granular. Media \pm SEM. *** p<0,001.

La **densidad neuronal** de la capa granular no muestra diferencias estadísticamente significativas entre los grupos estudiados. En el hemisferio ipsilateral el grupo con infusión de PBS presenta una densidad 26% menor que el grupo control, mientras que en el caso del grupo VEGF la diferencia se reduce al 12% (Fig. 36b; Tabla 18). En cambio, en el hemisferio contralateral la densidad neuronal del grupo PBS y del grupo VEGF es 13% y 1% menor que en el grupo control no operado. Por último, el grupo VEGF muestra una densidad 18% y 14% mayor en el hemisferio IL y CL respectivamente (Fig. 36b; Tabla 18).

Tabla 17. Porcentaje de diferencia de la densidad vascular del giro dentado y el valor p de los grupos estudiados en el hemisferio ipsilateral (IL) y contralateral (CL) en condiciones de entorno enriquecido en P46.

	PBS vs. Control		VEGF vs. Control		VEGF vs. PBS	
	<i>IL</i>	<i>CL</i>	<i>IL</i>	<i>CL</i>	<i>IL</i>	<i>CL</i>
% Dif.	-34,71	-33,62	2,17	0,80	56,50	51,97
P	0,000	0,000	1,000	1,000	0,000	0,000

Tabla 18. Porcentaje de diferencia de la densidad neuronal de la capa granular del giro dentado y el valor p de los grupos estudiados en el hemisferio ipsilateral (IL) y contralateral (CL) en condiciones de entorno enriquecido en P46.

	PBS vs. Control		VEGF vs. Control		VEGF vs. PBS	
	<i>IL</i>	<i>CL</i>	<i>IL</i>	<i>CL</i>	<i>IL</i>	<i>CL</i>
% Dif.	-25,86	-13,28	-12,64	-0,92	17,83	14,25
<i>P</i>	0,513	1,000	0,998	1,000	0,989	1,000

c. Efecto del entorno enriquecido (SC-EE vs. SC-SC)

En la **densidad vascular** del giro dentado, el grupo control sin operar no muestra diferencias significativas si bien el que el grupo criado en entorno enriquecido muestra un aumento de la densidad frente al grupo criado en condiciones estándar (6% y 3% en el hemisferio ipsilateral y contralateral respectivamente) (Fig. 37a; Tabla 19). En el caso del grupo con infusión de PBS, el grupo criado en SC-EE muestra una disminución significativa (28%) en ambos hemisferios (Fig. 37c; Tabla 19). El grupo con infusión de VEGF tampoco muestra diferencias estadísticamente significativas. En el hemisferio ipsilateral el grupo criado en SC-EE muestra una densidad un 4% mayor y un 1% menor en el hemisferio contralateral (Fig. 37e; Tabla 19).

En lo que a la **densidad neuronal** respecta, aunque no se han hallado diferencias significativas, el grupo criado en entorno enriquecido muestra una tendencia al aumento de la densidad en todos los grupos experimentales. En el hemisferio ipsilateral se ha encontrado una densidad neuronal un 41%, un 49% y un 33% mayor en los animales criados en SC-EE (grupo control, PBS y VEGF respectivamente) frente a aquellos criados en SC-SC (Fig. 37b, d, f; Tabla 20). En el hemisferio contralateral la tendencia es la misma. Mientras que el grupo control muestra una densidad un 11% mayor, el grupo PBS y VEGF muestran una densidad un 30% y un 21% mayor respectivamente (Fig. 37b, d, f; Tabla 20) respecto al grupo criado en condiciones estándar.

5. Resultados

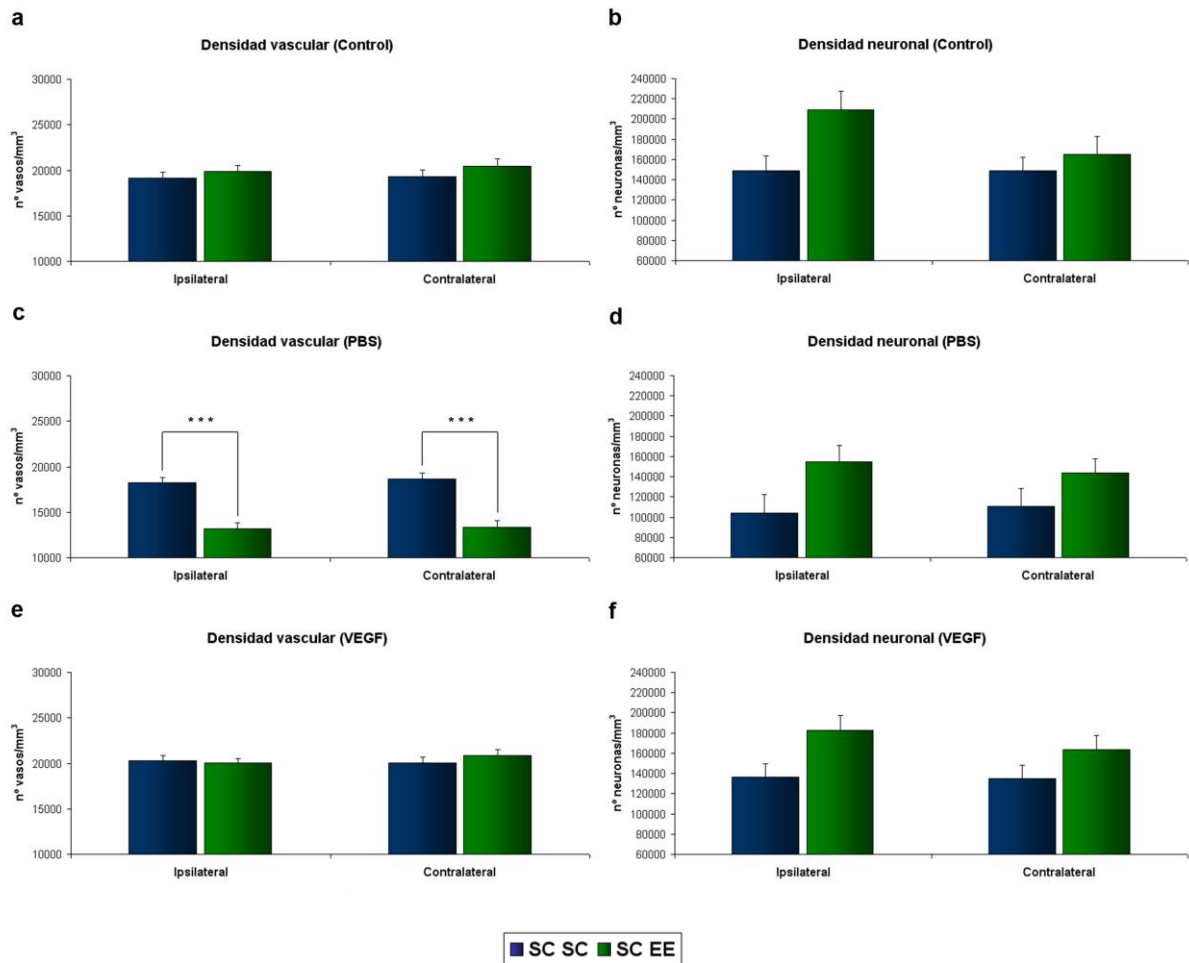


Figura 37. Estudio cuantitativo de las distintas condiciones visuales (SC-SC, SC-EE) en el giro dentado en P46. El eje horizontal muestra los hemisferios ipsilateral y contralateral. El eje vertical muestra el número de vasos/mm³ (a, c, e) del giro dentado y el número de neuronas/mm³ (b, d, f) de la capa granular del giro dentado. Media \pm SEM. *** p<0,001.

Tabla 19. Porcentaje de diferencia de la densidad vascular del giro dentado y el valor p de los animales criados en entorno enriquecido (SC-EE) y en condiciones estándar (SC-SC) en el hemisferio ipsilateral (IL) y contralateral (CL) en P46.

	SC-EE vs. SC-SC					
	Control		PBS		VEGF	
	<i>IL</i>	<i>CL</i>	<i>IL</i>	<i>CL</i>	<i>IL</i>	<i>CL</i>
% Dif.	5,93	3,64	-28,41	-27,73	4,33	-1,27
<i>P</i>	1,000	1,000	0,000	0,000	1,000	1,000

Tabla 20. Porcentaje de diferencia de la densidad neuronal de la capa granular del giro dentado y el valor p de los animales criados en entorno enriquecido (SC-EE) y en condiciones estándar (SC-SC) en el hemisferio ipsilateral (IL) y contralateral (CL) en P46.

	SC-EE vs. SC-SC					
	Control		PBS		VEGF	
	<i>IL</i>	<i>CL</i>	<i>IL</i>	<i>CL</i>	<i>IL</i>	<i>CL</i>
% Dif.	40,87	10,92	48,86	29,64	33,66	21,49
P	0,199	1,000	0,261	1,000	0,607	1,000

5.2.7. Efecto de la administración del VEGF sobre el aprendizaje y la memoria visuoespacial

El estudio del efecto del VEGF sobre el aprendizaje y la memoria espacial se llevó a cabo únicamente durante la administración de 4 semanas, ya que el protocolo utilizado para el estudio no permitía realizarlo en el caso de la administración de 1 semana. En este apartado analizamos el efecto de dicha administración sobre el aprendizaje y la memoria en animales criados en condiciones estándar (SC-SC) y en condiciones de entorno enriquecido (SC-EE).

a. Condiciones estándar (SC-SC)

A pesar de que la curva de aprendizaje se observa en todos los grupos experimentales, las latencias de cada día de adquisición muestran diferencias entre los grupos experimentales estudiados. Los resultados indican que el grupo VEGF necesitó significativamente menos tiempo que el grupo control en encontrar la plataforma escondida los días 1 ($p=0,005$), 2 ($p=0,001$) y 5 ($p=0,003$) de la prueba (Fig. 38). Además, el grupo VEGF también mostró una diferencia significativa respecto al grupo PBS el 2º día de adquisición ($p=0,009$) (Fig. 38). Por lo tanto, la latencia del grupo VEGF es menor que la de los grupos PBS y control.

Tras realizar el test de aprendizaje, se retiró la plataforma para medir el porcentaje de tiempo que pasan los animales en el cuadrante donde se ubicaba dicha plataforma y estudiar así, la memoria a largo plazo.

5. Resultados

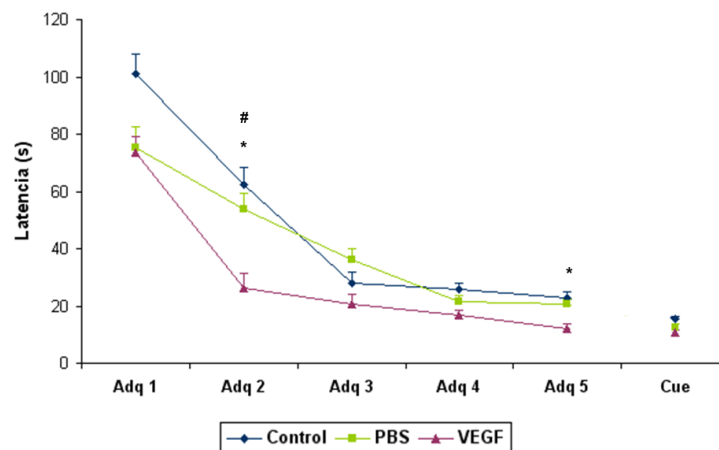


Figura 38. Estudio del aprendizaje en los diferentes grupos experimentales (Control, PBS, VEGF) en condiciones estándar (SC-SC). El eje horizontal muestra los días de adquisición (Adq 1, Adq 2, Adq 3, Adq 4, Adq 5) y el día Cue para la medición de la motivación sensorial. El eje vertical muestra la latencia de escape a la plataforma. Media \pm SEM. * Significancia del grupo control vs. VEGF ($p < 0,05$). # Significancia del grupo PBS vs. VEGF ($p < 0,05$).

En el cuadrante sudoeste (SE), si bien no se encontraron diferencias entre los grupos experimentales estudiados (40,63% grupo control; 40,70% grupo PBS; 40,11% grupo VEGF), es el cuadrante en el que mayor permanecen. Los resultados del cuadrante sudoeste (SO) tampoco muestran diferencias entre los grupos estudiados (20,42% grupo control; 31,35% grupo PBS; 22,66% grupo VEGF), al igual que en el cuadrante noroeste (NO), en el que encontramos una media de 26,48% en el grupo control, 19,92% en el grupo PBS y 20,34% en el grupo VEGF. Por último, en el cuadrante nordeste (NE), el grupo PBS (6,94%) mostró una diferencia significativa respecto al grupo VEGF (20,53%; $p = 0,006$), pero no respecto al grupo control (12,46%) (Fig. 39). Por lo tanto, la ausencia de diferencias significativas en el cuadrante SE indica que ni la implantación ni la administración de VEGF afectan a la memoria a largo plazo en condiciones estándar (Fig. 39).

El test de reaprendizaje se llevó a cabo durante 3 días en los cuales se midió la latencia de los animales en encontrar la nueva ubicación de la plataforma. Los resultados obtenidos muestran que todos los grupos aprenden la nueva ubicación de la plataforma pero no se hallaron diferencias significativas entre los grupos experimentales estudiados (Fig. 40). Así, podemos observar que la tendencia durante el reaprendizaje fue similar a la observada durante el aprendizaje, y al igual que ocurre con la memoria, la implantación y la administración de VEGF no parece afectar significativamente a este proceso (Fig. 40).

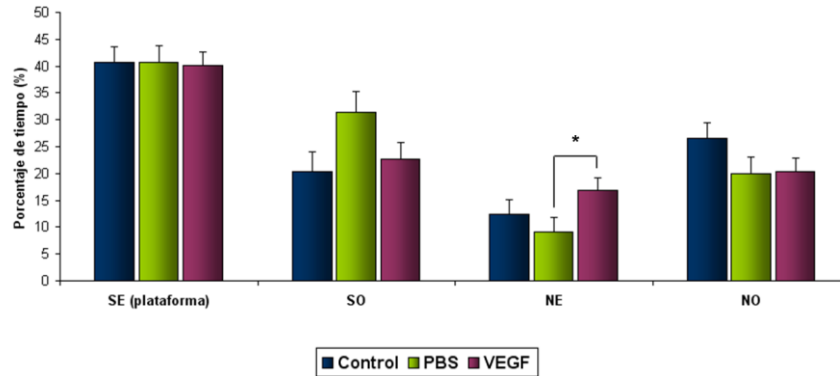


Figura 39. Estudio de la memoria a largo plazo en los diferentes grupos experimentales (Control, PBS, VEGF) en condiciones estándar (SC-SC). El eje horizontal muestra los cuadrantes de la piscina (SE, SO, NE, NO). El eje vertical muestra el porcentaje de tiempo empleado en cada uno de los cuadrantes. Media \pm SEM. * $p < 0,05$.

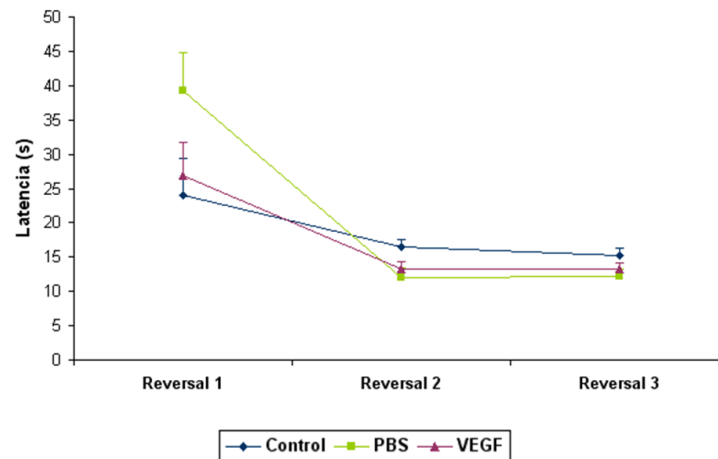


Figura 40. Estudio del reaprendizaje (reversal learning) en los diferentes grupos experimentales (Control, PBS, VEGF) en condiciones estándar (SC-SC). El eje horizontal muestra los días de entrenamiento (Reversal 1, Reversal 2, Reversal 3). El eje vertical muestra la latencia de escape de la plataforma. Media \pm SEM.

b. Entorno Enriquecido (SC-EE)

Todos los grupos experimentales muestran una curva de aprendizaje aunque se observan diferencias entre los grupos estudiados. El análisis de las latencias de cada día de adquisición muestra diferencias entre el grupo PBS y el grupo control los días 2 ($p=0,000$) y 3 ($p=0,001$) de adquisición y el día Cue ($p=0,026$), siendo el grupo PBS el que más tiempo necesitó para encontrar la plataforma (Fig. 41). Además, el grupo VEGF también muestra una diferencia significativa respecto al grupo PBS los días 3 ($p=0,000$) y 5 ($p=0,010$) de la fase de aprendizaje, pero no así frente al grupo control (Fig. 41).

5. Resultados

Por lo tanto, como se observa en la curva de aprendizaje, las latencias de los grupos VEGF y control son similares entre sí y menores que la mostrada por el grupo PBS.

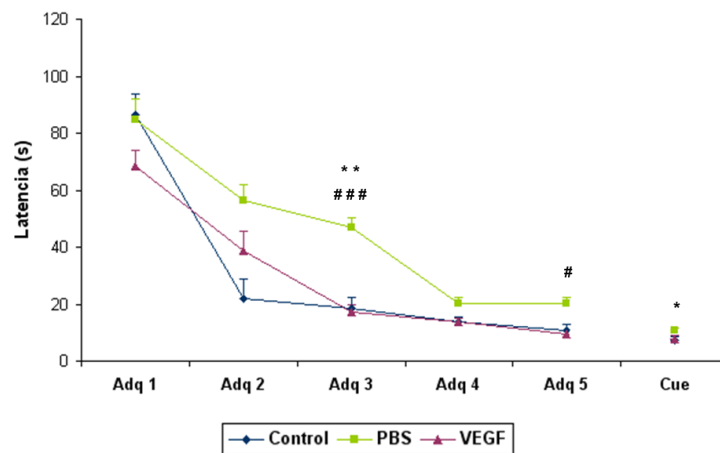


Figura 41. Estudio del aprendizaje de los diferentes grupos experimentales (Control, PBS, VEGF) en condiciones de entorno enriquecido (SC-EE). El eje horizontal muestra los días de adquisición (Adq 1, Adq 2, Adq 3, Adq 4, Adq 5) y el día Cue para la medición de la motivación sensorial. El eje vertical muestra la latencia de escape a la plataforma. Media \pm SEM. * Significancia del grupo control vs. PBS ($p < 0,05$). ** Significancia del grupo control vs. PBS ($p < 0,01$). # Significancia del grupo PBS vs. VEGF ($p < 0,05$). ### Significancia del grupo PBS vs. VEGF ($p < 0,001$).

Tras realizar el test de aprendizaje, se retiró la plataforma para medir el porcentaje de tiempo que pasan los animales en el cuadrante de la plataforma para medir así, la memoria a largo plazo. En el cuadrante de la plataforma (cuadrante sudoeste (SE)), se observó una diferencia significativa del grupo PBS frente al grupo VEGF ($p = 0,043$), que permaneció más tiempo en dicho cuadrante. Las medias encontradas han sido las siguientes: 33,32% grupo control; 22,38% grupo PBS; 35,37% grupo VEGF. En cambio, en los cuadrantes sudoeste (SO) y nordeste (NE) no se encuentran diferencias significativas entre los grupos estudiados (33,51% grupo control, 20,26% grupo PBS, 26,13% grupo VEGF en el cuadrante SO; 11,15% grupo control, 16,68% grupo PBS, 16,17% grupo VEGF en el cuadrante NE). Por último, en el cuadrante noroeste (NO), el grupo PBS (40,66%) muestra diferencias significativas tanto frente al grupo control (22%; $p = 0,002$) como frente al grupo VEGF (24,46%; $p = 0,003$) (Fig. 42).

Por lo tanto, la diferencia significativa del cuadrante SE muestra que la administración de VEGF recupera los efectos de la implantación de la bomba osmótica (grupo con infusión de vehículo) en la memoria a largo plazo en condiciones de entorno enriquecido.

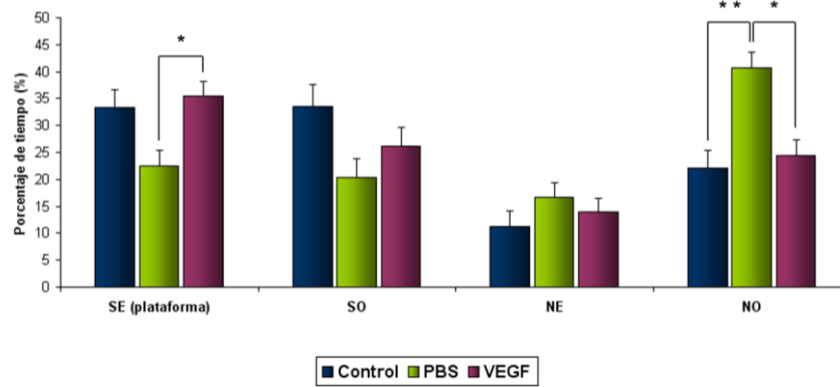


Figura 42. Estudio de la memoria a largo plazo de los diferentes grupos experimentales (Control, PBS, VEGF) en condiciones de entorno enriquecido (SC-EE). El eje horizontal muestra los cuadrantes de la piscina (SE, SO, NE, NO). El eje vertical muestra el porcentaje de tiempo empleado en cada uno de los cuadrantes. Media \pm SEM. * $p < 0,05$. ** $p < 0,01$.

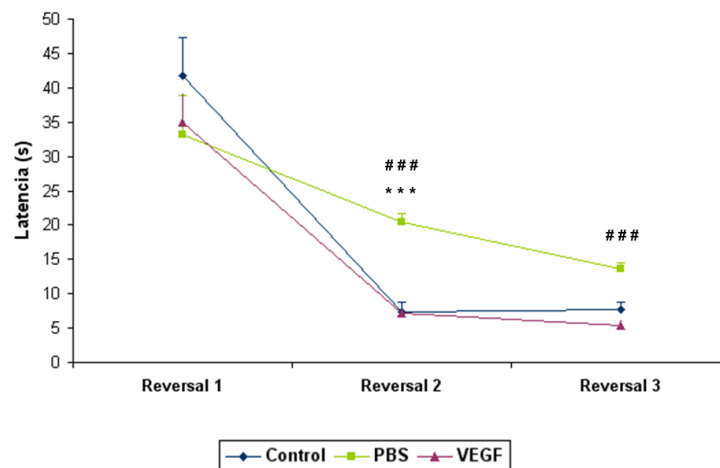


Figura 43. Estudio de la plasticidad del aprendizaje de los diferentes grupos experimentales (Control, PBS, VEGF) en condiciones de entorno enriquecido (SC-EE). El eje horizontal muestra los días de entrenamiento (Reversal 1, Reversal 2, Reversal 3). El eje vertical muestra la latencia de escape de la plataforma. Media \pm SEM. *** Significancia del grupo PBS vs. control ($p < 0,001$). ### Significancia del grupo PBS vs. VEGF ($p < 0,001$).

El test de reaprendizaje se llevó a cabo durante 3 días en los cuales se midió la latencia de los animales en encontrar la nueva ubicación de la plataforma. Los resultados obtenidos muestran que los grupos control y VEGF aprenden más rápido la nueva ubicación de la plataforma comparando con el grupo PBS. Así, los días 2 y 3 del test, el grupo PBS presenta una mayor latencia que los grupos control ($p = 0,000$ y $p = 0,018$ respectivamente) y VEGF ($p = 0,000$ ambos días), tratándose de diferencias significativas en ambos casos (Fig. 43). Por lo

5. Resultados

tanto, los resultados muestran que tanto el grupo control como el grupo VEGF presentan una latencia menor que el grupo PBS durante el reaprendizaje (reversal test) en condiciones de entorno enriquecido.

c. Efecto del entorno enriquecido (SC EE vs. SC SC)

La aplicación de entorno enriquecido en el grupo control produce una mejora del aprendizaje. El grupo SC EE presenta una menor latencia a lo largo de la curva de aprendizaje, encontrando diferencias significativas en las latencias de los días 2 ($p=0,000$), 4 ($p=0,003$), 5 ($p=0,001$) y Cue ($p=0,002$) del test (Fig. 44a). En los grupos PBS y VEGF, si bien se observa la curva de aprendizaje, no se encuentran diferencias significativas en ninguno de los días de la prueba entre el grupo criado en condiciones estándar y en entorno enriquecido (Fig. 44b, c). Por lo tanto, en animales control el entorno enriquecido mejora el aprendizaje, pero no así en los demás grupos experimentales.

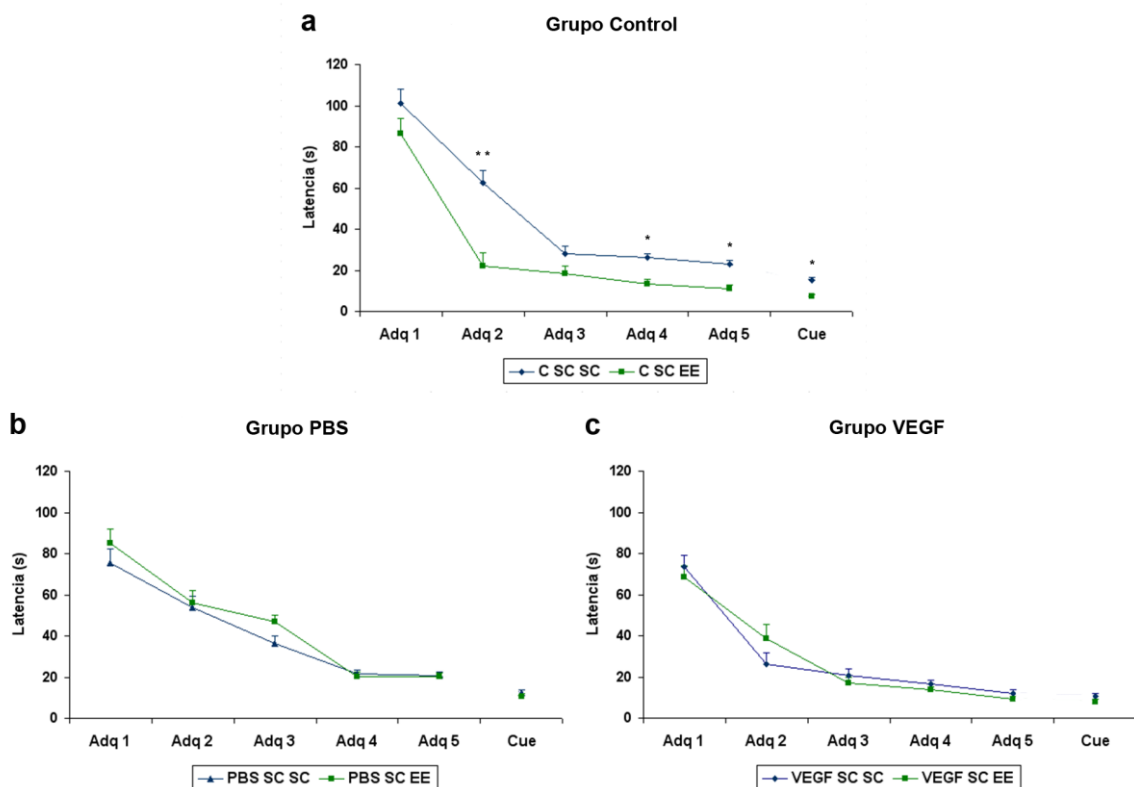


Figura 44. Estudio del efecto del entorno enriquecido sobre el aprendizaje en cada uno de los grupos experimentales (control, PBS, VEGF). El eje horizontal muestra los días del test (Adq 1, Adq 2, Adq 3, Adq 4, Adq 5) y el día Cue para la medición de la motivación sensorial). El eje vertical muestra la latencia de escape a la plataforma. Media \pm SEM. * $p<0,05$. ** $p<0,01$.

En el caso de la memoria, no se observan efectos del entorno enriquecido en el grupo control y en el grupo con infusión de VEGF (Fig. 45a, c). En el grupo control las medias del grupo criado en condiciones estándar y en entorno enriquecido son las siguientes: 40% y 33% en el cuadrante SE, 20% y 33% en el cuadrante SO, 12% y 11% en el cuadrante NE, y 26% y 22% en el cuadrante NO respectivamente. El grupo VEGF por su lado, muestra medias de 40% y 35% en el cuadrante SE, 22% y 26% en el cuadrante SO, 20% y 16% en el cuadrante NE, y 20% y 24% en el cuadrante NO (condiciones estándar y entorno enriquecido respectivamente) (Fig. 45c). En el caso del grupo PBS en cambio, el grupo de entorno enriquecido pasa significativamente menos tiempo en el cuadrante de la plataforma comparando con el grupo de condiciones estándar (40% vs. 35%; $p=0,002$) (Fig. 45b). Por el contrario, en los cuadrantes SO y NE no se han encontrado diferencias (SO: 31% vs. 20%; NE: 6% vs. 16%), y en el cuadrante NO el grupo criado en condiciones de enriquecimiento muestra una diferencia significativa respecto al criado en condiciones estándar (19% vs. 40%; $p=0,000$).

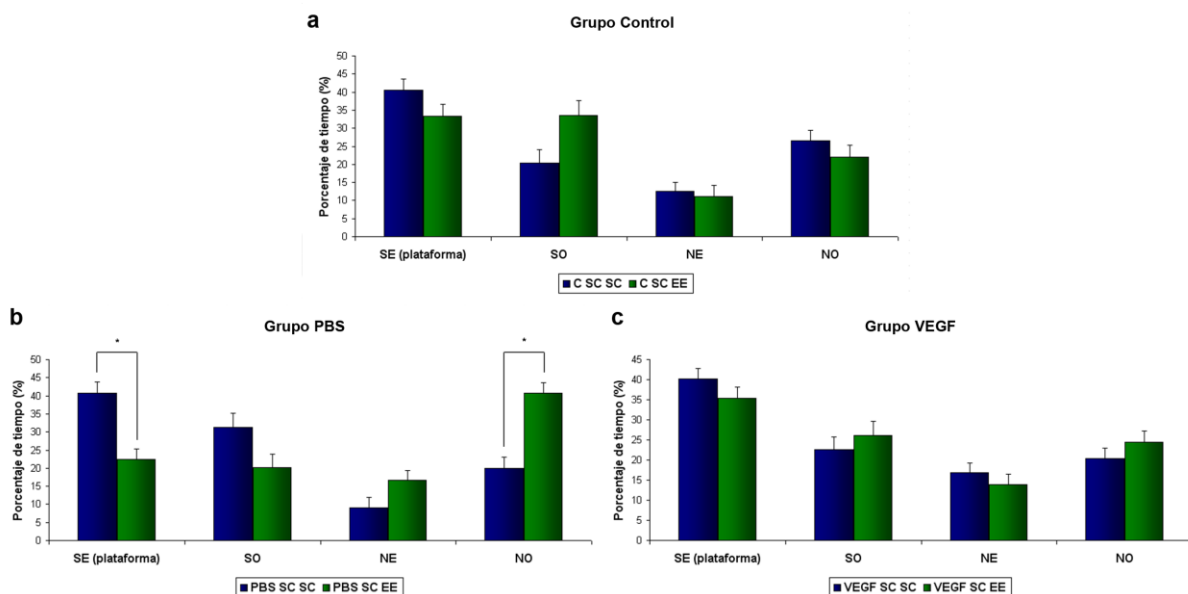


Figura 45. Estudio del efecto del entorno enriquecido sobre la memoria a largo plazo en los diferentes grupos experimentales (Control, PBS, VEGF). El eje horizontal muestra los cuadrantes de la piscina (SE, SO, NE, NO). El eje vertical muestra el porcentaje de tiempo empleado en cada uno de los cuadrantes. Media \pm SEM. * $p < 0,05$.

Por último, el cambio de ubicación de la plataforma, muestra que en el caso del grupo control, al igual que ocurre con el aprendizaje, la aplicación del entorno enriquecido afecta al reaprendizaje (reversal learning). Tanto el día 2 como el día 3 se observan diferencias significativas ($p=0,000$ en ambos casos) entre el grupo criado en condiciones estándar y el grupo criado en entorno enriquecido (Fig 46a). El grupo VEGF presenta la misma tendencia que el grupo control, en el que los días 2 y 3 el grupo de entorno enriquecido muestra una latencia significativamente menor ($p=0,033$ y $p=0,000$ respectivamente) que el grupo SC-SC

5. Resultados

(Fig. 46c). Por último, en el caso del grupo PBS el efecto del entorno enriquecido es opuesto al descrito hasta ahora. En este caso, sólo se observa una diferencia significativa del grupo SC-SC respecto al SC-EE el segundo día ($p=0,035$), y para el tercer día las latencias se igualan (Fig. 46b).

Por lo tanto, en el caso del grupo control y el grupo con infusión de VEGF, el entorno enriquecido mejora el proceso de reaprendizaje, pero no así en el caso del grupo PBS.

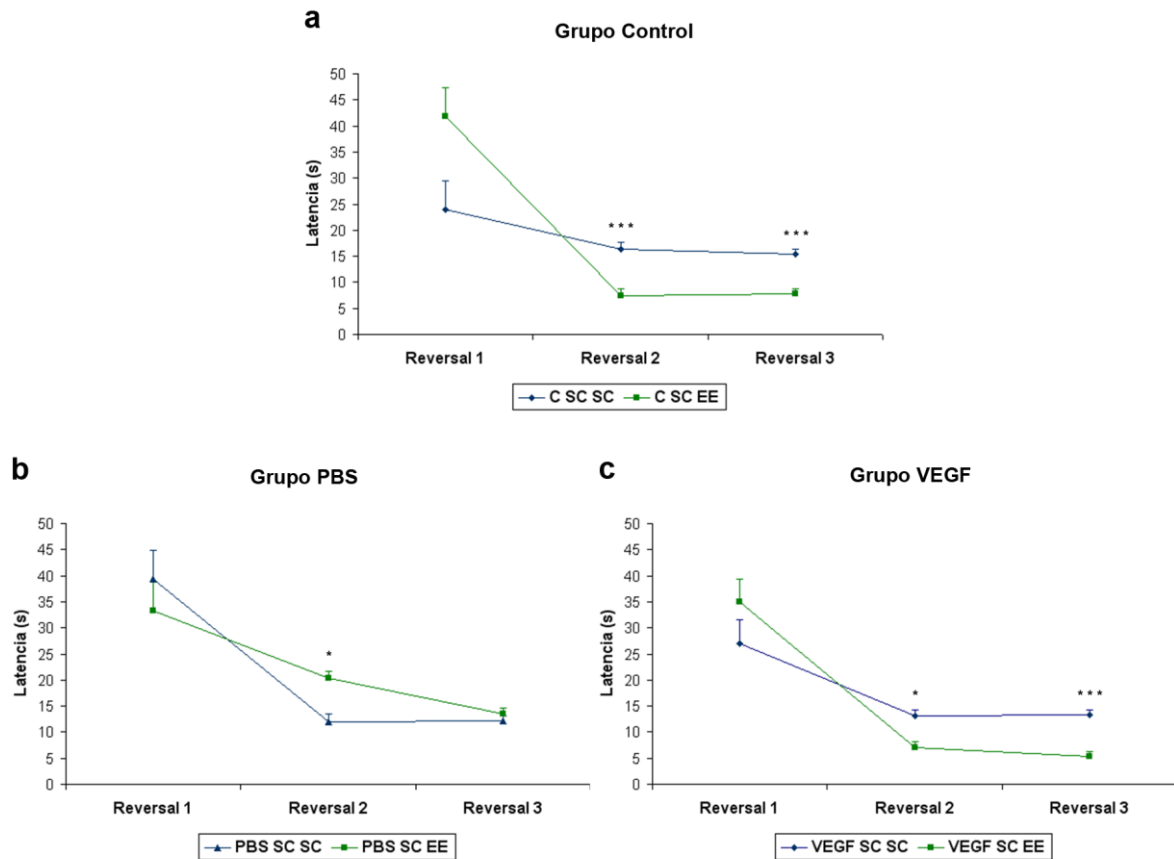


Figura 46. Estudio del efecto del entorno enriquecido sobre el reaprendizaje entre los diferentes grupos experimentales (Control, PBS, VEGF). El eje horizontal muestra los días de entrenamiento (Reversal 1, Reversal 2, Reversal 3). El eje vertical muestra la latencia de escape de la plataforma. Media \pm SEM. * $p<0,05$. *** $p<0,001$.

6. DISCUSIÓN

Los factores de crecimiento son claves para la regulación del sistema nervioso durante el desarrollo y el mantenimiento de la homeostasis. Entre ellos, destaca el VEGF por su papel sobre tres de los componentes de la unidad neuroglivascular: los vasos, las neuronas y las células gliales. El entorno enriquecido es un paradigma experimental que muestra efectos similares al VEGF ya que además de aumentar la neurogénesis y la angiogénesis, induce cambios en la expresión de genes relacionados con la neuroprotección. Ambas estrategias están implicadas en la mejora de las funciones cognitivas entre las que se encuentra la memoria visuoespacial.

6.1. Efecto morfológico de la implantación: Reacción astrogliol

La Barrera Hematoencefálica es un sistema selectivo que regula el acceso de las sustancias al parénquima cerebral. Entre las distintas estrategias empleadas para salvar esta dificultad encontramos la administración por vía intranasal (Yang y cols., 2010), la implantación de células encápsuladas (Antequera y cols., 2012) o el uso de bombas osmóticas (Thau-Zuchman y cols., 2010), ya que éstas permiten la difusión continua y prolongada en el tiempo directamente en el área de interés.

La infusión intracerebral mediante la implantación de bombas osmóticas produce una microlesión alrededor del cual se observa una reacción astrogliol. La gliosis es la reacción del sistema nervioso frente a diferentes tipos de agresiones (Pekny y Nilsson, 2005; Sofroniew, 2009), entre ellas la herida producida por una aguja como es el difusor de la bomba osmótica en la corteza cerebral. Además de la hiperplasia y la hipertrofia de los astrocitos, el aumento de la expresión de la proteína glial ácida fibrilar (GFAP) son las principales características de esta respuesta.

La proliferación astrogliol ha sido descrita también como respuesta a la administración de diversos factores de crecimiento (Craig y cols., 1996; Rabchevsky y cols., 1998), entre ellos y de forma muy significativa el VEGF tanto *in vitro* (Silvermann y cols., 1999; Mani y cols., 2005) como *in vivo* (Krum y cols. 2002; Krum y Khaibullina, 2003; Mani y cols., 2005).

Nuestros resultados, en línea con lo descrito hasta el momento, muestran en el grupo con infusión de VEGF una sobreexpresión de GFAP respecto al grupo con administración de vehículo en la zona perilesional tras 7 días de implantación, a la edad de P25. Esta proliferación astrogliol la atribuimos al VEGF cuyo efecto inductor de la reacción de los astrocitos paralelamente al aumento de la vascularización ya fue descrito por Krum y cols. (2002) sobre animales adultos. Los astrocitos reactivos sobreexpresan VEGF (Ogunshola y cols., 2000), lo

que también está presente en situaciones en las que no se administra VEGF exógeno (Bulnes y Lafuente, 2007). Por otro lado, el VEGF muestra efectos antiapoptóticos sobre las células endoteliales, de forma que actuaría como factor de supervivencia de los componentes de la pared vascular in situ (Krum y Khaibullina, 2003).

En el caso de una administración más prolongada, es decir, tras 28 días de implantación de la bomba osmótica, la expresión de GFAP es similar en los dos grupos, tanto con infusión de PBS como de VEGF. Krum y cols. (2002) refirieron que 7 días después de la implantación la proliferación astrogliar era significativamente menor que 3 días después de la implantación, por lo que esta ausencia de diferencias en la reacción astrogliar puede estar relacionada con el tiempo transcurrido. De acuerdo con lo descrito, tras 28 días de implantación como es nuestro caso, la reacción astrogliar debida a la lesión no presenta diferencias entre los animales a los que se les administró PBS y VEGF.

6.2. Co-expresión del VEGF

La localización del VEGF varía de un tipo celular a otro durante el desarrollo postnatal del cerebro de la rata (Ogunshola y cols., 2000). En condiciones de normoxia el VEGF se expresa principalmente en neuronas hasta el P13, coincidiendo así con el aumento del metabolismo neuronal y el pico de la actividad angiogénica durante el desarrollo vascular (Robertson y cols., 1985; Bengoetxea y cols., 2008). Posteriormente, a la edad de P24 disminuye la expresión neuronal y aumenta la expresión glial del VEGF (Ogunshola y cols., 2000; Bengoetxea y cols., 2008), coincidiendo con el momento en que las prolongaciones o pies de los astrocitos maduros rodean los vasos sanguíneos contribuyendo con ello al mantenimiento de la vascularización (Ilan y cols., 1998; Ogunshola y cols., 2000). En cambio, en condiciones de hipoxia se mantiene la expresión neuronal y glial del VEGF hasta P33 (Ogunshola y cols., 2000).

De esta forma, la expresión celular del VEGF ha sido estudiada con el fin de analizar su coexpresión con marcadores específicos de distintas estirpes celulares del SNC, neuronas, glia y células endoteliales. Las neuronas, identificadas mediante el marcador NeuN, muestran una mayor co-expresión con el VEGF a la edad de P25. El marcaje de astrocitos GFAP positivos sugiere que la expresión es principalmente astrogliar en P46 en las capas corticales del sistema visual, incluida la capa IV objeto de nuestro estudio. Así, los resultados de la colocalización del VEGF en la corteza visual primaria coinciden con lo descrito por Ogunshola y cols. (2000), encontrando mayor expresión glial en la edad P46.

Por otro lado, la expresión del VEGF en el giro dentado se corresponde en su mayoría con astrocitos GFAP positivos en P46, si bien también se han hallado neuronas VEGF positivas en menor cantidad. Resultados similares fueron descritos por Cao y cols. (2004) quienes postularon una función angiogénica del VEGF derivado de los astrocitos debido a su localización adyacente a los vasos sanguíneos, y una relación del VEGF derivado de neuronas en la regulación de la neurogénesis. Asimismo, el VEGF liberado por los astrocitos maduros en el hipocampo también ha sido relacionado con la conversión de las células madre a neuronas, tomando parte así en la regulación neurogénica (Song y cols., 2002).

6.3. Efectos sobre la corteza visual primaria de la administración de VEGF durante 1 semana (P25)

Los efectos de la administración del péptido VEGF en la corteza visual primaria varían dependiendo de la duración de la misma y de las condiciones en las que hayan sido criadas las ratas.

El periodo crítico del sistema visual se sitúa entre la tercera y la quinta semana de vida postnatal en ratas, alcanzando su pico en la cuarta semana (Fagiolini y cols., 1994; Fagiolini y Hensch, 2000). De esta forma, la administración de 1 semana, entre P18 y P25, hace posible el estudio de los efectos del VEGF durante los primeros días del periodo crítico de la corteza visual.

En animales criados en condiciones estándar, tras la implantación de la bomba osmótica con infusión del vehículo durante una semana, encontramos una disminución significativa de la densidad neuronal respecto al grupo control. Esta disminución parece deberse a un efecto a distancia inducido por la implantación. En un estudio previo pudimos observar que la disminución de la densidad neuronal iba acompañada de una disminución de la densidad de células Caspasa-3 positivas (Ortuzar y cols., 2011), resultado que sugiere que la muerte neuronal detectada podría ser debida más a la necrosis que a un proceso de apoptosis (Lafuente y cols., 2007). Algunos autores postulan que al producirse una lesión, la falta de disponibilidad de energía podría conducir a las células destinadas en principio a la apoptosis hacia la necrosis (Nicotera y cols., 2000).

Estos efectos negativos se revierten en el grupo en el que se lleva a cabo la administración de VEGF. Éste induce un aumento de la densidad neuronal respecto al grupo con infusión de vehículo, recuperando los valores hasta niveles cercanos a la normalidad. La viabilidad neuronal se mantiene por la acción conjunta y sinérgica de una variedad de factores de

crecimiento y factores de supervivencia que interactúan a través de diversas vías de señalización (Plaschke y cols., 2008). En el caso del VEGF, la activación de las vías PI3/Akt y ERK1/2 mediante la unión al VEGFR-2 ha sido descrita en distintas condiciones experimentales como responsable de la respuesta neuroprotectora del VEGF (Jin et al., 2000; Wick et al., 2002; Ma y cols., 2011). Diversos autores han descrito esta función del VEGF tanto en modelos de isquemia cerebral (Jin y cols., 2001; Sun y cols., 2003; Feng y cols., 2008) como en lesiones de médula espinal (Widenfalk y cols., 2003). Se postula una función neuroprotectora directa del VEGF mediante la inhibición de la activación de Caspasa-3 y la estimulación de la neurogénesis, o bien una función indirecta mediada por la estimulación de la angiogénesis. Nuestros resultados no muestran un aumento de la densidad vascular, por lo que la recuperación de la densidad neuronal observada tras la infusión de VEGF probablemente se deba al rescate de neuronas del proceso de apoptosis que se da en esta época del desarrollo (Ortuzar y cols., 2011; Argandoña y cols., 2012b). Así, los cambios en los niveles de fosforilación de ERK1/2 muestran el mismo comportamiento o evolución que la presentada por las modificaciones de la población neuronal, donde se observa una disminución significativa de ERK1/2 fosforilado en el grupo con infusión del vehículo que se recupera con la administración de VEGF.

Al igual que la infusión de VEGF, la exposición al entorno enriquecido también se ha llevado a cabo a partir del P18, justo después de la implantación de la bomba osmótica. En condiciones estándar el inicio del periodo crítico acontece entre la tercera y la cuarta semana de vida postnatal (Fagiolini y cols., 1994). Sin embargo, la exposición a un entorno enriquecido acelera el desarrollo de la corteza visual y por consiguiente adelanta el inicio del periodo crítico (Cancedda y cols., 2004). En un estudio previo pudimos observar que en animales criados en un entorno enriquecido desde el nacimiento, el adelanto del inicio del periodo crítico aumentaba la sensibilidad de los grupos a las manipulaciones quirúrgicas, en este caso, a la implantación de la bomba osmótica, de forma que los mejores resultados se obtuvieron cuando no se manipulaba el inicio del periodo crítico (Ortuzar y cols., 2011).

Los resultados de los animales criados en condiciones de entorno enriquecido presentan una disminución de la densidad vascular provocada por la infusión del vehículo, además de una disminución significativa de la densidad neuronal. En este caso, la administración de VEGF al igual que ocurre en condiciones estándar, revierte los efectos negativos sobre la densidad neuronal. Este parámetro, en el grupo VEGF, muestra valores similares a los niveles fisiológicos (grupo control no operado). Asimismo, los niveles de ERK1/2 fosforilado se recuperan mediante la infusión del péptido VEGF si bien en condiciones de entorno enriquecido las diferencias no son estadísticamente significativas.

Por otro lado, los efectos a nivel vascular de la administración de VEGF no son tan evidentes. A pesar de que se observa una tendencia angiogénica tras la administración de dicho factor en condiciones de entorno enriquecido, la diferencia respecto al grupo con infusión de PBS no es significativa. El pico de la expresión del VEGF en la corteza visual de ratas criadas en entorno enriquecido se alcanza en P28 (Bengoetxea y cols., 2008), mientras que el pico de la densidad vascular se obtiene en P49 (Argandoña y cols., 2005). Por lo tanto, en este caso la administración de una semana puede no ser suficiente para observar un aumento de la densidad vascular, siendo más temprana la respuesta neuroprotectora que la respuesta angiogénica. Nuestros resultados contradicen lo descrito por Krum y cols. (2002), quienes tras una semana de infusión de VEGF encontraron un aumento de la proliferación vascular en ratas adultas. Esto podría deberse a que la administración de VEGF se realizó en unas condiciones experimentales diferentes, es decir, en ratas adultas y en el estriado. El estriado anatómicamente resulta de la interdigitación de tractos de sustancia blanca en un núcleo sólido de sustancia gris, y cada uno de estos tejidos (sustancia gris y sustancia blanca) tiene patrones vasculares muy distintos. A diferencia del estriado, la corteza visual muestra una angioarquitectura bien sistematizada con patrones concretos bien perfilados, lo que hace que sea un sistema adecuado para el estudio de los cambios que ocurren durante la remodelación de la red microvascular. Por otro lado, Manoonkitiwongsa y cols. (2004) determinaron que la función neuroprotectora del VEGF exógeno en rata adulta no tiene porqué ocurrir simultáneamente con la angiogénesis. Así, los efectos en cerebro inmaduro, tanto de la administración del vehículo como del VEGF en periodos de máxima reorganización, pueden ser diferentes a los encontrados en un cerebro maduro.

Otro factor importante a tener en cuenta es la dosis administrada. Diversos autores han empleado las bombas osmóticas como herramienta de administración intracerebral de VEGF, tanto en situación normal como en modelos experimentales de distintas patologías. La mayoría de estos trabajos han sido llevados a cabo en animales adultos, y los efectos observados varían dependiendo de la dosis administrada, el lugar de administración o la duración de la misma. En modelos animales de esclerosis lateral amiotrófica (ELA) en rata, la administración intraventricular de entre 1-4 μg presenta efectos neuroprotectores (Storkebaum y cols., 2005), mientras que en ratones este efecto se observa a partir de 650 ng en un modelo experimental de excitotoxicidad (Tovar-y-Romo y Tapia, 2012). En el caso de modelos experimentales de isquemia, la administración de 2 μg y 560 ng muestran efectos neuroprotectores en rata y en ratón respectivamente (Manoonkitiwongsa y cols., 2004; Herz y cols., 2012). En animales normales, la administración intracerebroventricular de 1 μg muestra efectos angiogénicos (Harrigan y cols., 2002, 2003). Efectos similares han sido descritos con dosis cercanas a los 10 ng de VEGF tanto en el caso de una administración directa en la corteza (Rosenstein y cols., 1998) como en el estriado (Krum y cols., 2002). Estos trabajos

indican que las dosis necesarias para ver efectos con la administración intraventricular son más altas que las necesarias con la administración intracortical. Ante la falta de información sobre la administración de VEGF en cerebro inmaduro, en nuestro caso realizamos un ensayo con distintas dosis (2.5 ng; 25 ng, 250 ng). Con la dosis 250 ng observamos una exacerbada reacción astrogliar que abarcaba toda la corteza visual dificultando la valoración de las estructuras objeto de nuestro interés en este estudio. La dosis de 2.5 ng presentaba una reacción astrogliar moderada y homogénea en la corteza visual, por lo que decidimos optar por ella.

Por último, a pesar de que en condiciones estándar la infusión del vehículo no afecta a la densidad vascular, en los animales criados en enriquecimiento ambiental los grupos en los que se ha llevado a cabo la infusión tanto del vehículo como del VEGF, muestran niveles significativamente menores que su control. Sin embargo, éstos son similares a los valores del grupo control criado en condiciones estándar. Estos resultados indican que las diferencias son debidas a los efectos del entorno enriquecido sobre el grupo control (apartado 6.9). Anderson y cols. (2011) han descrito que la respuesta tanto a la exposición de un entorno enriquecido como a los procesos plásticos es diferente en animales sanos o en aquellos con patología.

6.4. Efectos sobre la corteza visual primaria de la administración de VEGF durante 4 semanas (P46)

Los resultados de la administración durante 4 semanas varían respecto a aquellos encontrados tras la administración de 1 semana. En este caso, la infusión del péptido se lleva a cabo desde el P18 hasta el P46, es decir, a lo largo de todo el periodo crítico de la corteza visual primaria (Fagiolini y cols., 1994).

En condiciones estándar, no se han encontrado efectos negativos de la infusión del vehículo en ninguno de los parámetros estudiados. La administración se lleva a cabo durante un periodo prolongado, lo que permite la reparación del tejido cercano al lugar de implantación y disminuyen así los efectos negativos producidos por el infusor. Las lesiones localizadas y de pequeño tamaño, como podría ser la microlesión derivada de la implantación, muestran una alta capacidad de reparación (Aram y Eisele, 1994; Ballantyne y cols., 2008). Asimismo, Doucette y cols. (2000) determinaron que la implatación de bombas osmóticas durante periodos críticos del desarrollo de ratas no afecta de forma significativa a las funciones cognitivas a largo plazo.

La densidad vascular y neuronal de la corteza visual primaria presenta niveles similares al grupo control, no observándose cambios debidos a la infusión de VEGF. La ausencia de variaciones en la densidad los elementos valorados, concuerda con los resultados en los niveles de fosforilación de ERK1/2, donde tampoco se observan diferencias significativas entre los grupos experimentales estudiados. Hasta el momento, pocos trabajos presentan los resultados de la administración de factores de crecimiento sobre parámetros neurovasculares durante el desarrollo normal. La mayoría de estudios se han llevado a cabo en modelos experimentales donde se ha inducido una lesión o que presentan una patología determinada (Storkebaum y cols., 2005; Herz y cols., 2012), y tan sólo unos pocos se ocupan de los efectos de la administración de estos en animales adultos (Krum y cols., 2002). A la luz de las evidencias que apuntan todos estos trabajos, los efectos de la administración de factores de crecimiento, en este caso del VEGF, en el cerebro inmaduro han de ser muy diferentes de los efectos que se presentan cuando hay una lesión.

En condiciones de entorno enriquecido el grupo con administración de vehículo presenta una disminución significativa de la densidad vascular y neuronal. El aumento de los requerimientos metabólicos que conlleva la cría en un entorno de mayor complejidad podría ser la causa de los efectos negativos observados en la microvascularización cerebral respecto a aquellas ratas criadas en condiciones estándar. La exposición al enriquecimiento ambiental ha sido llevada a cabo a partir de P18, es decir, a partir del día de la implantación de la bomba osmótica. La interacción del aumento de la demanda que conlleva el enriquecimiento ambiental con la lesión inducida por la implantación en el periodo crítico, afectaría áreas próximas a la lesión, no siendo capaces de responder a estos requerimientos energéticos de la nueva situación (Jones y Jefferson, 2011).

La infusión del VEGF revierte los efectos observados en el lecho vascular del grupo con infusión del vehículo, alcanzando niveles similares al grupo control no operado. A diferencia de lo que ocurría con la infusión de 1 semana, en este caso el grupo con infusión de PBS muestra una densidad vascular significativamente menor que el grupo control criado tanto en condiciones de entorno enriquecido como en condiciones estándar, y la administración de VEGF recupera la densidad vascular hasta niveles fisiológicos. Por lo tanto, estos resultados parecen abogar más por un efecto angiogénico del VEGF. En esta situación, los cambios observados a nivel vascular se corresponden con los encontrados en los niveles de fosforilación de ERK1/2. El grupo con infusión de VEGF compensa la disminución observada en el grupo en el que se ha administrado sólo vehículo, indicando una activación de dicha vía de señalización mediada por el VEGF. Recientemente, Lee y cols. (2010) han recalcado la implicación de ERK en la protección de neuronas y células endoteliales. Al igual que ocurría con la administración de una semana, a pesar de que se observa una tendencia marcada, en este

caso tampoco encontramos diferencias estadísticamente significativas, probablemente debido a la variabilidad interindividual.

Por el contrario, el efecto negativo observado en la densidad neuronal del grupo con infusión de PBS, no se recupera con la administración de VEGF. En condiciones de entorno enriquecido, el grupo control no operado muestra una densidad neuronal significativamente mayor que el control criado en condiciones estándar (apartado 6.9), es decir, el entorno enriquecido induce un aumento de la población neuronal. Si bien la disminución de la densidad neuronal de los grupos con infusión de PBS y VEGF es significativa respecto al control criado en entorno enriquecido, los niveles de ambos grupos son similares al control criado en condiciones estándar. Este resultado coincide con lo descrito para densidad vascular en P25 y para la densidad vascular y neuronal en P46. Los niveles de los parámetros estudiados son similares al control estándar y por tanto, el VEGF no induce cambios más allá de recuperar el nivel de normalidad.

Recientemente, Thau-Zuchman y cols. (2012a) han propuesto que el cerebro podría tener una capacidad de regeneración limitada al no encontrar efectos añadidos en la diferenciación neuronal y en la angiogénesis tras la administración combinada del VEGF y FGF2 respecto a la administración de cada factor por separado en un modelo de traumatismo experimental. Este hecho explicaría que en nuestro caso el VEGF sólo actúe cuando los niveles de los parámetros estudiados están por debajo de los fisiológicos. Así, cuando la implantación produce efectos negativos, el VEGF los repara, mostrando efectos sobre la densidad neuronal con la administración de 1 semana en ambas condiciones de cría, y sobre la densidad vascular con la administración de 4 semanas en condiciones de entorno enriquecido. En cambio, tras una infusión prolongada de 4 semanas en condiciones estándar, los efectos negativos de la implantación no afectan a la corteza visual primaria, por lo que tampoco observamos efectos del VEGF. En este caso los valores de los parámetros neurovasculares son similares a la normalidad.

Por último, en el caso de la administración de 4 semanas, la dosis de VEGF administrada es de 10 ng (2.5ng/semana), lo cual también podría estar relacionado con la respuesta angiogénica observada en condiciones de enriquecimiento ambiental (Rosenstein y cols., 1998; Krum y cols., 2002).

6.5. Efectos sobre el giro dentado de la administración de VEGF durante 4 semanas (P46)

Además de la corteza visual primaria, hemos estudiado los efectos de la administración a lo largo de 4 semanas sobre el giro dentado. En los últimos años diversos autores han descrito el papel del VEGF sobre el aprendizaje y la memoria visuoespacial, así como en la estimulación de la neurogénesis y en la plasticidad sináptica (Cao y cols., 2004). Esta neurogénesis tiene lugar de forma significativa en la zona subgranular del giro dentado (SGZ), siendo ésta una estructura crucial en el aprendizaje.

Al igual que ocurría en la corteza visual primaria, en condiciones estándar no se han encontrado diferencias en la microvascularización del giro dentado entre los grupos estudiados. Tanto el grupo con infusión de PBS como con infusión de VEGF muestran una densidad vascular similar al grupo control. Si bien la cuantificación de la densidad neuronal de la capa granular del giro dentado no muestra un efecto estadísticamente significativo, sí que se observa una tendencia al aumento en el grupo con infusión de VEGF respecto al grupo con infusión de vehículo.

En animales criados en entorno enriquecido también encontramos resultados similares a los observados en la corteza visual primaria. En este caso, el grupo con infusión de vehículo muestra una disminución significativa de la densidad vascular que se recupera con la administración de VEGF. Así, el VEGF vuelve a ejercer una función angiogénica en condiciones de enriquecimiento ambiental. En lo que respecta a la densidad neuronal, observamos la misma tendencia que en condiciones estándar, es decir, aunque las diferencias no son estadísticamente significativas, el grupo con infusión de VEGF muestra una tendencia al aumento de la población neuronal.

Por lo tanto, aunque los resultados del giro dentado apuntan sobre todo hacia una función angiogénica del VEGF en condiciones de enriquecimiento ambiental, la tendencia encontrada en las neuronas estaría relacionada con las funciones que cumple el VEGF en el hipocampo, ya que promueve la neurogénesis en la zona subgranular del giro dentado tanto *in vitro* como *in vivo* (Jin y cols., 2002; Cao y cols., 2004; During y Cao, 2006). Además, se ha demostrado que induce la proliferación de las células madre neurales (Studer y cols., 2000; Shingo y cols., 2001; Maurer y cols., 2003) y aumenta la plasticidad de las neuronas del hipocampo (Kim y cols., 2008). En nuestro caso, aunque no podemos confirmar que el aumento de la densidad neuronal se corresponda con la generación de nuevas neuronas, sí encontramos un aumento de la población neuronal madura en la capa granular del giro dentado. Una vez generadas las nuevas neuronas en la zona subgranular del giro dentado, éstas se incorporan al circuito hipocampal

existente (van Praag y cols., 2002; Kee y cols., 2007; Kerr y cols., 2010), por lo que el incremento de la densidad neuronal podría deberse a este hecho.

En la mayor parte de los ensayos que estudian los efectos de la administración del VEGF sobre el hipocampo y el aprendizaje, se realiza una administración intracerebroventricular (Sun y cols., 2003; Wang y cols., 2006; Thau-Zuchman y cols., 2012b) o intrahipocampal (Pati y cols., 2009). En nuestro caso, el VEGF se administra en la corteza, por lo que los efectos encontrados tanto en el giro dentado como en el proceso de aprendizaje y memoria podrían diferir de aquellos descritos en los trabajos descritos. La molécula administrada probablemente no alcance el hipocampo, pero los resultados sugieren que los efectos inducidos por la infusión del factor sí lo hacen.

6.6. Efectos sobre el aprendizaje y la memoria de la administración de VEGF durante 4 semanas (P46)

Desde el punto de vista funcional, mediante el test del laberinto acuático de Morris hemos analizado los cambios producidos en el proceso de aprendizaje, en la memoria a largo plazo y en la capacidad de reaprender una nueva ubicación de la plataforma.

En animales criados en condiciones estándar, el grupo con infusión de VEGF es quien menor latencia muestra durante el aprendizaje, a pesar de que la diferencia con el grupo con infusión de PBS sólo es significativa al segundo día. No se han observado efectos del VEGF en la memoria a largo plazo ni durante el reaprendizaje (reversal learning). Si bien en los últimos años el VEGF ha sido relacionado con la neurogénesis, la angiogénesis y con una mejora de la cognición (Cao y cols., 2004; Plaschke y cols., 2008), un estudio reciente ha demostrado que el VEGF, independientemente de sus efectos sobre las neuronas y los vasos, mejora la memoria dependiente de hipocampo mediante un aumento de la plasticidad neuronal (Licht y cols., 2011). Este hecho explicaría la ausencia de cambios significativos sobre los elementos neurovasculares en el giro dentado mediante las técnicas utilizadas, simultáneamente con la tendencia a la mejora que muestra la infusión del VEGF en el proceso de aprendizaje.

En condiciones de entorno enriquecido se ha encontrado un claro efecto de la administración del VEGF, mostrando una mejoría durante el proceso de aprendizaje, en la retención de la memoria, y durante el reaprendizaje. La administración de VEGF revierte los efectos negativos debidos a la implantación y a la infusión del vehículo, mostrando un comportamiento similar al control no operado. Estos resultados a su vez, están relacionados con aquellos obtenidos en el giro dentado, donde el grupo con infusión de PBS presenta una

densidad vascular significativamente menor que el grupo no operado y el grupo con infusión de VEGF. Diversos estudios han indicado que la neurogénesis no es suficiente para mejorar la memoria por sí sola (Shors y cols., 2002; Meshi y cols., 2006; Licht y cols., 2011), señalando la angiogénesis como factor crítico para el aprendizaje y la memoria (Kerr y cols., 2010). Nuestros resultados también indican que el componente vascular del giro dentado es determinante para este proceso, ya que el grupo con infusión de VEGF recupera la densidad vascular del giro dentado y mejora la cognición. Una tendencia de mejora en el proceso de aprendizaje en ambas condiciones de cría, y el hecho de que los animales criados en un entorno enriquecido muestren una mejoría de la retención de la memoria y del reaprendizaje acompañado todo ello de un aumento de la densidad vascular, apoya el papel importante de la vascularización en estos procesos.

Por lo tanto, los resultados sugieren una implicación del VEGF en estas funciones cognitivas superiores que podría ser debida tanto a la acción ejercida sobre la vascularización como al aumento de la neuroplasticidad mediante un aumento de la conectividad entre las neuronas maduras.

6.7. Conexión corteza visual primaria-giro dentado

Los resultados descritos hasta el momento, muestran que los efectos de la administración de VEGF en la corteza visual primaria tienen efectos indirectos en el giro dentado. A pesar de que las conexiones entre el sistema visual y el hipocampo exigen un estudio más detallado, es sabido que la corteza visual es un componente clave para la creación de memorias espaciales (Tsanov y Manahan-Vaughan, 2008). Varios estudios han sugerido que la corteza visual constituye un elemento imprescindible para la transferencia neocortico-hipocampal de la información (Heynen y Bear, 2001; Frenkel y cols., 2006; Karmarkar y Dan, 2006; Tsanov y Manahan-Vaughan, 2007). Tanto la corteza entorrinal como la corteza postrinal presentan conexiones recíprocas con áreas corticales entre las que se encuentra el sistema visual (Burwell y Amaral, 1998; Brown y Aggleton, 2001) y la mayor parte de las conexiones visuoespaciales en roedores y primates alcanzan la corteza lateral entorrinal (Burwell, 2000; Mohedano-Moriano y cols., 2007). Por otro lado, la corteza retrosplenial también contribuye a la memoria y a la navegación (Kovayashi y Amaral, 2007; Vann y cols., 2009).

Dadas las conexiones existentes se puede entender que los cambios observados en la corteza visual repercutan en el giro dentado, y por consiguiente, tengan un efecto sobre el aprendizaje visuoespacial.

6.8. Efectos contralaterales

Además de observar una relación entre los resultados de la corteza visual y el giro dentado, los resultados obtenidos en el lado contralateral son otro punto a analizar. A pesar de que no hay un efecto directo de la implantación, los resultados de los parámetros estudiados muestran una reacción en el lado contralateral similar a la observada en el lado ipsilateral. Al no haber una infusión directa del VEGF al hemisferio contralateral, estos efectos podrían estar relacionados con el fenómeno conocido como diasquisis. La diasquisis se define como un cambio en las funciones de una región del cerebro inducido por alteraciones en otra zona del cerebro alejada de ella pero anatómicamente conectada mediante fibras (Andrews, 1997). Por lo tanto, los efectos de la lesión durante el desarrollo de la corteza no sólo afectarían la zona circundante a la lesión, sino a regiones simétricas del hemisferio contralateral (Argandoña y cols., 2012b), donde además también se ha visto que funcionan los mecanismos de reparación (Hu y cols., 2011).

Un trabajo reciente ha detallado cambios neurovasculares en ambos hemisferios mediante el estudio de la actividad neuronal en roedores (Hoffmeyer y cols., 2007). Asimismo, otros autores han descrito que los efectos de un ictus localizado pueden alcanzar además de la zona cercana a la lesión, todo el hemisferio ipsilateral y hasta el hemisferio contralateral intacto (Greifzu y cols., 2011). Lafuente y cols. (1992) también observaron una participación activa del hemisferio contralateral en un modelo experimental de edema cerebral. Nuestros resultados están en línea con los trabajos mencionados, ya que hemos encontrado la misma tendencia en ambos hemisferios. Resultados similares han sido hallados mediante la administración local del VEGF en un modelo de isquemia, donde el VEGF aumenta la plasticidad en el hemisferio contralateral regulando factores como las efrinas, relacionados con la plasticidad (Herz y cols., 2012; Reitmeir y cols., 2012).

6.9. Efecto del entorno enriquecido

Trabajos previos han descrito los cambios morfológicos que se producen en el cerebro por la exposición a un entorno enriquecido, tanto en condiciones normales como en condiciones patológicas (Dahlgvist y cols., 1999; Johanson y Belinchenko, 2002). En animales normales dichos efectos han sido estudiados durante el desarrollo, en animales adultos y en modelos de envejecimiento (Cancedda y cols., 2004; Nithianantharajah y Hannan, 2006).

El entorno enriquecido influye en el desarrollo y en la plasticidad de los sistemas sensoriales, como el sistema visual. La corteza visual primaria es un modelo paradigmático para el estudio de la plasticidad dependiente de la experiencia. La maduración del sistema

visual comienza antes de la apertura de los ojos, pero el desarrollo y la maduración correcta del sistema requieren de la experiencia sensorial (Baroncelli y cols., 2010). A su vez, un aumento de la experiencia como el proporcionado por un entorno enriquecido afecta a la plasticidad del desarrollo del sistema visual (Sale y cols., 2007).

En este trabajo se ha estudiado el efecto del enriquecimiento ambiental sobre la vascularización y la población neuronal de la corteza visual primaria durante el periodo crítico del sistema visual. En el estudio se han incluido diferentes duraciones de las exposiciones al entorno enriquecido: una exposición de 1 semana, entre P18 y P25, y una exposición de 4 semanas, entre P18 y P46. Por lo tanto, se han analizado los efectos del entorno enriquecido cuando es aplicado durante los primeros días del periodo crítico, y si difiere o no de la exposición llevada a cabo durante todo el periodo crítico. Como se ha descrito anteriormente, el entorno enriquecido ha sido aplicado a partir del día P18 con el objetivo de evitar el adelantamiento del periodo crítico inducido por la cría en entorno enriquecido (Cancedda y cols., 2004).

En trabajos anteriores de nuestro grupo con animales criados en un entorno enriquecido desde el nacimiento hasta la edad adulta, se describió una densidad vascular significativamente mayor que en animales criados en condiciones estándar (Argandoña y Lafuente-Sánchez, 2002). Estos cambios morfológicos en la vascularización se correlacionan con un aumento de la expresión de VEGF (Bengoetxea y cols., 2008). En cambio, en el presente estudio el enriquecimiento ambiental ha sido aplicado a partir del P18, es decir, previo al inicio del periodo crítico (Fagiolini y cols., 1994). Los resultados obtenidos en el grupo control muestran que aplicando el enriquecimiento únicamente a partir del día P18, al día P25 podemos observar una mayor densidad vascular en la corteza visual primaria respecto a los animales criados en condiciones estándar. Esta rápida capacidad de adaptación a incrementos de la demanda energética, provocada en este caso por el entorno enriquecido, es una de las principales características del periodo crítico (McCoy y cols., 2009). Estos resultados concuerdan con lo observado por Ogunshola y cols. (2000), quienes en condiciones de hipoxia observaban una mayor expresión de VEGF respecto a condiciones de normoxia. En estos casos, una reducción del aporte de oxígeno o un aumento en la demanda del mismo, conlleva una mayor secreción de VEGF a través del factor inducible de hipoxia (Shweiki y cols., 1992), seguido de un aumento de la vascularización para satisfacer la demanda del tejido.

Por otro lado, en el grupo con infusión de vehículo, no se han encontrado efectos sobre los componentes neurovasculares de la cría en entorno enriquecido, probablemente debido a la agresión inducida por la implantación de la bomba osmótica. Así, ni el aumento de la vascularización producida por un incremento de la demanda, ni la función neuroprotectora del

enriquecimiento ambiental son suficientes para contrarrestar los efectos de la implantación. Este resultado podría a su vez estar relacionado con el hecho de que los efectos del entorno enriquecido dependen de la edad en la que se aplica, y son diferentes en animales sanos y en aquellos con algún tipo de lesión (Kolb, 1999; Anderson y cols., 2011). En cambio, en el grupo con infusión de VEGF el entorno enriquecido vuelve a mostrar efectos angiogénicos, al igual que en el grupo control no operado. El VEGF permite recuperar los efectos negativos de la implantación sobre el tejido (apartado 6.3), permitiendo que el enriquecimiento actúe sobre el lecho microvascular.

La exposición a un entorno enriquecido durante 4 semanas, es decir, durante el periodo de tiempo comprendido entre el P18 y el P46, muestra un aumento significativo de la densidad neuronal de la corteza visual primaria del grupo control. Diversos estudios han demostrado que la aplicación de un entorno enriquecido cambia, entre otros, la expresión de genes relacionados con la neuroprotección, reduciendo la muerte celular apoptótica (Young y cols., 1999; Nithianantharajah y cols., 2004; Paban y cols., 2011). El aumento de la expresión de angioglioneurinas como el BDNF y el VEGF, directamente relacionadas con la neuroprotección (Storkebaum y cols., 2004; Raab y Plate, 2007), ha sido además descrito en la corteza visual de las ratas criadas en un entorno enriquecido, siendo estas moléculas las responsables de los cambios producidos por la experiencia en la corteza visual (Caleo y Maffei, 2002; Sale y cols., 2007; Bengoetxea y cols., 2008).

Sin embargo, tampoco se han encontrado efectos del entorno enriquecido en el grupo con administración del vehículo. La agresión derivada de la implantación de la bomba osmótica podría ser la responsable de dicho resultado. Además, el grupo PBS criado en enriquecimiento muestra una disminución significativa de la densidad vascular que como se ha comentado previamente, podría estar relacionado con los efectos negativos inducidos por la interacción del aumento de la experiencia visual y la implantación (Jones y Jefferson, 2011). La administración de VEGF en cambio, revierte el efecto negativo de la implantación (apartado 6.4), pero no presenta efectos del enriquecimiento ambiental sobre el lecho vascular y la población neuronal.

Por lo tanto, los resultados muestran que la exposición al entorno enriquecido tiene diferentes efectos en la corteza visual primaria dependiendo de la duración de la misma. Cuando es aplicado durante los primeros días del periodo crítico, muestra efectos angiogénicos como respuesta al aumento de la demanda. En cambio, si se aplica durante todo el periodo crítico, produce un aumento de la población neuronal, posiblemente inducido por el aumento de expresión de moléculas que promueven la neuroprotección. Paradójicamente, los efectos de la cría en entorno enriquecido son opuestos a los encontrados con la administración exógena del VEGF, ya que éste último presenta efectos sobre la población neuronal cuando es

administrado durante 1 semana, y efectos sobre la vascularización cuando es administrado durante 4 semanas.

Además de estudiar los efectos del entorno enriquecido en el desarrollo de la corteza visual de la rata, también hemos estudiado la relación entre dicho paradigma y el aprendizaje. Varios estudios han descrito que el entorno enriquecido mejora el aprendizaje y la memoria (Rampon y cols., 2000; van Praag y cols., 2000; Bennet y cols., 2006), resultado que hemos podido corroborar en nuestro modelo, donde los animales control criados en entorno enriquecido muestran mejores resultados tanto durante el proceso de aprendizaje como durante el reaprendizaje (reversal learning). En relación a este último resultado, la cuantificación llevada a cabo en el giro dentado, si bien no muestra cambios estadísticamente significativos en la densidad vascular, presenta una población neuronal mayor de la capa granular del giro dentado respecto a animales criados en condiciones estándar. Kemperman y cols. (1997) describieron un incremento de las células granulares del giro dentado tras la exposición a un entorno enriquecido, resultados que sugerían que dicha condición aumentaba la neurogénesis en el hipocampo.

A pesar de que los resultados del grupo control no operado sugieren una relación del aumento de la densidad neuronal con la mejora del aprendizaje, varios autores sostienen que otros factores como la plasticidad sináptica también pueden contribuir a esta mejora (van Praag y cols., 1998; Nithianantharajah y Hannan, 2006; Pizzorusso y cols., 2007). Fischer y cols. (2007) describieron un aumento de las proteínas relacionadas con la sinapsis y una activación de la sinaptogénesis en la corteza y en el hipocampo. La vascularización también ha sido propuesta como factor crítico para un aprendizaje y memoria normal (Kerr y cols., 2010). Así, éstos y otros autores postulan que la neurogénesis no es el único sustento de la mejora del aprendizaje (Shors y cols., 2002; Meshi y cols., 2006). Las nuevas neuronas necesitan entre 3-4 semanas para completar el proceso de incorporación a las conexiones ya existentes (van Praag y cols., 2002; Overstreet y cols., 2004; Kee y cols., 2007; Kerr y cols., 2010), momento en el que la neurogénesis empieza a cobrar importancia en la mejora de la memoria visuoespacial.

Los resultados obtenidos en los grupos con infusión de PBS y VEGF indican en esta dirección. A pesar de que la cría en entorno enriquecido muestra un aumento de la densidad neuronal respecto al grupo criado en condiciones estándar de ambos grupos similar al observado en el grupo control, en ninguna de las condiciones experimentales encontramos una mejora del aprendizaje. Concretamente, el grupo con infusión de PBS muestra una densidad vascular menor en el giro dentado acompañado de un empeoramiento de la memoria y del reaprendizaje. Este resultado por tanto, vuelve a poner de manifiesto la importancia de la vascularización del giro dentado en la memoria.

Uno de los componentes del entorno enriquecido consiste en el aumento de la actividad física ya que las posibilidades para la actividad motora se ven aumentadas por las condiciones del entorno enriquecido respecto a las condiciones estándar de estabulación. No obstante, cuando el entorno enriquecido incorpora una rueda de ejercicio es cuando la estimulación motora cobra mayor importancia. La razón por la que en este estudio no se ha incluido la rueda de ejercicio es que la actividad física por sí sola muestra efectos difusos en todo el cerebro: aumenta la expresión de factores tróficos como el BDNF (Neeper y cols., 1995; Tong y cols., 2001), promueve la angiogénesis (Black y cols., 1990; Swain y cols., 2003), aumenta la proliferación y la supervivencia de las células en el hipocampo (van Praag y cols., 1999) y mejora la cognición en animales intactos (Anderson y cols., 2000; Radak y cols., 2001). De esta forma, sin la incorporación de la rueda de ejercicio, los efectos derivados de la cría en entorno enriquecido son mejor acotados. Sin embargo, no descartamos la posibilidad de que la presencia de la rueda de ejercicio aumentara los efectos del enriquecimiento sobre el giro dentado en particular, donde no hemos observado diferencias estadísticamente significativas.

6.10. Perspectivas de futuro

En los últimos años han ganado transcendencia las interacciones que existen entre los distintos tipos celulares que componen la unidad neuroglivascular (NVU): las neuronas, los astrocitos y las células endoteliales (Hawkins y Davis, 2005; Lecrux y Hamel, 2011). Algunos autores postulan que la neuroprotección por sí sola no será suficiente para revertir los efectos negativos que se produzcan en distintas patologías cerebrales. Aumentar el número de neuronas en el cerebro, puede no ser suficiente ya que estas células dependen de los vasos de nueva formación para su sustento metabólico y trófico (Palmer y cols., 2000; Horner y Palmer, 2003). Para que esta protección sea completa proponen además un efecto similar sobre los demás componentes de la NVU (Bastide y cols., 2007; Lok y cols., 2007; Vangilder y cols., 2011).

El VEGF ejerce una función angiogénica tanto en situaciones fisiológicas (Ferrara y cols., 2003) como en situaciones patológicas (Marti y cols., 2000; Bulnes y Lafuente, 2007; Thau-Zuchman y cols., 2010), además de aumentar la supervivencia de los precursores neuronales (Widenfalk y cols., 2003) y estar implicado en la neurogénesis (Sun y cols., 2003; Wang y cols., 2007). Por otra parte, el entorno enriquecido promueve la formación de nuevos vasos (Sirevaag y cols., 1988; Ortuzar y cols., 2011) y la neurogénesis (During y Cao, 2006), y reduce la muerte celular apoptótica (Nithianantharajah y cols. 2004; Paban y cols., 2011). Nuestros resultados muestran que las estrategias neuroprotectoras aplicadas ejercen efectos en dos de los componentes de la unidad neuroglivascular como son la población neuronal y la red vascular.

Aunque el tercer componente de la unidad neuroglivascular, la glía, queda fuera del objetivo del presente trabajo, resultados de nuestro grupo sugieren efectos proliferativos sobre la población astrogliar debidos tanto a la infusión de VEGF como al enriquecimiento ambiental y al ejercicio físico (Argandoña y cols., 2009; Argandoña y cols., 2012b).

Por lo tanto, la administración de angioglioneurinas como el VEGF, el IGF o BDNF junto con la aplicación de un entorno enriquecido podría ser utilizada como estrategia neuroreparadora en distintas patologías cerebrales. A pesar de ello, sigue siendo necesario profundizar en el estudio sobre los posibles efectos negativos, como la modificación del periodo crítico debido a la cría en entorno enriquecido, la interacción del aumento de la experiencia con la lesión o los efectos de la administración del VEGF sobre la población astrogliar. Asimismo, la estandarización del enriquecimiento ambiental será otro punto importante en el que avanzar. El hecho de que los componentes de dicho paradigma, como el ejercicio o la estimulación visual, induzcan efectos sobre el cerebro por sí mismos hace que no puedan compararse los resultados obtenidos en laboratorios que emplean distintas combinaciones de estos componentes. La estandarización del entorno enriquecido permitirá avanzar en el estudio de los efectos beneficiosos de este paradigma no invasivo para su aplicación en distintas patologías cerebrales.

7. CONCLUSIONES

1. La implantación intracortical de la bomba osmótica conlleva una reacción astrogliol alrededor de la trayectoria de la cánula en condiciones estándar. El grupo con infusión de VEGF muestra una mayor positividad frente a los antígenos GFAP y VEGF en P25, pero no se han encontrado diferencias entre los grupos experimentales estudiados en P46.
2. La expresión del VEGF es mayoritariamente astrogliol tanto en la corteza visual primaria como en el giro dentado de todos los grupos experimentales en P46. La expresión del VEGF en neuronas es mayor en P25.
3. Tras 1 semana de implantación de la bomba osmótica, los grupos con infusión de vehículo muestran una disminución de la densidad neuronal en la corteza visual primaria, mientras que aquellos con administración de VEGF presentan valores cercanos a la normalidad en ambas condiciones de cría.
4. La cría en entorno enriquecido durante los primeros días del periodo crítico (1 semana) induce de *per se* un aumento significativo de la red microvascular en la corteza visual primaria del grupo control no operado y del grupo con infusión de VEGF.
5. Tras 4 semanas de implantación de la bomba osmótica, el grupo con infusión de vehículo no muestra efectos negativos en animales criados en condiciones estándar, y se manifiesta con una disminución de la densidad vascular en condiciones de entorno enriquecido tanto en la corteza visual primaria como en el giro dentado.
6. Tras 4 semanas de implantación de la bomba osmótica, la administración de VEGF induce un aumento del lecho vascular en la corteza visual primaria y en el giro dentado de animales criados en entorno enriquecido.
7. La cría en entorno enriquecido durante todo el periodo crítico (4 semanas) induce un aumento de la población neuronal en la corteza visual primaria del grupo control no operado y en el giro dentado de todos los grupos experimentales estudiados.
8. Tras 4 semanas de implantación de la bomba osmótica, la administración de VEGF disminuye de forma estadísticamente significativa la latencia del proceso de aprendizaje y del reaprendizaje, y mejora la consolidación de la memoria en animales criados en entorno enriquecido.

7. Conclusiones

9. La cría en entorno enriquecido durante todo el periodo crítico (4 semanas) disminuye la latencia del proceso de aprendizaje en el grupo control no operado, y del reaprendizaje en el grupo control y el grupo con infusión de VEGF.

Los efectos de la administración intracortical del VEGF y de la cría en entornos enriquecidos dependen del momento de aplicación y de la duración de las mismas. La infusión intracortical durante 1 semana induce un aumento de la densidad neuronal y una administración más prolongada produce un aumento del lecho vascular. Estos cambios sólo se observan en el caso de que la implantación de la bomba osmótica haya producido un efecto negativo sobre dicho parámetro. El entorno enriquecido induce un aumento de la densidad vascular cuando es aplicado durante 1 semana y un aumento de la población neuronal en el caso de la exposición durante 4 semanas.

La administración del VEGF induce un aumento de la densidad vascular del giro dentado que se traduce en la disminución de la latencia durante el proceso de aprendizaje. Asimismo, una disminución similar en la latencia de aprendizaje se relaciona con el aumento de la densidad neuronal debida a la cría en un entorno enriquecido.

Ambas estrategias, muestran efectos notables sobre el componente vascular y neuronal, y juegan un papel crucial en el aprendizaje y la memoria visuoespacial.

8. BIBLIOGRAFÍA

Abbott NJ, Ronnback L, Hansson E (2006) Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier. *Nat Rev Neurosci* **7**:41-53.

Acarin L, González B, Hidalgo J, Castro AJ, Castellano B (1999) Primary cortical glial reaction versus secondary thalamic glial response in the excitotoxically injured young brain: astroglial response and metallothionein expression. *Neuroscience* **92**:827-839.

Aggleton JP, Vann SD (2004) Testing the importance of the retrosplenial navigation system: lesion size but not strain matters: a reply to Harker and Wishaw. *Neurosci Biobehav Rev* **28**:525-531.

Alladi PA, Roy T, Singh N, Wadhwa S (2005) Prenatal auditory enrichment with species-specific calls and sitar music modulates expression of Bcl-2 and Bax to alter programmed cell death in developing chick auditory nuclei. *Int J Dev Neurosci* **23**:363-373.

Anderson BJ, Raap DN, Baek DH, McCloskey DP, Coburn-Litvak PS, Robinson JK (2000) Exercise influences spatial learning in the radial arm-maze. *Physiol Behav* **70**:425-429.

Anderson V, Spencer-Smith M, Wood A (2011) Do children really recover better? Neurobehavioural plasticity after early brain insult. *Brain* **134**:2197-2221.

Andrews RJ (1997) Transhemispheric diaschisis. A review and comment. *Stroke* **22**: 943-949.

Antequera D, Portero A, Bolos M, Orive G, Hernández RM, Pedra JL, Carro E (2012) Encapsulated VEGF-secreting cells enhance proliferation of neuronal progenitors in the hippocampus of AβPP/Ps1 mice. *J Alzheimers Dis* **29**:187-200.

Aram DM, Eisele JA (1994) Intellectual stability in children with unilateral brain lesions. *Neurophysiologia* **32**:85-95.

Argandoña EG, Lafuente JV (1996) Effects of dark-rearing on the vascularization of the developmental rat visual cortex. *Brain Res* **732**:43-51.

Argandoña EG, Lafuente-Sánchez JV (2002) The effect of experience on post natal development of the vascularization of the visual cortex. *Rev Neurol* **34**:983-988.

Argandoña EG, Bengoetxea H, Lafuente JV (2005) Lack of experience-mediated differences in the immunohistochemical expresión of blood-brain barrier markers (EBA and GluT-1) during the postnatal development of the rat visual cortex. *Brain Res Dev Brain Res* **156**:158-166.

Argandoña EG, Bengoetxea H, Lafuente JV (2009) Physical exercise is required for environmental enrichment to offset the quantitative effects of dark-rearing on the S-100beta astrocytic density in the rat visual cortex. *J Anat* **215**:132-140.

Argandoña EG, Bengoetxea H, Ortuzar N, Bulnes S, Rico-Barrio I, Lafuente JV (2012a) Vascular endothelial growth factor: adaptative changes in the neuroglivascular unit. *Curr Neurovasc Res* **9**:72-81.

Argandoña EG, Bengoetxea H, Bulnes S, Rico-Barrio I, Ortuzar N, Lafuente JV (2012b) Effect of intracortical vascular endothelial growth factor infusion and blockade during the critical period in the rat visual cortex. *Brain Res* **1473**:141-154.

Armulik A, Abramsson A, Betsholtz C (2005) Endothelial/pericyte interactions. *Circ Res* **97**:512-523.

8. Bibliografia

Astur RS, Taylor LB, Mamelak AN, Philpott L, Sutherland RJ (2002) Humans with hippocampus damage display severe spatial memory impairments in a virtual Morris water task. *Behav Brain Res* **132**:77-82.

Bakkum BW, Benevento LA, Cohen RS (1991) Effects of light/dark- and dark-rearing on synaptic morphology in the superior colliculus and visual cortex of the postnatal and adult rat. *J Neurosci Res* **28**:65-80.

Ballantyne AO, Spilkin AM, Hesselink J, Trauner DA (2008) Plasticity in the developing brain: intellectual, language and academic functions in children with ischaemic perinatal stroke. *Brain* **131**:2975-2985.

Bär T (1980) The vascular system of the cerebral cortex. *Adv Anat Embryol Cell Biol* **59**:1-62.

Baroncelli L, Sale A, Viegi A, Maya Vetencourt JF, De Pasquale R, Baldini S, Maffei L (2010) Experience-dependent reactivation of ocular dominance plasticity in the adult visual cortex. *Exp Neurol* **226**:100-109.

Bastide M, Ouk T, Plaisier F, Pétrault O, Stolc S, Bordet R (2007) Neurogliovascular unit after cerebral ischemia: is the vascular wall a pharmacological target. *Psychoneuroendocrinology* **1**:S36-S39.

Bates DO, Cui TG, Doughty JM, Winkler M, Sugiono M, Shields JD, Peat D, Gillatt D, Harper SJ (2002) VEGF165b, an inhibitory splice variant of vascular endothelial growth factor, is down-regulated in renal cell carcinoma. *Cancer Res* **62**:4123-4131.

Benaroya-Milshtein N, Hollander N, Apter A, Kukulansky T, Raz N, Wilf A, Yaniv I, Pick CG (2004) Environmental enrichment in mice decreases anxiety, attenuates stress responses and enhances natural killer cell activity. *Eur J Neurosci* **20**:1341-1347.

Bengoetxea H, Argandoña EG, Lafuente JV (2008) Effects of visual experience on vascular endothelial growth factor expression during the postnatal development of the rat visual cortex. *Cereb Cortex* **18**:1630-1639.

Bennett EL, Rosenzweig MR, Diamond MC (1969) Rat brain: effects of environmental enrichment on wet and dry weights. *Science* **163**:825-826.

Bennett JC, McRae PA, Levy LJ, Frick KM (2006) Long-term continuous, but not daily, environmental enrichment reduces spatial memory decline in aged male mice. *Neurobiol Learn Mem* **85**:139-152.

Berardi N, Pizzorusso T, Maffei L (2000) Critical periods during sensory development. *Curr Opin Neurobiol* **10**:138-145.

Bezard E, Dovero S, Belin D, Duconger S, Jackson-Lewis V, Przedborski S, Piazza PV, Gross CE, Jaber M (2003) Enriched environment confers resistance to 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine and cocaine: involvement of dopamine transporter and trophic factors. *J Neurosci* **23**:10999-11007.

Black JE, Sirevaag AM, Greenough WT (1987) Complex experience promotes capillary formation in young rat visual cortex. *Neurosci Lett* **83**:351-355.

Black JE, Isaacs KR, Anderson BJ, Alcantara AA, Greenough WT (1990) Learning causes synaptogenesis, whereas motor activity causes angiogenesis, in cerebellar cortex of adult rats. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**:5568-5572.

- Black JE, Zelazny AM, Greenough WT** (1991) Capillary and mitochondrial support of neural plasticity in adult rat visual cortex. *Exp Neurol* **111**:204-209.
- Bliss TV, Lomo T** (1973) Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. *J Physiol* **232**:331-356.
- Bliss TV, Collingridge GL** (1993) A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. *Nature* **361**:31-39.
- Blomgren K, Leist M, Groc L** (2007) Pathological apoptosis in the developing brain. *Apoptosis* **12**:993-1010.
- Brown MV, Aggleton JP** (2001) Recognition memory: what are the roles of the perirhinal cortex and hippocampus? *Nat Rev Neurosci* **2**:51-61.
- Bruel-Jungerman E, Laroche S, Rampon C** (2005) New neurons in the dentate gyrus are involved in the expression of enhanced long-term memory following environmental enrichment. *Eur J Neurosci* **21**:513-521.
- Bulnes S, Lafuente JV** (2007) VEGF immunopositivity related to malignancy degree, proliferative activity and angiogenesis in ENU-induced gliomas. *J Mol Neurosci* **33**: 163-172.
- Burwell RD, Amaral DG** (1998) Cortical afferents of the perirhinal, postrhinal, and entorhinal cortices of the rat. *J Comp Neurol* **398**:179-205.
- Burwell RD** (2000) The parahippocampal region: corticocortical connectivity. *Ann N Y Acad Sci* **911**:25-42.
- Buss RR, Sun W, Oppenheim RW** (2006) Adaptive roles of programmed cell death during nervous system development. *Annu Rev Neurosci* **29**:1-35.
- Caleo M, Maffei L** (2002) Neurotrophins and plasticity in the visual cortex. *Neuroscientist* **8**:52-61.
- Cancedda L, Putignano E, Sale A, Viegi A, Berardi N, Maffei L** (2004) Acceleration of visual system development by environmental enrichment. *J Neurosci* **24**:4840-4848.
- Cao L, Jiao X, Zuzga DS, Liu Y, Fong DM, Young D, During MJ** (2004) VEGF links hippocampal activity with neurogenesis, learning and memory. *Nat Genet* **36**:827-835.
- Cebe-Suarez S, Pieren M, Cariolato L, Arn S, Hoffmann U, Bogucki A, Manlius C, Wood J, Ballmer-Hofer K** (2006) A VEGF-A splice variant defective for heparin sulphate and neuropilin-1 binding shows attenuated signalling through VEGFR-2. *Cell Mol Life Sci* **63**:2067-2077.
- Colombo M, Fernandez T, Nakamura K, Gross CG** (1998) Functional differentiation along the anterior-posterior axis of the hippocampus in monkeys. *J Neurophysiol* **80**:1002-1005.
- Corvetti L, Aztiria E, Domenici L** (2006) Reduction of GFAP induced by long dark rearing is not restricted to visual cortex. *Brain Res* **1067**:146-153.
- Craig CG, Tropepe V, Morshead CM, Reynolds BA, Weiss S, van der Kooy D** (1996) In vivo growth factor expansion of endogenous subependymal neural precursor cell populations in the adult mouse brain. *J Neurosci* **16**:2649-2658.

- Dahlqvist P, Zhao L, Johansson IM, Mattsson B, Johansson BB, Seckl JR, Olsson T** (1999) Environmental enrichment alters nerve growth factor-induced gene A and glucocorticoid receptor messenger RNA expression after middle cerebral artery occlusion in rats. *Neuroscience* **93**:527-535.
- Dahlqvist P, Ronnback A, Bergstrom SA, Soderstrom I, Olsson T** (2004) Environmental enrichment reverses learning impairment in the Morris water maze after focal cerebral ischemia in rats. *Eur J Neurosci* **19**:2288-2298.
- Deane R, Zlokovic BV** (2007) Role of the blood-brain barrier in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Curr Alzheimer Res* **4**:191-197.
- Diamond MC, Ingham CA, Johnson RE, Bennett EL, Rosenzweig MR** (1976) Effects of environment on morphology of rat cerebral cortex and hippocampus. *J Neurobiol* **7**:75-85.
- Diamond MC** (2001) Response of the brain to enrichment. *An Acad Bras Cienc* **73**:211-220.
- Dierssen M, Benavides-Piccione R, Martínez-Cué C, Estivill X, Flórez J, Elston GN, DeFelipe J** (2003) Alterations of neocortical pyramidal cell phenotype in the Ts65Dn mouse model of Down syndrome: effects of environmental enrichment. *Cereb Cortex* **13**:758-764.
- Doucette TA, Ryan CL, Tasker A** (2000) Use of osmotic minipumps for sustained drug delivery in rat pups: effects on physical and neurobehavioural development. *Physiol Behav* **71**:207-212.
- Dupret D, Fabre A, Döbrössy MD, Panatier A, Rodríguez JJ, Lamarque S, Lemaire V, Oliet SH, Piazza PV, Abrous DN** (2007) Spatial learning depends on both the addition and removal of new hippocampal neurons. *PLoS Biol* **5**:e214.
- During MJ, Cao L** (2006) VEGF, a mediator of the effect of experience on hippocampal neurogenesis. *Curr Alzheimer Res* **3**:29-33.
- Duvernoy H, Delon S, Vansson JL** (1981) Cortical blood vessels of the human brain. *Brain Res Bull* **7**:519-579.
- Duvernoy H** (2005) The human hippocampus. Functional Anatomy, Vascularization and serial sections with MRI. 3rd ed. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, New York.
- Dvorak HF** (2006) Discovery of vascular permeability factor (VPF). *Exp Cell Res* **312**:522-526.
- Fagiolini M, Pizzorusso T, Berardi 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.
- Fagiolini M, Hensch TK** (2000) Inhibitory threshold for critical-period activation in primary visual cortex. *Nature* **404**:183-186.
- Faherty CJ, Kerley D, Smeyne RJ** (2003) A Golgi-Cox morphological analysis of neuronal changes induced by environmental enrichment. *Brain Res Dev Brain Res* **141**:55-61.
- Feng R, Rampon C, Tang YP, Shrom D, Jin J, Kyin M, Sopher B, Miller MW, Ware CB, Martin GM, Kim SH, Langdon RB, Sisodia SS, Tsien JZ** (2001) Deficient neurogenesis in forebrain-specific presenilin-1 knockout mice is associated with reduced clearance of hippocampal memory traces. *Neuron* **32**:911-926.

- Feng Y, Rhodes PG, Bhatt AJ** (2008) Neuroprotective effects of vascular endothelial growth factor following hypoxic ischemic brain injury in neonatal rats. *Pediatr Res* **64**:370-374.
- Ferrara N, Henzel WJ** (1989) Pituitary follicular cells secrete a novel heparin-binding growth factor specific for vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* **161**:851-858.
- Ferrara N** (2001) Role of vascular endothelial growth factor in regulation of physiological angiogenesis. *Am J Physiol Cell Physiol* **280**:C1358-C1366.
- Ferrara N, Gerber HP, LeCouter J** (2003) The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med* **9**:669-676.
- Finlay BL** (1992) Cell death and the creation of regional differences in neuronal numbers. *J Neurobiol* **23**:1159-1171.
- Fischer A, Sananbenesi F, Wang X, Dobbin M, Tsai LH** (2007) Recovery of learning and memory is associated with chromatin remodelling. *Nature* **447**:178-182.
- Fong GH, Rossant J, Gertsenstein M, Breitman ML** (1995) Role of the Flt-1 receptor tyrosine kinase in regulating the assembly of vascular endothelium. *Nature* **376**:66-70.
- Forstreuter F, Lucius R, Mentlein R** (2002) Vascular endothelial growth factor induces chemotaxis and proliferation of microglial cells. *J Neuroimmunol* **132**:93-98.
- Frenkel MY, Sawtell NB, Diogo AC, Yoon B, Neve RL, Bear MF** (2006) Instructive effect of visual experience in mouse visual cortex. *Neuron* **51**:339-349.
- Fu M, Zuo Y** (2011) Experience-dependent structural plasticity in the cortex. *Trend Neurosci* **34**:177-187.
- Gerber HP, McMurtrey A, Kowalski J, Yan M, Keyt BA, Dixit V, Ferrara N** (1998) Vascular endothelial growth factor regulates endothelial cell survival through the phosphatidylinositol 3'-kinase/Akt signal transduction pathway. Requirement for Flk-1/KDR activation. *J Biol Chem* **273**:30336-30343.
- Girouard H, Iadecola C** (2006) Neurovascular coupling in the normal brain and in hypertension, stroke, and Alzheimer disease. *J Appl Physiol* **100**:328-335.
- Gluzman-Poltorak Z, Cohen T, Herzog Y, Neufeld G** (2000) Neuropilin-2 is a receptor for the vascular endothelial growth factor (VEGF) forms VEGF-145 and VEGF-165. *J Biol Chem* **275**:18040-18045.
- Gordon JA, Stryker MP** (1996) Experience-dependent plasticity of binocular responses in the primary visual cortex of the mouse. *J Neurosci* **16**:3274-3286.
- Gould E, Beylin A, Tanapat P, Reeves A, Shors TJ** (1999) Learning enhances adult neurogenesis in the hippocampal formation. *Nat Neurosci* **2**:260-265.
- Greenberg DA, Jin K** (2005) From angiogenesis to neuropathology. *Nature* **438**:954-959.
- Greenough WT, Volkman R, Juraska JM** (1973) Effects of rearing complexity on dendritic branching in fronto-lateral and temporal cortex of the rat. *Exp Neurol* **41**:371-378.

8. Bibliografia

Greifzu F, Schmidt S, Schmidt KF, Kreikemeier K, Witte OW, Löwel S (2011) Global impairment and therapeutic restoration of visual plasticity mechanisms after a localized cortical stroke. *PNAS* **108**:15450-15455.

Grivas I, Michaloudi H, Batzios Ch, Chiotelli M, Papatheodoropoulos C, Kostopoulos G, Papadopoulos GC (2003) Vascular network of the rat hippocampus is not homogeneous along the septotemporal axis. *Brain Res* **971**:245-249.

Gu C, Limberg BJ, Whitaker GB, Perman B, Leahy DJ, Rosenbaum JS, Ginty DD, Kolodkin AL (2002) Characterization of neuropilin-1 structural features that confer binding to semaphorin 3A and vascular endothelial growth factor 165. *J Biol Chem* **277**:18069-18076.

Gu Y, Janoschka S, Ge S (2012) Neurogenesis and hippocampal plasticity in the adult brain. *Curr Top Behav Neurosci*. Doi: 10.1007/7854_2012_217.

Harker KT, Whishaw IQ (2004) Impaired place navigation in place and matching-to-place swimming pool tasks follows both retrosplenial cortex lesions and cingulum bundle lesions in rats. *Hippocampus* **14**:224-231.

Harrigan MR, Ennis SR, Masada T, Keep RF (2002) Intraventricular infusion of vascular endothelial growth factor promotes cerebral angiogenesis with minimal brain edema. *Neurosurgery* **50**:589-598.

Harrigan MR, Ennis SR, Sullivan SE, Keep RF (2003) Effects of intraventricular infusion of vascular endothelial growth factor on cerebral blood flow, edema, and infarct volume. *Acta Neurochir* **145**:49-53.

Hawkins BT, Davis TP (2005) The blood-brain barrier/neurovascular unit in health and disease. *Pharmacol Rev* **57**:173-185.

Hayakawa K, Pham LD, Som AT, Lee BJ, Guo S, Lo EH, Arai K (2011) Vascular endothelial growth factor regulates the migration of oligodendrocyte precursor cells. *J Neurosci* **31**:10666-10670.

Hayashi T, Abe K, Itoyama Y (1998) Reduction of ischemic damage by application of vascular endothelial growth factor in rat brain after transient ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab* **18**:887-895.

Hebb DO (1947) The effects of early experience on problem-solving at maturity. *Am Psychol* **2**:306-307.

Hensch TK (2005) Critical period plasticity in local cortical circuits. *Nat Rev Neurosci* **6**:877-888.

Herrera JJ, Nestic-Taylor DO, Narayana PA (2009) Reduced Vascular Endothelial Growth Factor Expression In Contusive Spinal Cord Injury. *J Neurotrauma* **26**:995-1003.

Herz J, Reitmeir R, Hagen SI, Reinboth BS, Guo Z, Zechariah A, ElAli A, Doeppner TR, Bacigaluppi M, Pluchino S, Kilic U, Kilic E, Hermann DM (2012) Intracerebroventricularly delivered VEGF promotes contralesional corticorubral plasticity after focal cerebral ischemia via mechanisms involving anti-inflammatory actions. *Neurobiol Dis* **45**:1077-1085.

Heynen AJ, Bear MF (2001) Long-term potentiation of thalamocortical transmission in the adult visual cortex in vivo. *J Neurosci* **21**:9801-9813.

- Hicks AU, Lappalainen RS, Narkilahti S, Suuronen R, Corbett D, Sivenius J, Hovatta O, Jolkkonen J** (2009) Transplantation of human embryonic stem cell-derived neural precursor cells and enriched environment after cortical stroke in rats: cell survival and functional recovery. *Eur J Neurosci* **29**:562-574.
- Hoffmeyer HW, Enager P, Thomsen KJ, Lauritzen MJ** (2007) Nonlinear neurovascular coupling in rat sensory cortex by activation of transcallosal fibers. *J Cereb Blood Flow Metab* **27**: 575-587.
- Holloway RL** (1966) Dendritic branching: some preliminary results of training and complexity in rat visual cortex. *Brain Res* **2**:393-396.
- Horner PJ, Palmer TD** (2003) New roles for astrocytes: the nightlife of an “astrocyte”. *La vida local! Trends Neurosci* **26**:597-603.
- Hu TT, Van den Bergh G, Thorrez L, Heylen K, Eysel UT, Arckens L** (2011) Recovery from retinal lesions: molecular plasticity mechanisms in visual cortex far beyond the deprived zone. *Cereb Cortex* **21**:2883-2892.
- Ickes BR, Pham TM, Sanders LA, Albeck DS, Mohammed AH, Granholm AC** (2000) Long-term environmental enrichment leads to regional increases in neurotrophin levels in rat brain. *Exp Neurol* **164**:45-52.
- Ilan N, Mahooti S, Madri JA** (1998) Distinct signal transduction pathways are utilized during the tube formation and survival phases of in vitro angiogenesis. *J Cell Sci* **111**:3621-3631.
- Ito N, Wernstedt C, Engstrom U, Claesson-Welsh L** (1998) Identification of vascular endothelial growth factor receptor-1 tyrosine phosphorylation sites and binding of SH2 domaincontaining molecules. *J Biol Chem* **273**: 23410-23418.
- Jadavji NM, Kolb B, Metz GA** (2006) Enriched environment improves motor function in intact and unilateral dopamine-depleted rats. *Neuroscience* **140**:1127-1138.
- Jankowsky JL, Xu G, Fromholt D, Gonzales V, Borchelt DR** (2003) Environmental enrichment exacerbates amyloid plaque formation in a transgenic mouse model of Alzheimer disease. *J Neuropathol Exp Neurol* **62**:1220-1227.
- Jin KL, Mao XO, Greenberg DA** (2000) Vascular endothelial growth factor: direct neuroprotective effect in in vitro ischemia. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**: 10242-10247.
- Jin K, Mao XO, Bateur SP, McEachron E, Leahy A, Greenberg DA** (2001) Caspase-3 and the regulation of hypoxic neuronal death by vascular endothelial growth factor. *Neuroscience* **108**:251-358
- Jin K, Zhu Y, Sun Y, Mao XO, Xie L, Greenberg DA** (2002) Vascular endothelial growth factor (VEGF) stimulates neurogenesis in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**:11946-11950.
- Johansson BB, Belichenko PV** (2002) Neuronal plasticity and dendritic spines: effect of environmental enrichment on intact and postischemic rat brain. *J Cereb Blood Flow Metab* **22**:89-96.
- Jones TA, Jefferson SC** (2011) Reflections of experience-expectant development in repair on the adult damaged brain. *Dev Psychobiol* **53**:466-475.

8. Bibliografia

- Karmarkar UR, Dan Y** (2006) Experience-dependent plasticity in adult visual cortex. *Neuron* **52**:577-585.
- Kawamura H, Li X, Harper SJ, Bates DO, Claesson-Welsh L** (2008) Vascular endothelial growth factor (VEGF)-A165b is a weak in vitro agonist for VEGF receptor-2 due to lack of coreceptor binding and deficient regulation of kinase activity. *Cancer Res* **68**:4683-4692.
- Kaya D, Gursoy-Ozdemir Y, Yemisci M, Tuncer N, Aktan S, Dalkara T** (2005) VEGF protects brain against focal ischemia without increasing blood-brain permeability when administered intracerebroventricularly. *J Cereb Blood Flow Metab* **25**:1111-1118.
- Kee N, Teixeira CM, Wang AH, Frankland PW** (2007) Preferential incorporation of adult-generated granule cells into spatial memory networks in the dentate gyrus. *Nat Neurosci* **10**:355-362.
- Kempermann G, Kuhn HG, Gage FH** (1997) More hippocampal neurons in adult mice living in an enriched environment. *Nature* **386**:493-495.
- Kempermann G, Gage FH** (1999) Experience-dependent regulation of adult hippocampal neurogenesis: effects of long-term stimulation and stimulus withdrawal. *Hippocampus* **9**:321-332.
- Kerr AL, Steuer EL, Pochtarev V, Swain RA** (2010) Angiogenesis but not neurogenesis is critical for normal learning and memory acquisition. *Neuroscience* **171**:214-226.
- Kessels RP, de Haan EH, Kappelle LJ, Postma A** (2001) Varieties of human spatial memory: a meta-analysis on the effects of hippocampal lesions. *Brain Res Brain Res Rev* **35**:295-303.
- Kilic E, Kilic U, Wang Y, Bassetti CL, Marti HH, Hermann DM** (2006) The phosphatidylinositol-3 kinase/Akt pathway mediates VEGF's neuroprotective activity and induces blood brain barrier permeability after focal cerebral ischemia. *FASEB J* **20**:1185-1187.
- Kim BW, Choi M, Kim YS, Park H, Lee HR, Yun CO, Kim EJ, Choi JS, Kim S, Rhim H, Kaang BK, Son H** (2008) Vascular endothelial growth factor (VEGF) signalling regulates hippocampal neurons by elevation of intracellular calcium and activation of calcium/calmodulin protein kinase II and mammalian target of rapamycin. *Cell Signal* **20**:714-725.
- Kim SM, Frank LM** (2009) Hippocampal lesions impair rapid learning of a continuous spatial alternation task. *PLoS One* **4**:e5494.
- Kirk S, Frank JA, Karlik S** (2004) Angiogenesis in multiple sclerosis: is it good, bad or an epiphenomenon? *J Neurol Sci* **217**:125-130.
- Kobayashi Y, Amaral DG** (2007) Macaque monkey retrosplenial cortex: III. Cortical efferents. *J Comp Neurol* **502**:810-833.
- Kobilo T, Liu QR, Gandhi K, Mughai M, Shamam Y, van Praag H** (2011) Running is the neurogenic and neurotrophic stimulus in environmental enrichment. *Learn Mem* **18**:605-609.
- Kolb B, Gibb R** (1991) Environmental enrichment and cortical injury: behavioural and anatomical consequences of frontal cortex lesions. *Cereb Cortex* **1**:189-198.
- Kolb B** (1999) Synaptic plasticity and the organization of behaviour after early and late brain injury. *Can J Exp Psychol* **53**:62-76.

- Komitova M, Mattsson B, Johansson BB, Eriksson PS** (2005) Enriched environment increases neural stem/progenitor cell proliferation and neurogenesis in the subventricular zone of stroke-lesioned adult rats. *Stroke* **36**:1278-1282.
- Krum JM, Mani N, Rosenstein JM** (2002) Angiogenic and astroglial responses to vascular endothelial growth factor administration in adult rat brain. *Neuroscience* **110**:589-604.
- Krum JM, Khaibullina A** (2003) Inhibition of endogenous VEGF impedes revascularization and astroglial proliferation: roles for VEGF in brain repair. *Exp Neurol* **181**:241-257.
- Lafuente JV, Cruz-Sánchez FF, Rossi ML, Cervos-Navarro J** (1992) Ultraviolet irradiation induced brain oedema in rats. A microgravimetric study. *Neuropathol Appl Neurobiol* **18**:137-144.
- Lafuente JV, Adan B, Alkiza K, Garibi JM, Rossi M, Cruz-Sanchez FF** (1999) Expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and platelet-derived growth factor receptor beta (PDGFR-beta) in human gliomas. *J Mol Neurosci* **13**:177-185.
- Lafuente JV, Mitre B, Argandoña EG** (2007) Spatio-temporal distribution of apoptosis and the modulators thereof following a cortical microinfarct in rat brain. *Neurosci Res* **57**:354-61.
- Lambrechts D, Storkebaum E, Morimoto M, Del-Favero J, Desmet F, Marklund SL, Wyns S, Thijs V, Andersson J, van Marion I, Al-Chalabi A, Bornes S, Musson R, Hansen V, Beckman L, Adolfsson R, Pall HS, Prats H, Vermeire S, Rutgeerts P, Katayama S, Awata T, Leigh N, Lang-Lazdunski L, Dewerchin M, Shaw C, Moons L, Vlietinck R, Mani N, Khaibullina A, Krum JM, Rosenstein JM** (2003) Astrocyte growth effects of vascular endothelial growth factor (VEGF) application to perinatal neocortical explants: receptor mediation and signal transduction pathways. *Exp Neurol* **192**:394-406.
- Lazarov O, Robinson J, Tang YP, Hairston IS, Korade-Mirnic Z, Lee VM, Hersh LB, Sapolsky RM, Mirnic K, Sisodia SS** (2005) Environmental enrichment reduces Abeta levels and amyloid deposition in transgenic mice. *Cell* **120**:701-713.
- Lazarus MS, Huang ZJ** (2011) Distinct maturation profiles of perisomatic and dendritic targeting GABAergic interneurons in the mouse primary visual cortex during the critical period of ocular dominance plasticity. *J Neurophysiol* **106**:775-787.
- Lazic SE, Grote HE, Blakemore C, Hannan AJ, van Dellen A, Phillips W, Barker RA** (2006) Neurogenesis in the R6/1 transgenic mouse model of Huntington's disease: effects of environmental enrichment. *Eur J Neurosci* **23**:1829-1938.
- Lecrux C, Hamel E** (2011) The neurovascular unit in brain function and disease. *Acta Physiologica* **203**:47-59.
- Lee HT, Chang YC, Tu YF, Huang CC** (2010) CREB activation mediates VEGF-A's protection of neurons and cerebral vascular endothelial cells. *J Neurochem* **113**:79-91.
- Leggio MG, Mandolesi L, Federico F, Spirito F, Ricci B, Gelfo F, Petrosini L** (2005) Environmental enrichment promotes improved spatial abilities and enhanced dendritic growth in the rat. *Behav Brain Res* **163**:78-90.
- Li Q, Ford MC, Lavic EB, Madri JA** (2006) Modeling the neurovascular niche: VEGF- and BDNF-mediated cross-talk between neural stem cells and endothelial cells: an in vitro study. *J Neurosci Res* **84**:1656-1668.

Licht T, Goshen I, Avital A, Kreisel T, Zubedat S, Eavri R, Segal M, Yirmiya R, Keshet E (2011) Reversible modulations of neuronal plasticity by VEGF. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**:5081-5086.

Lindhorst T, Kurz H, Sibbe M, Meseke M, Förster E (2012) Congruence of vascular network remodeling and neuronal dispersion in the hippocampus of reelin-deficient mice. *Histochem Cell Biol* **137**:629-639.

Lo EH, Dalkara T, Moskowitz MA (2003) Mechanisms, challenges and opportunities in stroke. *Nat Rev Neurosci* **4**:399-415.

Lok J, Gupta P, Guo S, Kim WJ, Whalen MJ, van Leyen K, Lo EH (2007) Cell-cell signaling in the neurovascular unit. *Neurochem Res* **32**:2032-2045.

Louissaint A Jr, Rao S, Leventhal C, Goldman SA (2002) Coordinated interaction of neurogenesis and angiogenesis in the adult songbird brain. *Neuron* **34**:945-960.

Loukavenko EA, Ottley MC, Moran JP, Wolff M, Dalrymple-Alford JC (2007) Towards therapy to relieve memory impairment after anterior thalamic lesions: improved spatial working memory after immediate and delayed postoperative enrichment. *Eur J Neurosci* **26**:3267-3276.

Ma Y, Liu W, Wang Y, Chao X, Qu Y, Wang K, Fei Z (2011) VEGF protects rat cortical neurons from mechanical trauma injury induced apoptosis via the MEK/ERK pathway. *Brain Res Bull* **86**:441-446.

Maguire EA, Frackowlak RS, Frith CD (1996) Learning to find your way: a role for the human hippocampal formation. *Proc Biol Sci* **263**:1745-1750.

Malenka R, Bear M (2004) LTP and LTD: an embarrassment of riches. *Neuron* **44**:5-21.

Mani N, Khaibullina A, Krum JM, Rosenstein JM (2005) Astrocyte growth effects of vascular endothelial growth factor (VEGF) application to perinatal neocortical explants: receptor mediation and signal transduction pathways. *Exp Neurol* **192**:394-406.

Manoonkitiwongsa PS, Schultz RL, McCreery DB, Whitter EF, Lyden PD (2004) Neuroprotection of ischemic brain by vascular endothelial growth factor is critically dependent on proper dosage and may be compromised by angiogenesis. *J Cereb Blood Flow Metab* **24**:693-702.

Manteca X, Zúñiga JM (2008) Bienestar. Medidas correctoras aplicadas al animal de experimentación. En *Ciencia y Tecnología del Animal de Laboratorio* (ed: Zúñiga JM, Orellana JM, Tur JM). UAH y SECAL, Salamanca. pp 433-462.

Marti HJ, Bernaudin M, Bellail A, Schoch H, Euler M, Petit E, Risau W (2000) Hypoxia-induced vascular endothelial growth factor expression precedes neovascularization after cerebral ischemia. *Am J Pathol* **156**:965-976.

Martínez-Cué C, Rueda N, García E, Davisson MT, Schmidt C, Flórez J (2005) Behavioral, cognitive and biochemical responses to different environmental conditions in male Ts65Dn mice, a model of Down syndrome. *Behav Brain Res* **163**:174-185.

Matsuzaki H, Tamatani M, Yamaguchi A, Namikawa K, Kiyama H, Vitek MP, Mitsuda N, Tohyama M (2001) Vascular endothelial growth factor rescues hippocampal neurons from glutamate-induced toxicity: signal transduction cascades. *FASEB J* **15**:1218-1220.

- Maurer MH, Tripps WK, Feldmann RE Jr, Kuschinsky W** (2003) Expression of vascular endothelial growth factor and its receptors in neural stem cells. *Neurosci Lett* **344**:165-168.
- McCoy PA, Huang HS, Philpot BD** (2009) Advances in understanding visual cortex plasticity. *Curr Opin Neurobiol* **19**:298-304.
- McDonald AJ, Mascagni F** (1996) Cortico-cortical and cortico-amygdaloid projections of the rat occipital cortex: a Phaseolus vulgaris leucoagglutinin study. *Neuroscience* **71**:37-54.
- Meshi D, Drew MR, Saxe M, Ansorge MS, David D, Santarelli L, Malapani C, Moore H, Hen R** (2006) Hippocampal neurogenesis is not required for behavioural effects of environmental enrichment. *Nat Neurosci* **9**:729-731.
- Miller MW, Vogt BA** (1984) Direct connections of rat visual cortex with sensory, motor, and association cortices. *J Comp Neurol* **226**:184-202.
- Mohedano-Moriano A, Pro-Sistiaga P, Arroyo-Jimenez MM, Artacho-Pérula E, Insausti AM, Marcos P, Cebada-Sánchez S, Martínez-Ruiz J, Muñoz M, Blaizot X, Martínez-Marcos A, Amaral DG, Insausti R** (2007) Topographical and laminar distribution of cortical input to the monkey entorhinal cortex. *J Anat* **211**:250-260.
- Morrison KE, Robberecht W, Van Broeckhoven C, Collen D, Andersen PM, Carmeliet P** (2003) VEGF is a modifier of amyotrophic lateral sclerosis in mice and humans and protects motoneurons against ischemic death. *Nat Genet* **34**:383-394.
- Moser E, Moser MB, Andersen P** (1993) Synaptic potentiation in the rat dentate gyrus during exploratory learning. *Neuroreport* **5**:317-320.
- Naber PA, Witter MP, Lopes da Silva FH** (2000) Differential distribution of barrel or visual cortex. Evoked responses along the rostro-caudal axis of the peri- and postrhinal cortices. *Brain Res* **877**:298-305.
- Naka F, Narita N, Okado N, Narita M** (2005) Modification of AMPA receptor properties following environmental enrichment. *Brain Dev* **27**:275-278.
- Nedergaard M, Ransom B, Goldman SA** (2003) New roles for astrocytes: redefining the functional architecture of the brain. *Trends Neurosci* **26**:523-530.
- Neeper SA, Gómez-Pinilla F, Choi J, Cotman C** (1995) Exercise and brain neurotrophins. *Nature* **373**:109.
- Neufeld G, Cohen T, Gengrinovitch S, Poltorak Z** (1999) Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors. *FASEB J* **13**:9-22.
- Neufeld G, Kessler O, Herzog Y** (2002) The interaction of Neuropilin-1 and Neuropilin-2 with tyrosine-kinase receptors for VEGF. *Adv Exp Med Biol* **15**:81-90.
- Newman EA** (2003) New role for astrocytes: regulation of synaptic transmission. *Trends Neurosci* **26**:536-542.
- Nikolova G, Strilic B, Lammert E** (2007) The vascular niche and its basement membrane. *Trends Cell Biol* **17**:19-25.
- Nikotera P, Leist M, Fava E, Berliocchi L, Volbracht C** (2000) Energy requirement for caspase activation and neuronal cell death. *Brain Pathol* **10**:276-282.

- Nithianantharajah J, Levis H, Murphy M** (2004) Environmental enrichment results in cortical and subcortical changes in levels of synaptophysin and PSD-95 proteins. *Neurobiol Learn Mem* **81**:200-210.
- Nithianantharajah J, Hannan AJ** (2006) Enriched environments, experience-dependent plasticity and disorders of the nervous system. *Nat Rev Neurosci* **7**:697-709.
- Nithianantharajah J, Hannan AJ** (2009) The neurobiology of brain and cognitive reserve: Mental and physical activity as modulators of brain disorders. *Prog Neurobiol.***89**:369-382.
- Ogunshola OO, Stewart WB, Mihalcik V, Solli T, Madri JA, Ment LR** (2000) Neuronal VEGF expression correlates with angiogenesis in postnatal developing rat brain. *Brain Res Dev Brain Res* **119**:139-153.
- Ohlsson AL, Johansson BB** (1995) Environment influences functional outcome of cerebral infarction in rats. *Stroke* **26**:644-649.
- Olsson AK, Dimberg A, Kreuger J, Claesson-Welsh L** (2006) VEGF receptor signalling in control of vascular function. *Nat Rev Mol Cell Biol* **7**:359-371.
- Oosthuysen B, Moons L, Storkebaum E, Beck H, Nuyens D, Brusselmans K, Van Dorpe J, Hellings P, Gorselink M, Heymans S, Theilmeier G, Dewerchin M, Laudénbach V, Vermynen P, Raat H, Acker T, Vleminckx V, Van Den Bosch L, Cashman N, Fujisawas H, Drost MR, Sciot R, Bruyninckx F, Hicklin DJ, Ince C, Gressens P, Lupu F, Plate KH, Robberecht W, Herbert JM, Collen D, Carmeliet P** (2001) Deletion of the hypoxia-response element in the vascular endothelial growth factor promoter causes motor neuron degeneration. *Nat Genet* **28**:131-138.
- Ortuzar N, Argandoña EG, Bengoetxea H, Lafuente JV** (2011) Combination of intracortically administered VEGF and environmental enrichment enhances brain protection in developing rats. *J Neural Transm* **118**:135-144.
- Overstreet LS, Hentges ST, Bumashny VF, de Souza FS, Smart JL, Santangelo AM, Low MJ, Westbrook GL, Rubinstein M** (2004) A transgenic marker for newly born granule cells in dentate gyrus. *J Neurosci* **24**:3251-3259.
- Paban V, Chambon C, Manrique C, Touzet C, Alescio-Lautier B** (2011) Neurotrophic signalling molecules associated with cholinergic damage in young and aged rats: environmental enrichment as potential therapeutic agent. *Neurobiol Aging* **32**:470-485.
- Palmer TD, Willhoite AR, Gage FH** (2000) Vascular niche for adult hippocampal neurogenesis. *J Comp Neurol* **425**:479-494.
- Papadopoulos GC, Michaloudi HC** (1999) Apoptosis in the visual system of normal and dark-reared rats. *Brain Res* **838**:214-217.
- Park JE, Chen HH, Winer J, Houck KA, Ferrara N** (1994) Placenta growth factor. Potentiation of vascular endothelial growth factor bioactivity, in vitro and in vivo, and high affinity binding to Flt-1 but not to Flk-1/KDR. *J Biol Chem* **269**:25646-25654.
- Passineau MJ, Green EJ, Dietrich WD** (2001) Therapeutic effects of environmental enrichment on cognitive function and tissue integrity following severe traumatic brain injury in rats. *Exp Neurol* **168**:373-384.
- Pati S, Orsi SA, Moore AN, Dash PK** (2009) Intra-hippocampal administration of the VEGF receptor blocker PTK787/ZK222584 impairs long-term memory. *Brain Res* **1256**:85-91.

- Paxinos G, Watson C** (2007) The rat brain in stereotaxic coordinates. 6th ed. Elsevier Academic Press, Amsterdam.
- Paz-Villagràn V, Lenck-Santini PP, Save E, Poucet B** (2002) Properties of place cell firing after damage to the visual cortex. *Eur J Neurosci* **16**:771-776.
- Pekny M, Nilsson M** (2005) Astrocyte activation and reactive gliosis. *Glia* **50**:427-434.
- Perea G, Navarrete M, Araque A** (2009) Tripartite synapses: astrocytes process and control synaptic information. *Trends Neurosci* **32**:421-431.
- Peters A** (1985) The visual cortex of the rat. In *Cerebral cortex*. (ed. Jones EG, Peters A). Plenum Press, New York, pp 19-80.
- Pham TM, Winblad B, Granholm AC, Mohammed AH** (2002) Environmental influences on brain neurotrophins in rats. *Pharmacol Biochem Behav* **73**:167-175.
- Pietropaolo S, Feldon J, Alleva E, Cirulli F, Yee BK** (2006) The role of voluntary exercise in enriched rearing: a behavioral analysis. *Behav Neurosci* **120**:787-803.
- Pizzorusso T, Medini P, Berardi N, Chierzi S, Fawcett JW, Maffei L** (2002) Reactivation of ocular dominance plasticity in the adult visual cortex. *Science* **298**:1248-1251.
- Pizzorusso T, Berardi N, Maffei L** (2007) A richness that cures. *Neuron* **54**:508-510.
- Plaschke K, Staub J, Ernst E, Marti HH** (2008) VEGF overexpression improves mice cognitive abilities after unilateral common carotid artery occlusion. *Exp Neurol* **214**:285-292.
- Pothuizen HH, Zhang WN, Jongen-Rêlo AL, Feldon J, Yee BK** (2004) Dissociation of function between the dorsal and the ventral hippocampus in spatial learning abilities of the rat: a within-subject, within-task comparison of reference and working spatial memory. *Eur J Neurosci* **19**:705-712.
- Proescholdt MA, Jacobson S, Tresser N, Oldfield EH, Merrill MJ** (2002) Vascular endothelial growth factor is expressed in multiple sclerosis plaques and can induce inflammatory lesions in experimental allergic encephalomyelitis rats. *J Neuropathol Exp Neurol* **61**:914-925.
- Raab S, Plate KH** (2007) Different networks, common growth factors: shared growth factors and receptors of the vascular and the nervous system. *Acta Neuropathol* **113**:607-626.
- Rabchevsky AG, Weinitz JM, Couplier M, Fages C, Tinel M, Junier MP** (1998) A role for transforming growth factor alpha as an inducer of astrogliosis. *J Neurosci* **18**:10541-10552.
- Radak Z, Taylor AW, Ohno H, Goto S** (2001) Adaptation to exercise-induced oxidative stress: from muscle to brain. *Exerc Immunol Rev* **7**:90-107.
- Rampon C, Tang YP, Goodhouse J, Shimizu E, Kyin M, Tsien JZ** (2000) Enrichment induces structural changes and recovery from nonspatial memory deficits in CA1 NMDAR1-knockout mice. *Nat Neurosci* **3**:238-244.
- Ranc V, Petruzzello F, Kretz R, Argandoña EG, Zhang X, Rainer G** (2012) Broad characterization of endogenous peptides in the tree shrew visual system. *J Proteomics* **75**:2526-2535.

8. Bibliografia

- Reitmeir R, Kilic E, Reinboth BS, Guo Z, ElAli A, Zechariah A, Kilic U, Hermann DM** (2012) Vascular endothelial growth factor induces contralesional corticobulbar plasticity and functional neurological recovery in the ischemic brain. *Acta Neuropathol* **123**:273-284.
- Repérant J, Weidner C, Pakhomova A, Desroches AM, Vesseclin N, Lemire M** (1987) Demonstration of a retino-thalamo-hippocampal pathway in the rat. *C R Acad Sci III* **305**:601-604.
- Repici M, Mariani J, Borsello T** (2007) Neuronal Death and Neuroprotection: A Review. In *Methods in Molecular Biology* (ed. Borsello T). Humana Press Inc., Totowa, NJ. pp 1-14.
- Ribatti D, Nico B, Crivellato E** (2011) The role of pericytes in angiogenesis. *Int J Dev Biol* **55**:261-268.
- Robertson PL, Du Bois M, Bowman PD, Goldstein GW** (1985) Angiogenesis in developing rat brain: an in vivo and in vitro study. *Brain Res* **355**:219-223.
- Rosenstein JM, Mani N, Silverman WF, Krum JM** (1998) Patterns of brain angiogenesis after vascular endothelial growth factor administration in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**:7086-7091.
- Rosenzweig MR, Bennet EL, Diamond MC, Wu SY, Slagle RW, Saffran E** (1969) Influences of environmental complexity and visual stimulation on development of occipital cortex in rat. *Brain Res* **14**:427-445.
- Rosenzweig MR, Bennet EL, Hebert M, Morimoto H** (1978) Social grouping cannot account for cerebral effects of enriched environments. *Brain Res* **153**:563-576.
- Rowan RA, Maxwell DS** (1981) Patterns of vascular sprouting in the postnatal development of the cerebral cortex of the rat. *Am J Anat* **160**:247-255.
- Ruhrberg C** (2008) VEGF in Development. Landes Biosciences and Springer Science, Austin, TX.
- Rutten A, van Albada M, Silveira DC, Cha BH, Liu X, Hu YN, Cilio MR, Holmes GL** (2002) Memory impairment following status epilepticus in immature rats: time-course and environmental effects. *Eur J Neurosci* **16**:501-513.
- Sale A, Maya Vetencourt JF, Medini P, Cenni MC, Baroncelli L, De Pasquale R, Maffei L** (2007) Environmental enrichment in adulthood promotes amblyopia recovery through a reduction of intracortical inhibition. *Nat Neurosci* **10**:679-681.
- Scali M, Baroncelli L, Cenni MC, Sale A, Maffei L** (2012) A rich environmental experience reactivates visual cortex plasticity in aged rats. *Exp Gerontol* **47**:337-341.
- Schilling G, Savonenko AV, Coonfield ML, Morton JL, Vorovich E, Gale A, Neslon C, Chan N, Eaton M, Fromholt D, Ross CA, Borchelt DR** (2004) Environmental, pharmacological, and genetic modulation of the HD phenotype in transgenic mice. *Exp Neurol* **187**:137-149.
- Scoville WB, Milner B** (1957) Loss of recent memory after bilateral hippocampal lesions. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* **20**:11-21.
- Shen Q, Goderie SK, Jin L, Karanth N, Sun Y, Abramova N, Vincent P, Pumiglia K, Temple S** (2004) Endothelial cells stimulate self-renewal and expand neurogenesis of neural stem cells. *Science* **304**:1338-1340.

- Shen Q, Wang Y, Kokovay E, Lin G, Chuang SM, Goderie SK, Roysam B, Temple S** (2008) Adult SVZ stem cell lie in a vascular niche: a quantitative analysis of niche cell-cell interaction. *Cell Stem Cell* **3**:289-300.
- Sherman SM, Spear PD** (1982) Organization of visual pathways in normal and visually deprived cats. *Physiological Reviews* **62**:738-855.
- Shibuya M** (2006) Differential roles of vascular endothelial growth factor receptor-1 and receptor-2 in angiogenesis. *J Biochem Mol Biol* **39**:469-478.
- Shima DT, Kuroki M, Deutsch U, Ng YS, Adamis AP, D'Amore PA** (1996) The mouse gene for vascular endothelial growth factor. Genomic structure, definition of the transcriptional unit, and characterization of transcriptional and post-transcriptional regulatory sequences. *J Biol Chem* **271**:3877-3883.
- Shingo T, Sorokan ST, Shimazaki T, Weiss S** (2001) Erythropoietin regulates the in vitro and in vivo production of neuronal progenitors by mammalian forebrain neural stem cells. *J Neurosci* **21**:9733-9743.
- Shors TJ, Townsend DA, Zhao M, Kozorovitskiy Y, Gould E** (2002) Neurogenesis may relate to some but not all types of hippocampal-dependent learning. *Hippocampus* **12**:578-584.
- Shweiki D, Itin A, Soffer D, Keshet E** (1992) Vascular endothelial growth factor induced by hypoxia may mediate hypoxia-initiated angiogenesis. *Nature* **359**:843-845.
- Silverman WF, Krum JM, Mani N, Rosenstein JM** (1999) Vascular, glial and neuronal effects of vascular endothelial growth factor in mesencephalic explant cultures. *Neuroscience* **90**:1529-1541.
- Sirevaag AM, Greenough WT** (1987) Differential rearing effects on rat visual cortex synapses. III. Neuronal and glial nuclei, boutons, dendrites, and capillaries. *Brain Res* **424**:320-332.
- Sirevaag AM, Black JE, Shafron D, Greenough WT** (1988) Direct evidence that complex experience increases capillary branching and surface area in visual cortex of young rats. *Brain Res* **471**:299-304.
- Sofroniew MW** (2009) Molecular dissection of reactive astrogliosis and gliar scar formation. *Trends Neurosci* **32**:638-647.
- Soker S, Takashima S, Miao HQ, Neufeld G, Klagsbrun M** (1998) Neuropilin-1 is expressed by endothelial and tumor cells as an isoform-specific receptor for vascular endothelial growth factor. *Cell* **92**:735-745.
- Song H, Stevens CF, Gage FH** (2002) Astroglia induce neurogenesis from adult neural stem cells. *Nature* **417**:39-44.
- Spiers HJ, Burgess N, Hartley T, Vargha-Khadem F, O'Keefe J** (2001) Bilateral hippocampal pathology impairs topographical and episodic memory but not visual pattern matching. *Hippocampus* **11**:715-725.
- Spires TL, Grote HE, Varshney NK, Cordery PM, van Dellen A, Blakemore C, Hannan AJ** (2004) Environmental enrichment rescues protein deficits in a mouse model of Huntington's disease, indicating a possible disease mechanism. *J Neurosci* **24**:2270-2276.

Storkebaum E, Lambrechts D, Carmeliet P (2004) VEGF: once regarded as a specific angiogenic factor, now implicated in neuroprotection. *Bioessays* **26**:943-954.

Storkebaum E, Lambrechts D, Dewerchin M, Moreno-Murciano MP, Appelmans S, Oh H, Van Damme P, Rutten B, Man WY, De Mol M, Wyns S, Manka D, Vermeulen K, Van Den Bosch L, Mertens N, Schmitz C, Robberecht W, Conway EM, Collen D, Moons L, Carmeliet P (2005) Treatment of motoneuron degeneration by intracerebroventricular delivery of VEGF in a rat model of ALS. *Nat Neurosci* **8**:85-92.

Studer L, Csete M, Lee SH, Kabbani N, Walikonis J, Wold B, McKay R (2000) Enhanced proliferation, survival, and dopaminergic differentiation of CNS precursors in lowered oxygen. *J Neurosci* **20**:7377-7383.

Sun FY, Guo X (2005) Molecular and cellular mechanisms of neuroprotection by vascular endothelial growth factor. *J Neurosci Res* **79**:180-184.

Sun Y, Jin K, Xie L, Childs J, Mao XO, Logvinova A, Greenberg DA (2003) VEGF-induced neuroprotection, neurogenesis, and angiogenesis after focal cerebral ischemia. *J Clin Invest* **111**:1843-1851.

Sun Y, Jin K, Childs JT, Xie L, Mao XO, Greenberg DA (2006) Vascular endothelial growth factor-B (VEGFB) stimulates neurogenesis: evidence from knockout mice and growth factor administration. *Dev Biol* **289**:329-335.

Sutherland RJ, Dringenberg HC, Hoelsing JM (1993) Induction of long-term potentiation at perforant path dentate synapses does not affect place learning or memory. *Hippocampus* **3**:141-147.

Swain RA, Harris AB, Wiener EC, Dutka MV, Morris HD, Theien BE, Konda S, Engberg K, Lauterbur PC, Greenough WT (2003) Prolonged exercise induces angiogenesis and increases cerebral blood volume in primary motor cortex of the rat. *Neuroscience* **117**:1037-1046.

Szeligo F, Leblond CP (1977) Response of the three main types of glial cells of cortex and corpus callosum in rats handled during suckling or exposed to enriched, control and impoverished environments following weaning. *J Comp Neurol* **172**:247-263.

Taha SA, Stryker MP (2005) Molecular substrates of plasticity in the developing visual cortex. *Prog Brain Res* **147**:103-114.

Talaei SA, Sheibani V, Salami M (2010) Light deprivation improves melatonin related suppression of hippocampal plasticity. *Hippocampus* **20**:447-455.

Tan IL, van Schijndel RA, Pouwels PJ, van Walderveen MA, Reichenbach JR, Manoliu RA, Barkhof F (2000) MR venography of multiple sclerosis. *Am J Neuroradiol* **21**:1039-1042.

Tashiro A, Makino H, Gage FH (2007) Experience-specific functional modification of the dentate gyrus through adult neurogenesis: a critical period during an immature stage. *J Neurosci* **27**:3252-3259.

Teyler TJ, DiScenna P (1987) Long-term potentiation. *Annu Rev Neurosci* **10**:131-161.

Thau-Zuchman O, Shohami E, Alexandrovich AG, Leker RR (2010) Vascular endothelial growth factor increases neurogenesis after traumatic brain injury. *J Cereb Blood Flow Metab* **30**:1008-1016.

Thau-Zuchman O, Shohami E, Alexandrovich AG, Leker RR (2012a) Combination of vascular endothelial and fibroblast growth factor 2 for induction of neurogenesis and angiogenesis after traumatic brain injury. *J Mol Neurosci* **47**:166-172.

Thau-Zuchman O, Shohami E, Alexandrovich AG, Leker RR (2012b) Subacute treatment with vascular endothelial growth factor after traumatic brain injury increases angiogenesis and gliogenesis. *Neuroscience* **202**:334-341.

Thomas KA (1996) Vascular endothelial growth factor, a potent and selective angiogenic agent. *J Biol Chem* **271**:603-606.

Tian YY, Tang CJ, Wang JN, Feng Y, Chen XW, Wang L, Qiao X, Sun SG (2007) Favorable effects of VEGF gene transfer on a rat model of Parkinson disease using adeno-associated viral vectors. *Neurosci Lett* **421**:239-244.

Tognini P, Manno I, Bonaccorsi J, Cenni MC, Sale A, Maffei L (2012) Environmental enrichment promotes plasticity and visual acuity recovery in adult monocular amblyopic rats. *Plos One* **7**:e34815. doi:10.1371/journal.pone.0034815.

Tong L, Shen H, Perreau VM, Balazs R; Cotman CW (2001) Effects of exercise on gene-expression profile in the rat hippocampus. *Neurobiol Dis* **8**:1046-1056.

Tovar-y-Romo LB, Tapia R (2012) Delayed administration of VEGF rescues spinal motor neurons from death with a short effective time frame in excitotoxic experimental models in vivo. *ASN Neuro* **4**:e00081. doi:10.1042/AN20110057.

Trancard J, Delamanche IS, Ruiz G, Bouchaud C (1989) Interspecific variations of cerebral endothelial cholinesterases in rodents and carnivores. *Brain Res* **476**:213-219.

Trottier C, Repérant J, Miceli D (1995) Anatomical evidence of retino-thalamo-hippocampal pathway in the pigeon (*Columba livia*). *J Hirnforsch* **36**:489-500.

Tsanov M, Manahan-Vaughan D (2007) Intrinsic, light-independent and visual activity-dependent mechanism cooperate in the shaping of the field response in rat visual cortex. *J Neurosci* **27**:8422-8429.

Tsanov M, Manahan-Vaughan D (2008) Synaptic plasticity from visual cortex to hippocampus: systems integration in spatial information processing. *Neuroscientist* **14**:584-597.

van Dellen A, Blakemore C, Deacon R, York D, Hannan AJ (2000) Delaying the onset of Huntington's in mice. *Nature* **404**:721-722.

van Groen T, Wyss JM (1992) Connections of the retrosplenial dysgranular cortex in the rat. *J Comp Neurol* **315**:200-216.

van Groen T, Wyss JM (2003) Connections of the retrosplenial granular b cortex in the rat. *J Comp Neurol* **463**:249-263.

van Praag H, Qu PM, Elliott RC, Wu H, Dreyfus CF, Black IB (1998) Unilateral hippocampal lesions in newborn and adult rats: effects on spatial memory and BDNF gene expression. *Behav Brain Res* **92**:21-30.

van Praag H, Christie BR, Sejnowski TJ, Gage FH (1999) Running enhances neurogenesis, learning, and long-term potentiation in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**:13427-13431.

8. Bibliografia

van Praag H, Kempermann G, Gage FH (2000) Neural consequences of environmental enrichment. *Nat Rev Neurosci* **1**:191-198.

van Praag H, Schinder AF, Christie BR, Toni N, Palmer TD, Gage FH (2002) Functional neurogenesis in the adult hippocampus. *Nature* **415**:1030-1034.

van Strien NM, Cappaert NL, Witter MP (2009) The anatomy of memory: an interactive overview of the parahippocampal-hippocampal network. *Nat Rev Neurosci* **10**:272-282.

Vangilder RL, Rosen CL, Barr TL, Huber JD (2011) Targeting the neurovascular unit for treatment of neurological disorders. *Pharmacol Ther* **130**:239-247.

Vann SD, Aggleton JP, Maguire EA (2009) What does the retrosplenial cortex do? *Nat Rev Neurosci* **10**:792-802.

Varey AH, Rennel ES, Qiu Y, Bevan HS, Perrin RM, Raffy S, Dixon AR, Paraskeva C, Zaccheo O, Hassan AB, Harper SJ, Bates DO (2008) VEGF 165b, an antiangiogenic VEGF-A isoform, binds and inhibits bevacizumab treatment in experimental colorectal carcinoma: balance of pro- and antiangiogenic VEGF-A isoforms has implications for therapy. *Br J Cancer* **98**:1366-1379.

Vogt BA, Miller MW (1983) Cortical connections between rat cingulate cortex and visual, motor, and postsubicular cortices. *J Comp Neurol* **216**:192-210.

von Tell D, Armulik A, Betsholtz C (2006) Pericytes and vascular stability. *Exp Cell Res* **312**:623-629.

Voyvodic JT (1996) Cell death in cortical development: How much? Why? So what? *Neuron* **16**:693-696.

Wagner AK, Chen X, Kline AE, Zafronte RD, Dixon CE (2005) Gender and environmental enrichment impact dopamine transporter expression after experimental traumatic brain injury. *Exp Neurol* **195**:475-483.

Wang P, Xie ZH, Guo YJ, Zhao CP, Jiang H, Song Y, Zhu ZY, Lai C, Xu SL, Bi JZ (2011) VEGF-induced angiogenesis ameliorates the memory impairment in APP transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Biochem Biophys Res Commun* **411**:620-626.

Wang Y, Galvan V, Gorostiza O, Ataie M, Jin K, Greenberg DA (2006) Vascular endothelial growth factor improves recovery of sensorimotor and cognitive deficits after focal cerebral ischemia in the rat. *Brain Res* **1115**:186-193.

Wang Y, Jin K, Mao XO, Banwait S, Marti HH, Greenberg DA (2007) VEGF-overexpressing transgenic mice show enhanced post-ischemic neurogenesis and neuromigration. *J Neurosci Res* **85**:740-747.

Warburton EC, Baird A, Morgan A, Muir JL, Aggleton JP (2001) The conjoint importance of the hippocampus and anterior thalamic nuclei for allocentric spatial learning: evidence from a disconnection study in the rat. *J Neurosci* **21**:7323-7330.

Wen PH, Hof PR, Chen X, Gluck K, Austin G, Younkin SG, Younkin LH, DeGasperi R, Gama Sosa MA, Robakis NK, Haroutunian V, Elder GA (2004) The presenilin-1 familial Alzheimer disease mutant P117L impairs neurogenesis in the hippocampus of adult mice. *Exp Neurol* **188**:224-237.

- Wick A, Wick W, Waltenberger J, Weller M, Dichgans J, Schulz JB** (2002) Neuroprotection by hypoxic preconditioning requires sequential activation of vascular endothelial growth factor receptor and Akt. *J Neurosci* **22**:6401-6407.
- Widenfalk J, Lipson A, Jubran M, Hofstetter C, Ebendal T, Cao Y, Olson L** (2003) Vascular endothelial growth factor improves functional outcome and decreases secondary degeneration in experimental spinal cord contusion injury. *Neuroscience* **120**:951-960.
- Wiesel TN, Hubel DH** (1963) Effects of visual deprivation on morphology and physiology of cells in the cats lateral geniculate body. *J Neurophysiol* **26**:978-993.
- Will B, Galani R, Kelche C, Rosenzweig MR** (2004) Recovery from brain injury in animals: relative efficacy of environmental enrichment, physical exercise or formal training (1990-2002). *Prog Neurobiol* **72**:167-182.
- Woolard J, Wang WY, Bevan HS, Qiu Y, Morbidelli L, Pritchard-Jones RO, Cui TG, Sugiono M, Waite E, Perrin R, Foster R, Digby-Bell J, Shields JD, Whittles CE, Mushens RE, Gillatt DA, Ziche M, Harper SJ, Bates DO** (2004) VEGF_{165b}, an inhibitory vascular endothelial growth factor splice variant: mechanism of action, in vivo effect on angiogenesis and endogenous protein expression. *Cancer Res* **64**:7822-7835.
- Woolard J, Bevan HS, Harper SJ, Bates DO** (2009) Molecular diversity of VEGF-A as a regulator of its biological activity. *Microcirculation* **16**:572-592.
- Yang CB, Zheng YT, Kiser PJ, Mower GD** (2006) Identification of disabled-1 as a candidate gene for critical period neuroplasticity in cat and mouse visual cortex. *Eur J Neurosci* **23**:2804-2808.
- Yang JP, Liu HJ, Liu XF** (2010) VEGF promotes angiogenesis and functional recovery in stroke rats. *J Invest Surg* **23**:149-155.
- Yasuhara T, Shingo T, Date I** (2004) The potential role of vascular endothelial growth factor in the central nervous system. *Rev Neurosci* **15**:293-307.
- Yasuhara T, Shingo T, Muraoka K, Kameda M, Agari T, Wen Ji Y, Hayase H, Hamada H, Borlongan CV, Date I** (2005) Neurorescue effects of VEGF on a rat model of Parkinson's disease. *Brain Res* **1053**:10-18.
- Young D, Lawlor PA, Leone P, Dragunow M, During MJ** (1999) Environmental enrichment inhibits spontaneous apoptosis, prevents seizure and is neuroprotective. *Nat Med* **5**:448-453.
- Xavier GF, Costa VC** (2009) Dentate gyrus and spatial behaviour. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* **33**:762-773.
- Zacchigna S, Lambrechts D, Carmeliet P** (2008) Neurovascular signalling defects in neurodegeneration. *Nat Rev Neurosci* **9**:169-181.
- Zhang ZG, Zhang L, Jiang Q, Zhang R, Davies K, Powers C, Bruggen N, Chopp M** (2000) VEGF enhances angiogenesis and promotes blood-brain barrier leakage in the ischemic brain. *J Clin Invest* **106**:829-838.
- Zhao C, Teng EM, Summers RG Jr, Ming GL, Gage FH** (2006) Distinct morphological stages of dentate granule neuron maturation in the adult mouse hippocampus. *J Neurosci* **26**:3-11.

8. Bibliografia

Zheng XR, Zhang SS, Yang YJ, Yin F, Wang X, Zhong L, Yu XH (2010) Adenoviral vector-mediated transduction of VEGF improves neural functional recovery after hypoxia-ischemic brain damage in neonatal rats. *Brain Res Bull* **81**:372-377.

Zlokovic BV (2008) The blood-brain barrier in health and chronic neurodegenerative disorders. *Neuron* **57**:178-201.

Zlokovic BV (2011) Neurovascular pathways to neurodegeneration in Alzheimer's disease and other disorders. *Nat Rev Neurosci* **12**:723-738.

9. ANEXOS

Anexo 1. Densidad vascular (n° vasos/ mm^3) y densidad neuronal (n° neuronas/ mm^3) de la corteza visual primaria (V1) para cada grupo experimental (Control, PBS y VEGF) en P25, en el hemisferio ipsilateral (IL) y contralateral (CL) de animales criados en condiciones estándar (SC-SC) y en condiciones de entorno enriquecido (SC-EE). Media \pm SEM.

DENSIDAD VASCULAR (V1)

	Control		PBS		VEGF	
	IL	CL	IL	CL	IL	CL
SC-SC	18439,18 \pm 724,25	18149,39 \pm 749,05	16643,90 \pm 646,36	18762,90 \pm 703,88	17501,31 \pm 771,90	18707,64 \pm 775,92
SC-EE	23580,42 \pm 502,22	23699,64 \pm 532,48	18448,63 \pm 900,40	19322,72 \pm 826,70	20206,38 \pm 805,34	20824,54 \pm 733,97

DENSIDAD NEURONAL (V1)

	Control		PBS		VEGF	
	IL	CL	IL	CL	IL	CL
SC-SC	87928,27 \pm 2837,06	87284,31 \pm 2163,28	63487,50 \pm 3602,43	80055,80 \pm 2977,09	91949,52 \pm 5094,61	102158,80 \pm 3726,77
SC-EE	83068,21 \pm 3475,99	83151,80 \pm 2657,70	59726,83 \pm 3706,87	82765,70 \pm 4003,77	84193,12 \pm 4412,06	90493,45 \pm 3594,75

Anexo 2. Densidad vascular (n° vasos/ mm^3) y densidad neuronal (n° neuronas/ mm^3) de la corteza visual primaria (V1) para cada grupo experimental (Control, PBS y VEGF) en P46, en el hemisferio ipsilateral (IL) y contralateral (CL) de animales criados en condiciones estándar (SC-SC) y en condiciones de entorno enriquecido (SC-EE). Media \pm SEM.

DENSIDAD VASCULAR (V1)

	Control		PBS		VEGF	
	IL	CL	IL	CL	IL	CL
SC-SC	25940,13 \pm 798,73	26432,26 \pm 794,46	24600,04 \pm 788,15	26124,08 \pm 863,67	27153,82 \pm 872,61	27404,01 \pm 850,87
SC-EE	27677,07 \pm 798,73	26591,05 \pm 850,87	16496,55 \pm 724,26	16623,61 \pm 765,56	29572,98 \pm 758,77	30497,01 \pm 716,11

DENSIDAD NEURONAL (V1)

	Control		PBS		VEGF	
	IL	CL	IL	CL	IL	CL
SC-SC	68281,84 \pm 2465,58	68505,17 \pm 2111,49	68547,68 \pm 2772,66	71650,45 \pm 2629,21	71966,29 \pm 2732,88	82571,05 \pm 2297,76
SC-EE	87284,35 \pm 2662,24	86998,42 \pm 2369,30	69523,10 \pm 3170,68	77157,26 \pm 2338,37	70787,85 \pm 2903,00	83573,40 \pm 2102,54

9. Anexos

Anexo 3. Densidad vascular (n° vasos/ mm^3) del giro dentado y densidad neuronal (n° neuronas/ mm^3) de la capa granular del giro dentado (DG) para cada grupo experimental (Control, PBS y VEGF) en P46, en el hemisferio ipsilateral (IL) y contralateral (CL) de animales criados en condiciones estándar (SC-SC) y en condiciones de entorno enriquecido (SC-EE). Media \pm SEM.

DENSIDAD VASCULAR (DG)

	Control		PBS		VEGF	
	IL	CL	IL	CL	IL	CL
SC-SC	19307,12 \pm 726,69	19172,10 \pm 635,77	18651,75 \pm 649,97	18238,82 \pm 564,90	20027,71 \pm 634,31	20289,45 \pm 550,59
SC-EE	20452,63 \pm 839,11	19871,38 \pm 658,08	13352,37 \pm 750,52	13180,73 \pm 658,08	20896,23 \pm 619,72	20030,74 \pm 537,32

DENSIDAD NEURONAL (DG)

	Control		PBS		VEGF	
	IL	CL	IL	CL	IL	CL
SC-SC	148552,16 \pm 15315,81	149081,03 \pm 13363,73	104213,56 \pm 18471,56	110607,16 \pm 17563,39	136763,78 \pm 13061,36	134844,53 \pm 13025,35
SC-EE	209278,86 \pm 18471,56	165371,42 \pm 17563,39	155138,64 \pm 15818,10	143400,77 \pm 14127,98	182811,97 \pm 14439,88	163835,10 \pm 13363,73