

TESINA PARA OPTAR POR EL GRADO DE LICENCIATURA EN
CIENCIAS BIOLÓGICAS – ORIENTACIÓN NEUROCIENCIAS

LOS TRANSPORTADORES vGluT-1/vGAT COMO POSIBLES MARCADORES DE PLASTICIDAD EN LA CORTEZA

Bruno Pannunzio

Orientador: Francesco M. Rossi

Laboratorio de Neurociencias, Unidad de Neuroplasticidad

Facultad de Ciencias, Universidad de la República

Noviembre 2016

Tribunal:

Natalia Lago

Flavio Zolessi

Francesco M. Rossi



AGRADECIMIENTOS

En primer lugar quiero agradecer a mi tutor Francesco, que desde el comienzo me entusiasmó para llevar a cabo este trabajo, apoyándome en todo momento por cualquier duda o preocupación. No solo me enseñó a introducirme en el mundo de la ciencia y como abordar problemas científicos, sino que de él también me llevo enseñanzas más allá de lo académico.

En segundo lugar quiero agradecer a Gaby, compañera de almuerzos y tardes al sol leyendo papers, que me enseñó cómo hacer *Western blot*, siempre con la mejor onda y disposición.

A mis amigos de toda la vida y con los que compartimos la carrera, que hicieron de este camino uno muy divertido. Sin ellos la carrera no hubiese sido ni la mitad de interesante y divertida. En especial a Eli y Meche, que me aguantaron todos estos años.

A toda la gente del piso 4 con los que compartimos almuerzos y charlas.

Al tribunal que dedicaron su tiempo en leer y corregir este trabajo, aportando a mi formación.

Agradecer a CSIC, ANII y PEDECIBA por la financiación que permitió realizar este trabajo.

Agradecer a la sección de Bioquímica y Biología Molecular y a la sección de Biología Celular por asistencia técnica.

Al laboratorio Gador S.A., Uruguay, por proveer la fluoxetina.

Por último quiero agradecer especialmente a mi familia y a mi novia Cami que me apoyaron desde el momento que les dije que quería seguir esta carrera, y siempre continuaron con ese apoyo incondicional. Muchas veces, me contagiaron con el entusiasmo necesario para poder seguir cuando más lo necesitaba. Sin ellos, realizar esta carrera no hubiese sido posible, sin duda.

Gracias.

RESUMEN

La corteza visual es un modelo experimental paradigmático para el estudio de los procesos de plasticidad dependiente de la experiencia en el sistema nervioso central. En esta área, los niveles de plasticidad son particularmente elevados durante los llamados períodos críticos de plasticidad de la vida postnatal, y luego disminuyen durante la adultez. En los últimos años, varias estrategias que restauran altos niveles de plasticidad en el adulto han sido identificadas en roedores. Entre estas, la administración crónica con el antidepresivo fluoxetina y el mantenimiento en condiciones de ambiente enriquecido, son las más relevantes por su potencial uso en la clínica. Se ha propuesto que el balance entre el tono excitatorio e inhibitorio cortical (E/I) cumple un rol fundamental en la determinación de los niveles de plasticidad. Con el fin de identificar un posible marcador del balance E/I, medimos la relación entre los niveles de dos transportadores vesiculares, vGluT-1 y vGAT, clásicamente utilizados como marcadores de sinapsis excitatorias e inhibitorias, respectivamente. En este estudio realizamos ensayos de *Western blot* en ratones jóvenes con altos niveles de plasticidad comparando con adultos con bajos niveles de plasticidad, y en ratones adultos con altos niveles de plasticidad restaurados experimentalmente comparando con los controles. Encontramos que los niveles de vGluT-1 no son modulados en los diferentes modelos experimentales, mientras que los niveles de vGAT son modulados negativamente en ratones tratados con fluoxetina y mantenidos en ambiente enriquecido, pero no durante el PC. Nuestros resultados sugieren que la relación vGluT-1/vGAT es un buen marcador del balance E/I reflejando los niveles de plasticidad únicamente en los modelos de restauración de la plasticidad en adultos.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	4
1. JUSTIFICACIÓN	12
2. HIPÓTESIS	12
3. OBJETIVO GENERAL	13
4. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	13
MATERIALES Y MÉTODOS	14
1. MANTENIMIENTO Y TRATAMIENTO DE ANIMALES EXPERIMENTALES	14
2. WESTERN BLOT	16
2.1 PREPARACIÓN DE MUESTRAS.....	16
2.2 EXTRACCIÓN Y CUANTIFICACIÓN PROTEICA.....	16
2.3 ELECTROFORESIS Y ELECTROTRANSFERENCIA.....	16
2.4 BLOQUEO E INCUBACIÓN DE LA MEMBRANA CON ANTICUERPOS.....	18
2.5 DETECCIÓN DE LA SEÑAL.....	19
2.6 PROCESAMIENTO DE IMÁGENES Y OBTENCIÓN DE DATOS.....	20
2.7 STRIPPING DE LAS MEMBRANAS.....	21
2.8 ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	21
RESULTADOS	22
1. PUESTA A PUNTO	22
2. ESTUDIO DE LOS NIVELES DE vGluT-1 y vGAT EN DIFERENTES MODELOS DE PLASTICIDAD	32
2.1 ANÁLISIS DE LOS NIVELES DE vGluT-1 y vGAT DURANTE EL DESARROLLO (PC vs. AD).....	32
2.2 ANÁLISIS DE LOS NIVELES DE vGluT-1 y vGAT EN ADULTOS CON PLASTICIDAD RESTAURADA (FLX vs. AD y EE vs. SC).....	33
2.3 ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	35
3. COMPARACION DE LA RELACIÓN vGluT-1/vGAT EN LOS DIFERENTES MODELOS EXPERIMENTALES DE PLASTICIDAD	36
DISCUSIÓN	39
1. PUESTA A PUNTO	39
2. MODULACIÓN DE vGluT-1 Y vGAT EN DIFERENTES MODELOS DE PLASTICIDAD	39
2.1 DESARROLLO.....	39
2.2 RESTAURACIÓN EN EL ADULTO.....	40
3. MODULACIÓN DE LA RELACION vGluT-1/vGAT y EL BALANCE E/I	41
CONCLUSIONES	44
BIBLIOGRAFÍA	46

INTRODUCCIÓN

El sistema nervioso se caracteriza por presentar una gran capacidad de adaptarse a los constantes cambios de su entorno. La base de esta adaptación es la formación y el refinamiento de los circuitos neuronales, que permiten que nuestro cerebro se desarrolle, adquiera nuevos conocimientos, aprenda nuevas habilidades y se recupere de lesiones (van Versendaal & Levelt, 2016). En las fases más precoces del desarrollo neuronal, la formación de los circuitos está guiada por señales moleculares determinadas genéticamente, mientras que durante las etapas del desarrollo subsecuentes, los patrones de actividad eléctrica son los factores más relevantes en este complejo proceso. Dichos patrones de actividad eléctrica pueden ser generados de modo espontáneo por el cerebro en desarrollo, o una vez que los órganos sensoriales periféricos se hayan desarrollado y sean funcionales, por estímulos externos, es decir por la experiencia (Levelt & Hübener, 2012). La forma en que estos estímulos externos influyen la estructura y la función de los circuitos neuronales se conoce como plasticidad dependiente de la experiencia. Los circuitos neuronales son particularmente susceptibles a modificaciones inducidas por la experiencia durante algunos períodos de vida, llamados períodos críticos de plasticidad (PC) (Berardi *et al.*, 2000; Hensch, 2004). Estos períodos han sido identificados en todas las especies estudiadas y en diferentes sistemas sensoriales, en sistemas motores y en circuitos que procesan funciones multimodales (Hensch, 2004).

La distribución temporal de estos períodos críticos varía de acuerdo al sistema y depende, al menos en parte, de características específicas del estímulo. En humanos, estas ventanas temporales de sensibilidad a la experiencia se distribuyen en tres fases (Figura 1). Para el caso de las regiones cerebrales dedicadas a la visión y otros sentidos, el PC abre tempranamente en la infancia y cierra casi totalmente hacia la niñez. Para las regiones del lenguaje y de las funciones cognitivas de orden superior, este período abre un poco más tardíamente y disminuye en gran medida hacia la adolescencia y la adultez, pero nunca se cierra completamente, permitiendo así un cierto grado de aprendizaje continuo a lo largo de toda la vida. El hecho de que estas fases ocurran en modo secuencial permite la adquisición de habilidades cada vez más complejas (Bardin, 2012).

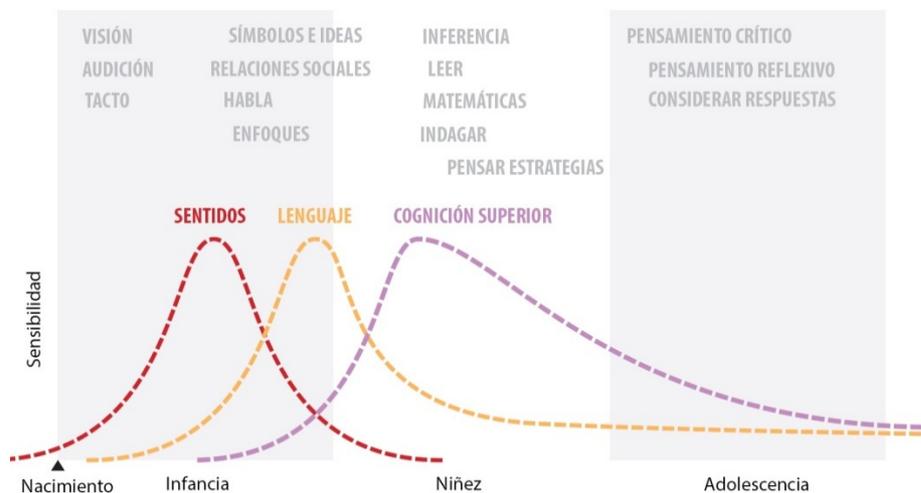


Figura 1. Las tres fases de sensibilidad a la experiencia en el cerebro humano. Los períodos críticos para regiones corticales dedicadas a la visión y otros sentidos (en rojo) abren durante la infancia y cierran casi totalmente hacia la niñez. Las regiones dedicadas al lenguaje (en amarillo) y a la cognición superior (en violeta) abren más tardíamente y nunca cierran totalmente. El orden secuencial de estas fases permite la adquisición de habilidades complejas (texto en gris) (Modificado de Bardin 2012).

Los procesos de plasticidad dependiente de la experiencia se han investigado clásicamente en los sistemas sensoriales, debido, en parte, a la facilidad de modular experimentalmente las entradas sensoriales y estudiar los efectos consecuentes. El sistema visual es uno de los modelos experimentales paradigmáticos en este tipo de estudios. En los años sesenta, experimentos pioneros liderados por David Hubel y Torsten Wiesel (Premio Nobel en Medicina en 1981) caracterizaron los efectos de la experiencia sobre la organización anatómico-funcional de la corteza visual primaria. Estos investigadores utilizaron el protocolo experimental de privación monocular que consiste en bloquear temporalmente la visión en un solo ojo y así crear un desequilibrio funcional entre los dos ojos. Este procedimiento, cuando es realizado en animales jóvenes, lleva a una reorganización tanto estructural como funcional en la corteza visual y a una fuerte reducción de la visión en el ojo bloqueado. Cuando la privación monocular es realizada en animales adultos, no se observa dicha reorganización. Estos experimentos fueron los primeros en demostrar el rol fundamental de la experiencia en el correcto desarrollo de la corteza visual, y en evidenciar la existencia de un período crítico de alta plasticidad en esta área, y la reducción de ésta en fases adultas (Hubel & Wiesel, 1963, 1970, 1998; Wiesel, 1982).

El desequilibrio funcional entre los dos ojos generado en animales experimentales por la privación monocular, produce efectos que son muy similares a los que se observan en niños ambliopes (Kiorpes *et al.*, 1998). La ambliopía es una condición patológica que afecta el 2-5% de la población mundial caracterizada por una reducción de la agudeza visual y de la sensibilidad al contraste (Holmes & Clarke, 2006). Ésta es causada principalmente por una experiencia visual anormal durante el desarrollo, como ser el estrabismo, la anisometropía, y la catarata congénita (condiciones caracterizadas por un desequilibrio funcional entre los dos ojos). La ambliopía es comúnmente tratada

poniendo un parche en el ojo “sano”, y reequilibrando así las entradas visuales. Este tratamiento es efectivo exclusivamente cuando se realiza en fases tempranas (antes de los 8-9 años de edad, en niños) cuando el sistema es todavía sensible a modificaciones, pero no tiene efecto si se realiza más tarde cuando las capacidades plásticas son reducidas (Baroncelli *et al.*, 2011).

En los últimos años, varios grupos se han focalizado en identificar estrategias experimentales que potencien la plasticidad en adultos bajo la hipótesis que esto pueda facilitar la recuperación de funciones afectadas durante el desarrollo o por patologías. Particularmente relevantes han sido los estudios en el sistema visual de animales experimentales con el objetivo de tratar la ambliopía en adultos. Se han identificado varias estrategias que restauran en el adulto altos niveles de plasticidad similares a los característicos del PC y que promueven la recuperación de la visión en animales ambliopes. Algunas de estas estrategias son no invasivas y potencialmente aplicables en tratamientos clínicos. Una de ellas es la administración de fluoxetina, un antidepresivo comercial utilizado en humanos (Prozac), que es un inhibidor selectivo de la recaptación de serotonina (Wong *et al.*, 2005; Castrén & Hen, 2013; Rossi, 2016). Otra estrategia experimental consiste en mantener a los animales en un entorno complejo de estimulación sensorio-motor y social, conocido como ambiente enriquecido (van Praag *et al.*, 2000). Se ha demostrado que ambas estrategias no solo restauran altos niveles de plasticidad en la corteza visual de animales adultos, sino que también permiten la recuperación de la agudeza visual en animales ambliopes (Sale *et al.*, 2007; Maya-Vetencourt *et al.*, 2008).

Caracterizar los mecanismos celulares y moleculares que determinan los niveles de plasticidad a lo largo de la vida y los que permiten restaurar altos niveles de plasticidad en adultos, es de gran relevancia no solo para tratar defectos de la visión, sino también para tratar otras patologías del neurodesarrollo (Sale *et al.*, 2010). En los últimos años, utilizando la corteza visual como modelo paradigmático, se han identificado numerosas moléculas y vías de señalización implicadas en estos procesos (Figura 2). La plasticidad está determinada por complejas interacciones entre varios mecanismos en los cuales participan diferentes tipos celulares (neuronas excitatorias e inhibitorias y células gliales) y varias clases de moléculas. Algunas de ellas son: componentes de la matriz extracelular (proteoglicanos condroitín sulfato, redes perineuronales, factores asociados a la mielina), factores nucleares (CREB, Arc), moduladores de la transcripción (histona deacetilasas), proteínas de unión al calcio (CamKII, calcineurina, troponina C), proteínas quinasa (PKA, CamKII, ERK), factores de crecimiento (BDNF, IGF-1), neuromoduladores (acetilcolina, serotonina, noradrenalina) y otros (PirB, TNF α , receptores cannabinoides) (Tropea *et al.*, 2009).

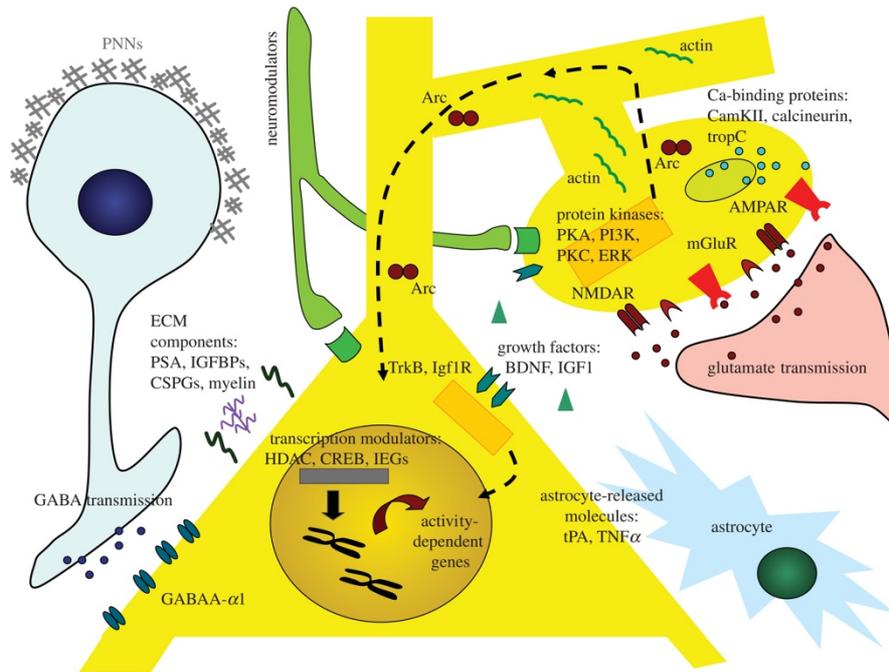


Figura 2. Esquema de los principales mecanismos celulares y moleculares que median la plasticidad en la corteza visual. Una neurona piramidal (en amarillo) recibe entradas de una neurona GABAérgica (en azul, a la izquierda) y de una terminal pre-sináptica glutamatérgica (en rosado, a la derecha). La composición y densidad de los receptores para GABA y glutamato modulan la plasticidad cortical, así como también las moléculas involucradas en la inserción y remoción de los receptores a la membrana plasmática (Arc). Moléculas que detectan y unen calcio post-sináptico, como la Troponina C cardíaca, calcineurina y CamKII, también son importantes para la plasticidad. Otros efectores incluyen moléculas MHC (complejo mayor de histocompatibilidad), factores de crecimiento, como BDNF e IGF-1 y neuromoduladores (serotonina, acetilcolina y noradrenalina). Cambios en la entrada de calcio son seguidos por cascadas de señalización que incluyen varias proteínas quinasa (como ser ERK, PKA y CamKII) y terminan en la activación de la transcripción mediada por CREB. Esta transcripción es controlada a su vez por enzimas de remodelación de la cromatina. Las modificaciones funcionales de las sinapsis están acopladas con re-arreglos estructurales de las dendritas y las espinas, que probablemente son mediados por la remodelación de la actina. A nivel extracelular, receptores asociados a la mielina (NogoR) y componentes de la matriz extracelular (proteoglicanos condroitín sulfato, ácido polisialílico, proteínas de unión a factores de crecimiento insulínicos y el activador tisular de plasminógeno) regulan la capacidad de la plasticidad estructural y/o el acceso a efectores moleculares al soma celular. Otros componentes de la matriz extracelular también forman redes alrededor de las neuronas inhibitorias parvalbuminérgicas, que restringen la plasticidad. Aferentes serotoninérgicas, colinérgicas y noradrenérgicas también modulan la plasticidad visual. Finalmente, las células gliales (astrocitos) contribuyen a la plasticidad cortical por medio de la modulación de la transmisión glutamatérgica y la producción de moléculas relacionadas a la plasticidad. Abreviaciones, PNNs: peri-neuronal nets (redes perineuronales); PSA: polysialic acid (ácido polisialílico); ECM: extracellular matrix (matriz extracelular); IGF1R: insulin-like growth factor-1 receptor (receptor de factor de crecimiento insulínico de tipo I); TrkB: tyrosine receptor kinase B (receptor tirosina quinasa B); HDAC: histone deacetylases (deacetilasas de histonas); IEGs: immediate early genes (genes de expresión rápida); CREB: cAMP-responsive element-binding protein (proteína de unión al elemento de respuesta al AMPc); tPA: tissue-type plasminogen activator (activador tisular de plasminógeno); TNF α : tumour necrosis factor alpha (factor de necrosis tumoral alfa); PKA: protein kinase A (proteína quinasa A); PKC: protein kinase C (proteína quinasa C); PI3K: phosphatidylinositol 3-kinase (fosfoinositol 3-quinasa); ERK: extracellular signal-regulated kinase (quinasa regulada por señales extracelulares); tropC: cardiac troponin C (troponina C cardíaca); CamKII: calcium/calmodulin-dependent protein kinase II (proteína quinasa dependiente de calcio/calmodulina II); BDNF: brain-derived neurotrophic factor (factor neurotrófico derivado del cerebro); Igf1R: insulin-like growth factor 1 receptor (receptor del factor de crecimiento insulínico de tipo I); TrkB: tyrosine receptor kinase B (receptor tirosina quinasa B). (Imagen de Tropea et al., 2009).

Se ha propuesto la hipótesis que los mecanismos que controlan la plasticidad ocurren en una secuencia temporal determinada y son regulados por numerosos factores, que se pueden separar en dos grandes grupos: los factores estructurales y los funcionales (Figura 3). Por factores estructurales se entienden varios mecanismos que se relacionan con la maduración de la mielina y la condensación de la matriz extracelular que limitan el crecimiento de las neuritas, la reorganización y reestructuración de las conexiones sinápticas (Stephany *et al.*, 2014). Los factores funcionales actúan directamente controlando los varios elementos que determinan el tono excitatorio e inhibitorio en los circuitos locales (balance E/I) (Hensch & Fagiolini, 2005). Durante el desarrollo del sistema nervioso la maduración de los circuitos excitatorios precede a la maduración de los circuitos inhibitorios. Las sinapsis inhibitorias comienzan a desarrollarse más tardíamente, de modo que se alcanza un primer umbral en el balance E/I que determina la apertura del período crítico. Luego, los circuitos inhibitorios continúan desarrollándose, y se alcanza un segundo umbral en el balance E/I que determina el cierre del período crítico. Este equilibrio E/I se mantiene durante la adultez, así como también los bajos niveles de plasticidad una vez finalizado el PC (Bavelier *et al.*, 2010; Takesian & Hensch, 2013).

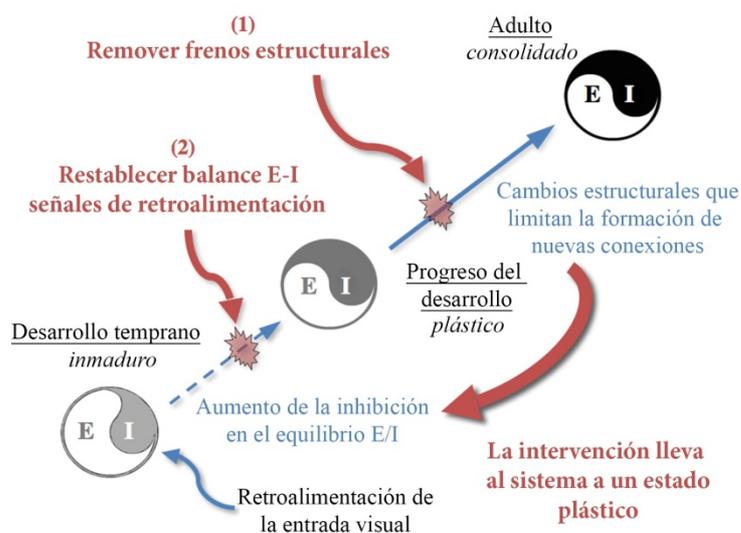


Figura 3. Evolución de la plasticidad a lo largo de la vida representada por los cambios en el balance entre excitación e inhibición (E/I). Las flechas rectas y finas indican los cambios que participan en el desarrollo del período crítico. Las flechas curvas y gruesas en (1) y (2) sugieren los posibles mecanismos para potenciar la plasticidad y la recuperación de funciones (Modificado de Bavelier *et al.* 2010).

De modo interesante, se ha propuesto que estos factores pueden ser considerados como “frenos” que limitan la plasticidad en el adulto, por lo tanto actuando sobre ellos se podrían modificar los niveles de plasticidad. Se ha demostrado que las estrategias mencionadas anteriormente que restauran la plasticidad en la corteza visual del adulto actúan removiendo frenos estructurales y funcionales (Figura 3). Por ejemplo, el tratamiento con fluoxetina y la exposición a ambientes

enriquecidos afectan la condensación de la matriz extracelular en las redes perineuronales (EE: Ciucci *et al.*, 2007; FLX: Chen *et al.*, 2011). A su vez, ambas estrategias disminuyen los niveles extracelulares basales de GABA, reduciendo el tono inhibitorio y modificando así el balance E/I (EE: Sale *et al.*, 2007; FLX: Maya-Vetencourt *et al.*, 2008).

Relevancia del balance E/I en los procesos de plasticidad cortical

Los experimentos iniciales que han demostrado la relevancia del balance E/I en el control de la plasticidad de la corteza visual se han basado principalmente en la utilización de animales mutantes (Figura 4). Por ejemplo, la alteración específica de la transmisión glutamatérgica en los ratones knock-out (KO) de la subunidad NR2A del receptor NMDA, ha permitido identificar el rol del tono excitatorio en este proceso (Fagiolini *et al.*, 2003). Por otro lado, animales que presentan alteraciones específicas de la transmisión GABAérgica, como los KO de una de las enzimas de síntesis de GABA (GAD65) (Hensch *et al.*, 1998; Fagiolini & Hensch, 2000), y los transgénicos que sobre-expresan BDNF (Huang *et al.*, 1999), han permitido caracterizar el rol fundamental de la inhibición en la determinación del comienzo, duración y cierre del período crítico de plasticidad (Hensch & Fagiolini, 2005).

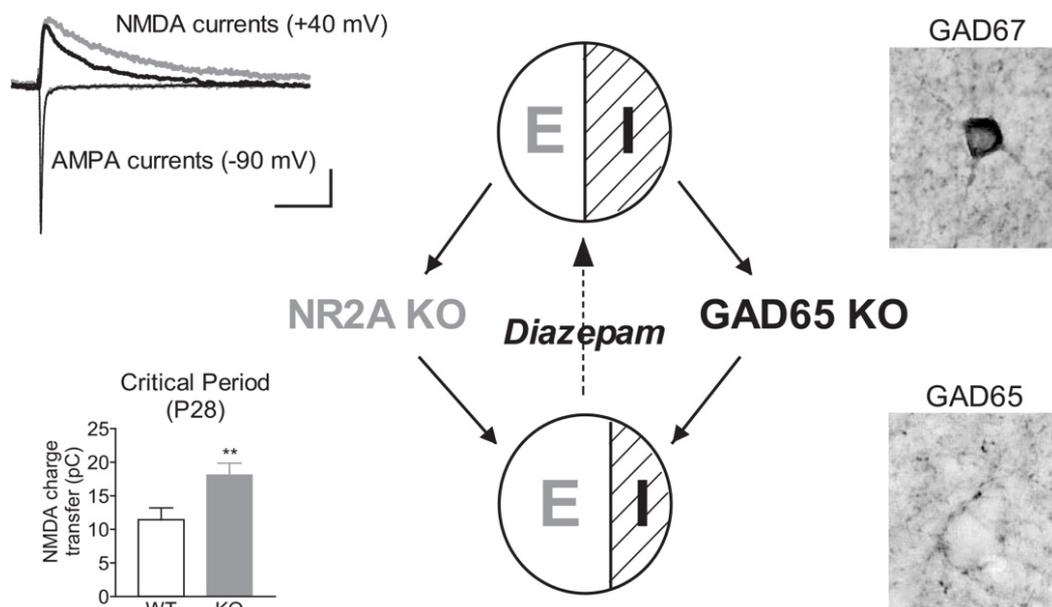


Figura 4. Análisis del rol del balance E/I en la plasticidad de la corteza visual. La excitación mediada por glutamato a través de receptores NMDA es prolongada (trazos grises, imagen arriba a la izquierda) en ratones mutantes que carecen de la subunidad NR2A, respecto a los wild type (trazos negros, imagen arriba a la izquierda). La cantidad total de carga transferida a través de los receptores NMDA es aumentada en los animales mutantes (imagen abajo a la izquierda) al pico del período crítico de plasticidad (P28). Del lado inhibitorio, el neurotransmisor GABA es sintetizado por dos isoformas de la enzima GAD (glutamic acid decarboxylase), GAD65 y GAD67. Una alteración de la isoforma GAD65, que se encuentra en las terminales sinápticas, reduce la liberación de GABA de las interneuronas inhibitorias. Ambas manipulaciones (de la subunidad NR2A del receptor NMDA y de la GAD65) alteran el balance E/I a favor de la excitación, y son revertidos por la administración de diazepam (agonista del receptor GABA_A). (Imagen de Hensch & Fagiolini, 2005).

Los mecanismos celulares y moleculares a través de los cuales el balance entre excitación e inhibición en los circuitos corticales controla los procesos de plasticidad dependiente de la experiencia, todavía no han sido completamente caracterizados. La experiencia sensorial que llega a la corteza es integrada a este nivel por la interacción entre circuitos locales complejos. Cada neurona que forma parte de estos circuitos, recibe entradas excitatorias e inhibitorias que modulan sus capacidades integrativas, y a su vez las de todo el circuito. La integración de la información sensorial en la corteza visual es fundamental para detectar el proceso competitivo entre las entradas de los dos ojos, y así desencadenar los mecanismos de plasticidad que van a inducir modificaciones en los circuitos tanto a nivel funcional como estructural (Liu, 2004; Hensch & Fagiolini, 2005).

No obstante la extrema dificultad en identificar cómo interaccionan las entradas excitatorias e inhibitorias en los circuitos, varios estudios han logrado caracterizar en parte el rol de la inhibición en estos procesos. Se ha propuesto que la transmisión inhibitoria podría actuar como filtro temporal y espacial sobre cada neurona individual, permitiendo así detectar diferencias en la actividad que provienen de los dos ojos, controlando así la plasticidad (Feldman, 2000; Heimel *et al.*, 2011; Chen & Nedivi, 2013).

Un tipo celular que posee todas las características necesarias para cumplir este rol, son las células parvalbuminérgicas, un subtipo específico de interneuronas GABAérgicas. Las principales conexiones de estas células ocurren a nivel del segmento inicial del axón y del soma, lo que hace que estén idealmente situadas para controlar la decisión de la neurona de descargar el potencial de acción y a su vez la retropropagación, que es necesaria para los procesos de plasticidad en el árbol dendrítico (Galarreta & Hestrin, 2002). Estas células forman redes de neuronas de rápida descarga, lo que genera un sistema que es sensible a diferencias temporales en las señales y por lo tanto permite detectar y transmitir señales que están sincronizadas. Todas estas características indican que las células parvalbuminérgicas corticales pueden ser la base celular y funcional responsable de detectar la competencia entre los dos ojos y desencadenar ciertos mecanismos de plasticidad (Heimel *et al.*, 2011). Una de las principales evidencias del rol de las células parvalbuminérgicas en el control del período crítico de plasticidad proviene de estudios relacionados a la homeoproteína OTX2. Las homeoproteínas son factores de transcripción bien caracterizados que tienen un rol importante durante el desarrollo embrionario. Además del clásico rol transcripcional, muchas homeoproteínas (entre ellas OTX2) actúan como factores de señalización extracelular. En el sistema visual, se ha demostrado que OTX2 es transportada trans-sinápticamente desde la retina hacia la corteza visual de modo dependiente de la experiencia sensorial. En la corteza, es capturada predominantemente por las células parvalbuminérgicas, promoviendo su maduración y la condensación de la matriz extracelular alrededor de éstas, lo que limita progresivamente la plasticidad. En ausencia de OTX2 en

la retina, el período crítico de plasticidad no comienza, pero puede ser recuperado por la administración exógena de la proteína OTX2 directamente en la corteza visual (Sugiyama *et al.*, 2008; Bernard & Prochiantz, 2016).

El rol del balance entre el tono excitatorio e inhibitorio en el control de los procesos de plasticidad se ha estudiado no solo en la corteza visual, sino que también en otras áreas de la corteza cerebral y en otras regiones del SNC (corteza somatosensorial: Zhang *et al.*, 2011; médula espinal y corteza motora: Scali *et al.*, 2013; corteza auditiva: Hackett *et al.*, 2015). En los últimos años se ha identificado que una regulación anormal del balance E/I está asociada a numerosas patologías del sistema nervioso (Eichler & Meier, 2008), como ser epilepsia (Olsen & Avoli, 1997; Cobos *et al.*, 2005), esquizofrenia (Lewis *et al.*, 2003; Kehrer, 2008), autismo (Laumonnier *et al.*, 2004; Gogolla *et al.*, 2009), síndrome de Rett (Patrizi *et al.*, 2015), envejecimiento, síndrome de Down y enfermedad de Alzheimer (Rissman & Mobley, 2011). Se ha demostrado que muchas de estas neuropatologías tienen su base en una sobre-inhibición, relacionada a déficits permanentes en la plasticidad sináptica y en el desarrollo neural. Como se muestra en la Figura 5, estrategias farmacológicas o comportamentales que reducen la inhibición GABAérgica pueden incrementar la plasticidad en el cerebro adulto, y por lo tanto pueden potencialmente aplicarse como terapias en el tratamiento de discapacidades intelectuales del desarrollo.

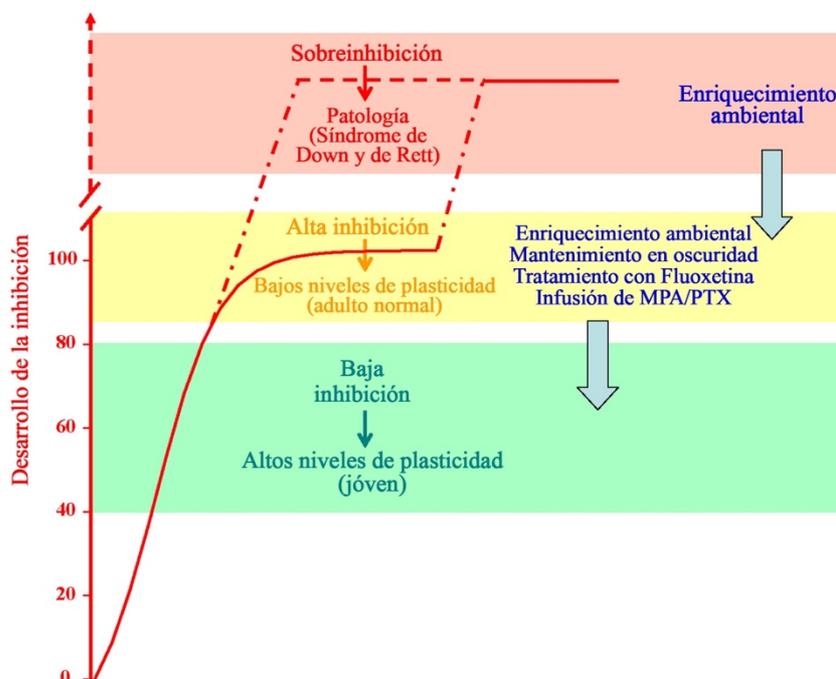


Figura 5. El aumento de la inhibición GABAérgica durante el desarrollo se relaciona con una reducción progresiva de la plasticidad dependiente de la experiencia. La plasticidad es alta en el joven durante el desarrollo temprano (bloque verde) y muy baja en el cerebro adulto (bloque amarillo). Aumentos anómalos en los circuitos inhibitorios pueden llevar a una sobre-inhibición, que se relaciona con discapacidades intelectuales del desarrollo (bloque rojo), caracterizadas por déficits de la plasticidad sináptica y del desarrollo neural. Una reducción de la inhibición GABAérgica, ya sea farmacológicamente o con tratamientos comportamentales (texto

en azul), puede aumentar la plasticidad en el adulto en condiciones fisiológicas y patológicas facilitando la recuperación. MPA: mercaptopropionic acid (ácido mercaptopropiónico, inhibidor de la síntesis de GABA); PTX: picrotoxina (antagonista del receptor GABA_A) (Modificado de Sale et al., 2010).

En conclusión, resulta particularmente relevante caracterizar en mayor detalle los mecanismos celulares y moleculares que subyacen a la determinación del balance E/I y así identificar estrategias para modularlo, a modo de potenciar la plasticidad en el adulto y facilitar la recuperación de funciones, ya sea en condiciones fisiológicas o patológicas.

1. JUSTIFICACIÓN

Como fue mencionado anteriormente, el balance entre el tono excitatorio e inhibitorio es considerado un factor fundamental en la determinación de los procesos de plasticidad en la corteza visual. En el presente proyecto se propone estudiar la modulación de marcadores específicos de sinapsis excitatorias y de sinapsis inhibitorias en distintos modelos de plasticidad. Para esto se utilizaron anticuerpos que reconocen específicamente el transportador vesicular de glutamato de tipo 1 (α -vGluT-1) y el transportador vesicular del GABA (α -vGAT). Ha sido ampliamente demostrado que en la corteza cerebral estos transportadores se encuentran exclusivamente a nivel de las terminales sinápticas de las neuronas glutamatérgicas y GABAérgicas, por lo que son considerados marcadores selectivos de dichas sinapsis (Nakamura et al., 2005; Edwards, 2007).

En este estudio se propone utilizar como modelo experimental el ratón (*Mus musculus*) porque es un modelo bien caracterizado a nivel molecular y funcional en cuanto a los procesos de plasticidad, y por la posibilidad de utilizar en el futuro animales experimentales genéticamente modificados.

2. HIPÓTESIS

La principal hipótesis del trabajo es que la relación entre los transportadores vGluT-1 y vGAT es un buen indicador del balance E/I y por lo tanto se correlaciona con los niveles de plasticidad cortical. Se espera encontrar una relación vGluT-1/vGAT distinta entre los modelos experimentales caracterizados por presentar altos niveles de plasticidad (período crítico, fluoxetina, ambiente enriquecido) y los modelos con plasticidad reducida (adultos y controles).

3. OBJETIVO GENERAL

Evaluar la relación entre sinapsis excitatorias e inhibitorias en diferentes modelos experimentales con altos y reducidos niveles de plasticidad cortical.

4. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Realizar la puesta a punto para los experimentos de *Western blot* utilizando los anticuerpos α -vGluT-1 y α -vGAT sobre muestra cerebrales.
2. Obtener información semi-cuantitativa por medio de ensayos de *Western blot* de los niveles de marcadores de sinapsis excitatorias (vGluT-1) e inhibitorias (vGAT) en la corteza visual de ratón comparando diferentes modelos experimentales de la siguiente manera:
 - animales jóvenes de 28 días post nacimiento (P28) que se encuentran en el período crítico (PC) por lo que presentan altos niveles de plasticidad vs. animales adultos (P98) sin ningún tratamiento que presentan bajos niveles de plasticidad
 - animales adultos (P98) tratados con fluoxetina que presentan altos niveles de plasticidad restaurados farmacológicamente vs. animales adultos (P98) sin ningún tratamiento que presentan bajos niveles de plasticidad
 - animales adultos (P98) mantenidos en ambiente enriquecido en estímulos sensorio-motores y sociales, que presentan altos niveles de plasticidad restaurados comportamentalmente vs. animales adultos (P98) mantenidos en condiciones estándar.
3. Evaluar si la relación de los niveles de vGluT-1/vGAT en los diferentes modelos experimentales refleja la modulación del balance E/I indicando los niveles de plasticidad cortical.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. MANTENIMIENTO Y TRATAMIENTO DE ANIMALES EXPERIMENTALES

Se utilizaron 30 ratones (*Mus musculus*) de la cepa C57BL/6J de ambos sexos. Los animales fueron mantenidos en condiciones estándar de temperatura ($20^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$), humedad (aproximadamente 40-60%) y ciclo de luz/oscuridad 14/10 horas respectivamente en el bioterio de la Unidad de Animales Transgénicos y de Experimentación (UATE) del Institut Pasteur de Montevideo. Los experimentos en animales fueron realizados en concordancia con los estándares del comité de ética de la Comisión Honoraria de Experimentación Animal (CHEA, Facultad de Ciencias, UdelaR), del Comité de Ética en el Uso de Animales (CEUA, Institut Pasteur de Montevideo), y avalados por la Comisión Nacional de Experimentación Animal (CNEA).

En la Tabla 1 se describen los varios grupos experimentales utilizados en este trabajo. Los ratones de 28 días de vida postnatal (P28) fueron utilizados como modelo de período crítico (PC) y los ratones de P98 sin ningún tratamiento como los adultos control (AD).

Tabla 1. Modelos y grupos experimentales. *PC: período crítico; AD: adulto sin tratamiento; FLX: adultos tratados con fluoxetina; EE: adultos mantenidos en ambiente enriquecido; SC: adultos mantenidos en condiciones estándar.*

Modelos experimentales	Grupos experimentales
Plasticidad durante el desarrollo	PC: animales de P28 en el pico del período crítico. AD: animales adultos de P98.
Farmacológicamente	FLX: animales adultos tratados con fluoxetina durante cuatro semanas de P70 a P98. AD: animales adultos de P98 que no recibieron tratamiento.
Plasticidad restaurada en adulto	EE: animales adultos mantenidos en ambiente enriquecido durante cuatro semanas de P70 a P98. SC: animales adultos mantenidos en condiciones estándar durante cuatro semanas de P70 a P98.
Comportamentalmente	

Para los modelos de plasticidad restaurada en adultos se utilizaron dos estrategias experimentales. Para la restauración farmacológica, a los ratones de P70 se les administró durante cuatro semanas por medio del agua del bebedero, una dosis diaria de 10-15 mg de Fluoxetina hidrocloreuro por kilogramo de peso del ratón. La dosis y la duración del tratamiento fueron seleccionadas en función de lo indicado por estudios previos de nuestro y otros laboratorios, ya que dosis similares potencian la plasticidad en roedores adultos y son eficaces a nivel celular, molecular y funcional (ratas: Maya-Vetencourt *et al.*, 2008, 2011; ratones: Rantamäki *et al.*, 2007; Begenisic *et al.*, 2014; Ruiz-Perera *et al.*, 2015; Vierci *et al.*, 2016). La fluoxetina (Selectchemie AG, Suiza, donación de Laboratorio Gador S.A., Uruguay) se administró en una concentración de 0,1 mg/mL en el agua de los bebederos, en botellas protegidas de la luz, y fue cambiada cada 3-4 días por solución fresca. Para estimar la dosis de fluoxetina (mg de fluoxetina/Kg de masa corporal media/día) consumida efectivamente por cada ratón, se midió el volumen de líquido tomado durante el tratamiento y se dividió por el número de animales, el número de días de duración del tratamiento y la masa corporal media por ratón (Tabla 2). Los ratones adultos controles fueron mantenidos en las mismas condiciones, sin la adición de fluoxetina en el agua.

Tabla 2. Cálculo de la dosis de fluoxetina hidrocloreuro utilizada en los experimentos. Se muestra el número de animales (N°), los días de tratamiento, el peso medio de los ratones (g), el volumen de la solución consumido por ratón por día (ml/día/ratón) que se multiplicó por el coeficiente de dilución de fluoxetina hidrocloreuro (0.1mg/ml), obteniendo la cantidad de fluoxetina consumida por ratón (mg/día/ratón). En base al número de días de tratamiento y el peso medio de los ratones se estimó la dosis de fluoxetina consumida por ratón por día (mg/día/kg/ratón).

N°	Días	Peso medio (g)	Vol. consumido (ml/día/ratón)	mg FLX consumido (mg/día/ratón)	Dosis FLX consumida (mg/día/kg/ratón)
6	28	29,7	4,04	0,404	13,6

Para el modelo de plasticidad restaurada comportamentalmente, los ratones de P70 fueron mantenidos durante cuatro semanas en un ambiente enriquecido en estímulos sensorio-motores y sociales, en los cuales las jaulas son de mayor tamaño (33x42x14 cm) conteniendo variedades de elementos como ruedas, escaleras, juguetes, entre otros, que son reposicionados y/o sustituidos varias veces por semana. Para los animales control de este modelo, se utilizaron ratones adultos de P70 que fueron mantenidos durante cuatro semanas en jaulas estándar de menor tamaño (19x33x14 cm) y sin elementos. En las jaulas control se colocaron tres ratones, mientras que en las de ambiente enriquecido se colocaron seis ratones por jaula. El protocolo y su duración, fueron seleccionados en función de lo indicado por estudios previos indicando que potencian la plasticidad en animales adultos (ratas: Sale *et al.*, 2007; Mainardi *et al.*, 2010; ratones: Begenisic *et al.*, 2011; Vierci *et al.*, 2016).

Terminado el tratamiento los animales fueron sacrificados por dislocación cervical, los tejidos cerebrales de interés fueron disecados y almacenados a -80°C, para su posterior análisis por *Western blot*.

2. WESTERN BLOT

La técnica de *Western blot* o *Inmunoblotting* es una técnica analítica ampliamente utilizada que se basa en la especificidad de la unión antígeno-anticuerpo para detectar proteínas específicas en una muestra compleja de proteínas separadas por electroforesis y así obtener datos cualitativos y semi-cuantitativos.

2.1 PREPARACIÓN DE MUESTRAS

Inmediatamente luego de la dislocación cervical de los animales, se procedió a la disección del cerebro colocándolo en PBS 1X (buffer fosfato salino) previamente enfriado a 4°C. Bajo un microscopio estereoscópico se disecaron las regiones correspondientes a las cortezas visuales primarias de ambos hemisferios cerebrales y se congelaron inmediatamente con nitrógeno líquido. Las muestras fueron guardadas a -80°C para su posterior utilización.

2.2 EXTRACCIÓN Y CUANTIFICACIÓN PROTEICA

Las muestras fueron homogeneizadas mecánicamente en 100-150 µL de buffer de lisis (Tris 50 mM; EDTA 1 mM; NaF 100 mM; PMSF 0,1 mM; Na₃VO₄ 2 mM; 1% Triton X-100; 10% Glicerol) y luego incubadas 30 minutos en hielo. Los lisados se centrifugaron a 13.000 g por 1 hora a 4°C para eliminar restos celulares. El sobrenadante se recuperó y se tomó una pequeña alícuota para la estimación de la concentración proteica y al resto se le agregó Loading Buffer 4X (2% SDS; 375 mM Tris; 10% glicerol; 5% beta-mercaptoetanol; 0,2% Azul de Bromofenol) para la posterior separación de las proteínas por electroforesis. Ambas alícuotas se guardaron a -20°C hasta el momento de su utilización. La cuantificación de la concentración proteica se realizó utilizando el método de Bradford en placa de 96 pocillos midiendo a 595 nm mediante la extrapolación de una curva de calibración utilizando sero-albúmina bovina (Olson & Markwell, 2007).

2.3 ELECTROFORESIS Y ELECTROTRANSFERENCIA

Las proteínas de las muestras fueron separadas por medio de electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE), utilizando un gel de corrida (Running gel) de 12% (12% acrilamida/bis-acrilamida; 375 mM Tris; 0,10% SDS; 0,05% TEMED y 0,10% APS), y un gel de

concentración (Stacking gel) de 4% (4% acrilamida/bis-acrilamida; 125 mM Tris; 0,10% SDS; 0,05% TEMED y 0,075% APS). Una vez que el gel polimerizó, se procedió a ensamblar el equipo de electroforesis llenando la cubeta con buffer de corrida para SDS-PAGE (0,1% SDS; 0,192% Glicina; 25 mM Tris pH 8,8; H₂O mQ) y luego se realizó una pre-corrida del gel a 80 V durante 15 minutos. Se cargaron en cada pocillo los μ L de muestra correspondiente a la cantidad de proteína deseada y en uno de ellos se cargaron 4 μ L del marcador de peso molecular (PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder, Thermo Scientific). Para poder comparar señales obtenidas con el mismo anticuerpo en diferentes muestras, en los geles se cargó la misma cantidad proteica para cada muestra (60 μ g). Se realizó la corrida a 120 V hasta que el azul de bromofenol alcanzó el gel de corrida (15 minutos aproximadamente), y luego se subió el voltaje a 160 V hasta que el azul de bromofenol alcanzó al borde inferior del gel (55 minutos aproximadamente).

Para que las proteínas sean accesibles a la detección por anticuerpos se transfirieron a una membrana de fluoruro de polivinilideno (PVDF). Para esto, una vez finalizada la electroforesis, se desmontó el equipo, y los geles con las proteínas separadas por peso molecular se equilibraron en el buffer de transferencia (25 mM Tris; 192 mM Glicina; 20% Etanol) junto con la membrana de PVDF durante 15 minutos a 4°C. Previo a este paso, las membranas de PVDF se colocaron 15 segundos en etanol 95% y luego 15 segundos en H₂O mQ. Este paso previo es necesario para hidratar las membranas de PVDF. Luego de que los geles y las membranas se equilibraron en el buffer de transferencia, se procedió al armado del “sándwich” conformado por: una esponja delgada, papel de filtro, el gel con las proteínas separadas por peso molecular, la membrana de PVDF, otro papel de filtro y otra esponja delgada, del polo negativo (cátodo) al polo positivo (ánodo). Se cerró el “sándwich” cuidando que todos los elementos estuvieran bien sumergidos en el buffer de transferencia, evitando siempre la formación de burbujas. Luego se colocó el “sándwich” en la cubeta de transferencia llena de buffer de transferencia frío y se aplicó una corriente de 100V durante 2 horas con un sistema de refrigeración que consiste en bloques congeladores de hielo y agitación con un agitador magnético, lo que permite que se mantenga a 4°C evitando el aumento de temperatura generado por la corriente eléctrica.

A través de este procedimiento, las proteínas en el gel se desplazan hacia el polo positivo quedando fuertemente adheridas a la membrana de PVDF. Por lo tanto, la membrana resultante es una copia exacta del patrón de proteínas que se tenía en el gel de poliacrilamida. Una vez finalizada la electrotransferencia, se desarmó el “sándwich” y la membrana se tiñó en forma reversible con Rojo de Ponceau (0,2% Rojo Ponceau S; 3% ácido tricloroacético (TCA)) por 5 minutos para comprobar la eficacia de la transferencia (Figura 6). Antes de proceder a la incubación con los anticuerpos, las

membranas se lavaron con PBS durante aproximadamente 10 minutos para retirar la marca del Rojo Ponceau.

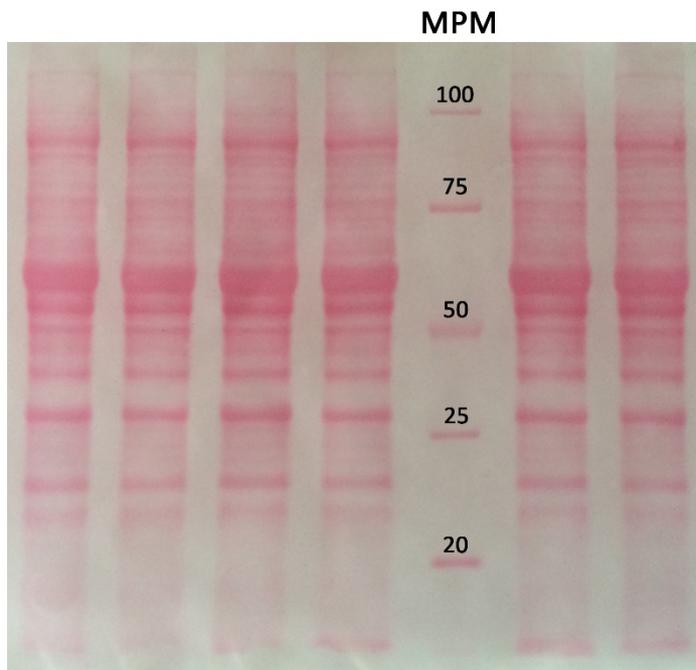


Figura 6. Ejemplo de membrana de PVDF teñida con Rojo de Ponceau para evidenciar la presencia de proteínas luego de la transferencia del gel. En todos los carriles se cargaron 60 μ g de la misma muestra de corteza cerebral; MPM: marcador de peso molecular, valores expresados en kDa.

2.4 BLOQUEO E INCUBACIÓN DE LA MEMBRANA CON ANTICUERPOS

Antes de proceder a la incubación con los anticuerpos primarios y secundarios se realiza el bloqueo de la membrana. Este paso es necesario para facilitar la interacción específica entre los anticuerpos y los epítopes de las proteínas de interés y evitar que éstos se unan de manera inespecífica a la membrana y al conjunto de proteínas. Para esto, se realizó un bloqueo de la membrana con leche al 5% en PBS-T (0,1% Tween-20 en PBS) durante una hora a temperatura ambiente con agitación. Luego de retirar la solución de bloqueo las membranas se incubaron *overnight* a 4°C con los anticuerpos primarios que son los que van a reconocer a las proteínas de interés (Tabla 3). Tras la incubación con los anticuerpos primarios, se realizaron tres lavados con PBS-T de 10 minutos cada uno en agitación para retirar los anticuerpos que no se unieron a la proteína de interés en la membrana. Seguidamente, las membranas se incubaron con el anticuerpo secundario correspondiente durante una hora a temperatura ambiente en agitación suave. Luego se realizaron dos lavados con PBS-T y uno con PBS para eliminar el exceso de anticuerpo.

Tabla 3. Anticuerpos primarios y secundarios utilizados en la puesta a punto y en el análisis de las muestras.

Anticuerpo primario	Marca y número	Concentración	µg	Bloqueo
Conejo α-vGluT-1	Synaptic Systems #135303	1:20000	60	Leche 5%
Ratón α-vGAT	Synaptic Systems #131011	1:500	60	Leche 5%/BSA 5%
Conejo α-vGAT	Synaptic Systems #131003	1:1000	60	Leche 5%
Ratón α-alfa-Tubulina	Sigma #T6074	1:1000	60	Leche 5%

Anticuerpo secundario	Conjugado	Marca y número	Concentración
Cabra α-Conejo IgG	HRP	Sigma #A0545	1:5000 – 1:7000
Caballo α-Ratón IgG	HRP	Cell Signaling #7076	1:2500 - 1:10000
Cabra α-Ratón IgG	HRP	Invitrogen #A16084	1:5000 - 1:10000
Cabra α-Ratón IgG	HRP	Sigma #A4416	1:5000
Burro α-Conejo IgG	IRDye 800CW	LI-COR #926-32213	1:10.000
Cabra α-Ratón IgG	Alexa Fluor 680	Invitrogen #A21058	1:1000 – 1:5000

2.5 DETECCIÓN DE LA SEÑAL

Para la detección de la señal de los anticuerpos conjugados a la peroxidasa de rábano (HRP, “horse-radish peroxidase”), se utilizó una solución de revelado (SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate, Thermo Scientific) en la cual se mezclan partes iguales de la solución estable de peróxido y de la solución de luminol. Las membranas se incubaron cinco minutos con dicha solución y luego se procedió a la obtención de imágenes utilizando el sistema de detección GBOX Chemi XT4 (Camara CCD 16bits 4.2MP Synoptic, GeneSys software versión 1.3.3.0, Database versión 1.69, Syngene). Para ello se colocaron las membranas en el GBOX y se procedió a configurar el equipo con los siguientes parámetros: *Autocapture; Sample format: Blot; Blot type: Chemi; Capture method: Series; Reagent: ChemiFast; Visible Marker; No binning; No filter*, exposición de 1 minuto, tomando fotos durante 5 minutos. Las imágenes obtenidas se guardaron en el formato JPEG 8 bit. Para la detección de la señal de los anticuerpos conjugados a fluoróforos, luego de los lavados, las membranas se colocaron directamente en el sistema de detección GBOX Chemi XT4 y se procedió a configurar el equipo utilizando el parámetro *Manual Capture; No binning*, modificando el tiempo de exposición, iluminación y filtro de acuerdo al fluoróforo en uso. Para el fluoróforo Alexa Fluor 680 se utilizó una

iluminación con led rojo y el filtro 705, y para el fluoróforo IRDye800 una iluminación con lámpara de infrarrojo IR740 MOD y el filtro LY800.

2.6 PROCESAMIENTO DE IMÁGENES Y OBTENCIÓN DE DATOS

Para estimar en modo semi-cuantitativo los experimentos de *Western blot*, las bandas correspondientes a la señal de interés son cuantificadas utilizando el programa ImageJ 1.50b (<http://imagej.nih.gov/ij>).

De la colección de imágenes obtenidas en cada experimento se seleccionó aquellas que presentaban señales claras y no saturadas. El parámetro *AutoCapture*, utilizado en el GBOX para la obtención de imágenes, es diseñado para capturar la máxima intensidad de señal sin permitir la saturación de esta, y por la tanto es ideal para la realización de análisis semi-cuantitativo. Además, el software de obtención de imágenes (Syngene) permite verificar el nivel de saturación de las imágenes obtenidas, lo cual fue corroborado en cada experimento.

Si las bandas en la imagen seleccionada no estaban de forma horizontal, con el programa ImageJ 1.50b se rotó la imagen utilizando la herramienta *Image/Transform/Rotate*. Luego con la herramienta *Rectangular Tool* se seleccionó una forma rectangular que incluya a todas las bandas de interés. Con *Analyse/Gels/Select First Lane* se seleccionó el área dentro de ese rectángulo y con *Analyse/Gels/Plot Lanes* se analizó la señal dentro del mismo. Como resultado se obtuvo una gráfica en donde se representa el nivel de grises (escala de 0 a 256) a lo largo del rectángulo seleccionado. Luego se trazó una recta que permite separar la señal de fondo de los picos correspondientes a las bandas de interés. Una vez seleccionados los picos con la herramienta *Wand tool*, con *Analyse/Gels/Label Peaks* se obtiene el valor numérico del área debajo de la curva de cada pico en unidades arbitrarias (Figura 7).

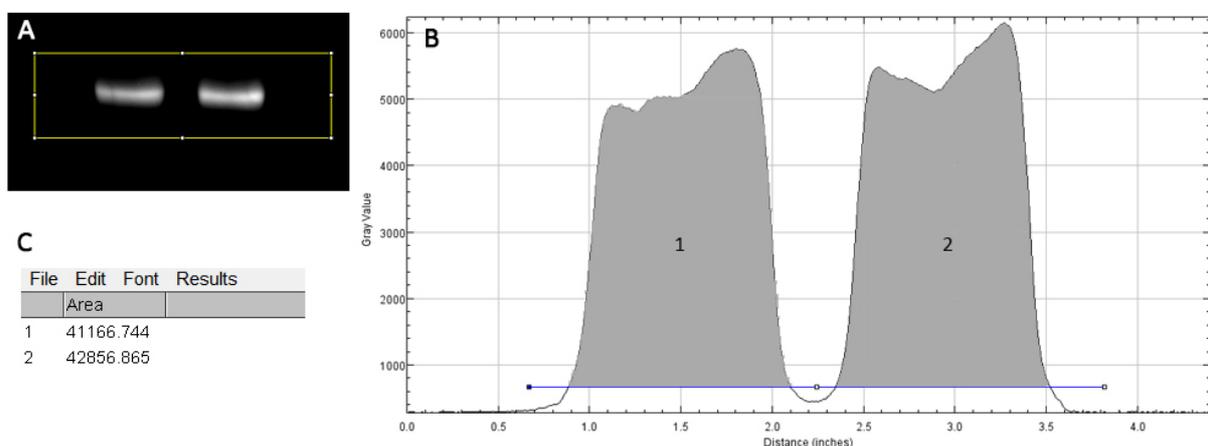


Figura 7. Ejemplo representativo del análisis de las imágenes. A: En la imagen se selecciona una forma rectangular con la herramienta Rectangular Tool que incluya todas las bandas de interés. **B:** Gráfica obtenida mediante Analyse/Gels/Plot Lanes. En el eje Y se representa el nivel de grises (escala de 0 a 256) y en el eje X los píxeles a lo largo del rectángulo seleccionado en A. Se trazó una recta que se muestra en azul para separar la señal de fondo de los picos correspondientes a las bandas de interés. Con la herramienta Wand tool se selecciona los picos (en gris) indicados con 1 y 2. **C:** Con Analyse/Gels/Label Peaks se obtiene el valor numérico del área bajo la curva de los picos 1 y 2 señalados en B, mostrado en unidades arbitrarias.

Para poder comparar señales de diferentes muestras experimentas obtenidas en diferentes experimentos de *Western blot*, los valores del área bajo la curva de cada pico en unidades arbitrarias fueron normalizados al valor promedio del fondo para cada membrana. Los valores correspondientes a la señal obtenida con los anticuerpos contra vGluT-1 y vGAT fueron normalizados a los valores correspondientes a la señal obtenida en la misma muestra con el anticuerpo contra alfa-tubulina.

2.7 STRIPPING DE LAS MEMBRANAS

Una vez obtenidas las imágenes correspondientes a las señales de vGluT-1 y vGAT, se procedió a realizar el stripping de las membranas. Para ello, las membranas se colocaron en NaOH 0,2 M durante 5 minutos, lo que provoca la disociación de los anticuerpos adheridos a las proteínas de la membrana. Posteriormente se volvieron a bloquear las membranas con leche al 5% y se incubaron overnight a 4°C con anticuerpo α -alfa-tubulina (ratón α -alfa-tubulina 1:1000, Sigma T6074). Luego se incubaron con el anticuerpo secundario α -ratón (cabra α -Ratón Alexa Fluor 680 1:5000, Invitrogen A21058) y se procedió a la obtención de las imágenes en el GBOX.

2.8 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para el análisis estadístico se utilizó el programa de uso libre Past 2.14 (Hammer *et al.*, 2001). Los valores obtenidos para cada modelo experimental se compararon de la siguiente manera: CP con AD, FLX con AD, y EE con SC, utilizando el Student's t-test con límite de significatividad $p < 0,05$ o el test one-way ANOVA con post-hoc Tukey's test comparando todas las muestras simultáneamente. Todos los datos en el texto y en las leyendas de las figuras están expresados como el promedio \pm desviación estándar.

RESULTADOS

1. PUESTA A PUNTO

Con el fin de encontrar la concentración óptima de anticuerpos primarios y de cantidad proteica se realizó un *Dot Blot* (Figura 8). Esta metodología consiste en colocar directamente sobre la membrana un determinado volumen de una misma muestra en distintas cantidades proteicas sin separarla por electroforesis e incubarla con anticuerpos en distintas concentraciones. Específicamente se colocaron 5 μ l de una muestra de corteza cerebral de ratón a concentración proteica diferente (5, 10, 20 y 30 μ g) por triplicado sobre una membrana de PVDF. Luego del bloqueo, se procedió a la incubación con los anticuerpos primarios (α -vGluT-1 y α -vGAT) a tres concentraciones diferentes (1:1000; 1:5000; 1:10.000) y con los anticuerpos secundarios correspondientes (α -Conejo-HRP y α -ratón-HRP 1:5000).

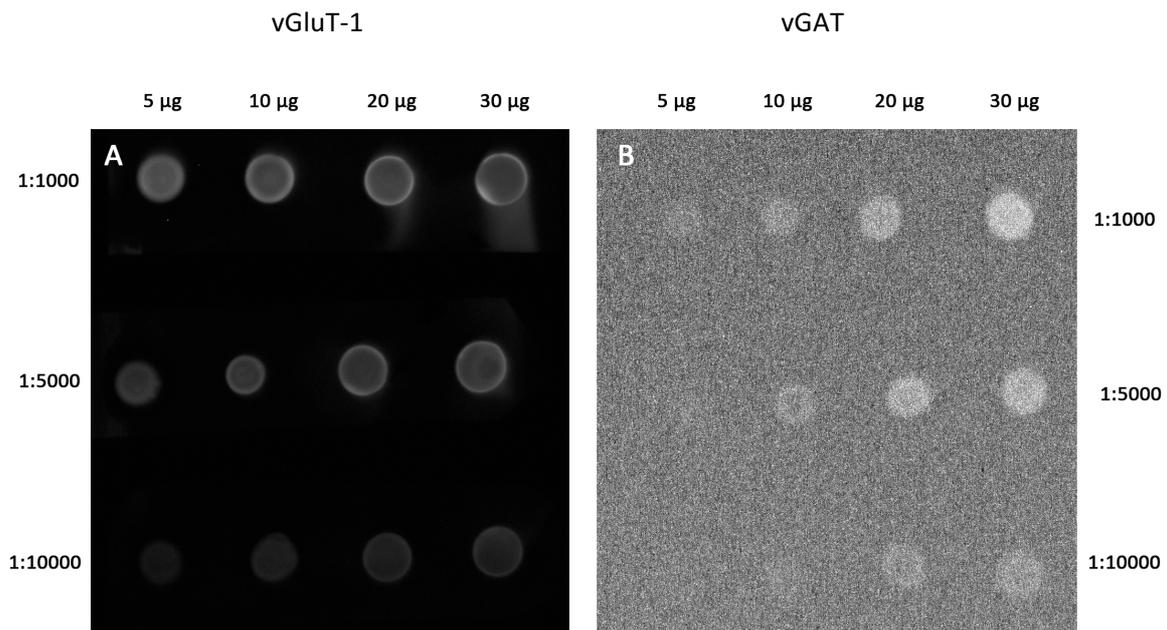


Figura 8. Dot Blot para determinar la dilución óptima de anticuerpos primarios y las cantidades proteicas. Cada punto corresponde a una combinación diferente de cantidad proteica y dilución de anticuerpo primario. En el eje X se utilizan cantidades crecientes de proteína (5, 10, 20, 30 μ g) y en el eje Y se colocan diferentes concentraciones de anticuerpo primario (1:1000, 1:5000 y 1:10.000). **A:** El anticuerpo primario utilizado es el α -vGluT-1 a las concentraciones indicadas y el anticuerpo secundario es el α -Conejo HRP a 1:5000 en todos los casos. **B:** El anticuerpo primario utilizado es el α -vGAT a las concentraciones indicadas y el anticuerpo secundario es el α -Ratón HRP a 1:5000 en todos los casos. La imagen de la Figura B es muy pixelada porque la señal correspondiente al anticuerpo α -vGAT es muy débil.

En el caso del anticuerpo α -vGluT-1 se pudo observar una señal en todas las condiciones utilizadas. Dado que se obtuvo una señal clara y no saturada con la dilución mayor del anticuerpo (1:10.000) y con 20 μ g de proteína, se decidió utilizar estos parámetros para los experimentos sucesivos de *Western blot*. En el caso del anticuerpo α -vGAT, las señales obtenidas fueron muy débiles en todas las condiciones. Por esto, se decidió utilizar la mayor cantidad de proteína 30 μ g y la dilución menor (1:1.000) del anticuerpo primario.

Teniendo esto en cuenta, se procedió a probar algunas diluciones de los anticuerpos primarios sobre una muestra de corteza separada por electroforesis (Figura 9). En el caso del anticuerpo α -vGluT-1 se observó una banda del peso molecular esperado (62 kDa) utilizándolo en las dos diluciones (1:10.000 y 1:5.000), confirmando la observación del experimento de *Dot Blot*. No obstante, se observó una señal difusa a lo largo del carril probablemente correspondiente a fondo inespecífico, que fue más fuerte cuando se utilizó el anticuerpo más concentrado.

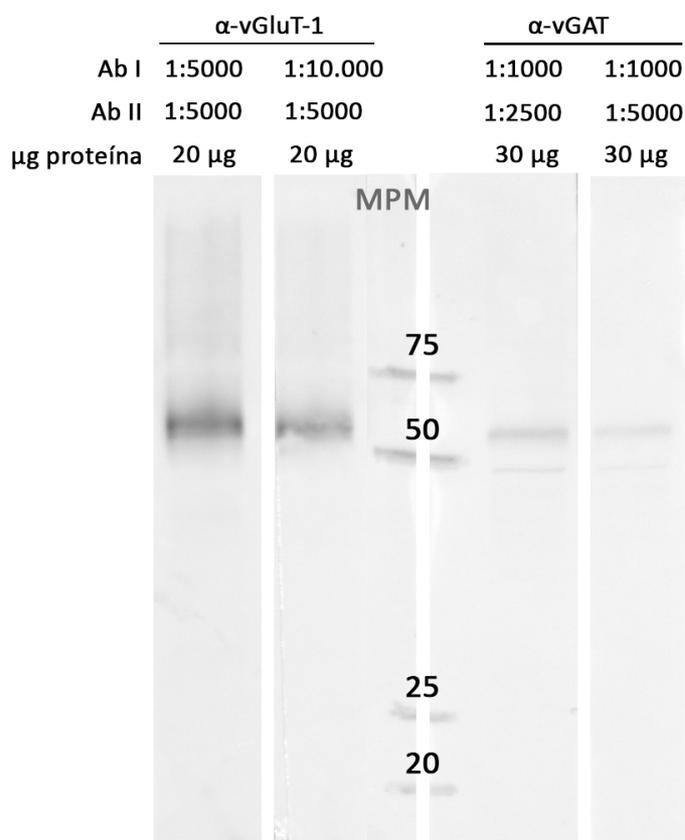


Figura 9. Western Blot para determinar la dilución óptima de anticuerpos primarios y secundarios. En los primeros dos pocillos se cargaron 20 μ g de muestra de corteza cerebral, mientras que en los últimos dos pocillos se cargaron 30 μ g de la misma muestra. Para el caso del anticuerpo primario α -vGluT-1 se utilizaron dos diluciones (1:5000 y 1:10.000) y el anticuerpo secundario α -Conejo HRP 1:5000. Se observa una banda de peso molecular esperado (62 kDa) y fondo inespecífico, aunque en menor medida con el anticuerpo primario más diluido. Para el caso del anticuerpo primario α -vGAT se utilizó diluido 1:1000 y el anticuerpo secundario α -Ratón HRP a dos diluciones (1:2500 y 1:5000). También se observa una banda de peso molecular esperado (57 kDa) que

es más fuerte con el anticuerpo secundario más concentrado, y una banda de menor peso molecular. **Ab I:** anticuerpo primario; **Ab II:** anticuerpo secundario; **MPM:** marcador de peso molecular expresado en kDa.

Por esta razón, para disminuir la señal de fondo se decidió probar concentraciones del anticuerpo primario y del secundario aún más diluidas (Figura 10). Efectivamente, utilizando el anticuerpo primario más diluido (1:20.000) y el secundario también (1:10.000) se pudo observar una banda bien definida y menos fondo.

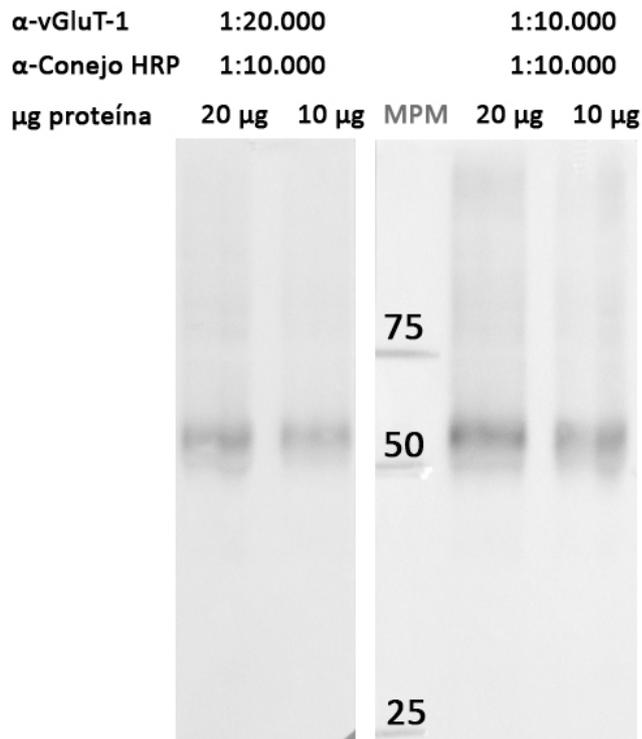


Figura 10. Western Blot para determinar la dilución óptima del anticuerpo primario α -vGluT-1. Se utilizó una muestra de corteza cerebral en dos cantidades proteicas diferentes (20 μ g y 10 μ g) y se probaron dos diluciones del anticuerpo primario α -vGluT-1 (1:20.000 y 1:10.000) y el anticuerpo secundario α -Conejo HRP diluido 1:10.000. En todos los casos se observa una banda de peso molecular esperado (62 kDa). Las condiciones que generan menos fondo y permiten diferenciar una única banda correspondiente a vGluT- 1 son y la dilución del α -vGluT-1 1:20.000 cargando 10 μ g de muestra. **MPM:** marcador de peso molecular expresado en kDa.

En el caso de anticuerpo α -vGAT, se decidió realizar una electroforesis cargando 30 μ g de proteínas provenientes de la corteza cerebral, e incubando la membrana con el anticuerpo primario 1:1.000 (como sugerido en los experimentos de *Dot Blot*) y probando dos concentraciones del anticuerpo secundario (1:2500 y 1:5000). En ambos casos, se observó una banda principal del peso molecular esperado para esta proteína (57 kDa), aunque se observaron otras bandas de peso molecular inferior (Figura 9).

Para mejorar la señal obtenida, se modificaron varios parámetros del protocolo experimental: se aumentó la cantidad de muestra cargada (30 y 60 μ g), se probó una solución de bloqueo alternativa

(leche vs. BSA), y se realizó un experimento sin anticuerpo primario solo con el secundario. Contrariamente a lo esperado, el bloqueo con BSA no mejoró la señal obtenida (Figura 11).

Al aumentar la cantidad de muestra cargada la señal correspondiente a la banda de 57 kDa fue más fuerte. Por otro lado, se observaron otras bandas de peso molecular inferior y superior. En el experimento sin el anticuerpo primario, se observaron estas mismas bandas pero no la banda de 57 kDa, sugiriendo que ésta realmente corresponde a la unión específica del anticuerpo α -vGAT (Figura 11). A su vez, las otras bandas podrían ser debidas a una interacción inespecífica del anticuerpo secundario con proteínas presentes en la membrana.

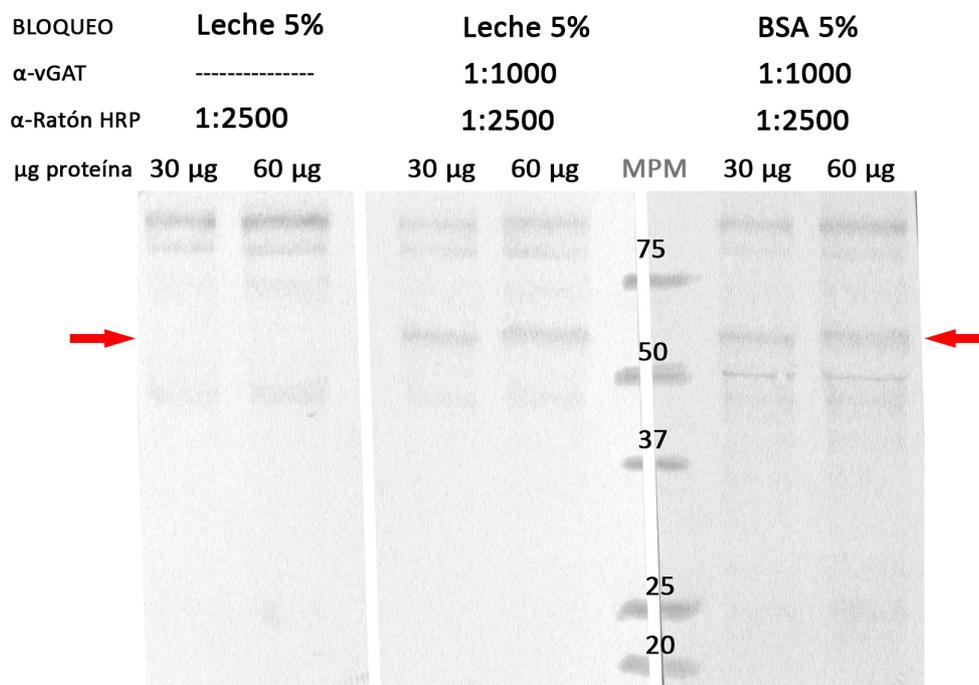


Figura 11. Western blot para determinar las condiciones óptimas del anticuerpo primario α -vGAT. Se utilizó una muestra de corteza cerebral a dos cantidades diferentes (30 μ g y 60 μ g) por triplicado. Se utilizó el anticuerpo primario α -vGAT diluido 1:1000 y el secundario α -Ratón HRP 1:2500 con dos soluciones de bloqueo: leche al 5% y BSA (seroalbúmina bovina) al 5%. En los primeros dos carriles no se colocó el anticuerpo primario pero sí el secundario α -Ratón HRP 1:2500 para comprobar la presencia de la banda específica de vGAT (marcada con las flechas). El bloqueo con BSA al 5% genera un mayor número de bandas inespecíficas comparado con el bloqueo con leche al 5%. **MPM:** marcador de peso molecular expresado en kDa.

Para disminuir la señal inespecífica, se decidió probar otros anticuerpos secundarios para encontrar uno que genere menos fondo. Además del anticuerpo α -Ratón HRP que ya se había utilizado (Cell Signaling), se probó otro anticuerpo conjugado a HRP de otra marca (Invitrogen) y un anticuerpo conjugado a un fluoróforo (Alexa Fluor 680). Se realizaron experimentos de *Western blot* cargando 30 μ g de una muestra de corteza cerebral e incubando únicamente con estos anticuerpos secundarios

(Figura 12). El anticuerpo HRP Invitrogen dio un mayor fondo respecto al anticuerpo Cell Signaling HRP que ya se estaba utilizando, por lo que lo descartamos como una posibilidad de mejorar la señal. Por otro lado, el anticuerpo secundario fluorescente (Alexa Fluor 680) dio un fondo similar o menor al Cell Signaling HRP. Para comprobar la funcionalidad de este anticuerpo secundario, se realizó un experimento de *Western blot* incubando la membrana con otro anticuerpo primario producido en ratón, el anticuerpo α -alfa-tubulina. Como se observa en la Figura 12, se puede apreciar una intensa señal del peso molecular esperado de 50 kDa correspondiente a la tubulina.

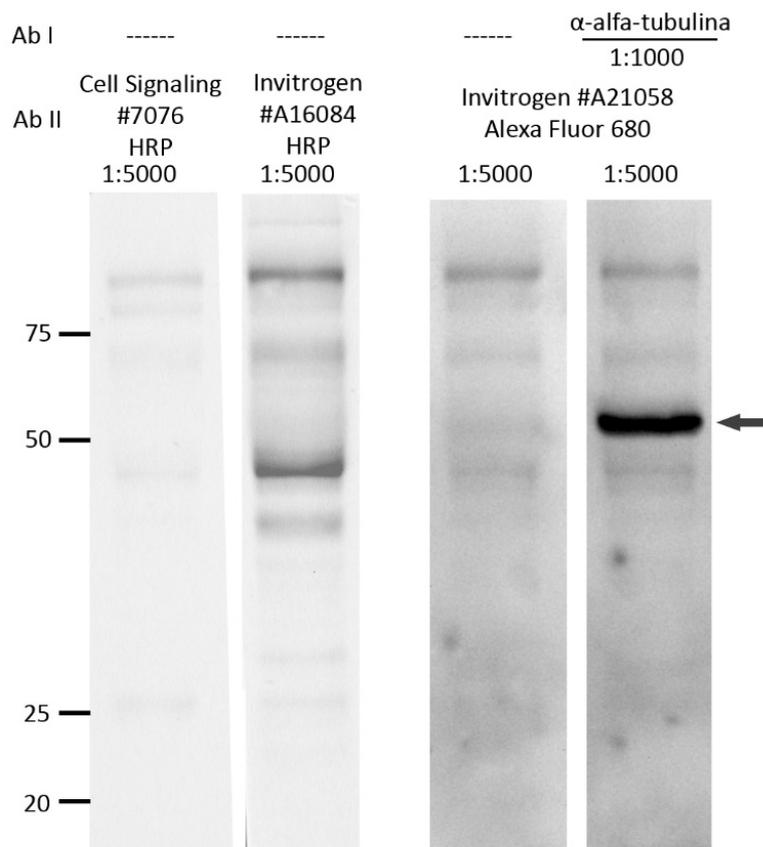


Figura 12. Western Blot de prueba de anticuerpos secundarios α -Ratón. En todos los pocillos se colocaron 30 μ g de una muestra de corteza cerebral. Se utilizaron tres anticuerpos secundarios α -Ratón a la misma dilución (1:5000), sin colocar anticuerpo primario previamente para evaluar la señal de fondo que estos generan. Dos de estos conjugados a HRP (Cell Signaling #7076 e Invitrogen #A16084) y uno de ellos conjugado al fluoróforo Alexa Fluor 680 (Invitrogen #A21058). El anticuerpo secundario Invitrogen conjugado a HRP fue el que dio mayor señal de fondo, mientras que el conjugado a Alexa Fluor 680 dio una señal similar o levemente mayor al Cell Signaling conjugado a HRP (que se había utilizado en los ensayos previos). En el último carril se colocó anticuerpo primario α -alfa-tubulina y luego anticuerpo secundario α -Ratón fluorescente para comprobar que podemos detectar una señal fuerte con este anticuerpo secundario y que los parámetros del sistema de detección están configurados correctamente. Con la flecha se indica la banda correspondiente a la tubulina (50 kDa).

Al haber obtenido una señal relativamente buena utilizando un anticuerpo secundario conjugado con fluoróforo, decidimos estudiar la posibilidad de implementar la metodología del *Multiplex* que permite identificar dos o más proteínas simultáneamente en el mismo carril. Cuando

dos proteínas de interés (reconocidas por dos anticuerpos primarios distintos) tienen pesos moleculares separables en el gel, se pueden identificar simultáneamente con el mismo anticuerpo secundario conjugado a HRP. Este no es el caso para vGluT-1 y vGAT que tienen pesos moleculares muy similares (62 y 57 kDa respectivamente). Dado que estos dos anticuerpos primarios son producidos en especies distintas (vGluT-1, conejo; vGAT, ratón) para poderlos identificar de modo simultáneo se pueden utilizar dos anticuerpos secundarios α -Conejo y α -Ratón conjugados a dos fluoróforos que tengan espectros de emisión separables.

Por lo tanto, lo primero a comprobar es la compatibilidad de los anticuerpos secundarios fluorescentes a utilizar y la posibilidad de distinguirlos a través del sistema de detección en uso (GBOX). Se decidió probar el anticuerpo secundario α -Conejo IRDye 800CW (a usar potencialmente para detectar el Conejo α -vGluT-1) que tiene un máximo de excitación a 778 nm y un máximo de emisión a 795 nm, y el anticuerpo secundario α -Ratón Alexa Fluor 680 (a usar potencialmente para detectar el ratón α -vGAT) que tiene un máximo de excitación a 650 nm y un máximo de emisión a 702 nm. Como se puede observar en la Figura 13, los espectros de excitación e emisión de un anticuerpo no están superpuestos respecto a los del otro anticuerpo, por lo que teóricamente se pueden detectar señales distinguibles.

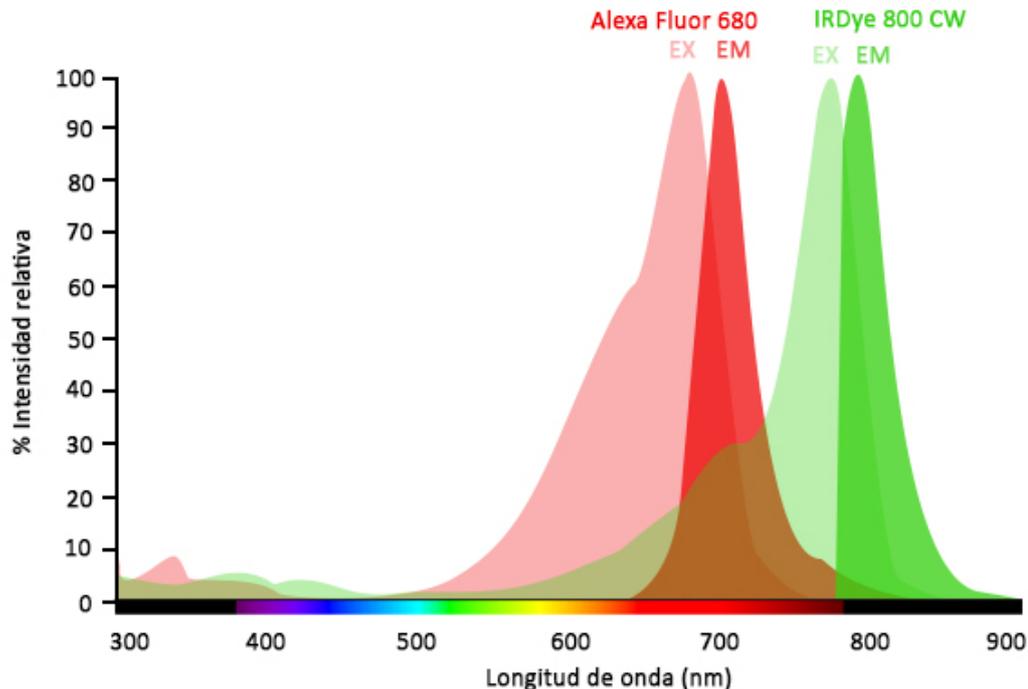


Figura 13. Espectros de excitación (EX) y emisión (EM) para los anticuerpos secundarios Alexa Fluor 680 (en rojo) e IRDye 800 CW (en verde). Los espectros de excitación e emisión de un anticuerpo no están superpuestos respecto a los del otro anticuerpo. Imagen adaptada de www.chroma.com/spectra-viewer.

Para comprobar que se puedan separar las señales de los dos anticuerpos con el sistema de detección en uso (GBOX), se realizó un *Dot blot* en el cual en una membrana de nitrocelulosa se colocaron 5 μ L de los anticuerpos secundarios diluidos 1:200 en 3 puntos, uno solamente con el Alexa Fluor 680, otro con el IRDye 800 y otro con ambos (Figura 14).

Teniendo en cuenta los valores máximos de excitación y emisión de cada anticuerpo secundario, se probaron diferentes combinaciones de luces y filtros disponibles en el GBOX para poder separar las señales. La mejor combinación fue una iluminación con led rojo y el filtro 705 para el fluoróforo Alexa Fluor 680, e una iluminación con lámpara de infrarrojo IR740 MOD y el filtro LY800 para el IR800. Como se puede observar en la Figura 14, efectivamente se pudieron separar las señales correspondientes para cada anticuerpo secundario, por lo que estos son compatibles y el equipo nos permite diferenciar entre ambas señales.

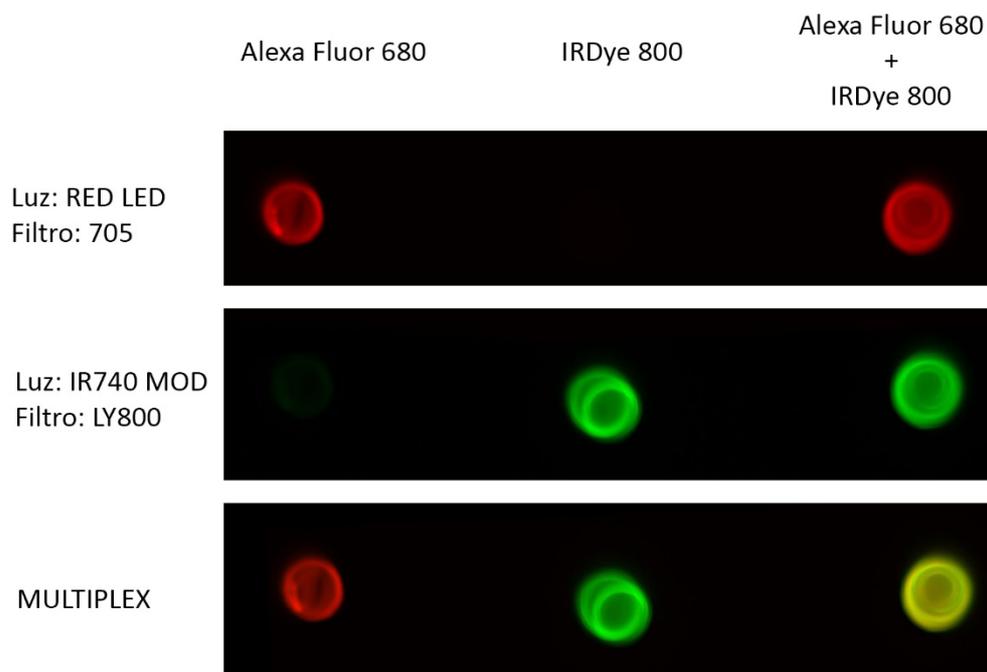


Figura 14. Dot Blot de anticuerpos secundarios fluorescentes. Se colocaron 3 puntos con diferentes combinaciones de anticuerpos secundarios: en el primero se colocaron 5 μ L de α -Ratón Alexa Fluor 680 diluido 1:200, en el segundo punto 5 μ L de α -Conejo IRDye 800 diluido 1:200 y en el tercer punto se colocaron ambos anticuerpos secundarios diluidos 1:200. En rojo (coloración falsa) se observa la señal con iluminación RED LED y filtro 705 correspondiente al anticuerpo secundario α -Ratón Alexa Fluor 680, y en verde (coloración falsa) se observa la señal con iluminación IR740 MOD y filtro LY800 correspondiente al anticuerpo secundario α -Conejo IRDye 800. Para el multiplex se fusionaron las imágenes obtenidas con ambos parámetros y en amarillo (coloración falsa) se observa la mezcla de las dos señales.

Una vez que se comprobó que estos anticuerpos secundarios fluorescentes son compatibles y se encontraron las condiciones óptimas para separar las señales, se procedió a realizar una prueba de *Western blot* utilizando estos mismos anticuerpos.

Se realizó un SDS-PAGE al 12% cargando 20 y 40 μg de la misma muestra por triplicado. Luego de la transferencia la membrana se separó en tres partes. La primera se incubó solo con el anticuerpo primario $\alpha\text{-vGluT-1}$ (1:20.000) y el secundario $\alpha\text{-Conejo IRDye 800}$ (1:10.000), la segunda solo con el $\alpha\text{-vGAT}$ (1:1000) y el secundario $\alpha\text{-Ratón Alexa Fluor 680}$ (1:5000), y la tercera con ambos anticuerpos primarios y secundarios. Para la detección de las señales se utilizaron los mismos parámetros de iluminación y filtro del experimento de *Dot blot*. Como se puede observar en la Figura 15, con la iluminación/filtro correspondiente al $\alpha\text{-Conejo IRDye 800}$ se pudo observar la señal esperada para vGluT-1 (62 kDa) en la primera membrana ($\alpha\text{-vGluT-1}$ / $\alpha\text{-Conejo IRDye 800}$) y en la tercera (todos los anticuerpos), pero no en la segunda membrana ($\alpha\text{-vGAT}$ / $\alpha\text{-Ratón Alexa Fluor 680}$). Con la iluminación/filtro correspondiente al $\alpha\text{-Ratón Alexa Fluor 680}$ no se observó ninguna señal en ninguna de las membranas.

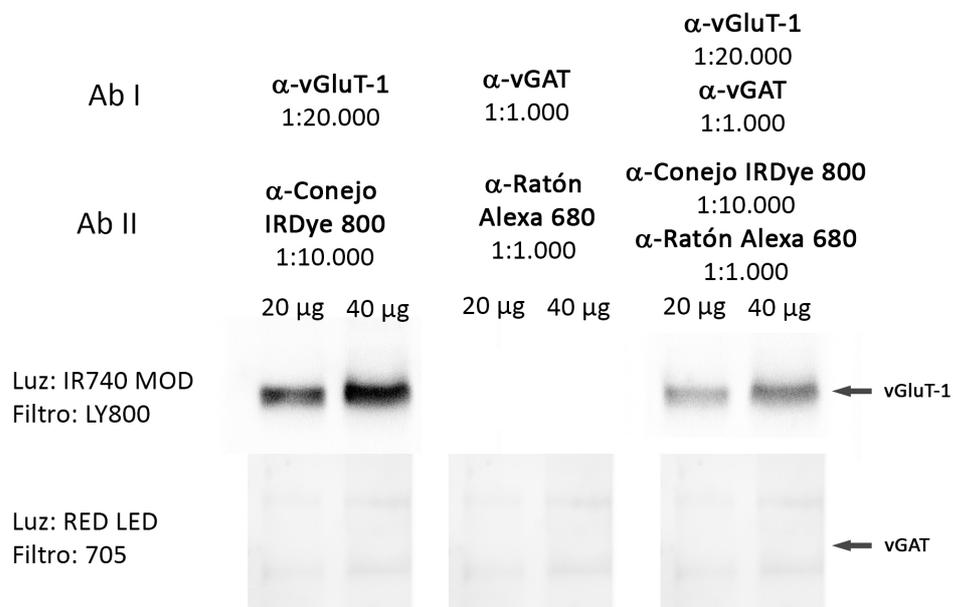


Figura 15. Western blot con anticuerpos secundarios fluorescentes. En el primer pocillo se cargaron 20 μg de muestra de corteza cerebral y en el segundo 40 μg de la misma muestra, por triplicado. La membrana se dividió en tres partes iguales, y cada parte fue incubada con diferentes combinaciones de anticuerpos. La primera membrana se incubó con el anticuerpo primario $\alpha\text{-vGluT-1}$ diluido 1:20.000 y el anticuerpo secundario $\alpha\text{-Conejo IRDye 800}$ diluido 1:10.000. La segunda membrana se incubó con el anticuerpo primario $\alpha\text{-vGAT}$ 1:1000 y el secundario $\alpha\text{-Ratón Alexa Fluor 680}$ 1:5000. La tercera membrana fue incubada con los cuatro anticuerpos ya mencionados en las mismas diluciones que las membranas previas. Se tomaron dos imágenes utilizando dos parámetros de iluminación y filtro: iluminación IR740 MOD y filtro LY800 para observar la señal del anticuerpo secundario $\alpha\text{-Conejo IRDye 800}$; e iluminación RED LED y filtro 705 para observar la señal del anticuerpo secundario $\alpha\text{-Ratón Alexa Fluor 680}$. Para el caso de vGluT-1 se observa una banda bien definida de peso molecular esperado (62 kDa, indicada con la flecha) en las dos membranas que fueron incubadas con el anticuerpo primario para esta proteína y no se observa en la membrana que no fue incubada con este anticuerpo. La señal observada es más fuerte en el pocillo con mayor concentración proteica. Para el caso de vGAT, no se observa una banda del peso molecular esperado (57kDa, con la flecha se indica la altura a la que debería estar la banda específica) en ninguna de las membranas, tanto las que fueron incubadas con el anticuerpo $\alpha\text{-vGAT}$ como en las que no, pero si se observa una señal de fondo aunque muy débil.

Para poder obtener una señal de vGAT se decidió realizar una segunda prueba con el anticuerpo primario y secundario más concentrados. Se cargaron 60 μg de muestra y se realizó la incubación con el α -vGAT 1:500 y el secundario α -Ratón Alexa Fluor 680 1:2500 y 1:1000. También se realizó un control sin incubar con al anticuerpo primario. A pesar de que aumentando la concentración de los anticuerpos se pudo observar una señal correspondiente a vGAT, también aumentó el fondo inespecífico (Figura 16).

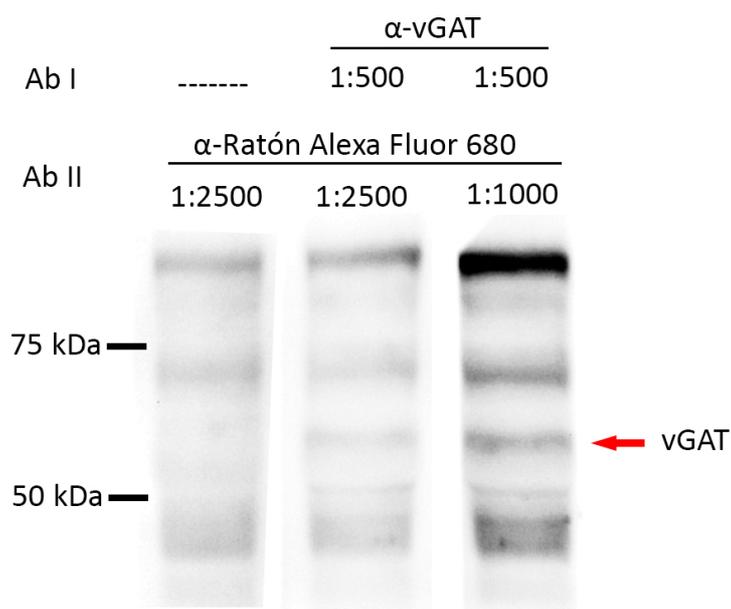


Figura 16. Western blot de puesta a punto del α -vGAT con anticuerpo secundario fluorescente. En los tres pocillos se cargaron 60 μg de la misma muestra de corteza cerebral. El anticuerpo primario α -vGAT se utilizó diluido 1:500 y se probó el anticuerpo secundario α -Ratón Alexa Fluor 680 en dos diluciones (1:1000 y 1:2500). A su vez en uno de ellos no se colocó anticuerpo primario pero sí secundario para comprobar la presencia de la banda específica de vGAT (marcada con la flecha). Utilizando el anticuerpo secundario más concentrado se observa más fuerte la banda de vGAT pero también el fondo. **Ab I:** anticuerpo primario; **Ab II:** anticuerpo secundario.

No obstante las varias pruebas, no se pudieron identificar condiciones experimentales óptimas para obtener una señal clara con el anticuerpo primario α -vGAT y el secundario α -Ratón Alexa Fluor 680. Dado que el anticuerpo α -Ratón Alexa Fluor 680 funcionó bien con el anticuerpo primario α -alfa-tubulina (ver Figura 12), concluimos que la ausencia de una señal clara de vGAT puede ser debida a una limitada calidad del anticuerpo primario α -vGAT y/o la baja concentración de la proteína vGAT en la muestra.

Habiendo descartado la posibilidad de implementar el sistema Multiplex, se decidió comprar otro anticuerpo α -vGAT, que ya había sido utilizado por otros grupos teniendo resultados positivos

(Mainardi *et al.*, 2010, 2014), el α -vGAT Synaptic Systems #131003 producido en conejo y detectarlo con un anticuerpo secundario conjugado a HRP.

Para la puesta a punto del nuevo anticuerpo Conejo α -vGAT, se realizó una prueba sobre una muestra de corteza visual utilizando el anticuerpo primario a dos diluciones diferentes (1:1000 y 1:4000). Como se puede observar en la Figura 17, no obstante haya una señal de fondo, se puede identificar claramente una banda correspondiente a vGAT a la dilución más concentrada. Mientras que si se usa el anticuerpo primario más diluido, la señal correspondiente a la banda de vGAT tiene la misma intensidad que el fondo, por lo que no es útil para realizar la cuantificación de la proteína de interés. En el carril de control sin anticuerpo primario pero solo con al anticuerpo secundario α -Conejo-HRP, no se observaron bandas inespecíficas.

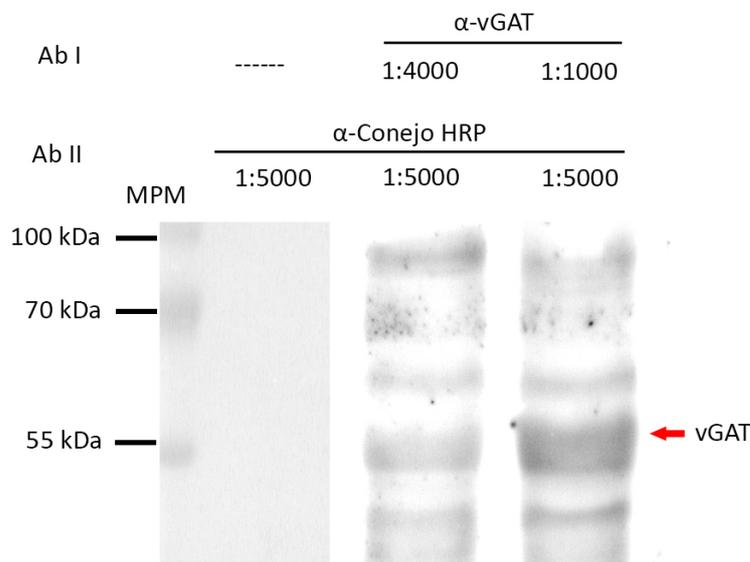


Figura 17. Western Blot para puesta a punto de anticuerpo primario α -vGAT nuevo de conejo. En cada pocillo se cargaron 60 μ g de muestra de corteza visual. Se utilizó el nuevo anticuerpo primario α -vGAT en dos diluciones (1:4000 y 1:1000) según lo indicado por el fabricante. El anticuerpo secundario α -Conejo HRP que se había utilizado en ensayos previos para el anticuerpo primario α -vGluT-1, se utilizó en dilución 1:5000. Con el α -vGAT más diluido (1:4000) se puede observar la banda de vGAT (marcada con la flecha) pero ésta tiene la misma intensidad que el fondo inespecífico. Al concentrar el anticuerpo primario α -vGAT (1:1000) la banda específica de vGAT se observa más fuerte que el fondo inespecífico. **Ab I:** anticuerpo primario; **Ab II:** anticuerpo secundario.

En conclusión, para la detección de vGluT-1 se decidió utilizar el anticuerpo Conejo α -vGluT-1 diluido 1:20.000 con el anticuerpo secundario α -Conejo HRP 1:7000, y para el vGAT el primario Conejo α -vGAT diluido 1:1000 y el mismo secundario 1:5000.

2. ESTUDIO DE LOS NIVELES DE vGluT-1 y vGAT EN DIFERENTES MODELOS DE PLASTICIDAD

Se estudiaron los niveles de los transportadores vesiculares vGluT-1 y vGAT en los modelos de desarrollo del período crítico y de restauración de la plasticidad en adultos en la corteza visual de ratón. vGluT-1 es uno de los tres transportadores vesiculares de glutamato y es el más abundante en las regiones telencefálicas, por lo que se considera un marcador de terminales excitatorias intracorticales (Nakamura *et al.*, 2005; Mainardi *et al.*, 2010). vGAT, también conocido como vIAAT, es un transportador vesicular que puede transportar tanto GABA como glicina hacia el interior de las vesículas (Aubrey *et al.*, 2007). A nivel cortical, visto que las neuronas glicinérgicas son escasas, se puede considerar a vGAT como marcador de terminales inhibitorias GABAérgicas (McIntire *et al.*, 1997; Chaudhry *et al.*, 1998).

Los valores obtenidos para cada anticuerpo (α -vGluT-1 y α -vGAT) fueron normalizados a los valores correspondientes a la señal obtenida en la misma muestra con el anticuerpo contra alfa-tubulina, obteniéndose así un valor en unidades arbitrarias que corresponde a los niveles de cada transportador en las diferentes condiciones experimentales.

2.1 ANÁLISIS DE LOS NIVELES DE vGluT-1 y vGAT DURANTE EL DESARROLLO (PC vs. AD)

Para estudiar los cambios en los niveles de estos transportadores en el desarrollo, se compararon los valores en animales del período crítico (PC) de P28 con los valores en los adultos (AD) de P98 los cuales no recibieron ningún tratamiento. Los animales del PC presentan altos niveles de plasticidad en la corteza visual, mientras que los AD tienen bajos niveles. El análisis por Western blot no reveló diferencias en el nivel de los transportadores entre las dos muestras. El estudio semi-cuantitativo indicó que tanto vGluT-1 (PC: 1.08 ± 0.06 vs. AD: 1.12 ± 0.11 , $n = 4$, Student's t-test, $P = 0.78$) como vGAT (PC: 0.92 ± 0.08 vs. A.; 0.91 ± 0.08 , $n = 4$, Student's t-test, $P = 0.89$) no presentan cambios significativos entre animales PC y AD (Figura 18).

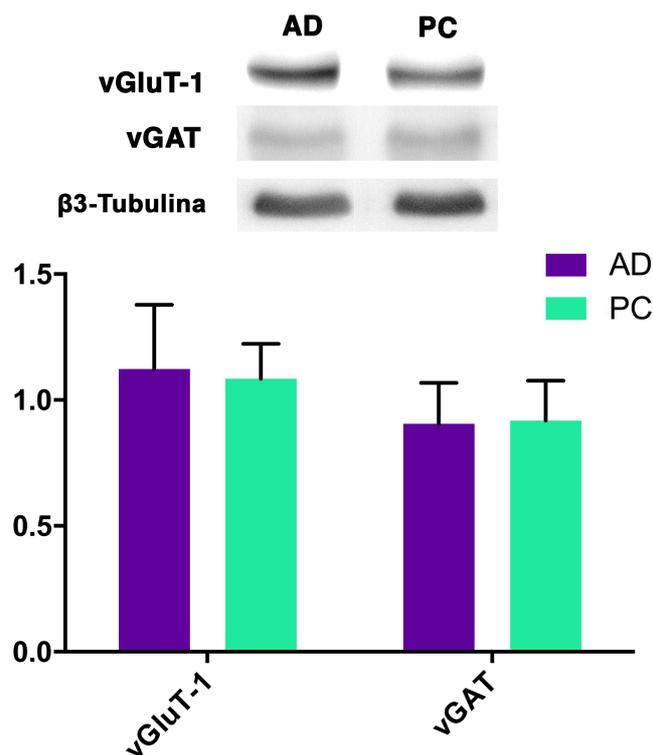


Figura 18. Análisis de los niveles de vGluT-1 y vGAT durante el desarrollo (PC vs. AD). Western blot representativo de muestras de corteza visual de animales en el PC y adultos incubadas con α -vGluT-1 (arriba), α -vGAT (medio) y con β 3-Tubulina (abajo). En el gráfico se indica la cuantificación de la señal (normalizado a la señal de α -tubulina) en ratones adultos y jóvenes. vGluT-1 no es modulado durante el desarrollo (PC: 1.08 ± 0.06 vs. AD: 1.12 ± 0.11 , $n = 4$, Student's t -test, $P = 0.78$) y vGAT tampoco (PC: 0.92 ± 0.08 vs. A.: 0.91 ± 0.08 , $n = 4$, Student's t -test, $P = 0.89$). Las barras violetas corresponden a los valores de los ratones adultos (AD) y las verdes a los valores de los ratones jóvenes (PC). Las barras de error corresponden a la desviación estándar.

2.2 ANÁLISIS DE LOS NIVELES DE vGluT-1 y vGAT EN ADULTOS CON PLASTICIDAD RESTAURADA (FLX vs. AD y EE vs. SC)

Luego se compararon los niveles de los transportadores en dos modelos de restauración de plasticidad en adultos: animales adultos tratados con fluoxetina (FLX) que presentan altos niveles de plasticidad comparados con animales adultos de control sin tratamiento (AD) que presentan bajos niveles de plasticidad, y animales adultos mantenidos en ambiente enriquecido (EE) con altos niveles de plasticidad comparados con animales adultos mantenidos en condiciones estándar (SC) con bajos niveles de plasticidad. Como se puede observar en la Figura 19, el análisis por Western blot no reveló diferencias de la señal de vGluT-1 entre animales tratados con fluoxetina y los controles, pero sí de la señal de vGAT. El estudio semi-cuantitativo indicó que el tratamiento con fluoxetina no modula los niveles de vGluT-1 (FLX: 1.11 ± 0.08 vs. AD: 1.12 ± 0.11 , $n = 4$, Student's t -test, $P = 0.90$), pero induce

una reducción del 50% de los niveles de vGAT con respecto al adulto sin tratamiento (FLX: 0.45 ± 0.05 vs. AD: 0.91 ± 0.07 , $n = 4$, Student's t-test, $P < 0.05$).

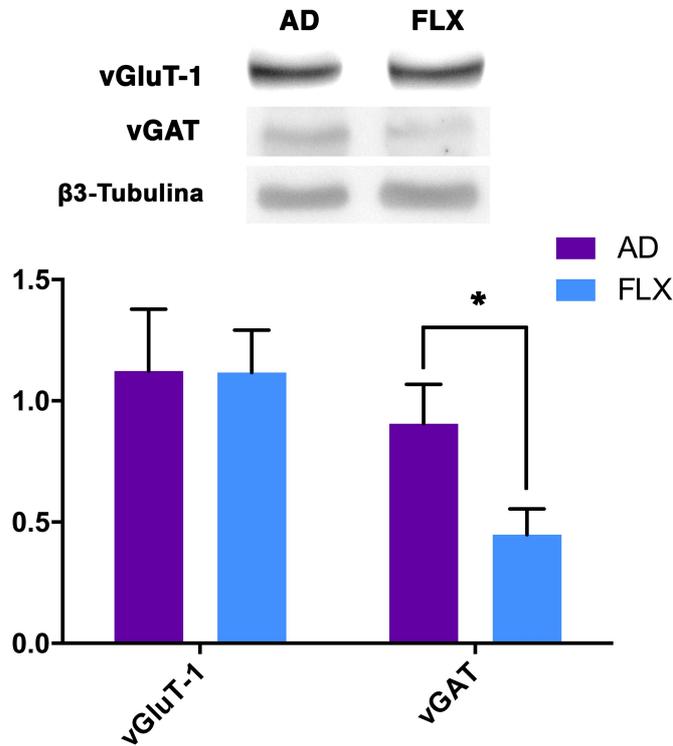


Figura 19. Análisis de los niveles de vGluT-1 y vGAT en el modelo de plasticidad restaurada en adultos mediante el tratamiento con fluoxetina. Western blot representativo de muestras de corteza visual de animales adultos tratados con fluoxetina durante 4 semanas (FLX) y adultos sin tratamiento (AD) incubadas con α -vGluT-1 (arriba), α -vGAT (medio) y con β 3-Tubulina (abajo). En el gráfico se indica la cuantificación de la señal (normalizado a la señal de α -tubulina) en ratones tratados y controles. vGluT-1 no es modulado por el tratamiento con fluoxetina (FLX: 1.11 ± 0.08 vs. AD: 1.12 ± 0.11 , $n = 4$, Student's t-test, $P = 0.90$), pero sí se observó una disminución significativa del 50% de los valores de vGAT en ratones tratados con fluoxetina (FLX: 0.45 ± 0.05 vs. AD: 0.91 ± 0.07 , $n = 4$, Student's t-test, $P < 0.05$). Las barras violetas corresponden a los valores de los ratones adultos sin tratamiento (AD) y las celestes a los valores de los ratones adultos tratados con fluoxetina (FLX). Las barras de error corresponden a la desviación estándar. * $P < 0.05$, Student's t-test.

De modo similar a lo observado en las muestras de animales tratados con fluoxetina, el análisis por Western blot entre animales adultos mantenidos en ambiente enriquecido y los animales mantenidos en condiciones estándar, no reveló diferencias de la señal de vGluT-1, pero sí de la señal de vGAT (Figura 20). El estudio semi-cuantitativo indicó que el ambiente enriquecido no modula los niveles de vGluT-1 (EE: 1.03 ± 0.01 vs. SC: 0.93 ± 0.05 , $n = 4$, Student's t-test, $P = 0.98$), pero reduce un 48% los valores de vGAT, respecto a los adultos control (EE: 0.54 ± 0.01 vs. SC: 1.03 ± 0.05 , $n = 4$, Student's t-test, $P < 0.05$).

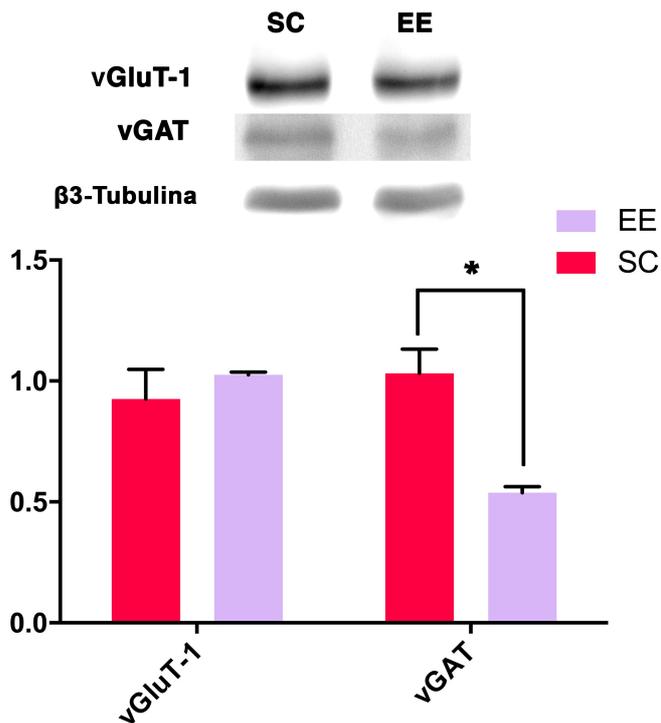


Figura 20. Análisis de los niveles de vGluT-1 y vGAT en el modelo de plasticidad restaurada en adultos mediante el mantenimiento en ambiente enriquecido. Western blot representativo de muestras de corteza visual de animales adultos mantenidos en ambiente enriquecido durante 4 semanas (EE) y adultos mantenidos en condiciones estándar (SC) incubadas con α -vGluT-1 (arriba), α -vGAT (medio) y con β 3-Tubulina (abajo). En el gráfico se indica la cuantificación de la señal (normalizado a la señal de α -tubulina) en ratones tratados y controles. vGluT-1 no es modulado por el ambiente enriquecido (EE: 1.03 ± 0.01 vs. SC: 0.93 ± 0.05 , $n = 4$, Student's t-test, $P = 0.98$), pero si se observó una disminución significativa del 48% de los valores de vGAT en ratones mantenidos en ambiente enriquecido (EE: 0.54 ± 0.01 vs. SC: 1.03 ± 0.05 , $n = 4$, Student's t-test, $P < 0.05$). Las barras rojas corresponden a los valores de los ratones adultos en condiciones estándar (SC) y las violetas a los valores de los ratones adultos mantenidos en ambiente enriquecido (EE). Las barras de error corresponden a la desviación estándar. * $P < 0.05$, Student's t-test.

2.3 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

En resumen, el análisis de los niveles de vGluT-1 mediante *Western blot* mostró que esta proteína no es modulada durante el desarrollo, ya que no se observan cambios entre los niveles del PC y los del adulto, y tampoco es modulada en los modelos experimentales de restauración de la plasticidad en el adulto, ya que no hay cambios entre los adultos sin tratamiento y los tratados con fluoxetina, así como tampoco en los animales mantenidos en ambiente enriquecido y en condiciones estándar.

Por otro lado, el análisis de los niveles de vGAT durante el desarrollo demostró que esta proteína tampoco es modulada durante el desarrollo ya que no se observan cambios entre los niveles del PC y del AD. Contrario a esto, vGAT mostró estar modulada negativamente en ambos modelos

experimentales de restauración de la plasticidad en el adulto. Se observó una disminución del 50% en los niveles de vGAT en los animales tratados con fluoxetina en comparación con los animales sin tratamiento. A su vez, se observó una disminución del 48% en el nivel de vGAT de los animales mantenidos en ambiente enriquecido en comparación con los animales en condiciones estándar.

En ambos casos el análisis estadístico se realizó con el test t de Student comparando PC vs AD, FLX vs AD, y EE vs SC. Para verificar si existían diferencias estadísticamente significativas entre todas las muestras se utilizó el análisis one-way ANOVA con post-hoc Tukey's test, comparando todas estas simultáneamente. Este análisis confirmó los resultados estadísticos obtenidos con el test t de Student (Tabla 4).

Tabla 4. Valores promedios (PROM) de los niveles de vGluT-1 y vGAT y su desvío estándar (STD).

	vGluT-1		vGAT	
	PROM	STD	PROM	STD
PC	1,0850	0,0596	0,9186	0,0686
AD	1,1233	0,1101	0,9053	0,0705
FLX	1,1163	0,0762	0,4485*#	0,0458
EE	1,0258	0,0050	0,5376*#	0,0112
SC	0,9254	0,0530	1,0318	0,0435

* $P < 0,05$ con el test t de Student comparando PC vs AD, FLX vs AD, y EE vs SC;

$P < 0,05$ con one-way ANOVA con post-hoc Tukey's test, comparando FLX vs AD y EE vs SC.

3. COMPARACION DE LA RELACIÓN vGluT-1/vGAT EN LOS DIFERENTES MODELOS EXPERIMENTALES DE PLASTICIDAD

Como fue mencionado en la introducción, el balance entre tono excitatorio e inhibitorio (balance E/I) a nivel cortical es considerado uno de los factores principales determinantes los niveles de plasticidad. Se ha demostrado que este balance es alto durante el período crítico de plasticidad, disminuye en el adulto, y es alto en los modelos de restauración de la plasticidad en adulto (Hensch & Fagiolini, 2005). Dado que vGluT-1 y vGAT son considerados marcadores de terminales sinápticas

excitatorias e inhibitorias respectivamente, la relación entre estos podría representar el balance entre el tono excitatorio e inhibitorio (balance E/I). Por esta razón se calculó la relación vGluT-1/vGAT en los diferentes modelos experimentales utilizando los datos obtenidos separadamente con los dos anticuerpos. Esta aproximación nos permite conocer en primer lugar si este balance se modula, y en el caso de que se module, si tiende hacia una mayor excitación o inhibición. Para obtener el valor de la relación vGluT-1/vGAT se realizó el cociente entre los valores obtenidos previamente para cada anticuerpo por separado, ya normalizados a los valores correspondientes de alfa-tubulina.

Analizando la relación vGluT-1/vGAT durante el período crítico y en el adulto, se puede observar que esta relación no es modulada durante el desarrollo (PC: 1.21 ± 0.12 vs. AD: 1.28 ± 0.18 , $n = 4$, Student's t-test, $P = 0.79$). Por el contrario, la relación vGluT-1/vGAT se modula en los modelos experimentales de restauración de la plasticidad en el adulto (Figura 21). El tratamiento con fluoxetina y el mantenimiento en ambiente enriquecido provocan un aumento en esta relación vGluT-1/vGAT de 97% luego del tratamiento con fluoxetina y de un 112% luego del mantenimiento en ambiente enriquecido, en comparación con la relación observada en sus respectivos controles (AD sin tratamiento y adultos en SC), lo que implica un desplazamiento hacia una mayor excitación (FLX: 2.52 ± 0.09 vs. AD: 1.28 ± 0.18 , $n = 4$, Student's t-test, $P < 0.05$; EE: 1.91 ± 0.0 vs. SC: 0.90 ± 0.07 , $n = 4$, Student's t-test, $P < 0.05$).

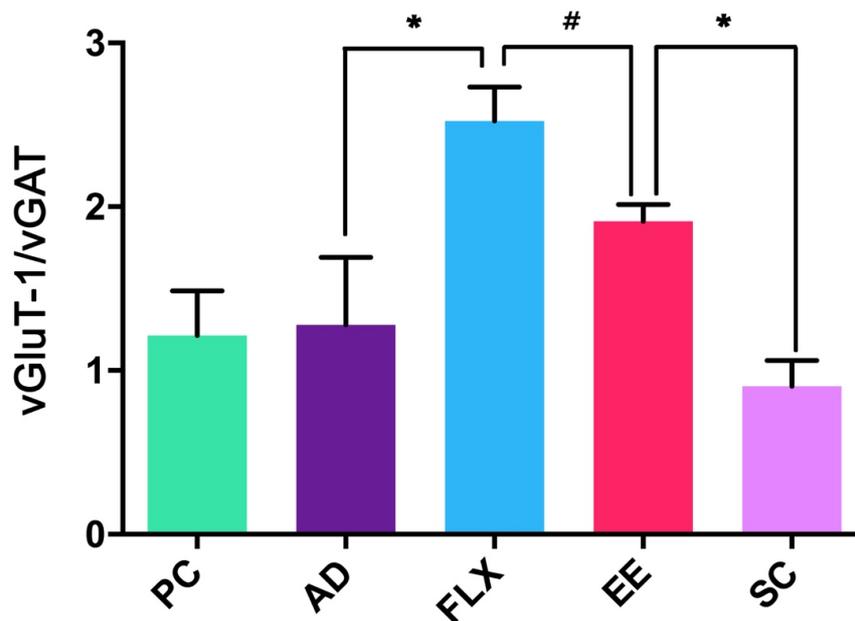


Figura 21. La relación vGluT-1/vGAT en diferentes modelos experimentales. Esta relación no es modulada durante el desarrollo del período crítico (PC: 1.21 ± 0.12 vs. AD: 1.28 ± 0.18 , $n = 4$, Student's t-test, $P = 0.79$), pero incrementa un 97% luego del tratamiento con fluoxetina (FLX: 2.52 ± 0.09 vs. AD: 1.28 ± 0.18 , $n = 4$, Student's t-test, $P < 0.05$) y un 112% en ratones adultos mantenidos en ambiente enriquecido (EE: 1.91 ± 0.0 vs. SC: 0.90 ± 0.07 , $n = 4$, Student's t-test, $P < 0.05$), cuando se comparan con los respectivos controles. **PC:** animales en el período crítico; **AD:** animales adultos sin tratamiento; **FLX:** animales adultos tratados con fluoxetina; **EE:**

animales adultos mantenidos en ambiente enriquecido; **SC**: animales adultos mantenidos en condiciones estándar.

* $P < 0.05$, Student's t-test; # $P < 0.05$, one-way ANOVA con test post hoc tukey's.

Los datos obtenidos sobre la relación vGluT-1 /vGAT fueron analizados también con el one-way ANOVA post hoc tukey's test, que nos permitió comparar dicha relación entre todas las condiciones experimentales. Este análisis confirmó los resultados obtenidos con el test t de Student, pero además indicó una diferencia significativa entre el valor vGluT-1/vGAT de FLX vs EE, sugiriendo que el tratamiento con fluoxetina induce una modulación de esta relación más fuerte que el mantenimiento en ambiente enriquecido (Tabla 5).

Tabla 5. Resumen del análisis estadístico con el test one-way ANOVA. Valores de significancia luego del análisis con el one-way ANOVA post hoc tukey's test de los valores de la relación vGluT-1/vGAT para las diferentes condiciones experimentales. En rojo se indican los valores de $P > 0.05$ y en verde y con asterisco se indican los valores de $P < 0.05$.

	PC	AD	FLX	EE	SC
PC	---	0,9961	0,0002*	0,0111*	0,4539
AD	---	---	0,0002*	0,0221*	0,2799
FLX	---	---	---	0,0276*	0,0002*
EE	---	---	---	---	0,0005*
SC	---	---	---	---	---

DISCUSIÓN

1. PUESTA A PUNTO

Para analizar los niveles de vGluT-1, se probaron una serie de diluciones de anticuerpo primario y secundario, y se decidió que la mejor combinación que generaba una buena señal era el anticuerpo primario diluido 1:20.000 y el secundario 1:7000. A su vez se realizaron pruebas para utilizar un anticuerpo secundario fluorescente, obteniéndose una señal clara y buena para poder ser cuantificada.

Para el caso de vGAT, se realizaron numerosas pruebas para mejorar la señal ya que en un principio ésta era muy débil y con mucho fondo. Por esto se usaron distintas soluciones de bloqueo y varios anticuerpos secundarios diferentes, incluyendo uno conjugado a un fluoróforo.

No obstante la realización con éxito de la puesta a punto del sistema de detección *Multiplex*, debido a que la señal obtenida con el anticuerpo vGAT usando el secundario fluorescente no dio los resultados esperados, se decidió descartar esta metodología.

Por esta razón se decidió volver al sistema de detección con secundarios conjugados a HRP utilizando un nuevo anticuerpo primario de conejo α -vGAT, que en la bibliografía tuvo resultados positivos (Mainardi *et al.*, 2010, 2014). Este nuevo anticuerpo permitió la detección de una señal clara de vGAT y luego de una nueva puesta a punto, se decidió utilizar el anticuerpo primario en la dilución 1:1000 y el secundario 1:5000 ya que esta combinación generaba una señal clara para la cuantificación de los niveles de vGAT.

2. MODULACIÓN DE vGLUT-1 Y vGAT EN DIFERENTES MODELOS DE PLASTICIDAD

2.1 DESARROLLO

En primer lugar se estudió si los transportadores vesiculares son modulados en la corteza visual de animales en el período crítico, caracterizados por presentar altos niveles de plasticidad, y de animales adultos, con bajos niveles. Los análisis de vGluT-1 y de vGAT mediante *Western blot* mostraron que los niveles de estos transportadores no son modulados entre estas dos condiciones.

Estudios previos han analizado la expresión de estos dos transportadores durante el desarrollo en la corteza cerebral de rata. Por medio de *Western blot* sobre toda la corteza, y por inmunohistoquímica en la corteza somato-sensorial primaria, han demostrado que vGluT-1 llega a un máximo alrededor de P30 (Minelli *et al.*, 2003b; Zhang *et al.*, 2011) y que vGAT llega a un máximo alrededor de P15 (Minelli *et al.*, 2003a), y que ambos niveles se mantienen constantes en el adulto. No obstante las diferencias metodológicas, es probable que el desarrollo de estos transportadores siga un patrón similar al observado en los estudios antes mencionados también en la corteza visual de ratón. Esto justificaría la ausencia de modulación observada en nuestros experimentos dado que se realizaron a P28, edad a la cual los transportadores ya habrían alcanzado valores similares a los del adulto.

2.2 RESTAURACIÓN EN EL ADULTO

Luego se estudió si vGluT-1 y vGAT son modulados en los modelos de restauración de plasticidad en adulto, el tratamiento con fluoxetina y el ambiente enriquecido. Las condiciones experimentales utilizadas en este trabajo fueron exactamente las mismas que en estudios en los cuales se ha demostrado que dichos tratamientos restauran la plasticidad funcional en el roedores adultos (Greifzu *et al.*, 2014; Ruiz-Perera *et al.*, 2015). Los análisis mediante *Western blot* mostraron que los niveles de vGluT-1 no son modulados por el tratamiento con fluoxetina ni por el mantenimiento en ambiente enriquecido, mientras que vGAT es regulado negativamente en ambas condiciones experimentales, observándose una disminución del 50% por el tratamiento con fluoxetina y del 48% por el mantenimiento en ambiente enriquecido.

Para el caso de los modelos de plasticidad restaurada en el adulto, se han observado resultados contrastantes sobre la expresión de vGluT-1 y vGAT a nivel cortical, tanto en el tratamiento con fluoxetina como en el ambiente enriquecido. Para el caso de vGluT-1, se ha observado que el tratamiento con fluoxetina promueve una modulación positiva, aumentando los niveles de este transportador (Moutsimilli *et al.*, 2005), aunque también se ha visto una modulación negativa (Beshara *et al.*, 2015). Con el ambiente enriquecido se ha visto que este tratamiento promueve un aumento de los niveles de vGluT-1, aunque este aumento sería solo del 10% con respecto al control (Mainardi *et al.*, 2010). Nuestros resultados de *Western blot* evidenciaron que el vGluT-1 no es modulado en ninguno de los dos modelos de restauración de la plasticidad en el adulto, lo que contrasta los resultados presentes en la bibliografía.

Para el caso de vGAT, en la bibliografía se ha reportado que la fluoxetina no promueve una modulación de los niveles de vGAT (Beshara *et al.*, 2015), aunque también en otro estudio se observó que promueve un aumento de los niveles del ARN mensajero que codifica este transportador

(Tiraboschi *et al.*, 2013). Nuestros resultados de *Western blot* contrastan ambas observaciones ya que en nuestro caso el tratamiento con fluoxetina generó una disminución de los niveles de vGAT. Una posible explicación de la disparidad entre nuestros resultados y los del trabajo de Beshara *et al.* puede ser metodológica. En los dos trabajos se utilizó el mismo anticuerpo, cuyo fabricante sugiere no hervir las muestras en buffer de corrida que contiene SDS antes de la corrida debido a que esto puede generar la agregación proteica y así afectar la detección y cuantificación de la proteína de interés. Mientras que en nuestro trabajo respetamos el protocolo sugerido, en el otro especifican haber hervido las muestras. Las diferencias con respecto al segundo estudio de los niveles de ARNm pueden deberse a que un aumento de éste no significa que necesariamente se produzca un aumento en los niveles de la proteína, ya que hay mecanismos de regulación pre-traduccionales que influyen sobre los niveles de la proteína que se producen. Para el caso del mantenimiento en ambiente enriquecido, se ha observado que vGAT es modulado negativamente por este tratamiento (Mainardi *et al.*, 2010), lo que concuerda con los resultados obtenidos en este estudio.

Las diferencias observadas con los resultados de otros estudios sobre la modulación de estos transportadores pueden deberse también a diferencias en la especie, ya que dichos estudios fueron obtenidos en modelos de rata, mientras que los nuestros en ratón. Otra posible causa puede ser la diferencia en los tratamientos, por ejemplo debido a diferencias en la dosis y vía de administración de la fluoxetina.

3. MODULACIÓN DE LA RELACION vGluT-1/vGAT y EL BALANCE E/I

Como fue mencionado previamente, varios estudios han sugerido que el equilibrio entre el tono excitatorio y el inhibitorio (balance E/I) es uno de los mecanismos centrales en el control de la plasticidad cortical. Varios son los factores que determinan el tono excitatorio e inhibitorio, como el número de células con fenotipo excitatorio o inhibitorio, la cantidad de sinapsis que estas realizan, y la fuerza sináptica de cada una de estas sinapsis. Ésta es a su vez determinada por una compleja serie de elementos entre los cuales se encuentran todos los que participan en la síntesis de neurotransmisor, la acumulación del neurotransmisor en las vesículas sinápticas, la liberación de las vesículas, la recaptación o inactivación del neurotransmisor, además de los receptores pre- y post-sinápticos, etc.

En este trabajo decidimos utilizar dos marcadores de sinapsis excitatorias e inhibitorias para verificar su posible utilización como correlatos moleculares del tono excitatorio e inhibitorio. Este estudio se llevó a cabo en la corteza visual del ratón en distintas condiciones de plasticidad, bajo la

hipótesis de que la relación vGluT-1/vGAT pueda representar el balance E/I, y así reflejar los niveles de plasticidad cortical.

Observamos que esta relación no es modulada entre el período crítico y el adulto, dado que los niveles de vGluT-1 y vGAT no cambian entre las dos condiciones. Como mencionado anteriormente, este resultado está en acuerdo con resultados obtenidos en otras áreas cerebrales en ratas. La modulación del balance E/I observada en la corteza visual (Morales *et al.*, 2002) y otras áreas cerebrales (Zhang *et al.*, 2011) entre el período crítico de plasticidad y el adulto, es probablemente debida a la modulación de otros factores que afectan la fuerza sináptica. Particularmente interesante es el estudio de Zhang *et al.*, 2011 en el cual evidencian en la corteza somato-sensorial que la modulación del balance E/I (identificada por registros electrofisiológicos) durante el desarrollo del período crítico de plasticidad se correlaciona con un cambio en la expresión de factores moleculares asociados principalmente al tono inhibitorio, como ser receptores y enzima de síntesis del GABA, pero no del transportador vGAT. Nuestros resultados, junto a evidencias obtenidas en otras áreas, indican que la relación vGluT-1/vGAT no sería un buen correlato molecular del balance E/I y de los niveles de plasticidad durante el desarrollo del período crítico, y sugieren que otros factores lo estarían modulando en esta fase.

Por otro lado, la relación vGluT-1/vGAT sí podría ser un buen indicador del balance E/I en los modelos de plasticidad restaurada en el adulto. En nuestros experimentos demostramos que el tratamiento con fluoxetina y el mantenimiento de los animales en ambiente enriquecido reducen los niveles de vGAT pero no modulan vGluT-1. Esto concuerda con otros reportes en los cuales se utilizaron estas mismas estrategias para restaurar altos niveles de plasticidad en la corteza visual de ratas y de ratones adultos. En estos trabajos se identificó una modulación del balance E/I principalmente debida a una reducción del tono inhibitorio evidenciada por varias metodologías: una reducción de la liberación basal del GABA sin modulación de la liberación del glutamato (medidos por HPLC luego de microdialisis in vivo), una reducción de la enzima GAD67 que sintetiza GABA, o de receptores del GABA (por inmunohistoquímica o Western blot) (Sale *et al.*, 2007; Maya-Vetencourt *et al.*, 2008; Baroncelli *et al.*, 2010; Greifzu *et al.*, 2014).

El análisis estadístico utilizando el test one-way ANOVA nos permitió observar que la modulación de la relación vGluT-1/vGAT no se da en la misma magnitud en los dos modelos de restauración de la plasticidad en el adulto (FLX y EE), lo que sugiere que el tratamiento con fluoxetina promueve una modulación mayor de esta relación comparado con el mantenimiento en ambiente enriquecido. No obstante, no podemos afirmar que esta diferencia se correlacione a una modulación diferente del nivel de plasticidad cortical dado que en la bibliografía no hay reportes que comparen cuantitativamente la plasticidad inducida por los dos tratamientos.

Como ya se ha planteado, los mecanismos que participan en la determinación del balance E/I y de los niveles de plasticidad son muy diversos y complejos, y aún no se conocen en detalle. La modulación de este balance, que parece ser una vía final común en la determinación del período crítico de plasticidad y en la restauración de la plasticidad en el adulto, puede ocurrir por medio de diferentes mecanismos, lo que dificulta la posibilidad de encontrar una estrategia experimental simple para evidenciarlo.

Resulta particularmente interesante un trabajo reciente que se focaliza sobre el análisis de las terminales sinápticas de las células parvalbuminérgicas (Sommeijer & Levelt, 2012). Como fue mencionado antes, estas células GABAérgicas son fundamentales en el control de los mecanismos de plasticidad dependiente de la experiencia. Los autores de este estudio identifican una proteína, la sinaptotagmina-2, que colocaliza con el transportador vesicular vGAT y se encuentra predominantemente en las células parvalbuminérgicas. Por lo que puede ser utilizada como marcador específico de los contactos sinápticos que estas células inhibitorias realizan. Como sugerido también por los autores de este trabajo, sería interesante estudiar la modulación de la sinaptotagmina-2 (marcador de las sinapsis parvalbuminérgicas) en los diferentes modelos de plasticidad cortical como posible correlato molecular de los niveles de plasticidad.

CONCLUSIONES

En la Figura 22 se muestra un esquema que resume los resultados obtenidos en nuestro y otros trabajos (citados a lo largo de la tesis) en cuanto a la modulación de los transportadores vGluT-1 y vGAT y del balance E/I durante el desarrollo del período crítico y en los modelos de restauración de la plasticidad en el adulto. Como se planteó previamente, vGluT-1 y vGAT aumentan de expresión en la corteza hasta aproximadamente P30 y P15 respectivamente, donde llegan a valores similares a los del adulto. El balance E/I, que determina la duración del período crítico, se modifica hasta P60 sugiriendo que hay otros factores que determinan esta modificación durante el desarrollo del período crítico. En la adultez, tanto el balance E/I como los niveles de expresión de vGluT-1 y vGAT permanecen constantes, y se mantienen bajos niveles de plasticidad.

Las estrategias que restauran la plasticidad en el adulto (tratamiento con fluoxetina y mantenimiento en ambiente enriquecido), modifican el balance E/I por medio de una reducción en el tono inhibitorio. En nuestro trabajo mostramos que la reducción de la inhibición ocurre por medio de una regulación negativa de los niveles de vGAT, mientras que los niveles de vGluT-1 permanecen constantes. Esta disminución de la inhibición modula el balance E/I hacia una mayor excitación, llevando al balance hacia valores que permiten los procesos de plasticidad.

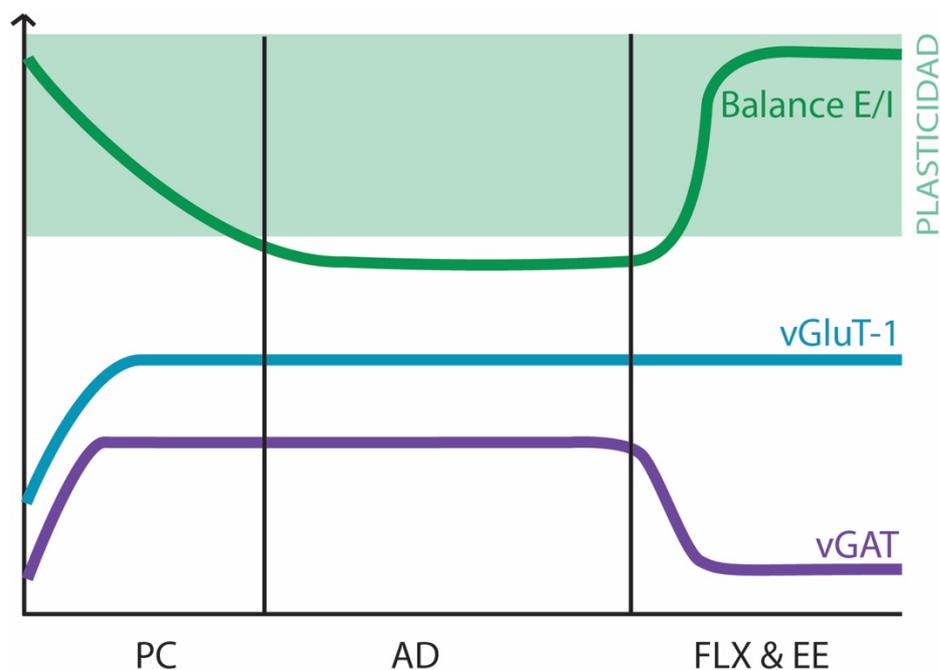


Figura 22. Modulación de los transportadores vGluT-1 y vGAT y del balance E/I durante el desarrollo y en los modelos de restauración de la plasticidad en el adulto. La línea verde corresponde al balance E/I, la línea azul al vGluT-1 y la violeta al vGAT. El recuadro verde indica el rango del balance E/I en el cual hay alta plasticidad. El balance E/I es modulado durante el desarrollo del período crítico, hasta alcanzar un valor que determina el cierre

del período crítico y la disminución de los niveles de plasticidad. Los transportadores vesiculares aumentan de nivel a medida que transcurre el período crítico llegando a valores similares a los del adulto en diferentes momentos (vGluT-1 alrededor de P30 y vGAT alrededor de P15). Los tratamientos que promueven la restauración de la plasticidad (FLX y EE) disminuyen los niveles de vGAT pero no modulan los niveles de vGluT-1, lo que modula el balance E/I hacia una mayor excitación y por lo tanto alcanza valores que permiten recuperar altos niveles de plasticidad.

En conclusión, en este trabajo sugerimos que la relación vGluT-1/vGAT puede representar un buen correlato molecular del balance E/I y de los niveles de plasticidad de la corteza visual en los modelos de restauración de la misma, pero no durante el período crítico.

BIBLIOGRAFÍA

- Aubrey, K.R., Rossi, F.M., Ruivo, R., Alboni, S., Bellenchi, G.C., Le Goff, A., Gasnier, B., & Supplisson, S. (2007) The transporters GlyT2 and VIAAT cooperate to determine the vesicular glycinergic phenotype. *J. Neurosci.*, **27**, 6273–6281.
- Bardin, J. (2012) Neurodevelopment: Unlocking the brain. *Nature*, **487**, 24–26.
- Baroncelli, L., Maffei, L., & Sale, A. (2011) New Perspectives in Amblyopia Therapy on Adults: A Critical Role for the Excitatory/Inhibitory Balance. *Front. Cell. Neurosci.*, **5**, 1–6.
- Baroncelli, L., Sale, A., Viegi, A., Maya-Vetencourt, J.F., 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.
- Bavelier, D., Levi, D.M., Li, R.W., Dan, Y., & Hensch, T.K. (2010) Removing brakes on adult brain plasticity: from molecular to behavioral interventions. *J. Neurosci.*, **30**, 14964–14971.
- Begenisic, T., Baroncelli, L., Sansevero, G., Milanese, M., Bonifacino, T., Bonanno, G., Cioni, G., Maffei, L., & Sale, A. (2014) Fluoxetine in adulthood normalizes GABA release and rescues hippocampal synaptic plasticity and spatial memory in a mouse model of Down Syndrome. *Neurobiol. Dis.*, **63**, 12–19.
- Begenisic, T., Spolidoro, M., Braschi, C., Baroncelli, L., Milanese, M., Pietra, G., Fabbri, M.E., Bonanno, G., Cioni, G., Maffei, L., & Sale, A. (2011) Environmental enrichment decreases GABAergic inhibition and improves cognitive abilities, synaptic plasticity, and visual functions in a mouse model of Down syndrome. *Front. Cell. Neurosci.*, **5**, 29.
- Berardi, N., Pizzorusso, T., & Maffei, L. (2000) Critical periods during sensory development. *Curr. Opin. Neurobiol.*, **10**, 138–145.
- Bernard, C. & Prochiantz, A. (2016) Otx2-PNN Interaction to Regulate Cortical Plasticity. *Neural Plast.*, **2016**.
- Beshara, S., Beston, B.R., Pinto, J.G., & Murphy, K.M. (2015) Effects of fluoxetine and visual experience on glutamatergic and GABAergic synaptic proteins in adult rat visual cortex. *eNeuro*, **2**.
- Castrén, E. & Hen, R. (2013) Neuronal plasticity and antidepressant actions. *Trends Neurosci.*, **36**, 259–267.
- Chaudhry, F. a., Reimer, R.J., Bellocchio, E.E., Danbolt, N.C., Osen, K.K., Edwards, R.H., & Storm-Mathisen, J. (1998) The vesicular GABA transporter, VGAT, localizes to synaptic vesicles in sets of glycinergic as well as GABAergic neurons. *J. Neurosci.*, **18**, 9733–9750.
- Chen, J.L., Lin, W.C., Cha, J.W., So, P.T., Kubota, Y., & Nedivi, E. (2011) Structural basis for the role of inhibition in facilitating adult brain plasticity. *Nat. Neurosci.*, **14**, 587–594.
- Chen, J.L. & Nedivi, E. (2013) Highly Specific Structural Plasticity of Inhibitory Circuits in the Adult Neocortex. *Neuroscientist*, **19**, 384–393.
- Ciucci, F., Putignano, E., Baroncelli, L., Landi, S., Berardi, N., & Maffei, L. (2007) Insulin-like growth factor 1 (IGF-1) mediates the effects of enriched environment (EE) on visual cortical development. *PLoS One*, **2**.
- Cobos, I., Calcagnotto, M.E., Vilaythong, A.J., Thwin, M.T., Noebels, J.L., Baraban, S.C., & Rubenstein, J.L.R. (2005) Mice lacking Dlx1 show subtype-specific loss of interneurons, reduced inhibition and epilepsy. *Nat. Neurosci.*, **8**, 1059–1068.
- Edwards, R.H. (2007) The Neurotransmitter Cycle and Quantal Size. *Neuron*, **55**, 835–858.
- Eichler, S.A. & Meier, J.C. (2008) E-I balance and human diseases - from molecules to networking. *Front. Mol. Neurosci.*, **1**, 2.
- Fagiolini, M. & Hensch, T.K. (2000) Inhibitory threshold for critical-period activation in primary visual cortex. *Nature*, **404**, 183–186.
- Fagiolini, M., Katagiri, H., Miyamoto, H., Mori, H., Grant, S.G.N., Mishina, M., & Hensch, T.K. (2003)

- Separable features of visual cortical plasticity revealed by N-methyl-D-aspartate receptor 2A signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **100**, 2854–2859.
- Feldman, D.E. (2000) Inhibition and plasticity. *Nat. Neurosci.*, **3**, 303–304.
- Galarreta, M. & Hestrin, S. (2002) Electrical and chemical synapses among parvalbumin fast-spiking GABAergic interneurons in adult mouse neocortex. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **99**, 12438–12443.
- Gogolla, N., LeBlanc, J.J., Quast, K.B., Südhof, T.C., Fagiolini, M., & Hensch, T.K. (2009) Common circuit defect of excitatory-inhibitory balance in mouse models of autism. *J. Neurodev. Disord.*, **1**, 172–181.
- Greifzu, F., Pielecka-Fortuna, J., Kalogeraki, E., Krempler, K., Favaro, P.D., Schlüter, O.M., & Löwel, S. (2014) Environmental enrichment extends ocular dominance plasticity into adulthood and protects from stroke-induced impairments of plasticity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **111**, 1150–1155.
- Hackett, T. a., Clause, A.R., Takahata, T., Hackett, N.J., & Polley, D.B. (2015) Differential maturation of vesicular glutamate and GABA transporter expression in the mouse auditory forebrain during the first weeks of hearing. *Brain Struct. Funct.*, .
- Hammer, Ø., Harper, D.A.T., & Ryan, P.D. (2001) PAST: Paleontological Statistics Software Package for Education and Data Analysis. *Palaeontol. Electron.*, **4(1)**, 1–9.
- Heimel, J.A., Levelt, C.N., & Van Versendaal, D. (2011) The role of GABAergic inhibition in ocular dominance plasticity. *Neural Plast.*, **2011**.
- Hensch, T.K. (2004) Critical period regulation. *Annu. Rev. Neurosci.*, **27**, 549–579.
- Hensch, T.K. & Fagiolini, M. (2005) Excitatory-inhibitory balance and critical period plasticity in developing visual cortex. *Prog. Brain Res.*, **147**, 115–124.
- Hensch, T.K., Fagiolini, M., Mataga, N., Stryker, M.P., Baekkeskov, S., & Kash, S.F. (1998) Local GABA Circuit Control of Experience-Dependent Plasticity in Developing Visual Cortex. *Science (80-)*, **285**, 1504–1508.
- Holmes, J.M. & Clarke, M.P. (2006) Amblyopia. *Lancet*, **367**, 1343–1351.
- Huang, Z.J., Kirkwood, A., Pizzorusso, T., Porciatti, V., Morales, B., Bear, M.F., Maffei, L., & Tonegawa, S. (1999) BDNF regulates the maturation of inhibition and the critical period of plasticity in mouse visual cortex. *Cell*, **98**, 739–755.
- Hubel, D.H. & Wiesel, T.N. (1963) Shape and arrangement of columns in cat's striate cortex. *J. Physiol.*, **165**, 559–568.
- Hubel, D.H. & Wiesel, T.N. (1970) The period of susceptibility to the physiological effects of unilateral eye closure in kittens. *J. Physiol.*, **206**, 419–436.
- Hubel, D.H. & Wiesel, T.N. (1998) Early exploration of the visual cortex. *Neuron*, **20**, 401–412.
- Kehrer, C. (2008) Altered excitatory-inhibitory balance in the NMDA-hypofunction model of schizophrenia. *Front. Mol. Neurosci.*, **1**.
- Kiorpes, L., Kiper, D.C., O'Keefe, L.P., Cavanaugh, J.R., & Movshon, J.A. (1998) Neuronal correlates of amblyopia in the visual cortex of macaque monkeys with experimental strabismus and anisometropia. *J. Neurosci.*, **18**, 6411–6424.
- Laumonier, F., Bonnet-Brilhault, F., Gomot, M., Blanc, R., David, A., Moizard, M.-P., Raynaud, M., Ronce, N., Lemonnier, E., Calvas, P., Laudier, B., Chelly, J., Fryns, J.-P., Ropers, H.-H., Hamel, B.C.J., Andres, C., Barthélémy, C., Moraine, C., & Briault, S. (2004) X-Linked Mental Retardation and Autism Are Associated with a Mutation in the NLGN4 Gene, a Member of the Neuroligin Family. *Am. J. Hum. Genet.*, **74**, 552–557.
- Levelt, C.N. & Hübener, M. (2012) Critical-period plasticity in the visual cortex. *Annu. Rev. Neurosci.*, **35**, 309–330.
- Lewis, D.A., Glantz, L.A., Pierri, J.N., & Sweet, R.A. (2003) Altered Cortical Glutamate Neurotransmission in Schizophrenia. *New York Acad. Sci.*, **26**.
- Liu, G. (2004) Local structural balance and functional interaction of excitatory and inhibitory synapses in hippocampal dendrites. *Nat. Neurosci.*, **7**, 373–379.

- Mainardi, M., Di Garbo, A., Caleo, M., Berardi, N., Sale, A., & Maffei, L. (2014) Environmental enrichment strengthens corticocortical interactions and reduces amyloid- β oligomers in aged mice. *Front. Aging Neurosci.*, **6**, 1–11.
- Mainardi, M., Landi, S., Gianfranceschi, L., Baldini, S., De Pasquale, R., Berardi, N., Maffei, L., & Caleo, M. (2010) Environmental enrichment potentiates thalamocortical transmission and plasticity in the adult rat visual cortex. *J. Neurosci. Res.*, **88**, 3048–3059.
- Maya-Vetencourt, J.F., Sale, A., Viegi, A., Baroncelli, L., Pasquale, R. De, O’Leary, O.F., Castrén, E., & Maffei, L. (2008) The Antidepressant Fluoxetine Restores Plasticity in the Adult Visual Cortex. *Science (80-.)*, **319**, 1490–1492.
- Maya-Vetencourt, J.F., Tiraboschi, E., Spolidoro, M., Castrén, E., & Maffei, L. (2011) Serotonin triggers a transient epigenetic mechanism that reinstates adult visual cortex plasticity in rats. *Eur. J. Neurosci.*, **33**, 49–57.
- McIntire, S.L., Reimer, R.J., Schuske, K., Edwards, R.H., & Jorgensen, E.M. (1997) Identification and characterization of the vesicular GABA transporter. *Nature*, **389**, 870–876.
- Minelli, A., Alonso-Nanclares, L., Edwards, R.H., Defelipe, J., & Conti, F. (2003a) Postnatal development of the vesicular GABA transporter in rat cerebral cortex. *Neuroscience*, **117**, 337–346.
- Minelli, A., Edwards, R.H., Manzoni, T., & Conti, F. (2003b) Postnatal development of the glutamate vesicular transporter VGLUT1 in rat cerebral cortex. *Dev. Brain Res.*, **140**, 309–314.
- Morales, B., Choi, S.-Y., & Kirkwood, A. (2002) Dark rearing alters the development of GABAergic transmission in visual cortex. *J. Neurosci.*, **22**, 8084–8090.
- Moutsimilli, L., Farley, S., Dumas, S., El Mestikawy, S., Giros, B., & Tzavara, E.T. (2005) Selective cortical VGLUT1 increase as a marker for antidepressant activity. *Neuropharmacology*, **49**, 890–900.
- Nakamura, K., Hioki, H., Fujiyama, F., & Kaneko, T. (2005) Postnatal changes of vesicular glutamate transporter (VGLUT1 and VGLUT2 immunoreactivities and their colocalization in the mouse forebrain. *J. Comp. Neurol.*, **492**, 263–288.
- Olsen, R.W. & Avoli, M. (1997) GABA and epileptogenesis. *Epilepsia*, **38**, 399–407.
- Olson, B.J.S.C. & Markwell, J. (2007) Assays for determination of protein concentration. *Curr. Protoc. Pharmacol.*, **Appendix 3**, 3A.
- Patrizi, A., Picard, N., Simon, A.J., Gunner, G., Centofante, E., Andrews, N.A., & Fagiolini, M. (2015) Chronic Administration of the N-Methyl-D-Aspartate Receptor Antagonist Ketamine Improves Rett Syndrome Phenotype. *Biol. Psychiatry*, 1–10.
- Rantamäki, T., Hendolin, P., Kankaanpää, A., Mijatovic, J., Piepponen, P., Domenici, E., Chao, M. V, Männistö, P.T., & Castrén, E. (2007) Pharmacologically diverse antidepressants rapidly activate brain-derived neurotrophic factor receptor TrkB and induce phospholipase-Cgamma signaling pathways in mouse brain. *Neuropsychopharmacology.*, **32**, 2152–2162.
- Rissman, R. a & Mobley, W.C. (2011) Implication for treatment: GABAA receptors in aging, Down syndrome and Alzheimer’s disease. *J. Neurochem.*, **117**, 613–622.
- Rossi, F.M. (2016) Analysis of fluoxetine-induced plasticity mechanisms as a strategy for understanding plasticity related neural disorders. *Neural Regen. Res.*, **11**, 547.
- Ruiz-Perera, L., Muniz, M., Vierci, G., Bornia, N., Baroncelli, L., Sale, A., & Rossi, F.M. (2015) Fluoxetine increases plasticity and modulates the proteomic profile in the adult mouse visual cortex. *Sci. Rep.*, **5**, 12517.
- Sale, A., Berardi, N., Spolidoro, M., Baroncelli, L., & Maffei, L. (2010) GABAergic inhibition in visual cortical plasticity. *Front. Cell. Neurosci.*, **4**, 10.
- Sale, A., Maya-Vetencourt, J.F., Medini, P., Cenni, M.C., 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., Begenisic, T., Mainardi, M., Milanese, M., Bonifacino, T., Bonanno, G., Sale, A., & Maffei, L. (2013) Fluoxetine treatment promotes functional recovery in a rat model of cervical spinal cord

- injury. *Sci. Rep.*, **3**, 2217.
- Sommeijer, J.P. & Levelt, C.N. (2012) Synaptotagmin-2 is a reliable marker for parvalbumin positive inhibitory boutons in the mouse visual cortex. *PLoS One*, **7**, 1–12.
- Stephany, C.-E., Chan, L.L.H., Parivash, S.N., Dorton, H.M., Piechowicz, M., Qiu, S., & McGee, A.W. (2014) Plasticity of Binocularity and Visual Acuity Are Differentially Limited by Nogo Receptor. *J. Neurosci.*, **34**, 11631–11640.
- Sugiyama, S., Di Nardo, A.A., Aizawa, S., Matsuo, I., Volovitch, M., Prochiantz, A., & Hensch, T.K. (2008) Experience-Dependent Transfer of Otx2 Homeoprotein into the Visual Cortex Activates Postnatal Plasticity. *Cell*, **134**, 508–520.
- Takesian, A.E. & Hensch, T.K. (2013) *Balancing Plasticity/stability across Brain Development*, 1st edn, Progress in Brain Research. Elsevier B.V.
- Tiraboschi, E., Guirado, R., Greco, D., Auvinen, P., Maya-Vetencourt, J.F., Maffei, L., & Castren, E. (2013) Gene expression patterns underlying the reinstatement of plasticity in the adult visual system. *Neural Plast.*, **2013**.
- Tropea, D., Van Wart, A., & Sur, M. (2009) Molecular mechanisms of experience-dependent plasticity in visual cortex. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.*, **364**, 341–355.
- van Praag, H., Kempermann, G., & Gage, F.H. (2000) Neural consequences of environmental enrichment. *Nat. Rev. Neurosci.*, **1**, 191–198.
- van Versendaal, D. & Levelt, C.N. (2016) Inhibitory interneurons in visual cortical plasticity. *Cell. Mol. Life Sci.*, 3677–3691.
- Vierci, G., Pannunzio, B., Bornia, N., & Rossi, F.M. (2016) H3 and H4 Lysine Acetylation Correlates with Developmental and Experimentally Induced Adult Experience-Dependent Plasticity in the Mouse Visual Cortex. *J. Exp. Neurosci.*, **10**, 49–64.
- Wiesel, T.N. (1982) The postnatal development of the visual cortex and the influence of environment. *Biosci. Rep.*, **2**, 351–377.
- Wong, D.T., Perry, K.W., & Bymaster, F.P. (2005) The discovery of fluoxetine hydrochloride (Prozac). *Nat. Rev. Drug Discov.*, **4**, 950–950.
- Zhang, Z., Jiao, Y.Y., & Sun, Q.Q. (2011) Developmental maturation of excitation and inhibition balance in principal neurons across four layers of somatosensory cortex. *Neuroscience*, **174**, 10–25.