



**ANÁLISIS DEL ROL DE CREB EN EL COLÍCULO
SUPERIOR EN TRES MODELOS DE PLASTICIDAD:
FISIOLÓGICA, INDUCIDA Y REACTIVADA**

**Pasantía de grado
Licenciatura en Ciencias Biológicas**

Autora: Gabriela Vierci
Orientador: Francesco M. Rossi
Laboratorio de Neurociencias
Febrero, 2012

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer en primer lugar a mi tutor, Francesco, por abrirme las puertas de su laboratorio, por su constante entusiasmo y paciencia, por estar siempre a disposición para enseñarnos y escucharnos. Fue el principal responsable para llevar adelante esta investigación.

A mis compañeras de laboratorio, Lu y Naty, por ayudarme y aconsejarme siempre que lo necesitaba.

Un especial agradecimiento a toda la gente de Biología Celular del piso 7, Cristina, Flavio, Andrea, Daniel, Maite, Gonzalo, por sus importantes aportes y conocimientos. Ellos son parte fundamental de este trabajo.

A toda la gente del piso 4, Andrés, Lety, Adriana, Adriana, Leo, Yuyo, Pelo, Musto, Rubén, Zorro, Memo, Fede, Helena, Nacho, Lucía, por bancarme siempre, por su constante buena onda y por ser un grupo humano increíble.

Al tribunal, que aceptaron amablemente corregir mi trabajo.

A mis amigos, que estuvieron conmigo y me apoyaron durante todos los años de mi carrera.

Particularmente a mi familia, porque siempre tuve, tengo y tendré su incentivo, su contención y su apoyo incondicional.

RESUMEN

La capacidad de los circuitos neuronales de modificar y reorganizar sus conexiones en respuesta a cambios en el entorno se conoce como plasticidad neuronal, y constituye la base de procesos vitales como el aprendizaje y la memoria. Esta capacidad es muy alta durante fases precoces de la vida postnatal (periodos críticos de plasticidad), pero disminuye progresivamente con el pasar del tiempo siendo casi ausente en fases adultas. Cambios de larga duración en los circuitos neuronales requieren de la expresión de genes y la síntesis de nuevas proteínas. Una vía nuclear que puede ser crítica en el control de la plasticidad neuronal en el cerebro de mamíferos es la vía de CREB (*cAMP response element-binding protein*), que es un factor de transcripción activado por fosforilación (PCREB). El sistema visual es un excelente modelo para estudiar los procesos plásticos; está demostrado que CREB tiene un importante papel en la determinación de la plasticidad en la corteza visual, así como en el refinamiento de las proyecciones retino-talámicas. Sin embargo, poco se sabe de su participación en el colículo superior (CS). El objetivo de este trabajo fue estudiar el rol de CREB en el colículo superior de ratones - la modulación de la expresión y activación de dicho factor - en tres modelos de plasticidad: plasticidad fisiológica en el desarrollo del CS, plasticidad inducida por una lesión en la retina y en un modelo en donde se reactiva la plasticidad mediante el tratamiento con Fluoxetina. Los resultados preliminares revelaron un aumento de la activación de CREB: 1) en el desarrollo del CS en correlación temporal con el periodo crítico de plasticidad de las proyecciones retino-coliculares; 2) en correlación con los procesos plásticos inducidos por la lesión; y 3) en correlación con la reactivación de la plasticidad por Fluoxetina. Estos resultados sugieren que CREB tiene un rol fundamental en los procesos de desarrollo y plasticidad también en el CS de ratones. Se espera que estos resultados puedan brindar información útil para seguir estudiando los procesos de plasticidad y así poder desarrollar nuevas estrategias para el tratamiento de patologías que afectan dichos procesos.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	5
1.1 Plasticidad neuronal.....	5
1.2 El sistema visual	5
1.3 Estudio de los procesos de plasticidad en el sistema visual	8
1.3.1 Rol de la visión en la plasticidad de la corteza visual	8
1.3.2 Reactivación de la plasticidad cortical en adultos	10
1.3.3 Rol de la actividad eléctrica retínica en la plasticidad del NGdl y CS	11
1.4 Mecanismos celulares y moleculares subyacentes a la plasticidad	13
1.4.1 CREB, <i>cAMP response element-binding protein</i>	14
2. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVO	16
3. MATERIALES Y MÉTODOS	18
3.1 Modelo animal.....	18
3.2 Extracción proteica.....	19
3.3 Medición de la concentración proteica.....	19
3.4 <i>Western Blot</i>	20
3.4.1 Electroforesis de proteínas	20
3.4.2 Electrotransferencia	22
3.4.3 Bloqueo e incubación de la membrana con anticuerpos.....	24
3.4.4 Revelación de la señal	25
3.5 Cuantificación.....	25
3.6 Análisis estadístico	26
4. RESULTADOS	27
4.1 Modelo de plasticidad fisiológica.....	27
4.2 Modelo de plasticidad inducida por lesión	29

4.3	Modelo de reactivación de plasticidad en adultos	31
5.	DISCUSIÓN.....	33
5.1	Modelo de plasticidad fisiológica.....	33
5.2	Modelo de plasticidad inducida por lesión	34
5.3	Modelo de reactivación de la plasticidad en adultos	34
5.4	Conclusiones.....	36
	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	37

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Plasticidad neuronal

El Sistema Nervioso (SN) se caracteriza por tener la capacidad de modificar sus propiedades estructurales y funcionales en el tiempo, con el fin de adaptarse de forma correcta a cambios en su entorno. Esta capacidad, denominada plasticidad neuronal, es fundamental en varias fases de la vida. Por ejemplo, durante el desarrollo, para la correcta maduración y formación de las complejas redes neuronales; en fases adultas, para procesos cognitivos como el aprendizaje y memoria; y en situaciones patológicas, para la re-inervación de tejidos lesionados y la recuperación de funciones afectadas (Berardi et al., 2003; Tropea et al., 2009).

El potencial plástico de los circuitos neuronales, es decir la capacidad de modificarse y adaptarse, persiste durante toda la vida de un organismo pero es particularmente elevado en algunos periodos especiales, llamados periodos críticos (PC) de plasticidad. Dichos periodos han sido identificados en varios sistemas neuronales y en diversas especies, y todos comparten algunas características básicas (Hensch, 2005). Entre los más estudiados se encuentran los PC que dependen de algún tipo de experiencia, principalmente los dependientes de experiencias sensoriales. En estos casos, el periodo crítico se define como una ventana temporal durante la cual el efecto de una determinada experiencia sensorial sobre la formación de un circuito neuronal es particularmente fuerte. Una vez cerrada dicha ventana temporal, la posibilidad de que la experiencia pueda modificar el circuito desaparece o disminuye drásticamente. Es decir, fuera del periodo crítico, el circuito no es más susceptible a modificaciones inducidas por cambios en su entorno. Además, el hecho de que el correcto desarrollo de algunos circuitos neuronales dependa de experiencias sensoriales, implica que la no exposición a dichas experiencias durante el PC de plasticidad, resulte en dramáticas alteraciones estructurales y funcionales que en muchos casos son irreversibles.

1.2 El sistema visual

Los periodos críticos de plasticidad dependientes de las experiencias han sido estudiados particularmente en el sistema visual, siendo éste un excelente modelo para el estudio de procesos plásticos y de desarrollo en el Sistema Nervioso Central (SNC).

Está caracterizado por poseer patrones anatómicos y funcionales bien definidos, que pueden ser manipulados experimentalmente de una manera relativamente fácil.

El sistema visual es el responsable de procesar la información que determina la percepción visual. La visión es procesada a través de tres estaciones principales jerárquicamente organizadas: la retina, responsable de la transducción de la información luminosa en señales eléctricas; el núcleo geniculado dorso-lateral (NGdl), núcleo talámico con funciones principales de relé; y la corteza visual primaria (CV1, o corteza estriada).

Los axones de las células de proyección de la retina, células ganglionares (CG), al salir de la misma se unen para formar los nervios ópticos. A nivel de una estructura mediana, el quiasma óptico, parte de las fibras del nervio óptico cruzan al lado opuesto al de procedencia (contralateral) y las restantes permanecen en el mismo lado (ipsilateral). Éstas provienen de la parte más medial de la retina (retina nasal), mientras que las que permanecen del mismo lado provienen de la parte lateral (retina temporal). En roedores, las fibras que cruzan representan aproximadamente el 95% de las fibras totales

Luego del quiasma óptico, las fibras nasales de un ojo se juntan a las fibras temporales del otro ojo para formar los tractos ópticos que, de este modo, llevan cada uno información proveniente de los dos ojos. Cada tracto óptico inerva varias estaciones, una de las cuales es el NGdl. En esta estructura, las fibras nasales terminan en territorios distintos de las fibras temporales, de modo que la información procedente de los dos ojos es procesada en modo separado y paralelo en este núcleo.

Esta separación de la información se mantiene en las proyecciones del tálamo a la corteza visual primaria. Las neuronas del NGdl envían proyecciones a la CV1 que terminan principalmente en la capa IV. Aquí, los axones que llevan información procedente de un ojo terminan en áreas distintas de los que llevan información del otro ojo, formando en la corteza una serie de bandas alternadas específicas para cada ojo, conocidas como columnas de dominancia ocular.

Otro núcleo que recibe aferencias de la retina, pero que no está directamente implicado en el procesamiento de la visión, es el colículo superior (CS). Este núcleo mesencefálico recibe proyecciones de varias áreas cerebrales, siendo responsable de la integración de estímulos visuales, auditivos y somato-sensoriales del entorno, auxiliando en la orientación de los ojos y de la cabeza hacia el origen de tales estímulos. Asimismo, en esta estructura, los terminales de las fibras procedentes de los dos ojos

están distribuidos de distinto modo: los axones provenientes del ojo contralateral se encuentran distribuidos de manera difusa, mientras que los axones provenientes del ojo ipsilateral presentan una distribución en forma de pequeños puntos que varía a lo largo del eje rostro-caudal (Figura 1).

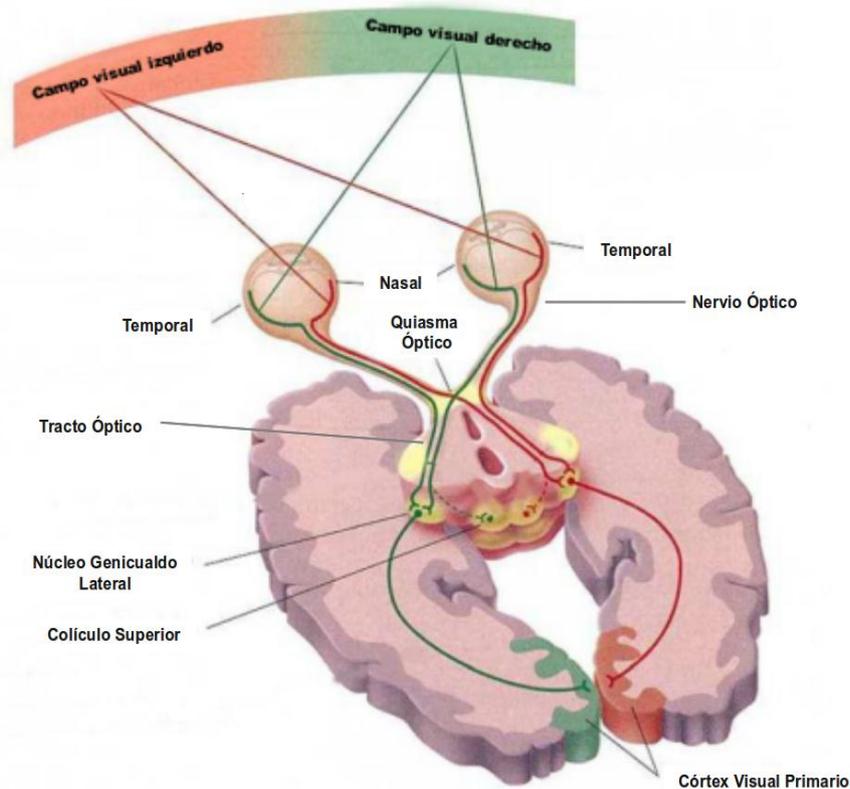


Figura 1: Representación esquemática de las vías visuales centrales. Los axones de las CG de cada retina se unen para formar los nervios ópticos. A nivel del quiasma óptico, las fibras del nervio óptico provenientes de cada retina nasal cruzan al lado opuesto al de procedencia (contralateral), mientras aquéllas que provienen de cada retina temporal permanecen del mismo lado (ipsilateral). Luego, las fibras nasales de un ojo y las fibras temporales del otro, forman los tractos ópticos que van a inervar al NGdl. A su vez, las neuronas de proyección del NGdl van a enviar sus axones a la CV1. Por otro lado, algunas células de la retina envían sus axones a otro núcleo localizado en el mesencefalo, el colículo superior (Modificado de <http://www.iperito.com/category/error-pericial>).

Como en otros sistemas sensoriales, en el sistema visual algunos parámetros fundamentales para la visión son procesados en vías paralelas. El ejemplo más característico, mencionado anteriormente, está representado por la distribución de las proyecciones provenientes de los dos ojos en áreas separadas en los territorios blancos (Figura 2).

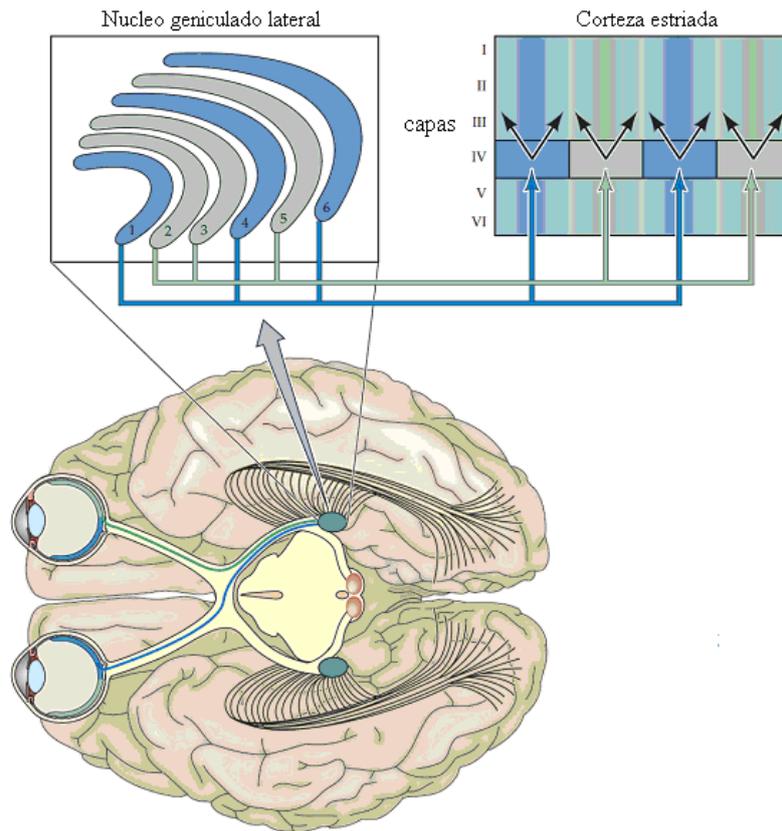


Figura 2: Territorios ojo-específicos en el sistema visual. Cada NGdl está constituido por capas que reciben proyecciones del ojo ipsilateral, alternadas por capas que reciben proyecciones del ojo contralateral. Esta distribución se mantiene en las proyecciones del tálamo a la CV1, en donde los axones provenientes del NGdl terminan en una serie de bandas alternadas específicas para cada ojo, llamadas columnas de dominancia ocular (Modificado de Purves et al., 2004).

1.3 Estudio de los procesos de plasticidad en el sistema visual

1.3.1 Rol de la visión en la plasticidad de la corteza visual

La distribución de las proyecciones neuronales en territorios ojo-específicos se encuentra completamente desarrollada cuando el sistema llega a su maduración completa. En fases más tempranas del desarrollo, las proyecciones axonales se encuentran distribuidas en modo difuso y compartiendo territorios comunes. Posteriormente, las fibras correspondientes a cada ojo se restringen a capas específicas a través de un proceso de segregación que incluye selección y retracción de proyecciones. Varios experimentos han demostrado que el proceso de segregación de las conexiones neuronales implica una competencia entre las proyecciones de los dos ojos por la conquista de un territorio común y que este proceso depende fuertemente de la actividad eléctrica. Trabajos pioneros comenzados en los años sesenta (Hubel and Wiesel, 1965; Hubel and Wiesel, 1998; Wiesel and Hubel, 1963a; Wiesel and Hubel, 1963b)

demonstraron que la correcta maduración de la corteza visual depende de la actividad eléctrica inducida por la experiencia visual. Simplemente bloqueando de modo temporario la visión en un ojo (privación monocular, PM) durante el desarrollo, se determinan dramáticas alteraciones en la organización anatómica y funcional, principalmente en la corteza contralateral al ojo cerrado, dado que cada corteza recibe aferencias mayoritariamente del ojo contralateral.

Como consecuencia de este tipo de manipulación, las proyecciones del ojo abierto “ganan” la competencia: las columnas de dominancia ocular de este ojo se expanden, mientras que las columnas del ojo privado de visión se reducen (Figura 3).

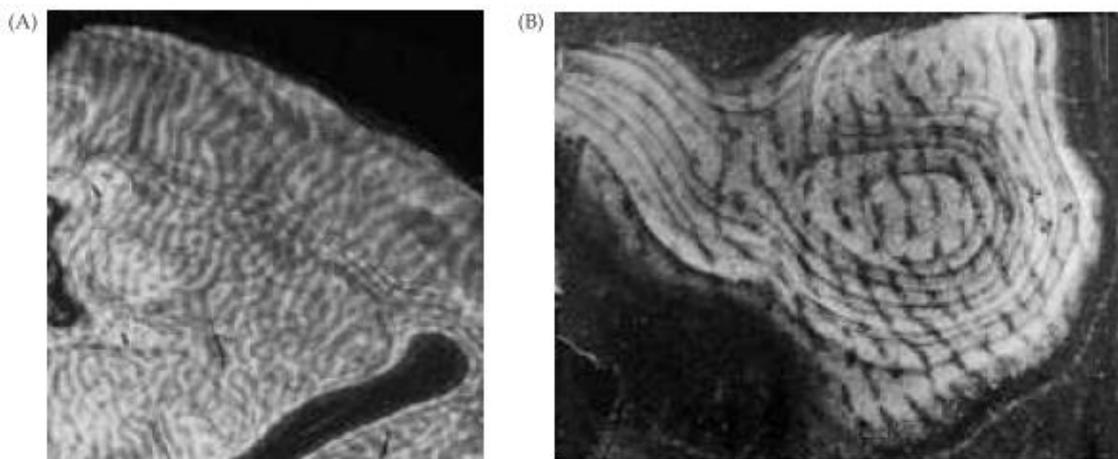


Figura 3: Alteraciones en la organización anatómica de la corteza visual por privación monocular. Cortes tangenciales a nivel de la capa IV de la corteza visual de mono mostrando las columnas de dominancia ocular (evidenciadas por trazado anterogrado intraocular con un marcador radioactivo). En A, corteza visual de control en donde las columnas de dominancia ocular se ven como rayas alternas aproximadamente del mismo tamaño. En B, corteza visual de mono con PM en donde se observa una expansión de las columnas de dominancia ocular del ojo abierto (en blanco) y una reducción de las columnas correspondientes al ojo privado de visión (en negro) (Modificado de Purves et al., 2004).

Desde el punto de vista fisiológico, se ha observado que disminuye drásticamente el número de células corticales conectadas funcionalmente con el ojo privado de visión, mientras que aumenta el número de células que responden al ojo abierto (Figura 4 A y B).

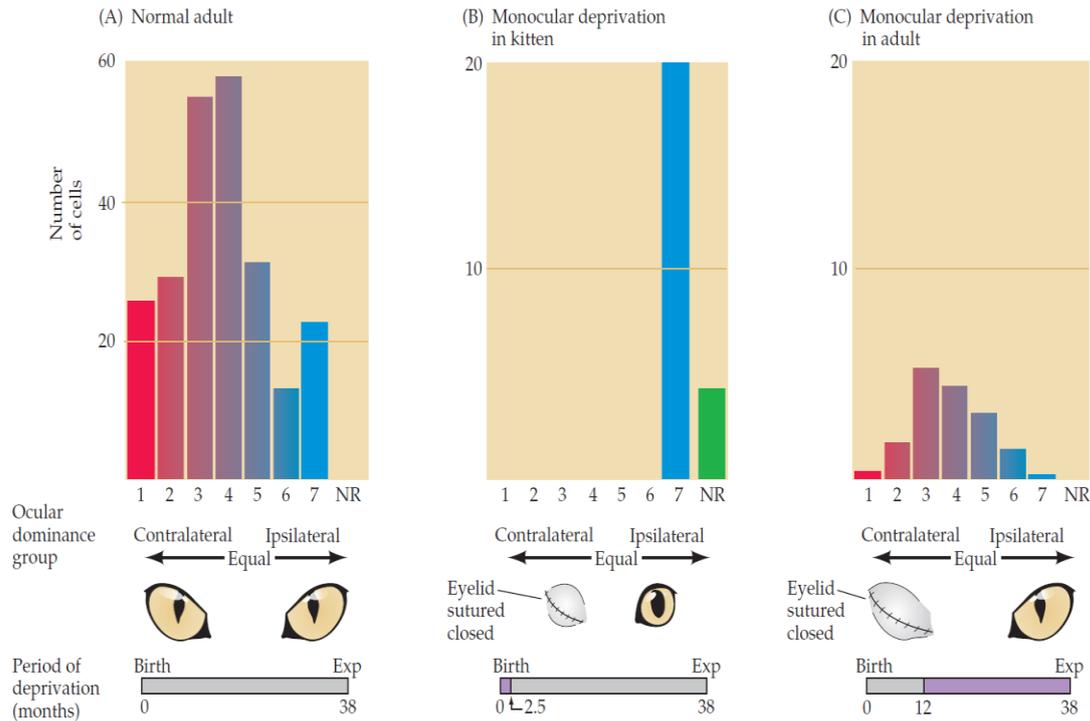


Figure 4: Alteraciones en la organización funcional de la corteza visual por privación monocular. Efectos de la PM en la distribución de las clases de dominancia ocular de las neuronas corticales. Células de la clase 1 son activadas exclusivamente por el ojo contralateral; células de la clase 7 son activadas exclusivamente por el ojo ipsilateral; mientras que células de la clase 2-6 son activadas por los dos ojos. A) Distribución en animales adultos normales (controles). B) Distribución en animales adultos que fueron sometidos a PM durante el PC. C) Distribución en animales adultos que fueron sometidos a PM fuera del PC (Modificado de Purves et al., 2004).

Los mismos investigadores observaron que la PM determina estos efectos exclusivamente si se efectúa durante una limitada ventana temporal en el desarrollo postnatal, mientras que si se efectúa más tardíamente los efectos son limitados o ausentes (Figura 4 C). Estas observaciones demostraron la existencia de un periodo crítico de plasticidad durante el cual la corteza visual es particularmente sensible a modificaciones en el entorno.

A nivel comportamental la PM determina ambliopía, una condición caracterizada por una fuerte reducción en la percepción de profundidad y una disminución en la agudeza visual.

1.3.2 Reactivación de la plasticidad cortical en adultos

Los efectos de la privación sensorial efectuada durante los periodos críticos de plasticidad son duraderos en el tiempo y prácticamente irreversibles. Esto tiene implicaciones clínicas y sociales extremadamente profundas. Una experiencia

“negativa” durante el periodo crítico de formación de un sistema, puede determinar consecuencias irreparables sobre la función cerebral si no se actúa cuando el sistema es todavía plástico. Un ejemplo en el sistema visual consiste en varios desórdenes que ocurren en la niñez, como el estrabismo y la anisometropía, que si no son tratados a tiempo determinan una ambliopía permanente. Por esta razón muchos investigadores están estudiando los mecanismos que determinan el potencial de plasticidad cerebral y los factores que limitan los periodos críticos a determinadas ventanas temporales. Esta información podría ser útil para identificar estrategias que permitan modular el potencial de plasticidad. De esta manera, se podría reactivar la plasticidad en adultos, aunque el periodo crítico haya cerrado, y, eventualmente, permitir la recuperación de alguna función afectada durante el desarrollo o tratar alguna patología.

De manera muy prometedora, estudios recientes en el sistema visual de animales experimentales, han identificado algunas estrategias para reactivar la plasticidad en la corteza visual adulta y también eliminar la ambliopía inducida por PM efectuada en fases tempranas del desarrollo. Una de las más interesantes es el tratamiento con Fluoxetina, un conocido antidepresivo, que determina un fuerte aumento de los niveles cerebrales de un neuromodulador, la serotonina (Maya Vetencourt et al., 2008). Estos investigadores han observado que la administración de Fluoxetina en animales adultos reactiva la plasticidad cortical: no obstante el PC haya terminado, los animales tratados con Fluoxetina son susceptibles a los efectos de la PM. Además, animales ambliopes por haber sufrido PM durante el desarrollo, luego del tratamiento con Fluoxetina en fases adultas, recuperan completamente las funciones visuales.

1.3.3 Rol de la actividad eléctrica retínica en la plasticidad del NGdl y CS

Otro modelo clásico para el estudio de los procesos de plasticidad en el sistema visual está representado por el desarrollo de las proyecciones retínicas al NGdl y al CS. Inicialmente, en estos dos núcleos las aferencias retínicas están mezcladas, pero luego de un proceso de segregación, se forman territorios de inervación distintos en el CS y territorio ojo específico en el NGdl. Este proceso de segregación depende de la actividad eléctrica que ocurre en fases muy precoces del desarrollo (primeras dos semanas de vida postnatal), antes de la apertura de los ojos (que ocurre a P15; P, días de vida postnatal), y cuando la retina todavía está madurando. Esta forma de actividad eléctrica no es inducida como en el caso de la visión, pero es una forma de actividad eléctrica espontánea. Las células retínicas (principalmente células ganglionares y

amacrinas) presentan una descarga eléctrica de modo espontáneo que se transmite a lo largo de la retina en forma de onda. Por esta razón, dicha actividad es definida como onda de actividad eléctrica espontánea retínica y ha sido observada en varias especies en concomitancia con el proceso de segregación de las proyecciones retínicas. Se observó que, bloqueando farmacológicamente o genéticamente estas ondas, se previene el proceso de segregación de las proyecciones axonales y la formación de los territorios específicos de cada ojo en el NGdl y en el CS (Kandler and Katz, 1998; Penn et al., 1998; Rossi et al., 2001; Feller, 2002). El bloqueo determina dichos efectos exclusivamente si se efectúa durante el PC de plasticidad de las proyecciones retínicas, pero no ocurre si se realiza fuera de éste.

Otra serie de experimentos interesantes son aquéllos en los cuales se induce una reorganización plástica de las proyecciones retínicas al CS efectuando una lesión en la retina. La lesión induce la muerte celular de algunas células ganglionares cuyo territorio de inervación en el CS contralateral desaparece. Si la lesión es efectuada durante el PC de plasticidad entre las dos primeras semanas de vida postnatal, las aferencias al mismo núcleo provenientes del ojo ipsilateral no lesionado reorganizan su estructura, expanden su territorio de inervación y ocupan el lugar ocupado inicialmente por las fibras lesionadas. En contraste con esta rápida plasticidad observada en neonatos, la lesión en la retina de animales jóvenes, induce solo sutiles cambios plásticos, que siguen un curso lento (Bastos et al., 1999; Serfaty et al., 2005).

De manera similar a lo que ocurre en la corteza visual, se observa que en este núcleo también el tratamiento con Fluoxetina puede afectar los procesos plásticos (Bastos et al., 1999). Este tratamiento potencia la poca plasticidad inducida por la lesión en adultos, en particular las proyecciones retínicas no lesionadas se reorganizan y expanden su territorio de inervación (Figura 5).

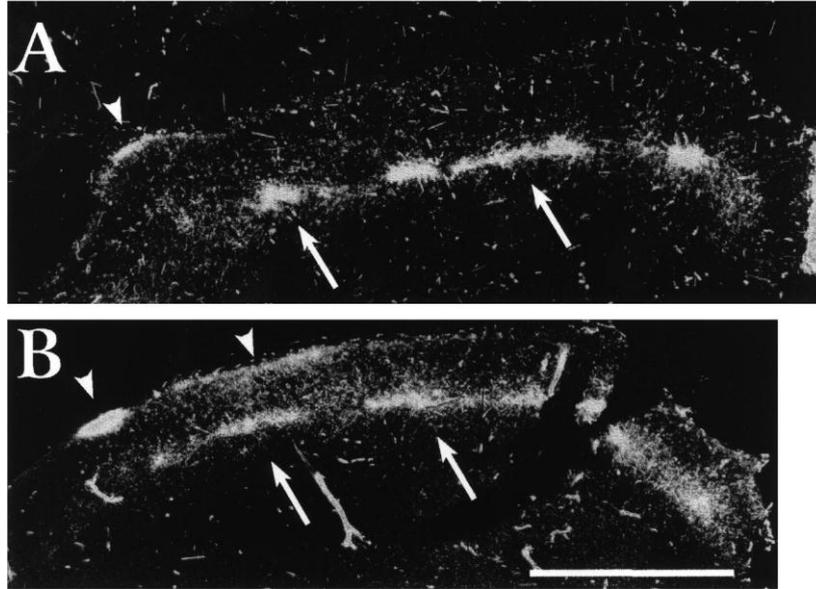


Figura 5: Reactivación de la plasticidad por Fluoxetina en el colículo superior. Secciones coronales de CS de animales que sufrieron la lesión retínica fuera del PC. En A, animales controles en donde se ve una pequeña reorganización de las proyecciones ipsilaterales post-lesión (evidenciadas por trazado anterogrado, en blanco). En B, animales tratados con Fluoxetina en donde la reorganización de las proyecciones ipsilaterales post-lesión es más acentuada. (Modificada de Bastos et al., 1999).

1.4 Mecanismos celulares y moleculares subyacentes a la plasticidad

Los mecanismos celulares y moleculares que determinan los procesos de plasticidad del cerebro de mamíferos y que regulan la duración de los periodos críticos no están bien caracterizados (Berardi et al., 2003). En el sistema visual, la hipótesis actual plantea que los periodos críticos de plasticidad son regulados fundamentalmente por dos factores: factores “funcionales”, en los cuales la relación entre el nivel de desarrollo del tono excitatorio y del tono inhibitorio en la corteza jugaría un rol fundamental en determinar la apertura y el cierre del periodo crítico; y factores “estructurales”, por ejemplo la matriz extracelular, cuyo grado de fluidez/rigidez permitiría o no a las proyecciones axonales modificar su distribución, influyendo así sobre el potencial de reorganización plástica de las conexiones sinápticas.

Considerando que los mecanismos de plasticidad sináptica dependen de modificaciones duraderas en los circuitos neuronales, necesariamente requieren cambios en la expresión de genes y síntesis de nuevas proteínas. En los últimos años varios grupos de investigación se han dedicado a la identificación de programas de expresión génica potencialmente necesarios para la plasticidad en la corteza visual de varias especies. Se ha demostrado que mientras algunos grupos de genes se expresan durante toda la vida del animal, otros son específicos del periodo crítico y otros se expresan

únicamente en las fases adultas. La hipótesis actual plantea que dicha expresión diferencial determina el potencial de plasticidad en función del tiempo y explica la diferencia entre la alta capacidad plástica característica del PC y la disminuida plasticidad del adulto (Majdan and Shatz, 2006; Tropea et al., 2006).

1.4.1 CREB, *cAMP response element-binding protein*

Un factor que ha demostrado tener un rol fundamental en mediar la expresión génica implicada en procesos de plasticidad en varios sistemas, es la proteína de unión al elemento de respuesta a AMPc (*cAMP response element-binding protein*, CREB). CREB es un factor de transcripción de 43kDa localizado en el núcleo de las células que abunda en el sistema nervioso. Se activa cuando se produce la fosforilación en un residuo de serina específico, la serina 133, dimerizándose, y provocando la asociación de la forma dimérica de CREB a secuencias específicas del ADN llamadas elemento de respuesta a AMPc (*cAMP response element*, CRE), configurando la proteína de unión a CREB (*CREB binding protein*, CBP), que lo coactiva. La forma activada de CREB (fosfo-CREB o PCREB, de también 43kDa) permite modular la transcripción génica de determinados genes. Varias vías de señalización son responsables de la activación de CREB. En general, una señal extracelular activa un receptor de membrana que determina la modulación de la cantidad de AMPc o del Ca^{2+} intracelular. Diversas quinasas dependientes de estos segundos mensajeros se activan, se desplazan hacia el interior del núcleo celular donde pueden inducir la fosforilación y por lo tanto su activación.

Distintos estudios han demostrado el rol fundamental de CREB en procesos de consolidación de la plasticidad, de memoria, en el aprendizaje y en la sensibilización conductual (Bourtchuladze et al., 1994). En el sistema visual también se ha observado que la expresión génica mediada por CREB tiene un importante papel en la determinación de la plasticidad de la dominancia ocular (Pham et al., 1999), así como en el refinamiento de las proyecciones retino-talámicas (Pham et al., 2001). Inicialmente se ha observado que la expresión de CREB y la expresión de los genes controlados por CREB aumentan en correlación con los periodos críticos de plasticidad en la CV1 y en el NGdl. Basado en estas observaciones se han desarrollado metodologías para modificar experimentalmente el nivel de expresión de CREB y efectuar *test* de plasticidad. En la corteza visual, la reducción durante el desarrollo de la expresión de CREB (obtenida utilizando un dominante negativo), bloquea la plasticidad. Por otro

lado, la activación persistente de CREB en la corteza visual de animales adultos (mediante expresión constitutiva) reactiva los procesos de plasticidad, y estos se vuelven sensibles a la PM (Pham et al., 2004). En el sistema retino-talámico se ha observado que, eliminando parcialmente la expresión de CREB (mediante transgénesis), se pierde el proceso de segregación de las proyecciones: las ipsilaterales se mantienen distribuidas de forma difusa superponiéndose con las proyecciones contralaterales (Pham et al., 2001).

2. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVO

El colículo superior es un excelente modelo experimental para el estudio de los procesos de desarrollo y de plasticidad en el sistema nervioso central, en particular en roedores, donde representa el principal blanco de las conexiones retínicas. Poco se sabe sobre los mecanismos moleculares que regulan los procesos plásticos en este núcleo.

Para contribuir al avance del conocimiento en esta área específica, el presente proyecto se propone caracterizar las modificaciones del patrón de expresión y de activación del factor de transcripción CREB, en distintos modelos experimentales de plasticidad en el CS de ratones, en particular:

- a) modelo de plasticidad fisiológica;
- b) modelo de plasticidad inducida por lesión;
- c) modelo de reactivación de plasticidad en adultos.

a) En el primer modelo se estudiará la expresión y la activación de CREB a varias edades postnatales (de P0 a P45), focalizando la atención sobre el periodo de segregación de las proyecciones retino-coliculares (primeras dos semanas de vida postnatal). Si CREB está implicado en el proceso de segregación, su expresión y activación tendría que modularse en correlación temporal con este periodo. Resultados preliminares han sido previamente obtenidos por otros miembros del equipo de investigación (Olivera, estudiante de Maestría en Neurociencias, UFSC, Brasil orientada por F.M. Rossi). En este trabajo se confirmarán algunos puntos experimentales para aumentar la validez de los mismos.

b) En el segundo modelo se utilizará una aproximación clásica de plasticidad inducida por lesión. Es conocido que una lesión en la retina determina una reorganización (plasticidad) de las proyecciones ipsilaterales del ojo no lesionado al núcleo contralateral del ojo lesionado, solo si es efectuada durante el periodo crítico, pero no más tardíamente. Esperamos encontrar una modulación de CREB solo en animales lesionados durante el periodo crítico pero no en animales lesionados fuera del mismo.

c) En el tercer modelo se utilizarán animales tratados con Fluoxetina fuera del periodo crítico. Como se mencionó anteriormente, es conocido que la Fluoxetina determina la reactivación de la plasticidad en adultos en la corteza visual y también en el colículo

superior. Se espera observar un aumento de la activación de CREB en animales tratados pero no en animales de control.

La expresión y la activación de CREB serán analizadas utilizando la técnica de *Western Blot*, con anticuerpos específicos que reconocen exclusivamente la forma fosforilada (PCREB) y anticuerpos que reconocen la forma total de CREB de modo independiente de la fosforilación (TCREB). El cálculo de la relación entre las señales obtenidas con los dos anticuerpos en la misma muestra experimental (PCREB/TCREB) es un índice representativo del grado de activación de CREB.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Modelo animal

Como modelo de estudio se utilizaron ratones de la cepa C57B6 provenientes del bioterio de la Unidad de Animales Transgénicos y de Experimentación (UATE) del Institut Pasteur de Montevideo.

Para el estudio de CREB en el modelo de plasticidad fisiológica, se utilizaron muestras de CS obtenidas de ratones a P0, P4, P9, P15, P30, P45.

Para el estudio de CREB en el modelo de lesión se utilizaron dos grupos de animales: animales neonatos operados a P2 y sacrificados a P9; y animales jóvenes operados a P21 y sacrificados a P28. El protocolo para la operación ha sido aprobado por la Comisión de Ética en el Uso de Animales (CEUA) del Institut Pasteur de Montevideo. Los animales neonatos fueron anestesiados por hipotermia, mientras que los jóvenes con ketamina 1,5%/xilacina 0,05% en PBS (150µl/g peso corporal). Se utilizó anestésico local (lidocaína) junto a antihemorrágicos (vasoconstrictores) aplicados al ojo antes y después de la operación; el globo ocular se expuso por retracción de los párpados; el nervio óptico se seccionó con tijeras finas; se aplicó gelatina absorbible o algodón embebido en anestésico puesto en la órbita ocular para facilitar la cicatrización; y luego se suturó con aguja e hilo de poliéster para cirugía cardiovascular (animales jóvenes). De ser necesario se aplicaron anti-inflamatorios, anti-doloríficos y antibióticos locales y/o sistémicos durante los 7 días post-operatorios. Para este modelo, se disecaron separadamente el CS derecho e izquierdo.

Para el estudio de CREB en el modelo con animales tratados con Fluoxetina se utilizó un protocolo aprobado por la CEUA del Institut Pasteur de Montevideo y por la Comisión Honoraria de Experimentación Animal (CHEA). El tratamiento consiste en administrar en el agua del bebedero una dosis de Fluoxetina de 20 mg/Kg/día que teóricamente alcanza niveles plasmáticos de la droga en el rango terapéutico en humanos tratados con el mismo fármaco (Rantamaki et al., 2007). El tratamiento duró semanas (de P70 a P98) y el bebedero que contiene Fluoxetina fue sustituido con uno fresco cada 4 días.

Los animales fueron sacrificados por dislocación cervical y las estructuras de interés fueron disecadas en frío con la ayuda de una lupa de microscopía utilizando pinzas de punta fina. Dichas estructuras (muestras) fueron guardadas a -70°C para su

posterior análisis. La manipulación de los animales fue realizada por el Dr. Francesco M. Rossi (acreditación CHEA B y C2).

3.2 Extracción proteica

Para la extracción proteica se realizó una homogeneización mecánica en hielo poniendo la muestra en 100-150µl buffer de lisis (50mM Tris, 1mM EDTA, 100mM NaF, 0,1mM PMSF, 2mM Na₃VO₄, 1% Tritón X-100, 10% Glicerol), macerándola mecánicamente con el uso de un pistilo. Tras esto, la muestra homogeneizada fue incubada por 30 minutos en hielo y centrifugada a 13.000 g, 4°C por una hora. Finalmente se recuperó el sobrenadante y se separó una pequeña alícuota para realizar la medición de la concentración proteica. Al resto se le agregó buffer de carga 4X (2% SDS, 0,375M Tris, 10% Glicerol, 5% beta-mercaptoetanol, Blue Bromophenol) en una relación 1:3 de forma que la concentración final del buffer sea 1X, para su posterior separación de proteínas mediante electroforesis. Ambas alícuotas se guardaron a -20°C hasta el momento de su utilización.

3.3 Medición de la concentración proteica

La cuantificación de la concentración proteica se realizó por el método de Bradford con una microplaca de 96 pocillos. Este método se basa en la unión del colorante Azul Brillante de Coomassie (*Coomassie Brilliant Blue*) G-250 a determinados residuos proteicos. El colorante unido a las proteínas determina una absorbancia máxima de 595nm, mientras que en solución, ésta es de 470nm.

En todos los pocillos que contenían 1µl de muestra con las proteínas a cuantificar (se sembró tres pocillos por muestra para luego promediar los resultados), se le agregó 139µl H₂O + 20µl de NaOH 1M + 40µl del reactivo de Bradford 5X. Se dejó reposando la microplaca 5 minutos a temperatura ambiente y luego se realizó la lectura con un espectrofotómetro a un lambda de 595nm. Las concentraciones de las muestras fueron obtenidas a través de la extrapolación de una curva estándar utilizando albúmina de suero bovino (BSA).

3.4 Western Blot

La técnica de *Western Blot* o *ImmunoBlotting* (debido a que se utilizan anticuerpos para detectar el antígeno o los antígenos específicos de interés), es una técnica analítica usada para detectar proteínas específicas en una muestra determinada. La especificidad de la unión antígeno-anticuerpo permite la detección de una única proteína dentro de una mezcla compleja de otras proteínas y permite obtener datos cualitativos y semi-cuantitativos sobre la misma.

El término *Blotting* hace referencia a la transferencia de macromoléculas biológicas desde un gel hasta una membrana y su posterior detección en la superficie de la misma. Este proceso es necesario ya que todas estas macromoléculas están embebidas dentro de la matriz que forma el gel, lo que dificulta su detección dentro del mismo, mientras que en la membrana, se encuentran accesibles al estar adheridas sobre la superficie de la misma.

Mediante la electroforesis en gel se separan las proteínas de acuerdo al criterio que se desee (peso molecular, estructura nativa, etc.). Luego son transferidas a una membrana adsorbente (típicamente de nitrocelulosa o polifluoruro de vinilideno, PVDF, que se caracterizan por su capacidad de unir proteínas de forma inespecífica), para poder buscar la proteína de interés con anticuerpos específicos contra ella. Esta transferencia puede realizarse por difusión, por vacío, o por la acción de un campo eléctrico (electrotransferencia). Posteriormente, se bloquea la membrana para evitar la unión inespecífica a su superficie de los anticuerpos que se van a utilizar para la detección de la proteína de interés. Finalmente se detecta la unión antígeno-anticuerpo por actividad enzimática, fluorescencia o radioactividad, así como por otras técnicas. De esta forma se puede estudiar la presencia de la proteína en el extracto y analizarla de acuerdo a los objetivos del estudio.

3.4.1 Electroforesis de proteínas

Las proteínas fueron separadas en un gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE), utilizando un gel de corrida (*Running gel*) de 10% (10% acrilamida/bis-acrilamida, 0,375M Tris, 0,10% SDS, 0,05% TEMED, 0,10% APS), y un gel de concentración (*Stacking gel*) de 4% (4% acrilamida/bis-acrilamida, 0,125M Tris, 0,10% SDS, 0,05% TEMED, 0,075% APS) (Figura 6).

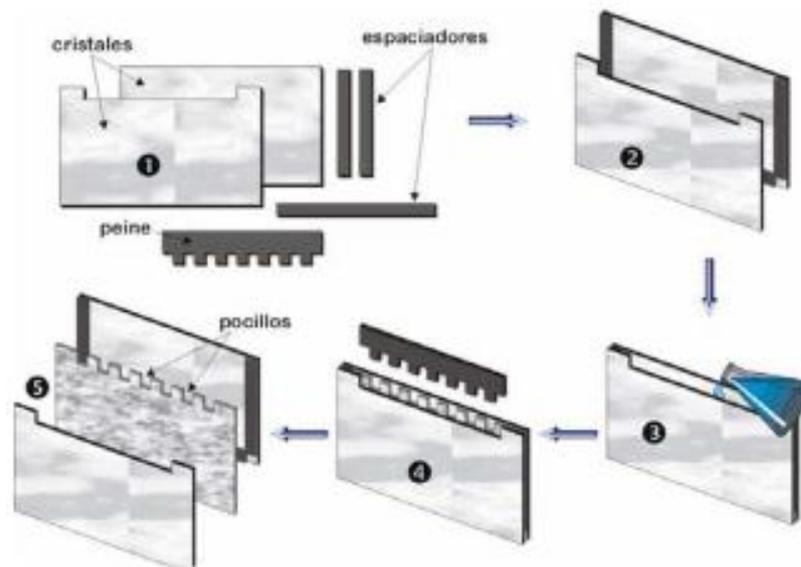


Figura 6: Representación esquemática de los pasos de armado de un gel. Con la ayuda de espaciadores de 1mm de espesor, se separan dos vidrios, los que son montados en un soporte. En el espacio que queda entre éstos, se vierte la solución de acrilamida: primero la solución del gel de corrida, se espera aproximadamente 15 minutos y una vez que está polimerizado se agrega la solución del gel de concentración. Rápidamente, sobre la superficie superior se coloca un peine que permite la formación de los pocillos. Se deja reposar el gel hasta que éste esté completamente polimerizado ([http://www.cultek.com/aplicaciones.asp?p=aplicacion Western Blot&opc=introduccion](http://www.cultek.com/aplicaciones.asp?p=aplicacion%20Western%20Blot&opc=introduccion)).

La electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico es una técnica ampliamente utilizada para separar las proteínas de acuerdo a su movilidad electroforética. El SDS desnatura las proteínas y produce el desplegamiento de las mismas eliminando sus estructuras secundarias y terciarias características de su funcionalidad biológica. A su vez, las moléculas de SDS proporcionan una carga negativa, por lo que los complejos SDS-proteína están cargados negativamente de forma uniforme. Esto provoca que la mayoría de las proteínas adquiera una relación carga/masa idéntica, de modo que la estructura tridimensional de las proteínas no influye en la electroforesis, pudiéndose asumir que la distancia de migración en el gel está directamente vinculada solo al tamaño de la proteína desplegada (longitud de su cadena, número de aminoácidos o peso molecular).

En este trabajo las muestras en el gel fueron corridas a un voltaje fijo de 160V durante una hora, a temperatura ambiente. Cada muestra fue cargada en dos geles separados, uno utilizado para la detección de TCREB y el otro para la detección de PCREB. Para cada muestra se cargó 70µg de extracto proteico total (Figura 7).

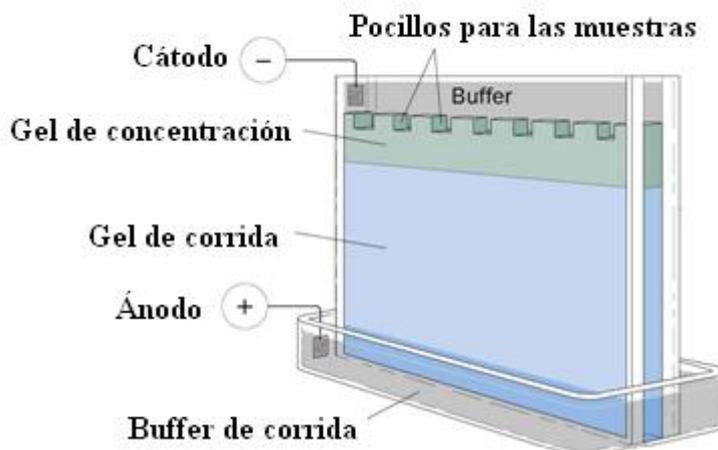


Figura 7: Representación esquemática de un equipo de electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato. Una vez polimerizado el gel (gel de corrida y gel de concentración), se cargan las muestras en los pocillos, y con la aplicación de una corriente eléctrica, las mismas migrarán del cátodo al ánodo de forma proporcional a su peso molecular: las de mayor peso migrarán menos que las de menor peso (Modificado de <http://proyectofinal6q.blogspot.com>).

3.4.2 Electrotransferencia

Para que las proteínas sean accesibles a la detección por anticuerpos, la corrida electroforética (con todas las bandas proteicas separadas por su peso molecular) tiene que ser transferida a una membrana de nitrocelulosa caracterizada por presentar una interacción membrana-proteína no covalente de naturaleza hidrofóbica.

Para esto, luego de la electroforesis, se equilibró el gel migrado y la membrana, así como esponjas delgadas y papeles de filtro cortados al tamaño del gel, en tampón de transferencia en frío durante 15 minutos. Dicho tampón tiene como base al mismo tampón de migración de la SDS-PAGE con el agregado de metanol, que facilita la transferencia proteica a la nitrocelulosa. Se procedió a armar el “sándwich” de transferencia conformado por, una esponja delgada, papel de filtro, el gel migrado, la membrana de nitrocelulosa, otro papel de filtro y otra esponja delgada, del polo negativo o cátodo al polo positivo o ánodo (Figura 8). Se cerró el “sándwich” cuidando que todos los elementos estén bien empapados en el tampón de transferencia, evitando siempre la formación de burbujas. Se lo colocó en la cuba de transferencia llena de dicho buffer frío con la utilización de un sistema de refrigeración. Aplicando una corriente de 100V durante dos horas, las proteínas fueron desplazadas del gel hacia el polo positivo quedando fuertemente adheridas a la membrana de nitrocelulosa. Por lo

tanto, la membrana resultante es una copia exacta del patrón de proteínas que se tenía en el gel de poliacrilamida.

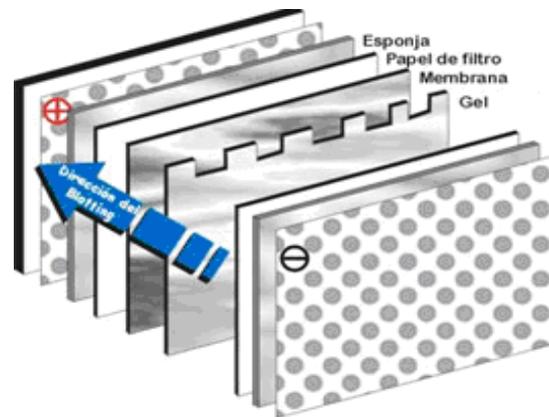


Figura 8: Representación esquemática del “sándwich” para la transferencia.

(http://www.cultek.com/aplicaciones.asp?p=aplicacion_Western_Blot&opc=introduccion)

Una vez finalizada la transferencia, el gel fue teñido con Azul Brillante de Coomassie para corroborar que la mayoría de las proteínas se hayan transferido a la membrana. Por otro lado, la membrana se tiñó en forma reversible con Rojo Ponceau por 10 minutos, para comprobar la eficacia de la transferencia donde se podrá ver la presencia de las proteínas (Figura 9). Una vez corroborada la eficiencia de la transferencia, se lava la membrana con PBS durante aproximadamente 10 minutos para retirar la marca del Rojo Ponceau.

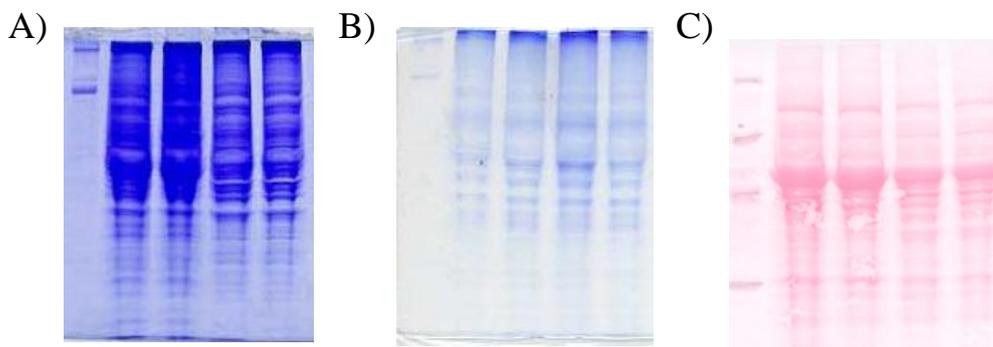


Figura 9: Para corroborar la transferencia de las proteínas del gel a la membrana, el gel fue teñido en Azul Brillante de Coomassie; al mismo tiempo la membrana se tiñó en Rojo Ponceau para evidenciar las proteínas transferidas. A) Gel teñido con Azul Brillante de Coomassie antes de la transferencia. B) Gel teñido con Azul Brillante de Coomassie después de la transferencia. C) Membrana de nitrocelulosa teñida con Rojo Ponceau después de la transferencia.

3.4.3 Bloqueo e incubación de la membrana con anticuerpos

Nuestro objetivo es que los anticuerpos utilizados se unan únicamente a las proteínas de interés y no a otros sitios de la membrana. Por lo tanto, para reducir la unión inespecífica de los anticuerpos durante los siguientes pasos del ensayo, es muy importante bloquear los sitios de unión de la membrana sin reaccionar con el antígeno (sitios libres de la membrana). Para esto se utiliza típicamente BSA, leche en polvo o caseína, que incrementan la sensibilidad del ensayo reduciendo los ruidos de fondo (*background*). Aquí se incubó la membrana con una solución de leche en polvo al 5% con PBS-Tween (PBS-T) durante una hora a temperatura ambiente. Las proteínas de la leche se unirán a todos aquellos lugares que no estén ocupados por las proteínas transferidas desde el gel.

Luego de haber bloqueado los sitios no específicos, se retiró dicha solución de bloqueo y las membranas fueron incubadas con los anticuerpos primarios (diluidos en PBS-T) que van a reconocer las proteínas de interés (anti-CREB 1:750 y anti-PCREB 1:250; *Cell Signalling*) por 12-16 horas a 4°C en agitación suave. Aquí los anticuerpos tienen que ser capaces de reconocer proteínas de ratones; para esto se utilizaron anticuerpos monoclonales generados en conejos, capaces de reconocer dichas proteínas. Para reconocer el anticuerpo primario de conejo se utilizaron anticuerpos secundarios específicos para conejo. Del mismo modo, hay una gran variedad de anticuerpos secundarios marcados de diferentes maneras para la detección. El marcaje con enzimas se utiliza ampliamente; las dos enzimas más utilizadas son la fosfatasa alcalina (AP) y la peroxidasa de rábano (HRP). A su vez, para cada una de ellas hay una amplia variedad de sustratos (cromogénicos, fluorogénicos y quimioluminiscentes).

Tras la incubación de los anticuerpos primarios, se realizaron 3 lavados con PBS-T de 10 minutos cada uno en agitación rápida para retirar los anticuerpos que no se unieron a las proteínas de las membranas. Seguidamente, las membranas fueron incubadas con el anticuerpo secundario (en PBS-T) conjugado a la peroxidasa (anti-Rabbit HRP 1:5000) durante una hora a temperatura ambiente en agitación suave. Finalmente se procedió a lavar nuevamente las membranas (2 lavados con PBS-T y uno con PBS, de 5 minutos cada uno) para eliminar el anticuerpo secundario no unido y así continuar con la revelación.

3.4.4 Revelación de la señal

La detección de la señal se realizó a través de la técnica de quimioluminiscencia, incubando la membrana durante 1 minuto con el *LumiGlo Reagent (Cell Signalling)* o 5 minutos con un producto de revelación producido en el laboratorio (A: Tris-HCl 1.5M, luminol, ácido p-coumarico y B: Tris-HCl, H₂O₂ mezclados en una relación 1:1). El principio se basa en la emisión de luz causada por la interacción entre el sustrato (luminol), el peróxido de hidrógeno y la HRP (peroxidasa).

La señal que se genera sobre la membrana es captada gracias a la exposición de la misma a placas fotográficas (Kodak) durante 30 minutos. Posteriormente la placa se incubó durante algunos minutos en solución reveladora. Una vez que se obtuvo una señal adecuada en la placa, se lavó en agua y se la sumergió en la solución de fijación (Figura 10).

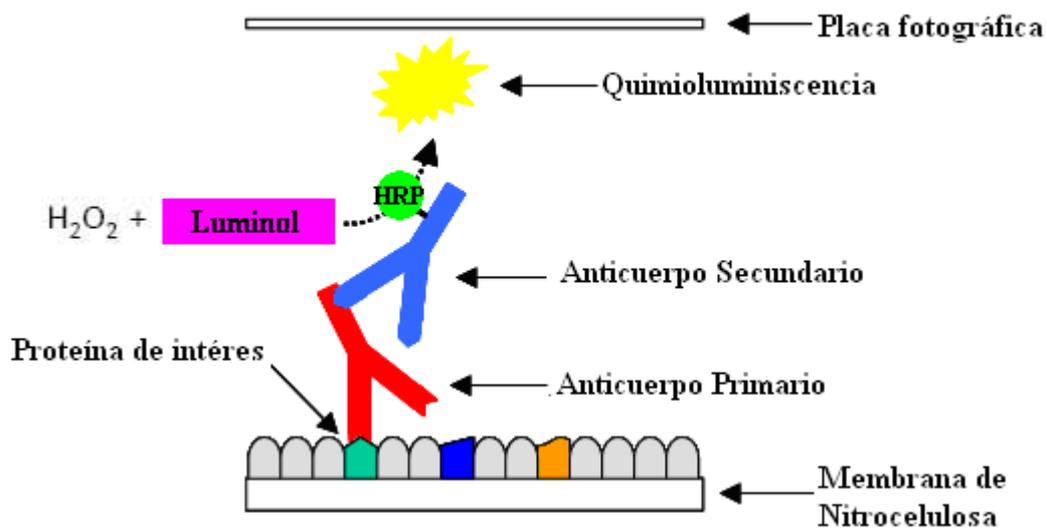


Figura 10: Representación esquemática del proceso de detección por la técnica de quimioluminiscencia. La proteína de interés en la membrana es reconocida por un anticuerpo primario específico contra ella. A su vez, éste es reconocido por un anticuerpo secundario conjugado a la HRP (peroxidasa). El sustrato (luminol) reacciona con la misma y con el peróxido de hidrógeno, emitiendo luz que atraviesa la placa fotográfica.

3.5 Cuantificación

Para estimar de modo semi-cuantitativo las señales obtenidas, las placas fotográficas fueron digitalizadas (escaneadas) y almacenadas. Las bandas correspondientes a la señal de interés fueron cuantificadas utilizando el programa NIHImageJ. Para cada banda se estimó un índice de la intensidad de la señal

multiplicando la densidad óptica media (DO) por el área total de la banda, determinando así la densidad óptica integral (DOINT).

En el correr del proyecto se ha observado una alta variabilidad inter experimental de la DOINT (datos crudos) para un determinado grupo experimental. Por otro lado la diferencia de la señal entre grupos experimentales se mantuvo constante en los distintos experimentos. Por esta razón, para el análisis estadístico y en los gráficos se ha utilizado la DOINT normalizada a un valor específico (ver resultados).

3.6 Análisis estadístico

Las diferencias entre niveles de TCREB y de PCREB en los varios grupos experimentales se evaluaron a través de *tests* estadísticos utilizando *one way ANOVA* seguido por el *test* de Tukey, con $p < 0.05$ como umbral para diferencias significativas.

4. RESULTADOS

Como se dijo anteriormente, en los procesos plásticos ocurren cambios en los circuitos y conexiones neuronales. Para que estos se mantengan en el tiempo y sean duraderos, es necesario que ocurra la síntesis de nuevas proteínas y la transcripción de nuevos genes.

Se ha demostrado que CREB es un factor de transcripción que puede tener un rol crítico en el control del desarrollo y la plasticidad del sistema nervioso de mamíferos y, en particular, en el sistema visual. Sin embargo, poco se sabe de la regulación de CREB en el colículo superior. Por lo tanto, en este trabajo se estudia la expresión y la activación de CREB en varios modelos de plasticidad neuronal en dicho núcleo, utilizando la técnica de *Western Blot*.

Para ser activado, CREB es fosforilado en un sitio específico (Ser 133). De esta manera, en el presente estudio se utilizaron anticuerpos específicos que reconocen exclusivamente la forma fosforilada (PCREB) y anticuerpos que reconocen la forma total de CREB de modo independiente de la fosforilación (TCREB). El cálculo de la relación entre las señales obtenidas con los dos anticuerpos en la misma muestra experimental (PCREB/TCREB) es un índice representativo del grado de activación de CREB.

4.1 Modelo de plasticidad fisiológica

Resultados preliminares han sido previamente obtenidos por otros miembros del equipo de investigación (Olivera, estudiante de Maestría en Neurociencias, UFSC, Brasil orientada por F.M. Rossi). En este trabajo fueron confirmados algunos puntos experimentales para aumentar la validez de los mismos.

Se estudió la expresión y activación de CREB en muestras de CS de ratones a diferentes edades postnatales (P0, P4, P9, P15, P30 y P45), focalizando la atención sobre el periodo de segregación de las proyecciones retino-coliculares (P4-P15).

Como se observa en la Figura 11, al momento del nacimiento (P0), la señal de PCREB es baja, pero luego ocurre un aumento a P4 que se mantiene aproximadamente de forma similar hasta P9. La intensidad de la señal decae a P15 y se mantiene de la misma manera hasta P45. En cuanto a la forma total de CREB, ésta presenta una

regulación similar a la anterior, aunque menos acentuada: se ve un aparente aumento a P4 que se mantiene hasta P9, pero decae a P15 y se mantiene así hasta P45.

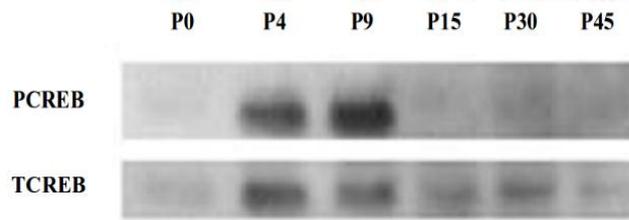


Figura 11: Western Blot representativo de la modulación de PCREB y TCREB en el colículo superior de ratones a diferentes edades postnatales. PCREB y TCREB tienen una modulación similar: ocurre un aumento a P4 que se mantiene hasta P9 que luego decae en P15 y sigue así hasta P45.

La cuantificación por densitometría de los resultados demostró que la intensidad de la señal de PCREB aumenta a P4 y P9 de aproximadamente 120% comparada a la señal obtenida a P0. Por otro lado, el aumento de TCREB en estas mismas edades es de aproximadamente 30%. El cálculo del índice de activación de CREB (DOINT PCREB/TCREB) mostró un aumento significativo de aproximadamente 60% entre P4 y P9 en comparación con la señal obtenida a P0 (Figura 12).

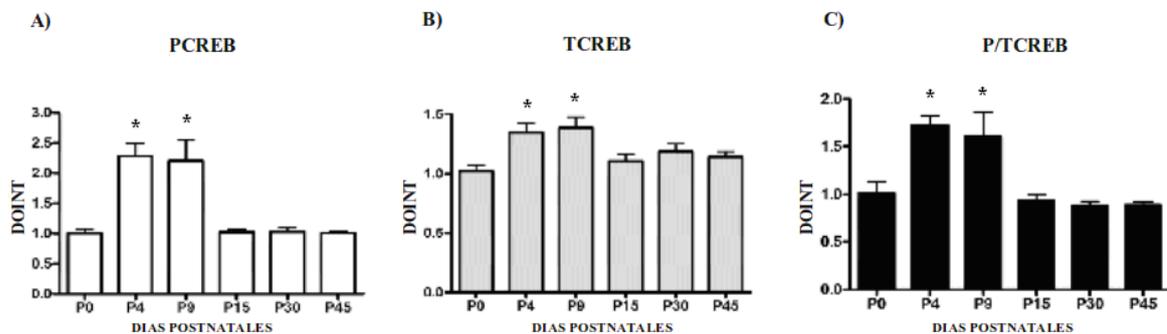


Figura 12: Cuantificación por densitometría de PCREB, TCREB y del índice de activación de CREB a diferentes edades postnatales. En A, se observa un aumento de PCREB de aproximadamente 120% a P4 y P9. En B, se observa un aumento de TCREB de aproximadamente 30% a P4 y P9. En C, se observa un aumento del índice de activación de CREB de aproximadamente 60% a P4 y P9. Las barras representan el promedio \pm SEM de los valores normalizados a los obtenidos a P0. El valor a P4 y P9 de PCREB, TCREB y PCREB/TCREB es estadísticamente significativo comparado con la señal a P0 (* $p < 0.05$). $n=4$ para cada edad.

4.2 Modelo de plasticidad inducida por lesión

En este modelo se utilizaron animales neonatos sometidos a enucleación monocular a P2 y sacrificados a P9 (NEI-NED); animales jóvenes con enucleación monocular a P21 y sacrificados a P28 (JEI-JED); y animales no lesionados, sacrificados a P9 y P21, utilizados como los respectivos controles (NCI-NCD y JCI-JCD). Para cada animal se separaron los CS izquierdo (contralateral a la lesión) y derecho (ipsilateral a la lesión).

Como se observa en la Figura 13, la lesión determinó un aumento de la señal de PCREB en el SC izquierdo de neonatos enucleados (NEI), comparado al SC derecho del mismo animal (NED), y a animales de control (NCD y NCI). De lo contrario, no se observó una variación de la señal de PCREB en ninguna muestra de animales jóvenes, ni enucleados (JED y JEI), ni de control (JCD y JCI).

Por otro lado ninguna variación se ha observado en la señal obtenida con el anticuerpo contra la forma total de CREB (TCREB) en las diferentes muestras.

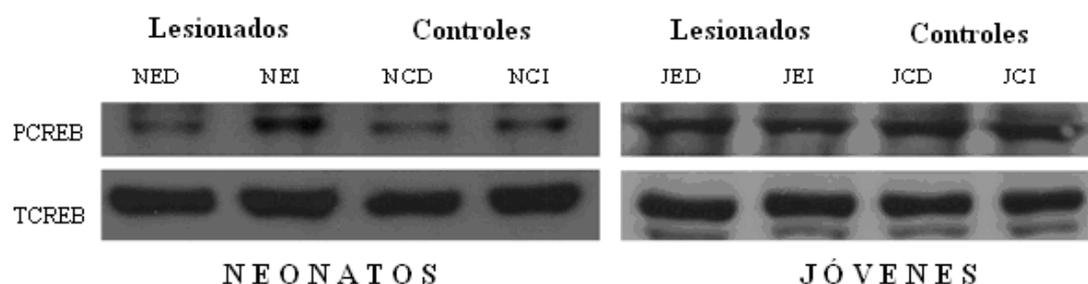


Figura 13: *Western Blot* representativo de la modulación de PCREB y TCREB en el colículo superior de ratones en un modelo de plasticidad inducida por lesión. NED-NEI: CS derecho e izquierdo de animales neonatos sometidos a enucleación a P2 y sacrificados a P9 (n=7); JED-JEI: CS derecho e izquierdo de animales jóvenes sometidos a enucleación a P21 y sacrificados a P28 (n=4); NCD-NCI, JCD-JCI: CS derecho e izquierdo de animales neonatos (n=2) y jóvenes (n=7) que no fueron sometidos a lesión. Se observa: i) un aumento en la intensidad de señal de PCREB en NEI en comparación con NED, NCD y NCI; ii) ninguna variación de la señal de PCREB en ninguna muestra de animales jóvenes; y iii) ninguna variación de la señal de TCREB entre las diferentes muestras.

Para el análisis se utilizó el índice de activación de CREB (PCREB/TCREB). Este valor coincide con el valor de PCREB debido a que la señal de TCREB no varía. La cuantificación por densitometría de los resultados demostró que la lesión determina un aumento del índice de activación de CREB en el SC izquierdo de animales neonatos (NEI) de aproximadamente 90% en comparación con la señal obtenida en el SC derecho (NED).

Aunque para un determinado grupo experimental se haya observado una cierta variabilidad inter experimental de la DOINT (datos crudos), la diferencia de la señal entre grupos experimentales se mantuvo constante en los distintos experimentos. Por esta razón, para el análisis estadístico se procedió de la siguiente manera: en cada experimento la DOINT del índice de activación de CREB de cada muestra se normalizó a un determinado valor, a la DOINT del índice de activación de CREB del SC derecho (NCD, NED, JCD y JED), o a la DOINT del índice de activación de CREB del SC de controles (NC=NCD+NCI y JC=JCD+JCI). En los gráficos se representa el promedio de estos valores obtenidos en cada experimento para cada muestra.

El aumento del valor del índice de activación de CREB obtenido para el SC izquierdo de neonatos enucleados (NEI/NED) es estadísticamente significativo cuando se lo compara al valor obtenido en los controles (NCI/NCD y NED/NC), indicando un efecto de la lesión. Por otro lado, la lesión no produce efectos sobre el CS derecho (no hay diferencia significativa entre NED/NC y NCI/NCD, $p=0.9$).

Asimismo, el aumento inducido por la lesión en el CS de neonatos es estadísticamente significativo cuando se lo compara con todas las muestras de animales jóvenes, indicando que la lesión determina un efecto específico en función de la edad (Figura 14).

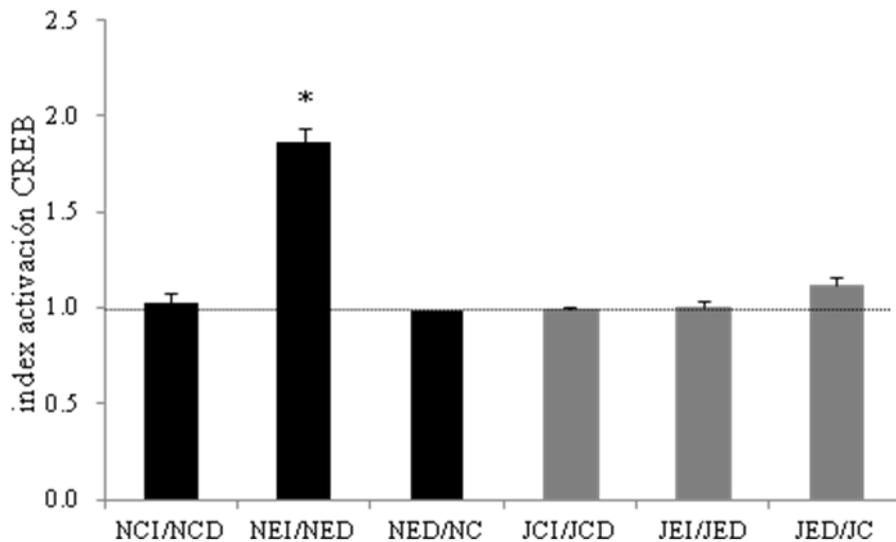


Figura 14: Cuantificación por densitometría del índice de activación de CREB en un modelo de plasticidad inducida por lesión. NCI: CS izquierdo de neonatos no lesionados (controles), NCD: CS derecho de neonatos no lesionados (controles), NEI: CS izquierdo de neonatos lesionados, NED: CS derecho de neonatos lesionados, JCI: CS izquierdo de jóvenes no lesionados (controles), JCD: CS derecho de jóvenes no lesionados (controles), JEI: CS izquierdo de jóvenes lesionados, JED: CS derecho de jóvenes lesionados. La lesión determina un aumento del índice de activación de CREB de aproximadamente 90% en el CS izquierdo de animales neonatos. Las barras representan el promedio \pm

SEM del índice de activación de CREB i) del SC izquierdo normalizado a la DOINT obtenida en el SC derecho de cada muestra o ii) del SC derecho normalizado a la DOINT de los controles. La línea horizontal representa la normalización de dichos valores. EL valor NEI/NED es estadísticamente significativo comparado a todos los otros valores (* $p < 0.05$). El valor NED/NC no es diferente de NCI/NCD ($p = 0.9$). El valor JEI/JED no es diferente de JCI/JCD ($p = 0.9$). $n = 2, 7, 3, 7, 4, 6$, respectivamente.

4.3 Modelo de reactivación de plasticidad en adultos

En este modelo se utilizaron animales adultos tratados (AF) con 20 mg/Kg/día de Fluoxetina (vía oral) durante 4 semanas (P70 a P98), así como animales controles no tratados (AC). Se ha demostrado que el tratamiento con Fluoxetina, conocido anti-depresivo potenciador del tono serotoninérgico, reactiva la plasticidad en animales fuera del periodo crítico.

Como puede verse en la Figura 15, se observó un aumento en la intensidad de la señal de PCREB en el SC de animales tratados con Fluoxetina en comparación a los animales no tratados (animales de control).

Por otro lado, no se observa ninguna variación en la intensidad de la señal obtenida con el anticuerpo contra la forma total de CREB (TCREB).

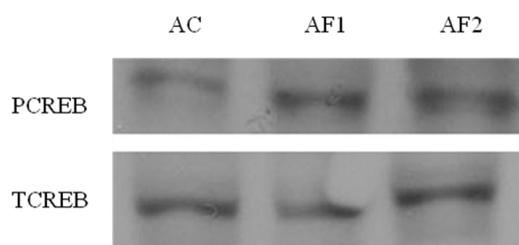


Figura 15: Western Blot representativo de la modulación de CREB y PCREB en el colículo superior de ratones en un modelo de reactivación de plasticidad en adultos. AC: colículo de animales adultos controles no tratados con Fluoxetina; AF1-AF2: colículo superior de animales adultos tratados con Fluoxetina. Se observa un aumento en la intensidad de señal de PCREB en el CS de animales tratados con Fluoxetina en comparación con los animales no tratados. Por otro lado, la intensidad de señal de TCREB no varió entre las diferentes muestras.

Para el análisis se utilizó el índice de activación de CREB, debido a que la señal de TCREB no varía. La cuantificación por densitometría reveló que el tratamiento con Fluoxetina determina un aumento del índice de activación de CREB de aproximadamente 70% en comparación con las muestras de animales no tratados de la misma edad (Figura 16).

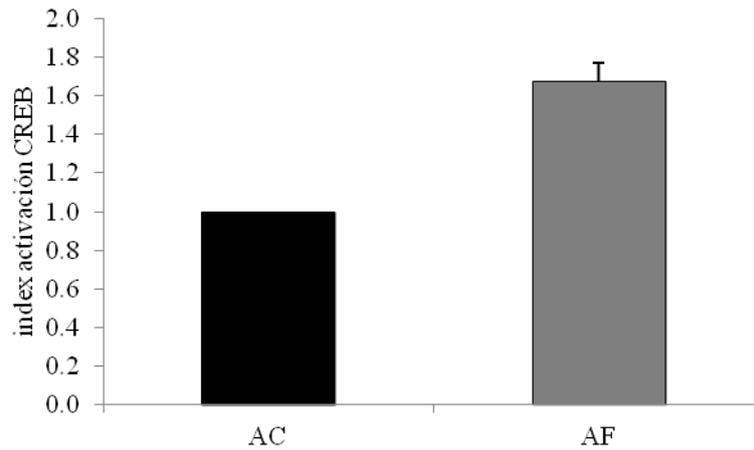


Figura 16: Cuantificación por densitometría de la modulación de la activación de CREB en un modelo de reactivación de la plasticidad en adultos. AC: animales adultos controles no tratados (n=1); AF: animales adultos tratados con Fluoxetina (n=2). El tratamiento con Fluoxetina en animales adultos determina un aumento del índice de activación de CREB de aproximadamente 70%. La barra gris representa el promedio \pm SEM del índice de activación de CREB del CS de animales adultos tratados con Fluoxetina normalizado al valor de la muestra de control (barra negra).

Aunque el número de muestras procesadas no fue suficiente para realizar un análisis estadístico, estos resultados preliminares indican un fuerte aumento de la activación de CREB inducido por el tratamiento. Esto será confirmado en estudios posteriores mediante el análisis de un mayor número de muestras y el uso de réplicas de los experimentos realizados.

5. DISCUSIÓN

Si bien se sabe poco sobre la regulación de CREB en el desarrollo del colículo superior, sí se ha demostrado que tiene una importante participación en procesos de desarrollo y plasticidad en otras regiones del sistema visual, por lo que el objetivo de este trabajo es estudiar la expresión y la modulación de dicho factor en diferentes modelos de plasticidad del colículo superior de ratones, a través de la técnica de *Western Blot*.

5.1 Modelo de plasticidad fisiológica

Antes de comenzar con la discusión de los resultados de este primer modelo, es importante recordar que en roedores, el colículo superior representa el principal objetivo de las conexiones retínicas. Estas aferencias inicialmente están mezcladas, pero luego de un proceso de segregación, proceso plástico dependiente de la actividad eléctrica espontánea, las proyecciones retino-coliculares pasan a formar territorios de inervación distintos, específicos de cada ojo.

Por lo antedicho, en este modelo se estudió la modulación de CREB a diferentes edades postnatales. Los resultados del *Western Blot* mostraron que tanto la forma total (TCREB) como la forma fosforilada (PCREB), aumentaron a P4 y P9, sugiriendo un aumento de la vía de señalización de CREB a esas edades. A su vez, PCREB aumentó más que TCREB (aumento del índice de activación PCREB/TCREB), mostrando que hay más moléculas fosforiladas en la misma cantidad de extracto proteico, lo que estaría indicando un aumento en la activación del factor de transcripción y por consiguiente la expresión de nuevos genes.

Los resultados se correlacionan temporalmente con el periodo de segregación de las proyecciones retino-coliculares (que en ratones ocurre en las primeras dos semanas de vida postnatal), sugiriendo un posible rol de CREB en este proceso. Una modulación similar de la vía de señalización de CREB ha sido descrita en el NGdl (Krahe et al., 2012) donde se ha demostrado que CREB tiene un rol determinante en la segregación de las proyecciones retino-talámicas (Pham et al., 2001).

En su conjunto, estos resultados estarían indicando que CREB está fuertemente involucrado en procesos de desarrollo y plasticidad de las proyecciones retínicas no solo al tálamo pero también al colículo superior.

5.2 Modelo de plasticidad inducida por lesión

Para estudiar el segundo modelo, se realizó una lesión en la retina derecha (enucleación monocular) de ratones neonatos y jóvenes. Los resultados del *Western Blot* mostraron que la lesión provocó un aumento en la activación de CREB únicamente en el CS de animales neonatos pero no en animales jóvenes. Como se dijo anteriormente, una lesión determina una reorganización plástica de las fibras ipsilaterales del ojo no lesionado solo cuando se realiza durante el PC, cuando el sistema se encuentra aún en una fase de alta plasticidad, pero ésta es mucho menos acentuada si se realiza fuera del mismo, cuando las capacidades plásticas disminuyen drásticamente (Bastos et al., 1999; Serfaty et al., 2005). Aunque existan otros efectos de la lesión, la correlación entre el aumento observado de fosfo-CREB con los efectos plásticos inducidos por lesión, sugiere un posible rol de la vía de señalización de CREB en este proceso.

Es importante recordar que, en ratones, aproximadamente el 95% de las fibras de cada nervio óptico cruzan al lado contralateral (opuesto) al de procedencia, por lo tanto, más que sorprender, es esperable que se haya observado una modificación de la activación de CREB en el CS izquierdo, contralateral al ojo lesionado (derecho).

5.3 Modelo de reactivación de la plasticidad en adultos

En el tercer modelo se utilizaron muestras de CS de animales adultos tratados con Fluoxetina durante un mes y animales adultos no tratados (controles). La Fluoxetina es un conocido antidepresivo, que determina un aumento de los niveles cerebrales de serotonina debido a que es un inhibidor del recaptador de la misma. Los resultados del *Western Blot*, aunque siendo preliminares, indican un fuerte aumento de la activación de CREB inducido por la Fluoxetina. Esto estaría en concordancia con lo observado en otros estudios (Nibuya et al., 1996), donde se vio que el tratamiento con Fluoxetina también aumenta la expresión de CREB en el hipocampo de roedores.

Ha sido demostrado (Bastos et al., 1999), que la serotonina esta implicada en la plasticidad y en la reorganización axonal de las proyecciones retino-coliculares durante el desarrollo, y luego de la maduración del sistema visual (en fases adultas). En esta línea, se observó que el tratamiento con Fluoxetina durante el PC modifica el desarrollo de las proyecciones durante el proceso de segregación. Aunque menos acentuada, el mismo tratamiento realizado a animales adultos produce también una reorganización,

indicando un efecto del exceso de serotonina también en el mantenimiento de dichas proyecciones.

Siguiendo con este razonamiento y con los resultados obtenidos en este modelo, el tratamiento con Fluoxetina en el CS, provocaría la unión de la serotonina a sus receptores de membrana provocando así un aumento de la cantidad de AMPc o del Ca^{2+} intracelular. Diversas quinasas dependientes de estos segundos mensajeros se activarían y desplazarían hacia el interior del núcleo celular fosforilando y activando de esta manera a CREB, alterando así la expresión específica de ciertos grupos de genes que serían responsables de los cambios plásticos ocurridos y que estarían implicados en el mantenimiento de las proyecciones retino-coliculares en animales adultos. Uno de los genes regulados por CREB es el factor neurotrófico derivado del cerebro (*brain-derived neurotrophic factor*, BDNF) y su receptor TrkB. Ya fue demostrado que BDNF juega un papel importante en el desarrollo y en los procesos plásticos del sistema visual. Se vio que se requiere para la formación de las proyecciones retino-estriadas, así como para la plasticidad inducida por la PM durante el PC en la corteza visual de ratones (Huang et al., 1999).

Por otro lado, se ha demostrado que la administración con Fluoxetina reinstaura la plasticidad cortical en adultos, ya que animales fuera del PC tratados con Fluoxetina vuelven a ser sensibles a la PM. Al mismo tiempo, el tratamiento con este antidepresivo permite recuperar las funciones visuales en animales ambliopes que sufrieron PM durante el desarrollo (Maya Vetencourt et al., 2008).

A su vez, una lesión temporal en la retina realizada a animales adultos tratados con Fluoxetina, provoca la reorganización de las proyecciones retínicas no lesionadas en el CS, expandiendo su territorio de inervación. Por lo tanto, la Fluoxetina potencia la poca plasticidad inducida por la lesión en el adulto, reactivándola (Bastos et al., 1999).

Como se dijo anteriormente, en el sistema visual, la hipótesis actual plantea que los periodos críticos de plasticidad son regulados fundamentalmente por factores "estructurales" y "funcionales". En este último caso, la relación entre el nivel de desarrollo del tono excitatorio y del tono inhibitorio jugaría un rol fundamental para determinar la apertura y el cierre del periodo crítico. La transmisión serotoninérgica y su consecuente reducción de la inhibición GABAérgica inducida por la administración de la Fluoxetina, promueve mecanismos funcionales y estructurales que cambian el balance inhibitorio-excitatorio, que abrirían el camino para la expresión de nuevos

genes que regulan la plasticidad, permitiendo así la reactivación de la misma (Maya Vetencourt et al., 2008).

En conjunto, podría pensarse que el tratamiento con Fluoxetina activaría la vía de CREB, y por lo tanto la expresión de los genes regulados por dicho factor, como ser BDNF, que sería responsable de la reactivación de la plasticidad en animales fuera del PC y estaría implicada también en el mantenimiento de las proyecciones retino-coliculares.

5.4 Conclusiones

En conclusión, se pudo ver la participación de CREB en tres modelos de plasticidad en el colículo superior de ratones:

- En un modelo de plasticidad fisiológica, donde se observó que CREB estaría involucrado en el desarrollo y plasticidad de las proyecciones retínicas al CS.
- En un modelo de plasticidad inducida por lesión de la retina, donde se demostró una correlación en la activación de CREB y los efectos plásticos inducidos por la lesión.
- En un modelo de reactivación de la plasticidad en animales adultos, en donde se vio que el tratamiento con Fluoxetina estaría reactivando la plasticidad utilizando la vía de CREB. A su vez está también estaría involucrada en el mantenimiento de las proyecciones retino-coliculares.

Con estos resultados se puede saber un poco más sobre los mecanismos celulares y moleculares subyacentes a la plasticidad en el CS y así poder brindar información útil sobre alguno de estos mecanismos, de modo de ayudar a la identificación de nuevas estrategias para el tratamiento de patologías en las que se afecta el proceso de plasticidad.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Bastos E.F., Marcelino J.L., Amaral A.R., Serfaty C.A. (1999) Fluoxetine-induced plasticity in the rodent visual system. *Brain Res* 824:28-35.

Berardi N., Pizzorusso T., Ratto G.M., Maffei L. (2003) Molecular basis of plasticity in the visual cortex. *Trends Neurosci* 26:369-78.

Bourtchuladze R., Frenguelli B., Blendy J., Cioffi D., Schutz G., Silva A.J. (1994) Deficient long-term memory in mice with a targeted mutation of the cAMP-responsive element-binding protein. *Cell* 79:59-68.

Feller M.B. (2002) The role of nAChR-mediated spontaneous retinal activity in visual system development. *J Neurobiol* 53:556-67.

Hensch T.K. (2005) Critical period plasticity in local cortical circuits. *Nat Rev Neurosci* 6:877-88.

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* 98:739-55.

Hubel D.H., Wiesel T.N. (1965) Binocular interaction in striate cortex of kittens reared with artificial squint. *J Neurophysiol* 28:1041-59.

Hubel D.H., Wiesel T.N. (1998) Early exploration of the visual cortex. *Neuron* 20:401-12.

Kandler K., Katz L.C. (1998) Coordination of neuronal activity in developing visual cortex by gap junction-mediated biochemical communication. *J Neurosci* 18:1419-27.

Maya Vetencourt J.F., Sale A., Viegi A., Baroncelli L., De Pasquale R., O'Leary O.F., Castren E., Maffei L. (2008) The antidepressant fluoxetine restores plasticity in the adult visual cortex. *Science* 320:385-8.

Nibuya M., Morinobu S., Duman R.S. (1995) Regulation of BDNF and trkB mRNA in rat brain by chronic electroconvulsive seizure and antidepressant drug treatments. *J Neurosci* 15:7539-47.

Nibuya M., Nestler E.J., Duman R.S. (1996) Chronic antidepressant administration increases the expression of cAMP response element binding protein (CREB) in rat hippocampus. *J Neurosci* 16:2365-72.

Penn A.A., Riquelme P.A., Feller M.B., Shatz C.J. (1998) Competition in retinogeniculate patterning driven by spontaneous activity. *Science* 279:2108-12.

Pham T.A., Graham S.J., Suzuki S., Barco A., Kandel E.R., Gordon B., Lickey M.E. (2004) A semi-persistent adult ocular dominance plasticity in visual cortex is stabilized by activated CREB. *Learn Mem* 11:738-47.

Purves D., Augustine G.J., Fitzpatrick D., Hall W.C., Lamantia A.S., Mcnamara J.O., Williams S.M. (2004)

Rantamaki T., Hendolin P., Kankaanpaa A., Mijatovic J., Piepponen P., Domenici E., Chao M.V., Mannisto P.T., Castren E. (2007) Pharmacologically diverse antidepressants rapidly activate brain-derived neurotrophic factor receptor TrkB and induce phospholipase-Cgamma signaling pathways in mouse brain. *Neuropsychopharmacology* 32:2152-62.

Rossi F.M., Pizzorusso T., Porciatti V., Marubio L.M., Maffei L., Changeux J.P. (2001) Requirement of the nicotinic acetylcholine receptor beta 2 subunit for the anatomical and functional development of the visual system. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:6453-8.

Serfaty C.A., Campello-Costa P., Linden R. (2005) Rapid and long-term plasticity in the neonatal and adult retinotectal pathways following a retinal lesion. *Brain Res Bull* 66:128-34.

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* 364:341-55.

Tropea D., Kreiman G., Lyckman A., Mukherjee S., Yu H., Horng S., Sur M. (2006) Gene expression changes and molecular pathways mediating activity-dependent plasticity in visual cortex. *Nat Neurosci* 9:660-8.

Wiesel T.N., Hubel D.H. (1963a) Single-Cell Responses in Striate Cortex of Kittens Deprived of Vision in One Eye. *J Neurophysiol* 26:1003-17.

Wiesel T.N., Hubel D.H. (1963b) Effects of Visual Deprivation on Morphology and Physiology of Cells in the Cats Lateral Geniculate Body. *J Neurophysiol* 26:978-93.