

Tesis de Maestría en Ciencias Biológicas

PEDECIBA Biología  
Subárea Neurociencias

# **ESTUDIO DE PROCESOS DE ACETILACIÓN EN MODELOS DE PLASTICIDAD EN LA CORTEZA VISUAL**

**LIC. GABRIELA VIERCI**

Laboratorio de Neurociencias – “Unidad de Neuroplasticidad”

Facultad de Ciencias

UdelaR

**Orientador de tesis: Dr. Francesco M. Rossi**

**Co-orientador: Dr. Rúben Budelli**

**Tribunal de tesis:**

**Presidente: Dra. Patricia Lagos**

**Vocales: Dra. Laura Quintana**

**Dra. Natalia Uriarte**

# TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN .....	4
INTRODUCCIÓN .....	5
1. PLASTICIDAD NEURONAL.....	5
2. ESTUDIO DE LOS PROCESOS DE PLASTICIDAD EN EL SISTEMA VISUAL.....	6
2.1 ROL DE LA VISIÓN EN LA PLASTICIDAD DE LA CORTEZA VISUAL .....	6
2.2 ESTRATEGIAS EXPERIMENTALES PARA EVALUAR LA PLASTICIDAD CORTICAL.....	10
3. MECANISMOS DE REACTIVACIÓN DE LA PLASTICIDAD EN ANIMALES ADULTOS.....	11
3.1 ESTRATEGIAS DE REACTIVACIÓN DE LA PLASTICIDAD: EL TRATAMIENTO CON FLUOXETINA .....	12
3.2 ESTRATEGIAS DE REACTIVACIÓN DE LA PLASTICIDAD: EL MANTENIMIENTO DE LOS ANIMALES EN UN AMBIENTE ENRIQUECIDO .....	13
4. MECANISMOS FUNCIONALES Y ESTRUCTURALES INVOLUCRADOS EN CONTROLAR LOS NIVELES DE PLASTICIDAD EN LA CORTEZA VISUAL .....	14
4.1 LA MADURACIÓN DE LOS CIRCUITOS INHIBITORIOS CONTROLA EL CURSO TEMPORAL DE LOS PC DE PLASTICIDAD.....	14
4.2 COMPONENTES DE LA MATRIZ EXTRACELULAR SON CLAVE EN LA DETERMINACIÓN DEL NIVEL DE PLASTICIDAD .....	18
5. EXPRESIÓN GÉNICA DIFERENCIAL Y CONTROL DE LA PLASTICIDAD .....	20
5.1 HUELLA MOLECULAR .....	20
5.2 FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN .....	21
5.3 MECANISMOS EPIGENÉTICOS DE REGULACIÓN GÉNICA .....	22
JUSTIFICACIÓN.....	29
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS .....	31
HIPÓTESIS.....	31
OBJETIVO GENERAL.....	31
OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	31
MATERIALES Y MÉTODOS.....	33
1. ANIMALES.....	33
1.1 GRUPOS EXPERIMENTALES .....	33
1.2 MANTENIMIENTO Y TRATAMIENTO.....	34
1.2.1 Tratamiento con fluoxetina .....	34
1.2.2 Ambiente enriquecido .....	35
1.2.3 Modelo de inducción por experiencia visual .....	35
2. EXPERIMENTOS DE WESTERN BLOT.....	36
2.1 PREPARACIÓN DE MUESTRAS .....	36
2.1.1 Extracción ácida de histonas.....	36
2.1.2 Cuantificación proteica .....	37
2.2 ELECTROFORESIS DE PROTEÍNAS .....	38
2.3 ELECTROTRANSFERENCIA .....	38
2.4 BLOQUEO E INCUBACIÓN DE LA MEMBRANA CON ANTICUERPOS.....	39
2.5 REVELADO DE LA SEÑAL Y OBTENCIÓN DE IMÁGENES .....	41
2.6 ANÁLISIS DE LAS IMÁGENES Y OBTENCIÓN DE DATOS .....	42
2.7 ANÁLISIS ESTADÍSTICO .....	44
3. EXPERIMENTOS DE INMUNOFLUORESCENCIA .....	44
3.1 PREPARACIÓN DE MUESTRAS .....	44
3.2 OBTENCIÓN DE IMÁGENES.....	46
3.3 ANÁLISIS DE LAS IMÁGENES .....	47

3.4 ANÁLISIS ESTADÍSTICO .....	47
<b>RESULTADOS .....</b>	<b>48</b>
<b>1. PUESTA A PUNTO DE LAS TÉCNICAS .....</b>	<b>48</b>
1.1 WESTERN BLOT .....	48
1.1.1 Verificación de la presencia de histonas en muestras de CV obtenidas por extracción ácida.....	48
1.1.2 Puesta a punto de los anticuerpos.....	50
1.1.3 Estudio de la especificidad de los anticuerpos.....	51
1.1.4 Puesta a punto de la estrategia para analizar la modulación del índice de acetilación de las histonas .....	52
1.1.5 Puesta a punto de la estrategia para el análisis y procesamiento de los datos experimentales ...	55
1.2 INMUNOFUORESCENCIA .....	56
1.2.1 Puesta a punto de los anticuerpos.....	56
<b>2. ESTUDIO DEL NIVEL DE ACETILACIÓN DE LAS HISTONAS H3 Y H4 EN MODELOS DE PLASTICIDAD EN CONDICIONES BASALES .....</b>	<b>59</b>
2.1 PLASTICIDAD DURANTE EL DESARROLLO .....	59
2.2 PLASTICIDAD RESTAURADA EN EL ADULTO .....	60
2.2.1 Tratamiento con fluoxetina .....	60
2.2.2 Mantenimiento en ambiente enriquecido .....	61
<b>3. ESTUDIO DEL EFECTO DE LA EXPERIENCIA VISUAL SOBRE EL NIVEL DE ACETILACIÓN DE LAS HISTONAS H3 Y H4.....</b>	<b>63</b>
3.1 PLASTICIDAD DURANTE EL DESARROLLO .....	63
3.1.1 Estudio de la modulación de la acetilación de las histonas por la experiencia visual: inmunofluorescencia.....	64
3.2 PLASTICIDAD RESTAURADA EN ADULTO.....	66
3.2.1 Tratamiento con fluoxetina .....	66
3.2.2 Mantenimiento en ambiente enriquecido .....	67
<b>DISCUSIÓN.....</b>	<b>69</b>
<b>1. ESTUDIO DEL NIVEL DE ACETILACIÓN DE LAS HISTONAS H3 Y H4 EN MODELOS DE PLASTICIDAD EN CONDICIONES BASALES .....</b>	<b>69</b>
<b>2. ESTUDIO DEL EFECTO DE LA EXPERIENCIA VISUAL SOBRE EL NIVEL DE ACETILACIÓN DE LAS HISTONAS H3 Y H4.....</b>	<b>71</b>
<b>3. SIMILITUD ENTRE LOS MECANISMOS DE PLASTICIDAD DEL DESARROLLO Y DE PLASTICIDAD RESTAURADA EN ADULTO .....</b>	<b>74</b>
<b>4. ROL DE LAS MPT DE HISTONAS EN PROCESOS DE PLASTICIDAD CEREBRAL .....</b>	<b>75</b>
<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>78</b>
<b>PERSPECTIVAS .....</b>	<b>79</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>80</b>

La corteza visual primaria es uno de los modelos experimentales más utilizado en el estudio de procesos de desarrollo y plasticidad cerebral en los mamíferos. Se ha demostrado que las capacidades plásticas en esta área son particularmente elevadas durante fases precoces de la vida postnatal (período crítico de plasticidad), pero disminuyen progresivamente con el tiempo. Los mecanismos celulares y moleculares subyacentes todavía permanecen pocos caracterizados, sin embargo la hipótesis actual plantea que la expresión diferencial de programas genéticos específicos determinaría la diferencia entre la alta capacidad plástica juvenil y la disminuida plasticidad del adulto.

El objetivo principal del presente proyecto es caracterizar el rol potencial de uno de los principales mecanismos de regulación de la expresión génica, la acetilación reversible de las histonas, en regular los niveles de plasticidad en la corteza visual del ratón. Nuestra hipótesis es que la acetilación de las histonas se correlaciona con los altos niveles de plasticidad y que la experiencia visual induce esta modificación postraduccional exclusivamente cuando el sistema es plástico. Para esto utilizamos principalmente la técnica de Western blot para comparar el nivel de acetilación de las histonas H3 y H4 entre varios modelos experimentales de plasticidad: animales con alta plasticidad (jóvenes durante el período crítico) vs adultos poco plásticos; animales adultos con plasticidad restaurada experimentalmente (por tratamiento con fluoxetina y mantenimiento en ambiente enriquecido) vs controles respectivos. Los efectos de la luz se estudiaron en las mismas condiciones utilizando el protocolo de reexposición aguda a la luz luego del mantenimiento de los animales en oscuridad (*dark rearing + light*).

Nuestros resultados indican que la acetilación de las histonas H3 y H4 es mayor en las condiciones plásticas, en animales jóvenes y animales adultos con plasticidad restaurada, en comparación con animales adultos controles; y que la experiencia visual induce un aumento en los niveles de acetilación de ambas histonas únicamente en condiciones de alta plasticidad.

## 1. PLASTICIDAD NEURONAL

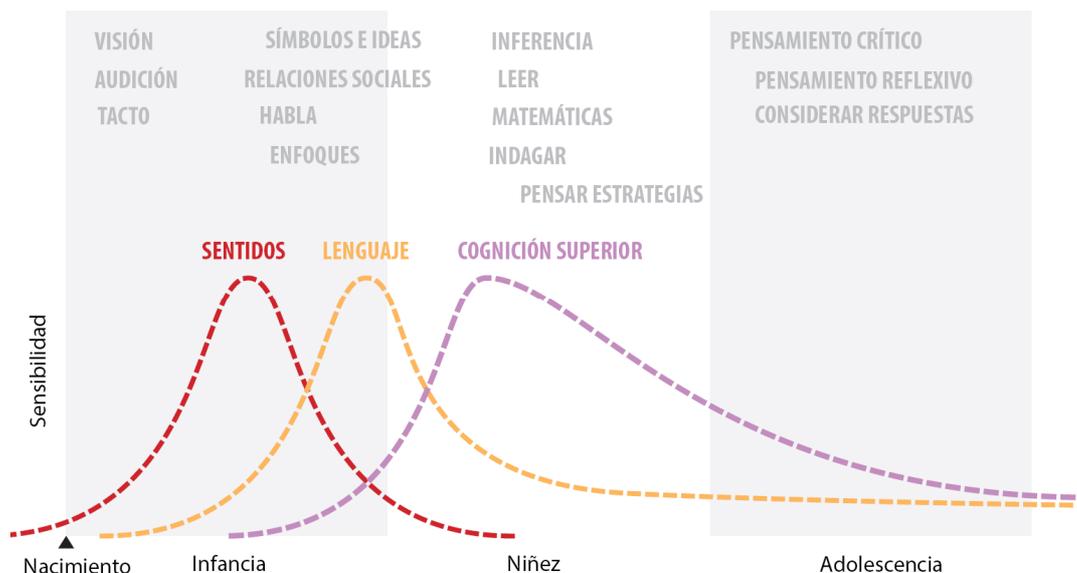
La construcción y el mantenimiento de la arquitectura del Sistema Nervioso (SN) dependen de la maduración de los circuitos neuronales que se establecen durante el desarrollo embrionario. En primer lugar, las conexiones se generan siguiendo el programa genético y luego son modificadas estructural y funcionalmente por patrones de actividad neuronal inicialmente espontáneos y luego resultado de estímulos externos.

Esta capacidad de los circuitos neuronales de modificar y reorganizar sus conexiones en respuesta a cambios en el entorno se conoce como plasticidad neuronal, y 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 determinados períodos, llamados períodos críticos (PC) de plasticidad. Dichos períodos han sido identificados en varios sistemas neuronales y en diversas especies, y todos comparten algunas características básicas (Hensch, 2005). Los PC de plasticidad dependiente de la experiencia se definen como una ventana temporal durante la cual el efecto de una determinada experiencia sobre un circuito neuronal es particularmente fuerte. Una vez cerrada dicha ventana, la posibilidad de que la experiencia pueda modificar el circuito desaparece o disminuye drásticamente (Berardi et al., 2000, 2003; Hensch, 2005; Tropea et al., 2009). Además, el hecho de que el correcto desarrollo de algunos circuitos neuronales dependa de determinadas experiencias, implica que la privación a las mismas durante el PC de plasticidad, resulte en dramáticas alteraciones estructurales y funcionales que en muchos casos son irreversibles.

En el cerebro humano, la capacidad de modificarse en función de las experiencias (plasticidad) se puede separar en tres etapas principales (Figura 1). En el caso de la visión y de otras funciones sensoriales el PC de sensibilidad comienza luego del nacimiento y disminuye casi totalmente

durante la infancia. En el caso del lenguaje y de otras funciones cognitivas de orden superior, estos presentan un comienzo más tardío y, si bien disminuyen con el paso del tiempo, nunca se cierran completamente. De este modo, aunque sea más dificultoso, se mantiene una determinada capacidad de aprendizaje a lo largo de toda la vida. Además, el hecho de que estas tres etapas ocurran de modo secuencial, permite a un individuo adquirir habilidades cada vez más complejas.



**Figura 1. La sensibilidad al aprendizaje del cerebro humano puede dividirse en tres amplias etapas.** El PC de las regiones corticales consagradas a la visión y a otras funciones sensoriales (en rojo) abre al nacer y cierra rápidamente durante la infancia. Los correspondientes al lenguaje (en amarillo) y a la cognición superior (en lila) abren más tardíamente en la infancia y nunca cierran totalmente. La secuencia de las tres etapas permite a un niño adquirir habilidades (texto en gris) cada vez más complejas. *Modificado de Bardin, 2012.*

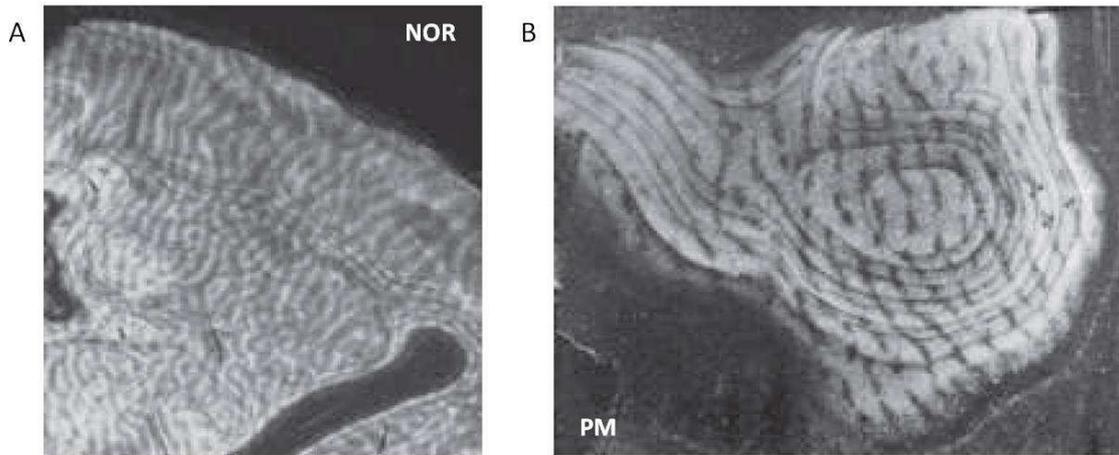
## 2. ESTUDIO DE LOS PROCESOS DE PLASTICIDAD EN EL SISTEMA VISUAL

### 2.1 Rol de la visión en la plasticidad de la corteza visual

El sistema visual es un modelo paradigmático para el estudio de los procesos de plasticidad dependiente de la experiencia, en el cual la entrada sensorial puede ser fácilmente manipulada experimentalmente y cuyos efectos subsecuentes pueden ser medidos a nivel anatómico, fisiológico y molecular de una manera relativamente fácil (Hooks & Chen, 2007; Morishita & Hensch, 2008; Leamey et al., 2009).

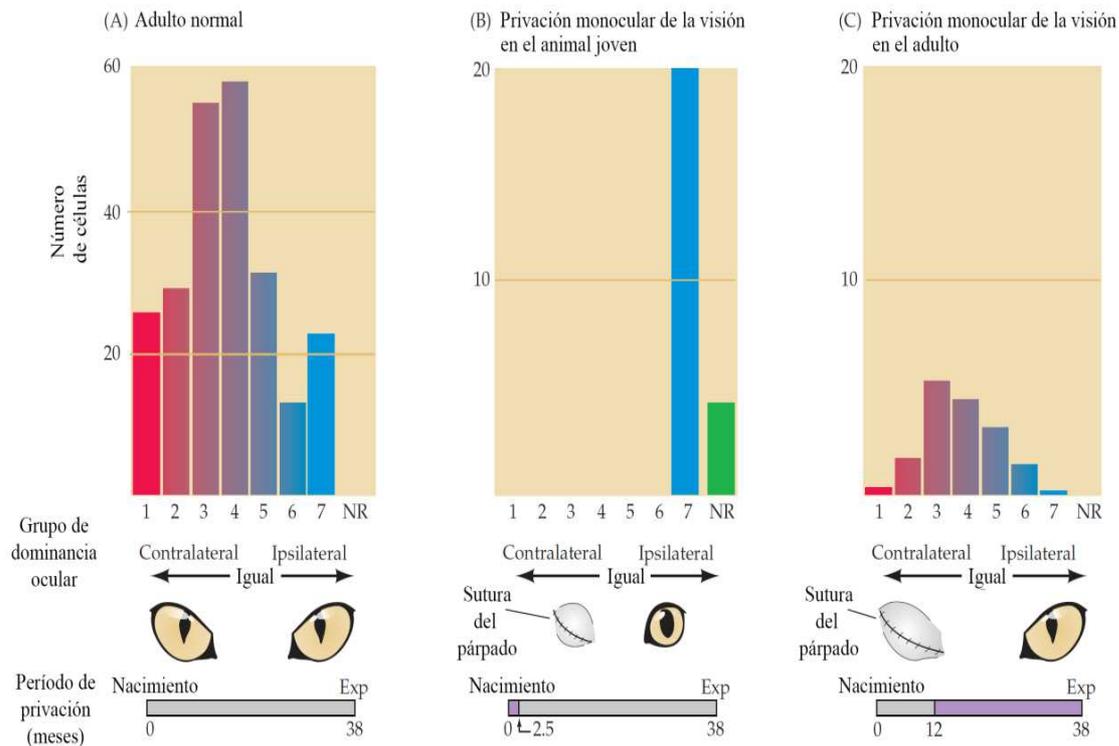
Trabajos pioneros comenzados en los años sesenta (Wiesel & Hubel, 1963a; Wiesel & Hubel, 1963b; Hubel & Wiesel, 1965; Hubel & Wiesel, 1998) demostraron que la correcta maduración de la corteza visual depende de la actividad eléctrica inducida por la experiencia visual. En estos trabajos, se demostró que bloqueando de modo temporario la entrada sensorial proveniente de un ojo durante el desarrollo (a través del protocolo experimental conocido como privación monocular, PM, que consiste en cerrar un ojo mediante cirugía o un parche) se inducen dramáticas alteraciones en la organización anatómica y funcional principalmente en la corteza contralateral al ojo cerrado.

Para evidenciar los efectos de la privación monocular a nivel anatómico, se analizó la distribución de las columnas de dominancia ocular (Purves et al., 2004). Para esto a animales jóvenes sometidos a PM se les inyectó un ojo con un trazador neuronal transináptico que es incorporado en las células ganglionares y es transferido a las neuronas del NGdl, marcando todas sus proyecciones sobre la corteza visual. Mediante esta técnica se pudo evidenciar que las terminales de las fibras provenientes del ojo cerrado reducen su territorio de inervación en la corteza visual dejando que sea ocupado por las terminales de las fibras provenientes del ojo abierto, las cuales “ganan” la competencia expandiendo su territorio de inervación. Es decir, las columnas de dominancia ocular del ojo privado de visión se reducen mientras que las columnas del ojo que fue mantenido abierto se expanden (Figura 2).



**Figura 2. 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). A: Corteza visual de control en donde las columnas de dominancia ocular se ven como rayas alternas aproximadamente del mismo tamaño. B: Corteza visual de mono joven sometido a PM (desde las 2 semanas de edad hasta los 18 meses) 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.*

Para analizar los efectos de la privación monocular a nivel funcional, se evaluó la distribución de las clases de dominancia ocular utilizando registros electrofisiológicos *in vivo* (*single-unit recording*). Las células corticales pueden ser clasificadas en función del tipo de respuesta al estimular un ojo u el otro (Purves et al., 2004). En particular se pueden dividir en: células de la clase 1, activadas exclusivamente por el ojo contralateral; células de la clase 7, activadas exclusivamente por el ojo ipsilateral; células de las clases 2-6, activadas en mayor o menor medida por los dos ojos (binoculares). Se observó que los animales a los que se les realizó PM en fases tempranas del desarrollo, presentan un importante cambio en la distribución de las clases de dominancia ocular respecto a los animales de control. En particular, el número de células corticales conectadas funcionalmente con el ojo privado de visión disminuye drásticamente, mientras que aumenta el número de células que responden al ojo abierto (Figura 3A y B).



**Figura 3. 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 (binoculares). A: Distribución de las clases de dominancia ocular en animales adultos normales (gato de 38 meses de edad). B: Distribución de las clases de dominancia ocular en animales adultos que fueron sometidos a PM durante el PC (del nacimiento a los 2.5 meses de edad). C: Distribución de las clases de dominancia ocular en animales adultos que fueron sometidos a PM fuera del PC (12-38 meses de edad). *Modificado de Purves et al., 2004.*

A nivel comportamental, la manipulación de la entrada visual (por privación monocular) determina una dramática reducción de la visión. Más específicamente, esta provoca una fuerte reducción de la agudeza visual (una medida de la resolución espacial), de la sensibilidad al contraste y de la percepción de la profundidad (Berardi et al., 2000).

En resumen, la PM realizada en animales jóvenes determina fuertes alteraciones en el desarrollo anatómico-funcional de la corteza visual. Por el contrario, cuando la PM es realizada en animales adultos, los efectos son muy limitados o ausentes (Figura 3C). Estos experimentos demostraron claramente que durante el desarrollo los animales son particularmente sensibles a manipulaciones de la experiencia visual, y que una correcta experiencia es necesaria para la correcta maduración del sistema. Se demostró, a su vez, que los efectos de la experiencia sobre la organización de los

circuitos disminuyen en fases adultas. Se demostró así, la existencia de un período de tiempo limitado en el cual la sensibilidad a la experiencia es particularmente elevada, el período crítico de plasticidad.

## **2.2 Estrategias experimentales para evaluar la plasticidad cortical**

Los experimentos de Hubel y Wiesel fueron fundamentales para la caracterización anatómico-funcional del sistema visual de los mamíferos. Como ya se ha dicho, para analizar los efectos de la experiencia visual se utilizó principalmente el protocolo de privación monocular. Hoy en día se ha demostrado que la PM induce cambios similares a los observados por estos investigadores en todas las especies analizadas (ratón, rata, hurón, gato, mono, entre otros), lo que ha llevado a su establecimiento como paradigma experimental para censar la presencia de plasticidad cortical. Sin embargo, a pesar de ser la PM la más utilizada, existen otras estrategias experimentales de manipulación del input visual para detectar la presencia de plasticidad dependiente de la experiencia, como por ejemplo la enucleación monocular, el mantenimiento de los animales en oscuridad, el estrabismo experimental, entre otros.

En los experimentos de Hubel y Wiesel mencionados, se muestran los resultados obtenidos utilizando métodos anatómicos (la modificación de las columnas de dominancia ocular) y funcionales (distribución de las clases de dominancia ocular) como estrategias para detectar los cambios en el nivel de plasticidad (Morishita & Hensch, 2008). Sin embargo existen también otras metodologías utilizadas habitualmente para censar la plasticidad. Entre las más utilizadas está el índice representativo de la dominancia ocular, DO (binocularidad cortical) que representa cuánto la corteza visual es “dominada” por la entrada de un ojo o del otro. Este índice se calcula midiendo la relación entre la amplitud de los potenciales visuales evocados por el ojo contralateral respecto al ipsilateral (PVE contra/ipsi), registrando en la región binocular de la corteza visual primaria. El índice de binocularidad en roedores es de aproximadamente 2.5 ciclo/grado, valor que refleja la predominancia de las fibras contralaterales que, como se mencionó, representan aproximadamente el 95% de las fibras totales del tracto óptico. La PM realizada en animales plásticos induce una reducción a la mitad de dicho índice (aprox. de 2.5 a 1.2 ciclo/grado).

Para evaluar los efectos de la PM a nivel comportamental clásicamente se miden modificaciones en la agudeza visual. Esta se puede registrar evaluando la respuesta a estímulos visuales cuya frecuencia espacial es aumentada de modo gradual, utilizando técnicas electrofisiológicas (registro

*in vivo* de PVE) como técnicas comportamentales (*test* visual de laberinto en agua, Prusky et al., 2000).

Además de las estrategias recién mencionadas, existen otras que se basan en analizar la presencia o ausencia de plasticidad en la corteza visual mediante el estudio de modificaciones en la comunicación neuronal como los procesos de plasticidad a corto o largo plazo (*long-term depression/potentiation*, LTD/LTP), entre otros. En este caso no se miden los efectos de la manipulación de la entrada visual pero sí las propiedades intrínsecas del circuito neuronal. La metodología más utilizada es el registro *in vitro* de LTP estimulando la materia blanca (WM-LTP, *theta-burst stimulation*) y registrando en las capas II/III de la corteza visual. Se ha observado que este tipo específico de LTP disminuye de forma dependiente de la edad y se correlaciona estrechamente con la disminución de los niveles de plasticidad durante el desarrollo *in vivo* (Huang et al., 1999; Berardi et al., 2000; Cancedda et al., 2004).

### **3. MECANISMOS DE REACTIVACIÓN DE LA PLASTICIDAD EN ANIMALES ADULTOS**

Los efectos de la PM sobre las funciones visuales en animales experimentales son similares a lo que se observa en la ambliopía (ojo perezoso) en el ser humano. Esta es una patología severa asociada a varios desórdenes visuales que ocurren en la niñez como el estrabismo, la anisometropía y la catarata congénita, y es la causa más común de pérdida de la visión durante la infancia con una incidencia de 2 al 5% en la población mundial (Kiorpes et al., 1998; Berardi et al., 2000; Mittelman, 2003; Holmes & Clarke, 2006; Maya Vetencourt et al., 2009). La ambliopía puede revertirse con estrategias implementadas únicamente cuando el sistema es todavía plástico (en el PC, en niños antes de los 9 años de edad). Una de estas ha sido mediante el cierre temporal del ojo sano, al colocar un parche sobre el mismo y dejando el ojo ambliope abierto. Por el contrario, cuando estos tratamientos no pueden ser efectuados durante fases precoces de la vida, etapa en la que el sistema todavía mantiene las capacidades de modificarse, no logran recuperar los déficits y la ambliopía se vuelve irreversible (Holmes & Clarke, 2006; Wu & Hunter, 2006).

En los últimos años se han identificado algunas estrategias alternativas utilizables en adultos. El paradigma de base consiste en potenciar la plasticidad residual en el adulto para poder facilitar la recuperación de alguna función afectada durante el desarrollo o por una determinada patología. De manera muy prometedora, estudios recientes en el sistema visual de animales experimentales, han

identificado algunas estrategias que no solo reactivan la plasticidad en animales adultos sino también permiten la recuperación de la visión en animales ambliopes privados de visión en fases tempranas del desarrollo. Entre estas se encuentra la administración crónica del conocido antidepresivo fluoxetina (Maya Vetencourt et al., 2008), que es un inhibidor de la recaptación de serotonina; la exposición de los animales a un ambiente enriquecido en estímulos sensorio-motores (Sale et al., 2007; Baroncelli et al., 2010); y el mantenimiento de los animales en condiciones de oscuridad (He et al., 2006). La relevancia de estas tres aproximaciones radica en que no son invasivas, por lo cual son particularmente ventajosas para aplicar en tratamientos clínicos.

### **3.1 Estrategias de reactivación de la plasticidad: el tratamiento con fluoxetina**

La fluoxetina es un antidepresivo ampliamente utilizado (Prozac) que actúa inhibiendo la recaptación de la serotonina (5-hidroxitriptamina, 5-HT) en la hendidura sináptica potenciando así la transmisión serotoninérgica. El efecto de la serotonina en el cerebro depende de la composición de los receptores a nivel pre y postsináptico y de la interacción con otros sistemas neuromoduladores pudiéndose producir un efecto facilitador o supresor de la actividad neuronal. En la corteza visual primaria los receptores del tipo 5HT1A, cuya activación conlleva a la disminución de la excitabilidad neuronal, se encuentran principalmente en las neuronas piramidales. Se ha demostrado que la administración de serotonina en la corteza visual de animales adultos induce efectos sobre la plasticidad muy similares a los obtenidos con la administración de fluoxetina y que el efecto de ésta es mediado por receptores serotoninérgicos del tipo 1A (Maya Vetencourt et al., 2011), si bien otros receptores pueden contribuir en menor nivel. Por otra parte la serotonina puede tener un efecto autorregulatorio e inhibitorio sobre su propia liberación, mediado por autorreceptores. Este efecto podría explicar la acción terapéutica a largo plazo del tratamiento crónico con fluoxetina y con otros antidepresivos, en donde inicialmente habría un aumento en el nivel de serotonina extracelular y luego por un efecto compensatorio habría una disminución de la misma. En este sentido, se ha observado que la serotonina actúa sobre autorreceptores de tipo 1A que actúan reduciendo el influjo de  $Ca^{2+}$  e incrementando la conductancia del potasio, disminuyendo así la excitabilidad neuronal (Pineyro & Blier, 1999). Por ende la fluoxetina podría estar modulando el tono serotoninérgico *per se* así como el de otros neuromoduladores. Esto a su vez estaría desencadenando una cascada de señales que finalmente promueve cambios a nivel de la estructura de la cromatina que media la expresión de genes

tempranos específicos, aumentando de esta forma el nivel de plasticidad en el adulto (Maya Vetencourt et al., 2008).

La primera evidencia que la fluoxetina restaura altos niveles de plasticidad en el cerebro y permite la recuperación de funciones, se ha obtenido utilizando la corteza visual como modelo de plasticidad (Maya Vetencourt et al., 2008). En este trabajo se demostró que el tratamiento crónico con fluoxetina induce la plasticidad en ratas adultas, siendo sensibles a los efectos de la PM (reducción del índice de binocularidad) y que el aumento de plasticidad inducido por fluoxetina facilita la recuperación de la visión en animales ambliopes. Además, en este trabajo, utilizando otra aproximación experimental, se detectó la ocurrencia de WM-LTP en rodajas de corteza visual obtenidas de ratas adultas tratadas con fluoxetina, fenómeno característico del animal joven normalmente ausente en los animales adultos, indicando que la fluoxetina está induciendo plasticidad cortical en el adulto.

Recientemente en nuestro laboratorio (en colaboración con el Instituto di Neuroscienze del CNR di Pisa, Italia) hemos demostrado que la fluoxetina determina la reapertura de la plasticidad cortical también en el ratón adulto (Ruiz-Perera et al., 2015). Este dato es relevante porque valida al ratón como modelo de estudio de los efectos de la fluoxetina sobre la plasticidad cortical, modelo en el que los procesos de plasticidad han sido bien caracterizados y que presenta muchas ventajas, entre ellas la de poder utilizar animales genéticamente modificados.

### **3.2 Estrategias de reactivación de la plasticidad: el mantenimiento de los animales en un ambiente enriquecido**

Otra estrategia propuesta para la restauración de la plasticidad en animales adultos, es el mantenimiento de los animales en un ambiente enriquecido en estímulos sensorio-motores (EE, *enriched environment*). Esta consiste en mantener a los animales en cajas de dimensiones mayores, conteniendo variedades de elementos como ruedas, escaleras, juguetes, entre otros, que son reposicionados y/o substituidos varias veces por semana. Recientemente se ha demostrado que el aumento de la conducta exploratoria así como de la estimulación sensorio-motriz, resultada del EE, no sola reactiva la plasticidad en la corteza visual de ratas adultas sino que permite la recuperación completa de la agudeza visual y del índice de binocularidad de animales adultos ambliopes. Por otro lado se observó una completa restauración de WM-LTP en la corteza visual de ratas adultas mantenidas en EE (Sale et al., 2007; Baroncelli et al., 2010).

Debido a los resultados obtenidos en estos trabajos, la administración crónica con fluoxetina y el mantenimiento de los animales en un ambiente enriquecido se han vuelto dos estrategias comúnmente utilizadas para el estudio de los procesos de plasticidad cerebral.

#### **4. MECANISMOS FUNCIONALES Y ESTRUCTURALES INVOLUCRADOS EN CONTROLAR LOS NIVELES DE PLASTICIDAD EN LA CORTEZA VISUAL**

Como se mencionó anteriormente, comprender los mecanismos moleculares y celulares que determinan los procesos de plasticidad neuronal en mamíferos y que regulan la duración de los PC es de fundamental importancia. En los últimos años se ha demostrado y caracterizado la participación de varios factores en el control del PC y de los niveles de plasticidad en la corteza visual. Este es un proceso extremadamente complejo en donde juegan un rol relevante varios tipos celulares (células excitatorias, inhibitorias, gliales), diversos sistemas neuromoduladores (serotonina, acetilcolina, noradrenalina), varios componentes de la matriz extracelular (redes perineuronales, mielina), factores tróficos (BDNF, IGF-1), así como componentes moleculares pre- y postsinápticos (diferentes tipos de receptores), varias vías de señalización intracelular (ERK, PKA, CaMKII), factores de transcripción (CREB, NPAS4), etc.

Sin embargo, los resultados obtenidos en los últimos años han llevado a definir una hipótesis que simplifica la complejidad de los mecanismos que controlan la plasticidad cortical. La hipótesis actual plantea que el PC de plasticidad está determinado por el desarrollo natural de una secuencia temporal de eventos moleculares regulados fundamentalmente por dos factores principales: factores funcionales, en los cuales la relación entre el nivel de desarrollo del tono excitatorio y del tono inhibitorio (E/I) en la corteza jugaría un rol fundamental en determinar la apertura y el cierre del PC; 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.

##### **4.1 La maduración de los circuitos inhibitorios controla el curso temporal de los PC de plasticidad**

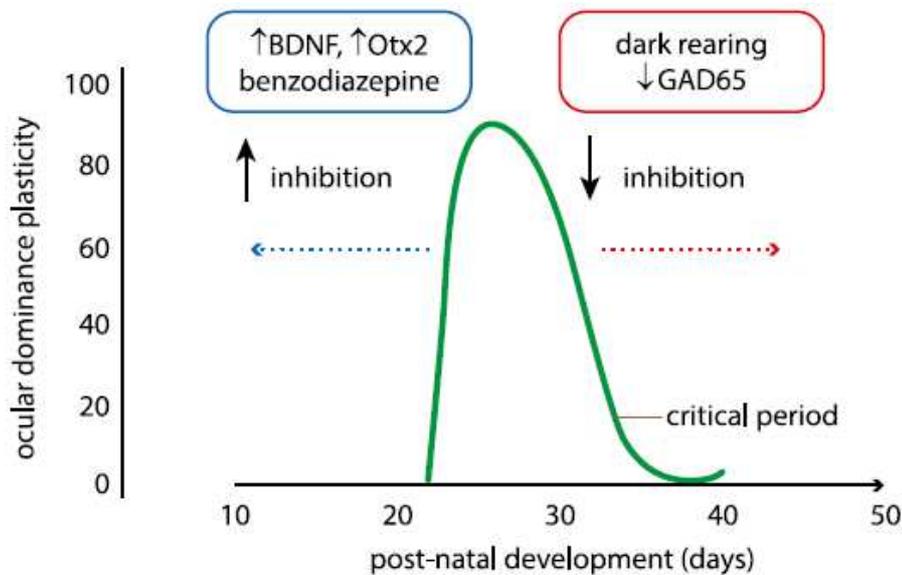
Considerando el balance entre el tono excitatorio e inhibitorio a nivel cortical (E/I), se ha demostrado que la maduración del sistema inhibitorio GABAérgico juega un rol clave en determinar la apertura, duración y cierre del PC de plasticidad (Figura 4). En varios sistemas neuronales

incluyendo la corteza visual, las conexiones excitatorias se desarrollan prematuramente y luego ocurre el desarrollo de los circuitos inhibitorios. Al aumentar el tono inhibitorio se modifica la relación E/I, alcanzando un umbral inicial, que determina la apertura del PC en el cual los circuitos neuronales son altamente susceptibles a la experiencia sensorial. A medida que el desarrollo continúa el tono inhibitorio sigue aumentando, hasta que se estabiliza, y se mantiene a nivel constante durante la vida adulta. En este modo se alcanza un segundo umbral en la relación E/I que determina el cierre del PC y como consecuencia un período con bajo nivel de plasticidad.

Esto ha sido demostrado en varios trabajos. Por ejemplo, ratones mutantes con niveles de inhibición intracortical reducidos debido a la ausencia de una isoforma de la enzima sintetizadora de GABA (glutamato decarboxilasa de 65 kDa, GAD65) no son susceptibles a la privación monocular durante el PC, por no haber alcanzado todavía el primer umbral de inhibición. Esta deficiencia se revierte aumentando la transmisión inhibitoria mediante el tratamiento con agonistas de los receptores GABA<sub>A</sub>, como son las benzodiazepinas (Hensch et al., 1998; Fagiolini & Hensch, 2000, Fagiolini et al., 2004).

Por otro lado, en animales transgénicos que sobreexpresan de forma precoz el factor neurotrófico derivado del cerebro, BDNF (ver más adelante), o en animales jóvenes normales tratados con benzodiazepinas se acelera la maduración de las neuronas inhibitorias GABAérgicas modificando el balance E/I, lo que desencadena una apertura y cierre prematuro del PC de plasticidad (Huang et al., 1999; Fagiolini & Hensch, 2000).

Se ha demostrado que los receptores GABA<sub>A</sub> a través de los cuales el GABA controla el PC en la corteza visual contienen la subunidad  $\alpha 1$ . Estos receptores son muy abundantes en las terminales de las *basket cells*, una clase de interneuronas GABAérgicas parvalbúmina-positivas (Pv+) que envían sus axones a grandes distancias a lo largo de la corteza envolviendo cuerpos celulares de neuronas piramidales. Estudios recientes indicaron que la homeoproteína OTX2 es liberada en función de la experiencia visual a nivel de la retina y es transferida hasta la corteza visual, en donde promueve la maduración de las interneuronas GABAérgicas Pv+ (Huang & Di Cristo G, 2008; Sugiyama et al., 2008). En esta línea, la infusión de OTX2 en la CV de animales jóvenes, antes del comienzo del PC, causa una respuesta plástica prematura a la PM (Sugiyama et al., 2008).



**Figura 4. Procesos inhibitorios controlan el curso temporal del PC.** La sensibilidad a la privación monocular en ratones está restringida al período crítico, que comienza una semana después de la apertura de los ojos y tiene su pico un mes luego del nacimiento. El inicio de la plasticidad puede ser retrasado si se impide la maduración de la inhibición cortical (mediante la delección de GAD65 o manteniendo a los animales en la oscuridad) (flecha roja). El aumento de la transmisión GABAérgica (mediante la administración de benzodiazepinas, BDNF u OTX2) provoca un inicio precoz del período crítico (flecha azul). *Modificado de Galizia & Lledo, 2013.*

También en los experimentos mencionados de restauración de la plasticidad en animales adultos se ha demostrado el rol del sistema inhibitorio en el control de la plasticidad. El tratamiento crónico con fluoxetina, así como el mantenimiento de los animales en ambiente enriquecido disminuyen los niveles de GABA extracelular modificando el balance E/I a favor de un estado más plástico. Los efectos de dichos tratamientos son bloqueados con la administración de diazepam (agonista receptores GABA<sub>A</sub>), sugiriendo que la reducción de la inhibición intracortical promueve la plasticidad de la corteza visual en el adulto (Sale et al., 2007; Maya Vetencourt et al., 2008; Sale et al., 2009; Baroncelli et al., 2010; Sale et al., 2010). Esto está en concordancia con lo demostrado por Harauzov et al., 2010, en donde vieron que reduciendo la inhibición (mediante el tratamiento con MPA o PTX, inhibidor de la enzima GAD65 o un antagonista del receptor GABA<sub>A</sub> respectivamente) se reactiva la plasticidad de la dominancia ocular así como la ocurrencia de WM-LTP en la corteza visual de ratas adultas. Estos resultados son la primera demostración directa de que en animales adultos normales, en donde los procesos inhibitorios han completado su desarrollo, una breve reducción de la inhibición GABAérgica, es suficiente para reabrir una ventana de plasticidad en la corteza visual incluso después de que el PC haya cerrado.

En la caracterización de los mecanismos que controlan la plasticidad dependiente de la experiencia en la corteza visual, han recibido particular atención las neurotrofinas. Estas son factores de crecimiento liberados por células neuronales y gliales que promueven el crecimiento de neuronas blanco, favoreciendo el desarrollo de sus arborizaciones dendríticas y/o de los axones. El factor de crecimiento de nervios (*Nerve Growth Factor*, NGF), el BDNF, la neurotrofina 3 (NT-3) y la neurotrofina 4/5 (NT-4) han sido vinculadas a varias formas de plasticidad sináptica en la corteza visual. Estas neurotrofinas interactúan con dos tipos de receptores (alta y baja afinidad) que a su vez activan varias vías de señalización intracelular (PKA, ERK 1/2, CaMKII), controlando así factores de transcripción que alteran la expresión génica. Típicamente las neurotrofinas funcionan de manera dependiente de la actividad, por lo tanto las neuronas más activas son las que más se benefician de su acción y son las que crecen más (Cohen et al., 1991; Diamond et al., 1992; Cabelli et al., 1995; Cohen & Fraser, 1995; Ghosh & Greenberg, 1995; McAllister et al., 1995; Wang et al., 1995).

La primera demostración de que las neurotrofinas juegan un papel importante en la plasticidad de la corteza visual surge de la observación de que la administración de NGF exógeno en la corteza visual evita los efectos de la privación monocular en la rata durante el PC (Maffei et al., 1992). Este hallazgo sugiere que durante los procesos de plasticidad cortical las proyecciones geniculocorticales compiten por un factor neurotrófico que es producido y liberado por las neuronas corticales de una manera dependiente de la actividad. De acuerdo con esta hipótesis, se demostró que la infusión de BDNF o NT-4 en la corteza visual de gato joven impide la correcta formación de las columnas de dominancia ocular durante el desarrollo, confirmando el rol fundamental de las neurotrofinas en el control de la remodelación estructural dependiente de la experiencia (Cabelli et al., 1995).

Uno de los mecanismos a través de los cuales las neurotrofinas modulan la plasticidad cortical es modificando el balance E/I. En particular, se ha demostrado que la sobreexpresión de BDNF acelera la maduración de la inervación GABAérgica en la corteza visual durante el desarrollo lo que resulta en una prematura plasticidad de la dominancia ocular (Hanover et al., 1999; Huang et al., 1999; Harauzov et al., 2010). En la misma línea, en animales privados de experiencia visual (mantenidos en condiciones de oscuridad total), en los cuales el PC de plasticidad es retrasado, la sobreexpresión de BDNF normaliza la ocurrencia del PC en el tiempo (Gianfranceschi et al., 2003). Por otra parte, se ha observado que en el adulto el tratamiento con BDNF provoca el efecto

opuesto sobre el tono inhibitorio, es decir, lo disminuye, favoreciendo así la reapertura de la plasticidad en animales adultos. En esta línea la infusión de BDNF en ratas adultas hace que estas sean sensibles a los efectos de la PM (Maya Vetencourt et al., 2008; Harauzov et al., 2010). También se ha visto que las estrategias de restauración de la plasticidad en el adulto (tratamiento con fluoxetina y el mantenimiento en ambiente enriquecido) inducen un aumento de los niveles de BDNF en la corteza visual que a su vez determina la disminución del tono GABAérgico (Maya Vetencourt et al., 2008; Baroncelli et al., 2010).

Otro factor de crecimiento recientemente involucrado en controlar la plasticidad cortical es el factor de crecimiento insulínico de tipo 1 (IGF-1). Se ha demostrado que tiene un efecto similar al BDNF, su sobreexpresión durante el desarrollo acelera la maduración del sistema inhibitorio y la apertura precoz del período crítico. A su vez la aplicación exógena de IGF-1 previene los efectos de la privación monocular sobre la dominancia ocular durante el período crítico de plasticidad (Tropea et al., 2006; Ciucci et al., 2007). De otro lado, la aplicación exógena en animales adultos promueve la plasticidad cortical disminuyendo el tono GABAérgico y así modulando el balance E/I (Maya Vetencourt et al., 2012).

#### **4.2 Componentes de la matriz extracelular son clave en la determinación del nivel de plasticidad**

En segundo lugar, se ha propuesto que la aparición de determinados factores moleculares en la matriz extracelular (MEC) jugaría un rol fundamental en determinar la duración del PC y la disminución de la plasticidad con el paso del tiempo. Los condroitín sulfato proteoglicanos (CSPG), son una clase de molécula que representa el principal componente de la matriz extracelular del cerebro. En el cerebro adulto, la mayoría de los CSPGs se condensan alrededor de los somas y de las dendritas de las interneuronas GABAérgicas Pv+ formando estructuras especializadas llamadas redes perineuronales (PNNs) que bloquean estructuralmente la reorganización de sus conexiones, limitando así la plasticidad (Hensch, 2005; Morishita & Hensch, 2008).

Se ha demostrado que el aumento de las redes perineuronales se correlaciona temporalmente con el cierre del PC, y que atrasando dicho cierre, se enlentece la formación de PNNs en la corteza visual (Pizzorusso et al., 2002). Por otro lado, la degradación selectiva de los CSPG que forman las redes perineuronales, mediante la administración exógena de la enzima condroitinasa ABC (ChABC) en la corteza visual de animales adultos, induce la reactivación de la plasticidad y promueve la

recuperación de los efectos causados por la PM prolongada iniciada durante el PC (Pizzorusso et al., 2002, 2006). Estos resultados sugieren que en el adulto, las redes perineuronales previenen la reorganización de los circuitos que se mantienen estables luego de su maduración, y que removiendo los componentes de la MEC que son inhibitorios para el crecimiento axonal, se proveería un ambiente permisivo para la plasticidad estructural. En esta línea, Sale et al., 2007 demostraron que mantener los animales en un ambiente enriquecido, que restaura la plasticidad de la corteza visual en animales adultos, produce una disminución de la densidad de PNNs en comparación a aquellos animales mantenidos en condiciones estándares. Aún más, la reactivación de la plasticidad de la dominancia ocular mediante la disminución de la inhibición GABAérgica en la corteza visual de animales adultos, está asociada con una reducción de las PNNs (Harauzov et al., 2010).

En línea con el rol de los factores extracelulares en controlar los procesos de plasticidad estructural, se ha demostrado la participación de la proteasa extracelular *tissue plasminogen activator* (tPA), una enzima presente en las neuronas que se libera de manera dependiente de la actividad (Mataga et al., 2002). Se ha demostrado que la disminución de la densidad de espinas dendritas inducida por la PM durante el PC, dependen de la tPA (Mataga et al., 2004; Oray et al. 2004). De hecho, en ratones deficientes para la tPA no se observan cambios en la dominancia ocular luego de someterlos a PM. Estos resultados demuestran un importante rol de tPA como un factor permisivo en “liberar” la MEC y así promover la reorganización estructural de las conexiones neuronales durante la privación monocular.

Otros factores extracelulares que también estarían involucrados en la determinación del curso temporal del período crítico de plasticidad, son una serie de factores mielínicos cuya maduración ocurre en paralelo con el cierre del PC y que también actuarían como “frenos” para la movilidad y crecimiento neuríticos. Se sabe que en la mielina existen varias moléculas que causan un fuerte efecto de inhibición del crecimiento y la movilidad axonal, lo que resulta en la disminución de la capacidad de reorganización de las conexiones, limitando la plasticidad (McGee et al., 2005; Yiu & He, 2006). En particular, las proteínas de la vaina de mielina Nogo-A y la glicoproteína asociada a la mielina (MAG) que se unen al receptor Nogo (NgR), actúan como inhibidoras de la plasticidad. Dichos receptores se expresan en neuronas corticales y su activación induce cascadas de señalización intracelular que inhiben el crecimiento neurítico. En ratones *knock-out* para el receptor o para su ligando Nogo-A, la susceptibilidad a la privación monocular persiste en el adulto,

confirmando que mecanismos dependientes de NgR participan directamente en restringir la plasticidad dependiente de la experiencia en la corteza visual (McGee et al., 2005). A su vez PirB (receptor pareado tipo inmunoglobulina B), que muestra una alta afinidad por Nogo-A y MAG, restringe la plasticidad en la corteza visual en el desarrollo (Syken et al., 2006; Atwal et al., 2008).

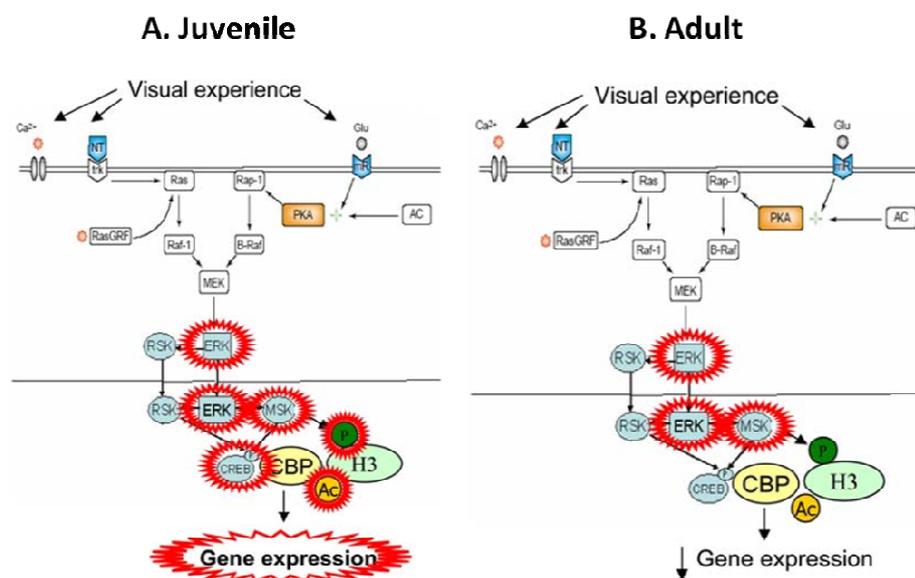
## 5. EXPRESIÓN GÉNICA DIFERENCIAL Y CONTROL DE LA PLASTICIDAD

### 5.1 Huella molecular

Considerando que los procesos de plasticidad dependen de modificaciones a largo plazo de los circuitos neuronales, estables en el tiempo, necesariamente requieren cambios en la expresión de genes y síntesis de nuevas proteínas. En los últimos años, se han utilizado análisis a gran escala principalmente a través de un enfoque genómico con el fin de identificar los genes y los respectivos programas de expresión que están involucrados en la regulación de los niveles de plasticidad en la corteza visual de varias especies. Se ha demostrado que mientras algunos grupos de genes se expresan durante toda la vida del individuo, otros son específicos del PC y otros se expresan únicamente en fases adultas. Esta expresión diferencial determinaría el potencial de plasticidad en función del tiempo y explicaría la diferencia entre la alta capacidad plástica característica del PC y la disminuida plasticidad del adulto. En esta misma línea, también se ha observado que la experiencia visual induce la expresión de grupos de genes parcialmente distintos en función de la edad. Por ejemplo, se ha observado que la PM induce la expresión de un grupo de genes cuando se realiza en el PC, y de otro grupo de genes parcialmente distinto cuando se realiza en animales adultos. Habría entonces un patrón de huellas moleculares determinado que registra la acción de la experiencia visual de distinta forma según la edad (Majdan & Shatz, 2006; Tropea et al., 2006).

Respecto a la activación de determinadas vías de señalización intracelular, un trabajo fundamental que ha demostrado una modulación diferencial de estas entre el período crítico de plasticidad y fases adultas, fue el de Putignano et al., 2007. En este, se observó que la exposición aguda a la luz induce cambios en la activación de factores de transcripción así como de modificaciones postraduccionales de las histonas durante el PC de plasticidad pero no en el adulto, sugiriendo una correlación entre estas modificaciones y los procesos de plasticidad. Para estudiar los efectos de la experiencia visual se mantuvieron los animales durante tres días en la oscuridad (*dark rearing*, DR), un grupo es sacrificado en esta condición mientras que otro es sacrificado luego de la exposición a

40-90 minutos de luz (*dark rearing + light, DRL*). La exposición a la luz comenzó en P24 - P25 (grupo durante el PC) o al P80 - P100 (grupo adulto). Estos autores demostraron que la experiencia visual durante el PC activa específicamente una vía de señalización intracelular que involucra las proteínas ERK, MSK, la activación de CREB y la expresión de genes dependientes de CREB, y determinadas modificaciones postraduccionales de histonas. Por otro lado, la estimulación visual en ratones adultos también activa ERK y MSK, pero no induce la activación de CREB y genes asociados y las modificaciones de histonas (Figura 5).



**Figura 5.** En la corteza visual de animales jóvenes (durante el PC) (A), ERK y MSK son fuertemente activados por la experiencia visual y su activación es requerida para la fosfo-acetilación de histonas y la expresión de genes mediados por CREB. En el adulto (B), ERK y MSK también responden a la estimulación visual, pero la acción sobre CREB y las histonas es limitada, resultando en una disminución de la expresión génica mediada por CREB. *Modificado de Medini & Pizzorusso, 2008.*

## 5.2 Factores de transcripción

Los resultados recién mencionados demuestran que la experiencia visual activa vías de señalización intracelular que controlan la expresión de genes de forma diferencial según el nivel de plasticidad. Para que dicha expresión de genes ocurra, es necesario el reclutamiento de factores de transcripción específicos. En el sistema visual los factores de transcripción mejor caracterizados en el control de la expresión de genes relacionados con procesos de plasticidad son CREB (*cAMP response element-binding protein*) y NPAS4 (*neuronal PAS domain protein 4*). En la corteza visual la

expresión y activación de CREB es regulada durante el desarrollo (Lalonde & Chaudhuri, 2007), y la transcripción de los genes mediada por CREB coincide con el PC de plasticidad y disminuye en el animal adulto (Pham et al., 1999, 2001). Más aun, la modulación experimental (disminución o aumento) de la expresión de CREB previene o restaura la plasticidad en ratones jóvenes y adultos respectivamente (Mower et al., 2002; Pham et al., 2004). Por otro lado ha sido recientemente demostrado que NPAS4 promueve la formación de las sinapsis inhibitorias en el sistema visual durante el desarrollo (Lin et al., 2008). Además se ha observado que la restauración de la plasticidad en adultos inducida por el tratamiento con fluoxetina es mediada por la activación de NPAS4. En particular, ratas adultas tratadas con fluoxetina a las que se les inhibió dicho factor, no son más sensibles a los efectos de la PM. Asimismo la sobreexpresión de NPAS4 en animales adultos determina *per se* la restauración de la plasticidad en la corteza visual (Maya Vetencourt et al., 2012).

### **5.3 Mecanismos epigenéticos de regulación génica**

La regulación de la transcripción génica requiere no solo la activación de factores de transcripción, sino además, el reclutamiento de coactivadores multifuncionales que estimulan o reprimen la transcripción (Rosenfeld & Glass, 2001) entre los cuales se encuentran programas epigenéticos que controlan la remodelación de la cromatina y la accesibilidad de la maquinaria transcripcional a los genes. El término epigenética se refiere a modificaciones heredables que alteran la expresión génica sin afectar la secuencia del ADN. Los factores que contribuyen a la regulación epigenética son numerosos e incluyen: microARN, metilación del ADN y modificaciones postraduccionales (MPT) de las histonas nucleosomales. La suma de todos los cambios inducidos por dichos factores se denomina epigenoma. A diferencia del genoma, el epigenoma es altamente variable entre células y fluctúa en el tiempo en cada célula.

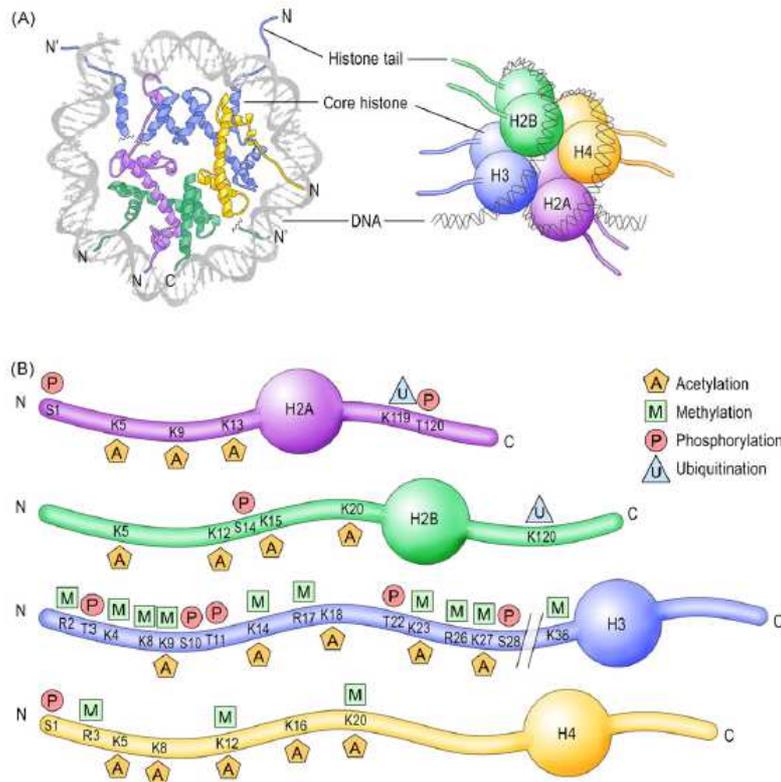
Los microARNs son pequeñas moléculas de ARN no codificante, de aproximadamente 22 nucleótidos de largo, que actúan como reguladores negativos a nivel post-transcripcional. Se unen complementariamente a la región 3'UTR (región que no se traduce) del ARNm blanco impidiendo su traducción al inducir su clivaje por endonucleasas que reconocen y degradan ARN doble cadena. Esto hace posible que un solo micro ARN controle la expresión de múltiples genes que poseen la misma secuencia en esta región del ARNm. Evidencia experimental reciente ha mostrado que los microARNs juegan un papel muy importante en la regulación de la plasticidad neuronal

dependiente de la experiencia. Se observó que un microARN específico del cerebro, miR-134, se localiza en el compartimento sinapto-dendrítico y media el efecto de las neurotrofinas como BDNF en la plasticidad estructural de las espinas dendríticas en neuronas de hipocampo de rata (Schratt et al., 2006). En la corteza visual, miR-132 (un microARN inducido por CREB) actúa como un mediador molecular de la actividad de la experiencia visual en los circuitos en desarrollo probablemente actuando sobre procesos de plasticidad estructural modulando las espinas dendríticas (Vo et al., 2005; Wayman et al., 2008; Edbauer et al., 2010; Hansen et al., 2010; Impey et al., 2010). Ha sido descrito que miR-132 aumenta su expresión en ratones inmediatamente luego de la apertura de los ojos y este aumento es retrasado si los animales son mantenidos en oscuridad. Por otra parte, se ha visto que la privación monocular reduce la expresión de miR-132 en la corteza contralateral al ojo privado de visión y si dicha reducción es contrarrestada mediante una infusión de oligonucleótidos miR-132, se bloquea completamente los efectos de la PM en la plasticidad de la dominancia ocular (Tognini et al., 2011). Del mismo modo se ha observado que la inhibición *in vivo* de miR-132 provoca que la PM durante el período crítico, no tenga efectos sobre la distribución de clases de dominancia ocular (Mellios et al., 2011). Estos resultados sugieren que miR-132 juega un rol crítico en la plasticidad de los circuitos de la corteza visual, posiblemente actuando a través de la modulación de la plasticidad de las espinas dendríticas.

La metilación del ADN es una modificación química que consiste en el agregado de grupos metilo sobre residuos citosina (C), por una enzima metiltransferasa (DNMT), que se encuentran incluidos dentro de secuencias repetidas (CG) del ADN. Los residuos CpG metilados mantienen a la cromatina en un estado “silenciado”, inhibiendo la actividad de los promotores incluidos en esa región del genoma, y por lo tanto impidiendo la transcripción de los genes controlados por dichos promotores. Estas modificaciones epigenéticas constituyen un importante mecanismo mediante el cual la experiencia sensorial en los primeros años de vida influye en el comportamiento. Esto ha sido demostrado en el caso del cuidado maternal; las crías de rata que reciben mayor cuidado maternal durante el desarrollo postnatal, muestran, en etapas posteriores de la vida, un mejor desempeño en las pruebas de aprendizaje y memoria, y son menos ansiosas comparadas con las que reciben menos cuidado maternal (Francis et al., 1999). Este comportamiento sería resultado de modificaciones epigenéticas que ocurren durante la primera semana de vida postnatal; el cuidado maternal promueve la expresión del receptor de glucocorticoides, y este fenómeno se acompaña de un estado de metilación de ADN disminuido en el área promotora del gen del receptor en el

hipocampo (Weaver et al., 2004). También ha sido establecido que la metilación del ADN juega un rol importante en los procesos de adicción (Nestler, 2014). Se ha observado que la exposición a la cocaína y a las anfetaminas altera los niveles de las enzimas metilasas y demetilasas del ADN en el Núcleo Accumbens (Anier et al., 2010; Deng et al., 2010; Im et al., 2010; LaPlant et al., 2010). Estos resultados ponen en evidencia la complejidad de la regulación del comportamiento mediante metilación del ADN. En la corteza visual de ratones se ha visto que la metilación del ADN tiene un rol en controlar la plasticidad de la dominancia ocular inducida por privación monocular. En particular, se ha visto que la PM durante el período crítico produce el aumento de enzimas DNMTs (DNMT1, DNMT3a y DNMT3b) en la corteza visual contralateral al ojo privado, mientras que la inhibición de dichas enzimas bloquea los efectos moleculares y funcionales de la PM (Tognini et al., 2015).

Uno de los factores más importantes de regulación epigenética son las modificaciones postraduccionales (MPT) de las histonas. Las proteínas histónicas se ensamblan con el ADN para formar los nucleosomas, bloques de construcción básicos de la cromatina, que se encuentran empaquetando el ADN en las células eucariotas. Son estructuras formadas por un octámero de histonas altamente conservadas (dos dímeros H2A-H2B y un tetrámero H3-H4) (Figura 6A), y se asocian entre sí a través de la histona H1 estableciendo un mayor nivel de compactación del ADN (fibra de 30 nm). Los extremos N-terminales de las histonas nucleosomales proyectan hacia afuera e interactúan con el ADN, y son susceptibles de sufrir varios tipos de modificaciones postraduccionales que ocurren en sitios específicos. En general las MPT provocan un cambio en la carga neta de los nucleosomas, lo cual puede llevar a cambios estructurales en la cromatina mediante la alteración de las interacciones de los nucleosomas con el ADN facilitando o limitando el acceso de la maquinaria de transcripción (Strahl & Allis, 2000; Turner, 2000; Jenuwein & Allis, 2001). Se conocen varias MPT, entre las más importantes se encuentran metilación, ubiquitinación, fosforilación y acetilación (Figura 6B), que pueden combinarse para modular la expresión génica (Fischle et al., 2003; Peterson & Laniel, 2004; Levenson & Swarr, 2005).



**Figura 6. Marcas epigenéticas en la cola de las histonas.** A: A la izquierda se muestra un esquema de una mitad de un nucleosoma asociado al ADN; a la derecha se representa la estructura del nucleosoma, formado por un octámoro de histonas compuesto por 4 histonas principales H2A, H2B, H3 y H4. B: Representación esquemática de los extremos N y C terminales de las histonas principales y sus MPT residuo-específicas. *Graff & Mansuy, 2008.*

La metilación de la histona tiene un doble impacto en la actividad transcripcional y está asociada tanto a genes transcritos activamente como a silenciados (Peters & Shubeler, 2005; Klose & Zhang, 2007). La misma se produce en diferentes formas, desde mono-, di- o tri-metilación de residuos de lisina, y juega un rol complejo en la regulación de la expresión de genes (Shilatifard, 2006). La ubiquitinación ha sido correlacionada con la activación transcripcional y también se ha identificado como un requisito previo para la posterior metilación de las histonas (He & Lehming, 2003; Shilatifard, 2006). Sin embargo, sus funciones precisas siguen sin estar claras. La fosforilación de las histonas es más comúnmente asociada con la activación transcripcional, presumiblemente porque crea una fuerza de repulsión entre la carga negativa de las fosfo-histonas y el ADN (Loury & Sassone-Corsi, 2003). Por último, la acetilación de las histonas generalmente está asociada con la activación transcripcional. La adición del grupo acetilo neutraliza la carga positiva del grupo amino del residuo de lisina (K), lo que disminuye la afinidad entre la cola de la histona y el ADN, relajándose la estructura de la cromatina (Brownell & Allis, 1996). La acetilación de histonas ejerce

sus efectos, ya sea por la remodelación física de la cromatina o por el reclutamiento y modulación de complejos moleculares que estimulan o repriman la transcripción (Jacobson et al., 2000; Peterson & Laniel, 2004).

Las enzimas que median estas diversas modificaciones reversibles covalentes de las histonas se denominan como "escritoras" o "borradoras". Por ejemplo, las acetiltransferasas de histonas (HATs) catalizan la acetilación de las histonas al transferir un grupo acetil de la acetil CoA al grupo NH<sup>+</sup>, y las histona desacetilasas (HDACs) catalizan su desacetilación; mientras que las metiltransferasas de histonas (HMTs) catalizan la metilación de histonas y las demetilinasas (HDMs) catalizan su demetilación. La especificidad de las numerosas HAT y HDAC para residuos específicos de K sigue sin comprenderse completamente. En contraste, distintas HMTs y HDMs controlan la metilación de residuos específicos de K y R e incluso la valencia de metilación, es decir los estados mono-, di-, o tri-metilados. Las consecuencias funcionales de las modificaciones de las histonas están mediadas en parte a través de "lectores", que son proteínas que se unen a residuos modificados específicos y afectan la actividad transcripcional (Strahl et al., 2000; Turner, 2000; Jenuwein & Allis, 2001; Jaenisch & Bird, 2003). Por ejemplo, las diferentes familias de proteínas remodeladoras de la cromatina, que utilizan la energía derivada del ATP para modificar el espaciado de los nucleosomas y su condensación, reconocen formas específicas de histonas modificadas y aumentan o reprimen la actividad de los genes cercanos. En última instancia, se cree que cientos de proteínas son reclutadas coordinadamente para controlar la transcripción de un gen. Así, las colas terminales de las histonas sirven como plataformas de integración de señales de extraordinaria complejidad, en donde las MPT son combinadas en un "código de histonas" que especifican funciones únicas y que dirigen la actividad de numerosos factores de transcripción, cofactores y la maquinaria transcripcional en general (Strahl et al., 2000; Fischle et al., 2003; Peterson et al., 2004; Levenson et al., 2005). Este código o patrón se lee, determinando la expresión de genes específicos.

En los últimos años se ha reconocido que la acetilación de las histonas juega un rol crucial en regular la expresión de determinados genes importantes para consolidar cambios plásticos asociados a varios procesos cognitivos en varias áreas del cerebro (Van Lint et al., 1996; Fass et al., 2003; Vecsey et al., 2007). En particular se ha demostrado que esta juega un rol fundamental en la consolidación de la memoria a largo plazo en el hipocampo (Levenson et al., 2004). Utilizando el paradigma del *contextual fear conditioning* en donde los animales aprenden a asociar contextos novedosos a un estímulo aversivo, se observó un aumento en los niveles de acetilación en el

residuo de lisina 14 de la histona H3, pero no de la histona H4, en la zona CA1 del hipocampo luego de una hora de entrenamiento con dicho paradigma (Levenson et al., 2004). La formación de este tipo de memoria depende de receptores NMDA y de la cascada de señalización ERK/MAPK en el hipocampo, en donde la inhibición de algunas de estas etapas bloquea la acetilación de la histona H3 y la formación de la memoria. Resulta interesante que, en este mismo estudio, se demostró que una forma diferente de memoria a largo plazo, *latent inhibition*, estaba asociada con una alteración en la acetilación de la histona H4 (utilizando un anticuerpo anti-lisina<sup>5,6,12,16</sup>H4), mientras que la H3 permanecía inalterada. Estos resultados sugieren que existe un código específico para la formación de la memoria en el hipocampo, en donde diferentes tipos de memorias están asociadas con modificaciones específicas de histonas. Por otro lado, utilizando también el paradigma del *contextual fear conditioning* se observaron alteraciones en el estado de acetilación de dichas histonas en otras áreas del cerebro como la corteza prefrontal (Bredy et al., 2007) y la amígdala (Maddox & Schafe 2011; Monsey et al., 2011), áreas importantes para la formación de otro tipo de memoria como el reconocimiento de objetos novedosos y el condicionamiento (Lattal et al., 2007; Lesburgueres et al., 2011).

Por otro lado, se ha observado que un desbalance entre los niveles de acetilación y desacetilación de las histonas está asociado con varios desórdenes neuropsiquiátricos, neurodegenerativos, y del desarrollo, como el síndrome de Rubinstein-Taybi (RTS) y la enfermedad de Alzheimer (AD). El RTS es un desorden del neurodesarrollo causado por una mutación en las principales enzimas histonas acetilasas, el coactivador p300 y CBP (Petrij et al., 1995; Roelfsema et al., 2005). Alarcon et al., 2004 demostraron que la depleción parcial o total de las proteínas CBP/p300 en el ratón causa déficits cognitivos luego del *contextual fear conditioning* así como déficits en tareas de reconocimientos de objetos, sugiriendo que la acetilación de histonas mediada por p300/CBP es esencial para la formación de la memoria. En esta línea, en pacientes RTS, se observó una disminución de la acetilación de las histonas H2A y H2B (López-Atalaya et al., 2012). Por otro lado el AD está marcado por una deterioración progresiva de las funciones cognitivas debida a la formación de las placas amiloide, ovillos neurofibrilares y pérdida neuronal en varias áreas del cerebro. En cultivos neuronales de ratón, se ha observado que la sobreexpresión de APP, proteína precursora de amiloide, provoca la disminución de la acetilación de la histona H3 y H4 así como de los niveles de CBP (Saura et al., 2004). Recientemente se ha demostrado que también en el envejecimiento ocurre una disminución de la acetilación del residuo de lisina 12 de la histona H4 en el hipocampo,

relacionada con una disminución de la transcripción de varios genes asociados a procesos de memoria (Peleg et al., 2010). Asimismo, el uso de múltiples drogas de abuso induce cambios en la acetilación de histonas en el cerebro que subyacen a algunas de las anomalías funcionales que se encuentran en los modelos de adicción (McQuown & Wood 2010; Renthal & Nestler 2008; Maze & Nestler 2011). En particular, se ha visto que la exposición aguda o crónica a la cocaína, induce un aumento en los niveles de acetilación de las histonas H3 y H4 en el Núcleo Accumbens (NAcc).

Considerando los procesos de plasticidad en la corteza visual se ha demostrado que el aumento farmacológico del nivel de acetilación de las histonas en animales adultos (mediante administración de inhibidores de la enzima histona desacetilasa, iHDAC) reactiva la plasticidad y revierte los déficits visuales en roedores adultos ambliopes (Putignano et al., 2007; Silingardi et al., 2010; Maya Vetencourt et al., 2011). Los inhibidores de desacetilasa, como por ejemplo el ácido valproico (VPA), el butirato de sodio (SB) y la tricostatina (TSA), son objeto de estudio intensivo por su potencial efecto terapéutico en el tratamiento de patologías no solo neurodegenerativas sino también inflamatorias y en el cáncer (Kazantsey & Thompson, 2008; Marks & Xu, 2009). Por otro lado se ha demostrado que también la restauración experimental de la plasticidad en la corteza visual de animales adultos ocurre a través de modificaciones epigenéticas. Por ejemplo la fluoxetina provoca un aumento en la acetilación de la histona H3 asociada al promotor de los exones I y IV del BDNF y una disminución en la expresión de la desacetilasa HDAC5 (Maya Vetencourt et al., 2011). También se ha demostrado que el mantenimiento de animales adultos en EE induce cambios en la acetilación de la histona H3 (Baroncelli et al., 2016).

## JUSTIFICACIÓN

---

La corteza visual primaria es uno de los modelos experimentales mejor caracterizados para el estudio de procesos de plasticidad neuronal, los que constituyen la base de la memoria y el aprendizaje (Hooks & Chen, 2007; Morishita & Hensch, 2008; Leamey et al., 2009). La existencia de un PC de plasticidad dependiente de una correcta entrada sensorial ha sido identificada en la corteza visual de varias especies, incluyendo el ser humano (Berardi et al., 2000).

La disminución del nivel de plasticidad con la edad tiene implicancias importantes para la clínica. Cuando el sistema ha perdido la capacidad de modificarse en función de la experiencia, es difícil implementar con éxito tratamientos que permitan recuperar funciones dañadas. Por ejemplo, en el sistema visual varias patologías que determinan ambliopía en humanos (disminución de agudeza visual y sensibilidad al contraste), si no son tratadas adecuadamente antes de los 9 años de edad, cuando el sistema es todavía plástico, se vuelven permanentes. En esta línea, surge la hipótesis de que la restauración de altos niveles de plasticidad en períodos caracterizados por una plasticidad reducida (por ejemplo adultos fuera del PC), podría facilitar la recuperación de funciones.

En los últimos años, utilizando el sistema visual como modelo experimental, se han desarrollado estrategias que permiten restaurar altos niveles de plasticidad en animales adultos favoreciendo así la recuperación de la visión en animales ambliópes (Morishita & Hensch, 2008). Entre ellas se encuentran la administración crónica del conocido antidepresivo fluoxetina, la exposición de los animales a un ambiente enriquecido en estímulos sensorio-motores (Sale et al., 2007; Karpova et al., 2008; Maya Vetencourt et al., 2008; Maya Vetencourt et al., 2011;) y el mantenimiento de los animales en condiciones de oscuridad (He et al., 2007). Estos descubrimientos son considerados muy importantes para el potencial tratamiento no solo de patologías del sistema visual, sino, en general, de patologías en las que el proceso de plasticidad sináptica es afectado, como sucede en los síndromes de Rett y de Down, en el autismo y en la esquizofrenia (Di Cristo, 2007; Sale et al., 2010; Fass et al., 2013).

Recientemente se ha demostrado que la expresión génica diferencial representa un mecanismo relevante en el control de los niveles de plasticidad cortical. Uno de los mecanismos epigenéticos que modulan dicha expresión diferencial y que podría ser relevante en el control de la plasticidad de la corteza visual, es la acetilación de las histonas. Esta modificación postraduccional ha sido

recientemente reconocida como un mecanismo crucial en la transcripción génica, altamente conservado y con un potencial regulatorio similar a la fosforilación (Norris et al., 2009).

En esta línea, el objetivo principal del presente proyecto es caracterizar en mayor detalle la acetilación reversible de las histonas H3 y H4, en modelos de plasticidad de la corteza visual del ratón. Para esto, se realizarán ensayos de Western blot para obtener información semi-cuantitativa del nivel de modificación de dichas histonas en varios modelos experimentales de plasticidad: animales jóvenes durante el PC con altos niveles de plasticidad, animales adultos con bajo nivel de plasticidad, animales adultos con plasticidad restaurada farmacológicamente por tratamiento con fluoxetina y animales adultos con alta plasticidad restaurada experimentalmente mediante el mantenimiento en un ambiente enriquecido en estímulos sensorio-motores. A su vez, se analizará con esta técnica los efectos de la experiencia visual sobre el nivel de acetilación de las histonas de interés en todas las condiciones experimentales recién mencionadas. Por otro lado, se realizarán ensayos de inmunofluorescencia para obtener información sobre la localización de la modulación de la acetilación de dichas histonas por la experiencia visual utilizando animales con altos niveles de plasticidad (animales jóvenes, durante el PC).

La comparación de los resultados obtenidos en las varias condiciones analizadas nos permitirá delinear un cuadro más preciso de los procesos epigenéticos de acetilación potencialmente responsables de la determinación del nivel de plasticidad en la corteza visual del ratón, y así brindar información útil para contribuir al conocimiento sobre las bases de la plasticidad neuronal en general y el tratamiento de patologías del sistema visual.

# HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

---

## HIPÓTESIS

En base a los antecedentes mencionados y de la importancia de obtener más información sobre los mecanismos subyacentes a los procesos de plasticidad cortical, postulamos como hipótesis que:

1. Existe una correlación entre los niveles de acetilación de las histonas y la plasticidad en la corteza visual.
2. La experiencia visual induce la acetilación de las histonas exclusivamente en condiciones de alta plasticidad.

## OBJETIVO GENERAL

El objetivo general de este proyecto es caracterizar uno de los procesos epigenéticos de regulación de la transcripción, la acetilación de las histonas H3 y H4, en modelos experimentales de plasticidad dependiente de la experiencia en la corteza visual del ratón.

## OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Estudiar el nivel de acetilación de las histonas H3 y H4 en modelos de plasticidad en condiciones basales:
  - Modelo de plasticidad durante el desarrollo: comparando animales jóvenes plástico durante el PC vs. animales adultos no plásticos AD.
  - Modelo de plasticidad restaurada en el adulto: comprando animales adultos con plasticidad restaurada por FLX vs. no tratados, y restaurada por EE vs. animales en SC.
2. Estudiar el efecto de la experiencia visual sobre el nivel de acetilación de las histonas H3 y H4 comparando el efecto de la misma entre:
  - Modelo de plasticidad durante el desarrollo: comparando animales jóvenes plásticos durante el PC (DRLPC/DRPC) y animales adultos no plásticos (DRLAD/DRAD).

- Modelo de plasticidad restaurada en el adulto: comprando animales adultos con plasticidad restaurada por FLX (DRLFLX/DRFLX) vs. no tratados (DRLAD/DRAD), y restaurada por EE (DRLEE/DREE) vs. animales en SC (DRLSC/DRSC).

# MATERIALES Y MÉTODOS

## 1. ANIMALES

Se utilizaron ratones (*Mus musculus*) de la cepa C57B6/J de 20 a 30 gramos de peso corporal. Los animales (n total=103) fueron mantenidos en condiciones estándar de temperatura ( $20^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ ), humedad (aproximadamente 50%) y ciclo de luz/oscuridad 14/10 horas respectivamente en el bioterio de la Unidad de Animales Transgénicos y Experimentación (UATE) del Institut Pasteur de Montevideo. Todos los experimentos en animales fueron aprobados por la Comisión de Ética en el Uso de Animales (CEUA, Institut Pasteur de Montevideo).

### 1.1 Grupos experimentales

Para verificar si existe una correlación entre los niveles de acetilación de las histonas y la plasticidad en la corteza visual se utilizaron los siguientes grupos experimentales:

MODELO	GRUPO EXPERIMENTAL	TÉCNICA
Plasticidad durante el desarrollo	PC: animales a 28 días postnatal (P28) en el pico del periodo crítico (n=6)	Western blot
	AD: animales adultos a P98 (n=6)	Western blot
Plasticidad restaurada en el adulto	FLX: animales adultos (P98) tratados con fluoxetina (de P70 a P98) (n=6)	Western blot
	AD: animales adultos sin tratamiento (control)	
	EE: animales adultos (P98) mantenidos en ambiente enriquecido (de P70 a P98) (n=6) SC: animales adultos mantenidos en condiciones estándares (control) (n=6)	Western blot

Para verificar si la experiencia visual induce cambios en el nivel de acetilación de las histonas se utilizó el clásico protocolo de DRL/DR mencionado anteriormente, en los siguientes grupos experimentales:

MODELO	GRUPO EXPERIMENTAL	TÉCNICA
Plasticidad durante el desarrollo	PC: animales a P28 expuestos ( <b>DRLPC</b> , n=6/7) y no expuestos ( <b>DRPC</b> , n=6/7) a la luz	Western blot / Inmunofluorescencia
	AD: animales adultos expuestos ( <b>DRLAD</b> , n=6) y no expuestos ( <b>DRAD</b> , n=6) a la luz	Western blot
Plasticidad restaurada en el adulto	FLX: animales tratados con fluoxetina ( <b>DRLFLX</b> , n=6) y no expuestos ( <b>DRFLX</b> , n=6) a la luz	Western blot
	AD: animales adultos sin tratamiento expuestos ( <b>DRLAD</b> , n=6) y no expuestos ( <b>DRAD</b> , n=6) a la luz	
	EE: animales mantenidos en ambiente enriquecido expuestos ( <b>DRLEE</b> , n=6) y no expuestos ( <b>DREE</b> , n=6) a la luz SC: animales mantenidos en condiciones estándares expuestos ( <b>DRLSC</b> , n=6) y no expuestos ( <b>DRSC</b> , n=6) a la luz	Western blot

## 1.2 Mantenimiento y tratamiento

### 1.2.1 Tratamiento con fluoxetina

Para el tratamiento con fluoxetina hidrocloreuro de animales adultos, la dosis (10-15 mg/Kg/día) y la duración del mismo (4 semanas, del día P70 al P98) 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 (ratas: Maya Vetencourt et al., 2008, 2011; ratones: Begenisic et al., 2014; Ruiz-Perera et al., 2015) y son eficaces a nivel celular, molecular y funcional (Dulawa et al., 2004; Rantamaki et al., 2007; Karpova et al., 2008; Maya Vetencourt et al., 2008, 2011; Ruiz-Perera et al., 2015). 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/Kg/día) consumida efectivamente, se midió el volumen de líquido total tomado durante el

tratamiento para calcular los mg de fluoxetina consumidos. Luego se dividió por el número de animales, el número de días de duración del tratamiento y la masa corporal media por ratón. Los ratones adultos controles fueron mantenidos en las mismas condiciones, sin la adición de fluoxetina en el agua. En la Tabla 1 se detallan un ejemplo de los datos utilizados para el cálculo de la dosis de fluoxetina consumida por ratón.

Nº animales por jaula	Días de tratamiento	Peso medio (g) por ratón	Vol. consumido por ratón por día (ml/día/ratón)	mg FLX consumido por ratón por día (mg/día/ratón)	Dosis de FLX consumido por ratón (mg/día/kg)
6	29	27.8	4.21	0.421	15.05

**Tabla 1. Ejemplo del cálculo de la dosis de fluoxetina hidrocloreuro utilizada en los experimentos.** Se muestra el número de animales y el volumen de agua consumido por ratón por día en cada jaula que se multiplicó por el coeficiente de dilución de fluoxetina hidrocloreuro (0.1mg/ml), obteniendo la cantidad de fluoxetina consumida por ratón. En base al número de días de tratamiento y el peso medio por ratón se obtuvo la dosis en mg por kg por día por ratón.

### 1.2.2 Ambiente enriquecido

El protocolo de ambiente enriquecido, su duración (4 semanas, del día P70 al P98) y las condiciones específicas, fueron seleccionados en función de lo indicado por estudios previos en donde se vio que dicho protocolo potencia la plasticidad en animales adultos (Karpova et al., 2008; Maya Vetencourt et al., 2008, 2011; Sale et al., 2007). El mismo consiste en el mantenimiento de los animales en jaulas de dimensiones superiores a las estándar (33x42x14 cm vs. 19x33x14 cm) conteniendo varios elementos de distintos colores, formas y texturas como túneles, cajas de plástico y cartón, entre otros. Estos elementos fueron reposicionados dos veces por semana y substituidos por otros una vez por semana. En las jaulas de ambiente enriquecido se alojaron 6 animales mientras que en las de control (condiciones estándares) se alojaron solo 3 animales por jaula sin agregar elementos.

### 1.2.3 Modelo de inducción por experiencia visual

Para el estudio del efecto de la experiencia visual sobre la acetilación de histonas se utilizó el protocolo utilizado por Putignano et al., 2007. Este consiste en mantener a los animales durante tres días en oscuridad (*dark rearing*, DR), una parte de ellos fueron sacrificados en la oscuridad (utilizado como grupo control, DR), mientras que otros fueron expuestos a 90 min de luz y luego

sacrificados (*dark rearing + light*, DRL). En detalle, los animales durante el PC fueron mantenidos en oscuridad de P25 a P28, un grupo fue sacrificado en oscuridad y la otra mitad fue sacrificada luego de 90 minutos de exposición a la luz. De la misma forma los animales adultos, ya sea animales de control sin tratamiento como en los modelos de plasticidad restaurada, se mantuvieron en oscuridad de P95 a P98, un grupo fue sacrificado en oscuridad y la otra mitad fue sacrificada luego de 90 minutos de exposición a la luz.

Luego del tratamiento correspondiente los animales fueron sacrificados según el análisis a realizar: por dislocación cervical para los experimentos de Western blot y por perfusión intracardiaca para los experimentos de Inmunofluorescencia.

## 2. EXPERIMENTOS DE WESTERN BLOT

### 2.1 Preparación de muestras

Inmediatamente después de la dislocación cervical se realizó la disección de los tejidos de interés en PBS 1X (*buffer* fosfato salino) previamente enfriado a 4°C. Para ello, se extrajo el cerebro manteniéndolo en hielo en solución salina (NaCl 0.9%), y se disecaron las regiones correspondientes a la corteza visual primaria bajo un microscopio estereoscópico, que fueron congeladas inmediatamente en nitrógeno líquido y guardadas a -70°C hasta su posterior utilización.

#### 2.1.1 Extracción ácida de histonas

Para la obtención de muestras enriquecidas en histonas se utilizaron protocolos de técnicas estándar detallados en Shechter et al., 2007 y Green & Do, 2009, sobre los cuales se hicieron pequeños ajustes. Los protocolos finalmente utilizados se detallan a continuación.

1. Colocar las cortezas visuales (de aproximadamente 20-40mg) en 100-200µl de *buffer* de lisis hipotónico HLB (10mM Tris pH 7.5, 1mM EDTA, 1mM ortovanadato de sodio (Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>), 1mM fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF), 10µg/ml Aprotinina, 1% Igepal CA-630).
2. Homogeneizar suavemente en tubo *ependorf* con mortero manual a 4°C y dejar 1 hora.
3. Centrifugar a 18000g durante 15 minutos a 4°C.
4. Descartar el sobrenadante, recuperar el *pellet*.
5. Agregar 500µl de solución ácida (0.2M HCl, 10% glicerol).

6. Agitar enérgicamente en vórtex hasta disolver el *pellet*.
7. Centrifugar a 18000g durante 30 minutos a 4°C.
8. Descartar el *pellet*, recuperar el sobrenadante.
9. Precipitar las proteínas presentes en el sobrenadante con 10 volúmenes de acetona fría (mantenida a -20°C durante al menos 15 minutos antes de usar).
10. Agitar en vórtex inmediatamente.
11. Centrifugar a 18000g durante 30 minutos a 4°C.
12. Descartar el *pellet*, recuperar el sobrenadante.
13. Lavar el *pellet* sin romperlo, con acetona fría y centrifugar a 18000g durante 10 minutos a 4°C.
14. Secar al aire a temperatura ambiente durante 10 minutos (no resecar).
15. Resuspender el *pellet* en un *buffer* que contiene 40mM Tris, 7M Urea, 2M Thiourea, 4% (w/v) CHAPS, 56mM DTT. Parte de la resuspensión se utiliza para estimar la concentración proteica y al resto se le agrega *Loading Buffer 4X* (2% SDS, 0.375M Tris, 10% glycerol, 5% beta-mercaptoethanol, 0.2% Bromophenol Blue) para la posterior separación de las proteínas por electroforesis.

### **2.1.2 Cuantificación proteica**

La cuantificación de proteínas se realizó mediante el método de Bradford en microplaca de 96 pocillos a  $\lambda$  595nm mediante extrapolación a partir de una curva estándar de referencia de albúmina de suero bovino (BSA) con concentraciones conocidas (Olson & Markwell, 2001) según el siguiente protocolo:

1. Se preparan los estándares de BSA (de 0 a 8 $\mu$ g/ $\mu$ l) y las muestras de concentración desconocida (0.5 y 1 $\mu$ l) en un volumen final de 140 $\mu$ l.
2. Se agrega 20 $\mu$ l de 1M NaOH para mejorar la solubilidad de las proteínas, que pueden precipitar con el contacto directo del reactivo de Bradford.
3. Se adiciona 40 $\mu$ l de reactivo de Bradford 5X (0.05% Azul brillante de Coomassie G-250, 23.75% etanol, 42.5% ácido fosfórico) a cada pocillo de la placa y se mezcla.
4. Se incuba durante 5 minutos a temperatura ambiente.
5. Se detecta la absorbancia a  $\lambda$  595 nm en un lector de placas.

6. Se prepara la curva de calibración, graficando absorbancia a 595nm en función de la concentración proteica, y se calcula la concentración proteica de las muestras a partir de la ecuación obtenida.

## 2.2 Electroforesis de proteínas

Las proteínas de las muestras utilizadas fueron separadas mediante electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE).

Para la realización de dichos geles se utilizó el siguiente protocolo:

1. Preparar el gel de corrida (*Running gel*) acrilamida/bis-acrilamida al 15% en 0,375M Tris pH 8.8, 0,1% SDS, 0,05% TEMED, 0,05% APS en H<sub>2</sub>O mQ (solución stock acrilamida 29.2 g/bis-acrilamida 0.8g en 100ml H<sub>2</sub>O mQ, 30%T, 2,67 %C).
2. Recubrir el gel con isobutanol al 50%.
3. Dejar polimerizar al menos una hora a temperatura ambiente.
4. Preparar el gel de concentración (*Stacking gel*) acrilamida/bis-acrilamida al 6% en 0.125M Tris pH 6.8, 0.1% SDS, 0.05% APS, 0.1% TEMED en H<sub>2</sub>O mQ).
5. Remover el isobutanol y enjuagar con agua destilada. Agregar el gel de concentración sobre el gel de corrida, e insertar el peine apropiado.
6. Dejar polimerizar una hora a temperatura ambiente.
7. Remover el peine, enjuagar con agua destilada, cargar los µl de muestras correspondientes (resuspendidas en *buffer* de resuspensión, como se detalla en el protocolo de extracción ácida), y cargar 5µl de marcador de peso molecular (Precision Plus Protein, Unstained Standards, BioRad).
8. Ensamblar el equipo de electroforesis, llenar con *buffer* de corrida para SDS-PAGE (0.1% SDS, 0.192% Glicina, 0.025M Tris pH 8.8, H<sub>2</sub>O mQ), y correr a 120V hasta que el azul de bromofenol alcance el gel de corrida. Luego subir el voltaje a 160V y correr hasta que el azul de bromofenol alcance al borde del gel.

## 2.3 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) son transferidas a una membrana de nitrocelulosa.

Para esto, se sigue el siguiente protocolo:

1. Una vez finalizada la corrida se desarma el equipo de electroforesis.
2. Se equilibra el gel migrado y la membrana, así como esponjas delgadas y papeles de filtro cortados al tamaño del gel, con el *buffer* de transferencia (25mM Tris, 192mM Glicina, 20% Metanol) en frío durante 15 minutos.
3. Se procede 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.
4. Se cierra el “*sándwich*” cuidando que todos los elementos estén bien sumergidos en el tampón de transferencia, evitando siempre la formación de burbujas.
5. Se lo coloca en la cuba de transferencia llena de dicho *buffer* frío y durante la transferencia este es mantenido a 4°C con bloques congeladores de hielo, y en agitación sobre un agitador magnético (*stirrer*).
6. Se aplica una corriente de 100V durante dos horas para que las proteínas se desplacen 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.
7. Una vez finalizada la transferencia, el gel se tiñe con Azul Brillante de Coomassie (0.1% Azul de Coomassie R-250, 50% etanol, 7% ácido acético) para corroborar que la mayoría de las proteínas se hayan transferido a la membrana. Por otro lado, la membrana se tiñe en forma reversible con Rojo de Ponceau (0.2% Rojo Ponceau S, 3% ácido tricloroacético (TCA)) por 10 minutos, para comprobar la eficacia de la transferencia donde se podrá ver la presencia de las proteínas así como para identificar el marcador del peso molecular.
8. 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.

## **2.4 Bloqueo e incubación de la membrana con anticuerpos**

Para que los anticuerpos utilizados se unan únicamente a las proteínas de interés y no a otros sitios de la membrana, se incuba la membrana con solución bloqueo de leche al 5% en PBS-T (0.1% Tween-20 en PBS) o BSA al 5% en PBS-T durante una hora a temperatura ambiente, con agitación suave.

Luego de haber bloqueado los sitios no específicos, se prosigue con la incubación de los anticuerpos (primarios y secundarios respectivos, ver Tabla 2 para los detalles de los anticuerpos utilizados) según el siguiente protocolo:

1. Se retira dicha solución de bloqueo.
2. Las membranas son incubadas con los anticuerpos primarios (diluidos en PBS-T) que van a reconocer las proteínas de interés, por 12-16 horas a 4°C en agitación suave.
3. Tras la incubación de los anticuerpos primarios, se realizan 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.
4. Seguidamente las membranas son incubadas con el anticuerpo secundario correspondiente (en PBS-T) conjugado a la peroxidasa durante una hora a temperatura ambiente en agitación suave.

Para minimizar la variabilidad experimental, cada muestra se cargó en paralelo en dos carriles del mismo gel, y dos geles se corrieron simultáneamente en el mismo aparato. Para cada gel, la membrana correspondiente obtenida luego de la electrotransferencia fue cortada en dos partes con el fin de obtener en cada mitad, una serie completa de las muestras cargadas. Una mitad se incubó con un anticuerpo que reconoce la forma total de la histona (H3 o H4), mientras que la otra mitad fue incubada con un anticuerpo que reconoce la histona solamente cuando se encuentra acetilada en la Lys 9 o 8 respectivamente (AcH3 o AcH4). Esto permite que las señales obtenidas para la forma acetilada y la total sean procesadas bajo las mismas condiciones y así poder compararlas.

La comparación del nivel de acetilación de las histonas se llevó adelante entre:

- PC, AD y FLX, cargando siempre las 3 muestras dos veces en paralelo en el mismo gel
- EE y SC, cargando siempre 2 o 4 muestras dos veces en paralelo en el mismo gel
- DRL y DR de las varias condiciones (PC, AD, FLX, EE, SC), cargando siempre un mínimo de dos muestras dos veces en paralelo en el mismo gel.

En algunos experimentos se procedió al *stripping* y reincubación de las membranas con el anticuerpo primario anti-Actina.

Para esto se siguió el siguiente protocolo:

1. La membrana que ya había sido procesada con un determinado anticuerpo, se lava con NaOH 0.2M durante 5 minutos.
2. Se realizan 2 lavados con PBS-T de 10 minutos cada uno para retirar el NaOH excedente.
3. Seguidamente se incuba la membrana con solución bloqueo, leche al 5%, por una hora a temperatura ambiente.
4. Se retira dicha solución y se procede a incubar la membrana con el anticuerpo primario anti-Actina por 12-16 horas a 4°C en agitación suave.
5. Una vez finalizado el tiempo de incubación, se realizan 3 lavados con PBS-T de 10 minutos cada uno en agitación rápida.
6. Finalmente se incuba con el anticuerpo secundario correspondiente durante una hora a temperatura ambiente en agitación suave.

**Tabla 2. Anticuerpos y bloqueo utilizados en los análisis de Western blot:**

<b>Anticuerpo Primario</b>	<b>Marca</b>	<b>Concentración</b>	<b>µg de muestra</b>	<b>Bloqueo</b>
H2A (conejo)	Cell Signaling	1:1000	20	BSA 5%
H2B (conejo)	Cell Signaling	1:1000	20	BSA 5%
H3 (conejo)	Cell Signaling	1:2000	15	Leche 5%
H4 (ratón)	Cell Signaling	1:1000	30	Leche 5%
Ac(Lys9)H3 (conejo)	Cell Signaling	1:2000	15	Leche 5%
P(Ser10)H3 (conejo)	Santa Cruz	1:1000	20	Leche 5%
Ac(Lys8)H4 (conejo)	Cell Signaling	1:5000	20	BSA 5%
Actina (conejo)	Sigma	1:5000	15 20 30	Leche 5%

<b>Anticuerpo Secundario</b>	<b>Marca</b>	<b>Concentración</b>
Cabra anti-Conejo	Cell Signaling	1:5000
Caballo anti-Ratón	Cell Signaling	1:5000

## 2.5 Revelado de la señal y obtención de imágenes

El revelado de la señal se realizó a través de la técnica de quimioluminiscencia. Para esto se sigue el siguiente protocolo:

1. Terminada la incubación con el anticuerpo secundario, se procede 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.

2. Luego, se incuban las membranas durante 5 minutos con una solución de revelado producida en el laboratorio que consiste en 2 soluciones: solución A (1.5M Tris-HCl pH 8.8, 1% Luminol, 0.44% ácido p-coumarico) y solución B (1.5M Tris-HCl pH 8.8, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) mezcladas en una relación A:B de 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 peroxidasa (HRP) del anticuerpo secundario.

Para la detección de la señal luminosa, al comienzo de la tesis se exponía la membrana a una placa fotográfica (Kodak) durante 10-20 minutos. Posteriormente la placa se incubaba durante algunos minutos en solución reveladora, y una vez obtenida una señal adecuada, se lava en agua y se la sumerge en la solución de fijación.

Luego, se comenzó a utilizar como sistema de detección el GBOX Chemi XT4 (Camara CCD 16bits 4.2MP Synoptic, GeneSys software versión 1.3.3.0, Database versión 1.69, Syngene), disponible en Facultad de Ciencias, debido a las ventajas de sensibilidad y dinámica que este presenta.

Para esto se sigue el siguiente protocolo:

1. Inmediatamente después de la incubación en la solución de revelado, se colocan las membranas en el GBOX y se procede 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*, tomando una imagen cada 1 minuto por 5-10 minutos (exposición de 1 minuto cada imagen). De este modo se obtiene una colección de 5-10 imágenes para cada experimento. Las membranas incubadas con anticuerpos anti-H3 y anti-Ach3 del mismo experimento fueron procesadas en simultáneo en el GBOX. Por otro lado, debido a la diferencia de intensidad de las señales obtenidas con los anticuerpos anti-H4 y anti-Ach4, las membranas correspondientes fueron procesadas separadamente.
2. Las imágenes obtenidas son guardadas en varios formatos (JPEG 8 bit, TIFF 16 bit) tanto en modo *Captured* como en *Displayed*.

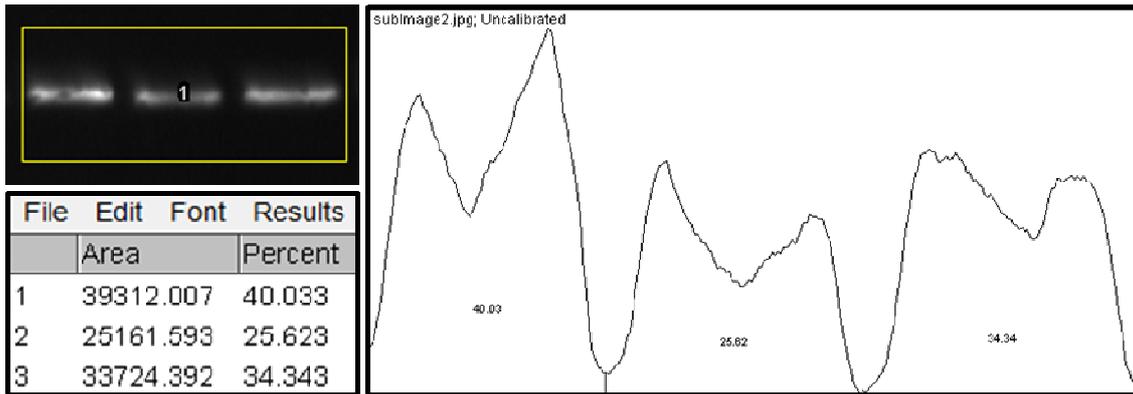
## 2.6 Análisis de las imágenes y obtención de datos

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>).

Un análisis preliminar demostró que al momento de obtener y analizar los datos, no había diferencia cuando se utilizaban imágenes guardadas como *Displayed vs Captured*, y como TIFF vs JPEG. Por cuestiones prácticas, el análisis final se llevó adelante utilizando las imágenes en JPEG (8 bits) guardadas como *Displayed*. 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 lo 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.

Para el análisis de las imágenes se siguió el siguiente protocolo:

1. Se abre la colección de imágenes obtenidas en el GBOX y se selecciona la mejor (JPEG 8bits, rango de píxeles de 0, negro, a 256, blanco).
2. Si las bandas en la imagen seleccionada no están de forma horizontal, se rota la imagen seleccionando: *Image/Transform/Rotate*.
3. Luego se selecciona *Rectangular Tool*, una herramienta que permite seleccionar de forma rectangular las bandas de interés que se quieren analizar, teniendo en cuenta que todas las bandas deben estar dentro de ese rectángulo.
4. Luego se selecciona el área que está dentro de ese rectángulo con *Analyse/Gels/Select First Lane*, y se procede al análisis de la señal dentro del mismo con *Analyse/Gels/Plot Lanes*.
5. Como resultado del paso anterior se obtiene una gráfica en donde se representa el nivel de grises (eje y, escala 0-256) a lo largo del rectángulo seleccionado (eje x, distancia en píxeles).
6. Luego, los picos correspondientes a las bandas de interés son separados manualmente y se substraen el *background* de modo homogéneo para todas las bandas (*Straight tool*).
7. Luego, con la herramienta *Wand tool* se seleccionan los picos.
8. Una vez que están todos los picos seleccionados, con *Analyse/Gels/Label Peaks* se obtiene el valor numérico del área integral debajo de cada pico en unidades arbitrarias así como el valor en porcentaje de cada pico respecto a la suma de los valores de todos los picos (Figura 7).



**Figura 7. Ejemplo representativo del análisis de las imágenes.** Se seleccionan las bandas de interés con *Rectangular Tool* y se procede con el análisis de las señales dentro del mismo. Se seleccionan los picos correspondientes a las bandas de interés y se calcula el valor numérico del área integral debajo de cada pico en unidades arbitrarias así como el valor en porcentaje de cada pico respecto a la suma de los valores de todos los picos.

9. Esos valores son transferidos a Excel.

10. Los valores en porcentaje correspondientes a las señales obtenidas con los anticuerpos contra las formas acetiladas de las histonas de una muestra, se dividen por los valores en porcentaje correspondientes a las señales obtenidas con los anticuerpos contra las formas totales de las histonas de la misma muestra (índice del nivel de acetilación de las histonas).

## 2.7 Análisis estadístico

Para el análisis estadístico se utilizó el programa Past 2.14 de análisis libre (Hammer et al., 2001). En los experimentos con muestras de PC, AD, FLX y EE, SC se utilizaron los datos correspondientes al índice de acetilación y se compararon entre las distintas condiciones. Para esto, se utilizó el *Two-tailed Student t test* con límite de significatividad  $p < 0.05$ . Para el análisis de inducción por luz de la acetilación, los datos correspondientes al índice de acetilación obtenidos en las muestras DRL se normalizaron a los datos obtenidos en las muestras DR. Para el análisis estadístico se compararon las condiciones DRL vs. DR utilizando el *Two-tailed Student t test*.

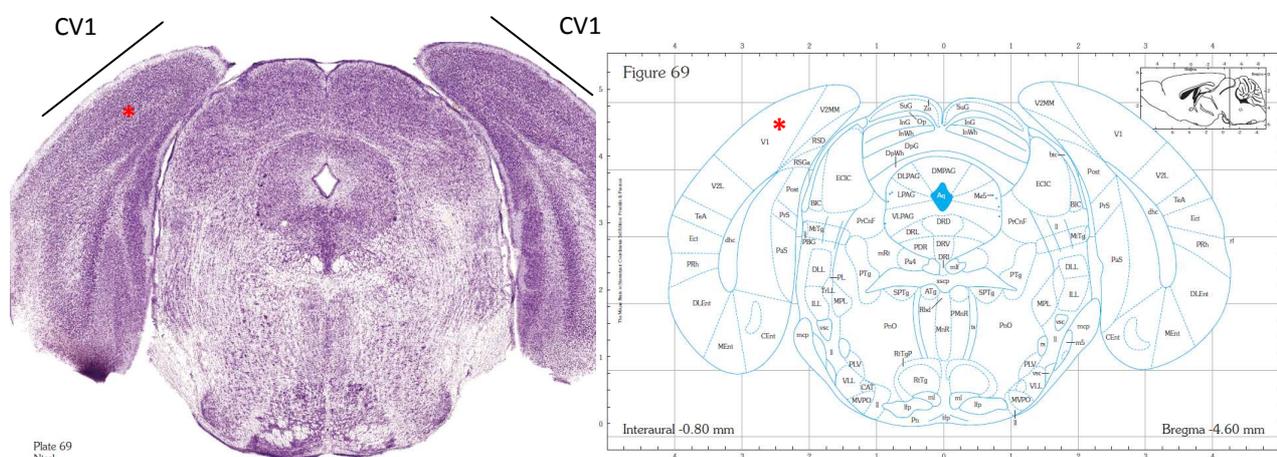
## 3. EXPERIMENTOS DE INMUNOFLORESCENCIA

### 3.1 Preparación de muestras

Los experimentos de Inmunofluorescencia se realizaron exclusivamente en animales DRL y DR en el PC de plasticidad. Para esto, una vez finalizado el tratamiento, los animales fueron anestesiados

profundamente con Xilacina/Ketamina 10/90 mg/kg de peso corporal. Luego fueron sacrificados por perfusión intracardiaca con aprox. 15ml de solución salina conteniendo 0.4% del anti-coagulante citrato de sodio, seguido por aprox. 50ml de paraformaldehido 4% en PBS 0.1M. Luego de la perfusión los cerebros fueron extraídos, post-fijados en paraformaldehido 4%, y crioprotectados en 30% de Sacarosa toda la noche. Se congelaron con Isopentano, y se almacenaron a -70°C.

Luego de 48 horas se realizaron cortes coronales de 35µm de la corteza visual en el criostato siguiendo las coordenadas estereotáxicas especificadas en el atlas del cerebro de ratón (Franklin & Paxinos, 2007) y se mantuvieron en PBS a 4°C durante 24 horas (Figura 8).



**Figura 8. Ejemplo representativo de un corte coronal de cerebro de ratón según las coordenadas estereotáxicas especificadas en el atlas del cerebro de ratón. \*: Región de la corteza que se utilizó para realizar los experimentos. CV1: corteza visual primaria.**

Una vez seleccionados los cortes a utilizar se prosigue con el siguiente protocolo:

1. Se realiza 1 lavado con PBS de 5 minutos de los cortes seleccionados.
2. Seguidamente los cortes en *free-floating* son sujetos a 1 hora de bloqueo en PBS-Tritón 0.2%-BSA 5%.
3. Terminada la hora, los cortes son incubados con los anticuerpos primarios (diluidos en PBST 0.2%-BSA 1%, que van a reconocer las proteínas de interés) o con el medio de dilución (utilizado como control) por 12-16 horas a 4°C en agitación suave. En la Tabla 3 se muestran los detalles de los anticuerpos utilizados.
4. Tras la incubación de los anticuerpos primarios, se realizan 3 lavados con PBS de 5 minutos cada uno en agitación rápida para retirar los anticuerpos que no se unieron.

5. Posteriormente los cortes son incubados con el anticuerpo secundario conjugado a un fluoróforo (diluido en PBST 0.2%-BSA 1%) o con el medio de dilución (utilizado como control) durante una hora a temperatura ambiente en agitación suave.
6. Una vez finalizado el tiempo de incubación, se realizan 3 lavados con PBS de 5 minutos cada uno en agitación rápida.
7. Terminados los lavados, se procede con el montaje de los cortes en los portaobjetos.
8. Finalmente se deposita la solución de montaje PBS-Glycerol 50% para cubrir los cortes con cubreobjetos y estos se sellan con esmalte.

**Tabla 3. Anticuerpos utilizados en los experimentos de Inmunofluorescencia:**

<b>Anticuerpo Primario</b>	<b>Marca</b>	<b>Concentración</b>
Ac(Lys9)H3 (conejo)	Cell Signaling	1:1000
Ac(Lys8)H4 (conejo)	Cell Signaling	1:1000

<b>Anticuerpo Secundario</b>	<b>Marca</b>	<b>Concentración</b>
Cabra anti-Conejo FITC 488	Cell Signaling	1:2000

### 3.2 Obtención de imágenes

El análisis de los cortes y la obtención de imágenes para el posterior análisis se realizó en el microscopio confocal (LSM800 Zeiss) utilizando el software “ZEN Microscope and Imaging Software-Zeiss” (ZEN) del Institut Pasteur de Montevideo. Se utilizaron objetivos 25X para la obtención de imágenes representativas de corteza visual, y 63X para confirmar que la marcación observada, con los anticuerpos utilizados, era nuclear. Ambos objetivos se utilizaron con previa inmersión en aceite mineral.

Se obtuvieron cortes de corteza visual marcados tanto con Ach3 como con Ach4 de 7 animales DRL y 6 animales DR. De cada animal con cada anticuerpo se obtuvieron aprox. entre 10 y 14 imágenes de campos representativos de la corteza visual. Para obtener una imagen completa del área de interés se utilizó la función *stitching tiles* con el objetivo 25X. Se adquirieron imágenes de diferentes tamaños según la cantidad de *tiles* aplicados: de  $947\mu\text{m}^2/3788\text{pixel}^2$  (4X4 *tiles*), de  $1180\mu\text{m}^2/4710\text{pixel}^2$  (5X5 *tiles*) o de  $1410\mu\text{m}^2/5632\text{pixel}^2$  (6X6 *tiles*). Finalmente las imágenes se salvaron en formato .czi para poder ser abiertas con el programa ZEN para su posterior análisis.

### 3.3 Análisis de las imágenes

Las imágenes fueron analizadas con el software (Fiji Is Just) ImageJ 1.50e (<http://fiji.sc/Fiji>) para contar células positivas siguiendo el siguiente protocolo:

1. Se abre la colección de imágenes obtenidas en el programa ZEN guardadas en formato TIFF.
2. Se ajusta el tipo de imagen con: *Image/Type/8 bit*.
3. Se ajusta el tamaño de la imagen con: *Image/Adjust/Size* según los *tiles* utilizados.
4. Se ajusta la escala de la imagen según el objetivo utilizado con: *Analyze/Set scale/* para el objetivo 25X: *Distance in pixels: 1, Known distance: 0.25, Pixel aspect ratio: 1, Unit of length: micrón*; para el objetivo 63X: *Distance in pixels: 1, Known distance: 0.63, Pixel aspect ratio: 1, Unit of length: micrón*.
5. Se ajusta el *Threshold (Image/Adjust/Threshold)* calculado previamente para cada imagen según  $Threshold = \text{MGVns de cada imagen} + D$  promedio, siendo MGVns “*mean gray value non specific*” el promedio del *background* de cada imagen, y D el promedio de la suma de los D de cada imagen para cada anticuerpo, siendo  $D = \text{MGVns} + 2 \times \text{SD}$ , siendo SD el desvío estándar.
6. Se selecciona el área a cuantificar manualmente con el *Rectangular tool*, de manera de abarcar todas las capas de la corteza visual.
7. Se analiza el número de partículas especificando los parámetros de Área y Circularidad con: *Analyze/Analyze particles/Size: 20-Infinity micron<sup>2</sup>, Circularity: 0.05-1*. Dichos parámetros fueron previamente establecidos según la marcación obtenida.
8. El resultado que se obtiene es el número de células positivas que cumplen con los parámetros establecidos y el área del rectángulo seleccionado (en  $\mu\text{m}^2$ ).
9. Dichos valores se pasan al Excel donde se calcula la densidad de células positivas  $(D) = \text{n}^\circ \text{ células positivas} / \text{área del rectángulo}$ , y se prosigue con la comparación y el análisis estadístico.

### 3.4 Análisis estadístico

Para el análisis estadístico se utilizó el programa Past 2.14 de análisis libre (Hammer et al., 2001). Para el análisis se utilizaron los valores de células positivas. Para el análisis estadístico se compararon las condiciones DRL vs. DR utilizando el *Two-tailed Student t test*.

## 1. PUESTA A PUNTO DE LAS TÉCNICAS

Antes de comenzar con el análisis de los niveles de acetilación de las histonas en estudio, fue necesario poner a punto ciertos aspectos de las metodologías utilizadas.

### 1.1 Western blot

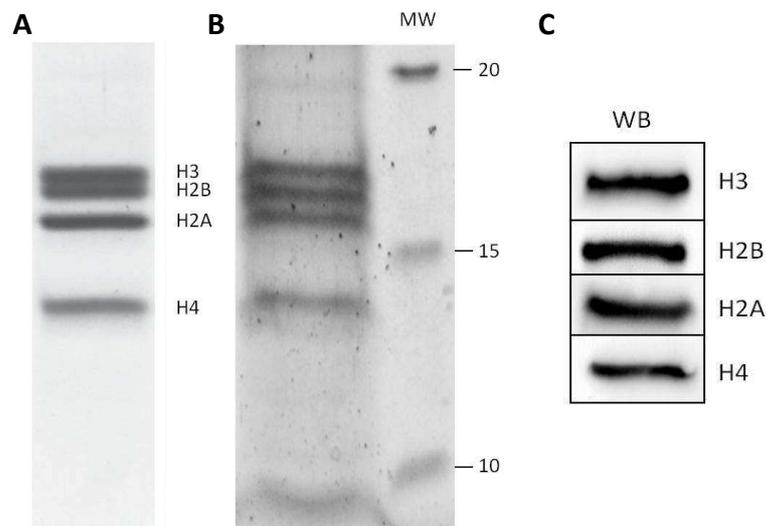
#### 1.1.1 Verificación de la presencia de histonas en muestras de CV obtenidas por extracción ácida

Para obtener muestras de corteza visual enriquecidas en histonas se decidió utilizar una metodología estándar, la extracción ácida (Shechter et al., 2007; Green & Do, 2009), la cual fue puesta a punto por estudios previos del laboratorio llevados a cabo por la Mg. Natalia Bornia. Para la misma, las muestras son homogeneizadas en *buffer* de lisis hipotónico, conteniendo inhibidores de fosfatasas y proteasas de manera de preservar la estructura de las proteínas y sus modificaciones postraduccionales. Posteriormente la muestra se homogeniza mecánicamente y se centrifuga. A continuación se adiciona HCl que permite separar las histonas del ADN y, luego de centrifugar, obtener un sobrenadante enriquecido en proteínas básicas, especialmente histonas. Finalmente, estas proteínas se precipitan mediante la adición de acetona a  $-20^{\circ}\text{C}$ , y luego se resuspenden en *buffer* de resuspensión como se menciona anteriormente en la sección Materiales y Métodos (Véase punto 2.1.1).

Antes de proceder con la utilización de las muestras experimentales, para confirmar la presencia de los principales tipos de histonas, así como el mantenimiento de las MPT luego de la extracción ácida, se realizaron experimentos de electroforesis y de Western blot utilizando anticuerpos específicos que reconocen las formas principales de las histonas H2A, H2B, H3 y H4, y experimentos con anticuerpos que reconocen las histonas H3 y H4 con determinadas MPT.

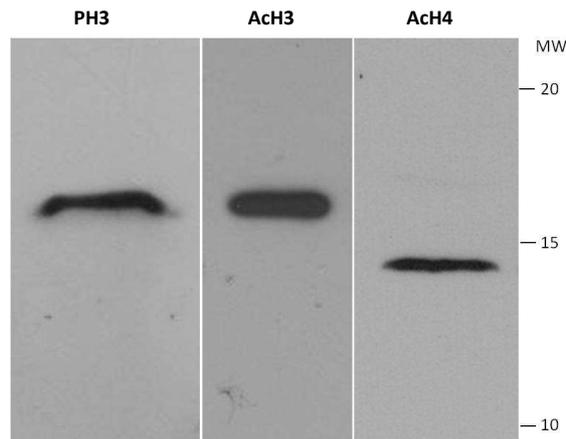
En la Figura 9A se muestra un gel SDS-PAGE de extracto de células HeLa indicando la distribución de las histonas H2A, H2B, H3 y H4 (de Shechter et al., 2007). Por otro lado en la figura 9B se presenta un ejemplo de un gel SDS-PAGE al 15% con  $20\mu\text{g}$  de muestra de CV obtenida por extracción ácida y teñido con Azul de Coomassie. La comparación del perfil de bandas entre ambas imágenes, confirma que el perfil de bandas obtenido en nuestro gel corresponde a la clásica distribución de las

formas principales de histonas. Este gel fue transferido a membranas de nitrocelulosa que se incubaron con los anticuerpos primarios correspondientes. Luego de incubar con los anticuerpos secundarios específicos, se reveló la señal luminosa como se describe en la sección Materiales y Métodos (Véase punto 2.2.5). Cada anticuerpo reconoció una banda principal (aprox. 14 kDa para H2A y H2B, 17 kDa para H3 y 11 kDa para H4), confirmando así la presencia de las principales formas de las histonas en dicho extracto (Figura 9C).



**Figura 9. Verificación de la presencia de las principales formas de histonas en extractos ácidos de CV.** A: Western blot de extracto de células HeLa indicando la distribución de las histonas H2A, H2B, H3 y H4 (de Shechter et al., 2007). B: Gel SDS-PAGE al 15% teñido con azul de Coomassie. Se cargaron 20µg de muestra enriquecida en histonas de corteza visual de ratón adulto, obtenida mediante extracción ácida. Se observa que el patrón de bandas obtenido, se corresponde a la clásica distribución de las formas principales de histonas. C: Análisis por Western blot utilizando anticuerpos contra H2A, H2B, H3 y H4 (ver Materiales y Métodos para los detalles). MW: peso molecular en kDa.

Para verificar que las MPT de las histonas se mantienen luego de la extracción ácida de las muestras de prueba, se realizaron experimentos de Western Blot utilizando un anticuerpo que reconoce específicamente la histona H3 fosforilada en la serina 10 (PH3), otro que reconoce la H3 acetilada en lisina 9 (AcH3), y otro que reconoce la H4 acetilada en lisina 8 (AcH4) (ver Tabla 1). Como se puede observar en la Figura 10, los anticuerpos anti-PH3 y anti-AcH3 reconocieron una banda principal del peso molecular correspondiente a la histona H3 (17 kDa), mientras que el anticuerpo anti-AcH4 reconoció una banda principal del peso molecular correspondiente a la histona H4 (11 kDa), indicando que estas MPT son preservadas en los extractos utilizados.



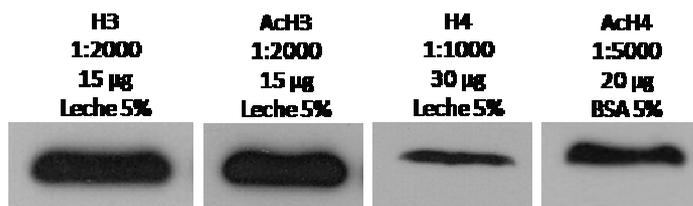
**Figura 10. Verificación del mantenimiento de las MPT en extractos ácidos de CV.** Western blot representativo con anticuerpos anti-PH3, anti-AcH3 y anti-AcH4 de muestra de corteza visual de ratón adulto obtenida mediante extracción ácida. Anti-PH3 y anti-AcH3 reconocen una única banda a 17 kDa, mientras que anti-AcH4 reconoce una única banda a 11 kDa. MW: peso molecular en kDa.

En conclusión, estos experimentos indican que la metodología utilizada para la preparación de las muestras permite obtener muestras enriquecidas en histonas y que además estas mantienen las principales MPT.

### 1.1.2 Puesta a punto de los anticuerpos

Como se menciona anteriormente, con el fin de estudiar el nivel de acetilación de las histonas H3 y H4 y su modulación por la exposición aguda a la luz en la corteza visual del ratón, se realizaron ensayos de Western blot con: (i) anticuerpos que detectan el nivel endógeno total de la histona H3 o H4 (anti-H3 o anti-H4, que reconocen a las histonas tengan o no alguna MPT), y (ii) anticuerpos que detectan los niveles endógenos de H3 o H4 solo cuando se encuentran acetiladas en Lys9 o Lys8 respectivamente (anti-AcH3 o anti-AcH4).

Para identificar las condiciones óptimas para la detección de las proteínas de interés con los anticuerpos mencionados, se realizaron varios experimentos, probando tanto la cantidad proteica de muestra a cargar (entre 15 y 40µg), la concentración de los anticuerpos primarios (entre 1:1000 y 1:5000) y secundarios (1:2500 y 1:10000), así como la solución bloqueo a utilizar (leche o BSA al 5%). Luego de una serie de ensayos se decidió utilizar los parámetros mencionados en la Tabla 2 de la sección Materiales y Métodos (Véase punto 2.4). En la Figura 11 se puede observar un ejemplo de los experimentos de puesta a punto de la funcionalidad de los anticuerpos, mostrándose Western blots realizados con las condiciones óptimas elegidas para realizar el resto de los ensayos.

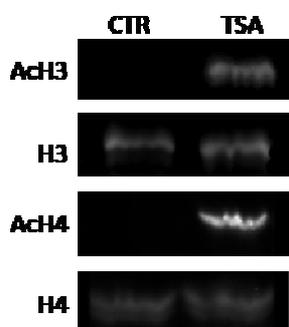


**Figura 11. Ejemplos de la puesta a punto por Western blot de la funcionalidad de los anticuerpos anti-H3, anti-AcH3, anti-H4 y anti-AcH4.** SDS PAGE 15%. 15µg CV para H3 y AcH3/ 30µg CV para H4/ 20µg CV para AcH4. Bloqueo con Leche 5% (H3, AcH3 y H4) o BSA 5% (AcH4).

### 1.1.3 Estudio de la especificidad de los anticuerpos

Una vez realizada la puesta a punto de los anticuerpos y escogidas las condiciones óptimas, la especificidad de los anticuerpos en detectar modulaciones en el nivel de acetilación de las histonas fue testeada sobre células CHO (Chinese hamster ovary) tratadas durante 4 horas con 50ng/ml de Tricostatina A (TSA), un inhibidor de las enzimas deacetilasas. Para esto, se realizaron geles SDS-PAGE al 15% y se cargaron entre 15-30µg de muestra de células CHO tratadas con TSA o células controles (CTR) sin tratamiento resuspendidas en el *buffer* de corrida (provisas por Dr. Wilner Martínez-López, IIBCE).

Se pudo verificar que los anticuerpos contra las formas acetiladas de las histonas en estudio son capaces de reconocer modulaciones en el nivel de acetilación (Figura 12). Los anticuerpos anti-AcH3 y anti-AcH4 reconocen una única banda de aproximadamente 17kDa y 11kDa respectivamente, únicamente en muestras de células tratadas con TSA y no en muestras controles. Por otro lado, los anticuerpos contra las formas totales de las histonas (anti-H3 y anti-H4) reconocen una única banda de aproximadamente 17kDa y 11kDa respectivamente tanto en células tratadas como de control.



**Figura 12. Western blot representativo del testeo de la especificidad de los anticuerpos.** TSA: tratamiento de células CHO con Tricostatina A (4 horas, 50ng/ml); CTR: células controles sin tratamiento. Los anticuerpos reconocen una única banda en aproximadamente 17kDa (H3 y AcH3) o en 11kDa (H4 y AcH4).

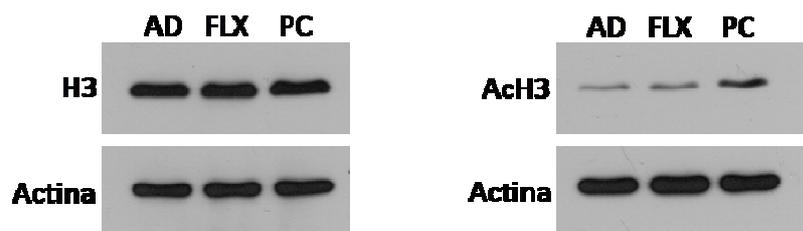
#### 1.1.4 Puesta a punto de la estrategia para analizar la modulación del índice de acetilación de las histonas

Para identificar una posible modulación del nivel de acetilación de las histonas, clásicamente se calcula la relación entre la señal obtenida con el anticuerpo que reconoce la forma acetilada y la señal obtenida con el anticuerpo que reconoce la forma total, para así estimar el índice de acetilación de la histona en estudio (en nuestro caso AcH3/H3 y AcH4/H4).

Una estrategia es incubar la misma membrana primero con el anticuerpo contra la forma acetilada de la histona, lavarla por *stripping*, y luego re-incubarla con el anticuerpo contra la forma total de dicha histona. Como esta aproximación, en la cual las dos señales se obtienen sobre el mismo carril de la misma membrana, no proporcionó los resultados esperados, se decidió probar con otra estrategia alternativa.

Para esto, se cargó una serie completa de muestras en duplicado en dos geles distintos, una de las membranas fue incubada con el anticuerpo anti-AcH3 o anti-AcH4 y la otra con el anticuerpo contra la forma total correspondiente. Debido a que de este modo las dos señales se obtienen en distintos carriles en distintos geles, es necesario verificar la homogeneidad de carga. Para esto luego de obtener las señales de los anticuerpos contra las histonas, las membranas fueron lavadas por *stripping* y re-incubadas con un anticuerpo que reconoce el *housekeeping gene* Actina. Así, las señales obtenidas con los anticuerpos contra las histonas en cada carril son normalizadas a las señales obtenidas con el anti-Actina del mismo carril. Luego, con estos valores, se calcula el índice de acetilación ( $[\text{AcH3}/\text{Actina}]/[\text{H3}/\text{Actina}]$  y  $[\text{AcH4}/\text{Actina}]/[\text{H4}/\text{Actina}]$ ).

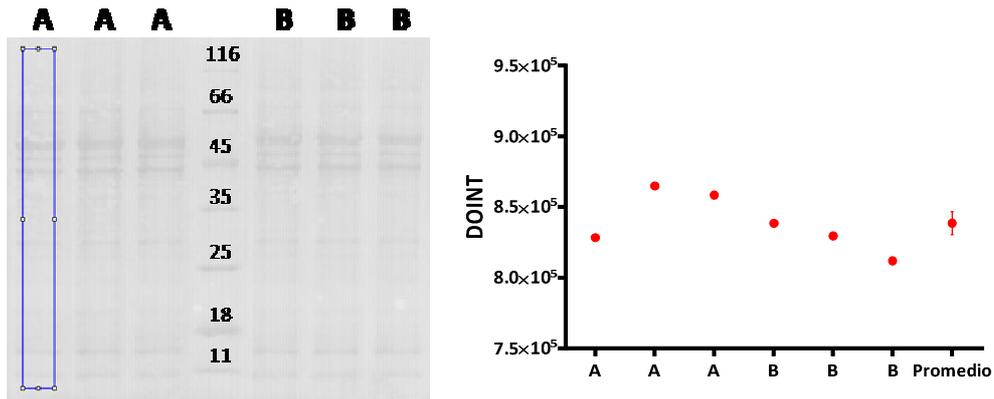
Este procedimiento se realizó con los 4 anticuerpos utilizados, pero únicamente en las membranas que habían sido previamente incubadas con el anticuerpo anti-H3 o anti-AcH3 se logró observar la banda correspondiente a la Actina de aproximadamente 43kDa (Figura 13). En las membranas que habían sido incubadas con los anticuerpos anti-H4 y anti-AcH4 no fue posible observar dicha banda.



**Figura 13. Western blot representativo del *stripping* con Actina en membranas previamente incubadas con anti-H3 y anti-AcH3.** El anticuerpo anti-Actina dio una única banda de aproximadamente 43kDa tanto en la membrana previamente incubada con anti-H3 como con anti-AcH3.

Por esta razón se descartó este procedimiento y se decidió utilizar otros métodos para verificar la homogeneidad de carga en los experimentos. Luego de la electrotransferencia, antes de proceder con la incubación de las membranas con los anticuerpos, las mismas fueron teñidas con Rojo Ponceau, un colorante no específico que tiñe todas las proteínas presentes en la membrana. La tinción con este colorante para verificar el control de carga es un modo alternativo y con mayores ventajas que la utilización de *housekeeping genes*, ya que la misma no se basa en una única proteína cuya expresión, además, puede variar en ciertas condiciones experimentales o estar saturada en los niveles de carga que son necesarios para la detección de la señal de determinadas proteínas en estudio (Romero-Calvo et al., 2010)

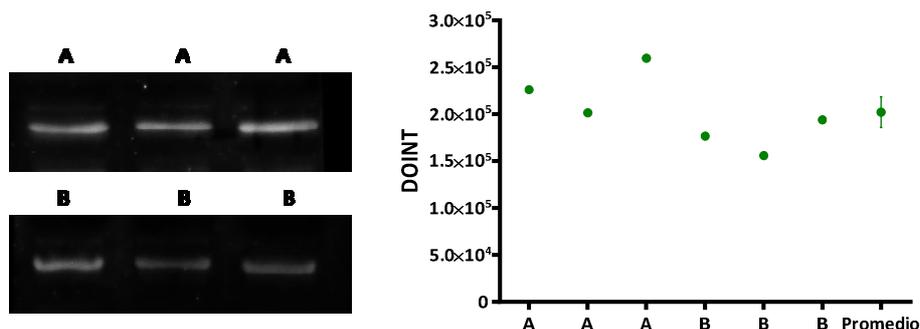
Luego de 15 minutos de tinción, las membranas fueron escaneadas para obtener imágenes digitales. Con el software de análisis de la imagen NIH ImageJ se estimó la cantidad total de proteínas presentes en cada carril. Como se observa en la Figura 14, la señal obtenida en los distintos carriles es homogénea indicando que se cargó la misma cantidad de proteína en cada carril.



**Figura 14. Control de carga por tinción con Rojo Ponceau.** Membrana de un gel cargado con 15µg de dos muestras diferentes de CV (A y B por triplicado). Luego de la electrotransferencia la membrana fue teñida con Rojo Ponceau y se cuantificó la DOINT en cada carril (en el primer carril se muestra como ejemplo la región seleccionada para la cuantificación). Como se observa en el grafico la DOINT en los distintos carriles fue homogénea. El promedio mostró un desvío estándar muy pequeño (promedio=  $8,4 \times 10^5 \pm SEM 8,1 \times 10^3$ ). PM: Marcador de peso molecular.

Además, para minimizar la variabilidad experimental cada serie de muestras se cargó en paralelo en el mismo gel, la membrana obtenida se dividió en dos partes iguales, una mitad fue incubada con el anticuerpo contra la forma acetilada y la otra, con el anticuerpo contra la forma total. De este modo el índice de acetilación de una muestra se calcula con las señales obtenidas en carriles distintos pero en el mismo gel.

En algunos casos y como ulterior control, la homogeneidad de carga se verificó realizando experimentos de Western blot directamente con el anticuerpo anti-Actina. Como se observa en la Figura 15, también con esta metodología, no se detectaron variaciones en las señales obtenidas en los distintos carriles.



**Figura 15. Control de carga por Actina.** Western blot representativo de los niveles de Actina en 15µg de dos muestras diferentes de CV (A y B). Como se observa en el gráfico la DOINT en los distintos carriles fue homogénea. El promedio mostró un desvío estándar muy pequeño (promedio=  $1.9 \times 10^5 \pm \text{SEM } 1.8 \times 10^4$ ). La escala del eje y va de  $5.0 \times 10^4$  a  $3.0 \times 10^5$ .

Con esta estrategia se pudo verificar que las diferencias encontradas en el índice de acetilación entre las muestras de distintas condiciones experimentales a lo largo del proyecto, no son debidas a errores de carga ni de manipulación.

El análisis de la imagen y cuantificación de las señales en las membranas teñidas con Ponceau se realizaron solo en las fases iniciales del proyecto, luego se consideró válida la simple observación cualitativa.

### 1.1.5 Puesta a punto de la estrategia para el análisis y procesamiento de los datos experimentales

Existen varias estrategias aceptadas en la comunidad científica para llevar adelante el análisis semi-cuantitativo de experimentos de Western blot, y a lo largo de la tesis se estudiaron y llevaron a cabo algunas de ellas.

Inicialmente se seleccionaron las bandas correspondientes a las señales de interés delineando manualmente el perímetro de las mismas y se utilizó como parámetro la densidad óptica integral (DOINT). El índice de acetilación es calculado normalizando la DOINT de la forma acetilada de la histona en una muestra a la DOINT de la forma total de la histona en la misma muestra (ver antes). No obstante con este método de análisis se logró observar una modulación del índice de acetilación entre las distintas condiciones experimentales en cada experimento individual, debido a una alta variabilidad inter-experimental, cuando se realizó el análisis estadístico agrupando los datos obtenidos en los distintos experimentos no se observó una diferencia estadísticamente significativa. Es por esto que se decidió normalizar los datos crudos y limitar los efectos de la

variabilidad inter-experimental. En particular, en cada experimento el índice de acetilación de las muestras PC, AD y FLX se normalizó al índice de acetilación del AD (PC/AD, AD/AD, FLX/AD); para las muestras EE y SC, se normalizó al índice del SC (EE/SC, SC/SC); y para las muestras DR, DRL, el índice de acetilación de las muestras DRL se normalizó al índice de acetilación de las muestras DR para cada condición (DRL/DR, DR/DR). No obstante con este método se logró obtener diferencias estadísticamente significativas, se pierde la posibilidad de aplicar el *test* estadístico ANOVA ya que la normalización de los valores a uno de los grupos experimentales hace que este adquiera el valor de 1, impidiendo además, la comparación de 3 condiciones en simultáneo. Por estas razones se decidió implementar otro método de normalización de los datos como se describe en la sección Materiales y Métodos (Véase punto 2.2.6). En resumen: se delinea un área rectangular que abarque todas las bandas de interés y se obtiene una gráfica que representa el nivel de grises a lo largo del rectángulo seleccionado. El valor correspondiente a cada banda se obtiene separando los picos específicos de cada una y eliminando el *background*. El valor de cada pico (banda) es luego normalizado a la suma de los valores de todos los picos y expresado en porcentaje. Finalmente, los valores en porcentaje de las señales obtenidas con los anticuerpos anti-acetil de una muestra, se dividen por los valores en porcentaje de las señales obtenidas con los anticuerpos contra las formas totales de la misma muestra, obteniéndose el índice de acetilación. Con este método se logró obtener diferencias estadísticamente significativas utilizando el *test* estadístico *Two-tailed Student t test*.

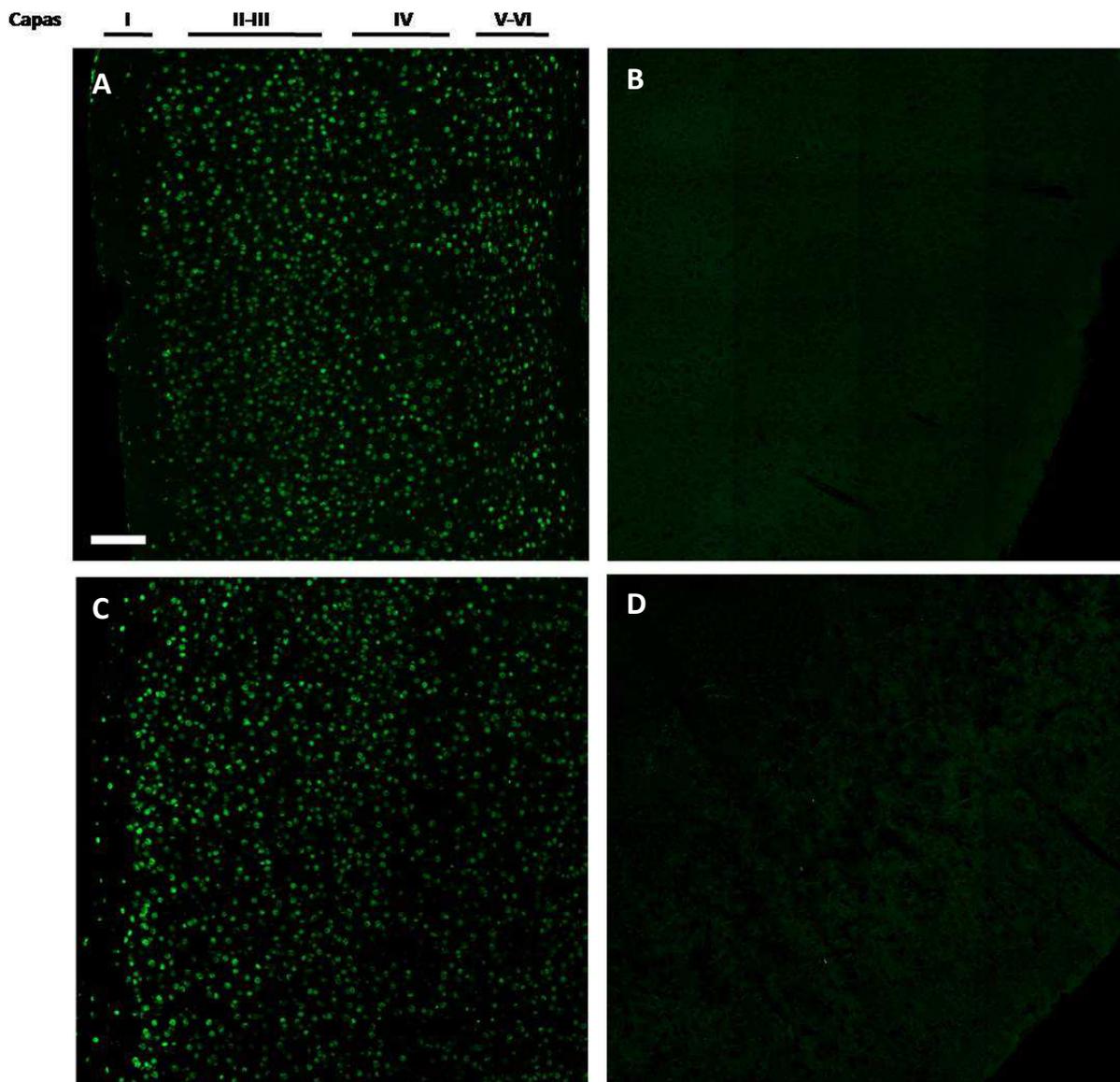
## **1.2 Inmunofluorescencia**

### **1.2.1 Puesta a punto de los anticuerpos**

Con el fin de estudiar la localización y modulación de la acetilación de las histonas en estudio por la exposición aguda a la luz en la corteza visual de ratones durante el PC, se realizaron ensayos de Inmunofluorescencia con los mismos anticuerpos utilizados para los experimentos de Western blot.

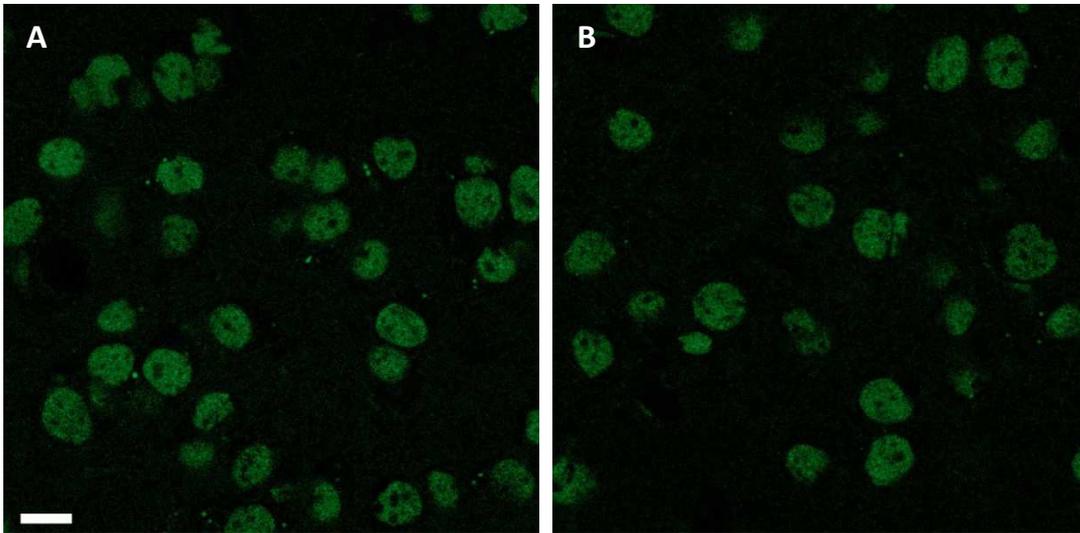
Para identificar las condiciones óptimas con los anticuerpos, se realizaron varios experimentos, probando tanto la concentración de los anticuerpos primarios (entre 1:500 y 1:5000) como la del anticuerpo secundario (entre 1:500 y 1:5000). Luego de una serie de ensayos se decidió utilizar los parámetros mencionados en la Tabla 3 de la sección Materiales y Métodos (Véase punto 3.1), los cuales nos proporcionaron una buena relación señal-fondo (Figura 16).

Utilizando el objetivo 25X, en cortes de corteza visual incubados con los anticuerpos primarios correspondientes (anti-Ach3 y anti-Ach4), se pudo observar un marcado de células positivas para dichos anticuerpos cuya distribución es homogénea a lo largo de las capas de corteza (Figuras 16A y C respectivamente). Por otro lado, en los cortes sin incubación con los anticuerpos primarios no se observó ningún marcado, confirmando así la especificidad de los mismos (Figuras 16B y D).



**Figura 16. Ejemplos de la puesta a punto por Inmunofluorescencia de la funcionalidad de los anticuerpos anti-Ach3 y anti-Ach4.** Imágenes de microscopía confocal de cortes representativos de CV de ratón a 25X. A y B: CV incubada con anti-Ach3 1:1000 y su respectivo control sin anticuerpo primario (B). C y D: CV incubada con anti-Ach4 1:1000 y su respectivo control sin anticuerpo primario (D). Barra= 100µm.

Como se observa en la Figura 17, en una imagen de microscopía confocal representativa de cortes de CV con el objetivo 63X, se pudo confirmar la localización esperada a nivel nuclear del marcado tanto con el anticuerpo anti-Ach3 (Figura 17A) como anti-Ach4 (Figura 17B).



**Figura 17. Observación de la localización celular del marcado.** Imágenes de microscopía confocal de cortes representativos de CV de ratón a 63X. A y B: CV incubada con anti-Ach3 y anti-Ach4 respectivamente, en donde se observa una marcación nuclear de los anticuerpos. Barra= 10  $\mu$ m.

## 2. ESTUDIO DEL NIVEL DE ACETILACIÓN DE LAS HISTONAS H3 Y H4 EN MODELOS DE PLASTICIDAD EN CONDICIONES BASALES

Para verificar si el nivel de acetilación de las histonas se relaciona con el nivel de plasticidad fisiológico de la corteza visual se llevaron adelante experimentos de Western blot comparando la acetilación de las histonas H3 y H4 en un modelo de plasticidad durante el desarrollo y en dos modelos de plasticidad restaurada en el adulto.

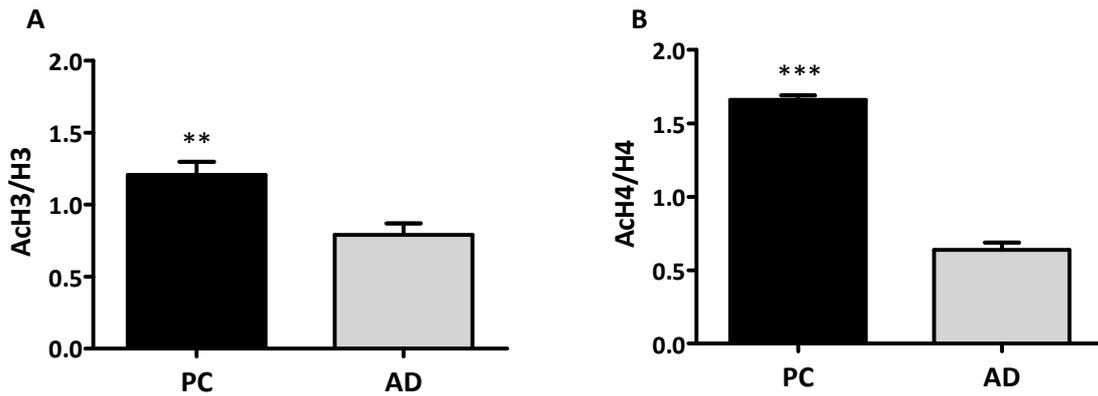
### 2.1 Plasticidad durante el desarrollo

Como se observa en la Figura 18, en un Western blot representativo con muestras de CV de animales jóvenes y animales adultos, la intensidad de las señales de Ach3 y Ach4 en animales que se encuentran durante el PC, es mayor que la intensidad de la señales de animales AD.



**Figura 18.** Western blot representativo de los niveles de Ach3, H3, Ach4 y H4 en la CV de ratones en el PC y AD.

La cuantificación de los resultados muestra que tanto la acetilación de la histona H3 como la acetilación de la histona H4 son superiores en animales durante el PC que en los animales AD (54% y 159% respectivamente). Con el *Two-tailed Student's t test*, se verificó que estas diferencias eran estadísticamente significativas (Figura 19A y B).



**Figura 19. Cuantificación de los niveles de ACh3 y ACh4 en animales durante el PC y AD.** A: La señal de ACh3/H3 es un 54% mayor en PC vs. AD. Barras: Media  $\pm$  SEM de ACh3/H3. B: La señal de ACh4/H4 es 159% mayor en PC vs. AD. Barras: Media  $\pm$  SEM de ACh4/H4. *Two-tailed Student t test*, \*=vs. AD. \*\*= $p < 0.01$ , \*\*\*= $p < 0.001$ .

## 2.2 Plasticidad restaurada en el adulto

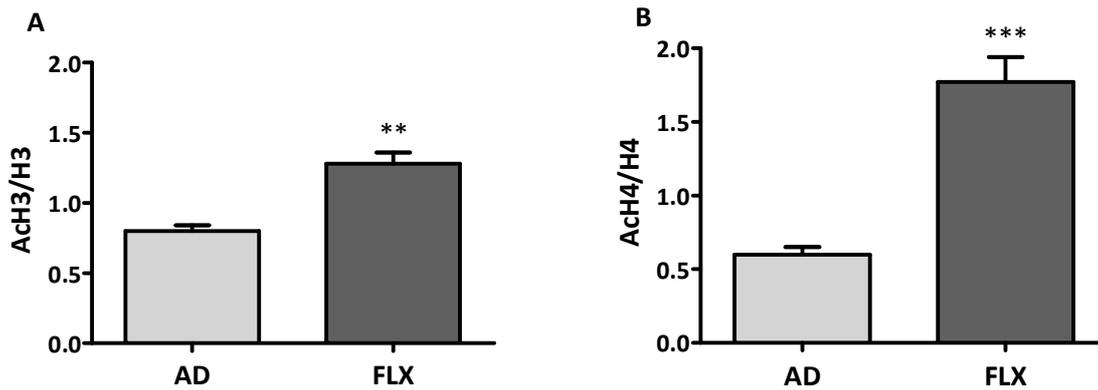
### 2.2.1 Tratamiento con fluoxetina

Como se observa en la Figura 20, en un Western blot representativo con muestras de animales tratados con FLX y animales AD sin tratamiento, la intensidad de las señales de ACh3 y ACh4 en adultos con plasticidad restaurada, es mayor que la intensidad de las señales de animales controles.



**Figura 20. Western blot representativo de los niveles de ACh3, H3, ACh4 y H4 en la CV de ratones AD y FLX.**

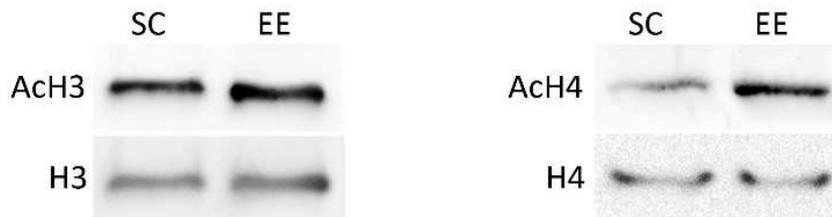
La cuantificación de los resultados muestra que la acetilación de la histona H3 es mayor de un 59% en animales tratados con FLX en comparación con AD. Del mismo modo, dicho tratamiento provoca un aumento en la acetilación de la histona H4 de un 159% en comparación con los AD (Figura 21A y B). Con el *Two-tailed Student's t test* se verificó que estas diferencias eran estadísticamente significativas.



**Figura 21. Cuantificación de los niveles de AcH3 y AcH4 en el primer modelo de plasticidad restaurada mediante el tratamiento con fluoxetina.** A: La señal de AcH3/H3 es un 54% mayor en PC vs. AD. Barras: Media  $\pm$  SEM de AcH3/H3. B: La señal de AcH4/H4 es 159% mayor en PC vs. AD. Barras: Media  $\pm$  SEM de AcH4/H4. *Two-tailed Student t test*, \*=vs. AD. \*\*= $p < 0.01$ , \*\*\*= $p < 0.001$ .

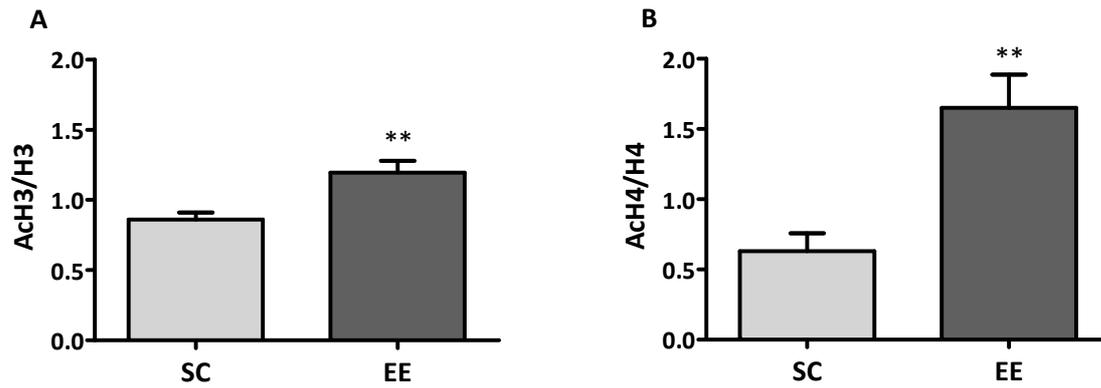
### 2.2.2 Mantenimiento en ambiente enriquecido

Como se observa en la Figura 22, los animales que habían sido mantenidos en un ambiente enriquecido presentan una intensidad de señal de la forma acetilada tanto de la histona H3 como de la histona H4 mayor que los animales que habían sido mantenidos en condiciones estándares.



**Figura 22. Western blot representativo de los niveles de AcH3, H3, AcH4 y H4 en la CV de ratones en un modelo de plasticidad restaurada mediante EE.**

La cuantificación de los resultados muestra que la señal de AcH3/H3 aumenta un 39% (Figura 23A) y que la señal de AcH4/H4 un 162% (Figura 23B) en animales EE en comparación con animales SC. Con el *Two-tailed Student t test* se verificó que estas diferencias eran estadísticamente significativas.



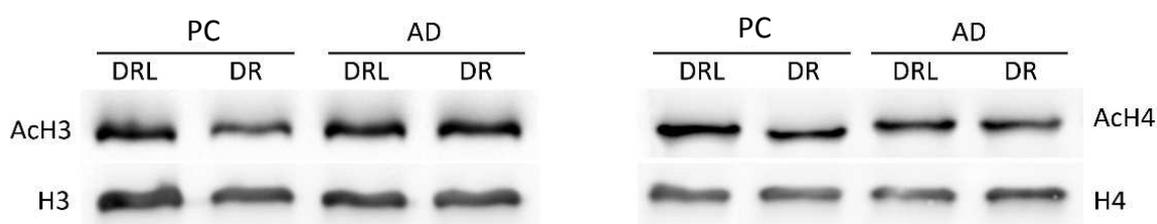
**Figura 23: Cuantificación de los niveles de ACh3 y ACh4 en el segundo modelo de plasticidad restaurada mediante el mantenimiento de los animales en ambiente enriquecido.** A: La señal de ACh3/H3 aumenta aprox. 40% en animales mantenidos en EE vs. animales mantenidos en SC. Barras: Media  $\pm$  SEM de ACh3/H3. B: La señal de ACh4/H4 aumenta aprox. 162% en animales mantenidos en EE vs. animales mantenidos en SC. Barras: Media  $\pm$  SEM de ACh4/H4. Test Two-tailed Student t test, \*=vs. SC. \*\*= $p < 0.01$ .

### 3. ESTUDIO DEL EFECTO DE LA EXPERIENCIA VISUAL SOBRE EL NIVEL DE ACETILACIÓN DE LAS HISTONAS H3 Y H4

Para verificar si la experiencia visual induce la acetilación de las histonas exclusivamente en condiciones de alta plasticidad, se utilizaron los mismos modelos de plasticidad que para el punto anterior (un modelo de plasticidad durante el desarrollo y dos modelos de plasticidad restaurada en el adulto) pero en este caso los animales fueron sometidos al clásico protocolo de DRL/DR.

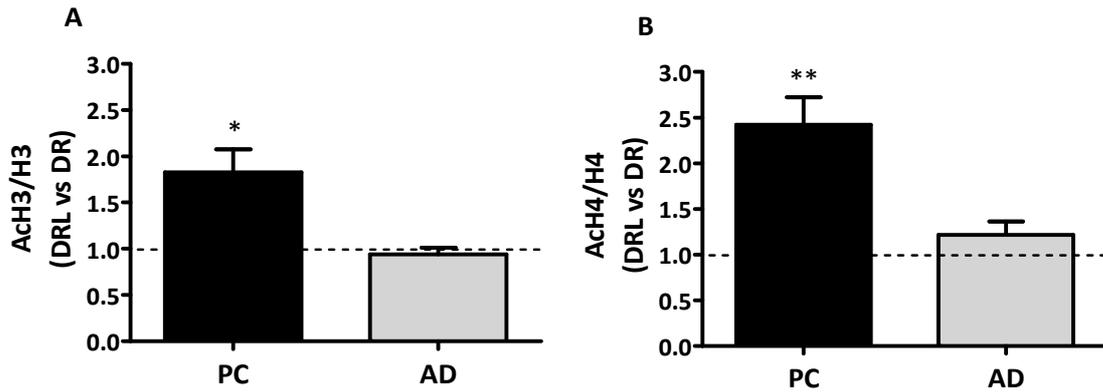
#### 3.1 Plasticidad durante el desarrollo

Como se observa en la Figura 24, la luz induce un aumento en la intensidad de la señal obtenida con los anticuerpos contra AcH3 y AcH4 únicamente en los animales con alto nivel de plasticidad, animales durante el PC, pero no en animales adultos.



**Figura 24. Western blot representativo de la modulación por la experiencia visual en los niveles de AcH3, H3, AcH4 y H4 en la CV de ratones en PC y AD.**

La cuantificación de los resultados muestra que la luz (DRL) induce un aumento estadísticamente significativo en los niveles de acetilación de la histona H3 de un 82% en los animales durante el PC en comparación con aquellos animales sacrificados en oscuridad (DR). Por otro lado la luz no indujo modificaciones estadísticamente significativas en el nivel de acetilación en animales AD (Figura 25A). Del mismo modo, la cuantificación de los resultados muestra que la experiencia visual induce un aumento estadísticamente significativo en los niveles de acetilación de la histona H4 de un 142% en los animales durante el PC en comparación con aquellos animales sacrificados en oscuridad. Por otro lado la luz no indujo modificaciones estadísticamente significativas en el nivel de acetilación en animales AD (Figura 25B).

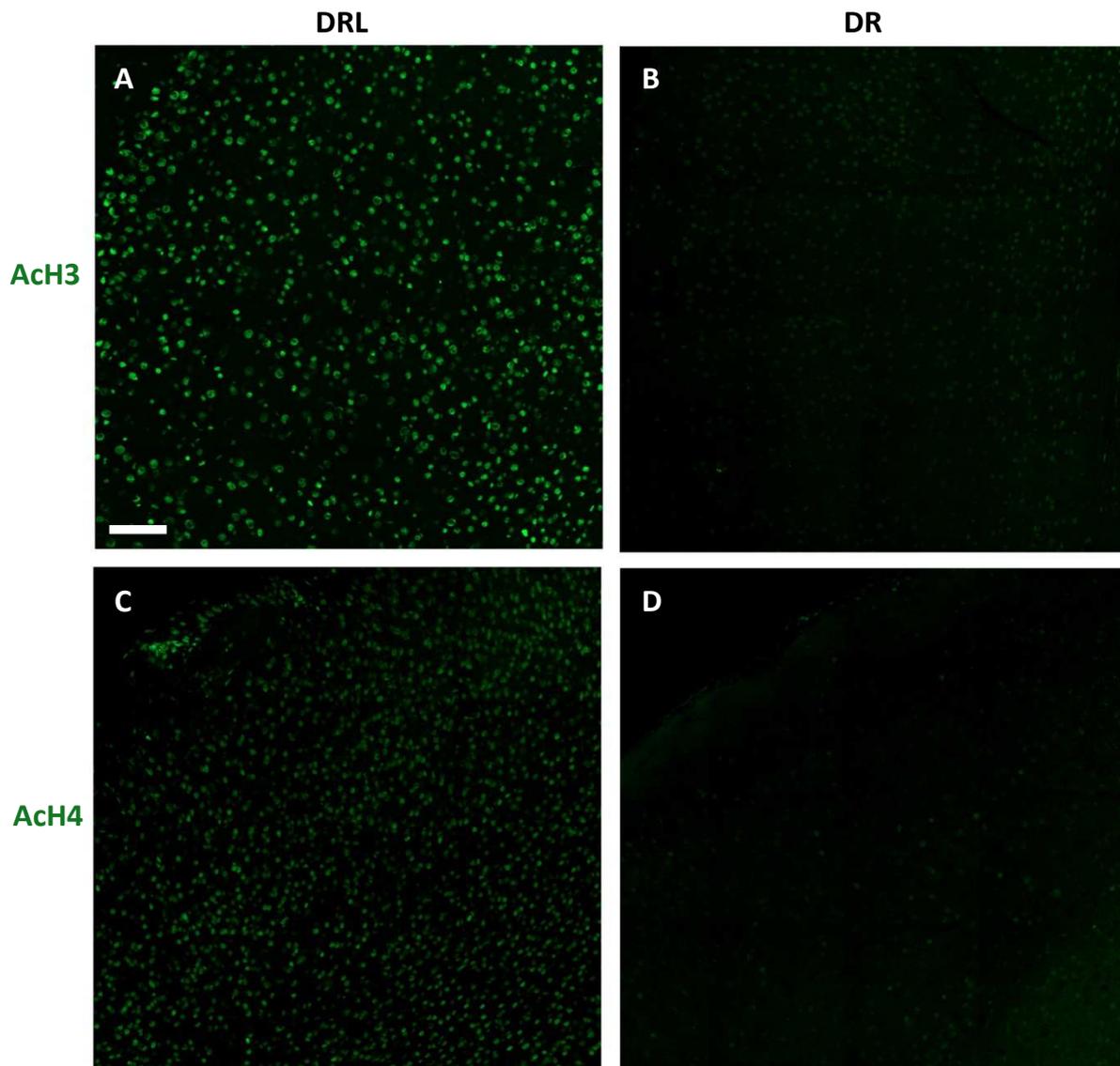


**Figura 25. Cuantificación de los niveles de ACh3 y ACh4 inducidos por la experiencia visual en ratones PC y AD.** A: La exposición a 90 minutos de luz induce un aumento en la intensidad de la señal de ACh3/H3 de un 82% en el PC pero no en el AD ( $p=0.42$ ), en comparación con los respectivos controles mantenidos en oscuridad (DR: línea punteada). Barras: Media  $\pm$  SEM de ACh3/H3 de animales DRL normalizados a la señal de ACh3/H3 de animales DR. B: La exposición a 90 minutos de luz induce un aumento en la intensidad de la señal de ACh4/H4 de aprox. 142% en PC pero no en AD ( $p=0.18$ ), en comparación con los respectivos controles mantenidos en oscuridad (DR, línea punteada). Barras: Media  $\pm$  SEM de ACh4/H4 de animales DRL normalizados a la señal de ACh4/H4 de animales DR. Two-tailed Student t test, \*=vs. DR:  $*=p<0.05$ ,  $**=p<0.01$ .

### 3.1.1 Estudio de la modulación de la acetilación de las histonas por la experiencia visual: inmunofluorescencia

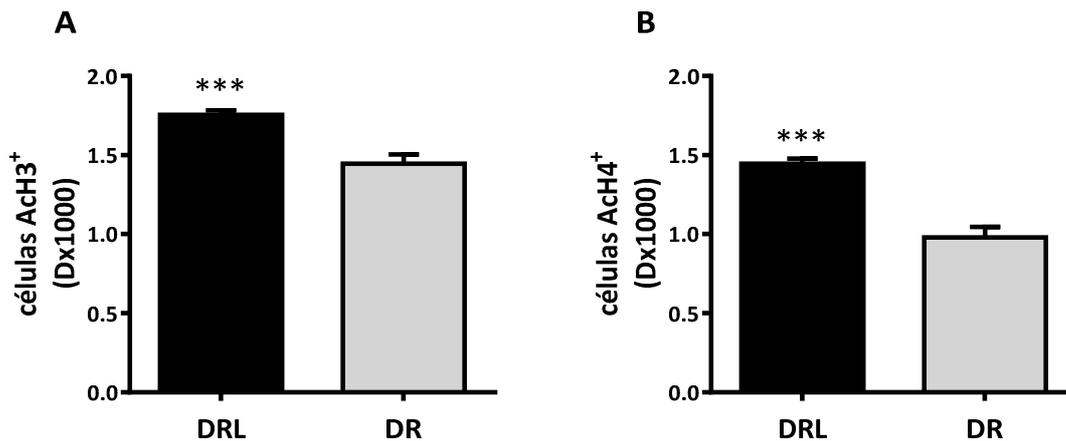
Para verificar la localización y modulación de la acetilación de las histonas H3 y H4 por la experiencia visual, se realizaron también ensayos de inmunofluorescencia en cortes de corteza visual de animales durante el PC expuestos a la luz (DRL) o no (DR).

Como se observa en la imagen representativa de la Figura 37, el número de células positivas marcadas con ambos anticuerpos aumenta en aquellos animales expuestos a 90 minutos de luz (Figura 26A y C) en comparación con los animales sacrificados en oscuridad (Figura 26B y D).



**Figura 26. Imagen representativa de la modulación por luz en los niveles de ACh3 y ACh4.** Imágenes de microscopía confocal de cortes representativos de CV de ratón a 25X. La luz induce un aumento en el número de células positivas para ACh3 y un aumento aún mayor en el número de células positivas para ACh4. Barra= 100  $\mu$ m.

La cuantificación de los resultados muestra que la experiencia visual induce un aumento significativo en la densidad de células inmunopositivas a los anticuerpos anti-ACh3 y anti-ACh4 en comparación con aquellos animales que no fueron expuestos a la misma, es decir animales DR (Figura 27). En el caso del anticuerpo anti-ACh3 se observa un aumento de aproximadamente 21% estadísticamente significativo y para el anticuerpo anti-ACh4 un aumento más fuerte aún de aproximadamente 48%.

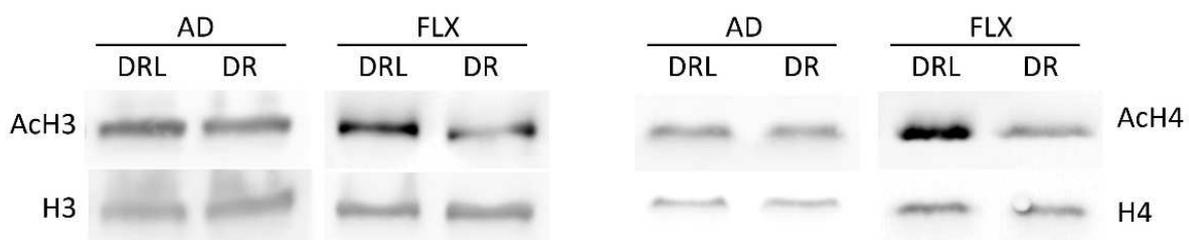


**Figura 27. Cuantificación de la densidad de células positivas para ACh3 y ACh4 en animales DRL vs. DR.** A: La luz induce un aumento en la D de células positivas para ACh3 en animales DRL de aprox. 21% vs. animales DR. Barras: Media ± SEM de la D de células positivas para ACh3 (DRL: n=6; DR: n=6). B: La luz induce un aumento en la D de células positivas para ACh4 en animales DRL de aprox. 48% vs. animales DR. Barra: Media ± SEM de la D de células positivas para ACh4 (DRL: n= 6; DR: n=3). Test Two-tailed Student t test, \*=vs. DR. \*\*\*=p<0.001.

### 3.2 Plasticidad restaurada en adulto

#### 3.2.1 Tratamiento con fluoxetina

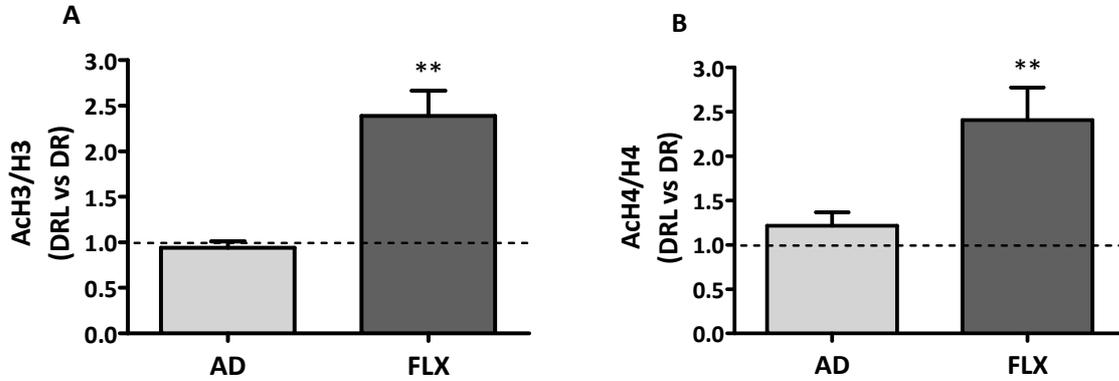
Como se puede observar en el Western blot representativo de la Figura 28, la experiencia visual induce un aumento en la intensidad de la señal de ambos anticuerpos, ACh3 y ACh4, únicamente en animales tratados con FLX pero no en animales adultos no tratados.



**Figura 28. Western blot representativo de la modulación por la experiencia visual en los niveles de ACh3, H3, ACh4 y H4 en la CV de ratones en PC y AD.**

La cuantificación de los resultados muestra que la luz induce un aumento estadísticamente significativo en los niveles de acetilación de la histona H3 de un 138% y un 140% en los niveles de acetilación de la histona H4 en animales tratados con FLX, en comparación con aquellos animales sacrificados en oscuridad. Por otro lado la luz no indujo modificaciones estadísticamente

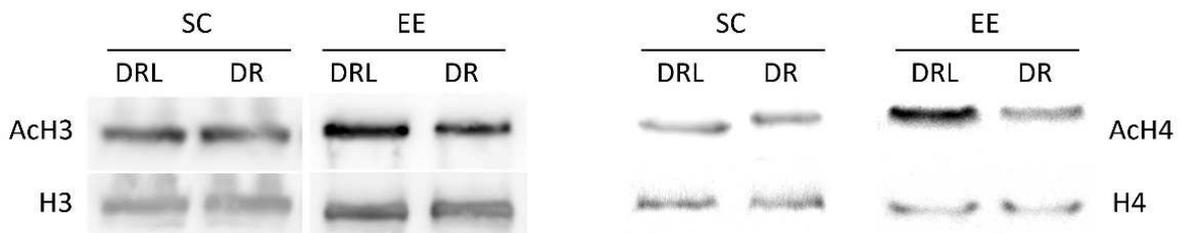
significativas en el nivel de acetilación de ninguna de las histonas en animales AD sin tratamiento (Figura 29A y B).



**Figura 29. Cuantificación de los niveles de ACh3 y ACh4 inducidos por luz en ratones AD y FLX.** A: La exposición a 90 minutos de luz induce un aumento en la intensidad de la señal de ACh3/H3 de un 138% en FLX, pero no en AD ( $p=0.42$ ), en comparación con los respectivos controles mantenidos en oscuridad (DR, línea punteada). Barras: Media  $\pm$  SEM de ACh3/H3 de animales DRL normalizados a la señal de ACh3/H3 de animales DR. B: La exposición a 90 minutos de luz induce un aumento en la intensidad de la señal de ACh4/H4 de un 140% en FLX, pero no en AD ( $p=0.18$ ), en comparación con los respectivos controles mantenidos en oscuridad (DR, línea punteada). Barras: Media  $\pm$  SEM de ACh4/H4 de animales DRL normalizados a la señal de ACh4/H4 de animales DR. Two-tailed Student t test, \*=vs. DR: \*\*= $p<0.01$ .

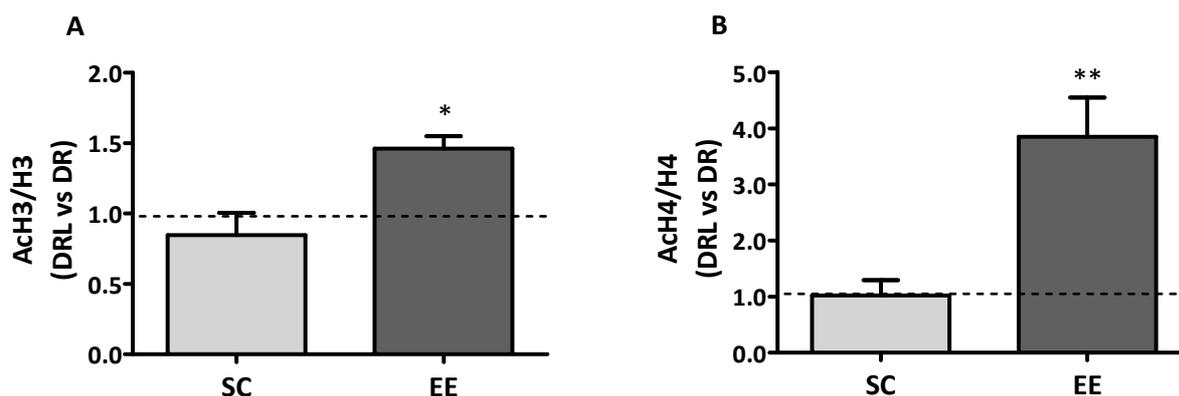
### 3.2.2 Mantenimiento en ambiente enriquecido

Como se uede observar en la Figura 30, al igual que en las condiciones experimentales anteriores, la luz induce un aumento en la intensidad de señal de la acetilación de las histonas H3 y H4 únicamente en animales plásticos, en este caso en animales adultos a los cuales se les restauró la plasticidad mediante EE.



**Figura 30. Western blot representativo de la modulación por la experiencia visual en los niveles de ACh3, H3, ACh4 y H4 en la CV de ratones EE y SC.** La luz induce un aumento en los niveles de ACh3 y ACh4 únicamente en animales plásticos (EE) y no en animales adultos controles (SC).

La cuantificación de los resultados muestra que la exposición a 90 minutos de luz induce un aumento estadísticamente significativo en los niveles de acetilación de la histona H3 (aprox. 46%) así como de la histona H4 (aprox. 280%) en aquellos animales adultos que habían sido mantenidos durante 4 semanas en un ambiente enriquecido. Por otro lado, la luz no produjo ningún efecto en la acetilación de dichas histonas en aquellos animales adultos mantenidos en condiciones controles (Figura 31A y B).



**Figura 31. Cuantificación de los niveles de AcH3 y AcH4 inducidos por la luz en ratones EE y SC.** A: La luz induce un aumento en la señal de AcH3/H3 de aprox. 46% en animales EE pero no en SC ( $p=0.36$ ). Barras: Media  $\pm$  SEM de AcH3/H3 de animales DRL normalizados a la señal de AcH3/H3 de animales DR (línea punteada) en cada condición. B: La luz induce un aumento en la señal de AcH4/H4 de aprox. 280% en animales EE pero no en SC ( $p=0.93$ ). Barras: Media  $\pm$  SEM de AcH4/H4 de animales DRL normalizados a la señal de AcH4/H4 de animales DR (línea punteada) en cada condición. Test Two-tailed Student t test, \*=vs. DR.  $*=p<0.05$ ,  $**=p<0.01$ .

En este proyecto nos focalizamos sobre el análisis de la acetilación de las histonas H3 y H4 en distintos modelos de plasticidad de la corteza visual del ratón, porque se ha observado que esta MPT en dichas histonas está implicada en la transcripción activa de genes relacionado a la plasticidad cerebral y en particular en la corteza visual (Cheung et al., 2000a; Crosio et al. 2003; Wood et al., 2006; Fischer et al., 2007; Maya-Vetencourt & Pizzorusso, 2013).

### **1. ESTUDIO DEL NIVEL DE ACETILACIÓN DE LAS HISTONAS H3 Y H4 EN MODELOS DE PLASTICIDAD EN CONDICIONES BASALES**

En la primera parte del proyecto se verificó si la disminución de los niveles de plasticidad de la corteza visual durante el desarrollo, está correlacionada con una modulación del índice de acetilación de las histonas en estudio, comparando animales al pico del PC de plasticidad (P28) con animales adultos (P98) con plasticidad reducida. Los resultados de Western blot mostraron que los animales durante el PC tienen niveles de acetilación de ambas histonas significativamente más altos que los animales AD, siendo la diferencia de la AcH4 más acentuada.

A pesar de que previamente se había demostrado que la experiencia visual modula la acetilación de histonas durante el PC (ver siguiente párrafo), nuestros resultados son la primera evidencia de una modulación de dicha MPT durante el desarrollo en la corteza visual de ratones mantenidos en condiciones normales y así de la existencia de una correlación entre la acetilación de histonas y los niveles de plasticidad durante el desarrollo.

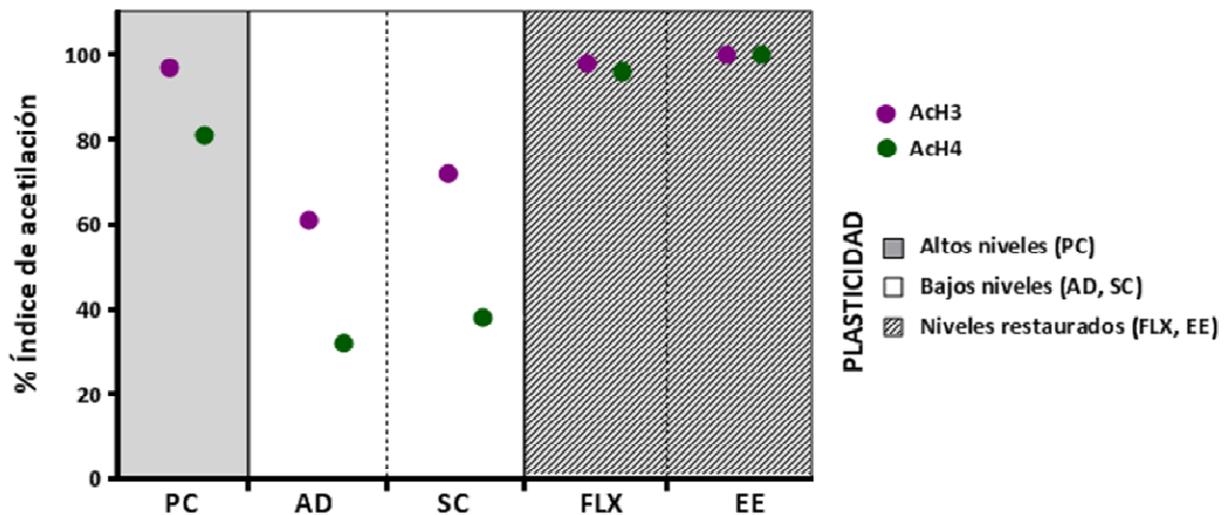
En esta misma línea, estos resultados están en concordancia con datos muy recientes obtenidos en la corteza visual de ratas en donde también observaron una disminución de la acetilación de la histona H3 a lo largo del desarrollo (Baroncelli et al., 2016). Por otro lado, Piña et al., 1988 identificaron una disminución de la mono-acetilación de la histona H4 en la corteza cerebral de rata durante el desarrollo. Estos autores sugieren que esta disminución contribuiría al envejecimiento cerebral debido a la reducción de la plasticidad estructural de la cromatina. Contrariamente a nuestros resultados, en este trabajo no se observó una modificación significativa de la acetilación de la histona H3. Esta diferencia podría deberse a las distintas metodologías utilizadas en ambos trabajos. Por un lado, estos autores separaron las histonas mono/multiacetiladas por electroforesis

en geles AUT (ácido acético/urea/tritón), mientras que en el presente proyecto se analizó el nivel de acetilación de las histonas utilizando anticuerpos que las detectan únicamente cuando se encuentran acetiladas en residuos de lisina específicos.

En una segunda instancia se verificó si existe una correlación entre la modulación del índice de acetilación y los altos niveles de plasticidad restaurados experimentalmente en animales adultos. Para esto se compararon animales tratados con fluoxetina vs. no tratados, y animales mantenidos en un ambiente enriquecido vs. animales mantenidos en condiciones estándares. Estos resultados son los primeros que demuestran un aumento en el índice de acetilación de la histona H3 como de la H4 en animales FLX y animales EE, en comparación con los animales adultos sin tratamiento (AD y SC).

En dos trabajos previos (Maya Ventencourt et al., 2011 y 2012) en donde se estudiaron los mecanismos de modulación de la expresión de genes de plasticidad, se demostró que el tratamiento crónico con FLX produce un aumento en la acetilación de la Lys9 de la histona H3 en el promotor del BDNF y una disminución de la tri-metilación de la Lys27 de la histona H3 en el promotor de NPAS4, considerada esta una MPT que reprime la transcripción. Por otro lado, se demostró que el mantenimiento de los animales en EE induce un aumento de los niveles de acetilación de la Lys9 de la histona H3 en la corteza visual de ratas de modo similar a lo observado en nuestro trabajo, aunque más acentuado (Baroncelli et al., 2016).

En su conjunto estos resultados estarían indicando que la acetilación de histonas, de la histona H3 y de la histona H4, está fuertemente involucrada en procesos de desarrollo y plasticidad de la corteza visual primaria y que su disminución podría explicar los niveles de plasticidad reducidos en el adulto (Figura 32). Además, que la acetilación de dichas histonas sería un mecanismo molecular que media la reactivación experimental de la plasticidad en la corteza visual del ratón adulto.



**Figura 32. Representación esquemática de los resultados obtenidos por Western blot sobre la acetilación de las histonas H3 y H4 en estado basal.** Se representa el porcentaje de variación del índice de acetilación de ambas histonas (ACh3, violeta; ACh4, verde) en la corteza visual de ratones en las 5 condiciones experimentales utilizadas (PC, AD, SC, FLX, EE), normalizado al valor más alto (en ambos casos EE=100%). Recuadro gris claro: altos niveles de plasticidad fisiológicos durante el período crítico; recuadro blanco: bajos niveles de plasticidad fisiológica en el adulto; recuadro gris con patrón: altos niveles de plasticidad restaurada experimentalmente en el adulto.

## 2. ESTUDIO DEL EFECTO DE LA EXPERIENCIA VISUAL SOBRE EL NIVEL DE ACETILACIÓN DE LAS HISTONAS H3 Y H4

Siendo el objetivo general de este trabajo el estudio de los mecanismos moleculares subyacentes a la plasticidad dependiente de la experiencia visual, se consideró relevante analizar si el nivel de acetilación de las histonas es modulado por la experiencia visual y si este efecto es dependiente de la edad, es decir del nivel de plasticidad. Para esto se implementó un diseño experimental comúnmente utilizado que consiste en exponer los animales a la luz luego de haberlos mantenidos en oscuridad durante algunos días (Putignano et al., 2007; Giannakopoulos et al., 2010; Tropea et al., 2011). En particular en este trabajo se utilizó el mismo modelo utilizado en Putignano et al., 2007 donde también se analizaron los efectos de la luz sobre las MPT de histonas en la corteza visual del ratón. Se utilizó 3 días de DR + 90 minutos de luz, intervalo de tiempo compatible con datos anteriores sobre el curso temporal de la acetilación de histonas en estructuras cerebrales (Levenson et al., 2004).

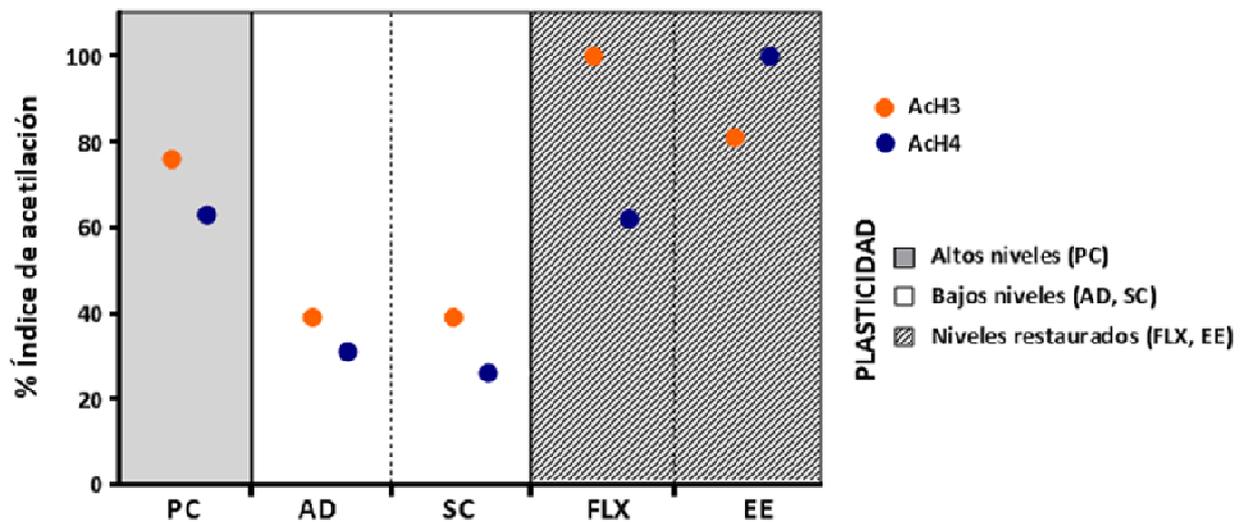
Los resultados de Western blot demostraron que la exposición a 90 minutos de luz produce un aumento en los niveles de acetilación de ambas histonas únicamente en animales durante el PC pero no en animales AD. A pesar de que en nuestros resultados la modulación de la acetilación de las histonas es menos acentuada, estos están en concordancia con los obtenidos por Putignano et al., 2007. Por otro lado, estos investigadores observaron que la acetilación de la histona H3 aumenta más que la acetilación de la histona H4, resultado opuesto al nuestro. Esto podría deberse a diferencias en la marca de los anticuerpos utilizados (Cell Signaling vs. Upstate) como al residuo de lisina acetilado que reconocen dichos anticuerpos. Mientras que los anticuerpos anti-AcH3 de los dos trabajos reconocen el mismo residuo (Lys9), los anticuerpos anti-AcH4 son distintos (Lys8 vs. Lys5,8,12,16). Sin embargo es importante mencionar que Dion et al. 2005 demostraron que cuando la lisina 8 de la H4 se encuentra en estado acetilado, también los otros residuos de lisina lo están (Lys5, 8, 12, 16). En Putignano et al., 2007 también se observó que otra MPT involucrada en determinar los efectos de la experiencia visual es la fosforilación en el residuo de Serina 10 de la histona H3 (PSer10H3) la cual aumenta (de aproximadamente el doble) únicamente en animales plásticos y no en animales AD.

Para estudiar más en detalle la correlación entre la adquisición de experiencia visual y la acetilación de las histonas en animales con niveles altos de plasticidad, se realizaron también ensayos de inmunofluorescencia que nos permitieron obtener información sobre la localización espacial y la modulación de la acetilación de las histonas H3 y H4. Durante la puesta a punto de los anticuerpos, se verificó que el marcado presentaba una localización nuclear, resultado esperado dado que las histonas se encuentran empaquetando el ADN dentro del núcleo de células eucariotas. Los resultados en animales expuestos a 90 minutos de luz mostraron un aumento en la densidad de células inmuno-positivas con ambos anticuerpos en comparación con los animales sacrificados en oscuridad. Además, el análisis de las imágenes nos permitió observar que el aumento del marcado con dichos anticuerpos es homogéneo a lo largo de las varias capas de la corteza visual. Es importante destacar que el aumento en los niveles de acetilación de la histona H4 fue mayor que el de la histona H3. Estos resultados complementan los obtenidos con los experimentos de Western blot en donde también se observó que la exposición a la luz induce durante el PC un aumento en los niveles de acetilación de las histonas, y que este es más acentuado en la histona H4.

Por otro lado, en los modelos de restauración de la plasticidad en animales adultos también se analizó si la acetilación de las histonas es el proceso que media el efecto de la luz. Estos resultados

de Western blot son los primeros que demuestran que la exposición a 90 minutos de luz induce un aumento en la acetilación de las histonas H3 y H4 exclusivamente en animales con plasticidad restaurada, pero no en los controles.

En su conjunto estos resultados sugieren que la modulación de la acetilación de las histonas H3 y H4 sería un mecanismo molecular clave a través del cual la experiencia visual determina sus efectos en animales durante el período de alta sensibilidad a la misma y en animales adultos con plasticidad restaurada (Figura 33).



**Figura 33. Representación esquemática de los resultados obtenidos por Western blot sobre los efectos de la experiencia visual sobre la acetilación de las histonas H3 y H4.** Se representa el porcentaje de variación del índice de acetilación de ambas histonas (ACh3, naranja ; ACh4, azul) en la corteza visual de ratones en las 5 condiciones experimentales utilizadas (PC, AD, SC, FLX, EE), normalizado al valor más alto (ACh3: FLX=100%; ACh4: EE=100%). Recuadro gris claro: altos niveles de plasticidad fisiológicos durante el período crítico; recuadro blanco: bajos niveles de plasticidad fisiológica en el adulto; recuadro gris con patrón: altos niveles de plasticidad restaurada experimentalmente en el adulto.

### **3. SIMILITUD ENTRE LOS MECANISMOS DE PLASTICIDAD DEL DESARROLLO Y DE PLASTICIDAD RESTAURADA EN ADULTO**

En el presente trabajo, los datos obtenidos fueron inicialmente discutidos en forma separada entre la condición de plasticidad durante el desarrollo (PC) y la de plasticidad restaurada en el adulto (FLX y EE). Otro aspecto relevante que surge de nuestros datos, es la similitud de los resultados obtenidos en las dos condiciones, sugiriendo que la modulación de la acetilación de las histonas H3 y H4 es un mecanismo común que controla tanto la plasticidad en el desarrollo como la plasticidad restaurada en el adulto.

Hasta el momento se ha publicado un único estudio, además del nuestro, en donde también se analizan los mecanismos de plasticidad del desarrollo y de plasticidad restaurada en adulto (Baroncelli et al., 2016). En los dos trabajos se ha identificado al aumento de la acetilación de histonas como uno de los mecanismos subyacentes a los procesos de plasticidad en común entre ambas condiciones. Comparando estudios realizados exclusivamente durante el desarrollo o en el adulto, se pueden identificar otros mecanismos en común. Entre ellos, se encuentra la modulación de la expresión o de la activación de moléculas como BDNF, IGF-1, CREB, y NPAS4 (Tropea et al., 2009). El rol del BDNF ha sido ampliamente estudiado en estos procesos: por un lado, el BDNF aumenta su expresión al pico del PC de plasticidad, y su modulación controla la apertura y cierre de dicha ventana temporal; por otro, la restauración de la plasticidad en adultos por FLX y EE ocurre a través de un aumento de la expresión del BDNF. Al igual que el BDNF, la acetilación de las histonas parece ser también un mecanismo común: esta tiene niveles más altos durante el PC y es inducida en los modelos de plasticidad restaurada en el adulto (Maya Vetencourt & Origlia, 2012).

La identificación de los mecanismos que controlan la plasticidad durante el desarrollo y de los involucrados en la restauración de la misma en el adulto, y la comparación entre estos, puede permitir la identificación de principios comunes. Esto es relevante en la búsqueda de estrategias que permitan restablecer en el adulto un nivel de plasticidad similar a la del período crítico, fundamental para poder definir tratamientos de neuropatologías caracterizadas por defectos en los procesos de plasticidad ya sea que ocurran durante el desarrollo como en etapas posteriores.

#### **4. ROL DE LAS MPT DE HISTONAS EN PROCESOS DE PLASTICIDAD CEREBRAL**

Cabe destacar que el análisis de las MPT de las histonas implicadas en mecanismos de plasticidad de la corteza visual ha recibido particular atención en los últimos años. Los datos obtenidos en esta tesis junto con otros publicados por otros autores, son los primeros trabajos que contribuyen a caracterizar el rol de algunas MPT de algunas histonas implicadas en este proceso. En la tabla 4 se reportan datos obtenidos directamente sobre la corteza visual (utilizando técnicas como Western blot o Inmunofluorescencia) o mediante el análisis de MPT de histonas sobre promotores de genes específicos relacionados con la plasticidad (a través de inmunoprecipitación de cromatina). Como se puede observar, hasta el momento, solo se han descrito algunas MPT exclusivamente sobre las histonas H3 y H4, siendo las modificaciones sobre la H3 las más caracterizadas. En esta línea, la MPT más estudiada sobre dicha histona, ampliamente utilizada por ser un marcador conocido de la activación de la transcripción, ha sido la acetilación sobre el residuo de lisina 9, la misma que se utiliza en este trabajo. La fosforilación en la serina 10, otro marcador de la activación de la transcripción génica, también ha sido involucrada en jugar un rol en estos procesos. Otra MPT analizada sobre la misma histona ha sido la metilación en residuos específicos de lisina. En particular la metilación sobre el residuo de lisina 27, como un marcador de la represión de la transcripción y la metilación sobre el residuo 4 asociada exclusivamente con la transcripción de genes activa (Shilatifard, 2006; Kouzarides, 2007; Shilatifard, 2008). Por otro lado, la única MPT de la histona H4 analizada en los procesos de plasticidad de la corteza visual, es la acetilación en residuos de lisina específicos.

**Tabla 4. MPT involucradas en procesos de plasticidad de la corteza visual**

<b>Histona</b>	<b>MPT</b>	<b>Modelo animal</b>	<b>Referencia</b>
<b>H3</b>	AcLys9	Ratón	Vierci et al., 2016
		Ratón	Putignano et al., 2007
		Rata	Silingardo et al., 2010
		Rata	Baroncelli et al., 2016
	PSer10	Ratón	Putignano et al., 2007
	AcLys9- <i>BDNF</i>	Rata	Maya Vetencourt et al., 2011
	3MetLys27- <i>NPAS4</i>	Rata	Maya Vetencourt et al., 2012
	AcLys9,14- <i>miR132</i> PSer10AcLys14- <i>miR132</i> 2MetLys4- <i>miR132</i>	Ratón	Tognini et al., 2011
<b>H4</b>	AcLys8	Ratón	Vierci et al., 2016
	AcLys5,8,12,16	Ratón	Putignano et al., 2007

Determinar el ensamblado de las MPT y la identificación de las diferentes combinaciones, que van a alterar la accesibilidad de la maquinaria transcripcional al ADN, es un paso crucial para entender la regulación génica (Strahl & Allis, 2000; Latham & Dent, 2007). En los últimos años, se ha hecho un gran progreso en la identificación y el mapeo de las MPT, y en la caracterización de las enzimas que las catalizan (Tweedie-Cullen et al., 2012). Estos resultados proveen información relevante sobre la naturaleza de las MPT que constituyen un código de histonas en el cerebro, y de las reglas que gobiernan las varias combinaciones posibles de dichas MPT. Por otro lado, existen también distintas variantes (isoformas) de cada tipo de histona, lo que hace que el estudio de esta área sea sumamente complejo. En un estudio reciente del 2014 se ha demostrado el rol fundamental de la modulación de una variante de histonas, la H2A.Z, en funciones cognitivas y de su implicancia como un regulador negativo en la consolidación de la memoria en el hipocampo, probablemente mediante la disminución de la expresión génica (Zovkic et al., 2014). En nuestro laboratorio también se ha comenzado a estudiar la expresión de isoformas de histonas en modelos de plasticidad en la corteza visual del ratón (Bornia, 2015 Tesis MD), logrando identificar una modulación dinámica de la expresión de algunas variantes en función del nivel de plasticidad cortical.

No obstante los avances de los últimos años, solo unas pocas MPTs de histonas y variantes han sido caracterizadas y vinculadas a una función particular. Por lo tanto, continuar con el estudio de los mecanismos epigenéticos en general y el estudio de las modificaciones postraduccionales de las histonas en particular es de suma importancia. A través del presente proyecto sobre acetilación de histonas en procesos de plasticidad cortical esperamos haber contribuido a entender el rol de uno de los factores de regulación epigenética en el control de la plasticidad de la corteza visual del ratón.

## CONCLUSIONES

---

En este trabajo, utilizando fundamentalmente la técnica semi cuantitativa de Western blot, se ha caracterizado en mayor detalle uno de los procesos epigenéticos más relevantes en el control de la expresión génica, la acetilación de las histonas H3 y H4, en algunos modelos experimentales de plasticidad en la corteza visual del ratón. La comparación del patrón de expresión entre las distintas condiciones nos ha permitido demostrar que:

1. Existe una correlación entre los niveles de acetilación de las histonas H3 y H4 y los altos niveles de plasticidad en la corteza visual (alta plasticidad característica de las fases precoces del desarrollo y alta plasticidad restaurada experimentalmente en el adulto);
2. La experiencia visual induce un aumento en la acetilación de las histonas H3 y H4 exclusivamente en condiciones de alta plasticidad (en el período crítico de alta plasticidad, pero no en el adulto normal, y en los modelos de reactivación de plasticidad en adultos, pero no en los controles);
3. La acetilación de las histonas H3 y H4 es un mecanismo común que controla tanto la plasticidad en el desarrollo como la plasticidad restaurada en el adulto.

1. Evaluar si la acetilación de las histonas H3 y H4 sobre promotores de genes específicos se correlaciona con los niveles de plasticidad en la corteza visual en las distintas condiciones experimentales utilizadas en este mismo proyecto:

Realizar experimentos de Inmunoprecipitación de Cromatina con anticuerpos contra las formas acetiladas de las histonas y amplificación por RT-PCR de promotores de genes específicos ya implicados en controlar el proceso de plasticidad en la corteza visual, por ejemplo: genes relacionados con el balance de la transmisión excitatoria/inhibitoria (ej.: transportador vesicular de GABA, receptores NMDA), factores de transcripción (CREB, NPAS4), factores neurotróficos (BDNF), genes remodeladores de la matriz extracelular (MMP2 y MMP9), de la mielinización (MBP) y de la cromatina (HDAC3).

2. Caracterizar en mayor detalle en cuales tipos celulares ocurre la modulación de la acetilación de histonas observadas en nuestro estudio:

- Realizar experimentos de doble inmuno-fluorescencia con marcadores específicos de neuronas (NeuN), de células gliales (GFAP), de neuronas glutamatergicas (vGluT) y GABAergicas (GAD67), y los anticuerpos contra las histonas acetiladas.

## BIBLIOGRAFÍA

---

- Alarcón JM, Malleret G, Touzani K, Vronskaya S, Ishii S, Kandel ER, Barco A (2004) **Chromatin acetylation, memory, and LTP are impaired in CBP+/- mice: a model for the cognitive deficit in Rubinstein-Taybi syndrome and its amelioration.** *Neuron* 42: 947-959.
- Ampuero E, Rubio FJ, Falcon R, Sandoval M, Diaz-Veliz G, Gonzalez RE, Earle N, Dagnino-Subiabre A, Aboitiz F, Orrego F, Wyneken U (2010) **Chronic fluoxetine treatment induces structural plasticity and selective changes in glutamate receptor subunits in the rat cerebral cortex.** *Neuroscience* 169: 98-108.
- Anier K, Malinovskaja K, Aonurm-Helm A, Zharkovsky A, Kalda A (2010) **DNA methylation regulates cocaine-induced behavioral sensitization in mice.** *Neuropsychopharmacology* 35: 2450-2461.
- Atwal JK, Pinkston-Gosse J, Syken J, Stawicki S, Wu Y, Shatz C, Tessier-Lavigne M (2008) **PirB is a Functional Receptor for Myelin Inhibitors of Axonal Regeneration.** *Science* 322: 967-970.
- Ausió J (2006) **Histone variants-the structure behind the function.** *Brief Funct Genomic Proteomic* 5: 228-43.
- Bardin J (2012) **Neurodevelopment: unlocking the brain.** *Nature* 487: 24-26.
- Baroncelli L, Sale A, Viegi A, Maya Vetencourt JF, De Pasquale R, Baldini S, Maffei L (2010) **Experience-dependent reactivation of ocular dominance plasticity in the adult visual cortex.** *Exp Neurol* 226:100-109.
- Baroncelli L, Scali M, Sansevero G, Olimpico F, Manno I, Costa M, Sale A (2016) **Experience Affects Critical Period Plasticity in the Visual Cortex through an Epigenetic Regulation of Histone Post-Translational Modifications.** *J Neurosci* 36: 3430-3440.
- 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: 12-9.
- Berardi N, Pizzorusso T, Maffei L (2000) **Critical periods during sensory development.** *Curr Opin Neurobiol* 10: 138-145.
- Berardi N, Pizzorusso T, Ratto GM, Maffei L (2003) **Molecular basis of plasticity in the visual cortex.** *Trends Neurosci* 26: 369-378.
- Berardi N, Pizzorusso T, Maffei L (2004) **Extracellular matrix and visual cortical plasticity: freeing the synapse.** *Neuron* 44: 905-908.
- Borna, N (2015) **Estudio de la expresión de variantes y de modificaciones postraduccionales de histonas en un modelo de plasticidad de la corteza visual.** Tesis de Maestría.
- Bredy TW, Wu H, Vrego C, Zellhoefer J, Sun YE, Barad M (2007) **Histone modifications around individual BDNF gene promoters in prefrontal cortex are associated with extinction of conditioned fear.** *Learn Mem* 14: 268-276.

- Brownell JE, Allis CD (1996) **Special HATs for special occasions: linking histone acetylation to chromatin assembly and gene activation.** *Curr Opin Genet Dev* 6: 176-184.
- Cabelli RJ, Hohn A, Shatz CJ (1995) **Inhibition of ocular dominance column formation by infusion of NT-4/5 or BDNF.** *Science* 267: 1662-1666
- Cancedda L, Putignano E, Sale A, Viegi A, Berardi N, Maffei L (2004) **Acceleration of visual system development by environmental enrichment.** *J Neurosci* 24: 4840-4848.
- Castrén E (2004) **Neurotrophic effects of antidepressant drugs.** *Curr Opin Pharmacol* 4: 58-64.
- Cheung P, Allis CD, Sassone-Corsi P (2000) **Signaling to chromatin through histone modifications.** *Cell* 103: 263-271
- 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: e475.
- Cohen CS, Fraser SE (1995) **Effects of brain-derived neurotrophic factor on optic axon branching and remodeling in vivo.** *Nature* 378: 192-196.
- Cohen CS, Dreyfus CF, Black IB (1991). **NGF and excitatory neurotransmitters regulate survival and morphogenesis of cultures cerebellar Purkinje cells.** *J Neurosci* 11: 462-471.
- Crosio C, Heitz E, Allis CD, Borrelli E, Sassone-Corsi P (2003) **Chromatin remodeling and neuronal response: multiple signaling pathways induce specific histone H3 modifications and early gene expression in hippocampal neurons.** *J Cell Sci* 116: 4905-4914.
- Deng JV, Rodriguiz RM, Hutchinson AN, Kim IH, Wetsel WC, West AE (2010) **MeCP2 in the nucleus accumbens contributes to neural and behavioral responses to psychostimulants.** *Nat Neurosci* 13: 1128-1136.
- Diamond J, Holmes M, Coughlin M (1992) **Endogenous NGF and nerve impulses regulate the collateral sprouting of sensory axons in the skin of the adult rat.** *J Neurosci* 12: 1454-1466.
- DiCristo G (2007) **Development of cortical GABAergic circuits and its implications for neurodevelopmental disorders.** *Clin Genet* 72: 1-8.
- Dion MF, Altschuler SJ, Wu LF, Rando OJ (2005) **Genomic characterization reveals a simple histone H4 acetylation code.** *Proc Natl Acad Sci USA* 102: 5501-5506.
- Dulawa SC, Holick KA, Gundersen B, Hen R (2004) **Effects of chronic fluoxetine in animal models of anxiety and depression.** *Neuropsychopharmacology* 29: 1321-30.
- Edbauer D, Neilson JR, Foster KA, Wang CF, Seeburg DP, Batterton MN, Tada T, Dolan BM, Sharp PA, Sheng M (2010) **Regulation of synaptic structure and function by FMRP-associated microRNA miR-125b and miR-132.** *Neuron*, 65: 373-384.
- Fagiolini M, Hensch TK (2000) **Inhibitory threshold for critical-period activation in primary visual cortex.** *Nature* 404: 183-186.

- Fagiolini M, Fritschy JM, Low K, Mohler H, Rudolph U, Hensch TK (2004) **Specific GABA circuits for visual cortical plasticity.** *Science* 303:1681-1683.
- Fass DM, Butler JE, Goodman RH (2003) **Deacetylase activity is required for cAMP activation of a subset of CREB target genes.** *J Biol Chem* 278: 43014-43019.
- Fass DM, Reis SA, Ghosh B, Hennig KM, Joseph NF, Zhao WN, Nieland TJ, Guan JS, Kuhnle CE, Tang W, Barker DD, Mazitschek R, Schreiber SL, Tsai LH, Haggarty SJ (2013) **Crebinostat: a novel cognitive enhancer that inhibits histone deacetylase activity and modulates chromatin-mediated neuroplasticity.** *Neuropharmacology* 64: 81-96.
- Fischer JJ, Toedling J, Krueger T, Schueler M, Huber W, Sperling S (2007) **Combinatorial effects of four histone modifications in transcription and differentiation.** *Genomics* 91: 41-51.
- Fischle W, Wang Y, Allis CD (2003) **Histone and chromatin cross-talk.** *Curr Opin Cell Biol* 15: 172-183
- Flavell SW, Greenberg ME (2008) **Signaling mechanisms linking neuronal activity to gene expression and plasticity of the nervous system.** *Ann Rev Neurosci* 31: 563-590.
- Francis D, Diorio J, Liu D, Meaney MJ (1999) **Nongenomic transmission across generations of maternal behavior and stress responses in the rat.** *Science* 286: 1155-1158.
- Galizia CD, Lledo PM (eds) (2013) **Neurosciences - From Molecule to Behaviour: a University Textbook.** Springer Spektrum.
- Ghosh A, Greenberg ME (1995) **Calcium signaling in neurons: molecular mechanisms and cellular consequences.** *Science* 268: 239-247.
- Gianfranceschi L, Siciliano R, Walls J (2003) **Visual cortex is rescued from the effects of dark rearing by overexpression of BDNF.** *Proc Natl Acad Sci USA* 100: 12486-12491.
- Giannakopoulos M, Kouvelas ED, Mitsacos A (2010) **Experience-dependent regulation of NMDA receptor subunit composition and phosphorylation in the retina and visual cortex.** *Invest Ophthalmol Vis Sci* 51: 1817-1822.
- Graff J, Mansuy I (2008) **Epigenetic codes in cognition and behavior.** *Behav Brain Res* 192: 70-78.
- Green G, Do D (2009) **Purification and analysis of variant and modified histones using 2D PAGE.** *Methods Mol Biol* 464: 285-302.
- Guirado R1, Varea E, Castillo-Gómez E, Gómez-Climent MA, Rovira-Esteban L, Blasco-Ibáñez JM, Crespo C, Martínez-Guijarro FJ, Nàcher J (2009) **Effects of chronic fluoxetine treatment on the rat somatosensory cortex: activation and induction of neuronal structural plasticity.** *Neurosci Lett* 457: 12-15.
- Hajszan T, Maclusky NJ, Leranth C (2005) **Short-term treatment with the antidepressant fluoxetine triggers pyramidal dendritic spine synapse formation in rat hippocampus.** *Eur J Neurosci* 21: 1299-303.
- Hammer O, Harper DAT, Ryan PD (2001) **Past: paleontological statistics software package for education and data analysis.** *Palaeontologia Electronica*, 4, 9.

- Hanover JL, Huang ZJ, Tonegawa S, Stryker MP (1999) **Brain-derived neurotrophic factor overexpression induces precocious critical period in mouse visual cortex.** J Neurosci 19: RC40.
- Hansen KF, Sakamoto K, Wayman GA, Impey S, Obrietan K (2010) **Transgenic miR132 alters neuronal spine density and impairs novel object recognition memory.** PLoS One 5: e15497
- Harauzov A, Spolidoro M, DiCristo G, De Pasquale R, Cancedda L, Pizzorusso T, Viegi A, Berardi N, Maffei L (2010) **Reducing intracortical inhibition in the adult visual cortex promotes ocular dominance plasticity.** J Neurosci 30: 361-71.
- He HY, Baisali R, Dennis K, Quinlan EM (2007) **Experience-dependent recovery of vision following chronic deprivation amblyopia.** Nature 10: 1134-1136.
- He HY, Hodos W, Quinlan EM (2006) **Visual Deprivation Reactivates Rapid Ocular Dominance Plasticity in Adult Visual Cortex.** J Neurosci 26: 2951-2955.
- He HY, Lehming N (2003) **Global effects of histone modifications.** Brief Funct Genomic Proteomic 2: 234-243.
- Hensch TK, Fagiolini M, Mataga N, Stryker MP, Baekkeskov S, Kash SF (1998) **Local GABA circuit control of experience-dependent plasticity in developing visual cortex.** Science 282: 1504-1508.
- Hensch TK (2005) **Critical period plasticity in local cortical circuits.** Nat Rev Neurosci 6: 877-888.
- Holmes J, Clarke M (2006) **Amblyopia.** Lancet 367: 1343-1351.
- Hooks BM, Chen C (2007) **Critical periods in the visual system: changing views for a model of experience-dependent plasticity.** Neuron 56: 312-326.
- Huang ZJ, Kirkwood A, Pizzorusso T, Porciatti V, Morales B, Bear MF, 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.
- Huang ZJ, Di Cristo G (2008) **Time to change: retina sends a messenger to promote plasticity in visual cortex.** Neuron 59: 355-358.
- Hubel DH, Wiesel TN (1965) **Binocular interaction in striate cortex of kittens reared with artificial squint.** J Neurophysiol 28: 1041-59
- Hubel DH, Wiesel TN (1998) **Early exploration of the visual cortex.** Neuron 20: 401-412.
- Im HI, Hollander JA, Bali P, Kenny PJ (2010) **MeCP2 controls BDNF expression and cocaine intake through homeostatic interactions with microRNA-212.** Nat Neurosci 13: 1120-1127.
- Impey S, Davare M, Lesiak A, Fortin D, Ando H, Varlamova O, Obrietan K, Soderling TR, Goodman RH, Wayman GA (2010) **An activity-induced micro RNA controls dendritic spine formation by regulating Rac1-PAK signaling.** Mol Cell Neurosci 1: 146-156.
- Jacobson RH, Ladurner AG, King DS, Tjian R (2000) **Structure and function of a human TAFII250 double bromodomain module.** Science 288: 1422-1425

- Jaenisch R, Bird A (2003) **Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals.** Nat Genet 33: 245-254.
- Jenuwein T, Allis CD (2001) **Translating the histone code.** Science 293: 1074-1080.
- Karpova NN, Lindholm J, Pruunsild P, Timmusk T, Castrén E (2008) **Long-lasting behavioural and molecular alterations induced by early postnatal fluoxetine exposure are restored by chronic fluoxetine treatment in adult mice.** Eur Neuropsychopharmacol 19: 97-108.
- Kazantsev AG, Thompson LM (2008) **Therapeutic application of histone deacetylase inhibitors for central nervous system disorders.** Nat Rev Drug Discov 7: 854-868.
- Keith BJ Franklin, George Paxinos (2007) **The Mouse Brain in stereotaxic coordinates.** Tercera edición.
- Kiorpes L, Kiper D, Keefe L, Cavanaugh J, Movshon J (1998) **Neuronal correlates of amblyopia in the visual cortex of macaque monkeys with experimental strabismus and anisometropia.** J Neurosci 18: 6411-6424
- Klose RJ, Zhang Y (2007) **Regulation of histone methylation by demethylase and demethylation.** Nat Rev Mol Cell Biol 8: 307–318.
- Korzus E, Rosenfeld MG, Mayford M (2004) **CBP histone acetyltransferase activity is a critical component of memory consolidation.** Neuron 42: 961-972.
- Kouzarides T (2007) **Chromatin modifications and their function.** Cell 128: 693-705.
- Kusch T, Workman JL (2007). **Histone variants and complexes involved in their exchange.** Subcell Biochem 41: 91-109.
- Lalonde J, Chaudhuri A (2007) **Dynamic changes in CREB phosphorylation and neuroadaptive gene expression in area V1 of adult monkeys after monocular enucleation.** Mol Cell Neurosci 35: 24-37.
- LaPlant Q, Vialou V, Covington HE, Dumitriu D, Feng J, Warren B, Maze I, Dietz DM, Watts EL, Iñiguez SD, Koo JW, Mouzon E, Renthal W, Hollis F, Wang H, Noonan MA, Ren YH, Eisch AJ, Bolaños CA, Kabbaj M, Xiao GH, Neve RL, Hurd YL, Oosting RS, Fan GP, Morrison JH, Nestler EJ (2010) **Dnmt3a regulates emotional behavior and spine plasticity in the nucleus accumbens.** Nat Neurosci 13: 1137-1143.
- Latham JA, Dent SY (2007) **Cross-regulation of histone modifications.** Nat Struct Mol Biol 14: 1017–1024.
- Lattal KM, Barrett RM, Wood MA (2007) **Systemic or intrahippocampal delivery of histone deacetylase inhibitors facilitates fear extinction.** Behav Neurosci 121: 1125-1131.
- Leamey CA, Van Wart A, Sur M (2009) **Intrinsic patterning and experience-dependent mechanisms that generate eye-specific projections and binocular circuits in the visual pathway.** Curr Op Neurobiol 19: 181-187.
- Lesburguères E, Gobbo OL, Alaux-Cantin S, Hambucken A, Trifilieff P, Bontempi B (2011) **Early tagging of cortical networks is required for the formation of enduring associative memory.** Science 331: 924-928.

- Levenson JM, O'Riordan KJ, Brown KD, Trinh MA, Molfese DL, Sweatt JD (2004) **Regulation of histone acetylation during memory formation in the hippocampus.** J Biol Chem 279: 40545-40559
- Levenson JM, Sweatt JD (2005) **Epigenetic mechanisms in memory formation.** Nat Rev Neurosci 6: 108-118.
- Lin Y, Bloodgood BL, Hauser JL, Lapan AD, Koon AC, Kim TK, Hu LS, Malik AN, Greenberg ME (2008) **Activity-dependent regulation of inhibitory synapse development by NPAS4.** Nature 455: 1198-1204.
- Lopez-Atalaya JP, Gervasini C, Mottadelli F, Spina S, Piccione M, Scarano G, Selicorni A, Barco A, Larizza L (2012) **Histone acetylation deficits in lymphoblastoid cell lines from patients with Rubinstein-Taybi syndrome.** J Med Genet 49: 66-74.
- Lounis S, Sassone-Corsi P (2003) **Histone phosphorylation: how to proceed.** Methods 31: 40-48.
- Maddox SA, Schafe GE (2011) **Epigenetic alterations in the lateral amygdala are required for reconsolidation of a Pavlovian fear memory.** Learn Mem 18: 579-593.
- Maffei L, Berardi N, Domenici L, Parisi V, Pizzorusso T (1992) **Nerve grow factor (NGF) prevents the shift in ocular dominance distribution of visual cortical neurons in monocularly deprived rats.** J Neurosci 12: 4651-4662.
- Majdan M, Shatz C J (2006) **Effects of visual experience on activity-dependent gene regulation in cortex.** Nat Neurosci 9: 650-659.
- Marks PA, Xu WS (2009) **Histone deacetylase inhibitors: Potential in cancer therapy.** J Cell Biochem 107: 600-608.
- Mataga N, Nagai N, Hensch TK (2002) **Permissive proteolytic activity for visual cortical plasticity.** Proc Natl Acad Sci USA 99: 7717-7721.
- Mataga N, Mizuguchi Y, Hensch TK (2004) **Experience-dependent pruning of dendritic spines in visual cortex by tissue plasminogen activator.** Neuron 44: 1031-1041.
- Maya Vetencourt J, Sale A, Viegi A, Baroncelli L, De Pasquale R, O'Leary O, Castrén E, Maffei L (2008) **The antidepressant Fluoxetine restores plasticity in the adult visual cortex.** Science 320: 385-388.
- Maya Vetencourt J, Caleo M, Maffei L (2009) **Frontiers in neural plasticity: can we treat amblyopia in adulthood?.** Opht Int Winter 2009, 45-50.
- Maya Vetencourt J, 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.
- Maya Vetencourt J, Baroncelli L, Viegi A, Tiraboschi E, Castrén E, Cattaneo A, Maffei L (2012) **IGF-1 restores visual cortex plasticity in adult life by reducing local GABA levels.** Neural Plast 2012, 250421.
- Maya Vetencourt J, Origlia N (2012) **Visual cortex plasticity: a complex interplay of genetic and environmental influences.** Neural Plast 2012, 631965.

- Maya Vetencourt J, Tiraboschi E, Greco D, Resani L, Cerri C, Auvinen P, Maffei L, Castren E (2012) **Experience-dependent expression of NPAS4 regulates plasticity in adult visual cortex.** J Physiol 590: 4777-4787.
- Maya Vetencourt J, Pizzorusso T (2013) **Molecular mechanisms at the basis of plasticity in the developing visual cortex: epigenetic processes and gene programs.** J Exp Neurosci. 2013: 775-83.
- Mayr B, Montminy M (2001) **Transcriptional regulation by the phosphorylation-dependent factor CREB.** Nat Rev Mol Cell Biol 2: 599-609.
- Maze I, Nestler EJ (2011) **The epigenetic landscape of addiction.** Ann N Y Acad Sci 1216: 99-113.
- McAllister AK, Lo DC, Katz LC (1995) **Neurotrophins regulate dendritic growth in developing visual cortex.** Neuron 15: 791-803.
- McGee AW, Yang Y, Fischer QS, Daw NW; Strittmatter SM (2005) **Experience-Driven Plasticity of Visual Cortex Limited by Myelin and Nogo Receptor.** Science 309: 2222-2226.
- McQuown SC, Wood MA (2010) **Epigenetic regulation in substance use disorders.** Curr Psychiatry Rep 12: 145-153.
- Medini P, Pizzorusso T (2008) **Visual experience and plasticity of the visual cortex: a role for epigenetic mechanisms.** Front Biosci 13: 3000-3007.
- Mellios N, Sugihara H, Castro J, Banerjee A, Le C, Kumar A, Crawford B, Strathmann J, Tropea D, Levine SS, Edbauer D, Sur M (2011) **miR-132, an experience-dependent microRNA, is essential for visual cortex plasticity.** Nat Neurosci 14: 1240-1242.
- Mittelman D (2003) **Amblyopia.** Pediatr Clin North Am 50: 189-196.
- Monsey MS, Ota KT, Akingbade IF, Hong ES, Schafe GE (2011) **Epigenetic alterations are critical for fear memory consolidation and synaptic plasticity in the lateral amygdala.** PLoS One 6: e19958.
- Morishita H, Hensch TK (2008) **Critical period revisited: impact on vision.** Curr Op Neurobiol 18:101-107.
- Morishita H, Kundakovic M, Bicks L, Mitchell A, Akbarian S (2015) **Interneuron epigenomes during the critical period of cortical plasticity: Implications for schizophrenia.** Neurobiol Learn Mem 124: 104-110.
- Mower AF, Liao DS, Nestler EJ, Neve RL, Ramoa AS (2002) **cAMP/Ca<sup>2+</sup> response element-binding protein function is essential for ocular dominance plasticity.** J Neurosci 22: 2237-2245.
- Nathan D, Ingvarsdottir K, Sterner DE, Bylebyl GR, Dokmanovic M, Dorsey LA, et al (2006) **Histone sumoylation is a negative regulator in Saccharomyces cerevisiae and shows dynamic interplay with positive-acting histone modifications.** Gene Dev 20: 966-976.
- Nestler EJ (2014) **Epigenetic mechanisms of drug addiction.** Neuropharmacology 76:259-268.
- Nibuya M, Morinobu S, Duman RS (1995). **Regulation of BDNF and trkB mRNA in rat brain by chronic electroconvulsive seizure and antidepressant drug treatments.** J Neurosci 15: 7539-7547.

- Norris KL, Lee JY, Yao TP (2009) **Acetylation Goes Global: The Emergence of Acetylation Biology**. *Sci Signal* 2: pe76.
- Nott A, Cho S, Seo J, Tsai LH (2015) **HDAC2 expression in parvalbumin interneurons regulates synaptic plasticity in the mouse visual cortex**. *Neuroepigenetics* 1: 34-40.
- O'Leary OF, Wu X, Castren E (2009) **Chronic fluoxetine treatment increases expression of synaptic proteins in the hippocampus of the ovariectomized rat: role of BDNF signalling**. *Psychoneuroendocrinology* 34: 367-381.
- Olson BJSC, Markwell J (2001) **Assays for Determination of Protein Concentration**. *Current Protocols in Protein Science*. John Wiley & Sons, Inc.
- Oray S, Majewska A, Sur M (2004) **Dendritic spine dynamics are regulated by monocular deprivation and extracellular matrix degradation**. *Neuron* 44: 1021-1030.
- Paxinos G, Franklin KB (2007) **The mouse brain in stereotaxic coordinates**. Gulf Professional Publishing.
- Peleg S, Sananbenesi F, Zovoilis A, Burkhardt S, Bahari-Javan S, Agis-Balboa RC, Cota P, Wittnam JL, Gogol-Doering A, Opitz L, Salinas-Riester G, Dettenhofer M, Kang H, Farinelli L, Chen W, Fischer A (2010) **Altered histone acetylation is associated with age-dependent memory impairment in mice**. *Science* 28: 753-756.
- Peters AH, Schubeler D (2005) **Methylation of histones: playing memory with DNA**. *Curr Opin Cell Biol* 17: 230-238.
- Peterson CL, Laniel MA (2004) **Histones and histone modifications**. *Curr Biol* 14: R546-R551.
- Petrij F, Giles RH, Dauwerse HG, Saris JJ, Hennekam RC, Masuno M, Tommerup N, van Ommen GJ, Goodman RH, Peters DJ (1995) **Rubinstein-Taybi syndrome caused by mutations in the transcriptional co-activator CBP**. *Nature* 376: 348-351.
- Pham TA, Impey S, Storm DR, Stryker MP (1999) **CRE-mediated gene transcription in neocortical neuronal plasticity during the developmental critical period**. *Neuron* 22: 63-72.
- Pham TA, Rubenstein JL, Silva AJ, Storm DR, Stryker MP (2001) **The CRE/CREB pathway is transiently expressed in thalamic circuit development and contributes to refinement of retinogeniculate axons**. *Neuron* 31: 409-420
- Pham TA, Graham SJ, Suzuki S, Barco A, Kandel ER, Gordon B, Lickey ME (2004) **A semi-persistent adult ocular dominance plasticity in visual cortex is stabilized by activated CREB**. *Learn Mem* 11:738-47.
- Pineyro G, Blier P (1999) **Autoregulation of serotonin neurons: role in antidepressant drug action**. *Pharmacol Rev* 51: 533-591.
- Piña B, Martínez P, Suau P (1988) **Differential acetylation of core histones in rat cerebral cortex neurons during development and aging**. *Eur J Biochem* 174: 311-315.
- Pizzorusso T, Medini P, Berardi n, Chierzi S, Fawcett JW, Maffei L (2002) **Reactivation of ocular dominance plasticity in the adult visual cortex**. *Science* 298: 1248-1251.

- Pizzorusso T, Medini P, Landi S, Baldini S, Berardi N, Maffei L (2006) **Structural and functional recovery from early monocular deprivation in adult rats**. Proc Natl Acad Sci USA, 103: 8517-8522.
- Purves D, Augustine GJ, Fitzpatrick D, Hall WC; Lamantia AS, McNamara JO, Williams SM (eds.) (2004) **Principles of neuroscience**.
- Putignano E, Lonetti G, Cancedda L, Ratto G, Costa M, Maffei L, Pizzorusso T (2007) **Developmental downregulation of histone posttranslational modifications regulates visual cortical plasticity**. Neuron 1: 747-759.
- Prusky GT, West PW, Douglas RM (2000) **Behavioral assessment of visual acuity in mice and rats**. Vision Res 40: 2201-2209.
- Rantamaki T, Hendolin P, Kankaanpaa A, Mijatovic J, Piepponen P, Domenici E, Chao MV, Mannisto PT, 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.
- Renthall W, Nestler EJ (2008) **Epigenetic mechanisms in drug addiction**. Trends Mol Med 14: 341-350.
- Roelfsema JH, Peters DJ (2007) **Rubinstein-Taybi syndrome: clinical and molecular overview**. Expert Rev Mol Med 9: 1-16.
- Romero-Calvo I, Ocón B, Martínez-Moya P, Suárez MD, Zarzuelo A, Martínez-Augustin O, de Medina FS (2010) **Reversible Ponceau staining as a loading control alternative to actin in Western blots**. Anal Biochem 401: 318-320.
- Rosenfeld MG, Glass CK. J (2001) **Coregulator codes of transcriptional regulation by nuclear receptors**. Biol Chem 276: 36865-36868.
- Rossi FMR (2016). **Analysis of fluoxetine-induced plasticity mechanisms as a strategy for understanding plasticity related neural disorders**. Neural Reg Res 11: 547-548.
- Ruiz-Perera L, Muniz M, Vierci G, Bornia N, Baroncelli L, Sale A, Rossi FM (2015) **Fluoxetine increases plasticity and modulates the proteomic profile in the adult mouse visual cortex**. SciRep 5: 12517
- Ryffel B, Woerly G, Greiner B, Haendler B, Mitasch MJ, Foxwell BM (1991) **Distribution of the cyclosporine binding protein cyclophilin in human tissues**. Immunology 72: 399-404.
- Sale A, Maya Vetencourt JF, Medini P, Cenni MC, Baroncelli L, De Pasquale R, Maffei L (2007) **Environmental enrichment in adulthood promotes amblyopia recovery through a reduction of intracortical inhibition**. Nat Neurosci 10: 679-681.
- Sale A, Berardi N, Maffei L (2009) **Enrich the environment to empower the brain**. Trends Neurosci 32: 233-239.
- Sale A, Berardi N, Spolidoro M, Baroncelli L, Maffei L (2010) **GABAergic inhibition in visual cortical plasticity**. Front Cell Neurosci 30:361-371.

- Saura CA, Choi SY, Beglopoulos V, Malkani S, Zhang D, Shankaranarayana Rao BS, Chattarji S, Kelleher RJ 3rd, Kandel ER, Duff K, Kirkwood A, Shen J (2004) **Loss of presenilin function causes impairments of memory and synaptic plasticity followed by age-dependent neurodegeneration.** *Neuron* 42: 23-36.
- Schratt GM, Tuebing F, Nigh EA et al (2006) **A brain specific microRNA regulates dendritic spine development.** *Nature* 439: 283-289.
- Shechter D, Dormann HL, Allis CD, Hake SB (2007) **Extraction, purification and analysis of histones.** *Nat Protoc* 2: 1445-1457.
- Shiio Y, Eisenman RN (2003) **Histone sumoylation is associated with transcriptional repression.** *Proc Natl Acad Sci USA* 100:13225-13230.
- Shilatifard A (2006) **Chromatin modifications by methylation and ubiquitination: implications in the regulation of gene expression.** *Annu Rev Biochem* 75: 243-269.
- Shilatifard A (2008) **Molecular implementation and physiological roles for histone H3 lysine 4 (H3K4) methylation.** *Curr Opin Cell Biol* 20: 341-348.
- Silingardi D, Scali M, Belluomini G, Pizzorusso T (2010) **Epigenetic treatments of adult rats promotes recovery from visual acuity deficits induced by long-term monocular deprivation.** *Eur J Neurosci* 31:2185-2192.
- Strahl BD, Allis CD (2000) **The language of covalent histone modifications.** *Nature* 403: 41-45.
- Sugiyama S, Di Nardo AA, Aizawa S et al (2008) **Experience-dependent transfer of Otx2 homeoprotein into the visual cortex activates postnatal plasticity.** *Cell* 134: 508-520.
- Syken J, Grandpre T, Kanold PO, Shatz CJ (2006) **PirB restricts ocular-dominance plasticity in visual cortex.** *Science* 313: 1795-800.
- Taniura H, Sng JC, Yoneda Y (2007) **Histone modification in the brain.** *Neurochem Int* 51: 85-91.
- Tognini P, Putignano E, Coatti A, Pizzorusso T (2011) **Experience-dependent expression of miR-132 regulates ocular dominance plasticity.** *Nat Neurosci* 14: 1237-1237.
- Tognini P, Napoli D, Pizzorusso T (2015) **Dynamic DNA methylation in the brain: a new epigenetic mark for experience-dependent plasticity.** *Front Cell Neurosci* 9: 331.
- 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: 660-668
- Tropea D, Van Wart A, Sur M (2009) **Molecular mechanisms of experience-dependent plasticity in visual cortex.** *Phil Trans R Soc B* 1-12.
- Tweedie-Cullen RY, Brunner AM, Grossmann J, Mohanna S, Sichau D, Nanni P, Panse C, Mansuy IM (2012) **Identification of combinatorial patterns of post-translational modifications on individual histones in the mouse brain.** *PLoS one* 7: e36980.

- Turner BM (2000) **Histone acetylation and an epigenetic code.** Bioessays 22: 836-845.
- Van Lint C, Emiliani S, Verdin E (1996) **The expression of a small fraction of cellular genes is changed in response to histone hyperacetylation.** Gene Expr 5: 245-253.
- Vecsey CG1, Hawk JD, Lattal KM, Stein JM, Fabian SA, Attner MA, Cabrera SM, McDonough CB, Brindle PK, Abel T, Wood MA (2007) **Histone deacetylase inhibitors enhance memory and synaptic plasticity via CREB:CBP-dependent transcriptional activation.** J Neurosci 27: 6128-6140.
- Vierci G, Bornia N, Pannunzio B, Rossi FM (2016) **H3 and H4 lysine acetylation correlates with developmental and experimentally induced adult experience-dependent plasticity in the mouse visual cortex.** En preparación.
- Vo N, Goodman RH (2001) **CREB-binding protein and p300 in transcriptional regulation.** J Biol Chem 276: 13505-13508.
- Vo N, Klein ME, Varlamova C, Keller DM, Yamamoto T, Goodman RH, Impey S (2005) **A cAMP-response element binding protein-induced microRNA regulates neuronal morphogenesis.** Proc Natl Acad Sci USA 102: 16426-16431.
- Wang T, Xie K, Lu B (1995) **Neurotrophins promote maturation of developing neuromuscular synapses.** J Neurosci 15: 4796-4805.
- Wayman GA, Davare M, Ando H, Fortin D, Varlamova O, Cheng HY, Marks D, Obrietan K, Soderling TR, Goodman RH, Impey S (2008) **An activity-regulated microRNA controls dendritic plasticity by down-regulating p250GAP.** Proc Natl Acad Sci USA 105: 9093-9098.
- Weaver N, Cervoni FA, Champagne, et al (2004) **Epigenetic programming by maternal behavior.** Nat Neurosci 7: 847-854.
- Wiesel TN, Hubel DH (1963a) **Single-cell responses in striate cortex of kittens deprived of vision in one eye.** J Neurophysiol 26: 1003-1017.
- Wiesel TN, Hubel DH (1963b) **Effects of Visual Deprivation on Morphology and Physiology of Cells in the Cats Lateral Geniculate Body.** J Neurophysiol 26:978-993.
- Wiesel TN, Hubel DH (1965) **Comparison of the effects of unilateral and bilateral eye closure on cortical unit responses in kittens.** J Neurophysiol 28: 1029-1040.
- Wood MA1, Hawk JD, Abel T (2006) **Combinatorial chromatin modifications and memory storage: a code for memory?** Learn Mem 13: 241-244.
- Wu C, Hunter DG (2006) **Amblyopia: diagnostic and therapeutic options.** Am J Ophthalmol 141: 175-184.
- Yiu G, He Z (2006) **Glial inhibition of CNS axon regeneration.** Nat Rev Neurosci 7: 617-627.
- Zovkic IB, Paulukaitis BS, Day JJ, Etikala DM, Sweatt JD (2014) **Histone H2A.Z subunit exchange controls consolidation of recent and remote memory.** Nature 515: 582-586

