

**TESIS DE GRADO EN LICENCIATURA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS  
ORIENTACIÓN NEUROCIENCIAS**

# **Análisis de los cambios proteómicos asociados a la plasticidad en la corteza visual de ratón.**

**Agustina Dapuetto**

**Laboratorio de Neurociencias “Unidad de Neuroplasticidad”, Facultad  
de Ciencias, Universidad de la República.**

**Febrero 2019.**

**Orientador:**

**Francesco M. Rossi**



## Agradecimientos:

En primer lugar, debo agradecerle a Francesco, quien me abrió las puertas del Laboratorio y mostró gran interés desde el primer momento, no solo en el ámbito académico, sino también en el personal, convirtiéndose en más que solo un tutor, sino también en un amigo, que espero poder conservar. Gracias por ser no solo un excelente mentor, sino una excelente persona y siempre estar abierto a escuchar cualquier duda o proposición. Gracias por todas las enseñanzas compartidas y por esa gran disposición a ayudar.

En segundo lugar, gracias a toda la gente del piso 4, por la aceptación, todos los almuerzos compartidos y esas charlas que más de una vez me hicieron reír.

Quisiera agradecer también a mis amigos por la presencia constante durante todos estos años. Gracias a Ximena, amiga de toda la vida, por todos los recreos mentales sumamente necesarios en los que me acompañó. A mis compañeros de carrera que se volvieron mejores amigos, gracias por los cientos de almuerzos compartidos, las risas, los consejos. Particularmente debo agradecer a Andrés, por ser mi fiel compañero de escapadas a McDolanld's en las horas puente, y por reírse conmigo de las cosas más absurdas. También a Cami, con quien no solo comparto el amor por la biología, sino también por el arte y los libros, gracias por ser de lo más lindo que me dejó la Facultad y siempre contagiar alegría, incluso en la más fría de las mañanas.

Gracias al tribunal por aceptar evaluar este trabajo e invertir su tiempo en ayudarme a superar esta etapa tan importante de mi carrera. Particularmente gracias a Giselle, por las palabras de aliento en momentos difíciles y por darme la oportunidad de ser parte de su Laboratorio, ayudándome a sustentar los últimos meses de desarrollo de esta tesis.

Al Fondo de Solidaridad, por haber brindado apoyo durante casi el total de la Licenciatura y darme la oportunidad de ser la primera persona en mi familia con un título universitario.

Por último, gracias a mi familia por el apoyo incondicional de toda la vida. Gracias a mis padres por haber imaginado una vida mejor para su hija y darme siempre la libertad de elegir todos los aspectos de mi futuro. Gracias a mi mamá por todas las comidas en la cama cuando no podía dejar de estudiar, por estar ahí en los momentos de llanto por perder un examen y darme siempre el aliento necesario para nunca rendirme. Gracias a mi papá por todos los documentales mirados juntos cuando pequeña, los cuales fueron el primer impulsor de mi amor por la ciencia. Gracias a ambos, por siempre creer en mí y confiar sin la más mínima duda en todas mis decisiones. Sin ellos, nada de esto habría sido posible.

## Resumen:

El sistema nervioso (SN), se caracteriza por su gran capacidad adaptativa a los constantes cambios de su entorno, pudiendo modificar su conformación anatómica y funcional en respuesta a estos. Esta propiedad, denominada plasticidad neuronal, es necesaria para el correcto desarrollo del SN y para la adquisición gradual de todas las funciones nerviosas, desde la locomoción hasta los procesos cognitivos superiores. Varios estudios han demostrado que existen ventanas temporales, conocidas como periodos críticos de plasticidad, en los cuales esta capacidad plástica es particularmente alta, y con el pasar del tiempo estas ventanas cierran y se ve ampliamente disminuida. Actualmente se cree que la reducción en la capacidad plástica del sistema nervioso adulto, es la causa de la escasa recuperación funcional característica de varias patologías neuronales. El sistema visual es un modelo clásico para el análisis de procesos de plasticidad dependientes de la experiencia, y estudios recientes sobre este modelo han encontrado estrategias que determinan un aumento de los niveles de plasticidad en el adulto, y que facilitan la recuperación de patologías en modelos experimentales animales, como la administración de fluoxetina o la exposición a ambiente enriquecido. Sin embargo, los mecanismos moleculares y celulares subyacentes a los procesos de plasticidad durante el desarrollo, y que controlan los niveles de plasticidad a lo largo de la vida son aún poco caracterizados. Un mayor entendimiento de los mecanismos que controlan la apertura, duración y cierre del periodo crítico puede ser útil para desarrollar estrategias que potencien la plasticidad en el adulto y así poder potencialmente facilitar la recuperación funcional en determinadas patologías. El presente trabajo tiene como objetivo contribuir a la caracterización de estos mecanismos a nivel molecular, mediante el desarrollo de la proteómica diferencial sobre muestras de corteza visual de ratones jóvenes al pico del periodo crítico (plasticidad alta) y ratones adultos (plasticidad reducida), para identificar así aquellas proteínas que muestren patrones de expresión diferentes entre los dos niveles de plasticidad estudiados. Utilizando la electroforesis bidimensional se lograron identificar 32 spots con una intensidad óptica diferencial entre las dos condiciones, de los cuales 14 aumentan durante el periodo crítico y 18 aumentan en la adultez. Será necesario darle continuidad a este trabajo mediante la secuenciación por espectrometría de masa de los spots que muestran expresión diferencial, para identificar las proteínas y poder así caracterizar los potenciales candidatos a la regulación de la plasticidad cortical.

# Índice

<b>1.</b>	Lista de abreviaciones	1
<b>2.</b>	Introducción	2
	Sobre la electroforesis bidimensional	6
	Antecedentes del grupo: Proteómica de la plasticidad en la corteza visual	9
<b>3.</b>	Hipótesis y Objetivos	11
	Hipótesis	11
	Objetivo general	11
	Objetivos específicos	11
<b>4.</b>	Materiales y Métodos	12
	Mantenimiento de animales y disección tejidos de interés	12
	Electroforesis 2D	12
	Preparación de las muestras para 2D	12
	Extracción proteica	12
	Precipitación de las proteínas	13
	Cuantificación proteica	13
	Rehidratación y enfoque isoeléctrico	13
	2da Dimensión SDS-PAGE	14
	Tinción y Visualización	15
	Western Blot	15
	Preparación de geles	15
	Corrida electroforética	16
	Transferencia a membrana	17
	Experimentos de proteómica diferencial	17
	Procesamientos de imágenes y obtención de datos	17
	Detección de los spots	17
	Comparación de geles	18
	Obtención de datos	19
	Análisis Estadístico	20
<b>5.</b>	Resultados y Discusión	21
	Puesta a punto de la metodología	21
	Preparación de la muestra y evaluación de la calidad de la misma	21
	Electroforesis bidimensional	25

Experimentos de proteómica diferencial	32
Análisis imagenológico de los geles	35
Análisis estadístico	37
Comparación con datos anteriores del Laboratorio	41
<b>6.</b> Conclusiones	43
<b>7.</b> Perspectivas	45
<b>8.</b> Referencias bibliográficas	46

## 1. Lista de abreviaciones

%Vol	Volumen relativo
2D-PAGE	Electroforesis de geles de poliacrilamida bidimensionales
AD	Adulto
AMPA	$\alpha$ -amino-3-hidroxil-5-metil-4-isoxazol-propionato
APS	Persulfato de amonio
CHAPS	3-[(3-Colamidopropil)- dimetilamonio]-propano sulfonato (detergente)
CV	Corteza visual
DIGE	"Difference Gel Electrophoresis" (Electroforesis diferencial de geles)
DTT	Ditiotreitol
E/I	Balance a nivel cortical entre el tono excitatorio y el tono inhibitorio
FLX	Fluoxetina
GABA	Ácido gamma-amino butírico).
ID	Número de identificación
IEF	Isoelectroenfoque
PBS	Buffer fosfato salino
PC	Período crítico
pI	Punto isoeléctrico
PM	Peso molecular
SDS	Dodecil sulfato de sodio
SDS-PAGE	Electroforesis de geles de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio
SEM	Error estándar de la media
SN	Sistema nervioso
TEMED	Tetrametiletildiamina
Tris	Tris(hidroximetil)aminometano
UATE	Unidad de Animales Transgénicos y Experimentación

## 2. Introducción

El sistema nervioso es particularmente interesante por su gran capacidad adaptativa. Esta compleja red, está formada por células especializadas en la transmisión de señales, conocidas como neuronas, que tienen la capacidad de comunicarse entre sí mediante sinapsis, uniones intercelulares especializadas, que permiten definir entidades anatómicas funcionales, denominadas circuitos. Los circuitos se encargan de procesar tipos específicos de información y durante el desarrollo neuronal, estas vías de procesamiento pasan por una serie de transiciones fundamentales, de las que emergen patrones precisos de conexiones sinápticas. Los patrones resultantes, van a depender tanto de señales moleculares, como de patrones de actividad neuronal dados por factores circuitales intrínsecos y también mediados por la experiencia. Esta propiedad de las neuronas de sufrir cambios funcionales y estructurales, en respuesta a cambios en el entorno, se define como plasticidad neuronal dependiente de la experiencia y es un proceso fundamental en el desarrollo de los circuitos neuronales y en hacer posible que el cerebro logre adaptarse a su entorno (Katz & Crowley, 2002; Purves et al., 2008). Este tipo de plasticidad es un proceso continuo de creación y organización de conexiones neuronales, que se produce como resultado de las experiencias sensorio-motoras de los individuos, donde las diferentes situaciones y circunstancias de la vida, influyen en cómo ciertas áreas del cerebro se desarrollan y continúan creciendo.

La plasticidad, es mayor durante etapas específicas del desarrollo y decrece significativamente con el pasar del tiempo. Es decir, existen ventanas temporales, conocidas como periodos críticos de plasticidad dependiente de la experiencia, en la que el cerebro en desarrollo es más maleable y se muestra más responsivo a las influencias ambientales externas (Hooks & Chen, 2007). Estudios recientes, han propuesto que el efecto de la experiencia sobre el cerebro humano se puede separar en tres etapas que ocurren en modo secuencial, permitiendo así la adquisición de habilidades cada vez más complejas (Bardin, 2012). En el caso de la corteza visual y otras regiones sensoriales, el período crítico de plasticidad dependiente de la experiencia abre de forma temprana luego del nacimiento y cierra rápidamente casi por completo durante la infancia. En las regiones asociadas al lenguaje y a otras funciones cognitivas de orden superior, este período abre un poco más tardíamente para luego disminuir en gran medida hacia la adolescencia y la adultez, pero sin llegar a cerrarse en su totalidad, permitiendo de esta manera un cierto grado de aprendizaje continuo a lo largo de toda la vida (**Fig. 1**).

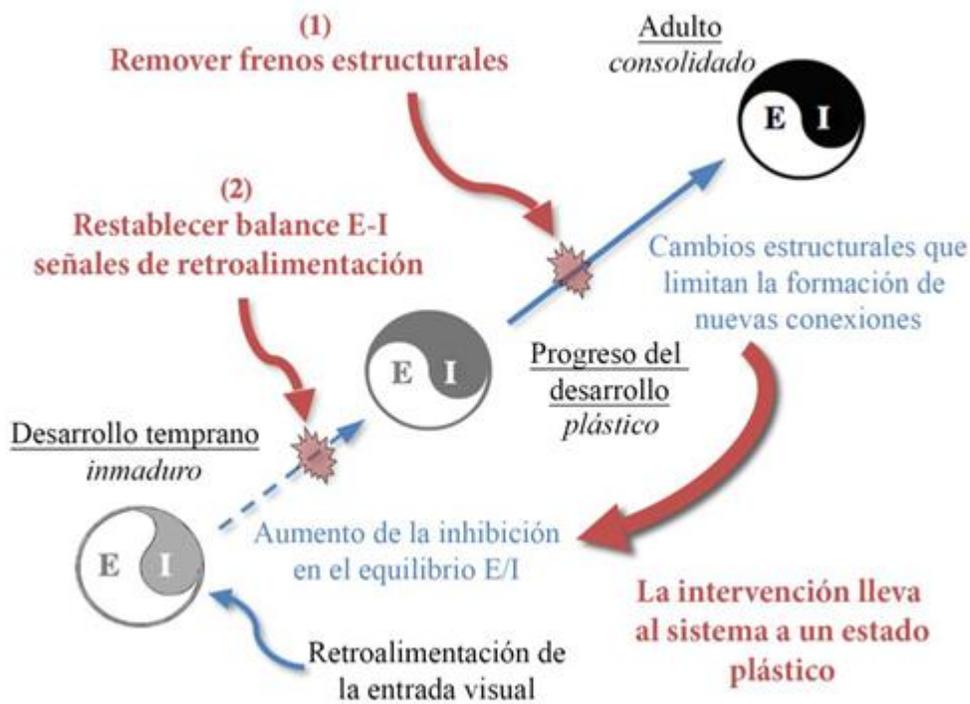


**Figura 1:** Las tres etapas de sensibilidad al aprendizaje del cerebro humano. Los períodos críticos para las regiones corticales dedicadas a la visión y a otros sentidos (línea roja) se abren en la infancia y luego se cierran herméticamente, mientras que en regiones dedicadas al lenguaje (línea amarilla) y a la cognición superior (línea violeta), los periodos críticos se abren más tarde, y nunca se cierran por completo. Las olas sucesivas permiten que el individuo pueda adquirir habilidades cada vez más complejas (texto gris) (Modificado de Bardin, 2012).

Cuando se trata de estudiar la plasticidad neuronal dependiente de la experiencia, el sistema visual es uno de los modelos más utilizados. Esto se debe a la relativa sencillez con la que se logra manipular la experiencia visual en un contexto experimental y a que las consecuencias de estas manipulaciones, pueden ser fácilmente medidas en niveles anatómicos, fisiológicos y moleculares (Tropea et al., 2009). Estudios pioneros en este campo realizados por D. Hubel y T. Wiesel, mostraron que bloquear temporalmente la entrada sensorial de un ojo (privación monocular) durante el periodo crítico, tiene como consecuencia una reorganización estructural y funcional en la corteza visual, mientras que el mismo tipo de procedimiento experimental realizado en fases adultas, no muestra efecto alguno sobre la corteza (Wiesel & Hubel, 1963; Hubel & Wiesel, 1970; 1998). Es así que estos investigadores lograron demostrar, que el desarrollo de la corteza visual es altamente influenciado por la experiencia visual durante este periodo del desarrollo posnatal, ya definido como periodo crítico de plasticidad.

Hasta ahora no se han logrado establecer con exactitud los mecanismos celulares y moleculares subyacentes a los procesos de plasticidad. Actualmente se propone, que la plasticidad es regulada por una compleja interacción entre dos grupos de factores: los factores estructurales, conformados principalmente por la matriz extracelular, y los factores funcionales, que modulan la relación a nivel cortical entre el tono excitatorio y el tono inhibitorio (E/I) (**Fig. 2**) (Bavelier et al., 2010). Los factores estructurales están relacionados con la maduración de la mielina y la condensación de la matriz extracelular, cuyo grado de fluidez es una de las principales

limitantes en la formación de nuevas neuritas y por ende en las modificaciones plásticas organizacionales y estructurales de las conexiones sinápticas (Hockfield et al., 1990; Pizzorusso et al., 2002; Mcgee et al., 2005). Los factores funcionales, son los que actúan directamente sobre el balance entre el tono excitatorio e inhibitorio (E/I) en los circuitos locales. Durante el desarrollo del sistema nervioso, primero ocurre la maduración de los circuitos excitatorios y luego la maduración de los circuitos inhibitorios (Long et al., 2005). A medida que aumenta el tono inhibitorio durante el desarrollo, el balance E/I va cambiando hasta alcanzar un determinado valor umbral, que marca la apertura del periodo crítico. A continuación, los circuitos inhibitorios siguen desarrollándose hasta alcanzar un segundo valor umbral en el balance E/I, que determina el cierre del período crítico y como consecuencia bajos niveles de plasticidad que se mantienen en la fase adulta (Hensch et al, 1998; Fagiolini & Hensch, 2000; Hensch, 2005).



**Figura 2:** La transformación a lo largo de la vida de las capacidades plásticas (flechas azules) (E/I, balance entre tono excitatorio e inhibitorio) sugiere posibles mecanismos para mejorar el aprendizaje y la recuperación de funciones en la edad adulta (rojo). (1), Removiendo barreras estructurales, por ejemplo, eligiendo como blanco redes perineuronales, mielina o estados epigenéticos. (2), Restablecer el balance E/I local a un estado juvenil donde domina la excitación también puede promover efectivamente la plasticidad en la edad adulta (Modificado de Bavelier et al., 2010).

En la actualidad, se considera que la disminución de las capacidades plásticas en el sistema nervioso adulto, es un factor que contribuye a la dificultad de recuperación funcional característica de varias patologías neuronales (Baroncelli et al., 2011; Levelt & Hubener, 2012). Por este motivo, en los últimos años, varios grupos de investigadores han comenzado a explorar

posibles estrategias para potenciar o reactivar la plasticidad en el individuo adulto, con la finalidad de caracterizar mecanismos que puedan facilitar la recuperación funcional a nivel del sistema nervioso.

Teniendo en cuenta la serie de eventos moleculares que ocurren durante el desarrollo normal e influyen en la duración del PC, existirían dos tipos de estrategias para el restablecimiento de la plasticidad: reajuste de la relación entre tono excitatorio e inhibitorio (balance E/I) y remoción de los “frenos” moleculares que limitan la plasticidad estructural en el adulto.

En cuanto a la potenciación de la plasticidad en el adulto mediante la remoción de “frenos” estructurales (**Fig. 2(1)**), una de las estrategias utilizadas es la administración de proteasas que devuelven la matriz extracelular a un estado “fluido” y permisivo (Pizzorusso et al., 2006).

Entre las estrategias identificadas para reajustar el balance E/I (**Fig. 2(2)**), encontramos la administración crónica de fluoxetina (Maya Vetencourt et al., 2008), droga que actúa en el sistema nervioso como inhibidor de la recaptación de serotonina, y particularmente relevante por tratarse de un tratamiento no invasivo y de fácil aplicación en la clínica, dado su alto uso y difusión en la población como potente antidepressivo. A su vez, encontramos también la exposición de los animales a un ambiente enriquecido en estímulos sensorio-motores (Sale et al., 2007) y el mantenimiento de los animales en condiciones de oscuridad (He et al., 2006). Se ha demostrado, que tanto el tratamiento con fluoxetina, como la exposición a un ambiente enriquecido, reducen la transmisión inhibitoria (GABAérgica), resultando en la modificación del balance E/I, logrando así potenciar la plasticidad en individuos adultos y permitiendo una exitosa recuperación de defectos en la visión (ambliopía). Por otro lado, el mantenimiento de los animales en condiciones de oscuridad, disminuye el nivel de receptores GABAA en relación a los receptores glutamatérgicos de tipo AMPA, determinando un aumento del tono excitatorio en relación al tono inhibitorio (He et al., 2007).

En la última década, se han utilizado análisis a gran escala con el fin de determinar el marco molecular exacto que determina la apertura, duración y cierre del período crítico de plasticidad cortical dependiente de la experiencia. Estos estudios han utilizado principalmente la búsqueda de transcritos que presentan un patrón de expresión diferencial correlacionado al periodo crítico y que por lo tanto podrían estar regulando los niveles de plasticidad cortical. Ya que comúnmente ocurren desajustes entre los niveles de ARNm y de las proteínas, posiblemente debido a diferencias en sus vidas medias (Anderson & Seilhamer, 1997; Gygi et al., 1999), es de mayor importancia también identificar a nivel proteómico las diferentes moléculas que contribuyen a la plasticidad durante el periodo crítico.

De forma complementaria a estos estudios transcriptómicos previos, se ha comenzado a utilizar la proteómica como abordaje de análisis por parte de algunos grupos de investigadores, como es el caso del grupo de L. Arckens sobre la corteza visual del gato (Van den Bergh et al,

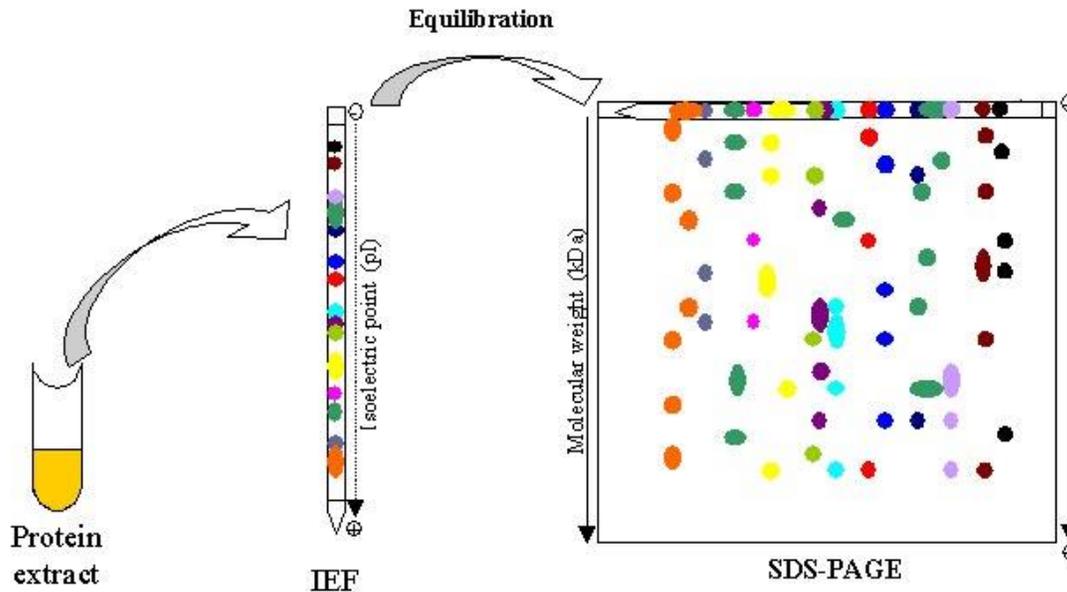
2003; Van Den Bergh & Arckens, 2004; Van Den Bergh et al., 2006) y más recientemente el grupo de C.N. Levelt (Dahlhaus et al., 2011) y el grupo que integro sobre la corteza visual de ratón (Ruiz-Perera et al., 2015; Bornia, 2015, Tesis de Maestría).

Esta clase de enfoque proteómico a gran escala, pretende contribuir a definir más detalladamente los mecanismos regulatorios de los procesos de plasticidad. La ventaja principal de este tipo de aproximación, radica en la posible identificación de nuevas proteínas potencialmente implicadas en la regulación de la plasticidad, que fueran desconocidas hasta el momento o al menos no estuvieran asociadas previamente con una función específica en la plasticidad cortical. La necesidad de este tipo de estudio, surge también debido a las posibles aplicaciones de esta información. Un mayor entendimiento de los mecanismos que controlan la apertura, duración y cierre del periodo crítico, puede servir para desarrollar estrategias que potencien la plasticidad en el adulto y así poder potencialmente corregir discapacidades visuales causadas por un desequilibrio funcional entre los dos ojos, como el estrabismo, la anisometropía y la catarata congénita, condiciones que de no ser tratadas en fases tempranas del desarrollo, serían irreversibles (Kiorpes et al., 1998; Baroncelli et al., 2011).

## 2.1. Sobre la electroforesis bidimensional

La electroforesis bidimensional en gel de poliacrilamida (2D-PAGE) es un método ampliamente utilizado para el análisis de mezclas complejas de proteínas extraídas de células, tejidos, u otras muestras biológicas que fue introducido por O'Farrell en 1975 (O'Farrell, 1975).

Esta técnica, separa las proteínas según dos propiedades independientes en dos pasos discretos (**Fig. 3**). El paso de la primera dimensión, enfoque isoeléctrico (IEF), separa las proteínas según su punto isoeléctrico (pI); el paso de la segunda dimensión, electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS (SDS-PAGE), separa las proteínas según sus pesos moleculares. Cada punto (o spot por su denominación en inglés) en el gel bidimensional, corresponde potencialmente a una única especie proteica en la muestra. Por ende, miles de proteínas diferentes pueden ser separadas y se puede obtener información relevante sobre las mismas como el pI, el peso molecular aparente y también una medida de la cantidad relativa de cada proteína en la muestra.



**Figura 3:** Esquema de los sucesos en una electroforesis bidimensional. A partir de un extracto proteico se realiza en primera instancia un enfoque isoeléctrico donde las proteínas (representadas en la imagen como puntos de colores) se separan según su punto isoeléctrico, para luego ser separadas en un segundo paso de acuerdo a su peso molecular.

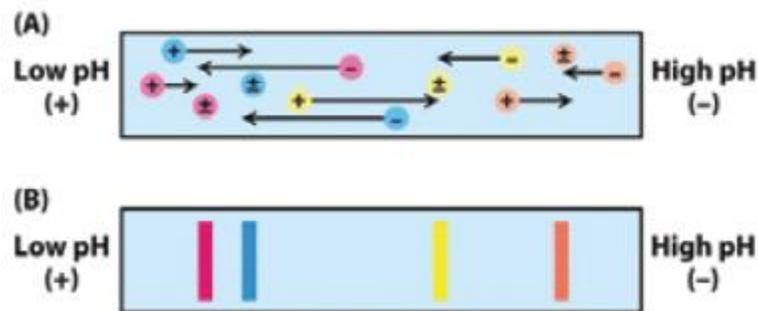
Esta técnica se aplica principalmente dentro del campo de la proteómica, debido a su incomparable capacidad de separación sistemática, identificación por técnicas como la espectrometría de masa y cuantificación de miles de proteínas simultáneamente, a partir de una única muestra. Esta técnica, es única también en su capacidad de detectar modificaciones post- y co-traduccionales, las cuales no pueden ser predichas a partir de la secuencia genómica. Aplicaciones de esta técnica incluyen: análisis proteómico, diferenciación celular, detección de marcadores de enfermedades, monitoreo de terapias, descubrimiento de drogas, investigación del cáncer, controles de pureza y purificación proteica a microescala (Alzate, 2010).

Como fue mencionado anteriormente, el IEF es un método electroforético que separa las proteínas de acuerdo con sus puntos isoeléctricos. Las proteínas son moléculas que, dependiendo de su composición aminoacídica y el pH de su entorno, pueden llevar carga neta positiva, negativa o nula. La carga neta de una proteína, es la suma de todas las cargas negativas y positivas de sus cadenas laterales de aminoácidos y sus extremos amino y carboxilo. El punto isoeléctrico, es el pH específico en el que la carga neta de la proteína es cero. Las proteínas se cargan positivamente a valores de pH por debajo de su pI y se cargan negativamente a valores de pH por encima de su pI.

La presencia de un gradiente de pH es fundamental para la técnica IEF. En un gradiente de pH, bajo la influencia de un campo eléctrico, una proteína se moverá a la posición en el gradiente donde su carga neta es cero. Una proteína con una carga neta positiva, migrará hacia el cátodo, volviéndose progresivamente menos cargada positivamente a medida que se mueve a través del gradiente de pH hasta que alcanza su pI. Una proteína con una carga neta negativa, migrará hacia

el ánodo, y se cargará menos negativamente hasta que también alcance una carga neta cero. Este es el efecto de enfoque de IEF, que concentra las proteínas en sus pI y las separa con diferencias de carga muy pequeñas.

Un método para generar gradientes de pH en geles IEF se basa en los anfolitos portadores, moléculas pequeñas, solubles, anfóteras, con una alta capacidad de amortiguación cerca de su pI. Las mezclas comerciales de anfolitos portadores comprenden cientos de especies poliméricas individuales, con pI que abarcan un rango de pH específico. Cuando se aplica un voltaje a través de una mezcla de anfolitos portadores, los anfolitos portadores con el pI más bajo (y la carga más negativa) se mueven hacia el ánodo, y los anfolitos portadores con el pI más alto (y la carga más positiva) se mueven hacia el cátodo (**Fig. 4(A)**). Los otros anfolitos portadores, se alinean entre los extremos de acuerdo con sus pI, y amortiguan su entorno a los correspondientes pH. El resultado es un gradiente continuo de pH (**Fig. 4(B)**).



**Figura 4:** Formación de gradiente de pH con anfolitos portadores. (A) Anfolitos y proteínas se mueven en respuesta al voltaje aplicado, hacia el polo negativo o positivo según su carga neta. (B) En el pH isoeléctrico, las proteínas y los anfolitos se encuentran en foco, alcanzando una carga neta de cero y dejan de moverse.

El IEF se puede ejecutar en modo nativo o desnaturizante. Un IEF nativo, puede llegar a ser conveniente porque existen geles IEF prefabricados disponibles en una variedad de rangos de gradiente de pH, sin embargo, a menudo está limitado por el hecho de que muchas proteínas no son solubles a baja fuerza iónica o tienen baja solubilidad cerca de su punto isoeléctrico. En estos casos, se emplea el IEF desnaturizante. La urea es generalmente el desnaturizante de elección, y por el que optamos en esta Tesis, ya que este compuesto no cargado puede solubilizar muchas proteínas que de otra manera no serían solubles en condiciones de IEF. Detergentes y agentes reductores a menudo se usan junto con la urea para lograr un despliegue y solubilización más completos.

La segunda dimensión, es mediante electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE). En este tipo de electroforesis, la migración es determinada por el peso molecular de los polipéptidos y no por la carga eléctrica intrínseca de los mismos. El dodecilsulfato sódico (SDS) es un detergente aniónico que desnaturiza las proteínas uniéndose

al esqueleto polipeptídico en una relación de 1.4 gramos de SDS, por gramo de proteína, confiriéndole así una carga neta negativa al polipéptido en proporción a su largo. A su vez, el SDS rompe los enlaces de hidrógeno, bloquea las interacciones hidrófobas y despliega las moléculas de proteínas, minimizando las diferencias en la forma molecular al eliminar las estructuras terciarias y secundarias. Los polipéptidos reducidos y desnaturalizados con SDS son varillas flexibles con carga negativa uniforme por unidad de longitud. Por lo tanto, debido a que el peso molecular es esencialmente una función lineal de la longitud de la cadena peptídica, en los geles las proteínas se separan por peso molecular (Protein Electrophoresis, Technical Manual, Amersham).

## 2.2. Antecedentes del grupo: Proteómica de la plasticidad en la corteza visual

Como fue mencionado anteriormente, esta línea de investigación fue iniciada en el Laboratorio de realización de este trabajo, con la publicación de un artículo científico en el año 2015 (Ruiz-Perera et al., 2015). Los aportes de ese trabajo se basaron nuevamente en el sistema visual como un modelo clásico para el estudio de procesos de plasticidad dependientes de experiencia, enfocándose específicamente en estrategias que potencian la plasticidad en el adulto y permiten la recuperación de defectos en la visión (ambliopía). En particular, se estudiaron los efectos de la administración de fluoxetina, cuyos mecanismos subyacentes a la restauración de la plasticidad en el individuo adulto y que controlan los niveles de plasticidad son aún poco caracterizados. El trabajo tuvo como objetivo contribuir a la caracterización de estos mecanismos a nivel molecular mediante el desarrollo de la proteómica diferencial sobre muestras de corteza visual de ratones adultos tratados con fluoxetina (plasticidad restaurada) y controles (adultos con plasticidad disminuida). Utilizando la electroforesis bidimensional se encontraron 31 spots con una intensidad óptica diferencial entre las dos condiciones. A partir de los resultados obtenidos se lograron identificar por espectrometría de masa 24 proteínas, de las cuales 19 presentaban mayor nivel en los ratones tratados con fluoxetina y 12 presentaban menor nivel respecto a los controles. Las proteínas identificadas están implicadas en diversos procesos celulares, entre ellos el control de la estructura del citoesqueleto, la endocitosis y la exocitosis, el transporte, la señalización intracelular, el control del estado redox de la célula, el metabolismo y la degradación proteica. Estas proteínas son candidatas potenciales a la regulación de la plasticidad cortical y contribuyen a caracterizar mejor el cuadro general de los mecanismos subyacentes a este proceso.

En 2014, se inició un estudio proteómico igual al de este trabajo, donde se pretendía identificar proteínas que se expresaran de forma diferencial entre la corteza visual de ratones adultos y la de ratones jóvenes al pico del periodo crítico de plasticidad, para de esa forma complementar los datos previamente obtenidos sobre ratones con plasticidad inducida

farmacológicamente, pero no obstante la obtención de algunos datos preliminares, no se logró concluir el estudio.

Por último, en 2015 se realizó un trabajo en donde se estudiaron algunos procesos epigenéticos que determinan el nivel de plasticidad en la corteza visual de ratón; en particular, buscando identificar cambios en el patrón de expresión y de modificaciones postraduccionales de las histonas en diferentes condiciones de plasticidad (Bornia, 2015). A través del análisis de imágenes de geles bidimensionales (específicos para la separación en dos dimensiones de histonas, AUT/SDS), se compararon los niveles de expresión de histonas entre animales con alta vs baja plasticidad, y se logró revelar una regulación dinámica de la expresión de las proteínas estudiadas en función del nivel de plasticidad cortical.

Este trabajo de tesis, se enmarca dentro de esta misma línea de investigación que pretende caracterizar patrones de expresión diferencial entre varias condiciones de plasticidad, para profundizar en el conocimiento de los mecanismos celulares y moleculares responsables de determinar el potencial plástico de los circuitos neuronales. Mediante una aproximación experimental proteómica y utilizando el ratón (*Mus musculus*) como modelo experimental, se estudió el proteoma de la corteza visual mediante electroforesis bidimensional de proteínas en gel de poliacrilamida (2D-PAGE) en animales jóvenes altamente plásticos (PC) y en animales adultos con plasticidad reducida (AD), con la finalidad de aportar más información a los estudios realizados previamente en este mismo Laboratorio.

## 3. Hipótesis y Objetivos

### 3.1. Hipótesis:

Las diferencias en los niveles de plasticidad neuronal de la corteza visual de ratones jóvenes y adultos podría estar determinado por una modulación diferencial de proteínas específicas, por lo que existiría un grupo de proteínas que se expresan de igual forma durante toda la vida del individuo, otro grupo cuyos niveles de expresión son específicamente altos durante el periodo crítico de plasticidad y otro que se expresa únicamente o en mayor proporción en las fases adultas.

### 3.2. Objetivo general:

Lograr establecer un conjunto de candidatos proteicos cuya actividad pueda estar jugando un papel determinante en los procesos neuronales plásticos a nivel de la corteza cerebral, mediante la regulación de la apertura, duración y cierre del periodo crítico de plasticidad.

### 3.3. Objetivos específicos:

Por tratarse de una pasantía de grado, el primer paso para cumplir con los objetivos planteados es familiarizarse con el funcionamiento general de un laboratorio de investigación, aprendiendo metodologías básicas como técnicas de preparación de muestras y extracción de proteínas y también poniendo a punto los protocolos experimentales a utilizar durante el desarrollo del trabajo final de grado (en este caso particular, 2D-PAGE).

Con la finalidad de lograr lo planteado en el objetivo general, los objetivos específicos son:

- Realización de experimentos 2D-PAGE sobre muestras experimentales de corteza visual de ratones PC y AD.
- Análisis de la imagen y selección de spots con densidad óptica diferencial entre la corteza visual de ratones PC y AD, para identificar proteínas que se vean moduladas en relación al nivel de plasticidad.

La información obtenida en este trabajo de finalización de grado, será utilizada en una segunda etapa para dar continuidad al proyecto mediante el análisis por espectrometría de masa de los spots con expresión diferencial, y el posterior análisis bioinformático para seleccionar proteínas que presenten potencial relevancia en el control de procesos de plasticidad.

## 4. Materiales y Métodos

### 4.1. Mantenimiento de animales y disección de tejidos de interés.

Se utilizan ratones (*Mus musculus*) de la cepa C57B6/J jóvenes adultos (~P47, definidos como adultos "AD") y jóvenes en el pico del periodo crítico de plasticidad de la corteza visual (~P28-31, definidos como período crítico "PC"), mantenidos en condiciones estándar de temperatura ( $20 \pm 1$  °C), humedad ( $\approx 50\%$ ) y ciclo de luz/oscuridad (14/10 horas), en el bioterio de la Unidad de Animales Transgénicos y Experimentación (UATE) del Institut Pasteur de Montevideo.

Las diferentes edades experimentales se eligen en base a que existen estudios que demuestran que el período crítico para la corteza visual en ratones comienza alrededor del final de la tercera semana postnatal (P21), alcanza su punto máximo entre la cuarta y quinta semana (P28) y comienza a disminuir a partir del final de la quinta semana (P35) (Fagiolini, 1994). Es decir que, si bien un ratón de 47 días sigue siendo en teoría un individuo juvenil, puede ser considerando igual que un adulto en términos de capacidades plásticas a nivel de la corteza visual.

Los animales se sacrifican por dislocación cervical, inmediatamente seguida por la disección de los tejidos de interés en PBS 1X (buffer fosfato salino) previamente enfriado a 4°C. Para ello, se extrae el cerebro y se disecciona la región de interés (corteza visual primaria), que es congelada inmediatamente en nitrógeno líquido y almacenada a -80°C hasta su posterior utilización. Los experimentos en animales se realizan en concordancia con la reglamentación vigente en Uruguay (Ley Nacional N°18.611) y los estándares de la Comisión de Ética en el Uso de Animales del Institut Pasteur de Montevideo.

### 4.2. Electroforesis 2D

#### 4.2.1. Preparación de las muestras para 2D

##### 4.2.1.1. Extracción proteica:

Se transfiere el tejido a 150µl de Lisis Buffer (Urea 7M, Thiourea 2M, 4% w/v CHAPS, DTT 56mM, cocktail inhibidor de proteasas 1x), homogenizando mecánicamente y por sonicación. Las muestras son incubadas durante 1hr a temperatura ambiente para facilitar la solubilización. A continuación, se realizan dos centrifugaciones consecutivas de 20 minutos cada una a 13000g y 4°C, recuperando el sobrenadante para eliminar los restos celulares que quedan retenidos en el pellet.

#### 4.2.1.2. Precipitación de las proteínas:

Se separan las muestras equitativamente en 4 tubos de 1.5ml, manteniéndolas en hielo en todo momento. Las soluciones a utilizar son previamente enfriadas a -20°C. Se agregan 300µl de solución de precipitación (TAD: 20% ácido tricloroacético v/v en Acetona, 0.07% DTT 4.5mM) a cada tubo mezclando con vortex y se incuban en hielo durante 15 minutos. Luego se agregan 300µl de solución de co-precipitación (AD: 0.07% DTT en Acetona) mezclando nuevamente con vortex. Se realizan dos centrifugaciones consecutivas (13000g, 4°C), la primera de 10 minutos, descartando el sobrenadante y la segunda de 2 minutos para eliminar el sobrenadante remanente. Se resuspende el pellet en 40µl de AD, incubando en hielo durante 5 minutos para inmediatamente a continuación centrifugar durante 10 minutos, eliminando el sobrenadante. Se lava el pellet con 25µl de agua mQ, utilizando vortex hasta que el mismo se desprege de las paredes del tubo. Luego se agrega 1ml de AD, mezclando con vortex hasta dispersar el sedimento y se incuba a -20°C por al menos 30 minutos. Finalmente se realiza una última centrifugación de 10 minutos, descartando el sobrenadante y resuspendiendo el pellet en 15µl de lisis buffer (sin inhibidor de proteasas) mezclando meticulosamente. Las muestras se mantienen a temperatura ambiente de 5 a 6 horas u overnight a 4°C para facilitar la solubilización. Una vez que el pellet se disuelve por completo se unen las 4 alícuotas y se conservan las muestras a -20°C.

#### 4.2.1.3. Cuantificación proteica:

La cuantificación de las proteínas se realiza mediante el método de Bradford en placa de 96 pocillos, midiendo la absorbancia a  $\lambda=595-600$  nm (Olson and Markwell, 2001). La concentración proteica de las muestras es estimada a través de la extrapolación de una curva de calibración utilizando sero-albúmina bovina.

#### 4.2.2. Rehidratación y enfoque isoelectrico

El isoelectroenfoque (IEF) se realiza en el aparato Ettan IPGphor II System (Amersham), aplicando 60 µg de muestra en strips de 7cm de gradiente no lineal de pH 3-10. Para ello se prepara el volumen correspondiente a 60µg de muestra en un volumen final de 125µl de buffer de rehidratación (Urea 7M, Tiourea 2M, 2% w/v CHAPS, 0.002% Bromophenol Blue, DTT 18mM, 0.5% Anfolitos) y se aplica homogéneamente en un

barquito de cerámica especialmente diseñado. El strip se coloca en el barquito de forma que el gel quede hacia abajo y toda su superficie en contacto con la muestra, cuidando que ambos extremos del strip contacten con los electrodos. Se sella el strip utilizando aceite mineral para llenar el barquito antes de colocar la tapa del mismo, teniendo cuidado de que no se formen burbujas. Antes del enfoque isoeléctrico, los strips se rehidratan pasivamente durante 16-18 horas a 20°C. El enfoque se inicia a 150V durante una hora, luego se mantiene a 300V por 30 minutos, seguido de un aumento gradual de voltaje primero a 1000V en una hora y luego a 5000V en 80 minutos para finalmente mantener el voltaje constante hasta alcanzar un total de ~9000Vhr.

**Tabla 1:** Protocolo IEF #2. Sobre cada paso se indica el valor de voltaje en voltios, la duración y de qué tipo de paso se trata. Rehidratación: se refiere al primer paso del enfoque isoeléctrico donde no se aplica voltaje para que las proteínas se rehidraten pasivamente. Sostenido: cuando el voltaje varía en un solo paso hasta el valor marcado y se mantiene constante durante toda la duración del mismo. Gradual: cuando el voltaje va variando paulatinamente a lo largo del tiempo hasta alcanzar el valor marcado.

	<b>Paso 1</b>	<b>Paso 2</b>	<b>Paso 3</b>	<b>Paso 4</b>	<b>Paso 5</b>	<b>Paso 6</b>
<b>Voltaje (V)</b>	-	150	300	1000	5000	300
<b>Duración</b>	16-18hrs	1h	30min	1h	80min	Hasta ~9000Vhr
<b>Tipo</b>	Rehidratación	Sostenido	Sostenido	Gradual	Gradual	Sostenido

### 4.2.3. 2da Dimensión SDS-PAGE

En primera instancia se prepara el gel de poliacrilamida para la segunda dimensión (al 12%, 1mm de espesor). Para el moldeado del gel, durante la puesta a punto de la metodología, en las primeras etapas de prueba se utilizaba un peine 2D, pero en etapas posteriores se emplea isopropanol en su lugar, donde inmediatamente después de verter la solución de acrilamida en el molde, se recubre la superficie superior con isopropanol, a modo de sello. Una vez solidificado el gel y cuando sea el momento de usarlo, se descarta la solución de recubrimiento y se enjuaga el remanente con agua mQ. Luego se equilibra el strip en dos etapas consecutivas de 15 minutos cada una sumergiendo el strip en buffer de equilibración (Tris pH 8.8 50mM, Urea 6M, 30% (v/v) glicerol, 2% w/v SDS, 0.002% Bromophenol Blue). En la primera etapa se utiliza una solución de buffer de equilibración con DTT (1%, w/v) y en la segunda una solución de buffer de equilibración con iodoacetamida (2.5%, w/v). Mientras transcurre la equilibración, se carga el estándar de peso molecular (PM) con una cantidad igual de agarosa en un eppendorf y luego se coloca sobre un pequeño trozo de papel filtro (2-5mm) y se deja secar. Una vez finalizada la equilibración, se coloca el papelito con el PM en un extremo del gel de poliacrilamida y

luego el strip horizontalmente de forma que quede bien alineado y sin burbujas. Se agregan 400µl de solución sellante de agarosa (0.5% Agarosa, SDS running buffer 1x, 0,002% Bromophenol Blue) para mantener el strip en posición y visualizar el frente de corrida. Al cabo de unos minutos para dejar polimerizar la agarosa, se coloca el gel en la cuba de electroforesis con el SDS running buffer 1x (Tris 0.025M, Glicina 0.192M, 0.1% SDS), donde se corre durante 15 minutos a 10mA/gel y luego se pasa a 20mA/gel durante 90 minutos aproximadamente, hasta que se observe que el frente de corrida sale completamente del gel, momento en el cual finalizar la corrida.

#### 4.2.4. Tinción y Visualización

Se desmonta el gel y se fija en una solución de 10% ácido acético, 40% etanol en agua durante al menos 30 minutos. Luego se transfiere a una solución de coloración de Coomassie coloidal (8% sulfato de amonio, 0.8% ácido fosfórico, 0.08% Coomassie Blue G-250, 20% etanol) y se mantiene en agitación overnight o más tiempo. Finalmente, el gel se enjuaga con agua mQ para eliminar la coloración residual y se escanea utilizando el scanner UMAX PoweLook 2100XL en conjunto con el programa LabScan 5.0.

### 4.3. Western Blot

Durante la pasantía, en una fase previa a la elección de la temática de la Tesis, se realizaron varios experimentos de Western Blot con varios anticuerpos, con el fin de familiarizarse también con otras técnicas ampliamente utilizadas en biología molecular como es el caso del Western Blot. Este es un tipo de método que permite detectar proteínas específicas mediante la reactividad de anticuerpos específicos y para ello las proteínas separadas deben estar libres de matriz de electroforesis. Es por esto que se utiliza la transferencia, la cual permite que las moléculas separadas en un gel eluyan a través de la cara ancha del mismo sobre un filtro de membrana que retiene las moléculas a medida que emergen. Las proteínas permanecen predominantemente en la superficie de la membrana, donde son accesibles para su detección. Sin embargo, como en el marco del proyecto de tesis simplemente se aplicó esta técnica de forma complementaria, se realizó la transferencia a la membrana sin el posterior tratamiento con anticuerpos, ya que el interés del estudio era el proteoma completo y no una proteína específica, motivo por el que no será detallado el protocolo de uso de anticuerpos y revelado.

#### 4.3.1. Preparación de geles

Se prepara la solución de "running gel" de poliacrilamida al 15% (15% Acrilamida, Tris pH 8.8 0.375 M, 0.10% SDS, 0.05% TEMED, 0.05% APS) y se vierte en el molde de 1mm de espesor hasta que llegar a 2cm antes del borde e inmediatamente se recubre la

superficie superior con isopropanol, a modo de sello. Luego de dejar polimerizar el gel por aproximadamente 40 minutos, se retira el isopropanol, lavando con agua mQ para que no quede ningún remanente y se rellena el resto del molde con "stacking gel" (4% Acrilamida, Tris pH 6.8 0.125 M, 0.10% SDS, 0.05% TEMED, 0.050% APS), colocando a continuación el peine para la formación de pocillos de forma cuidadosa. Se espera nuevamente a que el gel polimerice durante unos 30 minutos aproximadamente en caso de usarse en ese mismo momento, o se guarda a 4°C en caso de usarse al día siguiente, procurando poner agua en los pocillos del aparato de montaje de los geles y envolverlo en una bolsa para mantener la humedad.

### 4.3.2. Corrida electroforética

Se arma el cassette para la corrida electroforética y se rellena con Running Buffer (Tris 0.025 M, Glicina 0.192 M, 0.10% SDS) hasta cubrir por completo el gel. Se remueve el peine y se limpian los pocillos pipeteando el líquido varias veces para remover cualquier partícula no deseada. A continuación, se coloca el cassette en la cubeta y se vierte la cantidad necesaria de Running Buffer según el número de geles que sean. Se coloca la tapa de la cubeta cuidando de que los electrodos queden bien colocados y se realiza una pre-corrida a 80V durante 15 minutos. Luego se cargan las muestras de interés, en este caso específico, se cargan 50 µg de extracto proteico de corteza visual preparado de la forma detallada en la sección 3.2.1, y en diferente pocillo se cargan 2 µL de marcador de peso molecular, cargando también Loading Buffer 1x (2% SDS, Tris pH 6.8 0.0625 M, 10% Glicerol, 5% b-mercaptoetanol, 0.0025% Blue Bromophenol) en todos los pocillos que queden libres. Inmediatamente a continuación se inicia una segunda pre-corrida a 120V durante 15 minutos. Por último, se aumenta el voltaje a 160V y se corre durante aproximadamente 1 hora o hasta que el frente de migración, visualizable por el colorante dentro de Loading Buffer, salga por completo del gel.

Aquí se decide qué gel o qué porción de gel será transferida a membrana y cual será utilizada para tinción directa con Azul de Coomassie, colorante que se une inespecíficamente a prácticamente todas las proteínas. En caso de esto último, si corresponde se corta la porción elegida del gel cuidadosamente y se coloca en un contenedor con colorante Azul de Coomassie (0.10% Coomassie Blue G-250, 30% Etanol, 10% Ácido Acético) durante unas horas u overnight. Luego se traslada el gel a un contenedor con Coomassie Destaining Solution (30% Etanol, 10% Ácido Acético) y una vez decolorado lo suficiente, se coloca sobre una superficie plana con fondo blanco y se fotografía.

### 4.3.3. Transferencia a membrana

Se corta un trozo de membrana de nitrocelulosa del tamaño del gel que se desea transferir y se pone a equilibrar a 4°C por 15 minutos, al igual que el buffer de transferencia (Tris 0.025 M, Glicina 0.192 M, 20% Etanol) y todos los otros elementos necesarios para el armado del sándwich de transferencia sumergidos en buffer. Una vez equilibrados los elementos necesarios, se arma el sándwich de transferencia (En el orden: Cassette de plástico, esponja, papel de filtro, gel, membrana, papel de filtro, esponja, cassette transparente) y se monta la cubeta de transferencia, se pone dentro gel refrigerante, se rellena con buffer de transferencia fresco hasta donde indica la cubeta y se coloca sobre un agitador magnético. Se realiza una corrida de 2 horas a 100V, cambiando el gel refrigerante en el medio.

Una vez se termina la transferencia, se desarma la cubeta y pone el gel en Coomassie unas horas u overnight. La membrana se colora con Rojo de Ponceau (0.20% Rojo Ponceau S, 5% Ácido Acético Glacial) por unos minutos y luego se realizan dos lavados con agua mQ (o hasta que el fondo recupere el color blanco). Una vez colorada, se coloca sobre una superficie plana, se recortan los bodes sobrantes y se fotografía.

## 4.4. Experimentos de proteómica diferencial

En los experimentos de proteómica de geles bidimensionales se utilizan muestras de corteza visual de ratones adultos controles (P47, n=3: AD1, AD2, AD3) y de ratones jóvenes al pico del periodo crítico de plasticidad (P28, n=3: PC1, PC2, PC3). Los experimentos se realizan en parejas (una muestra AD vs una muestra PC), en tres ocasiones diferentes.

## 4.5. Procesamientos de imágenes y obtención de datos

Las imágenes de los geles obtenidas con el scanner (en formato tiff) se analizan usando el software Melanie 6.0 (Genebio Amersham Biosciences). Los spots proteicos se detectan y editan automáticamente para mejorar la precisión. La coincidencia entre spots en geles distintos se obtiene de modo automático y luego se verifica manualmente. Para evaluar las diferencias del nivel de proteína entre geles se utiliza el parámetro de volumen relativo (%Vol).

### 4.5.1. Detección de los spots

Para la detección automática de los spots proteicos el programa utiliza tres parámetros básicos que son ajustados por el usuario según corresponda para optimizar la detección de los spots. El primer parámetro que debe ajustarse es "Smooth", el cual fija la

cantidad de veces que el programa suavizará la imagen antes de detectar los spots, optimizando la detección de spots reales y la separación de spots que se superponen, a través de un algoritmo. El segundo parámetro es "Saliency", el cual se basa en la curvatura del spot e indica cuánto sobresale éste del entorno. Por último, "Min Area" permite eliminar artefactos menores al área mínima fijada, como partículas de polvo y aberraciones de los geles. Los valores de estos parámetros pueden variar considerablemente en diferentes geles, particularmente "Smooth", el cual es altamente dependiente de la resolución de imagen, por lo que es necesario establecer los valores de forma tal, que estos mejoren lo más posible la detección, en todos los geles del experimento. En este caso los valores utilizados fueron los siguientes: Smooth=2, Saliency=0.5, Min Area= 20.

Una vez detectados los spots automáticamente, se realiza una inspección visual para eliminar cualquier punto que no se correspondiera con un spot, como partículas de polvo, burbujas o irregularidades en el gel. A su vez se editan manualmente, modificando la forma de los spots en el caso de que la misma sea demasiado irregular y no sea representativa del límite real del spot observado en el gel, agregando también spots nuevos en los casos necesarios, cuando el programa no los detecta exitosamente por si solo.

#### 4.5.2. Comparación de geles

A continuación, se asignan manualmente 3 puntos de referencia por gel, denominados "landmarks". Esto básicamente consiste en encontrar spots claramente identificables a simple vista en todos los geles del grupo de estudio, y asignarles la misma etiqueta para que el programa establezca una correspondencia entre esos spots y lo utilice como herramienta de guía durante la fase de "matching" (comparación de spots entre geles), para lograr parear de forma más eficaz todos los spots restantes. En esta fase, se crea un "match set" donde se elige el gel con el mayor número de spots como gel de referencia ("master gel") para la comparación. Todos los geles son comparados al gel de referencia y de esta forma se obtiene, para cada "matched spot" (spot pareado) un número de identificación (ID) que es el mismo en todos los geles en los que aparece el spot. Luego de la comparación automática, nuevamente se procede a la inspección visual y al análisis de los perfiles tridimensionales para eliminar y corregir los spots mal pareados, adicionando otros manualmente en los casos necesarios.

### 4.5.3. Obtención de datos

Para obtener información relevante sobre cada spot pareado satisfactoriamente en la etapa anterior, las imágenes de los geles se transfieren a lo que el programa denomina como “clases”, lo que permite obtener un reporte intra-clase con los valores correspondientes a los spots pareados. Si bien el programa tiene herramientas para el análisis de los datos, en este caso, los datos del reporte final se copian a una hoja de cálculo de Excel, para su posterior análisis estadístico.

Al realizar el análisis intra clase se seleccionan las variables a estudiar y en este caso se elige el volumen. El volumen del spot es una medida de densidad óptica integrada, que el programa calcula como el volumen por encima del contorno del spot, que va desde el pico del mismo hasta el 75% de su altura. Para la correcta comparación de los spots entre geles, es necesaria la normalización de los spots, la cual es un tipo de calibración interna que hace que los datos sean independientes de las variaciones experimentales entre geles, causadas por condiciones como diferencias en la carga de proteínas, la tinción o el escaneo. Para ello se le pide al programa que, en lugar de mostrar solo los datos crudos de volumen de cada spot en el reporte intra-clase, realice el cálculo del Volumen relativo (%Vol) para cuantificar y comparar los spots de cada gel. Por definición el %Vol es el volumen del spot sobre la sumatoria de todos los volúmenes de los spots contenidos en el gel, multiplicado 100.

El elegir esta variable para el estudio de los datos, introduce una dificultad en la fase anterior ya que por la forma en la que se calcula el %Vol, este es directamente dependiente del número total de spots en el gel. Esto hace que, para poder comparar correctamente estos valores en geles distintos, sea necesario que el número de spots y de “matches” sea exactamente el mismo en todos los geles. Lograr esto es un trabajo manual que puede ser bastante engorroso, de selección y edición de spots uno por uno. La estrategia utilizada en esta etapa es una de ida y vuelta entre el reporte intra-clase y el match set. Mediante el reporte se puede visualizar cuantos spots han sido pareados, si hay spots que no fueron exitosamente pareados en todos los geles, y en ese caso se puede identificar en cuales geles no se logró encontrar determinado spot. Esto permite volver al match set y realizar los cambios pertinentes en todos los geles que así lo requieran (menos en el master gel el cual no puede ser editado), hasta llegar al objetivo de que no existan spots sin parear y que cada spot pareado sea encontrado en todos los geles estudiados. Una vez completado esto se crea una nueva clase con el nuevo match set modificado, y se solicita un nuevo reporte intra-clase que debería cumplir con la condición de que la sumatoria de todos los %Vol de cada gel sea igual a 100.

## 4.6. Análisis Estadístico

Con el fin de identificar los spots de proteínas que presentan diferencias entre muestras de AD y de PC, primero se agrupan los datos %Vol por pareja y se normalizan mediante el cociente PC/AD para cada pareja, obteniendo un único valor por pareja para cada spot pareado. Luego se seleccionan aquellos spots que muestren la misma tendencia, ya sea de aumento ( $PC/AD \geq 1,15$ ) o de disminución ( $PC/AD \leq 0,85$ ), en las 3 parejas experimentales, porque al tratarse de un n bajo, es correcto asumir que, de verse la misma tendencia en 2 de las 3 parejas, la probabilidad de que ese spot sea estadísticamente aceptable, es prácticamente nula. Se considera que, si la relación PC/AD se encontraba en valores mayores a 0,85 y menores a 1,15, los valores entre ambas condiciones son prácticamente iguales y no muestran expresión diferencial.

Con los spots seleccionados como potencialmente relevantes, se realiza el test estadístico U de Mann Whitney con los datos de %Vol de cada spot (no con el cociente PC/AD), utilizando el programa Past 2.14 free analysis system (Hammer, 2001), organizando los datos en una tabla por spot, donde cada columna es una condición (AD o PC) y cada fila es un experimento diferente. Es así que para cada spot específico, se comparan los tres valores (n experimental) de %Vol provenientes del adulto, con los tres valores provenientes del periodo crítico y se estudia si estos datos son realmente diferentes entre sí. En este caso debido al bajo número de experimentos, se consideran estadísticamente significativos aquellos spots cuyo p valor sea igual o menor a 0,08.

Una vez identificados los spots que muestran una expresión diferencial de forma estadísticamente aceptable, se verifican uno por uno en un gel utilizando su número de ID como referencia, para confirmar nuevamente que se trata de spots bien identificados y que no existan errores en la forma del spot ni en el pareo de los mismos, que estén alterando los datos.

En el caso de algunos spots que fueron seleccionados, el pI y el peso molecular se estimaron manualmente utilizando una grilla de referencia sobre los geles.

## 5. Resultados y Discusión

### 5.1. Puesta a punto de la metodología

#### 5.1.1. Preparación de la muestra y evaluación de la calidad de la misma

El primer objetivo de este trabajo era familiarizarse con técnicas de preparación de muestras y extracción de proteínas, ya que este es un paso fundamental para los experimentos de electroforesis bidimensional, los cuales requieren de muestras de buena calidad, con cantidades mínimas de impurezas para obtener buenos resultados. Para ello se utilizó un protocolo de extracción seguida de precipitación proteica, previamente probado en este Laboratorio que ya ha demostrado funcionar correctamente (Ruiz-Perera et al., 2015).

Como es el caso con la mayoría de los experimentos de este tipo, el primer paso antes de comenzar fue el de preparación de todas las soluciones necesarias, de particular interés entre ellas, el buffer de lisis. Elementalmente, para analizar completamente todas las proteínas intracelulares como se requiere en este tipo de estudio, las células deben romperse de manera efectiva. Durante este proceso las células pueden liberar y/o activar proteasas, enzimas que destruyen proteínas mediante la ruptura de sus enlaces peptídicos, lo cual despierta la necesidad de proteger a las muestras de la proteólisis para preservar su integridad. Es aquí que el buffer de lisis juega un rol fundamental en asegurar que las muestras sean aptas para el análisis mediante electroforesis en dos dimensiones, evitando la degradación proteica por proteasas. Con ese objetivo es que se realizó la lisis de las muestras directamente en una solución que contiene reactivos altamente desnaturizantes, como la Urea y la Tiourea (ver Materiales y Métodos). A su vez las proteasas son menos activas a temperaturas bajas por lo que todo este procedimiento se lleva a cabo utilizando hielo. En adición a esto, se agregó un cocktail inhibidor de proteasas al buffer de lisis, ya que incluso bajo las condiciones anteriormente descritas algunas proteasas pueden mantener su actividad proteolítica. Se trata de un cocktail porque cada tipo individual de inhibidor es capaz de actuar específicamente sobre una clase de proteasas por lo que se utiliza una combinación de varios para mejores resultados (2-D Electrophoresis, Principles and Methods, Amersham).

Otro factor que se debe cuidar a la hora de la preparación de las muestras para electroforesis 2D es el de las impurezas. En los lisados de células enteras, las proteínas están presentes en un amplio rango de concentraciones, ocasionando que las proteínas más abundantes puedan dificultar la detección de proteínas de interés menos abundantes. Un análisis de proteoma efectivo requiere de la separación de proteínas abundantes y el enriquecimiento de proteínas de baja abundancia para llevar a estas últimas a un rango detectable. Es con este objetivo que se puede realizar la precipitación proteica, que sin bien no es un paso obligatorio,

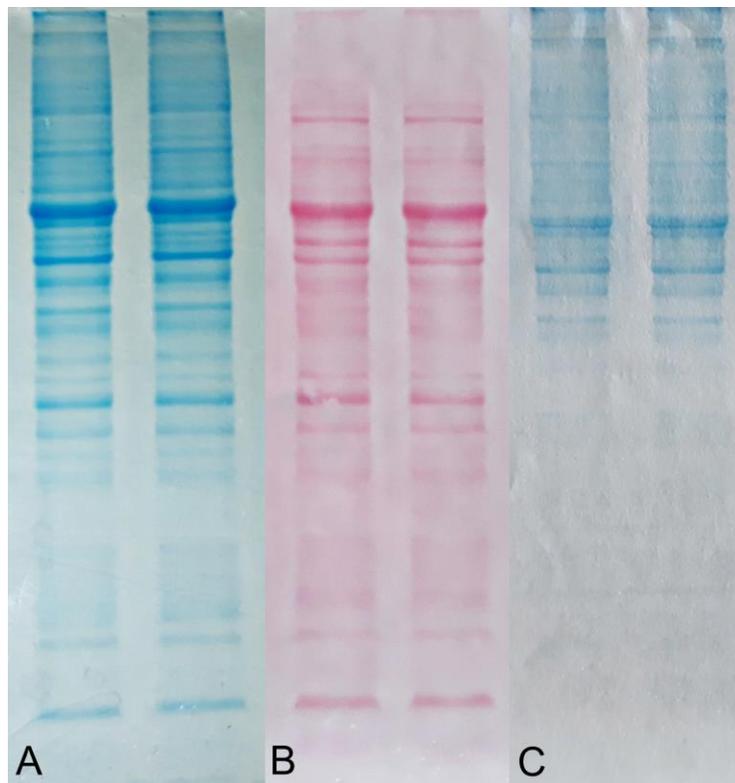
permite una resolución mejorada de los geles, simplifica el análisis y la interpretación y aumenta las posibilidades de descubrir proteínas nuevas de interés. En este caso las proteínas se precipitaron con una combinación comúnmente utilizada de ácido tricloroacético y acetona, mientras que las sustancias que interfieren, como los ácidos nucleicos, sales, lípidos o detergentes, permanecen en solución. Luego de esto el precipitado se resuspende y se obtiene una solución enriquecida en proteínas más limpia (2-D Electrophoresis, Principles and Methods, Amersham).

Antes de comenzar los experimentos 2D, fue necesario verificar la integridad de la muestra por dos razones. La primera y principal, era comprobar que el buffer de lisis funcionaba correctamente teniendo en cuenta todas las complicaciones que pueden surgir no solo a la hora de preparar las soluciones sino también durante la extracción con todas las posibles variantes de errores que implica la manipulación experimental. La segunda tenía que ver con el tiempo de conservación del tejido del que se extrajeron las proteínas, ya que para las primeras pruebas de puesta a punto de la metodología, se decidió utilizar una muestra de tejido de corteza visual de ratón dentro del periodo crítico de plasticidad (P31), que fue conservada a  $-80^{\circ}\text{C}$  desde agosto de 2014 hasta el momento de la extracción proteica en marzo de 2018. La decisión de utilizar este tejido, surgió ante la gran cantidad de muestras conservadas de las que dispone el Laboratorio. Al contar con esta variada selección de muestras, era muy interesante estudiar la posibilidad de aprovecharlas durante el desarrollo de este Proyecto, por tratarse de muestras representativas de varias condiciones distintas de plasticidad, incluyendo muestras de corteza visual de ratón durante el periodo crítico, como también de ratones con plasticidad inducida farmacológicamente o por exposición a ambiente enriquecido en la adultez. Si bien el largo tiempo de conservación no necesariamente implica que una muestra se encuentra en mal estado, es algo a tener en cuenta a la hora de lanzar un experimento que depende directamente de la integridad de las proteínas de la muestra y por supuesto también a la hora de analizar los resultados.

Una posible forma de verificar la integridad de una muestra es mediante electroforesis unidimensional en gel de poliacrilamida con SDS (SDS-PAGE), donde la posición de una proteína a lo largo del carril de separación proporciona una buena aproximación de su tamaño y, después de la tinción, la intensidad de la banda es un indicador aproximado de la cantidad de proteína presente en la muestra (Protein Electrophoresis, Technical Manual, Amersham). Es así que este es un método ideal para verificar la calidad de un extracto proteico, ya que en presencia de una muestra degradada se observara una mancha a lo largo del carril, como consecuencia de la presencia de muchos fragmentos de distintos tamaños producto de la proteólisis, y no un patrón de bandas definidas como es el caso en presencia de proteínas enteras.

Para esto, se realizó la extracción proteica y la precipitación de la muestra de corteza visual de prueba como mencionado antes, y se cargaron  $50\ \mu\text{g}$  del extracto proteico en 4 pocillos de un gel de poliacrilamida al 15%. Luego de la electroforesis, se cortó el gel en dos partes: una se tiñó

con Azul de Coomassie y la otra se utilizó para transferir las proteínas a una membrana de nitrocelulosa y luego colorearla con Rojo Ponceau. Como se puede observar en la **Fig. 5A**, el patrón de bandas proteicas a lo largo del gel es bien definido, lo que nos habla de una muestra no degradada. Luego de la transferencia a la membrana de nitrocelulosa y coloración con Rojo Ponceau, nuevamente se logra apreciar el mismo patrón de bandas definidas que veíamos en el gel antes de transferirlo, lo cual confirma el correcto funcionamiento del buffer de lisis, que la muestra se encuentra en buen estado y por supuesto una correcta transferencia de las proteínas del gel a la membrana (**Fig. 5B**). Como es de esperarse, al colorar el gel con Azul de Coomassie luego de la transferencia, notamos una clara disminución en la intensidad de las bandas, donde se aprecia una transferencia completa en los lugares donde desde un principio había menor concentración proteica (menor intensidad de bandas) y una transferencia incompleta con bandas aún marcadas incluso luego de la transferencia en aquellos lugares donde la concentración era mayor (bandas más intensas) (**Fig. 5C**).



**Figura 5:** Electroforesis unidimensional en gel de poliacrilamida al 15% con SDS de un extracto proteico de corteza visual de ratón PC, con posterior transferencia a membrana. **A)** Fotografía del gel luego de la tinción con Azul de Coomassie, donde se observan bandas bien definidas. **B)** Mismo experimento, transferido a membrana teñida con Ponceau, donde se visualiza el mismo patrón de bandas. **C)** Fotografía del gel luego de la transferencia a la membrana y coloración con Azul de Coomassie, donde se observa el remanente de proteínas.

En cuanto al factor de las impurezas de la muestra, no es posible determinar con seguridad de forma previa al experimento de electroforesis 2D-PAGE, el correcto funcionamiento del protocolo de precipitación proteica y la efectividad del mismo en eliminar las impurezas de la muestra. Debido a que las mejoras esperadas al precipitar las proteínas son a nivel de la resolución de los spots en el gel 2D, este punto debió ser evaluado una vez obtenidos los primeros geles bidimensionales.

## 5.1.2. Electroforesis bidimensional

Una vez establecida la integridad de la muestra se procedió a la electroforesis bidimensional mediante un protocolo previamente utilizado en este mismo laboratorio (Ver Materiales y Métodos, Ruiz-Perera et al., 2015). Pero debido a que esta metodología es altamente sensible a muchos factores diferentes, era de esperarse que fuera necesario poner a punto los protocolos para lograr obtener los mejores resultados posibles. Ya que no solo la utilización de muestras con impurezas puede afectar los resultados de estos experimentos, se debe tener mayor cuidado durante todo el proceso, porque tanto errores de manipulación, que van desde la incorrecta colocación del strip, hasta una preparación inadecuada del gel de la segunda dimensión, como incluso la utilización de reactivos levemente contaminados o de baja calidad para la preparación de las soluciones, pueden tener un efecto significativo en los resultados de esta clase de experimento. Afortunadamente existe un manual en el que se muestran imágenes de varios geles bidimensionales con problemas bien marcados, el cual se convirtió en la herramienta principal durante esta etapa, pues brinda no solo la razón de ser de cada uno de esos problemas, sino también los posibles abordajes para solucionarlos (2-D Electrophoresis, Principles and Methods, Amersham).

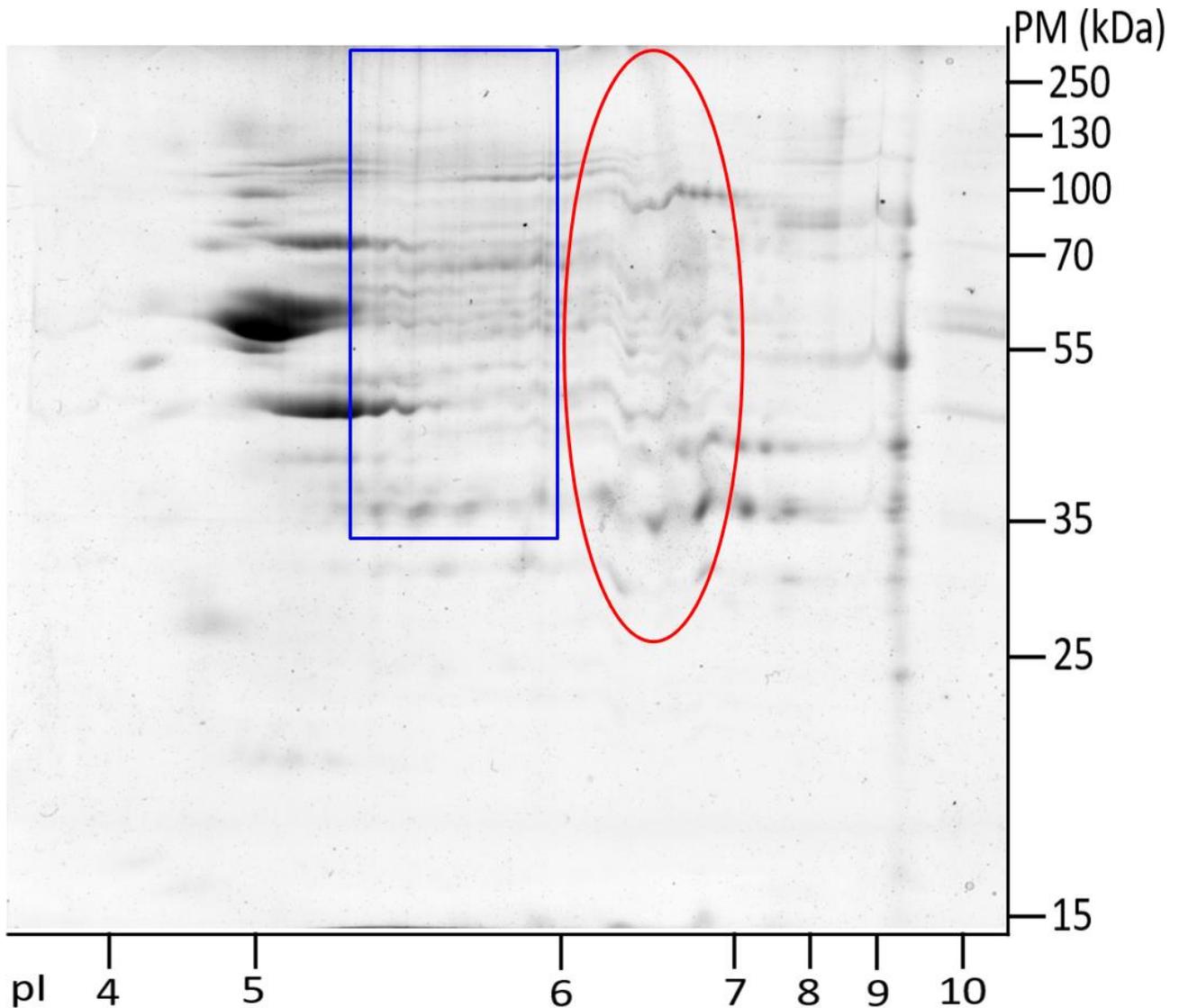
Para la primera prueba, se realizó un gel bidimensional utilizando el mismo extracto proteico previamente estudiado y se cargaron 60µg de muestra para su enfoque isoeléctrico utilizando el protocolo IEF #1 (Tabla 2) y posterior corrida vertical en gel de poliacrilamida al 12%. Al finalizar el gel fue colorado con Coomassie coloidal y escaneado para su visualización.

**Tabla 2:** Protocolo IEF #1. Sobre cada paso se indica el valor de voltaje en voltios, la duración y de qué tipo de paso se trata. Rehidratación: se refiere al primer paso del enfoque isoeléctrico donde no se aplica voltaje para que las proteínas se rehidraten pasivamente. Sostenido: cuando el voltaje varía en un solo paso hasta el valor marcado y se mantiene constante durante toda la duración del mismo. Gradual: cuando el voltaje va variando paulatinamente a lo largo del tiempo hasta alcanzar el valor marcado.

	<b>Paso 1</b>	<b>Paso 2</b>	<b>Paso 3</b>	<b>Paso 4</b>	<b>Paso 5</b>
<b>Voltaje (V)</b>	-	300	1000	5000	300
<b>Duración</b>	16-18hrs	30min	1h	80min	Hasta ~9000Vhr
<b>Tipo</b>	Rehidratación	Sostenido	Gradual	Gradual	Sostenido

Al observar el resultado de la electroforesis 2D-PAGE utilizando el protocolo inicial notamos que el patrón del gel muestra varias irregularidades. En primer lugar, si bien se distinguen algunos spots, estos no están bien definidos y se encuentran explayados en un patrón de líneas horizontales (**Fig. 6 Rectángulo**). Por otro lado, hay regiones del gel donde parece haber un problema a nivel de la corrida vertical que perturba el patrón causando un efecto de distorsión ondulada (**Fig. 6 Elipse**). Sin embargo, como factor positivo, no parecieran haber remanentes de

impurezas en la muestra que estén afectando los resultados, ya que no se observa un fondo saturado como se esperaría en presencia de impurezas, por lo queda establecido que el protocolo de precipitación proteica funciona correctamente.



**Figura 6:** Gel bidimensional al 12% de corteza visual de ratón PC, teñido con Coomassie coloidal. Se cargaron 60  $\mu\text{g}$  de proteínas y se utilizó el protocolo isoeléctrico #1 con el aparato Ettan IPGphor II System (Amersham). **Rectángulo (Azul):** Zona de bajo enfoque isoeléctrico, con spots explayados en líneas horizontales. **Elipse (Rojo):** Distorsión vertical. PM: peso molecular en kilo Daltons (kDa), pI: punto isoeléctrico.

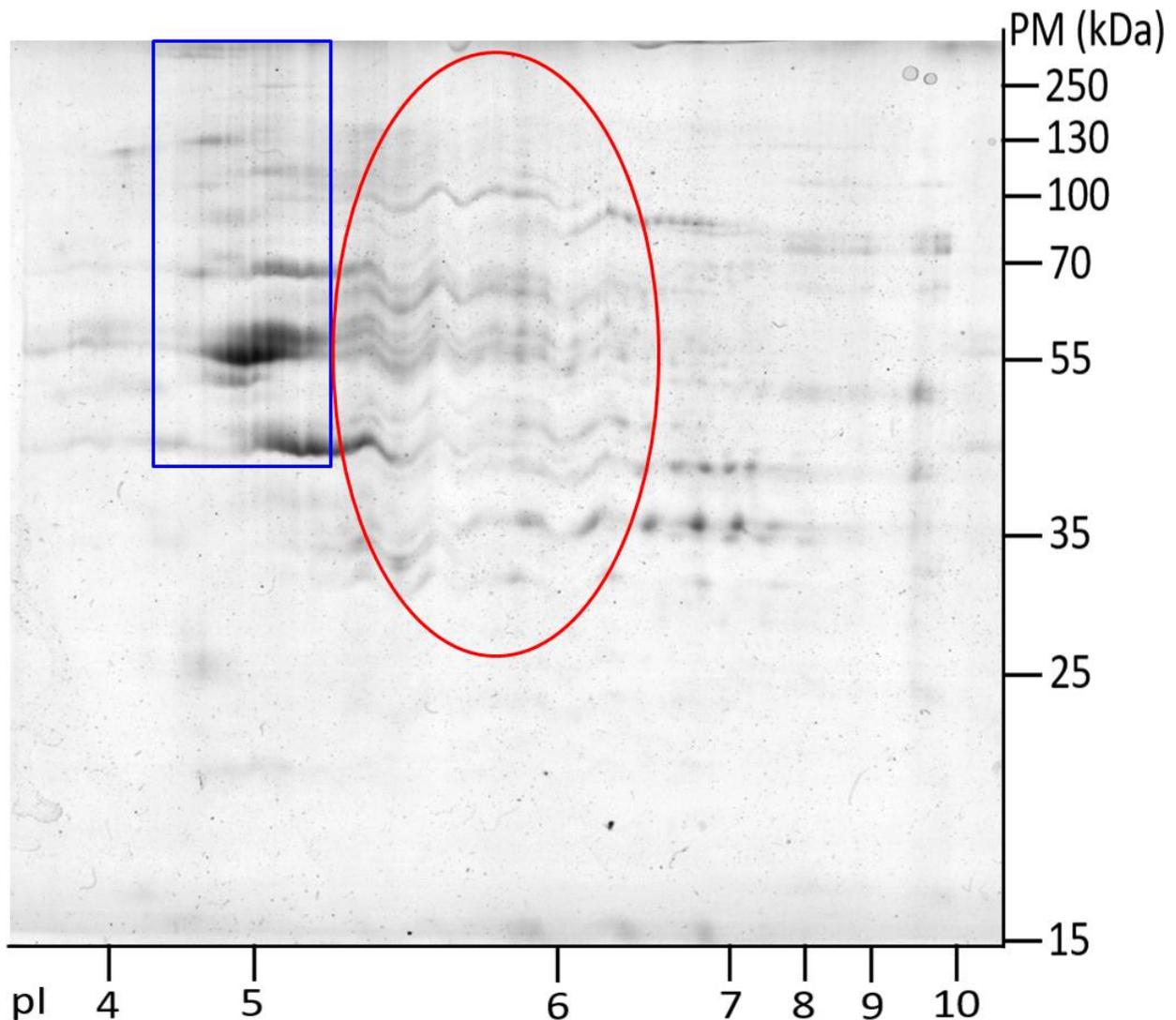
Recurriendo al manual de electroforesis 2D encontramos que el fenómeno de spots desenfocados como el que observamos en este caso es conocido como “horizontal streaking” y puede ocurrir con varias razones. Entre ellas se encuentran: la muestra es poco soluble en la solución de rehidratación; presencia de impurezas no proteicas que estén interfiriendo con IEF;

presencia de detergente iónico en la muestra a una concentración mayor al 0.25%; pero la principal razón es un enfoque insuficiente o “underfocusing”, el cual ocurre cuando el tiempo de enfoque no fue suficiente para lograr un enfoque de estado estable y permitir que las proteínas se separen completamente a nivel horizontal. Respecto a la distorsión se encontró que esta puede deberse a una polimerización desigual, incompleta o demasiado rápida del gel; fugas durante el armado del mismo o a que la superficie superior del gel de segunda dimensión no es lisa.

Luego de revisar la bibliografía se decidió que esta última era la razón más probable del problema, así como también la más simple de comprobar por lo que se modificó el protocolo de enfoque isoelectrico utilizado inicialmente (protocolo IEF #1), agregando al principio del protocolo un paso extra de 2hrs a 150V (Tabla 1: Protocolo IEF #2), para intentar mejorar la separación de las proteínas durante la corrida horizontal.

Para determinar si el “underfocusing” era la fuente del problema se repitió el mismo experimento anterior, utilizando la misma muestra y únicamente modificando el protocolo IEF como anteriormente se describió. También se procuró tener especial cuidado durante el moldeo del gel de poli(acrilamida) para asegurar una polimerización pareja y evitando las burbujas entre el strip y el gel.

Es así que se realizó a una segunda prueba cargando nuevamente 60µg de proteína que fueron separadas según su punto isoelectrico utilizando el protocolo IEF #2 para finalmente producir un nuevo gel bidimensional al 12% que mostrara los efectos de los cambios en el protocolo. Luego de la tinción con Coomassie coloidal se observa que las modificaciones aportadas durante el enfoque isoelectrico ayudaron a una mejor separación de los spots, principalmente sobre la parte derecha del gel donde se encuentran las proteínas de punto isoelectrico alrededor de 7 (**Fig. 7**). Sin embargo, persisten tanto los problemas de distorsión (incluso el área afectada por este fenómeno parece ser aún mayor que en la prueba anterior) (**Fig. 7 Elipse**), como las líneas verticales que se veían en menor medida en el experimento anterior (**Fig. 7 Rectángulo**), que también alteran el patrón.



**Figura 7:** Gel bidimensional al 12% de corteza visual de ratón PC conservada a  $-80^{\circ}\text{C}$  desde 2014, teñido con Coomassie coloidal. Se cargaron 60  $\mu\text{g}$  de proteínas y se utilizó el protocolo isoelectrico #2 con el aparato Ettan IPGphor II System (Amersham). **Rectángulo (Azul):** Se muestra una zona de bajo enfoque isoelectrico donde se observan también un conjunto de líneas verticales que alteran el patrón. **Elipse (Rojo):** Distorsión vertical. PM: peso molecular en kilo Daltons (kDa), pI: punto isoelectrico.

En este punto se decide mantener el protocolo IEF modificado ya que, a pesar de la persistencia de ciertos problemas, la mejoría en la definición de los spots, si bien es leve, es lo suficientemente notoria como para abandonar el protocolo IEF anterior mientras se prueban otras posibles aproximaciones para mejorar la calidad de los resultados.

Como fue mencionado anteriormente, hasta el momento se utilizó una muestra de corteza visual dentro del periodo crítico, extraída con antelación en el marco de otros proyectos del Laboratorio y conservada a  $-80^{\circ}\text{C}$  desde entonces. Para evaluar si el tiempo de conservación era un factor que estaba afectando negativamente la calidad de los experimentos, a partir de aquí se

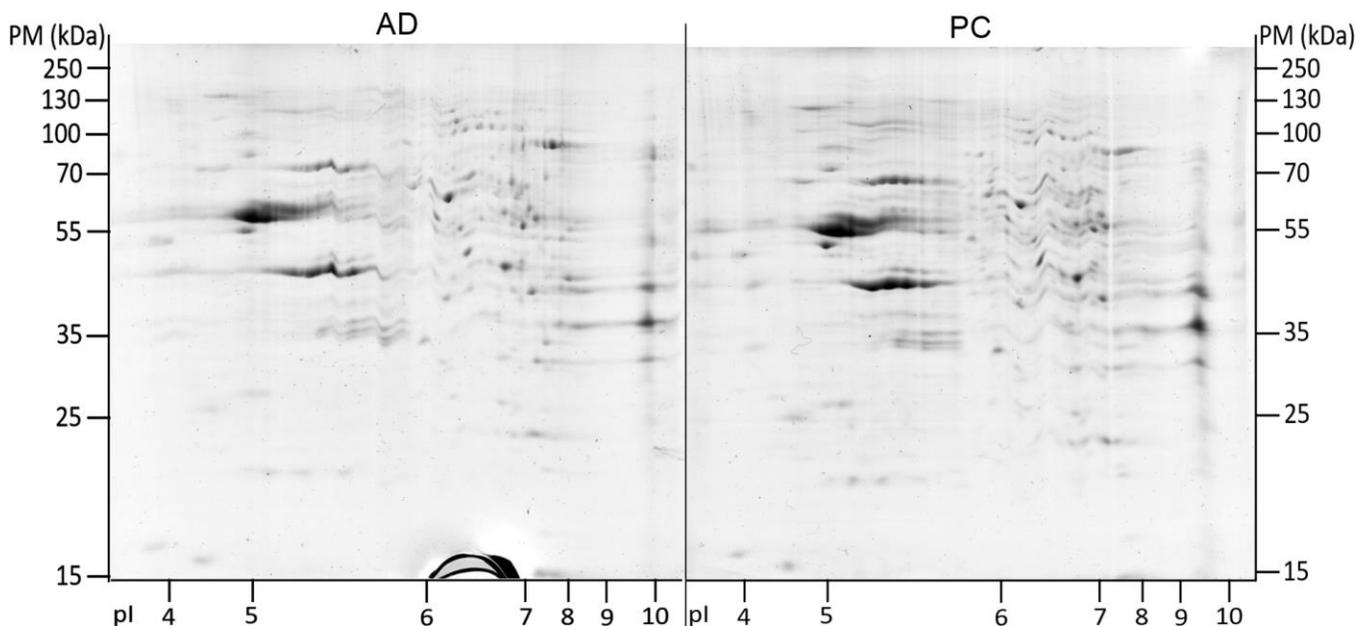
comenzaron a utilizar muestras frescas, de animales sacrificados específicamente para este propósito tan solo unas semanas antes del experimento. Se considera que esto puede llegar a contribuir a la mejoría de los resultados experimentales porque la congelación de las muestras puede desnaturalizar proteínas y cambiar las concentraciones de los distintos solutos debido a la cristalización del agua, la cristalización de los solutos que actúan como buffer y los cambios de pH resultantes (Cao, 2003). El almacenamiento durante un tiempo prolongado puede comprometer la integridad estructural de las muestras (Bortolin, 2017), por lo que en general, la mejor opción siempre es utilizar muestras frescas.

Por otra parte, como se indicó al inicio de esta sección, todos los protocolos empleados aquí, ya habían sido utilizados previamente en este Laboratorio, durante la realización de otros proyectos. Si bien en términos generales, estos protocolos se mantuvieron relativamente intactos, además de las modificaciones que debieron ser aportadas durante la puesta a punto de la metodología (como se ha visto hasta al momento específicamente sobre el enfoque isoeléctrico), también se realizaron cambios mínimos durante la revisión de los protocolos de manera previa a la realización de los experimentos, con el objetivo de que los pasos a seguir fueran más claros, e intentado a su vez facilitar al máximo el proceso que ya de por sí, es considerablemente delicado. Una de las implementaciones aportadas a priori, fue la de utilizar un peine 2D durante el moldeado del gel de la segunda dimensión. Es así, que en el protocolo empleado hasta este punto, se utilizaba este peine como herramienta, que permite la formación de dos pocillos en el gel de la segunda dimensión: uno pequeño donde cargar el marcador de peso molecular y uno grande donde colocar el strip.

En vista a lo observado en los resultados, se creía que el problema de distorsión podía deberse a algún error durante el moldeado del gel o durante la colocación del strip, por lo que para discernir entre estas dos posibilidades se lanzó la primera prueba PC vs AD usando exactamente el mismo protocolo empleado en los experimentos anteriores, cuidando en extremo la colocación del strip, y simultáneamente se hace un tercer gel con la misma muestra AD, solamente modificando levemente el protocolo de moldeado del gel de la segunda dimensión. Si bien en un principio se consideraba que la implementación del peine 2D facilitaría el proceso por implicar menos pasos en comparación a un protocolo que no lo utiliza, al tratarse de un aporte novedoso, el correcto funcionamiento del mismo definitivamente debía ser evaluado. Esta noción fue reforzada por el hecho de que, al observar con mucha atención el lugar de contacto entre el peine y el gel una vez polimerizado, este parecía mostrar ciertas irregularidades. Ante esto, se decide realizar una prueba sin utilizar el peine 2D, simplemente dejando el espacio para el strip en el molde de armado del gel de la segunda dimensión, recubriendo el borde superior del mismo con isopropanol, el cual sirve para minimizar la exposición del gel al oxígeno y crear una superficie plana. Se realizaron los 3 geles al mismo tiempo para de esa forma poder comparar directamente las diferencias, sabiendo que la única variante era la utilización o no del peine 2D.

Para ello, se realizó la extracción proteica y la precipitación de las muestras de corteza visual frescas, de ratón adulto y de ratón joven al pico del periodo crítico de plasticidad. A continuación, se midió la concentración proteica de ambas muestras y se cargó el volumen correspondiente a 60µg de proteína. Se utilizó el protocolo IEF #2 y la muestra AD se realizó en duplicado. Para la segunda dimensión, se corrió la muestra PC y una de las muestras AD en gel de poliacrilamida al 12% con peine 2D, y la muestra AD restante se corrió en gel de poliacrilamida al 12% sin peine 2D.

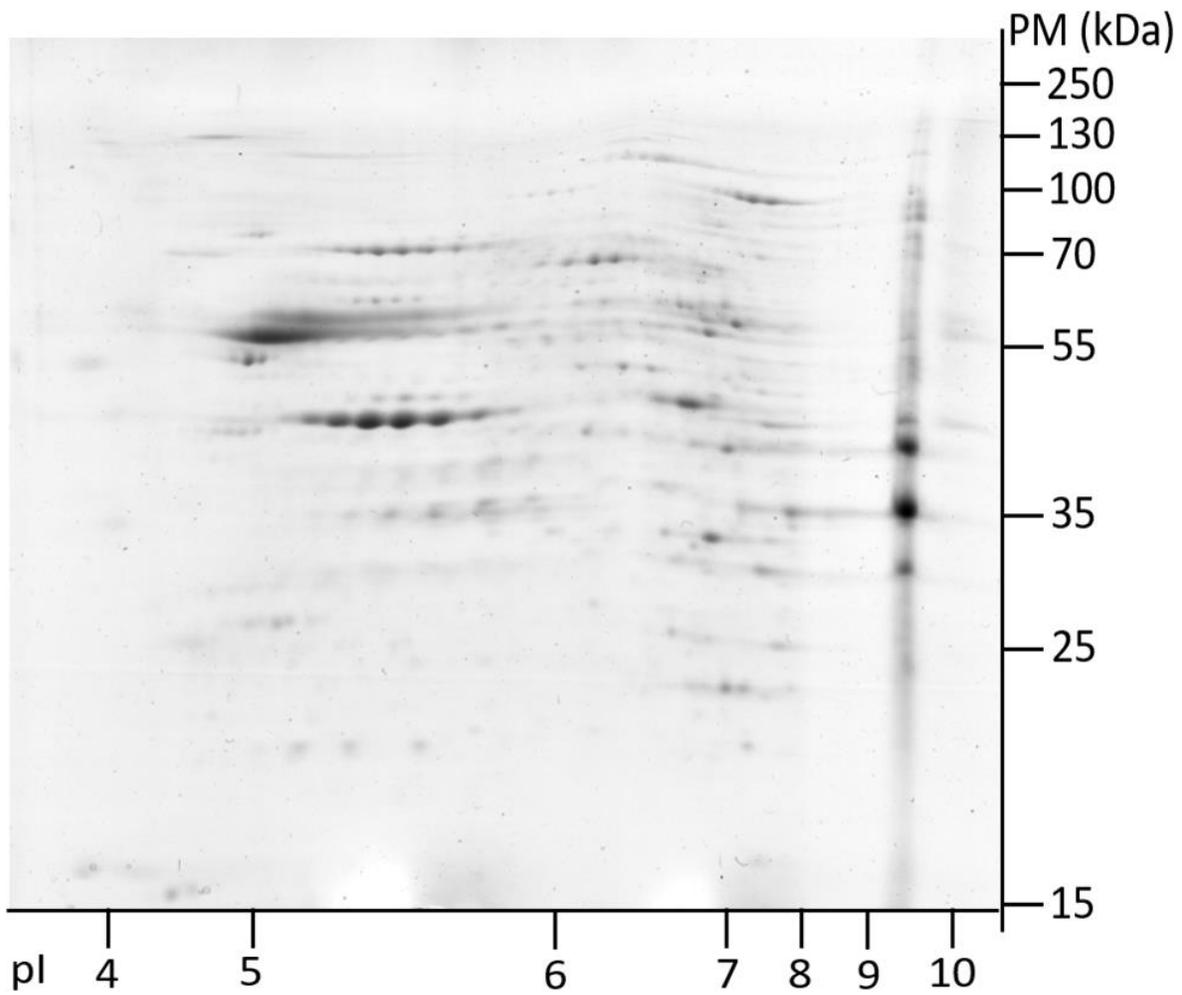
En la pareja se observa que hay una notoria mejoría en cuanto al enfoque de los spots, por lo que el utilizar muestras frescas es un factor importante a la hora de obtener spots bien definidos y de mayor intensidad. A pesar de las mejorías, notamos claramente que el problema del patrón ondulado persiste (**Fig. 8**).



**Figura 8:** Geles bidimensionales al 12% de muestras frescas de corteza visual de ratón AD (izquierda) y PC (derecha), teñidos con Coomassie coloidal. Se cargaron 60 µg y se utilizó el protocolo isoeléctrico #2 con el aparato Ettan IPGphor II System (Amersham). PM: peso molecular en kilo Daltons (kDa), pI: punto isoeléctrico.

En contraste, el gel realizado el mismo día y bajo las mismas condiciones, pero sin peine 2D muestra un patrón marcadamente diferente donde finalmente desaparece la distorsión ondulatoria (**Fig. 9**). Esto llevó a la conclusión de que la raíz del problema, era que por alguna razón, el peine no lograba sellar por completo el gel del contacto con el oxígeno, y la entrada de aire provocaba que la superficie del borde superior del gel de la segunda dimensión no fuera del

todo lisa. Esto generaba que el contacto entre el strip y el gel fuera desparejo, causando los problemas antes vistos.



**Figura 9:** Gel bidimensional al 12% de muestra fresca de corteza visual de ratón AD, teñido con Coomassie coloidal. Se cargaron 60  $\mu\text{g}$  y se utilizó el protocolo isoelectrico #2 con el aparato Ettan IPGphor II System (Amersham) y no se empleó peine 2D en el moldeado del gel de la segunda dimensión. PM: peso molecular en kilo Daltons (kDa), pI: punto isoelectrico.

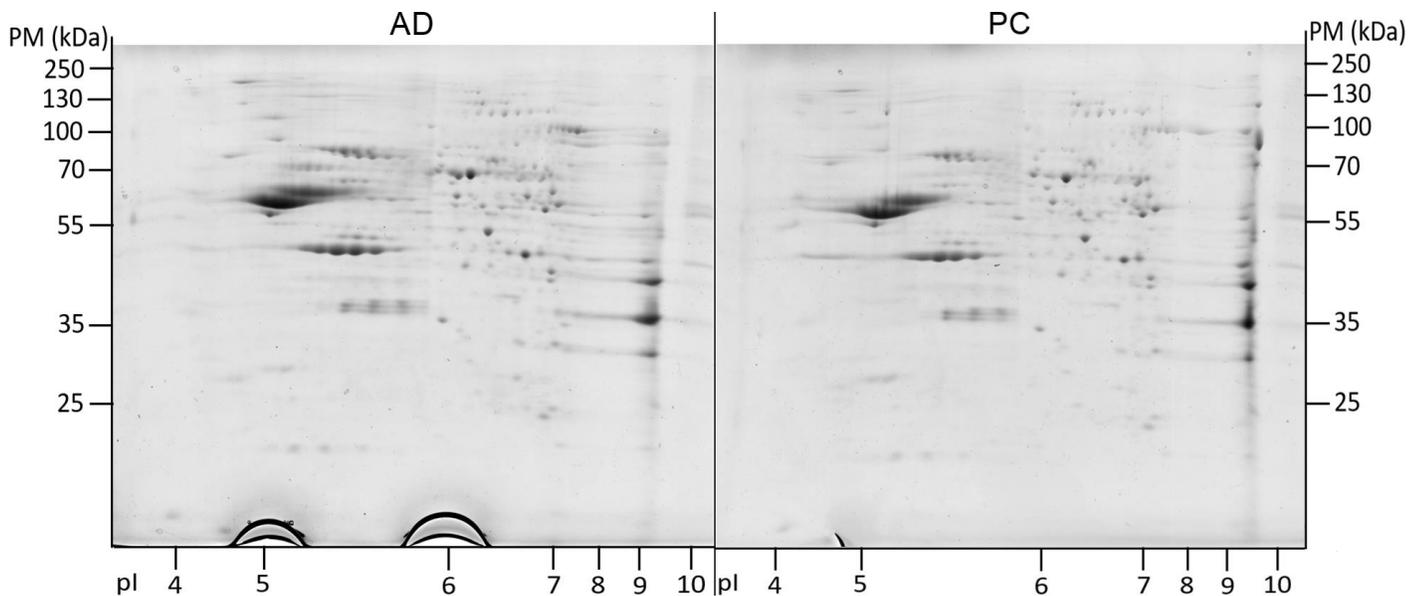
En este punto finalmente le damos el visto bueno a los protocolos y proseguimos a la realización del estudio comparativo y obtención de datos para el análisis.

## 5.2. Experimentos de proteómica diferencial

El tercer objetivo de este trabajo era la obtención de geles 2D-PAGE a partir de muestras proteicas de corteza visual de ratones durante el periodo crítico y de ratones adultos, para su posterior comparación. La finalidad de esto era la identificación de aquellos spots cuyos niveles de intensidad óptica en la corteza visual del ratón sean modulados entre el periodo crítico de plasticidad y la adultez. Para ello, se planificó llevar adelante una comparación de los geles obtenidos utilizando el software de análisis de la imagen (Melanie 6.0, GeneBio).

Es así, que luego de la puesta a punto de la técnica, finalmente comenzaron los experimentos de obtención de datos. Para ello, al momento de la redacción de esta Tesis, se lograron realizar experimentos sobre tres parejas PC vs AD, obteniendo tres pares de geles bidimensionales. Para hacer posible la comparación entre estos geles, en todos los casos, tanto la muestra AD como la PC de cada pareja se prepararon al mismo tiempo, al igual que el IEF y la corrida en segunda dimensión, asegurando así que cualquier cambio observado se debe únicamente a la diferencia de edad de los individuos estudiados y no a cambios en las condiciones de trabajo y/o manipulación.

Para cada pareja, se realizó la extracción y precipitación proteica de muestras de corteza visual AD y PC frescas, y se midió la concentración proteica de cada una. Cargando 60ug de cada extracto proteico, se separaron las proteínas según su punto isoeléctrico mediante el protocolo IEF #2 e inmediatamente después se realizó la segunda dimensión, empleando geles de poliacrilamida al 12% sin peine 2D. Luego de la coloración de los geles con Coomassie coloidal y el posterior escaneo para su correcta visualización, se puede observar que se obtuvieron geles bien definidos, sin distorsiones extrañas en el patrón y que los spots están bien enfocados, principalmente en la parte derecha del gel donde se encuentran las proteínas de pI más alto, de entre 6 y 8. Alrededor de la marca de pI 5 y peso molecular entre 70kDa y 55kDa notamos que hay una zona de alta densidad proteica que no logra formar spots bien definidos y claros, ocasionando que estos no sean fácilmente identificables para su comparación. A su vez se observa que la mayor cantidad de proteínas se encuentran en un rango de peso molecular entre 45kDa y 100kDa. En la zona inferior de los geles, donde se encuentran los pesos moleculares más bajos, es donde parece haber menor número de proteínas (**Fig. 10**).

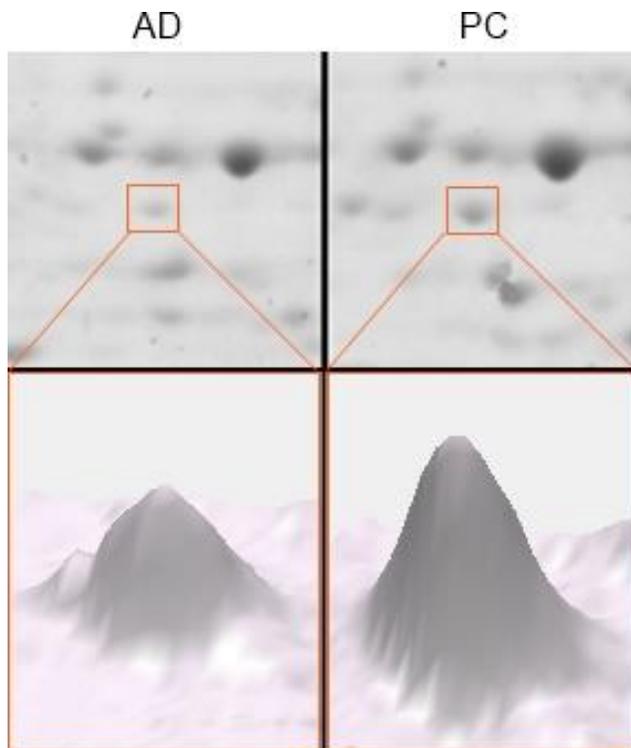


**Figura 10:** Geles bidimensionales al 12 %, de corteza visual de ratón adulto (izquierda) y periodo crítico (derecha), con una carga de 60  $\mu$ g de proteína en ambos, teñidos con Coomassie coloidal. PM: peso molecular en kilo Daltons (kDa), pI: punto isoeléctrico. Geles representativos de 3 experimentos, realizados con muestras de tres parejas de ratones distintas.

A su vez, notamos que la distribución de los spots en ambos geles muestra un patrón altamente similar, indicando que la metodología fue implementada correctamente y que la variabilidad introducida por esta es reducida.

A simple viste es difícil observar diferencias claras por lo que se requiere de la ayuda de herramientas de análisis informático para distinguirlas. Por lo que, para identificar diferencias en la coloración de spots entre las dos condiciones experimentales, se utilizó el programa Melanie 6.0 (GeneBio). Este programa, presenta una herramienta de visualización tridimensional (3D) de los spots, que permite visualizar rápidamente su forma y su intensidad en un modo muy claro e ilustrativo, haciendo posible verificar mediante una inspección visual, si el objeto identificado se puede considerar un spot o se trata de una mancha.

A modo de ejemplo, en la **Fig. 11** se muestra en mayor detalle una región aumentada de una pareja de geles, donde con la ayuda de la herramienta 3D sobre la región, notamos que hay una clara diferencia de intensidad en el spot señalado, que puede ser apreciada en más detalle en el panel inferior de la imagen. Particularmente se puede concluir que el objeto estudiado se trata efectivamente de un spot y que, en este caso, la intensidad del mismo es mayor en el ratón joven respecto al ratón adulto.



**Figura 11:** Se muestra una región aumentada de una pareja de geles bidimensionales al 12 % de corteza visual de ratón adulto (izquierda) y periodo crítico (derecha), donde se recuadra en rojo un spot (más adelante referido en la Tabla 1 con ID 226) que muestra expresión diferencial entre las dos condiciones. En el panel inferior de la imagen se muestra una imagen tridimensional del mismo, donde se nota claramente mayor intensidad en el gel correspondiente al ratón joven al pico del periodo crítico.

### 5.3. Análisis imagenológico de los geles

Para el procesamiento de las 6 imágenes obtenidas de los geles de las 3 parejas PC y AD, se utilizó nuevamente el programa de análisis informático Melanie 6.0 (GeneBio). Los detalles del procesamiento se encuentran bien desarrollados en Materiales y Métodos, pero brevemente, se comenzó por la detección automática de los spots proteicos, utilizando en todos los geles siempre los mismos parámetros (descritos en Materiales y Métodos) para intentar que la detección fuera relativamente pareja en todos los casos y evitar variabilidad introducida por el experimentador. En este modo se detectaron inicialmente entre 400 y 700 spots por gel aproximadamente. Esta gran variabilidad en el número de spots detectados en cada gel, se debió a que, de estos spots, muchos fueron objetos detectados erróneamente por el programa como spots, pero se trataba de suciedades o irregularidades que, luego de una inspección visual, utilizando nuevamente la herramienta 3D como apoyo, debieron ser eliminados manualmente.

Luego de una limpieza visual gruesa de spots, se llegó a un número promedio de 480 spots por gel (entre 300 y 550 spots por gel), que obviamente representa solo una fracción de la más de 10000 proteínas que se expresan en el cerebro de mamíferos. Por otro lado, el número de spot detectado es similar al que se encuentra normalmente mediante esta aproximación experimental, tanto en este mismo laboratorio (Ruiz-Perera et al., 2015) como por otros grupos de investigación (Van den Bergh et al., 2003, 2006; Dahlahus et al., 2011).

A continuación, se procedió a la comparación entre geles, para lo cual se eligió como gel de referencia aquel que al final de la etapa anterior mostrara mayor número de spots, considerando que esto aumenta la probabilidad de lograr encontrar en él, todos los spots de los cinco geles restantes. En esta primera fase de “matching”, la comparación automática entre geles produjo un número promedio de 350 spots pareados por gel (entre 290 y 415 por gel), correspondiente a un promedio de 73 % de los spots identificados durante la detección.

Con el fin de aumentar el número de spots pareados y llegar al mismo número de “matches” en todos los geles por las razones explicadas en Materiales y Métodos (sección 4.3), se continuó el procedimiento mediante la edición manual de los “matches”, utilizando como herramienta el reporte intra-clase para localizar aquellos spots que no lograron ser exitosamente pareados de forma automática (más detalles en Materiales y Métodos). Luego de esta intervención, finalmente se lograron parear 413 spots en todos los geles analizados, llegando así a parear el 86% de los spots identificados. Es decir, se lograron identificar exitosamente los mismos 413 spots en el total de los 6 geles bidimensionales.

De los spots exitosamente pareados se obtuvo una tabla de datos, con los valores correspondientes al volumen relativo (%Vol) que representa cada spot en relación al volumen total de spots del gel que lo contiene. Estos datos, brindan información normalizada sobre los spots, ya que mediante un tipo de calibración interna que realiza el programa sobre los datos

crudos del volumen (medida de densidad óptica integrada), los datos se vuelven completamente independientes de las variaciones experimentales que puedan existir entre los diferentes geles. Esto permite la correcta comparación de los spots entre geles, pudiendo cuantificar y comparar los spots de cada gel y asegurando que cualquier diferencia observada se debe realmente a la diferencia en el nivel de expresión de estos. En base a estos valores, se procedió al análisis para la detección de spots expresados diferencialmente entre PC y AD.

## 5.4. Análisis estadístico

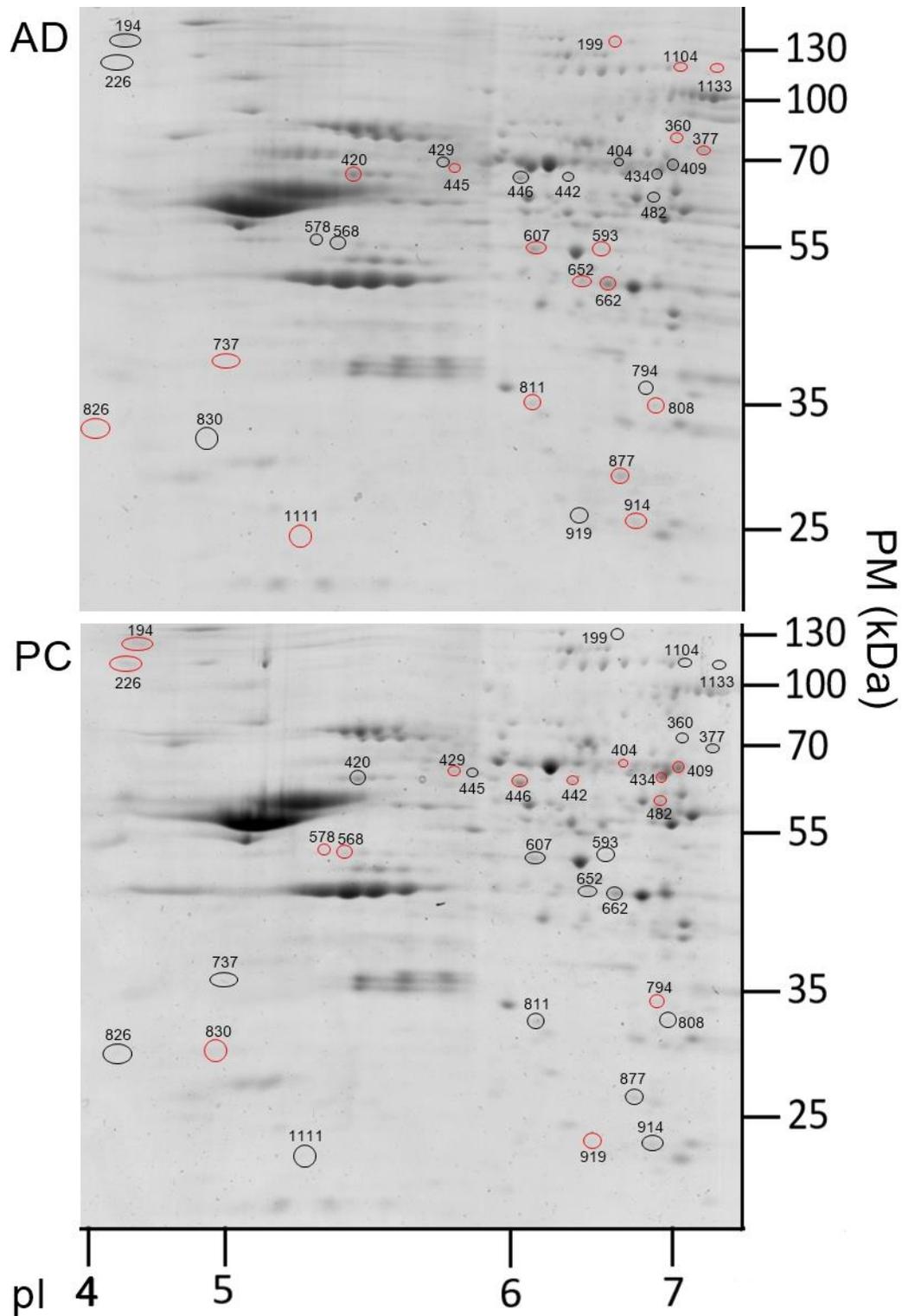
Como fue explicado en secciones anteriores, al momento de la redacción de esta tesis se lograron realizar con éxito geles bidimensionales sobre tres parejas experimentales. No obstante la dificultad de obtener datos estadísticamente aceptables con un  $n=3$  en experimentos de este tipo, se decidió buscar tendencias de reducción o aumento entre PC y AD usando el test U de Mann Whitney con los datos de %Vol de cada spot.

En primera instancia, se agruparon los datos %Vol por pareja y se normalizaron mediante el cociente PC/AD para cada pareja, obteniendo un único valor por pareja para cada spot pareado. El análisis de estos datos permitió identificar 92 spots que parecían mostrar una tendencia igual en los 3 experimentos (ya sea de aumento PC/AD  $\geq 1,15$ , o de disminución PC/AD  $\leq 0,85$ , ver Materiales y Métodos). Luego, los valores %Vol de estos 92 spots fueron analizados por el test estadístico de Mann Whitney, para discernir cuales mostraban una diferencia estadísticamente significativa.

El test U de Mann-Whitney es un test no paramétrico que en este caso permite determinar la probabilidad de que la diferencia en el valor del volumen observada en determinado spot entre los dos tipos de muestras (PC y AD) se deba a un fenómeno de azar y no a una diferencia real entre los valores. Con esta herramienta se puede afirmar que de los 92 spots que evidenciaban una tendencia de aumento o disminución, 36 de ellos mostraron una diferencia estadísticamente aceptable, con un 92% de certeza.

Mediante la inspección visual de estos spots en los geles de origen, utilizando el número de ID de cada uno como referencia, se debió confirmar nuevamente que se trata de spots bien identificados y que no existan errores en la forma del spot ni en el pareo de los mismos, que puedan estar alterando los datos. El resultado de esta inspección mostró que, de los 36 spots expresados diferencialmente, 4 debían ser descartados por tratarse de spots no claramente definidos (manchas), imposibilitando su estudio. De los 32 spots restantes, 14 muestran un aumento de la expresión en la corteza visual de ratones jóvenes respecto al adulto y 18 aumentan su expresión en el ratón adulto respecto al joven (**Fig. 12**).

El número relativamente bajo de proteínas expresadas diferencialmente en las condiciones experimentales analizadas, no es sorprendente. De hecho, estudios similares que utilizan strips más grandes con gradientes de pH más acotados, o metodologías más sofisticadas como la electroforesis diferencial de geles por fluorescencia (DIGE), el refaccionamiento por RP-HPLC y la etiqueta isobárica para la cuantificación relativa y absoluta (iTRAQ), han identificado un número de proteínas expresadas diferencialmente en la corteza visual de gato y de ratón, en un rango similar (Van den Bergh, 2003, 2006; Dahlahus, 2011).



**Figura 12:** Gels bidimensionales al 12 %, de corteza visual de ratón adulto (arriba) y periodo crítico (abajo), con una carga de 60  $\mu$ g de proteína en ambos, teñidos con Coomassie coloidal. Se muestran circulados los 32 spots que mostraron una expresión diferencial estadísticamente aceptable entre las dos condiciones, resaltados en color rojo los que aumentan en cada caso, respecto a la otra condición experimental. PM: peso molecular en kilo Daltons (kDa), pI: punto isoeléctrico.

En el caso de los spots que aumentan en el PC respecto al AD, el análisis del promedio de los datos PC/AD indica que este aumento varía entre el 205% y el 31%. Sin embargo, el desvío estándar de estos valores es considerablemente alto (**Tabla 3**).

**Tabla 3:** Proteínas que aumentan su expresión en la corteza visual de ratones durante el pico del periodo crítico, en relación al adulto. Spot ID: número que identifica a un spot específico dentro del gel 2D. PC/AD: Promedio de los cocientes de %Vol entre PC y AD, de las 3 parejas experimentales para el mismo spot. SEM: Desvío estándar de cada promedio. pI: Punto isoeléctrico estimado. PM: Peso molecular estimado en kilo Daltons (kDa).

<b>SPOTS QUE AUMENTA EN PC</b>			
<b>SPOT ID</b>	<b>PC/AD ± SEM</b>	<b>pI</b>	<b>PM (kDa)</b>
<b>194</b>	1,92 ± 0,85	4,4	128
<b>226</b>	1,85 ± 0,73	4,3	120
<b>404</b>	2,79 ± 2,14	6,68	66
<b>409</b>	1,57 ± 0,41	7,1	66
<b>429</b>	2,13 ± 1,25	5,8	65
<b>434</b>	1,97 ± 0,75	6,96	64
<b>442</b>	2,14 ± 0,51	6,4	63
<b>446</b>	1,97 ± 0,86	6,08	63
<b>482</b>	2,01 ± 1,17	6,96	60
<b>568</b>	1,31 ± 0,12	5,42	53
<b>578</b>	3,05 ± 1,91	5,33	53
<b>794</b>	2,06 ± 1,22	6,92	34
<b>830</b>	1,98 ± 0,92	4,9	30
<b>919</b>	1,44 ± 0,08	6,52	24

Por otro lado, en el caso de los spots que aumentan en el AD respecto al PC, este aumento de la expresión varía entre el 51% y el 17%. En este caso observamos un rango de cambio más acotado, junto con desvíos estándar un poco más razonables que en los spots que aumentan en el PC (**Tabla 4**).

**Tabla 4:** Proteínas que aumentan su expresión en la corteza visual de ratones adultos, en relación a durante el periodo crítico de plasticidad. Spot ID: número que identifica a un spot específico dentro del gel 2D. PC/AD: Promedio de los cocientes de %Vol entre PC y AD, de las 3 parejas experimentales para el mismo spot. SEM: Desvío estándar de cada promedio. pI: Punto isoeléctrico estimado. PM: Peso molecular estimado en kilo Daltons (kDa).

**SPOTS QUE AUMENTA EN AD**

<b>SPOT ID</b>	<b>PC/AD ± SEM</b>	<b>pI</b>	<b>PM (kDa)</b>
<b>199</b>	0,75 ± 0,10	6,64	140
<b>360</b>	0,63 ± 0,18	7,2	75
<b>377</b>	0,63 ± 0,29	7,6	70
<b>420</b>	0,70 ± 0,09	5,42	63
<b>445</b>	0,59 ± 0,36	5,86	64
<b>593</b>	0,50 ± 0,30	6,6	53
<b>607</b>	0,69 ± 0,26	6,16	52
<b>652</b>	0,62 ± 0,31	6,52	48
<b>662</b>	0,74 ± 0,11	6,64	48
<b>737</b>	0,80 ± 0,10	5	36
<b>808</b>	0,49 ± 0,38	7	32
<b>811</b>	0,83 ± 0,10	6,16	32
<b>826</b>	0,61 ± 0,23	4,2	30
<b>877</b>	0,72 ± 0,12	6,8	27
<b>1104</b>	0,52 ± 0,22	7,2	120
<b>1111</b>	0,73 ± 0,16	5,26	23
<b>1133</b>	0,62 ± 0,26	7,8	120
<b>914</b>	0,74 ± 0,08	6,92	24

Ante esto, claramente es necesario al menos duplicar el número de parejas experimentales, para agrandar el pool de datos de manera tal que los resultados obtenidos no tengan incertidumbres tan grandes. Al solo tener tres parejas, se introduce mucha variabilidad por azar que no llega a ser del todo despreciable. Una vez hecho esto, se podrá realizar análisis estadísticos más contundentes para estudiar las diferencias entre los spots provenientes de ratones AD y PC. Recién entonces será posible seleccionar con mayor certeza el conjunto de spots pertinentes y así cumplir el objetivo a futuro de realizar análisis por espectrometría de masa de los spots con expresión diferencial, junto con el posterior análisis bioinformático para seleccionar e identificar aquellas proteínas que presenten potencial relevancia en el control de procesos de plasticidad.

## 5.5. Comparación con datos anteriores del Laboratorio

Reiterando lo detallado durante la introducción sobre los antecedentes del grupo en cuanto a la proteómica de la plasticidad en la corteza visual, en este Laboratorio se cuenta con datos previos de 2D-PAGE en corteza visual de ratón, donde se identificó un conjunto de proteínas que muestran expresión diferencial entre animales adultos con plasticidad inducida farmacológicamente con fluoxetina y animales adultos no tratados de control. Por lo que nos pareció interesante comparar ambos conjuntos de datos, para poder contribuir a la identificación de los mecanismos específicos de plasticidad durante el desarrollo y los inducidos farmacológicamente en el adulto (Ruiz-Perera et al., 2015).

Para ello, en primera instancia se debió establecer una correspondencia entre los spots de los experimentos AD vs PC y los experimentos AD vs FLX, se tomó la imagen de un gel de los experimentos con fluoxetina donde estuvieran marcados aquellos spots donde se encontró una diferencia de intensidad entre ambas condiciones, junto con la imagen del gel de referencia de los experimentos AD vs PC del presente trabajo y se abrieron mediante el programa de análisis de la imagen Melanie 6.0 (GeneBio). Se buscaron mediante proyección visual los spots marcados en el gel AD vs FLX, en el gel de este trabajo, para establecer la correspondencia entre ambos geles y lograr identificar los números de ID pertinentes, para estudiar los valores de %Vol de los mismos y establecer si existe coincidencia en la variación del patrón de expresión de estos spots, entre ambas condiciones de plasticidad. Es así que de los 31 spots que mostraron expresión diferencial entre animales tratados con fluoxetina y animales control, se lograron identificar exitosamente 19 de ellos en el gel de referencia AD vs PC, es decir se lograron parear el 61% de los spots de interés.

Una vez establecida la correspondencia, se verificó mirando la tabla de datos, cuáles de ellos mostraban también una expresión diferencial en los experimentos del presente trabajo. De los 19 spots exitosamente pareados entre los dos tipos de experimento, se encontró que uno de ellos muestra expresión diferencial tanto en los experimentos de esta tesis de grado como en los experimentos publicados en el artículo científico de 2015, y que los otros 18 cambian su expresión con el tratamiento con fluoxetina, pero no en AD vs PC.

Estos resultados, aunque preliminares, sugieren que los procesos de plasticidad en las dos condiciones probablemente comparten algunos mecanismos comunes, pero que cada condición presenta también sus características específicas, lo que explicaría la expresión diferencial de un determinado grupo de proteínas en una condición y no en la otra (Levelt & Hubener, 2012; Maya-Vetencourt & Origlia, 2012).

El spot que presenta una expresión diferencial en las dos condiciones, es aquel previamente descrito en esta Tesis con el número de ID 662 (ver Tabla 4). Si la comparación fue realizada correctamente, se puede deducir que este corresponde a la proteína glutamina

sintetasa, enzima reguladora del ciclo de la glutamina-glutamato en el sistema nervioso, que juega un papel fundamental en el control de la excitabilidad de las neuronas y astrogliá. La modulación de esta enzima y las consecuentes alteraciones de la homeostasis del glutamato se han asociado a varios trastornos neurológicos como la epilepsia, el autismo, el síndrome de Down y la enfermedad de Alzheimer (Jorgensen, 1990; Coulter, 2012; Bristot Silvestrin, 2013).

Esta proteína mostró un incremento del 26% en el adulto respecto al periodo crítico (**Tabla 4**), mientras que en animales tratados con fluoxetina mostró un aumento del 17% respecto a animales adultos de control. Esta diferencia entre la modulación durante el periodo crítico y durante el tratamiento con fluoxetina, sugiere lo que fue mencionado anteriormente sobre que además de presentar algunas características en común, también es de esperarse que cada condición de plasticidad presente mecanismos propios, por lo que la glutamina sintetasa podría ser una de las proteínas que modula la plasticidad juvenil y la restaurada en el adulto en modos distintos, según del tipo de plasticidad del que se hable. De modo interesante, en concordancia con nuestros resultados, esta misma proteína ha sido identificada en otros dos trabajos de proteómica diferencial realizados en la corteza visual del gato (Van den Bergh, 2003; Van den Bergh 2006). En ellos, también se ha observado que la glutamina sintetasa aumenta su expresión en el adulto respecto al periodo crítico, lo cual estaría reforzando los datos preliminares aportados por este trabajo de grado sobre la expresión de esta proteína en la corteza visual de ratón.

Por último, cabe mencionar que hay varios spots más que forman parte de los 19 spots exitosamente pareados entre los geles de los experimentos con fluoxetina y los del presente trabajo, que mostraban también una tendencia de cambio en los experimentos AD vs PC, pero no pasaron el test estadístico y por eso no se mencionan. Sin embargo, una vez que se aumente el número de experimento y se logre mejorar la calidad estadística de los resultados, se esperaría que exista un mayor solapamiento entre los datos que se compararon en esta sección.

## 6. Conclusiones

En este trabajo, se propuso identificar una serie de posibles candidatos que puedan estar formando parte de los mecanismos moleculares subyacentes a los procesos de plasticidad, lo cuales hasta el momento han sido poco caracterizados. Utilizando la corteza visual del ratón como modelo experimental y mediante una aproximación experimental de proteómica diferencial, se estudió el proteoma completo de la corteza visual de ratones adultos y jóvenes al pico del periodo crítico de plasticidad, para de esa forma localizar las diferencias moleculares entre ambas condiciones. Esto se enmarca dentro de una línea de investigación iniciada hace varios años en el Laboratorio, donde se pretende aportar información potencialmente útil para contribuir a la creación de terapias, que permitan la recuperación funcional en diferentes patologías, en las cuales los procesos plásticos se ven afectados (ej.: ambliopía, Síndrome de Rett, de Down, autismo) (Prusky and Douglas, 2003; Asaka et al., 2006; Bourgeron, 2015).

En la primera parte del trabajo, además de alcanzar una correcta familiarización con las técnicas de base del Laboratorio y con la temática de estudio, se logró de manera exitosa volver poner en funcionamiento en el Laboratorio una metodología de electroforesis bidimensional, que permite una alta resolución en la separación de proteínas. Esto ha incluido el afinamiento y la mejora de varios aspectos en la preparación de las muestras, pero sobre todo en las condiciones técnicas de la electroforesis 2D.

La comparación del patrón de expresión proteica en las dos condiciones experimentales utilizadas se llevó adelante sobre las imágenes de los geles obtenidos, utilizando software de análisis de la imagen Melanie 6.0 (GeneBio Amersham Biosciences) y el programa Past 2.14 free analysis system (Hammer, 2001) para el análisis estadístico. Mediante esta aproximación, los resultados obtenidos indican una clara modulación dinámica de la expresión proteica, encontrándose 32 proteínas que se expresan de manera diferencial durante el periodo crítico y la adultez. De estas, 14 aumentan en la corteza visual de ratones jóvenes respecto al adulto y 18 aumentan en el ratón adulto respecto al joven.

Adicionalmente, la comparación con datos previos del Laboratorio, permitió de forma complementaria, la obtención de más información que puede ser potencialmente relevante para describir los mecanismos que regulan la plasticidad neuronal en distintas condiciones. Particularmente, mediante la comparación con los datos publicados en 2015, en el artículo titulado "Fluoxetine increases plasticity and modulates the proteomic profile in the adult mouse visual cortex" (Ruiz-Perera et al., 2015), se logró establecer exitosamente la identidad proteica de 19 spots de este trabajo, de los cuales 18 varían su patrón de expresión durante el tratamiento con fluoxetina, pero no durante el periodo crítico, y 1 muestra variación en ambas condiciones de plasticidad. Esto permitió establecer la identidad exacta de 1 de las 32 proteínas que aquí mostraron expresión diferencial. Esta es la glutamina sintetasa, una proteína relacionada con

procesos de control de la excitabilidad. A su vez, esta proteína, que en este trabajo muestra un aumento en su expresión en la corteza visual de ratones adultos, ya ha sido identificada en trabajos previos sobre la corteza visual del gato, donde también mostró el mismo patrón de expresión.

Finalmente, se logró mostrar que existe una asociación entre el nivel de plasticidad en corteza visual de ratón y la modulación de los patrones de expresión de cierto número de spots, que corresponden a proteínas que deberán ser posteriormente identificadas por espectrometría de masa para establecer sus funciones y caracterizar los candidatos prometedores para el control de la plasticidad cortical visual en el cerebro durante etapas tempranas del desarrollo.

## 7. Perspectivas

- Es necesario llevar adelante un estudio más completo y detallado sobre la variación en el nivel de proteínas entre los extractos de corteza visual de ratones adultos y dentro del periodo crítico. Para ello se deberá aumentar el n experimental de los geles 2D utilizando los mismos strips de rango de pI amplio (pI 3-10NL) y utilizando, si es necesario, también strips de rango más acotado (pI 4-7 y pI 6-11) para no solo mejorar la variabilidad estadística de los datos ya obtenidos, si no para también aumentar la resolución del patrón de distribución proteica y posiblemente facilitar la identificación de nuevos spots con expresión diferencial. De manera alternativa a la realización de más experimentos, se planifica verificar la posibilidad de comparar los datos de esta tesis con los datos preliminares obtenidos en 2014 sobre estas mismas condiciones (PC y AD), estableciendo si los patrones bidimensionales observados en esos experimentos son lo suficientemente similares a los obtenidos aquí como para permitir la unión de ambos grupos de geles para su análisis.
- Realizar un análisis más detallado de las imágenes de los geles, intentando reducir al máximo la manipulación manual de los datos y haciendo que el análisis sea lo más automatizado posible para evitar la introducción de errores por parte del operador.
- Realizar espectrometría de masa sobre los spots que muestren patrones de expresión diferentes entre las dos condiciones para caracterizar específicamente de que proteínas se trata (en cooperación con la Unidad de Bioquímica y Proteómica Analíticas, Institut Pasteur de Montevideo).
- Dentro de las proteínas exitosamente identificadas, seleccionar aquellas que, según sus funciones, puedan estar participando en la regulación de los procesos de plasticidad en la corteza visual, para analizar y describir en mayor detalle su rol.
- Confirmar la información obtenida en los experimentos de proteómica a través de otras metodologías, como estudios de Western blot, inmunohistoquímica y RT-PCR.
- Llevar a cabo estudios de proteómica diferencial también en otras condiciones experimentales, particularmente en animales adultos criados en ambiente enriquecido, ya que se trata del modelo de plasticidad restaurada utilizado en este Laboratorio, pero sobre el cual aún no se poseen datos proteómicos a gran escala. De esta forma, en conjunto con los datos obtenidos previamente sobre ratones tratados con fluoxetina, y mediante la comparación de los resultados obtenidos en las diversas condiciones, se logrará establecer de forma más precisa y clara, los mecanismos moleculares subyacentes a la plasticidad en la corteza visual. A su vez, se podrán establecer las diferencias y similitudes entre los mecanismos moleculares que están por detrás de los procesos plásticos dados naturalmente durante el desarrollo, y los procesos de plasticidad restaurada.

## 8. Referencias bibliográficas

- 2-D Electrophoresis. Principles and Methods GE Healthcare, Amersham. [https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/docs/Sigma-Aldrich/General\\_Information/1/ge-2d-electrophoresis.pdf](https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/docs/Sigma-Aldrich/General_Information/1/ge-2d-electrophoresis.pdf)
- Alzate, O. (2010) Neuroproteomics. *Frontiers in Neuroscience*, Boca Raton (FL): CRC Press/Taylor & Francis.
- Anderson, L., & Seilhamer, J. (1997). A comparison of selected mRNA and protein abundances in human liver. *Electrophor*, 18, 533–537.
- Asaka, Y., Jugloffb, D. G. M., Zhang, L., Eubanks, J. H., Fitzsimonds, R. M. (2006). Hippocampal synaptic plasticity is impaired in the Mecp2-null mouse model of Rett syndrome. *Neurobiol Dis.*, 21, 217-27.
- Bardin, J. (2012). Neurodevelopment: Unlocking the brain. *Nature*, 486, 24–26.
- Baroncelli, L., Braschi, C., Spolidoro, M., Begenisic, T., Maffei, L., & Sale, A. (2011). Brain plasticity and disease: A matter of inhibition. *Neural Plast*, 286073.
- Bavelier, D., Levi, D. M., Li, R. W., Dan, Y., & Hensch, T. K. (2010). Removing Brakes on Adult Brain Plasticity: From Molecular to Behavioral Interventions. *J Neuroscience*, 30, 14964–14971.
- Bornia, N. (2015) Análisis de histonas y modificaciones postraduccionales en modelos de plasticidad en el sistema visual. Tesis de maestría Pedeciba, Biología.
- Bortolin, R. C., Gasparotto, J., Chaves, P. R., Roncato, S., Gelain, D. P., Moreira, J. C. F. (2017). Effects of Freeze-Thaw and Storage on Enzymatic Activities, Protein Oxidative Damage, and Immunocontent of the Blood, Liver, and Brain of Rats. *Biopreserv Biobank.*, 15,182-190.
- Bourgeron, T. (2015). From the genetic architecture to synaptic plasticity in autism spectrum disorder. *Nature Reviews Neuroscience*, 16, 551–563.
- Bristot Silvestrin, R. et al. (2013). Animal model of autism induced by prenatal exposure to valproate: altered glutamate metabolism in the hippocampus. *Brain Res* 1495, 52–60.

- Cao E, Chen Y, Cui Z, Foster PR. (2003). Effect of freezing and thawing rates on denaturation of proteins in aqueous solutions. *Biotechnol Bioeng*, 82, 684–690.
- Coulter, D. A. & Eid, T. (2012). Astrocytic regulation of glutamate homeostasis in epilepsy. *Glia* 60, 1215–1226.
- Dahlhaus, M., Wan Li, K., van der Schors, R. C., Saiepour, M. H., van Nierop, P., Heimel, J. A., Hermans, J.M., Loos, M., Smit, A.B., Levelt, C. N. (2011). The Synaptic Proteome during Development and Plasticity of the Mouse Visual Cortex. *Mol & Cel Proteomics*, 10, M110.005413.
- Fagiolini M, Pizzorusso T, Berardi N, Domenici L, Maffei L. (1994) Functional postnatal development of the rat primary visual cortex and the role of visual experience: dark rearing and monocular deprivation. *Vision Res.* 34:709–720.
- Fagiolini, M., & Hensch, T. K. (2000). Inhibitory threshold for critical-period activation in primary visual cortex. *Nature*, 404, 183–186.
- Gygi, S. P., Rochon, Y., Franza, B. R., & Aebersold, R. (1999). Correlation between Protein and mRNA Abundance in Yeast. *Mol & Cel Biology*, 19, 1720–1730.
- Hammer, O., Harper, D. A. T., Ryan, P. D. (2001). PAST: Paleontological statistics software package for education and data analysis. *Palaeontologia Electronica* 4, 9.
- He HY, Hodos W, Quinlan EM (2006) Visual Deprivation Reactivates Rapid Ocular Dominance Plasticity in Adult Visual Cortex. *J Neurosci* 26, 2951-5.
- He, H. Y., Ray, B., Dennis, K. & Quinlan, E. M. (2007). Experience-dependent recovery of vision following chronic deprivation amblyopia. *Nat Neurosci*, 10, 1134-6.
- Hensch, Takao K.; Fagiolini, Michela; Mataga, Nobuko; Stryker, Michael P.; Baekkeskov, Steinunn; Kash, S. F. (1998). Local GABA Circuit Control of Experience-Dependent Plasticity in Developing Visual Cortex. *Science*, 282, 1504–1508.
- Hensch, T. K. (2005). Critical period plasticity in local cortical circuits. *Nat Rev Neurosci*, 6, 877–888.

- Hockfield, S., Kalb, R. G., Zaremba, S., & Fryer, H. (1990). Expression of neural proteoglycans correlates with the acquisition of mature neuronal properties in the mammalian brain. *CSH Symposia on Quantitative Biology*, 55, 505–514.
- Hooks, B. M., & Chen, C. (2007). Critical periods in the visual system: changing views for a model of experience-dependent plasticity. *Neuron*, 56, 312–326.
- Hubel, D. H., & Wiesel, T. N. (1970). The period of susceptibility to the physiological effects of unilateral eye closure in kittens. *J Physiol*, 206(2): 419–436.
- Hubel, D. H., & Wiesel, T. N. (1998). Early exploration of the visual cortex. *Neuron*, 20, 401–412.
- Jorgensen, O. S., Brooksbank, B. W. & Balazs, R. (1990). Neuronal plasticity and astrocytic reaction in Down syndrome and Alzheimer disease. *J Neurol Sci* 98, 63–79.
- Katz, L. C., & Crowley, J. C. (2002). Development of cortical circuits: Lessons from ocular dominance columns. *Nat Rev Neurosci*, 3, 34–42.
- Kiorpes, Lynne; Kiper, Daniel C.; O'Keefe, Lawrence P.; Cavanaugh, James R.; Movshon, J. A. (1998). Neuronal correlates of amblyopia in the visual cortex of macaque monkeys with experimental strabismus and anisometropia. *J Neurosci*. 18, 6411-24.
- Levelt C. N., Hübener M. (2012). Critical-period plasticity in the visual cortex. *Annu Rev Neurosci.*, 35:309-30.
- Long, M. A. (2005). Abrupt Maturation of a Spike-Synchronizing Mechanism in Neocortex. *J Neuroscience*, 25, 7309–7316.
- Maya-Vetencourt J., Origlia N. (2012). Visual cortex plasticity: a complex interplay of genetic and environmental influences. *Neural Plast.*, 631965.
- 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.

Mcgee, A. W. (2005). Experience-Driven Plasticity of Visual Cortex Limited by Myelin and Nogo Receptor Experience-Driven Plasticity of Visual Cortex Limited by Myelin and Nogo Receptor. *Science*, 309, 2222–2226.

O'Farrell, P. H. (1975). High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J. Biol. Chem.* 250, 4007–4021.

Olson, B. J. S. C. & Markwell, J. (2001). Assays for Determination of Protein Concentration. Current Protocols in Protein Science. John Wiley & Sons, Inc.

Pizzorusso, T., Medini, P., Berardi, N., Chierzi, S., Fawcett, J. W., & 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, 8517-22.

Protein Electrophoresis, Technical Manual, Amersham. 80-6013-88/Rev. B0/12-99  
[http://kirschner.med.harvard.edu/files/protocols/GE\\_proteinelectrophoresis.pdf](http://kirschner.med.harvard.edu/files/protocols/GE_proteinelectrophoresis.pdf)

Prusky, G. T. & Douglas, R. M. (2003). Developmental plasticity of mouse visual acuity. *European Journal of Neuroscience*, 17, 167-173.

Purves, D., Augustine, G., Fitzpatrick, D., Hall, W., Lamatia, A., Mcnamara, J. W. M. (2008). *Neuroscience*. 3<sup>rd</sup> Edition, Sinauer Associates Inc.

Ruiz-Perera, L., Muniz, M., Vierci, G., Bornia, N., Baroncelli, L., Sale, A., & Rossi, F. M. (2015). Fluoxetine increases plasticity and modulates the proteomic profile in the adult mouse visual cortex. *Sci Rep*, 5, 1–14.

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.

Tropea, D., Van Wart, A., & Sur, M. (2009). Molecular mechanisms of experience-dependent plasticity in visual cortex. *Phil Trans Royal Society B: Biological Sciences*, 364, 341–355.

Van Den Bergh, G., & Arckens, L. (2004). Fluorescent two-dimensional difference gel electrophoresis unveils the potential of gel-based proteomics. *Cur Op Biotech*, 15, 38–43.

Van den Bergh, G., Clerens, S., Cnops, L., Vandesande, F., & Arckens, L. (2003). Fluorescent two-dimensional difference gel electrophoresis and mass spectrometry identify age-related protein expression differences for the primary visual cortex of kitten and adult cat. *J Neurochem*, 85, 193–205.

Van Den Bergh, G., Clerens, S., Firestein, B. L., Burnat, K., & Arckens, L. (2006). Development and plasticity-related changes in protein expression patterns in cat visual cortex: A fluorescent two-dimensional difference gel electrophoresis approach. *Proteomics*, 6, 3821–3832.

Wiesel, T. N., & Hubel, D. H. (1963). Responses in Striate Deprived of Vision Cortex of One Eye. *J Neurophysiol*, 26, 1003–1017.