

# Análisis de la expresión de la Cofilina 1 en la corteza visual de ratón

Alfonso Taboada

Laboratorio de Neurociencias  
"Unidad de Neuroplasticidad"  
Facultad de Ciencias, Universidad de la República

Orientador:  
Francesco M. Rossi

Junio 2019



---

## AGRADECIMIENTOS

Quisiera agradecer en primer lugar a mi tutor Francesco por abrirme las puertas y darme la posibilidad de realizar el trabajo de grado en su laboratorio, por la enorme mano que me ha dado en los experimentos y en la redacción de la tesis, por todo lo que he aprendido a lo largo de esta experiencia, y por sobre todas las cosas la infinita paciencia que me tuvo durante el transcurso de esta etapa, dejando en claro no solo su enorme capacidad profesional sino también su gran calidez humana.

En segundo lugar quisiera agradecer a todos mis amigos. Aquellos que siendo ajenos al ámbito académico siempre estuvieron a mi lado y quienes hoy considero mis hermanos, y también aquellos que tuve la inmensa suerte de conocer en facultad y con quienes he compartido todo tipo de momentos y anécdotas a lo largo de la carrera.

También me gustaría agradecer a la gente del piso 4 por los divertidos almuerzos, y especialmente a Daniel, por haberme hecho más ameno muchas de las jornadas de trabajo en el laboratorio con sus charlas y sus consejos.

Muchísimas gracias a Daniella, quien aceptó ser la correctora externa de la tesina y tuvo una enorme predisposición para corregir de forma muy rápida y clara este trabajo.

Gracias a Rafael por haberme incentivado a seguir la carrera de Bioquímica en un momento de gran indecisión vocacional de mi vida.

Gracias también a los integrantes la Unidad de Animales Transgénicos y de Experimentación del Institut Pasteur de Montevideo por haberme brindado todas las muestras experimentales necesarias para poder realizar el trabajo.

Por último, me gustaría agradecer enormemente a mi familia, quienes siempre me dieron para adelante a lo largo de toda la carrera, además de darme una mano enorme en todo lo que precisé. De no ser por ellos, no hubiera sido posible alcanzar este objetivo.

## INDEX

AGRADECIMIENTOS .....	1
INDEX .....	2
LISTA DE ABREVIACIONES.....	4
RESUMEN .....	5
INTRODUCCIÓN.....	6
La corteza visual como modelo experimental de los procesos de plasticidad dependiente de la experiencia.....	7
Mecanismos celulares y moleculares de plasticidad .....	8
Plasticidad estructural .....	9
HIPÓTESIS.....	12
OBJETIVOS GENERALES .....	12
OBJETIVO ESPECÍFICO .....	12
MATERIALES Y METODOS.....	13
Diseño Experimental.....	13
Animales experimentales.....	13
Preparación de muestras.....	14
Extracción proteica .....	14
Cuantificación proteica .....	15
Western Blot .....	15
Electroforesis .....	15
Electrotransferencia.....	16
Bloqueo e incubación con anticuerpos.....	17
Detección de la señal .....	18
Procesamiento de imágenes y obtención de datos.....	20
Análisis estadístico .....	21
RESULTADOS.....	22
Puesta a punto de la metodología de Western Blot.....	22
Experimentos de Western Blot con el anticuerpo anti-Cofilina 1 .....	25
Estudio de la expresión de la Cofilina 1 en la corteza visual durante el desarrollo.....	31
Experimentos con el anticuerpo anti-Fosfo Cofilina 1 y de Multiplex.....	39
Experimentos con el anticuerpo anti-Fosfo Cofilina 1.....	40



Experimentos de Multiplex.....	44
DISCUSIÓN .....	54
Puesta a punto de la técnica experimental .....	54
La expresión de la Cofilina 1 es modulada en la corteza visual del ratón acompañando los distintos niveles de plasticidad cortical durante el desarrollo postnatal.....	55
Conclusión y perspectivas.....	57
BIBLIOGRAFÍA.....	58

## LISTA DE ABREVIACIONES

AD	Adulto
ADF	Factor Depolimerizante de Actina
ANOVA	Análisis de varianza
APS	Persulfato de amonio
BSA	Albúmina de suero bovino
CM	Corteza motora
CV	Corteza visual
DTT	Ditiotreitol
E/I	Excitación/Inhibición
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EtOH	Etanol
H	Hipocampo
HRP	Peroxidasa de rábano
IRDye	Infrared Fluorescent Dyes
LTD	Depresión a largo plazo
LTP	Potenciación a largo plazo
NaF	Fluoruro sódico
NaOH	Hidróxido de sodio
NOV	Ortovanadato de sodio
P(x)	X días de vida postnatal
PBS	Buffer fosfato salino
PBS-T	Buffer fosfato salino con Tween
PC	Período crítico
PMSF	Fluoruro de fenilmetilsulfonilo
PVDF	Polivinildenedifloride
Receptor AMPA	Receptor del ácido $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metilo-4-isoxazolpropiónico
SDS	Dodecilsulfato sódico
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico
TCA	Ácido tricloroacético
Tris	Tris(hidroximetil)aminometano



## RESUMEN

La corteza visual es un modelo experimental paradigmático para caracterizar los procesos de plasticidad dependiente de la experiencia en el sistema nervioso central. No obstante en los últimos años se han investigado varios mecanismos que potencialmente controlan este proceso, los detalles de los mecanismos celulares y moleculares quedan aún poco caracterizados.

Con el fin de profundizar el conocimiento sobre la plasticidad en la corteza visual, en este trabajo se decidió estudiar el rol potencial de la Cofilina 1 en este proceso. La Cofilina 1 es una proteína reguladora de la dinámica de los filamentos de Actina, que ha sido asociada a procesos de plasticidad estructural y funcional en algunas áreas cerebrales.

La hipótesis principal de este trabajo es que la expresión de la Cofilina 1 es modulada durante el desarrollo posnatal en la corteza visual del ratón, y que esta variación acompaña los distintos niveles de plasticidad cortical característicos de las edades analizadas.

Se realizaron varios ensayos de Western Blot en muestras de corteza visual de ratones, con el objetivo de obtener valores de expresión de la Cofilina 1 en cada uno de los individuos.

Se encontró que la Cofilina 1 aumenta su expresión a medida que aumenta la edad del ratón durante las primeras tres semanas de vida, alcanzando su máximo nivel durante el período crítico (entra la tercera y cuarta semana de vida), y decayendo notoriamente en la fase adulta a niveles similares a los expresados en ratones de una semana de vida. Estos resultados sugieren que la expresión de la Cofilina 1 en la corteza visual es modulada según los distintos niveles de plasticidad, reflejando un posible rol regulador de esta proteína en los procesos de plasticidad cortical.

## INTRODUCCIÓN

El cerebro se caracteriza por su habilidad de adaptación a cambios constantes en el ambiente. Las influencias del entorno juegan un rol fundamental en la formación de la arquitectura del sistema nervioso central, y la base de esta adaptabilidad es la formación y el refinamiento de los circuitos neuronales, permitiendo el desarrollo de dicho sistema, el aprendizaje de nuevas habilidades y conocimientos, y la recuperación de lesiones.

Esta capacidad de adaptabilidad estructural y funcional del sistema nervioso influenciada por el entorno que lo rodea es referida como plasticidad dependiente de la experiencia, y cambia durante el transcurso de nuestras vidas (Gordon & Stryker, 1996; van Versendaal et al., 2016).

El marco de tiempo durante el desarrollo en el cual la red neuronal es más sensible a la experiencia, es definido como período crítico, y una vez este período termina, el cerebro es menos afectado por el ambiente que lo rodea (Berardi et al., 2000; Takesian & Hensch, 2013).

Dichos periodos críticos han sido identificados en varios sistemas neuronales, desde los sistemas sensoriales - como el sistema visual - hasta los sistemas cerebrales multimodales - como el lenguaje en humanos (Fig. 1). Mientras un determinado nivel de plasticidad es mantenido a lo largo de la vida, confiriendo así la posibilidad de un aprendizaje continuo, es generalmente aceptado que la sensibilidad a modificaciones inducidas por la experiencia se ve acentuada durante los periodos críticos de plasticidad y disminuye notoriamente con el avance de la edad (Hensch et al., 2004).



**Figura 1: Las tres etapas de sensibilidad al aprendizaje del cerebro humano.** Los períodos críticos en 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 las regiones dedicadas al lenguaje (línea amarilla) y a la cognición superior (línea violeta), los períodos 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).

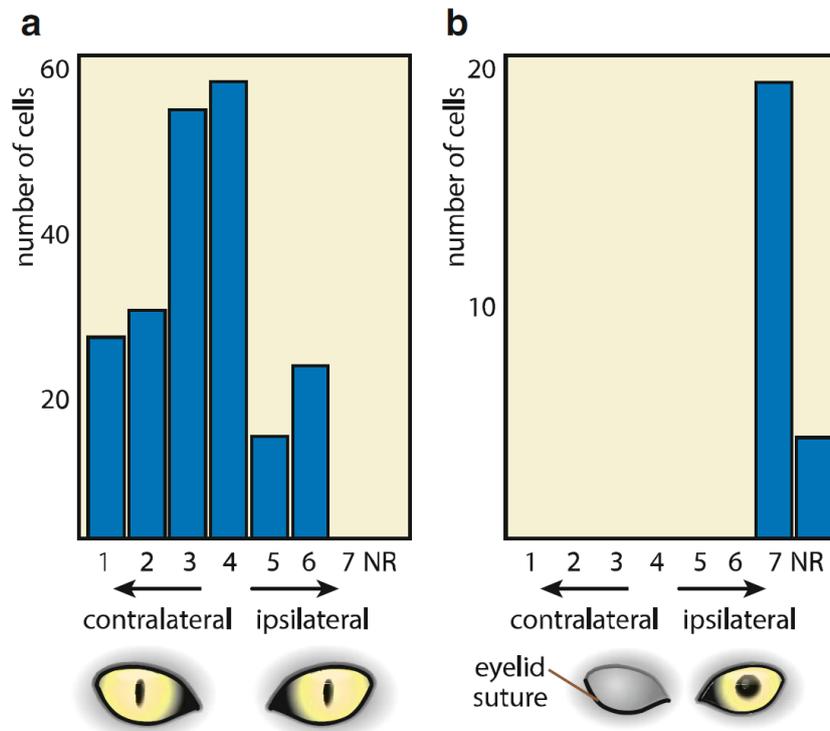
## **La corteza visual como modelo experimental de los procesos de plasticidad dependiente de la experiencia**

La corteza visual ha sido objeto de estudio de la plasticidad dependiente de la experiencia debido a que la entrada visual puede ser fácilmente manipulada y las consecuencias de esta manipulación pueden ser medidas a nivel molecular, anatómico y fisiológico (Tropea et al., 2009).

A pesar de que la maduración de los circuitos del sistema visual comienza antes de la apertura de los ojos y del inicio de la visión (Crowley & Katz 1999; Sur & Rubenstein 2005), el desarrollo apropiado del sistema visual requiere de la experiencia sensorial. De hecho, la ausencia total de entradas sensoriales induce un retraso en la maduración de la corteza visual y afecta también la estructura fina de las neuronas de dicha corteza. Además, el desarrollo normal del proceso parece ser restaurado una vez los animales son re-expuestos a la luz, permitiendo así la recuperación de las propiedades de las respuestas neuronales, tales como la selectividad de la orientación (Buisseret et al., 1982).

Los mecanismos celulares y moleculares subyacentes a los cambios inducidos por la actividad en la función de la corteza visual han sido estudiados mayormente en roedores, debido a la relativa simplicidad de la organización anatómica de este, y a la posibilidad de realizar manipulaciones genéticas.

Una forma clásica de plasticidad usada como modelo para entender cómo la actividad cambia el circuito del cerebro, es la plasticidad de dominancia ocular. En varias especies cada hemicorteza visual (derecha e izquierda) es dominada por el input proveniente del ojo contralateral. Es decir, la mayoría de las células de la corteza visual derecha responden a la estimulación del ojo izquierdo (contralateral), y viceversa. El trabajo innovador de Hubel y Wiesel a principio de los años 60 fue la primera evidencia de modificaciones estructurales y funcionales del sistema visual en respuesta a la privación sensorial. En un set de experimentos en donde se utilizaron gatos y monos, Hubel y Wiesel observaron que la distribución de la dominancia ocular en el área binocular de la corteza visual primaria cambia dramáticamente en respuesta a una sutura del párpado (privación monocular) realizada durante el periodo crítico. El número de células que responden al ojo privado de visión se reduce y el número de neuronas activadas por el ojo abierto incrementa (Fig. 2).



**Figura 2: Histogramas de distribución de la dominancia ocular en la corteza visual de gatos normales y con privación monocular de la visión.** Las células en los grupos de dominancia ocular 1 y 7 son activadas exclusivamente por el ojo contralateral e ipsilateral respectivamente. Células del grupo 2 y 3 muestran una dominancia marcada por el ojo contralateral mientras que las células del grupo 5 y 6 tienen una marcada dominancia ipsilateral. Las células del grupo 4 son activadas por los dos ojos igualmente. **A)** En la corteza visual de gatos criados normalmente, el ojo contralateral conduce la mayoría de las neuronas de la corteza visual. **B)** En gatos sometidos a privación monocular de la visión las células dejan de responder al ojo contralateral y comienza un dominio del ojo ipsilateral. La privación monocular en gatos adultos no altera la distribución de la dominancia ocular en la corteza visual, aunque sí reduce su actividad en general. NR células que no responden (Galizia & Lledo, 2013).

Como consecuencia, el ojo privado se vuelve ambliope, es decir, su agudeza y sensibilidad de contraste quedan notablemente dañadas.

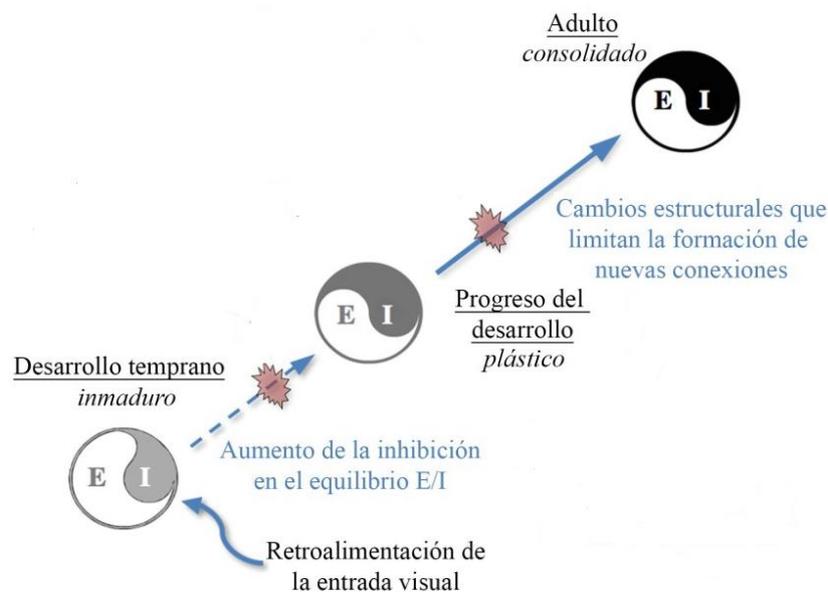
Como la privación monocular no causa ambliopía en la adultez, este período de vida temprana en el cual los circuitos neuronales son altamente susceptibles a la experiencia es un típico ejemplo de un periodo crítico (Wiesel & Hubel, 1963; Wiesel & Hubel, 1965).

### Mecanismos celulares y moleculares de plasticidad

La caracterización de los mecanismos celulares y moleculares que controlan la plasticidad es de gran relevancia, no solo para tratar defectos de la visión, sino también para tratar otras patologías neuronales (Sale et al., 2010). En los últimos años, utilizando la corteza visual como modelo experimental, se han identificado numerosas moléculas y vías de señalización implicadas en el control de la plasticidad (Tropea et al., 2009). Se ha propuesto que los mecanismos que controlan la plasticidad ocurren en una secuencia temporal determinada y son regulados por varios factores, que, a modo de simplificar, se pueden separar en dos grandes grupos: los factores estructurales y los funcionales (Bavelier et al., 2010, Takesian & Hensch, 2013). Por factores estructurales se entienden

varios mecanismos que se relacionan con la maduración de la mielina y la condensación de la matriz extracelular, que limitan el crecimiento de las neuritas, la reorganización y la re-estructuración de las conexiones sinápticas (Stephany et al., 2014).

Los factores funcionales controlan directamente los varios elementos que determinan el tono excitatorio e inhibitorio en los circuitos locales (Hensch & Fagiolini, 2005). Durante el desarrollo del sistema nervioso, primero ocurre la maduración de los circuitos excitatorios y luego de los sistemas inhibitorios (Long et al., 2005). Las sinapsis inhibitorias comienzan a desarrollarse más tardíamente, de modo que se alcanza un primer umbral en el balance excitación/inhibición (E/I) que determina la apertura del período crítico. Luego, los circuitos inhibitorios continúan desarrollándose, y se alcanza un segundo umbral en el balance E/I que determina el cierre del período crítico (Fig. 3). Este equilibrio E/I se mantiene durante la adultez, así como también los bajos niveles de plasticidad una vez finalizado el período crítico (Hensch et al., 1998; Fagiolini & Hensch 2000, Hensch 2005).



**Figura 3: Evolución de la plasticidad a lo largo de la vida representada por los cambios en el balance entre excitación e inhibición (E/I).** Las flechas rectas y finas indican los cambios que participan en el desarrollo del período crítico (Modificado de Bavelier et al. 2010).

Mientras que los aspectos funcionales de la plasticidad cortical han sido ampliamente analizados, las modificaciones estructurales subyacentes siguen poco caracterizadas.

### Plasticidad estructural

En los últimos años, numerosos estudios focalizados en caracterizar los procesos de plasticidad estructural se han centrado en el análisis de los procesos de refinamiento sináptico y más específicamente en la modulación de las espinas dendríticas. Al caracterizar la reorganización de las estructuras neuronales, se ha revelado que las espinas dendríticas son estructuras altamente dinámicas y que cambios en la densidad, morfología y movilidad de estas ocurren en paralelo con

cambios en la actividad neuronal y en la experiencia (Bonhoeffer & Yuste, 2002; Holtmaat & Svoboda, 2009).

Las espinas dendríticas son protuberancias membranosas salientes de la superficie neuronal que consisten de una cabeza de un volumen alrededor de  $0.01-1 \mu\text{m}^3$  conectada a la neurona mediante un cuello fino de un diámetro inferior a los  $0.2 \mu\text{m}$  (Harris & Kater, 1994; Nimchinsky et al., 2002; Zito & Murthy, 2002). Estas se originan principalmente desde las dendritas, aunque también pueden ser encontradas en el soma o en el axón (Yuste & Bonhoeffer, 2001; Nimchinsky et al., 2002; Sobczyk et al., 2005; Verkuyl & Matus, 2006; Tackenberg et al., 2009).

La dinámica de la Actina es un mecanismo clave en la regulación plástica del crecimiento y contracción de las espinas dendríticas que ocurren en los procesos de refinamiento de los circuitos neuronales dependiente de la actividad (Calabrese & Halpain, 2014). El ensamblado y desensamblado de los filamentos de Actina (F-Actina) controlan los cambios morfológicos de las espinas que ocurren en respuesta a la actividad sináptica (Hall, 1998; Lai & Ip, 2013).

Una importante clase de moléculas de señalización que transduce señales extracelulares para la regulación del ensamblaje de la Actina son las Rho GTPasas. Estas son una clase de enzimas de la familia de las pequeñas GTPasas (como RhoA, Rac1 y Cdc42) que cuando se encuentran activadas modulan la elongación de neuritas, la formación de nuevas espinas dendríticas y la ramificación de las dendritas neuronales (Luo et al., 1996; Threadgill et al., 1997; Li et al., 2000; Nakayama & Luo, 2000; Tashiro et al., 2000; Sin et al., 2002; Govek et al., 2004). Entre los efectores de las Rho GTPasas, se encuentran las proteínas depolimerizantes de la Actina de la familia ADF/Cofilina. Hoy sabemos que existen tres formas distintas de Cofilina en mamíferos, la Cofilina 1 (non muscular o n-cofilina), la Cofilina 2 (muscular o m-cofilina), y la ADF (factor depolimerizante de la Actina o Dextrina). La Cofilina 1 ha sido aislada e identificada en los años 80 como una proteína de un peso molecular de 19 kDa aproximadamente, con actividad depolimerizante de los filamentos de Actina (Bamburg et al., 1980; Maekawa et al., 1983). Varios estudios realizados para identificar la expresión del ARN y de la forma proteica de la Cofilina 1 han demostrado que esta es particularmente abundante en el cerebro, más específicamente en la corteza, hipocampo, cerebelo y estriado (Racz & Weinberg, 2006; Bellenchi et al., 2007; Rust et al., 2010; Gorlich et al., 2011).

Varios estudios han revelado que la Cofilina 1 actúa como un regulador bidireccional de la plasticidad estructural en las espinas dendríticas (Rust, 2015). Esto significa que es crucial tanto para la extensión de las espinas dendríticas como para su contracción. Más específicamente, se ha observado que la Cofilina 1 promueve el ensamblaje de la F-Actina durante la fase inicial de la potenciación a largo plazo (LTP) lo cual es crucial para la extensión de las espinas (Bosch et al., 2014), mientras que también puede promover el desensamblaje de la F-actina durante la depresión a largo plazo (LTD) lo cual es crucial para la contracción de las espinas (Zhou et al., 2004; Hotulainen et al., 2009; Gu et al., 2010; Rust et al., 2010).

La fosforilación y defosforilación de la Cofilina 1 en uno de sus residuos de Serina en la posición 3 cerca del N terminal regula su actividad (Abe et al., 1996). A partir de varios trabajos, se ha propuesto un modelo en donde el ensamblaje de la F-Actina resulta a partir de la inactivación de la Cofilina 1 mediante fosforilación, mientras que el desensamblaje de la F-actina es promovido por la reactivación de la Cofilina mediante defosforilación (Matsuzaki et al., 2004; Nagerl et al., 2004; Okamoto et al., 2004; Zhou et al., 2004; Chen et al., 2007).

Sin embargo, cabe destacar que varios estudios recientes sugieren que, a diferencia de este modelo descrito anteriormente en donde la activación de la Cofilina 1 induce la contracción de las espinas y la inactivación induce la extensión de las mismas, el rol regulador de la Cofilina 1 es un proceso muy complejo y no se podría asociar tan simplemente la forma activa/inactiva de la Cofilina 1 a un estado de contracción/extensión de las espinas dendríticas. Únicamente, se podría asumir que la inactivación de la Cofilina 1 mediante fosforilación impide su unión a la Actina (Bosch et al., 2014; Calabrese et al., 2014; Bernstein & Bamburg, 2010). De hecho, varios estudios indican que esta doble función de la Cofilina 1 para inducir la contracción o extensión de las espinas dendríticas, depende, entre otras cosas, de la relación Cofilina 1/Actina presente en las espinas. Mientras que una alta relación Cofilina 1/Actina promueve el ensamblado de F-actina (y una consecuente extensión de la espina) y eventualmente una estabilización de filamentos preexistentes de F-actina, una baja relación de Cofilina 1/Actina promueve el desensamblaje de la F-actina (y la consecuente contracción de la espina) (Rust, 2015).

Las enzimas protagonistas en esta vía regulatoria son la quinasa LIMK-1, encargada de fosforilar el residuo Ser3 de la Cofilina 1 (Gray et al., 2006), y las fosfatasa SSHs, encargadas de defosforilar dicho residuo (Niwa et al., 2002; Ohta et al., 2003). Estas enzimas juegan un rol fundamental en la reorganización del citoesqueleto de Actina y en una diversidad de actividades celulares relacionadas con la dinámica de la Actina (Mizuno, 2013).

Además de su rol regulador en la plasticidad estructural, la Cofilina 1 también controla la plasticidad funcional. Estudios recientes han sugerido que la Cofilina 1 facilita la difusión de los receptores AMPA (ácido  $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolepropionico) a través del citoesqueleto de Actina, depolimerizando los filamentos de F-actina (Rust et al., 2010). Esto hace que estos receptores se muevan hasta la superficie postsináptica durante la LTP, provocando un alargamiento de las espinas dendríticas (Rust et al., 2010).

Recientemente se ha realizado un estudio para caracterizar los mecanismos de plasticidad en la corteza somato-sensorial del ratón, un modelo relativamente similar al modelo de la corteza visual utilizado en este proyecto. Los autores, modulando experimentalmente la expresión de la Cofilina 1 in vivo, han demostrado que esta proteína participa en el control de un tipo específico de plasticidad en esta área (plasticidad trans-columnar) a través de la reorganización estructural de las espinas dendríticas (Tsubota et al., 2015). Con respecto a la corteza visual, existe un único estudio en el cual se puede vincular a la Cofilina 1 con procesos de plasticidad. En este, los autores han demostrado que la estimulación farmacológica de la activación de las Rho GTPasas in vivo restaura las capacidades plásticas funcionales en la corteza visual de roedores adultos, mediante una reorganización estructural (Cerri et al., 2011). Estos hallazgos han indicado una relación directa entre la plasticidad estructural y la plasticidad funcional en la corteza visual y han demostrado el rol fundamental de la dinámica de la Actina y de las Rho GTPasas posiblemente a través de una modulación de la Cofilina 1 (Cerri et al., 2014).

## **HIPÓTESIS**

Varias evidencias recientes indican que la Cofilina 1 es un factor regulador importante que controla aspectos estructurales y funcionales de la plasticidad sináptica en algunas áreas cerebrales (Rust et al., 2010; Wang et al., 2013).

La principal hipótesis en este trabajo es que la expresión de la Cofilina 1 en la corteza visual de ratón varía durante el desarrollo posnatal, y que su modulación acompaña los distintos niveles de plasticidad característicos de cada edad.

## **OBJETIVOS GENERALES**

Para contribuir a la caracterización de los mecanismos celulares y moleculares de plasticidad en el sistema nervioso, se propone investigar qué rol juega la Cofilina 1 en los procesos de plasticidad utilizando la corteza visual de ratón como modelo experimental.

## **OBJETIVO ESPECÍFICO**

El objetivo específico es caracterizar la expresión de la Cofilina 1 y Fosfo-Cofilina 1 en la corteza visual del ratón durante el desarrollo posnatal en función de la edad de los individuos y relacionarla con los diferentes niveles de plasticidad.

Para esto es necesario:

En primer lugar familiarizarse con el funcionamiento general de un laboratorio de investigación, aprendiendo metodologías básicas y también poniendo a punto las técnicas de Western Blot y Multiplex, necesarias para llevar a cabo los experimentos durante el desarrollo del trabajo.

En segundo lugar obtener información semi-cuantitativa de los niveles de expresión de la Cofilina 1 y de la Fosfo-Cofilina 1 en la corteza visual de animales experimentales a lo largo del desarrollo posnatal.



## MATERIALES Y METODOS

### Diseño Experimental

Para el diseño experimental, se utilizaron muestras de de corteza visual de ratones de distintas etapas del desarrollo postnatal; ratones jóvenes de 7 días de vida postnatal (P7), edad previa al período crítico y a la apertura de los ojos; ratones de 15 días de vida postnatal (P15), edad previa al período crítico y en la cual se produce la apertura de los ojos; ratones de 28 días de vida postnatal (P28), edad donde el periodo crítico de plasticidad (PC) alcanza su máxima expresión; y ratones adultos con 50 días de vida postnatal (P50), edad caracterizada por un nivel de plasticidad reducido (AD).

Se obtuvieron extractos proteicos totales de cada una de las muestras de corteza visual para luego, mediante la técnica de Western Blot, revelar las proteínas de interés incubando las membranas con los anticuerpos correspondientes. Las proteínas a revelar fueron Cofilina 1, Fosfo-Cofilina 1, y Tubulina o Actina como proteínas housekeeping.

Se evaluaron los distintos niveles de Cofilina 1 en cada muestra con el fin de caracterizar la expresión de esta proteína y también los niveles de Fosfo-Cofilina 1 con el fin de no solo obtener su nivel de expresión sino también poder obtener un índice de activación/inactivación de la misma.

**Tabla 1: Elección de animales experimentales.**

Edad animales	Procesos fisiológicos	Periodo crítico de plasticidad
P7	Pico de la sinaptogénesis	Previo al período crítico
P15	Apertura de los ojos	
P28	Pico máximo de plasticidad	Período crítico
P50	Niveles mínimos de plasticidad	Posterior al periodo crítico

### Animales experimentales

Como modelo de estudio se utilizaron ratones *Mus musculus* de la cepa C57B6/J de entre 25 y 30 gramos de peso corporal. Los animales fueron mantenidos en condiciones estándar de temperatura (20°C aprox.), humedad (aproximadamente 40-60%) y ciclo de luz/oscuridad 14/10 horas respectivamente en el bioterio de la Unidad de Animales Transgénicos y de Experimentación (UATE) del Institut Pasteur de Montevideo. Se utilizaron ratones jóvenes de 7 días de vida posnatal (P7), 14 (P14), 28 (P28), y 50 (P50). Los animales se sacrificaron por dislocación cervical, los tejidos cerebrales de interés fueron disecados y almacenados a -80°C para su posterior análisis. La manipulación de los animales experimentales fue realizada por el Dr. Francesco M. Rossi y los protocolos utilizados fueron avalados por el Comité de Ética de la Comisión Honoraria de Experimentación Animal (CHEA, Facultad de Ciencias, UdelaR), el Comité de Ética en el Uso de Animales (CEUA, Institut Pasteur de Montevideo), y la Comisión Nacional de Experimentación Animal (CNEA).

## **Preparación de muestras**

Inmediatamente luego de la dislocación cervical de los animales, se procedió a la disección del cerebro colocándolo en PBS 1X (buffer fosfato salino) previamente enfriado a 4°C. Bajo un microscopio estereoscópico se disecaron distintas regiones del cerebro (corteza visual, corteza parietal, hipocampo) y se congelaron inmediatamente en nitrógeno líquido. Las muestras fueron conservadas a -80°C para su posterior utilización.

## **Extracción proteica**

Las muestras fueron homogeneizadas mecánicamente en 150 µL de Buffer de Lisis (Tris pH 7,5 50 mM; EDTA pH 8,0 0,1 mM; Tritón 1%; glicerol 10%; NaF 0,1 M; NOV 2 mM; PMSF 0,1 mM; en una segunda fase se agregó DTT 50 mM; pirofosfato de sodio 2,5 mM; beta-glicerol fosfato de sodio 50 mM) e incubadas 30 minutos a 4°C. Se procedió a centrifugar el lisado obtenido a 13000 g por 30 minutos a 4°C, se descartaron los pellets para eliminar cualquier resto celular, y se procedió a una segunda centrifugación a 13000 g por 30 minutos a 4°C. Finalmente se separó una alícuota de 15 µL del sobrenadante obtenido para la estimación de la concentración proteica, y al remanente se le agregó Loading Buffer 4X (SDS 8%; Tris pH 6,8 0,25 M; glicerol 40%; beta-mercaptoetanol 20%; azul de bromofenol 0,01%), y se almacenó a -20°C hasta el momento de su utilización.



## Cuantificación proteica

La estimación de la concentración proteica se realizó utilizando el método de Bradford en placa de 96 pocillos, midiendo la absorbancia a  $\lambda=595-600$  nm (Olson & Markwell, 2001). La concentración proteica de las muestras es estimada a través de la extrapolación de una curva de calibración utilizando albúmina de suero bovino (BSA).

## Western Blot

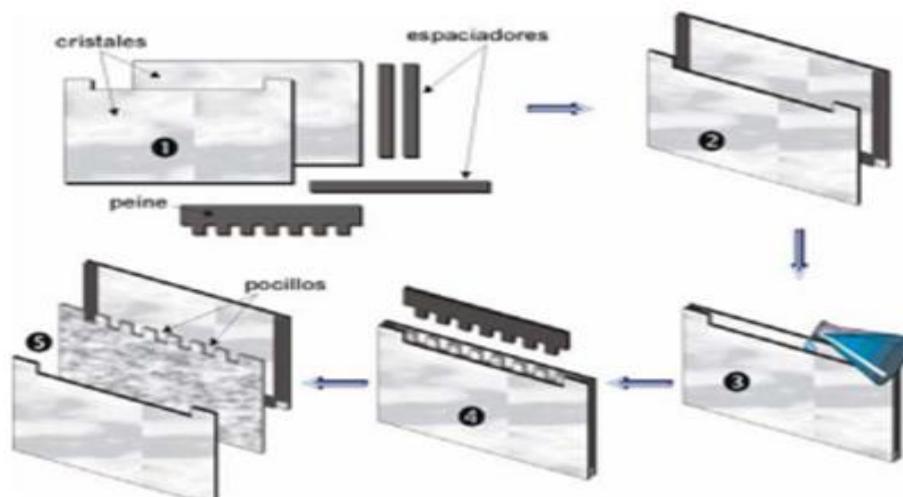
El Western Blot o *Inmunoblotting* (debido a que se utilizan anticuerpos para detectar el antígeno o los antígenos específicos de interés) es una técnica analítica utilizada para detectar proteínas específicas en una muestra determinada. La especificidad de la unión antígeno-anticuerpo permite la detección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

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

Mediante la electroforesis en gel se separan las proteínas de acuerdo a su peso molecular. Luego son transferidas a una membrana absorbente y de esta forma es posible identificar las proteínas de interés con anticuerpos específicos contra ellas.

## Electroforesis

Las proteínas de las muestras fueron separadas por medio de electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE), utilizando un gel de corrida al 15% (Acrilamida 15%; Tris pH 8,8 0,375 M; SDS 0,10%; Temed 0,05%; APS 0,05%) y un gel de concentración al 4% (acrilamida 4%; Tris pH 6,8 0,125 M; SDS 0,10%; Temed 0,05%; APS 0,05%). El SDS desnaturaliza las proteínas y facilita el desplegamiento de las mismas eliminando sus estructuras secundarias y terciarias características de su funcionalidad biológica. A su vez, las moléculas de SDS proporcionan una carga negativa, por lo que los complejos SDS-proteína están cargados negativamente en forma uniforme. Esto provoca que la mayoría de las proteínas adquiera una relación carga/masa idéntica, de modo que la estructura tridimensional de las proteínas no influye en la electroforesis, pudiéndose asumir que la distancia de migración en el gel está vinculada exclusivamente al tamaño de la proteína desplegada.



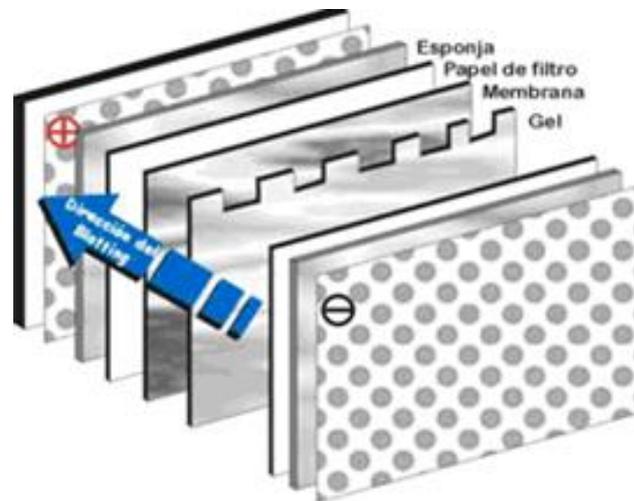
**Figura 4: Representación esquemática de los pasos de armado de un gel.** Con la ayuda de espaciadores de 1 mm de espesor, se separan dos vidrios que son montados en un soporte. En el espacio que queda entre éstos, se vierte la solución de acrilamida: primero la solución del gel de corrida, se espera aproximadamente 15 minutos y una vez que está polimerizada se agrega la solución del gel de concentración. Rápidamente, sobre la superficie superior se coloca un peine que permite la formación de los pocillos. Se deja reposar el gel hasta que esté completamente polimerizado (Vierci, 2012).

Una vez polimerizado el gel, se procedió a ensamblar el equipo de electroforesis llenando la cubeta con buffer de corrida para SDS-PAGE (Tris 0,025 M; glicina 0,192 M; SDS 0,10%) y luego se realizó una pre-corrída a 80 V durante 15 minutos (Fig. 4). Para poder comparar señales obtenidas con el mismo anticuerpo en diferentes muestras, en los geles se cargó la misma cantidad proteica para cada muestra, y en un pocillo se cargaron 2  $\mu$ L de marcador de peso molecular (PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder, 10 to 250 kDa, ThermoFisher Scientific). Se realizó la corrida a 120 V hasta que el azul de bromofenol alcanzó el gel de corrida (15 minutos aproximadamente), y luego se subió el voltaje a 160 V hasta que el azul de bromofenol alcanzó al borde inferior del gel (1 hora aproximadamente).

## Electrotransferencia

Para que las proteínas sean accesibles a la detección por anticuerpos, estas se transfirieron a una membrana que pudo ser tanto de nitrocelulosa como de fluoruro de polivinilideno (PVDF) (Amersham o BioRad, 0,2  $\mu$ m). En el caso de las membranas de PVDF, estas se preincubaron 15 segundos en EtOH 100% antes de utilizarlas. Para esto, una vez finalizada la electroforesis, se desmontó el equipo, y los geles con las proteínas separadas por peso molecular se equilibraron en el buffer de transferencia (Tris 0,025 M; glicina 0,192 M; EtOH 20%) junto con la membrana durante 15 minutos a 4°C. Luego, se procedió al armado del “sándwich” conformado por: una esponja delgada, papel de filtro, el gel, la membrana, otro papel de filtro y otra esponja delgada, del polo negativo (cátodo) al polo positivo (ánodo). Se cerró el “sándwich” cuidando que todos los elementos estuvieran bien sumergidos en el buffer de transferencia, evitando siempre la formación de burbujas (Fig. 5). Luego se colocó el “sándwich” en la cubeta de transferencia llena de buffer de transferencia frío (Tris 0,025 M; glicina 0,192 M; EtOH 20%) y se aplicó una corriente de 100 V durante 2 horas. Para evitar el aumento de temperatura generado por la corriente eléctrica, el sistema se refrigeró

con un bloque de hielo (el cual se cambió al cabo de una hora) y el buffer se mantuvo en agitación con un agitador magnético. A través de este procedimiento, las proteínas en el gel se desplazan hacia el polo positivo quedando fuertemente adheridas a la membrana. Por lo tanto, la membrana resultante es una copia exacta del patrón de proteínas que se tenía en el gel de poliacrilamida.



**Figura 5:** Representación esquemática del “sándwich” para la transferencia (Vierci, 2012).

Una vez finalizada la electrotransferencia, se desarmó el “sándwich” y el gel fue teñido con Azul Brillante de Coomassie (Coomassie Blue 0,10%; etanol 30%; ácido acético 10%) para corroborar que la mayoría de las proteínas se hayan transferido. Por otro lado, la membrana se tiñó en forma reversible con Rojo de Ponceau (Rojo Ponceau S 0,2%; TCA 3%) por 5 minutos para comprobar la eficacia de la transferencia. Antes de proceder a la incubación con los anticuerpos, las membranas se lavaron con PBS hasta retirar la marca del Rojo Ponceau.

### **Bloqueo e incubación con anticuerpos**

Antes de proceder a la incubación con los anticuerpos primarios y secundarios (ver Tabla 2) se realiza el bloqueo de la membrana. Este paso es necesario para facilitar la interacción específica entre los anticuerpos y los epítopes de las proteínas de interés y evitar que éstos se unan de manera inespecífica a la membrana y al conjunto de proteínas. Para esto, se realizó un bloqueo de la membrana con leche descremada en polvo al 5% en PBS-T (Tween-20 0,1% en PBS) durante una hora a temperatura ambiente con agitación. En otros casos se utilizó BSA al 5% en PBS-T. Luego de retirar la solución de bloqueo, las membranas se incubaron overnight a 4°C con los anticuerpos primarios que son los que van a reconocer a las proteínas de interés. Tras la incubación con los anticuerpos primarios, se realizaron tres lavados con PBS-T de 10 minutos cada uno en agitación para retirar los anticuerpos que no se unieron a la proteína de interés en la membrana. Seguidamente, las membranas se incubaron con el anticuerpo secundario correspondiente durante una hora a temperatura ambiente en agitación suave. Luego se realizaron dos lavados con PBS-T y uno con PBS para eliminar el exceso de anticuerpo.

**Tabla 2. Anticuerpos primarios y secundarios utilizados en la puesta a punto y en el análisis de las muestras por Western Blot.**

<b>Anticuerpo primario</b>	<b>PM kDa</b>	<b>Marca y número</b>	<b>Concentración</b>
Mouse Cofilin 1*	18	Abcam #54532	1:1000
Rabbit Cofilin (phospho S3)*	19	Abcam #12866	1:1000
Rabbit Phospho Cofilin (S3) 77G2	19	Cell Signaling #3313	1:500/1000
Rabbit vesicular glutamate transporter 1	62	Synaptic System #135303	1:10000
Mouse beta III Tubulin TU20	51	Abcam #7751	1:2000
Rabbit Pan-Actin (D18C11)	45	Cell Signaling #8456	1:1000/1500

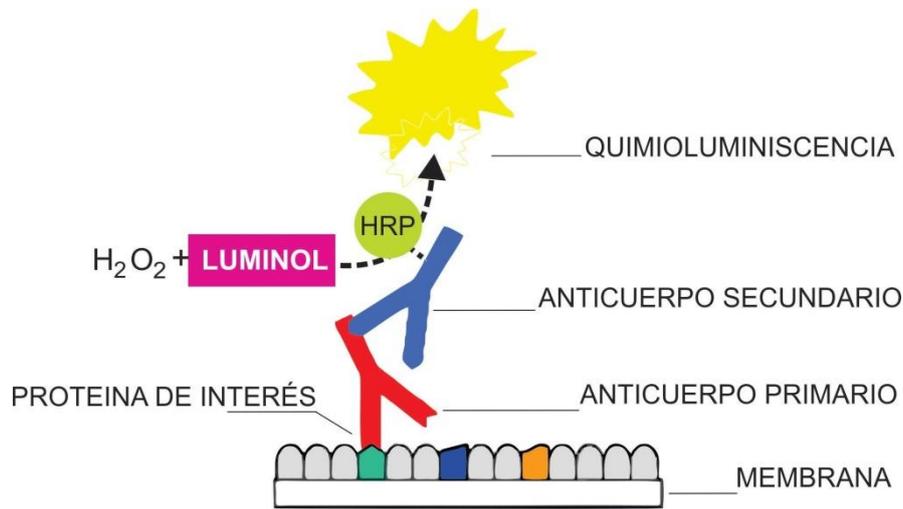
\* se adquirieron dos alícuotas de este anticuerpo denominadas #1 y #2 respectivamente.

<b>Anticuerpo secundario</b>	<b>Conjugado</b>	<b>Marca y código</b>	<b>Concentración</b>
Anti-mouse IgG	HRP-linked	Cell Signaling #7076	1:5000
Anti-rabbit IgG	HRP-linked	Sigma #A0545	1:5000
Goat anti-mouse IgG	Alexa Fluor 680	Invitrogen #A21058	1:5000 - 1:10000
Donkey anti-rabbit IgG	IRDye 800CW	LI-COR #926-32213	1:10000
Goat anti-mouse IgG	IRDye 800CW	LI-COR #926-32210	1:2500 – 1:5000
Goat anti-rabbit IgG	IRDye 680RD	LI-COR #926-68071	1:5000
Goat anti-mouse IgG <sup>&amp;</sup>	IRDye 680RD	LI-COR #926-68070	

<sup>&</sup>este anticuerpo se utilizó solo en ensayos de Dot Blot.

## **Detección de la señal**

Para la detección de la señal de los anticuerpos secundarios conjugados a la peroxidasa de rábano (HRP, “horse-radish peroxidase”), se utilizó una solución de revelado (SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate, Thermo Scientific o Clarity Western ECL Substrate, BioRad) en la cual se mezclan partes iguales de la solución estable de peróxido de hidrógeno y de la solución de luminol. La enzima conjugada al anticuerpo es capaz de generar un producto quimioluminiscente a partir de su interacción con el sustrato (luminol) y el peróxido de hidrógeno (Fig. 6).



**Figura 6: Representación esquemática del proceso de detección por la técnica de quimioluminiscencia.** La proteína de interés en la membrana es reconocida por un anticuerpo primario específico contra ella. A su vez, éste es reconocido por un anticuerpo secundario conjugado a la HRP (peroxidasa). El sustrato (luminol) reacciona con la misma y con el peróxido de hidrógeno, emitiendo un producto quimioluminiscente (modificado de Vierci, 2012).

Las membranas se incubaron cinco minutos con dicha solución y luego se procedió a la obtención de imágenes utilizando el sistema de detección GBOX Chemi XT4 (Camara CCD 16bits 4.2MP Synoptic, GeneSys software versión 1.3.3.0, Database versión 1.69, Syngene). Para ello, se colocaron las membranas en el GBOX y se procedió a configurar el equipo con los siguientes parámetros: *Autocapture; Sample format: Blot; Blot type: Chemi; Capture method: Series; Reagent: ChemiFast; Visible Marker; No binning; No filter, exposición de 1 minuto*, tomando fotos durante 5 minutos. Las imágenes obtenidas se guardaron en el formato JPEG 8 bit.

Para la detección de la señal de los anticuerpos conjugados a fluoróforos, luego de los lavados, las membranas se colocaron directamente en el sistema de detección GBOX Chemi XT4 y se procedió a configurar el equipo utilizando el parámetro: *Manual Capture; No binning*, modificando el tiempo de exposición, iluminación y filtro de acuerdo al fluoróforo en uso. Para los fluoróforos con emisión alrededor de 680 nm se utilizó una iluminación con led rojo y el filtro 705; para los fluoróforos con emisión alrededor de 800 nm se utilizó una iluminación con lámpara de infrarrojo IR740 MOD y el filtro LY800.

Para poder obtener datos significativos en los experimentos de Western Blot, es necesario verificar que las diferencias observadas entre las muestras experimentales se deben exclusivamente a una modificación en su nivel de expresión y no a errores en la carga proteica o en la electrotransferencia. Para esto, clásicamente se normaliza la señal obtenida con el anticuerpo de interés a la señal obtenida con un anticuerpo contra una proteína “housekeeping”. Estas son proteínas que presentan una expresión promedio consistente y abundante en los tejidos analizados.

Con la finalidad de poder identificar más de un tipo de proteína en la misma membrana, en algunos casos se utilizó el proceso de “stripping”, que se basa en la remoción de los anticuerpos primarios y secundarios de la membrana a partir de la incubación con una solución básica. Una vez revelada la señal obtenida con el primer anticuerpo primario, se colocaron las membranas en NaOH

0,2 M durante 5 minutos. Posteriormente se volvieron a bloquear las membranas y a incubarlas con otros anticuerpos primarios de interés.

En otros casos, luego de la electrotransferencia se recortaron las membranas en dos partes, una superior y una inferior, que se incubaron con anticuerpos distintos que reconocen proteínas de peso molecular diferentes.

Otra estrategia que se implementó es la técnica del Multiplex, que consiste en incubar la membrana con dos anticuerpos de forma simultánea que son revelados de modo diferencial utilizando anticuerpos secundarios fluorescentes con distintas frecuencia de emisión.

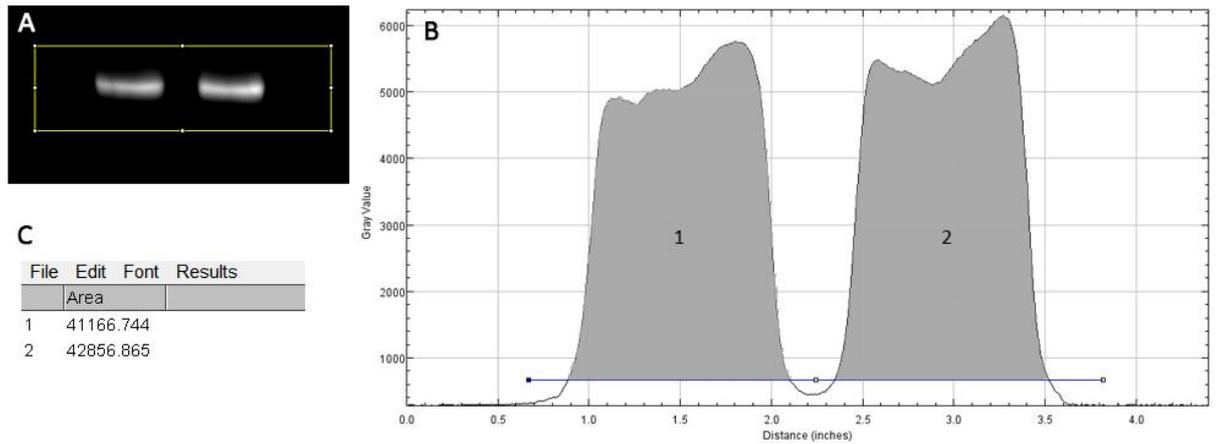
## **Procesamiento de imágenes y obtención de datos**

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

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

Si las bandas en la imagen seleccionada no estaban de forma horizontal, con el programa ImageJ 1.50b se rotó la imagen utilizando la herramienta *Image/Transform/Rotate*. Luego con la herramienta *Rectangular Tool* se seleccionó una forma rectangular que incluya a todas las bandas de interés. Con *Analyse/Gels/Select First Lane* se seleccionó el área dentro de ese rectángulo y con *Analyse/Gels/Plot Lanes* se analizó la señal dentro del mismo. Como resultado se obtuvo una gráfica en donde se representa el nivel de grises a lo largo del rectángulo seleccionado.

Luego se trazó una recta que permite separar la señal de fondo de los picos correspondientes a las bandas de interés. Una vez seleccionados los picos con la herramienta *Wand tool*, se obtiene el valor numérico del área debajo de la curva de cada pico en unidades arbitrarias (densidad óptica integral) (Figura7). Estos valores son transferidos a una tabla Excel para el análisis estadístico.



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

Para poder comparar señales de diferentes muestras experimentales obtenidas en diferentes experimentos de Western Blot, los valores del área bajo la curva de cada pico en unidades arbitrarias correspondientes a la señal obtenida con los anticuerpos primarios de interés (principalmente anti-Cofilina 1) fueron normalizados a los valores correspondientes a la señal obtenida en la misma muestra con anticuerpos primarios contra proteínas “house keeping” clásicamente utilizados con este fin (anticuerpos contra Tubulina o contra Actina).

### Análisis estadístico

Para el análisis estadístico se utilizó el programa Past 2.14 de análisis libre (Hammer et al., 2001). Los valores normalizados de Cofilina 1 obtenidos en las muestras experimentales (P7, P15, PC, AD) en los varios experimentos se compararon utilizando el test one-way ANOVA con post-hoc Tukey’s test y límite de significatividad  $p < 0,05$ . En los gráficos las barras expresan el promedio  $\pm$  SEM.

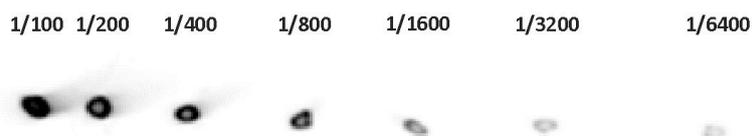
## RESULTADOS

### Puesta a punto de la metodología de Western Blot

Al comienzo de la pasantía se comenzó por adquirir nociones básicas de laboratorio con el objetivo de familiarizarse con las técnicas metodológicas a realizar, entre las que se encuentran el preparado de soluciones, extracción de tejidos cerebrales, medida de concentración proteica, Dot Blot, separación proteica mediante electroforesis, Western Blot, y coloración tanto de geles como de membranas.

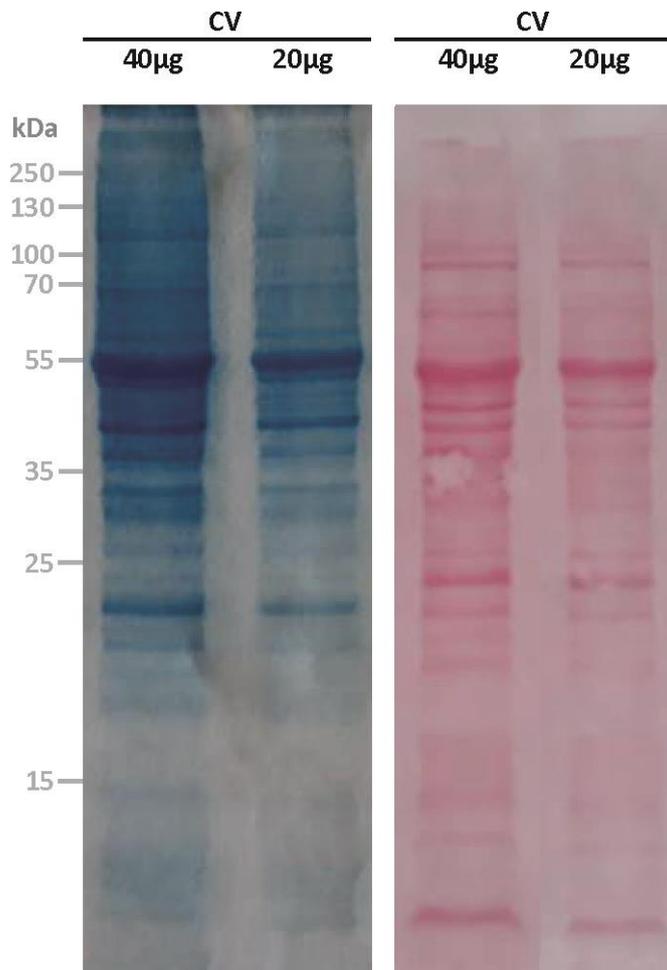
Uno de los primeros experimentos realizados consistió en probar, mediante la técnica de Dot Blot, la funcionalidad del anticuerpo secundario anti-rabbit HRP (anticuerpo importante en futuros experimentos). Esta metodología consiste en colocar, directamente sobre la membrana, un determinado volumen de una misma muestra a distintas concentraciones. En este caso se sembró 1  $\mu$ L de varias diluciones en agua del anticuerpo a probar (1/100, 1/200, 1/400, 1/800, 1/1600, 1/3200, 1/6400) sobre una membrana de PVDF, y una vez que la solución se secó, se procedió al revelado de la señal utilizando la solución de revelado.

Como se puede observar en la Figura 8, se detectó una señal en todos los puntos donde se sembraron las diluciones, que decae a medida que la dilución aumenta, concluyendo que el anticuerpo secundario anti-rabbit HRP mantiene su funcionalidad.



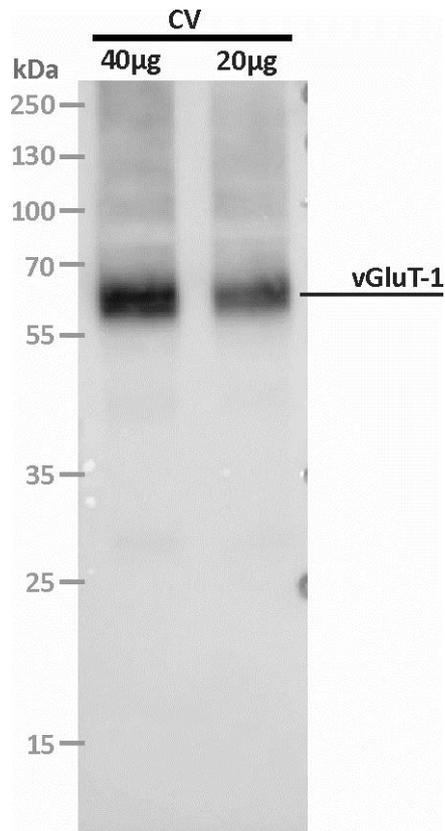
**Figura 8: Verificación de la funcionalidad del anticuerpo secundario anti-rabbit HRP por Dot Blot.** Revelado por luminiscencia de la membrana de PVDF con diluciones seriales en agua del anticuerpo anti-rabbit HRP (1/100, 1/200, 1/400, 1/800, 1/1600, 1/3200, 1/6400).

Otro ensayo que se realizó fue el de llevar a cabo un experimento de Western Blot completo. Para esto, se preparó un gel de poliacrilamida al 15% y se cargaron 20 y 40  $\mu$ g de una muestra de corteza visual de ratón adulto. Luego de la electrotransferencia, se tiñó el gel con Azul de Coomassie y la membrana con Rojo Ponceau para comprobar la eficiencia de la electrotransferencia. Como se puede ver en la Figura 9, luego de la transferencia, se observan en el gel pocas bandas proteicas de alto peso molecular, dado que las proteínas de bajo peso molecular se transfieren más rápidamente y con más eficiencia. En la membrana, luego de la coloración con Ponceau, se pueden observar varias bandas proteicas bien separadas, de distintos pesos moleculares, confirmando la eficiencia de la electrotransferencia. Además, la coloración en el carril cargado con 40  $\mu$ g es mayor que la coloración del otro carril, confirmando la proporcionalidad entre la cantidad de muestra cargada y la intensidad de la coloración (Fig. 9).



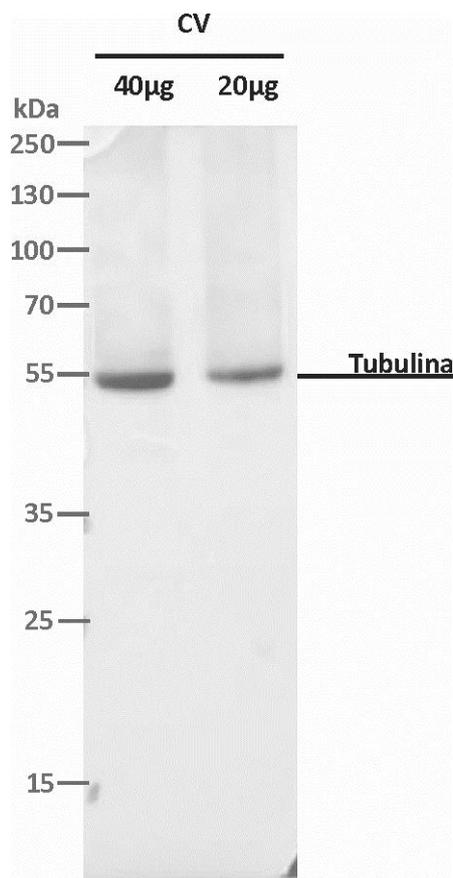
**Figura 9: Evidencia de una corrida electroforética y una transferencia exitosas.** En la imagen de la izquierda se observa el gel coloreado con Azul de Coomassie. Mientras que en la imagen de la derecha se aprecia la membrana coloreada con Rojo Ponceau, CV, corteza visual; kDa, Kilodalton.

Una vez verificada la eficiencia de la electrotransferencia, se procedió a incubar la membrana con la solución de bloqueo (leche en polvo al 5%), y luego con el anticuerpo anti-vGluT-1 1:10000, un anticuerpo ya utilizado en el laboratorio, cuya funcionalidad ha sido comprobada en experimentos previos (Vierci et al., 2016). Luego del revelado, se puede observar una única banda del peso molecular esperado (62 kDa), cuya intensidad óptica es proporcional a la cantidad de muestra cargada (Fig.10).



**Figura 10: Detección de señal de vGluT-1.** Se cargaron 40 y 20 µg de muestras de corteza visual en el carril de la izquierda y derecha respectivamente. La membrana fue incubada con anticuerpo primario anti-vGluT-1 1:10000 y posteriormente incubada con anticuerpo secundario anti-rabbit-HRP 1:5000. CV, corteza visual; kDa, Kilodalton.

También se decidió verificar la funcionalidad del “stripping”, lavando la membrana con NaOH 0,2 M 5 minutos, y, luego del bloqueo, incubándola con el anticuerpo anti-Tubulina 1:2000. Como se observa en la Figura 11, hay una clara señal de una única banda del peso molecular esperado (55 kDa) en ambos carriles de la membrana, cuya intensidad óptica es proporcional a la cantidad de muestra cargada.



**Figura 11: Correcto funcionamiento del “stripping”.** El “stripping” de la membrana se realizó incubando la misma por 5 minutos en NaOH 0,2M, luego se incubó con anticuerpo primario anti-Tubulina 1:2000 y posteriormente con anticuerpo secundario anti-mouse-HRP 1:5000. CV, corteza visual; kDa, Kilodalton.

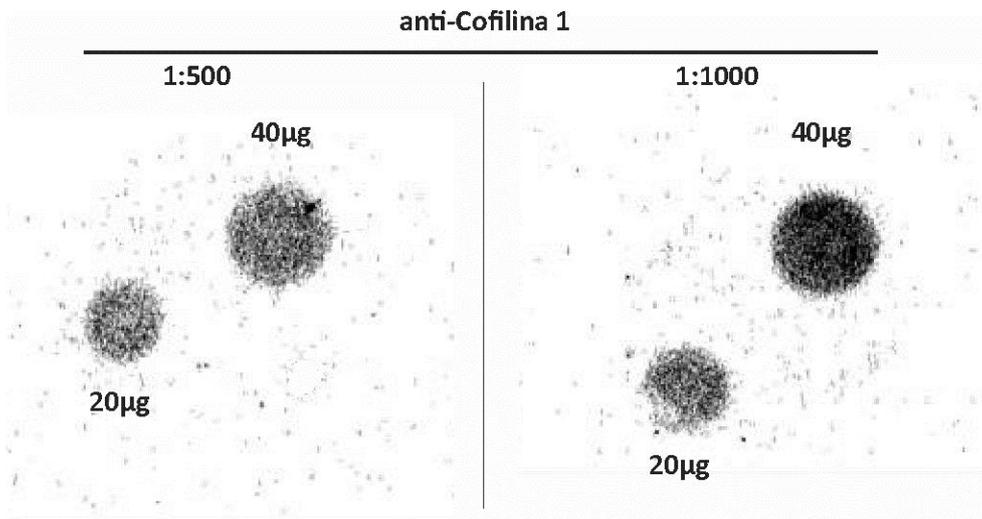
A partir de los resultados obtenidos, se pudo comprobar la exitosa realización en el laboratorio de todos los pasos de la metodología de Western Blot.

### Experimentos de Western Blot con el anticuerpo anti-Cofilina 1

Ya habiéndose familiarizado con las técnicas metodológicas descritas, y habiendo adquirido nociones básicas de trabajo en el laboratorio, se procedió a probar la funcionalidad del anticuerpo primario anti-Cofilina 1 (#1).

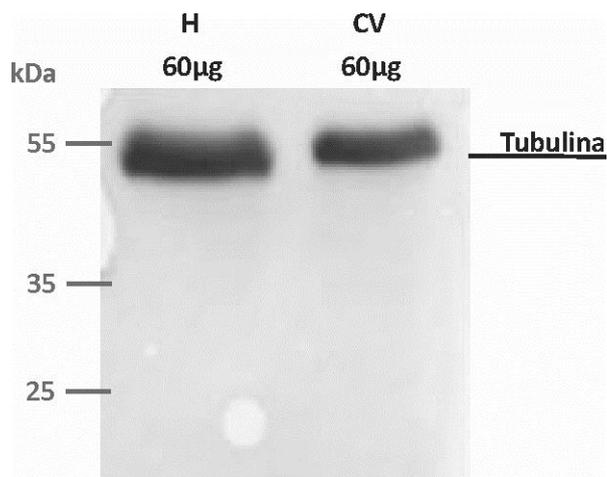
Para esto, se realizó un Dot Blot, en donde se utilizaron dos membranas, sembrando 20 y 40 µg de una muestra proteica de corteza visual de ratón adulto en cada una de ellas. Se incubó una de ellas con anticuerpo primario anti-Cofilina 1 1:500 y la otra con anti-Cofilina 1 1:1000. Posteriormente, se incubaron ambas membranas con anticuerpo secundario anti-mouse-HRP 1:5000. Tal como se observa en la Figura 12, se pudo observar una buena señal en todos los puntos y una proporcionalidad entre la intensidad de la señal y la cantidad de muestra sembrada. Sin embargo, esta proporcionalidad no se pudo apreciar entre las distintas concentraciones de los anticuerpos primarios. De todas formas, consideramos que la señal fue lo suficientemente buena

como para concluir que el anticuerpo primario anti-Cofilina 1 es funcional, y se decidió continuar los experimentos con este.



**Figura 12: Ensayo de Dot Blot con anticuerpo primario anti-Cofilina 1 (#1).** En cada membrana se sembraron 20 y 40 µg de una muestra proteica de corteza visual de ratón adulto, y se incubó una de ellas con anticuerpo primario anti-Cofilina 1 1:500 y la otra con anti-Cofilina 1 1:1000. Posteriormente se incubaron ambas con anticuerpo secundario anti-mouse-HRP 1:5000.

Se decidió realizar un experimento de Western Blot completo sobre muestras cerebrales con el anticuerpo anti-Cofilina 1 (#1). Se cargaron 60 µg de dos muestras distintas, corteza visual de adulto e hipocampo de P28, en un gel de poliacrilamida al 15%, incubando con el anticuerpo anti-Cofilina 1 1:1000 y anticuerpo secundario anti-mouse-HRP 1:5000. Luego del revelado de la membrana, no se pudo detectar ningún tipo de señal. Para verificar que este resultado negativo no se debiera a problemas ocurridos durante la electrotransferencia, a un mal funcionamiento del anticuerpo secundario o a errores de manipulación, se decidió realizar un “stripping” de la membrana y volver a incubarla con otro anticuerpo primario, el anti-Tubulina 1:2000, seguido por el mismo anticuerpo secundario utilizado anteriormente, el anti-mouse-HRP 1:5000. Como se puede observar en la Figura 13, el revelado de señal de Tubulina fue exitoso.



**Figura 13: Detección de señal de Tubulina.** Se cargaron 60 µg de muestra de Hipocampo P28 (izquierda) y de corteza visual adulta (derecha) en un gel de poliacrilamida al 15%. Luego de la incubación y revelado del anticuerpo anti-Cofilina 1 1:1000, se realizó un “stripping” de la membrana y se incubó con anticuerpo primario anti-Tubulina 1:2000 y anticuerpo secundario anti-mouse-HRP 1:5000. H, hipocampo; CV, corteza visual; kDa, Kilodalton.

A partir de este resultado negativo, se efectuaron varios tipos de modificaciones experimentales en distintos ensayos de Western Blot, con el objetivo de obtener algún tipo de señal con el anticuerpo anti-Cofilina 1 (#1). Entre estas modificaciones experimentales se realizaron: cambios en el tipo de muestras a utilizar (distintas áreas cerebrales, muestras conservadas por distintos tiempos luego de la extracción); cambios en la duración de la electrotransferencia (30, 60 y 120 minutos); cambios en la cantidad de proteínas a cargar, y en la concentración de los anticuerpos primarios y secundarios; cambio en la solución de bloqueo de la membrana (leche en polvo o BSA); mayor cuidado en el preparado de soluciones frescas.

No obstante todas estas modificaciones, no se logró obtener una señal específica para la Cofilina 1 con este anticuerpo (#1). Por otro lado, siempre se identificaron señales claras obtenidas con otros anticuerpos primarios aplicados en las mismas membranas anteriormente incubadas con anti-Cofilina 1 luego de realizar “stripping”, dando a entender que los resultados negativos fueron causados por un mal funcionamiento del anticuerpo primario anti-Cofilina-1 (#1). Un deterioro de este anticuerpo puede haber ocurrido en la fase de producción, en el envío y recepción en el laboratorio, y/o por otros factores.

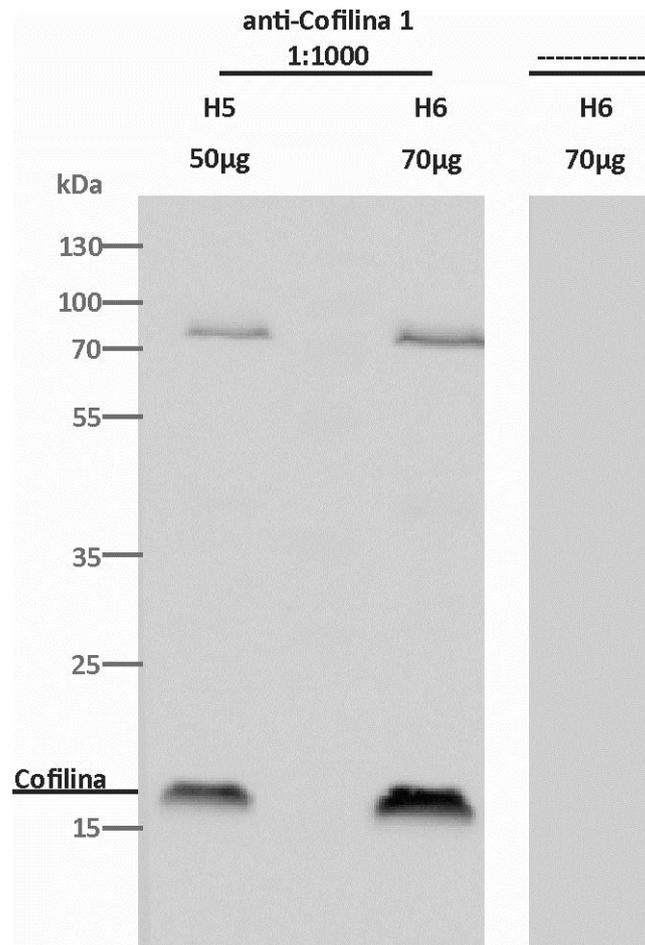
Vale la pena comentar que inicialmente se interpretó el resultado del experimento de Dot Blot (ver Figura 12) como una prueba exitosa de la funcionalidad del anticuerpo anti-Cofilina-1 (#1). A la luz de los últimos resultados, consideramos que la señal obtenida en el Dot Blot pudo haberse debido a una interacción no específica del anticuerpo primario o del secundario con la gran cantidad de proteínas acumuladas en el punto de aplicación y no con la Cofilina 1 endógena. Esta señal no se observó en las membranas obtenidas luego de la separación de las proteínas por electroforesis.

Tras los resultados obtenidos, se decidió incorporar una nueva alícuota del anticuerpo anti-Cofilina 1 (#2) de la misma empresa del anticuerpo anterior (Abcam). Se realizó un experimento de

Western Blot con dos muestras distintas de Hipocampo de P28 (H5 y H6) recién extraídas, cargando 50 y 70  $\mu\text{g}$  de las mismas respectivamente en un gel de poliacrilamida al 15%. Se incubó la membrana con el nuevo anticuerpo primario anti-Cofilina 1 1:1000 (#2) y con anticuerpo secundario anti-mouse-HRP 1:5000. También se cargaron 70  $\mu\text{g}$  de la muestra H6 en un carril separado, para realizar un experimento de control negativo, incubando esta parte de la membrana solo con el anticuerpo secundario pero no con el primario.

Como se puede observar en la Figura 14, con este anticuerpo se logró detectar por primera vez una fuerte señal en una banda a la altura correspondiente a la proteína Cofilina 1, aproximadamente 18 kDa. La intensidad de esta banda es proporcional a la cantidad proteica cargada, siendo más intensa en el carril con 70  $\mu\text{g}$  respecto al carril con 50  $\mu\text{g}$  de muestra de hipocampo. En el sector de la derecha de la Figura, no se obtuvo ninguna señal sobre el mismo tipo de muestra al omitir el anticuerpo primario, lo que sugiere que la señal obtenida es específica del anticuerpo primario y no se debe a una interacción inespecífica del anticuerpo secundario.

El haber logrado detectar la Cofilina 1 en muestras cerebrales separadas por electroforesis utilizando el nuevo anticuerpo anti-Cofilina 1 (#2), confirmó que los resultados negativos obtenidos por Western Blot anteriormente fueron debido al mal funcionamiento del anticuerpo anti-Cofilina 1 #1.



**Figura 14: Detección de Cofilina 1 en muestras cerebrales.** Se cargaron 50 y 70 µg de muestras de hipocampo (H5 y H6) respectivamente en un gel de poliacrilamida al 15%. La membrana de la izquierda fue incubada con el anticuerpo primario anti-Cofilina 1 1:1000 (#2) y posteriormente con anticuerpo secundario anti-mouse-HRP 1:5000; mientras que la membrana de la derecha fue incubada exclusivamente con el anticuerpo secundario anti-mouse-HRP 1:5000 (y no con el primario), sirviendo como control negativo. H, hipocampo; kDa, Kilodalton.

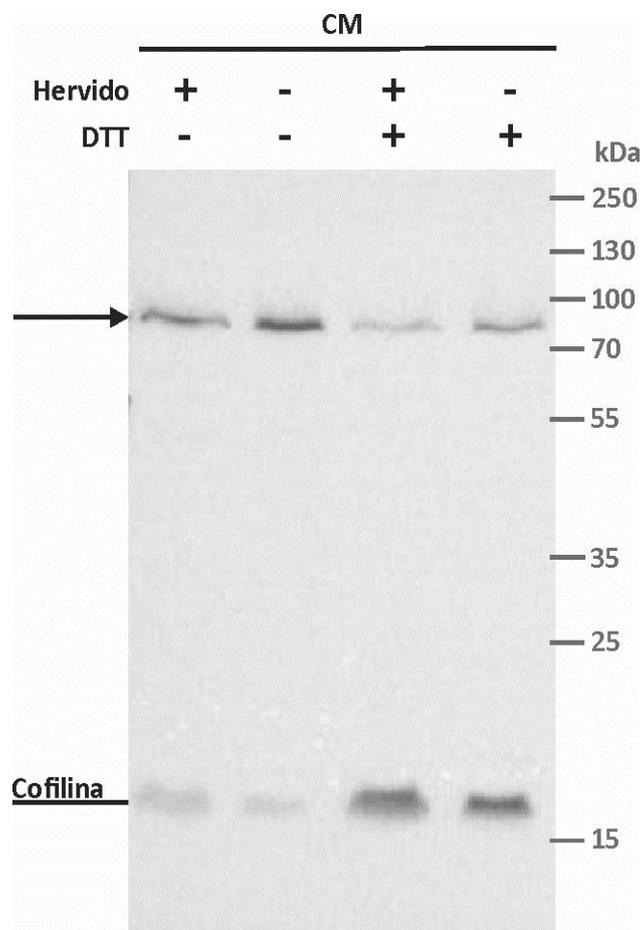
En esta misma membrana, además de la banda de 18 kDa correspondiente a la Cofilina 1, se observó una otra banda de mayor peso molecular, aproximadamente de 72 kDa (Figura 14). De modo similar a lo observado con la banda de 18 kDa, la banda de 72 kDa también exhibe una intensidad proporcional a la cantidad proteica cargada, y no se detecta en la membrana de control negativo.

Considerando que esta banda podría deberse a la formación de agregados de la Cofilina, un modo para eliminar o reducir su presencia sería el agregado de agentes reductores. En los protocolos utilizados en el laboratorio, las muestras son extraídas con un buffer de lisis sin agentes reductores, diluidas en Loading Buffer que contiene SDS y beta-mercaptoetanol, y hervidas 5 minutos a 95°C antes de cargarlas en el gel (otra estrategia que ayuda a desnaturalizar las proteínas con el fin de que el anticuerpo tenga un acceso más fácil al epítipo que reconoce).

Para este ensayo, se decidió utilizar muestras cerebrales que ya habían sido extraídas, utilizadas en otros experimentos y conservadas en Loading Buffer a -20°C (en el laboratorio se mantienen almacenadas varias muestras cerebrales de distintas condiciones experimentales de plasticidad que son potencialmente de interés para este trabajo; además, de este modo se limita el

uso de animales experimentales). Se prepararon cuatro tubos con 60  $\mu\text{g}$  de la misma muestra de corteza motora de ratón adulto que fueron tratados de la siguiente manera: al tubo 1, se le agregó directamente DTT 50 mM, se dejó incubar a temperatura ambiente 30 minutos (para facilitar la acción del DTT), y luego se procedió a hervirlo 5 minutos a 95°C; al tubo 2, solo se le agregó DTT, pero no se hirvió; al tubo 3, no se le agregó DTT, pero sí se hirvió; y el tubo 4 se procesó sin agregar DTT ni hervir.

Luego de la electroforesis y de la electrotransferencia, la membrana fue incubada con anticuerpo primario anti-Cofilina 1 1:2000 (mas diluido respecto al experimento anterior, con el fin de descartar que las bandas altas se deban a un exceso del mismo) y anticuerpo secundario anti-rabbit-HRP 1:5000. Como se puede observar en la Figura 15, la intensidad de la banda alta se reduce en la muestra solo hervida, un poco más en la muestra tratada solo con DTT, y se reduce aun más en la muestra con ambos tratamientos. En el caso de la banda de bajo peso molecular, se puede observar que su intensidad sigue el patrón contrario de distribución en las distintas muestras respecto a la banda alta: más fuerte en la muestra solo hervida, un poco más en la muestra tratada solo con DTT, y aun más fuerte en la muestra con ambos tratamientos.



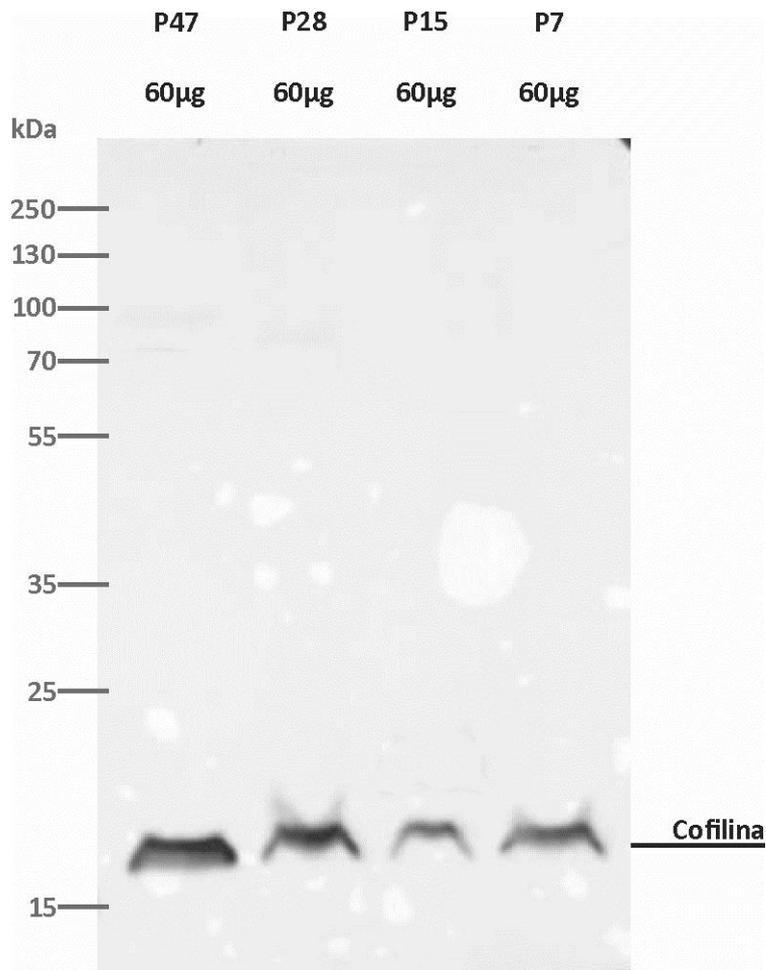
**Figura 15: Puesta a punto del tratamiento de muestras para evitar la señal de las bandas altas de Cofilina.** Se cargaron 45  $\mu\text{g}$  de muestra de corteza motora en cuatro carriles, tratadas de distinta manera (de izquierda a derecha: hervida, no hervida, hervida con DTT, no hervida con DTT) en un gel de poliacrilamida al 15%. La membrana fue incubada con anticuerpo primario anti-Cofilina 1 1:2000 y anticuerpo secundario anti-mouse-HRP 1:5000. CM, corteza motora; kDa, Kilodalton.

A la luz de estos ensayos, se concluyó que el agregado de otro agente reductor, la incubación a temperatura ambiente, y el hervir las muestras antes de cargarlas, son pasos necesarios para reducir la formación de agregados de la proteína en estudio.

### **Estudio de la expresión de la Cofilina 1 en la corteza visual durante el desarrollo**

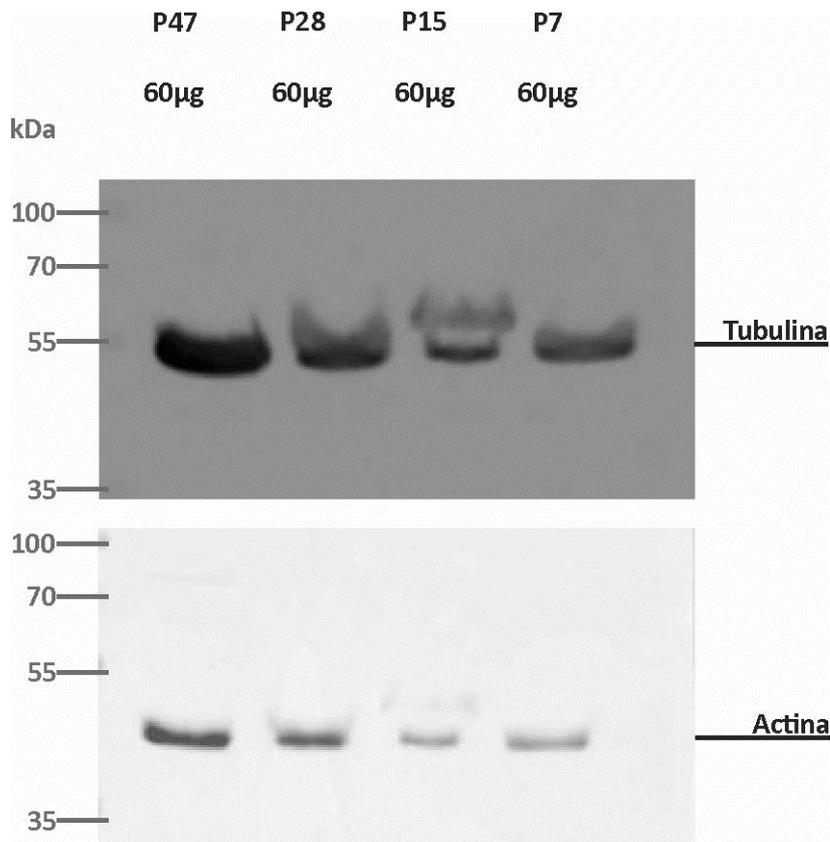
En esta fase del trabajo se logró detectar la presencia de Cofilina 1 en muestras cerebrales de ratón, y reducir la formación de agregados (banda de alto peso molecular) con las estrategias descritas anteriormente. Dado que uno de los objetivos de la tesis es caracterizar la expresión de la Cofilina 1 en la corteza visual del ratón y corroborar si su eventual modulación se correlaciona con los niveles de plasticidad cortical, se realizaron ensayos con muestras de corteza visual de ratones en distintas etapas del desarrollo posnatal, P7, P15, P28 y P50.

En este ensayo, las muestras proteicas fueron extraídas con un buffer de lisis modificado con DTT 50 mM, diluidas en Loading Buffer, incubadas 30 minutos a temperatura ambiente y hervidas 5 minutos a 95°C antes de cargarlas en el gel (60 µg de cada muestra en cada carril). La membrana fue incubada con anticuerpo primario anti-Cofilina 1 1:1000 y anticuerpo secundario anti-mouse-HRP 1:5000. En la Figura 16 se puede observar la presencia de una banda de aproximadamente 18 kDa, correspondiente al peso molecular de la Cofilina 1, en todos los carriles, indicando que esta proteína es expresada en la corteza visual del ratón. También se puede observar la ausencia de la banda de alto peso molecular, indicando que el tratamiento elegido fue exitoso.



**Figura 16: Señal de Cofilina 1 en distintas etapas del desarrollo de la corteza visual del ratón.** Se cargaron 60 µg de cada muestra en un gel de poliacrilamida al 15% (de izquierda a derecha son: P47, P28, P15, P7). Se incubó la membrana con anticuerpo primario anti-Cofilina 1 1:1000 y anticuerpo secundario anti-mouse-HRP 1:5000. kDa, Kilodalton.

Como se menciona en Materiales y Métodos, para corroborar que las diferencias observadas entre las señales de las muestras experimentales se deban exclusivamente a una modificación en su nivel de expresión, se normalizan esos valores con los valores correspondientes a la señal obtenida en la misma muestra con el anticuerpo contra una proteína “housekeeping”. Para esto, se realizaron dos “stripping” consecutivos de la membrana incubada con anticuerpo anti-Cofilina 1 (Fig. 16) y reincubaciones con el anticuerpo anti-Pan Actina 1:1500, y luego con el anticuerpo anti-Tubulina 1:2000 (Fig. 17).



**Figura 17: Señal de Actina y Tubulina en distintas etapas del desarrollo de la corteza visual del ratón.** Luego de revelar la señal de Cofilina 1 en la membrana (Fig. 16), se realizó un “stripping” y se incubó con el anticuerpo primario anti-Pan Actina 1:1500 y anticuerpo secundario anti-rabbit-HRP 1:5000. Por último, se realizó un segundo “stripping” y se incubó con anticuerpo primario anti-Tubulina 1:2000 y anticuerpo secundario anti-mouse-HRP 1:5000. kDa, Kilodalton.

Luego de los dos “stripping”, se pudo observar una banda de aproximadamente 45 kDa, correspondiente a la Actina, y luego una banda de aproximadamente 51 kDa correspondiente a la Tubulina en todos los carriles. Sin embargo, hay una clara variabilidad de la intensidad de la señal obtenida con el anticuerpo anti-Pan Actina, y también con el anticuerpo anti-Tubulina, entre los distintos carriles. Este resultado no fue el esperado. De hecho, varios grupos de investigación, y también nuestro laboratorio, han demostrado que el nivel de expresión de estas proteínas se mantiene constante durante el desarrollo de la corteza visual. Esto sugiere la presencia de algún error/problema, probablemente surgido en los pasos experimentales anteriores a la electroforesis.

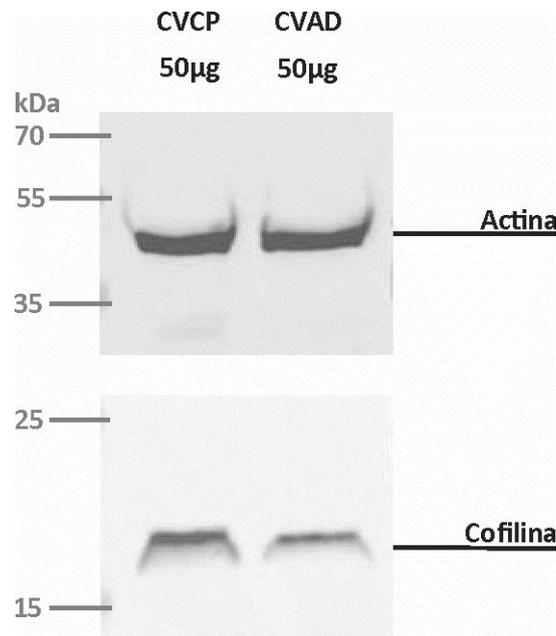
Una vez finalizado el experimento, se decidió revisar la imagen de la membrana teñida con Ponceau, que se obtiene antes de la incubación con el primer anticuerpo primario, y también, la imagen del gel teñido con Coomassie (luego de la electrotransferencia). Una revisión más detallada de estas nos indicó que, en ambos casos, la intensidad de coloración no era homogénea entre los distintos carriles, indicando que la cantidad de muestra cargada en cada carril no era la misma (datos no mostrados).

Con el fin de evitar la variabilidad en la intensidad de las señales obtenidas con los anticuerpos contra las proteínas “housekeeping”, se decidió revisar el proceso de preparación de las muestras antes de cargarlas.

Luego de la extracción del tejido de interés y de la estimación de la concentración proteica, las muestras son conservadas en Loading Buffer a  $-20^{\circ}\text{C}$  en un tubo de "stock". De estos tubos de stock se separa una alícuota, que es incubada 30 minutos a temperatura ambiente, hervida 5 minutos a  $95^{\circ}\text{C}$ , y centrifugada brevemente antes de cargarla en el gel. Teniendo en cuenta que el proceso de hervir puede inducir la evaporación de parte de la muestra, normalmente se preparaba la alícuota con un volumen superior a lo calculado para cargar en el gel la cantidad de microgramos deseada, y luego del hervido se cargaba en el gel el volumen exactamente correspondiente a esta cantidad (por ejemplo, si para cargar  $60\ \mu\text{g}$  se necesitaban  $6\ \mu\text{l}$  de la muestra, se preparaba una alícuota de  $10\ \mu\text{l}$ ). Este procedimiento, podría ser una posible causa de la heterogeneidad de carga proteica entre los carriles que observamos anteriormente. Dado que el volumen de la alícuota que se separa es relativamente pequeño, es posible que luego de hervir la muestra y de una posible evaporación, la concentración proteica de la alícuota se vuelva superior a lo estimado. Este razonamiento surge a partir de que, en teoría, la evaporación en el proceso de hervido solo implicaría una pérdida de agua y no una pérdida de carga proteica. Dado que la evaporación puede ocurrir en modo diferente entre las distintas alícuotas que se procesan en paralelo, es posible que al final no se cargue la misma cantidad proteica para cada una de estas. Teniendo esto en cuenta, se decidió preparar alícuotas con un volumen exactamente correspondiente a la cantidad proteica a cargar, y no superior, y luego del proceso de hervido y eventual evaporación, cargar en el gel la totalidad del volumen restante en el tubo de ensayo.

Para este experimento se decidió comparar dos muestras distintas recién extraídas de corteza visual de ratón adulto (AD) y joven (PC), y procesarlas con anticuerpo anti Cofilina 1 y, luego del "stripping", con anticuerpo anti-Pan Actina, esperando obtener una señal homogénea de la Actina entre los carriles. Las alícuotas correspondientes se prepararon y procesaron como fue descrito anteriormente para poder cargar  $50\ \mu\text{g}$  de cada una de ellas. Tal como se observa en la Figura 18, se puede apreciar una clara señal de la Cofilina 1 más intensa en la muestra del periodo crítico en comparación con la banda del adulto. Cabe destacar que en este experimento tampoco se observaron bandas de alto peso molecular. Con respecto a la señal de la Actina, se puede observar que las señales en los dos carriles son muy similares y no presentan una variabilidad tan fuerte como la observada anteriormente. También, el análisis de la membrana teñida con Ponceau y del gel teñido con Coomassie luego de la electrotransferencia, indicaron que la cantidad proteica de muestra cargada en los dos carriles era la misma (datos no mostrados).

Esto sugiere que la metodología de preparación de las alícuotas implementada favorece la homogeneidad en las señales de proteínas "housekeeping", necesaria en este trabajo para normalizar los resultados experimentales de la Cofilina 1.

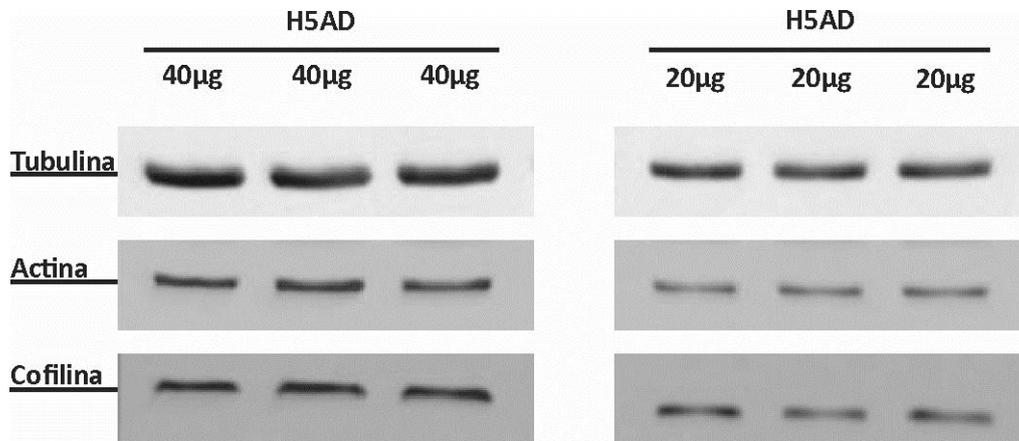


**Figura 18: Análisis de la variabilidad intra-experimental.** Se cargaron 50 µg de muestras de corteza visual de ratón joven (CVCP) y de ratón adulto (CVAD) en un gel de poliacrilamida al 15%. Se incubó con anticuerpo primario anti-Cofilina 1 1:1000 y anticuerpo secundario anti-mouse-HRP 1:5000. Posteriormente se realizó un “stripping” y se procedió a incubar con anticuerpo primario anti-Pan Actina 1:1000 y anticuerpo secundario anti-rabbit HRP 1:5000. CV, corteza visual; kDa, Kilodalton.

Otra posible causa de la irregularidad en la cantidad de muestra cargada en cada carril podría ser un mal funcionamiento de las pipetas utilizadas (lo cual fue descartado por controles de calibración regulares de las mismas), o un error de manipulación de las muestras por parte del experimentador. Para verificar este último punto, se realizó un experimento con una muestra recién extraída de hipocampo de ratón adulto, cargando la misma cantidad de 20 y de 40 µg cada una por triplicado en el mismo gel (las alícuotas de esta muestra fueron tratadas como se menciona anteriormente). La membrana obtenida fue incubada con anticuerpos anti-Cofilina 1, anti-Tubulina y anti-Pan Actina, esperando obtener una intensidad de señal homogénea entre los triplicados para los tres anticuerpos.

En los experimentos realizados hasta el momento, luego del revelado de Cofilina, se realizaba un “stripping” de la membrana para reincubarla con un anticuerpo contra una proteína “housekeeping” necesaria para la normalización de la señal. Dado que se logró eliminar la banda alta de Cofilina, y no era más necesario verificar la presencia de esta, se decidió implementar otra estrategia para obtener la señal de la proteína “housekeeping”. Específicamente, luego de la electrotransferencia, la membrana fue recortada en dos partes: la parte inferior fue procesada con anticuerpo anti-Cofilina 1 y la superior con anti-Tubulina. Esta estrategia reduce aún más las posibilidades de irregularidad entre las señales de los anticuerpos debido a que evita el posible desgaste causado por el “stripping”. Luego de revelar la Tubulina, se realizó “stripping” sobre la parte superior de la membrana y se reincubó con anticuerpo anti-Pan Actina.

En la Figura 19, se puede claramente observar que la señal obtenida con cada uno de los tres anticuerpos es muy similar entre los triplicados, y que la intensidad de esta señal es proporcional a la cantidad de carga proteica (20 y 40  $\mu$ g). Este resultado indica que el grado de error experimental en este tipo de ensayos es muy reducido.

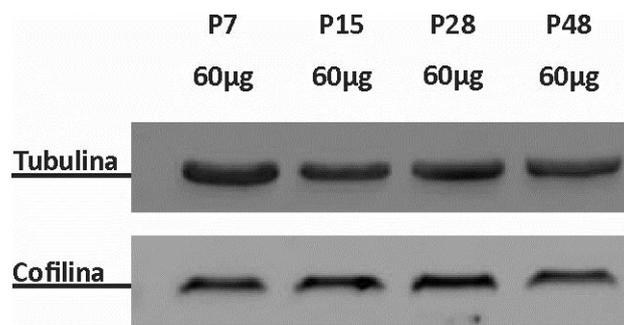


**Figura 19: Verificación de una buena modalidad de carga y de un bajo error experimental.** Se cargaron 40  $\mu$ g de muestra de hipocampo de ratón adulto (H5AD) por triplicado (sector izquierdo de la figura) y 20  $\mu$ g de la misma muestra por triplicado (sector derecho de la figura) en un gel de poliacrilamida al 15%. Se recortó la membrana en dos secciones de forma horizontal para luego incubarla: la parte superior de la misma con anticuerpo primario anti-Tubulina 1:2000 y anticuerpo secundario anti-rabbit-HRP 1:5000, y la parte inferior con anticuerpo primario anti-Cofilina 1 1:1000 y anticuerpo secundario anti-mouse-HRP 1:5000. Luego de revelar la señal de la Cofilina, se realizó un “stripping” en la sección inferior de la membrana y se incubó con anticuerpo primario anti-Pan Actina 1:1500 y anticuerpo secundario anti-rabbit-HRP 1:5000. H, hipocampo; kDa, Kilodalton.

Ya habiendo logrado una mejora en la señal de la Cofilina 1 y en la señal de proteínas “housekeeping”, se realizaron una serie de ensayos de Western Blot para caracterizar la expresión de la Cofilina 1 en la corteza visual del ratón en distintas etapas del desarrollo, manteniendo los procedimientos experimentales descritos anteriormente.

Para cada experimento, se utilizaron muestras frescas de corteza visual de ratón de 7, 15, 28, y 48 días de vida posnatal, que fueron analizados con anticuerpo anti-Cofilina 1 en la parte inferior de la membrana recortada y con anticuerpo contra una proteína “housekeeping” (principalmente Tubulina, en algunos casos Actina) en la parte superior.

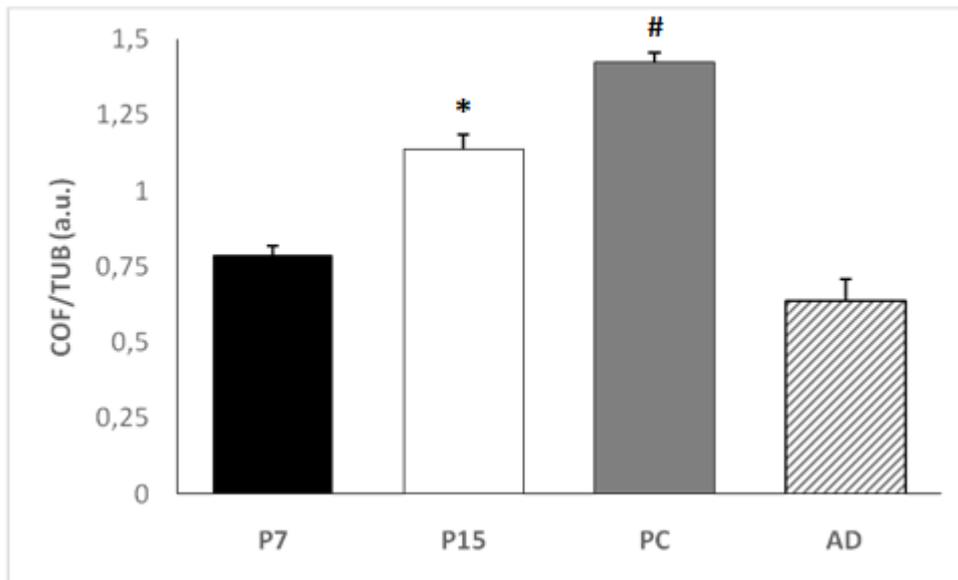
En la Figura 20 se puede observar el resultado de uno de estos experimentos. En detalle, se logró detectar una señal clara y específica a la altura de la Cofilina 1 en todas las muestras, y una señal clara y homogénea de la Tubulina.



**Figura 20: Western Blot representativo de la expresión de Cofilina 1 en una curva de desarrollo de la corteza visual del ratón.** Se cargaron 60 µg de todas las muestras (P7, P15, P28, P48) en un gel de poliacrilamida al 15%. La membrana se cortó por la mitad de forma horizontal, la parte inferior de la misma fue incubada con anticuerpo primario anti-Cofilina 1 1:1000 y anticuerpo secundario anti-mouse-HRP 1:5000, mientras que la parte superior fue incubada con anticuerpo primario anti-Tubulina 1:2000 y anticuerpo secundario anti-mouse-HRP 1:5000.

Cada grupo de muestra (P7, 15, 28, 48) fue analizada por duplicado o triplicado, cargándola en el mismo gel, cargándola en el gel que se corre en paralelo en la misma cubeta, o en otro experimento. Una vez terminados los experimentos, la densidad óptica integral de cada banda de Cofilina 1 se normalizó al valor correspondiente de Tubulina de la misma muestra. Los valores (Cofilina 1/Tubulina) obtenidos para cada edad posnatal, fueron promediado con los valores obtenidos en duplicado o triplicado de la misma muestra. De este modo, se puede reducir la variabilidad intra- e inter-experimental.

En el grafico de la Figura 21, se reportan los resultados obtenidos en este modo para las varias edades analizadas. Se puede observar que existe un aumento de la expresión de la Cofilina 1 a lo largo del desarrollo posnatal de la corteza visual del ratón hasta el periodo crítico, y una reducción en la edad adulta. El análisis estadístico indica que respecto a los valores obtenidos a P7, la expresión de la Cofilina 1 en P15 aumenta de aproximadamente un 45%, en PC aumenta de aproximadamente un 80%, y en AD disminuye drásticamente a valores similares a los observados en P7.



**Figura 21: Análisis de los niveles de Cofilina 1 durante el desarrollo de la corteza visual del ratón.** En el gráfico se indica la cuantificación de la señal de Cofilina 1 (normalizada al valor de Tubulina, COF/TUB) obtenida en la corteza visual de ratones de distintas edades. El valor aumenta a P15 un 45% y a PC un 80% respecto a P7. Luego, en AD, disminuye a valores similares a los observados a P7 (P7:  $0,79 \pm 0,03$ , n=5; P15:  $1,14 \pm 0,05$ , n=5; PC:  $1,42 \pm 0,03$ , n=6; AD:  $0,64 \pm 0,07$ , n=7; one-way ANOVA, post-hoc Tukey's test: P7 vs. P15 y PC, P15 vs. PC y AD, PC vs AD  $p < 0,05$ ; P7 vs. AD,  $p = 0,14$ ). Las barras expresan el promedio  $\pm$  SEM. \* y # indican una diferencia significativa respectivamente de P15 y de PC respecto a todas las otras edades.

## **Experimentos con el anticuerpo anti-Fosfo Cofilina 1 y de Multiplex**

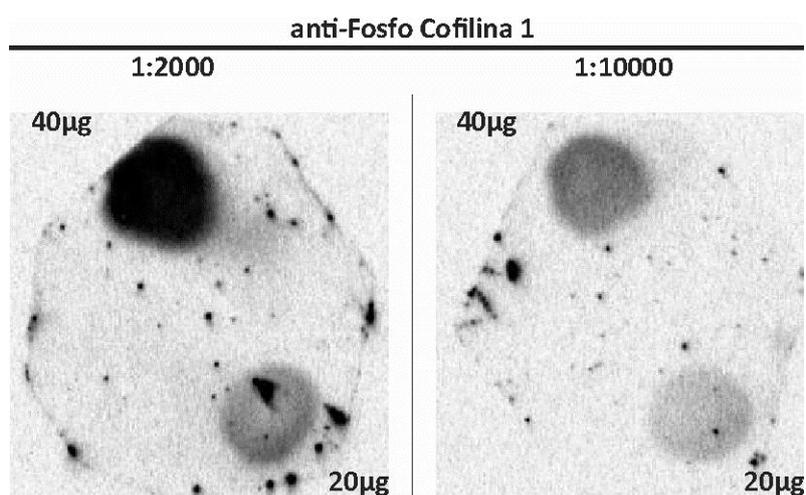
Uno de los objetivos iniciales de la pasantía, que fue descartado, era el de caracterizar la expresión de la Fosfo Cofilina 1 en muestras de corteza visual de ratón. Tal como se detalla en la introducción, la fosforilación de la Cofilina 1 en uno de sus residuos conservados de Serina en la posición 3, inhibe su unión a la Actina, siendo un factor clave de regulación para la actividad de la Cofilina 1 (Yang et al., 1998; Meng et al., 2002). Por lo tanto, el análisis de la forma fosforilada de la Cofilina 1 puede informar sobre el nivel de activación de esta en función de los distintos niveles de plasticidad durante el desarrollo posnatal.

En otra serie de experimentos se intentó realizar la puesta a punto de la metodología de Multiplex. Esta técnica consiste en incubar la membrana con dos anticuerpos primarios de forma simultánea, los cuales son revelados de modo diferencial utilizando anticuerpos secundarios fluorescentes con distintas frecuencias de emisión. Esto permite detectar de forma sincrónica dos proteínas distintas, y resulta particularmente útil si se quiere revelar dos proteínas con el mismo peso molecular, tal como es el caso de la Cofilina 1 y la Fosfo Cofilina 1.

Los objetivos recién descritos no se han podido lograr como se esperaba. De todas formas, fueron importantes en el proceso de aprendizaje en el laboratorio y nos han permitido obtener datos preliminares que pueden tener relevancia a futuro.

## Experimentos con el anticuerpo anti-Fosfo Cofilina 1

En primer lugar se procedió a probar la funcionalidad del anticuerpo primario anti-Fosfo Cofilina 1 (Abcam#1) realizando un experimento de Dot Blot. Se sembraron 20 y 40  $\mu\text{g}$  de una muestra proteica de corteza visual de ratón adulto en dos membranas, las cuales se incubaron con anticuerpo primario anti-Fosfo Cofilina 1 1:2000 y 1:10000. Luego de la incubación con anticuerpo secundario anti-rabbit-HRP 1:5000, se pudo observar una buena señal cuya intensidad era proporcional a la cantidad de muestra sembrada y a las distintas concentraciones del anticuerpo primario (Fig. 22).



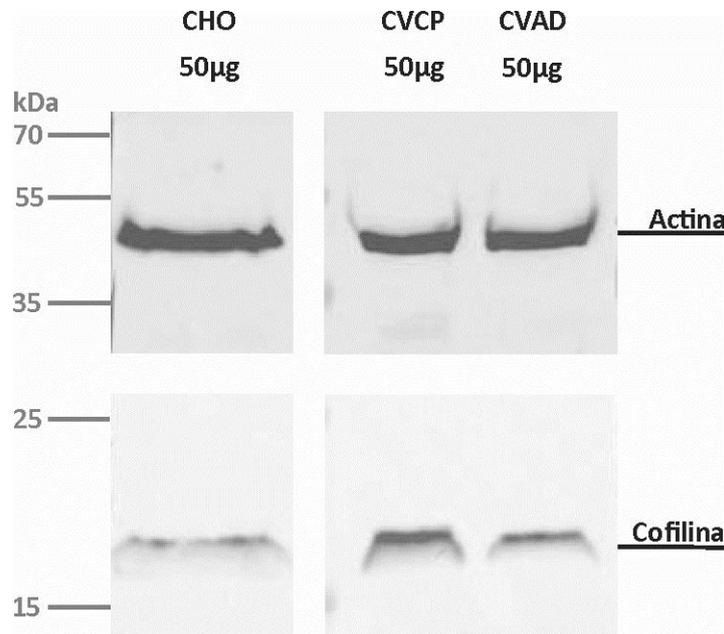
**Figura 22: Ensayo de Dot Blot con anticuerpo primario anti-Fosfo Cofilina 1 (Abcam #1).** En cada membrana se sembraron 20 y 40  $\mu\text{g}$  de una muestra proteica de corteza visual de ratón adulto, se incubó una de ellas con anticuerpo primario anti-Fosfo Cofilina 1 1:2000 y la otra con anti-Fosfo Cofilina 1 1:10000. Posteriormente se incubaron ambas con anticuerpo secundario anti-mouse-HRP 1:5000.

Luego de este primer experimento, se realizaron varios ensayos de Western Blot sobre muestras experimentales, los cuales no dieron ningún tipo de señal de Fosfo Cofilina 1 con el anticuerpo Abcam #1. Este tipo de resultados fue similar a los obtenidos con el anticuerpo anti Cofilina 1 (#1) que fue comprado en conjunto a este. Como se menciona anteriormente, estos resultados pueden haber sido causados por un deterioro de estos anticuerpos en la fase de producción, envío y recepción en el laboratorio, y/o por otros factores.

A partir de la realización de la segunda compra de anticuerpos Abcam (#2), se realizaron una serie de experimentos en donde el anticuerpo anti-Cofilina 1 dio resultados positivos, mientras que no se lograron obtener señales claras con el anticuerpo anti-Fosfo Cofilina 1. En vista de todos estos resultados negativos, se decidió adquirir un nuevo anticuerpo anti-Fosfo Cofilina 1 de otra empresa, en específico de Cell Signaling (CS).

Con este nuevo anticuerpo, se decidió realizar un ensayo de Western Blot sobre una muestra de control positivo del anticuerpo anti-Fosfo Cofilina 1, y también sobre muestras cerebrales. En específico, se utilizó un extracto de proteínas totales de células CHO (“Chinese hamster ovary”, donadas por la Unidad de Biología Celular, Institut Pasteur de Montevideo) que en los “data sheets” de los anticuerpos anti-Fosfo Cofilina 1 son descritas como células de control

positivo, y extractos de corteza visual de ratón adulto y joven. Se cargaron 50 µg de cada una de las muestras y se incubó la membrana con anticuerpo primario anti-Fosfo Cofilina 1 1:1000, y luego de realizar “stripping”, con anticuerpo primario anti-Cofilina 1 1:1000, y también con anticuerpo primario anti Pan Actina 1:1000. Mientras que se logró identificar una señal clara de Cofilina 1 y también de Actina a las alturas esperadas, no se pudo observar ningún tipo de señal correspondiente a la Fosfo-Cofilina 1 (Fig. 23).

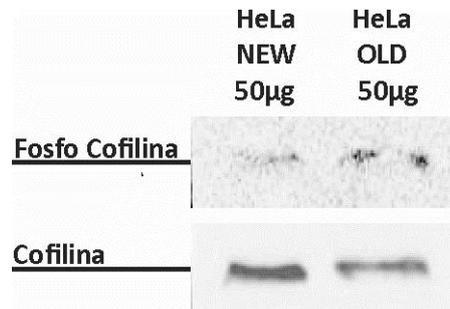


**Figura 23: Análisis de la señal para la Fosfo Cofilina-1.** En este experimento se cargaron 50 µg de cada muestra (de izquierda a derecha: CHO, CV CP y CV AD). Se incubó la membrana con anticuerpo primario anti-Fosfo Cofilina 1 1:1000 y anticuerpo secundario anti-rabbit-HRP 1:5000. Luego se realizó un “stripping” sobre la membrana y se incubó con anticuerpo primario anti-Cofilina 1 1:1000 y anticuerpo secundario anti-mouse-HRP 1:5000. Finalmente se realizó un segundo “stripping” para incubar la membrana con anticuerpo primario anti-Pan Actina 1:1000 y anticuerpo secundario anti-rabbit-HRP 1:5000 (imagen obtenida del mismo experimento de la Figura 18). CHO, células de “Chinese hamster ovary”; CV, corteza visual; kDa, Kilodalton.

En todas las muestras analizadas en este último experimento, como también en otros anteriores, se logró detectar la Cofilina 1 en su forma total pero no en su forma fosforilada. Esto puede deberse a una defosforilación de la Cofilina 1, ocurrida por ejemplo durante la fase de preparación de las muestras. En el buffer de lisis utilizado hasta el momento, estaba incluido el NOV, inhibidor de tirosina fosfatasa y fosfatasa alcalina, y el fluoruro de sodio, inhibidor de serina/treonina fosfatasa y fosfatasa ácida. Luego del análisis de otros protocolos experimentales, se decidió agregar a este buffer de lisis otros inhibidores de serina/treonina fosfatasa, tales como el pirofosfato de sodio y el beta-glicerol fosfato de sodio (ver Materiales y Métodos). Otro cambio que se implementó, fue la utilización de otra línea celular como control positivo del anticuerpo anti-Fosfo Cofilina 1 (como indicado en el “data sheet” correspondiente), las células HeLa (células derivadas de una muestra de cáncer cérvico-uterino, donadas por la Sección de Bioquímica, Facultad de Ciencias).

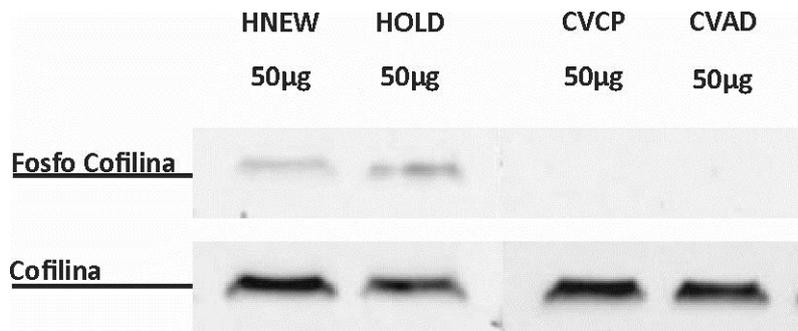
Se realizó la extracción de una alícuota de células HeLa con el buffer de lisis utilizado anteriormente (OLD) y de otra alícuota con el buffer de lisis al cual se le habían agregado los otros

inhibidores de fosfatasas (NEW). Se cargaron 50  $\mu\text{g}$  de las muestras y luego de la electrotransferencia se incubó la membrana con anticuerpo primario anti-Fosfo Cofilina1 1:1000 y anticuerpo secundario anti-rabbit HRP 1:5000. Como se muestra en la figura 24, se logró identificar por primera vez una señal débil a la altura correspondiente al peso molecular de la Fosfo Cofilina 1 (18 kDa aproximadamente). Luego del “stripping” de la membrana y reincubación con anticuerpo primario anti-Cofilina1 1:1000, se pudo observar también una banda más intensa a la altura esperada. Este experimento, indica que las células HeLa son un buen control positivo para la detección de la Cofilina 1 y también de la Fosfo Cofilina 1.



**Figura 24: Primer señal detectada de Fosfo Cofilina1.** Se cargaron 50  $\mu\text{g}$  de células HeLa. A la izquierda se cargó la muestra extraída con el nuevo buffer de lisis al cual se le agregaron más inhibidores de fosfatasas (NEW), y a la derecha se cargó la muestra extraída con el buffer de lisis utilizado anteriormente (OLD). La membrana se incubó con anticuerpo primario anti-Fosfo Cofilina 1 1:1000 y anticuerpo secundario anti-rabbit-HRP 1:5000. Se realizó un “stripping” de la membrana y se incubó con anticuerpo primario anti-Cofilina 1 1:1000 y anticuerpo secundario anti-mouse-HRP 1:5000.

Finalmente, se decidió realizar un experimento sobre muestras cerebrales utilizando en el mismo los extractos de células HeLa como control positivo. Se realizó la extracción con el nuevo buffer de lisis de dos muestras frescas de corteza visual de ratón joven y adulto, y se cargaron 50  $\mu\text{g}$  de cada una de las muestras. Luego de la electrotransferencia, se recortó la membrana en dos secciones para poder incubar una de ellas con el anticuerpo anti-Cofilina 1 y la otra con el anticuerpo anti-Fosfo Cofilina 1. En la Figura 25, se puede observar una clara señal de Cofilina 1 en todas las muestras, confirmando los resultados anteriores. Sin embargo, la señal de la Fosfo Cofilina 1 se identificó solo en las muestras de control positivo (HeLa) pero no en las muestras de corteza visual.

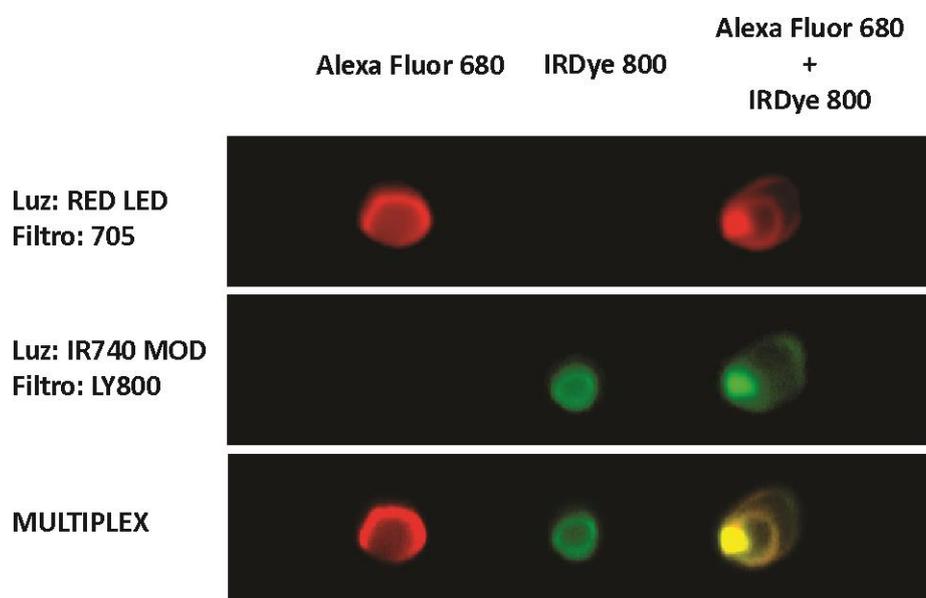


**Figura 25: Señal de Cofilina 1 y Fosfo Cofilina 1.** Se cargaron 50 µg de cada una de las muestras (de izquierda a derecha: células HeLa extraídas con el buffer de lisis modificado, NEW; células HeLa extraídas con buffer de lisis viejo, OLD; corteza visual de ratón joven, CVCP; corteza visual de ratón adulto, CVAD). Se recortó la membrana en dos secciones de forma horizontal, la sección superior se incubó con anticuerpo primario anti-Fosfo Cofilina 1 1:1000 y anticuerpo secundario anti-rabbit-HRP 1:5000, mientras que la sección inferior se incubó con anticuerpo primario anti-Cofilina 1 1:1000 y anticuerpo secundario anti-mouse-HRP 1:5000. CV, corteza visual.

En consecuencia de los varios experimentos realizados que no dieron los resultados esperados, se decidió continuar el trabajo de la pasantía analizando la expresión de la forma total de la Cofilina 1 y no de su forma fosforilada. Para futuros experimentos, se considera realizar otras modificaciones del protocolo utilizado, como por ejemplo el uso de un buffer de lisis diferente, y el agregado de inhibidores de fosfatasas a partir de “kit/cocktail” de otras empresas disponibles en el mercado.

## Experimentos de Multiplex

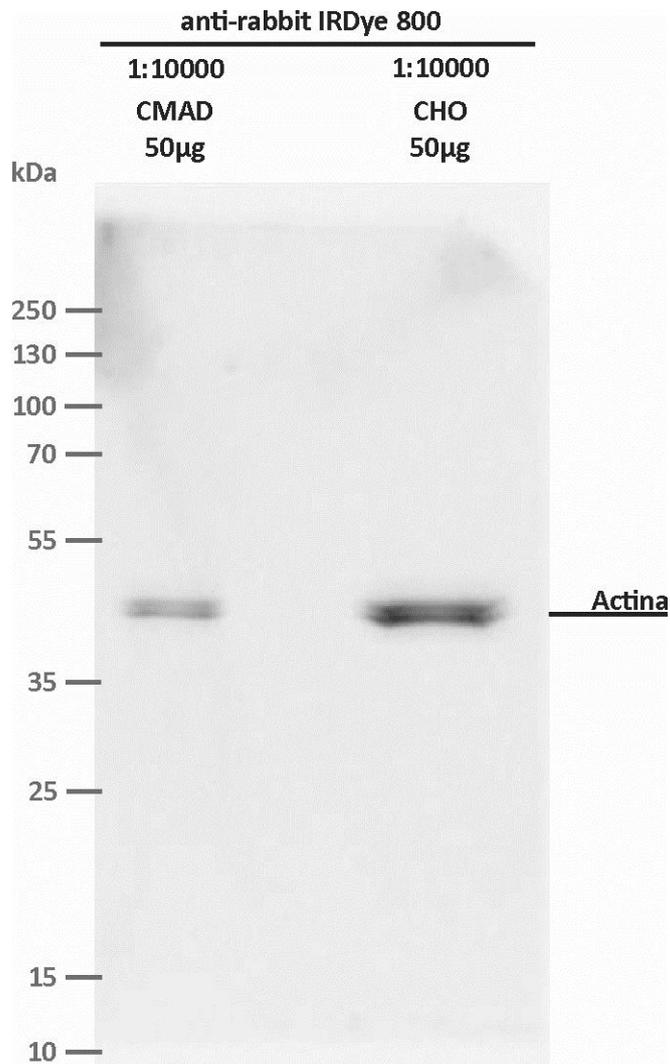
La primera aproximación para la utilización de esta metodología fue la de realizar un ensayo con el objetivo de corroborar el correcto funcionamiento del sistema GBOX para la detección de señales fluorescentes y la funcionalidad de los anticuerpos secundarios fluorescentes a disposición. Dado que los anticuerpos primarios a utilizar eran el anti-Cofilina 1 y el anti-Fosfo Cofilina 1, producidos respectivamente en ratón y conejo, los anticuerpos secundarios a utilizar debían ser necesariamente anti-mouse y anti-rabbit. Se realizó un experimento de Dot Blot con los anticuerpos secundarios fluorescentes anti-mouse ALEXA 680 y anti-rabbit IRDye 800. Se sembraron sobre una membrana de PVDF 2 µl de cada anticuerpo (diluidos 1:500 en agua) en dos puntos separados, y 2 µl de una mezcla 1:1 de ambas diluciones en un mismo punto. Luego de la absorción del líquido en la membrana, se procedió al revelado de la señal a 680 nm y luego a 800 nm. En la Figura 26, se puede observar una señal del revelado a 680 en el punto sembrado solo con el anticuerpo anti-mouse ALEXA 680 y en el punto sembrado con los dos anticuerpos. Lo mismo se observa con el revelado a 800 nm. En esta figura también se observa una imagen compuesta de las dos anteriores donde se evidencia en rojo la señal a 680, en verde la señal a 800 y en amarillo la superposición de las dos señales.



**Figura 26: Verificación del funcionamiento del sistema Multiplex.** Se sembraron en una membrana de PVDF dos tipos de anticuerpos secundarios fluorescentes (de izquierda a derecha: 2 µl de anti-mouse ALEXA 680, 2 µl de anti-rabbit IRDye 800 y 2 µl de dichos anticuerpos en simultáneo). En la imagen superior se observa el revelado a 680 nm, en la imagen del medio se observa el revelado a 800 nm y en la imagen inferior se observa la composición de ambas imágenes.

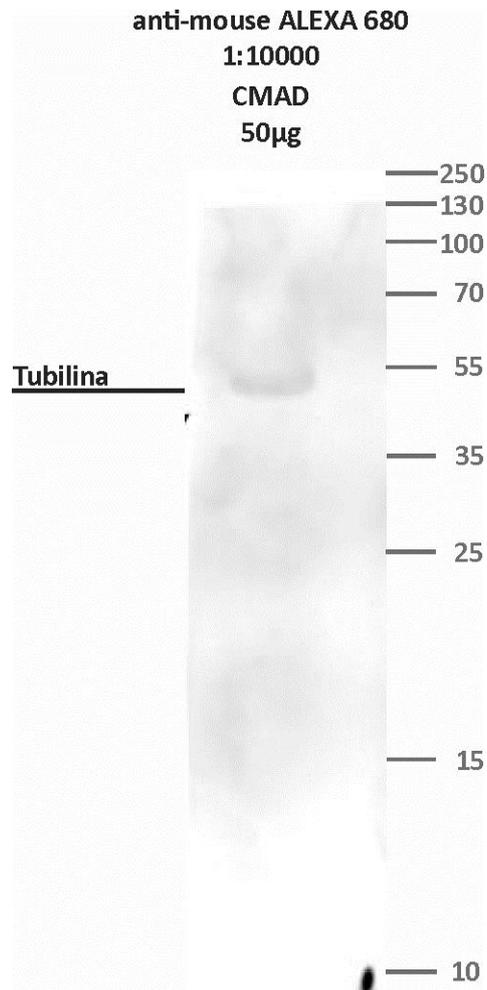
Ya habiendo corroborado un buen funcionamiento del sistema GBOX y de los anticuerpos secundarios fluorescentes en uso, se procedió a probar estos anticuerpos sobre muestras en un experimento de Western Blot. Se cargaron 50 µg de una muestra de corteza motora de ratón adulto y de un extracto proteico de células CHO, y luego de la electrotransferencia se incubó la membrana con anticuerpo primario anti-Pan Actina 1:1000 y con anticuerpo secundario anti-rabbit IRDye 800 1:10000. Como se aprecia en la Figura 27, se obtuvo un resultado positivo al evidenciarse una clara

señal de Actina a la altura de 45 kDa aproximadamente en las dos muestras, confirmando un correcto funcionamiento del anticuerpo secundario anti-rabbit IRDye 800.



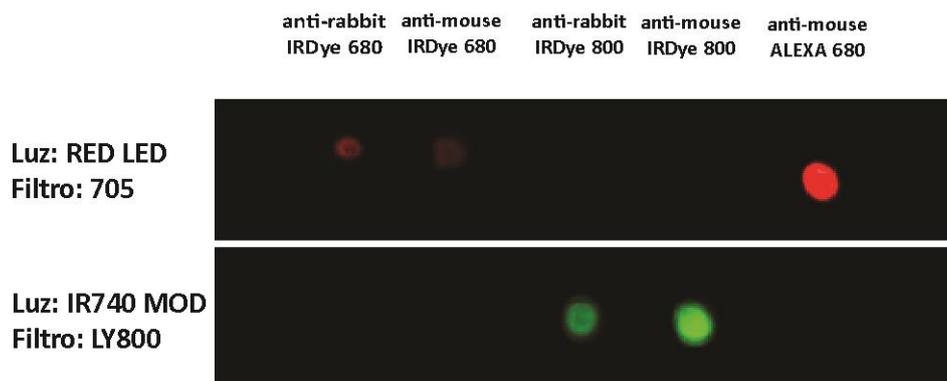
**Figura 27: Verificación de la funcionalidad del anticuerpo secundario anti-rabbit IRDye 800 sobre una muestra proteica.** Se cargaron 50 µg de cada una de las muestras (de izquierda a derecha: corteza motora de ratón adulto, CMAD y células CHO). Se incubó la membrana con anticuerpo primario anti-Pan Actina 1:1000 y con anticuerpo secundario anti-rabbit IRDye 800 1:10000. Se reveló a 800 nm. CM, corteza motora; CHO, células de "Chinese hamster ovary". kDa, Kilodalton.

Posteriormente, en otro experimento de Western Blot, se cargaron 50 µg de la misma muestra de corteza motora de ratón adulto y de otra muestra de hipocampo de ratón joven, y luego de la electrotransferencia, se incubó la membrana con anticuerpo primario anti-Tubulina 1:2000 y con anticuerpo secundario anti-mouse ALEXA 680 1:5000. Como se observa en la Figura 28, aunque se puede identificar una señal de Tubulina a la altura correspondiente (51 kDa aprox.), esta es muy débil y se evidencia una gran cantidad de fondo.



**Figura 28: Verificación de la funcionalidad del anticuerpo secundario anti-mouse ALEXA 680 sobre muestra proteica.** Se cargaron 50 µg de cada una de muestra de corteza motora de ratón adulto, CMAD. Se incubó la membrana con anticuerpo primario anti-Tubulina 1:2000 y con anticuerpo secundario anti-mouse ALEXA 680 1:5000. Se reveló a 680 nm. CM, corteza motora. kDa, Kilodalton.

En esta fase se decidió probar otros anticuerpos secundarios fluorescentes, que se encontraban recientemente a disposición del laboratorio, con el objetivo de reducir el problema del fondo e identificar una mejor combinación de anticuerpos secundarios anti-rabbit y anti-mouse a utilizar en los ensayos de Multiplex. Para este ensayo de Dot Blot se sembraron sobre una membrana 2 µl de cada uno de los anticuerpos, detallados a continuación, diluidos 1:500 en agua en puntos separados: los anticuerpos anti-mouse ALEXA 680 y anti-rabbit 800 IRDye utilizados anteriormente, y los anticuerpos anti-mouse IRDye 680, anti-rabbit IRDye 680, y anti-mouse IRDye 800 utilizados por primera vez. Luego de la absorción del líquido en la membrana se procedió al revelado de la señal a 680 nm y luego a 800 nm. El análisis de la imagen obtenida revelando a 680 nm, indica que la señal más intensa es la correspondiente al anticuerpo ya utilizado anti-mouse ALEXA 680, mientras que las señales de los otros anticuerpos nuevos son más débiles. En el caso del revelado a 800 nm, la intensidad de señal de los dos anticuerpos probados es fuerte, aunque es menor la del anticuerpo anti-rabbit 800 IRDye respecto a la del anticuerpo nuevo anti-mouse IRDye 800 (Fig. 29).

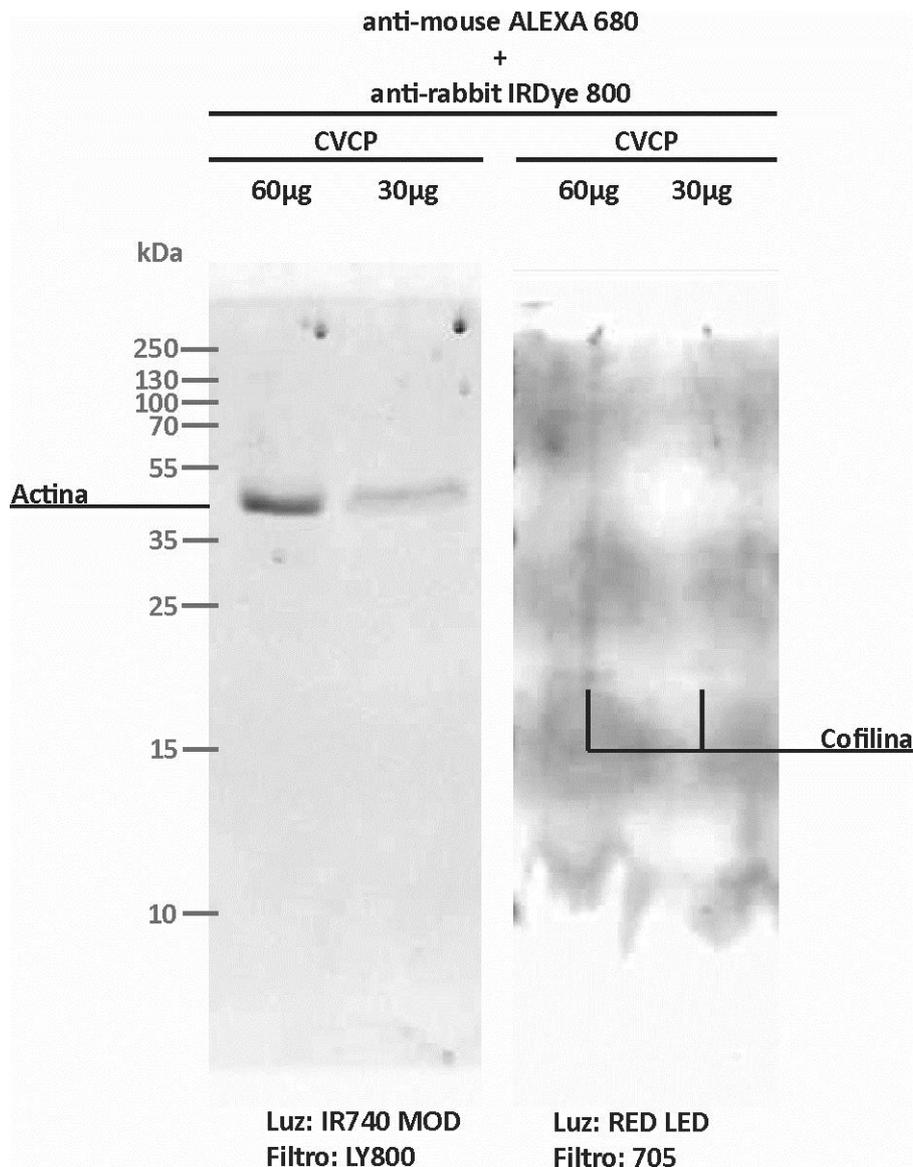


**Figura 29: Comparación de la funcionalidad de anticuerpos secundarios fluorescentes mediante Dot Blot.** Se sembraron distintos spots de anticuerpos secundarios fluorescentes con concentración 1:500. De izquierda a derecha los anticuerpos son: anti-rabbit IRDye 680, anti-mouse IRDye 680, anti-rabbit 800 IRDye, anti-mouse IRDye 800, anti-mouse ALEXA 680. En la imagen superior se observa la señal de los anticuerpos en el revelado a 680 nm, en la imagen inferior se observa la señal de los anticuerpos en el revelado a 800 nm.

Los resultados obtenidos en este ensayo de Dot Blot, indican que la mejor pareja de anticuerpos para utilizar en experimentos de Multiplex son los ya utilizados anti-mouse ALEXA 680 y anti-rabbit IRDye 800. Una segunda opción sería la pareja de anticuerpos nuevos anti-mouse IRDye 800 y anti-rabbit IRDye 680.

Es así que se decidió realizar un primer experimento de Multiplex sobre muestras de corteza visual de ratón joven utilizando inicialmente la pareja de anticuerpos fluorescentes indicados anteriormente. En este ensayo se probaron el anticuerpo primario de rabbit anti-Pan Actina, que ya había dado una buena señal de fluorescencia con el anticuerpo secundario anti-rabbit IRDye 800, y, por primera vez, el anticuerpo primario de mouse anti-Cofilina 1, con el anticuerpo secundario anti-mouse ALEXA 680.

Se cargaron 60 y 30 µg de la muestra, y, luego de la electrotransferencia, se incubó la misma membrana con una solución conteniendo los dos anticuerpos primarios, el anti-Cofilina 1 1:1000 y el anti-Pan Actina 1:2000, y luego con una solución conteniendo de los dos anticuerpos secundarios anti-mouse ALEXA 680 1:10000 y anti-rabbit IRDye 800 1:10000. En este ensayo, se pudo identificar una fuerte señal de la Actina a la altura correspondiente en el revelado a 800 nm, confirmando el correcto funcionamiento del anticuerpo secundario fluorescente IRDye 800 sobre el anticuerpo primario anti-Pan Actina (Fig. 30). Por otro lado, en el revelado a 680 nm, aunque se puede identificar una señal de Cofilina 1 a la altura correspondiente, esta es muy débil y se evidencia una gran cantidad de fondo, de modo similar a lo observado anteriormente en el experimento de Western Blot con el anticuerpo de mouse anti Tubulina (Fig. 28).

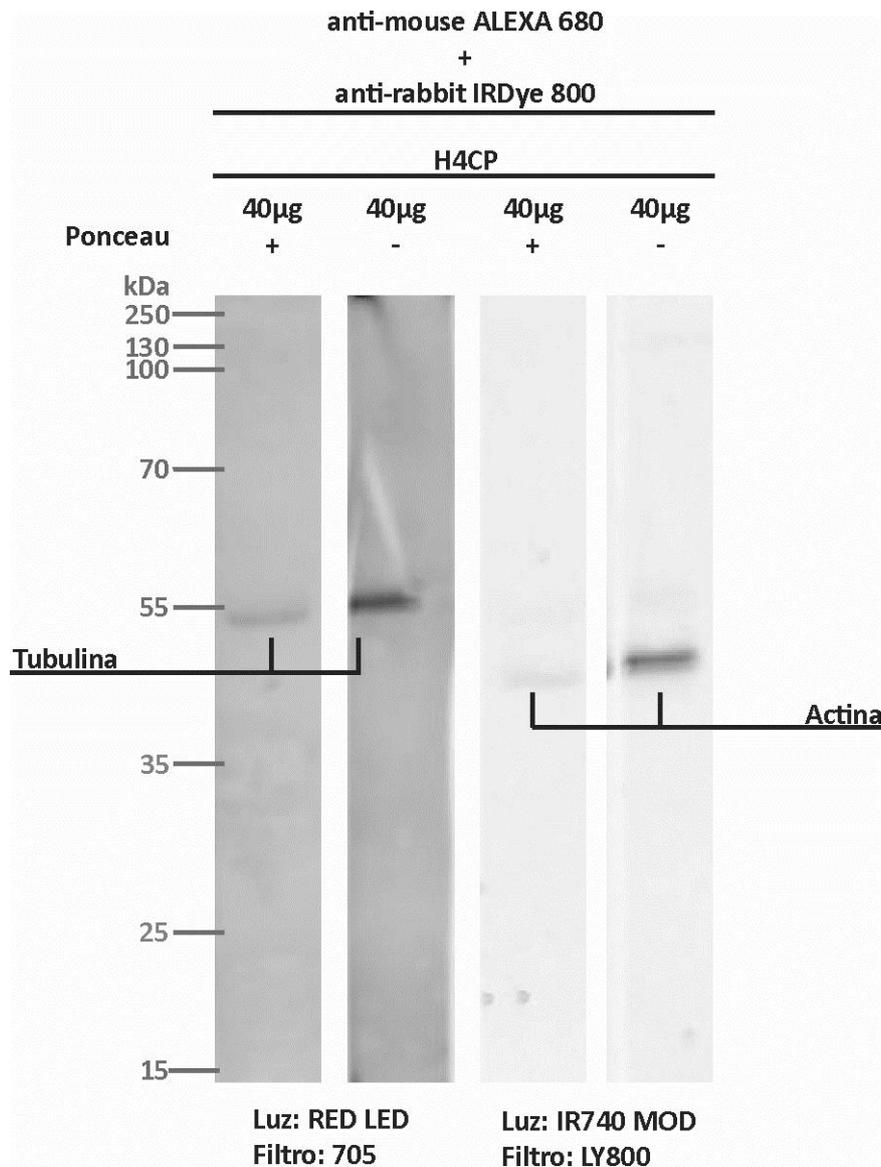


**Figura 30: Western Blot representativo de la señal de Cofilina y Actina.** Se cargaron 60 y 30 µg (izquierda y derecha respectivamente) de una muestra de corteza visual de ratón joven (CVCP), en un gel de poliacrilamida al 15%. Se incubó la misma membrana con anticuerpos primarios anti-Cofilina 1 1:1000 y anti-Pan Actina 1:2000 y luego con anticuerpos secundarios anti-mouse ALEXA 680 1:10000 y anti-rabbit IRDye 800 1:10000. En la imagen de la izquierda se observa la membrana revelada a 800 nm; mientras que en la imagen de la derecha se observa la misma membrana revelada a 680 nm. CV, corteza visual; kDa, Kilodalton.

A continuación, se planteó volver a realizar un ensayo de Multiplex, pero utilizando como anticuerpos primarios el de rabbit anti-Pan Actina, y de mouse el anti-Tubulina en lugar del anti-Cofilina 1 (el cual había dado una señal más débil) y verificar el funcionamiento de las dos parejas de anticuerpos secundarios fluorescentes seleccionadas previamente. Además, con el objetivo de obtener señales más claras, se implementaron otras modificaciones en el protocolo experimental. Se revisaron todos los elementos del equipo de Western Blot y en particular los elementos del “sándwich”, corroborando que los papeles de filtro para el armado del “sándwich” fueran nuevos y limpios. Por otro lado, dado que se ha reportado que la coloración de la membrana con Ponceau puede aumentar la autofluorescencia, se realizó el experimento sobre dos membranas separadas, una de las cuales se tiñó con Ponceau mientras que la otra no. También se aumentó el número y la

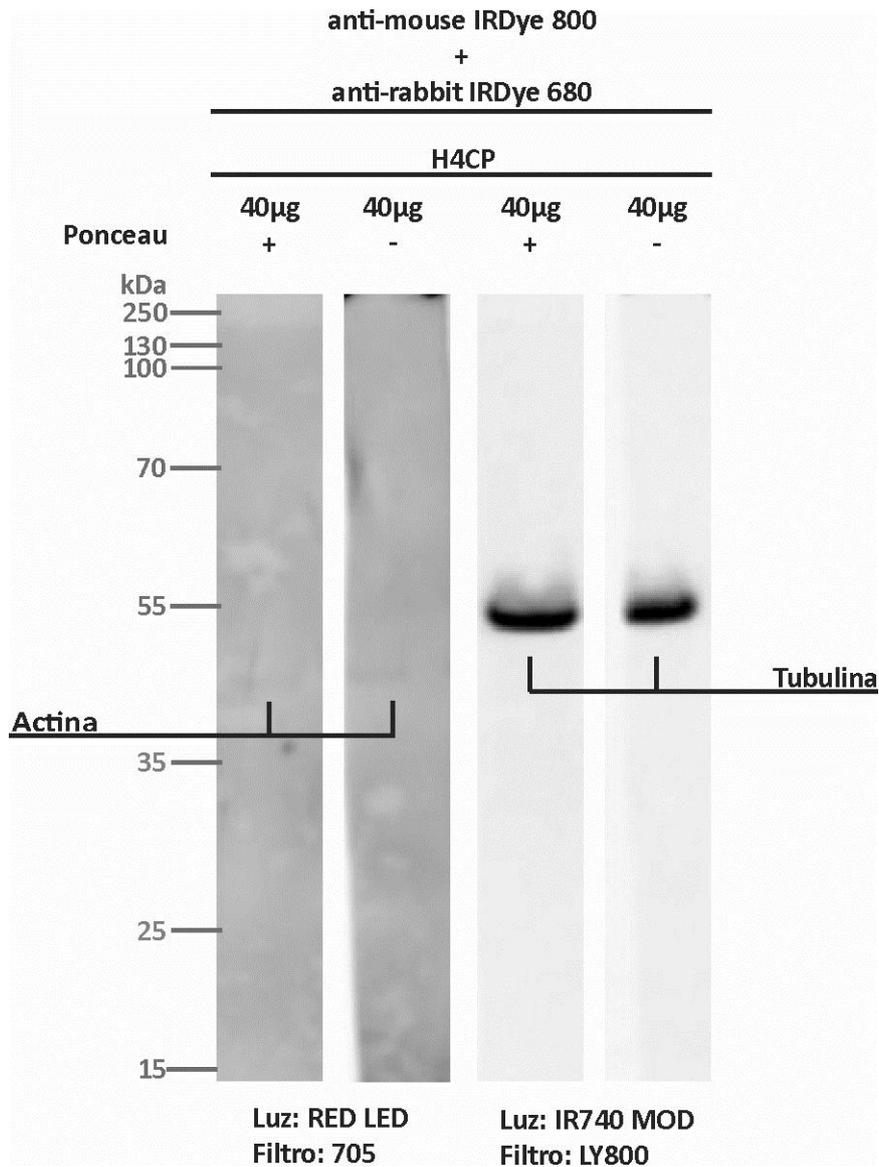
duración de los lavados entre los anticuerpos como otra estrategia para reducir el fondo. Se cargaron 40 µg de muestra de hipocampo de ratón joven en cuatro carriles distintos y se recortó la membrana en cuatro secciones distintas, dos de estas fueron coloreadas con Ponceau mientras que las otras dos no. Todas las secciones fueron incubadas con una solución conteniente del anticuerpo primario anti-Pan Actina 1:2000 y el anti-Tubulina 1:2000 de forma simultánea. Posteriormente, de las partes de membrana que fueron teñidas con Ponceau, se incubó una con una solución conteniente los anticuerpos secundarios anti-mouse ALEXA 680 1:10000 y anti-rabbit IRDye 800 1:10000, mientras que la otra con anticuerpos secundarios anti-mouse IRDye 800 1:2500 y anti-rabbit IRDye 680 1:2500. El mismo tratamiento se realizó para las membranas que no se tiñeron con Ponceau.

En la figura 31 se reportan las imágenes correspondientes al experimento realizado con la pareja de anticuerpos secundarios anti-mouse ALEXA 680 (para la detección de la Tubulina) y anti-rabbit IRDye 800 (para la detección de la Actina) en partes de membranas teñidas o no con Ponceau. En el caso del revelado de la Tubulina con el anticuerpo anti-mouse ALEXA 680, se puede observar que los cambios implementados mejoraron la señal disminuyendo el fondo (en comparación a experimentos previos, ver Figura 28) y que en la membrana no tratada con Ponceau la señal es más clara. En el caso del revelado de la Actina con el anticuerpo anti-rabbit IRDye 800, se puede observar que la señal es similar a la obtenida previamente (ver Figura 30) y que también en este caso en la membrana no tratada con Ponceau la señal es más clara.



**Figura 31: Señal de Actina y Tubulina con la pareja de anticuerpos anti-mouse ALEXA 680 y anti-rabbit IRDye 800.** Se cargaron 40 µg de muestras de hipocampo de ratón joven (H4CP) en cuatro carriles distintos en un gel de poliacrilamida al 15%. Luego de la electrotransferencia, dos secciones de la membrana se tiñeron en Ponceau, mientras que otras dos no se tiñeron. Se incubaron esas secciones con anticuerpos primarios anti-Pan Actina 1:2000 y anti-Tubulina 1:2000 en simultáneo. Luego dos secciones (una teñida con Ponceau y la otra no) se incubaron con la pareja de anticuerpos secundarios anti-mouse ALEXA 680 y anti-rabbit IRDye 800 1:2500. En las dos imágenes de la izquierda se observan las dos secciones reveladas a 800 nm, mientras que en las dos imágenes de la derecha se observan las mismas dos secciones reveladas a 680 nm. H, hipocampo; kDa, Kilodalton.

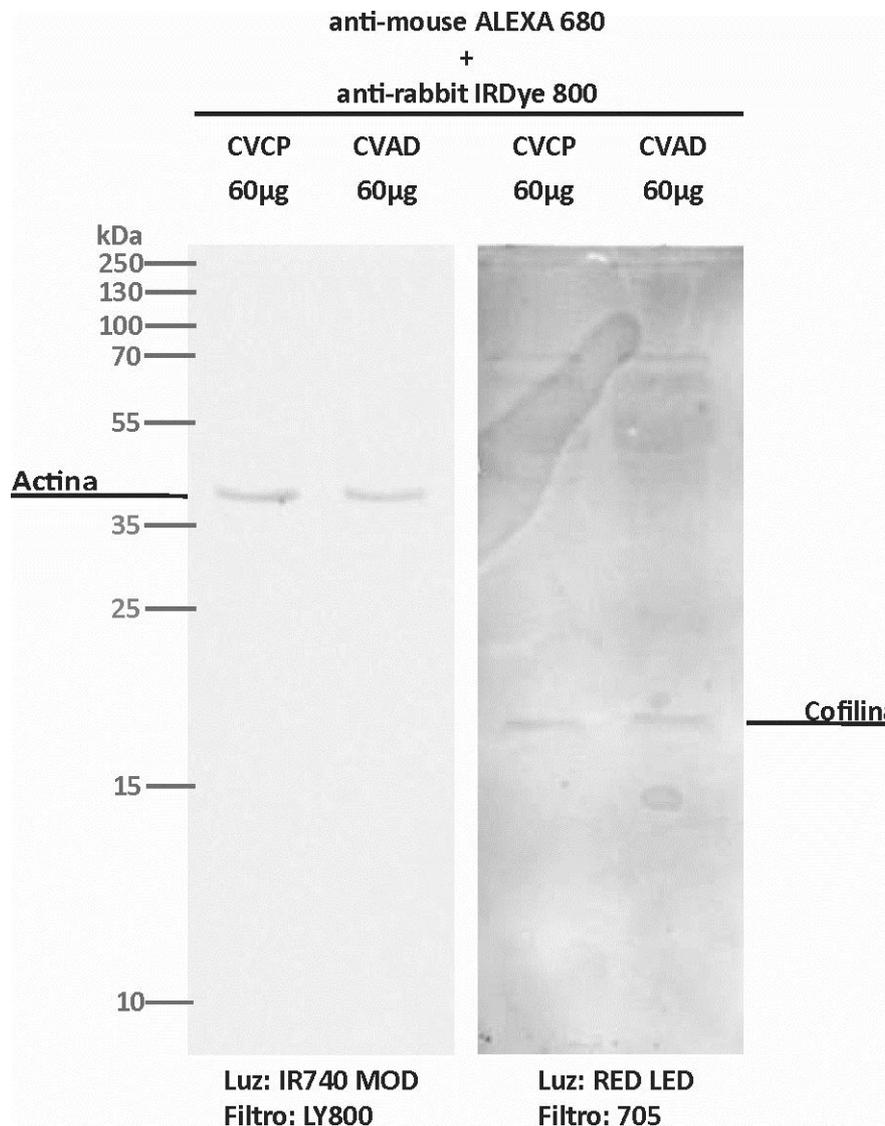
En la figura 32 se reportan las imágenes correspondientes al mismo experimento pero realizado con la pareja de anticuerpos secundarios anti-rabbit IRDye 680 (para la detección de la Actina) y anti-mouse IRDye 800 (para la detección de la Tubulina), en partes de membranas teñidas o no con Ponceau. En el caso del revelado de la Actina con el anticuerpo anti-rabbit IRDye 680, se puede observar que la señal es muy débil y casi nula en ambas partes de la membrana, mientras que la señal de Tubulina revelada con el anticuerpo anti-mouse IRDye 800 es muy fuerte en ambas partes. No se pudieron observar diferencias entre las señales en las membranas tratadas con Ponceau y las no tratadas.



**Figura 32: Señal de Actina y Tubulina con la pareja de anticuerpos anti-mouse IRDye 800 y anti-rabbit IRDye 680.** Se cargaron 40 µg de muestras de hipocampo de ratón joven (H4CP) en cuatro carriles distintos en un gel de poliacrilamida al 15%. Luego de la electrotransferencia, dos secciones de la membrana se tiñeron en Ponceau, mientras que otras dos no se tiñeron. Esas secciones se incubaron con anticuerpos primarios anti-Pan Actina 1:2000 y anti-Tubulina 1:2000 en simultáneo. Luego dos secciones (una teñida con Ponceau y la otra no) se incubaron con la pareja de anticuerpos secundarios anti-mouse IRDye 800 1:2500 y anti-rabbit IRDye 680 1:2500. En las dos imágenes de la izquierda se observan las dos secciones reveladas a 680 nm, mientras que en las dos imágenes de la derecha se observan las mismas dos secciones reveladas a 800 nm. H, hipocampo; kDa, Kilodalton.

En conclusión, la única pareja de anticuerpos secundarios que se pueden utilizar para experimentos de Multiplex es la del anti-mouse ALEXA 680 y anti-rabbit IRDye 800. Los cambios implementados lograron mejorar la señal, en específico la del revelado a 680 nm reduciendo el fondo. Por otro lado, la pareja de los anticuerpos secundarios anti-rabbit IRDye 680 y anti-mouse IRDye 800 no se puede utilizar, dado que el primero ha dado una señal muy débil.

En vista a lo observado, se decidió repetir el experimento de Multiplex sobre muestras de corteza visual de ratón joven y adulto con los anticuerpos primarios de mouse anti-Cofilina 1 y de rabbit anti-Pan Actina, revelándolos con los anticuerpos secundarios anti-mouse ALEXA 680 1:2500 y anti-rabbit IRDye 800 1:2500, habiendo implementado las modificaciones al protocolo experimental antes mencionadas. En la Figura 33 se observan las imágenes de la membrana revelada a 680 nm y a 800 nm. En ambos casos se logró detectar una señal clara, con un fondo reducido, pero no muy intensa.



**Figura 33: Señal de Actina y Cofilina1, revelado con la técnica de Multiplex.** Se cargaron 60 µg de muestras de corteza visual de ratón joven y de ratón adulto (CVCP y CVAD, izquierda y derecha respectivamente) en un gel de poliacrilamida al 15%. Se incubó la membrana con anticuerpos primarios anti-Cofilina1 1:1000 y anti-Pan Actina 1:2000 de forma simultánea. Luego se incubó con anticuerpos secundarios anti-mouse ALEXA 680 1:10000 y anti-rabbit IRDye 800 1:2500 de forma simultánea. En la imagen de la izquierda se aprecia la membrana revelada a 800 nm, mientras que en la imagen de la derecha se aprecia la misma membrana revelada a 680 nm. CV, corteza visual; kDa, Kilodalton.

En esta fase de desarrollo de la pasantía, se decidió no continuar los experimentos de Multiplex debido a la sumatoria de resultados poco convincentes y también porque los experimentos realizados hasta el momento con el anticuerpo de interés, el anti-Fosfo Cofilina 1, no habían dado ningún tipo de señal (ver sección Fosfo Cofilina 1). Por lo que se resolvió continuar los experimentos de Western Blot utilizando los anticuerpos secundarios conjugados a HRP y normalizando con proteínas “house keeping” luego de “stripping” o luego de recortar la membrana en dos partes (tal como se detalla en Materiales y Métodos).

## DISCUSIÓN

El objetivo principal de la pasantía fue lo de contribuir al conocimiento sobre el posible rol de la Cofilina 1 en los procesos de plasticidad de la corteza visual del ratón. Para esto, se decidió analizar la modulación no solo de la expresión de la Cofilina 1, sino que inicialmente también de su estado de activación. Se utilizó la metodología de Western Blot que permite obtener datos cualitativos y semi-cuantitativos. Para poder realizar este objetivo, se precisaba en primer lugar obtener una buena señal tanto de Cofilina como de Fosfo Cofilina en las muestras de interés, y en segundo lugar identificar una buena estrategia para normalizar los valores de las señales de Cofilina y Fosfo Cofilina entre ellas, y con las señales de proteínas “housekeeping”.

### Puesta a punto de la técnica experimental

En el correr de la pasantía, se pudo poner a punto todas las técnicas experimentales necesarias para poder llevar a cabo un experimento de Western Blot. Con respecto a la Cofilina 1, en los experimentos iniciales no se pudo revelar una señal sino hasta la adquisición de una nueva alícuota del anticuerpo. En estos experimentos se pudo detectar una clara banda a la altura correspondiente a la Cofilina 1, pero también una banda de mayor altura, probablemente causada por la formación de agregados de esta proteína. Gracias a la implementación de modificaciones en el protocolo experimental utilizado, finalmente se logró obtener una buena señal con el anticuerpo anti-Cofilina 1, que nos permitió caracterizar la expresión de esta proteína en la corteza visual del ratón durante el desarrollo posnatal.

Con respecto a la Fosfo Cofilina 1, desafortunadamente las dos alícuotas de anticuerpo utilizadas inicialmente no dieron resultados durante la realización de la pasantía. En la parte final de esta se pudo utilizar un nuevo anticuerpo de otra empresa (Cell Signaling) con el cual se lograron obtener resultados preliminares sobre muestras de control. Se prevé a futuro realizar otros experimentos para medir la expresión de la Fosfo Cofilina 1 en las mismas edades analizadas con el anticuerpo anti-Cofilina 1 y así poder obtener también una estimación del estado de activación de esta proteína.

En cuanto a la normalización de las señales, una de las técnicas utilizadas en el correr de la pasantía fue la de Multiplex, la cual permite revelar señales de proteínas del mismo peso molecular en la misma membrana utilizando anticuerpos secundarios fluorescentes. No obstante las numerosas pruebas con distinto tipos de anticuerpos secundarios fluorescentes, y también con varios tipos de anticuerpos primarios, no se logró obtener el tipo de señal deseada. La puesta a punto de esta metodología es muy compleja, y probablemente el equipo a disposición no fue el más indicado para la detección de señales con los anticuerpos secundarios fluorescentes utilizados. Además, debido a que los experimentos realizados hasta el momento con el anticuerpo anti-Fosfo Cofilina 1 no habían dado ningún tipo de señal, se decidió no seguir con la puesta a punto del Multiplex como estrategia de normalización de las señales.

En conclusión, los experimentos exitosos fueron realizados utilizando el anticuerpo anti-Cofilina 1 y normalizando contra proteínas “housekeeping” como la Tubulina y la Actina. Durante la pasantía, se implementó la estrategia de recortar en dos partes las membranas e incubarlas con los

dos anticuerpos de interés, lo que evita el uso del “stripping” y facilita la obtención de señales más regulares.

### **La expresión de la Cofilina 1 es modulada en la corteza visual del ratón acompañando los distintos niveles de plasticidad cortical durante el desarrollo postnatal.**

En este trabajo se logró la puesta a punto de la metodología de Western Blot para analizar la expresión de la Cofilina 1 en la corteza visual del ratón. Se pudo observar que los niveles de expresión de Cofilina 1 aumentan en P15 en comparación con P7 y aumentan aún más en P28 en comparación con P7 y P15, y luego, a P50, se reducen a valores similares a los observados en P7. Los datos obtenidos en este trabajo indican una clara modulación de la expresión de la Cofilina 1 en la corteza visual de ratón durante las distintas etapas del desarrollo analizadas, sugiriendo una implicancia de la Cofilina 1 en los procesos de plasticidad cortical. Cabe destacar que el estudio de la expresión de la Cofilina 1 a P15 puede además dar información sobre la dependencia de esta del input visual, dado que a esta edad, tal como se menciona en el diseño experimental, los ratones abren los ojos y se determina un fuerte aumento de la entrada visual a la corteza.

Como ya se indica en la introducción, la Cofilina ha sido aislada, identificada y caracterizada en estudios anteriores (Bamburg et al., 1980; Maekawa et al., 1983). Se han encontrado tres formas distintas de Cofilina en mamíferos y otros estudios han demostrado que la Cofilina 1 es particularmente abundante en el cerebro (Racz & Weinberg, 2006; Bellenchi et al., 2007; Rust et al., 2010; Gorlich et al., 2011). Un único estudio ha analizado la expresión de la Cofilina 1 durante el desarrollo postnatal. En este estudio, realizado por Western Blot en el hipocampo de ratas, se ha observado que el estado de activación de la Cofilina 1 aumenta de P10 a P21, principalmente por una reducción de la forma fosforilada respecto a la total. También, utilizando la técnica de inmunohistoquímica, se ha observado que la inmunoreactividad para la Fosfo Cofilina 1 se encuentra en bandas difusas en la capa molecular y en el giro dentado del hipocampo, y que esta distribución se reduce durante el desarrollo concentrándose en sitios postsinápticos (Lauterborn et al., 2016). Estos autores han relacionado la modulación de la Cofilina 1 con los cambios en la dinámica de los filamentos de Actina necesarios para la extensión de las neuritas y el cierre de la fase de formación de las espinas dendríticas y la sinaptogénesis, que en el hipocampo ocurren en las primeras tres semanas de vida posnatal. Nuestros datos muestran que la expresión de la Cofilina 1 en la corteza visual del ratón aumenta durante las primeras 4 semanas de vida posnatal. Este es un período en donde ocurren múltiples procesos relacionados con el desarrollo y la maduración de la corteza cerebral. En la corteza visual del ratón las primeras sinapsis maduras se pueden observar a partir de P7 luego de la finalización de la etapa de laminación cortical. La sinaptogénesis continúa hasta llegar a una meseta alrededor de la tercera/cuarta semana de vida posnatal (Li et al., 2010). Aunque nuestros datos no contribuyan a la caracterización del estado de activación de la Cofilina 1, la modulación de la expresión de esta en la corteza visual sugiere un potencial rol en la formación de espinas dendríticas y la sinaptogénesis también a nivel cortical.

Los factores que son relacionados con los procesos de plasticidad dependiente de la experiencia en la corteza visual, teóricamente tendrían que ser modulados por el input visual. En nuestros experimentos observamos un aumento de la expresión de la Cofilina 1 a P15, alrededor de la edad en la cual los ratones abren los ojos y donde ocurre un fuerte aumento de la actividad

eléctrica entrante por la vía visual a la corteza, y al comienzo del periodo crítico de plasticidad (Trachtenberg, 2015; Shen & Colonnese, 2016). Esto podría sugerir una dependencia de la expresión de la Cofilina 1 de la experiencia visual. Para comprobar el efecto del input visual sobre la expresión de la Cofilina 1, prevemos utilizar aproximaciones experimentales clásicas y ya utilizadas en el laboratorio como la privación monocular de la visión o la exposición de los animales a la luz luego de un periodo de mantenimiento en la oscuridad (Vierci et al., 2016).

La comparación de los datos obtenidos en la corteza visual a P28 y a P50, indica que el nivel de expresión de la Cofilina 1 se reduce aproximadamente a la mitad volviendo a valores similares a los obtenidos a P7. Datos obtenidos en el hipocampo de ratón en edades comparables, P21 y P60, indican una reducción similar de la expresión de la Cofilina 1 y un aumento de su estado de activación (Cao et al., 2017). Lo más relevante en este trabajo es la demostración de que la Cofilina 1 está implicada en el control de una determinada forma de plasticidad (depresión a largo plazo, LTD) solo a P60 pero no a P21, indicando un rol de la Cofilina 1 distinto en función de la etapa del desarrollo posnatal. Las edades analizadas en la corteza visual en nuestro estudio son caracterizadas por ser edades con un alto nivel de plasticidad, P28, y con un nivel de plasticidad reducido o nulo, P50. La modulación de la Cofilina 1 en la corteza visual en correlación con distintas etapas del desarrollo posnatal caracterizadas por presentar distintos niveles de plasticidad, sugiere que en esta área también la Cofilina 1 pueda tener un rol distinto en función de la fase posnatal en determinados procesos de plasticidad.

Una de las líneas de investigación del laboratorio es la de identificar nuevos posibles candidatos a la regulación de la plasticidad de la corteza visual utilizando la proteómica diferencial, electroforesis en geles de poliacrilamida bidimensional seguida por espectrometría de masa. En uno de estos estudios, se comparó el perfil proteómico de ratones con altos niveles de plasticidad fisiológica (P28, pico del período crítico de plasticidad), con plasticidad reducida o nula (P50), y también con animales adultos pero con altos niveles de plasticidad restaurados por el tratamiento farmacológico con la fluoxetina (Bornia, 2015). Dentro de los varios spots que presentaron un nivel diferencial entre las varias condiciones, se identificó por espectrometría de masa a la Cofilina 1. La intensidad óptica del spot correspondiente fue más alta en las dos condiciones de alta plasticidad (periodo crítico y adultos tratados con fluoxetina) respecto a la de escasa plasticidad (adultos no tratados). Nuestros experimentos de Western Blot, comprueban que el nivel de expresión de la Cofilina 1 es más alto en el periodo crítico de plasticidad respecto a la condición de escasa plasticidad. Prevemos realizar experimentos de Western Blot para verificar si la expresión de la Cofilina 1 también aumenta en animales adultos tratados con fluoxetina respecto a los controles.

Tal como se describe en la introducción, el único estudio que puede relacionar la modulación de la Cofilina 1 con la plasticidad de la corteza visual es el estudio de Cerri et al., 2011. En este estudio, se ha demostrado que la activación persistente de las Rho GTPasas en animales adultos con niveles de plasticidad reducidos, restaura altos niveles de plasticidad en la corteza visual. Dado que uno de los efectores de las Rho GTPasas es la Cofilina 1, es posible que la restauración de la plasticidad en adulto observada en este estudio ocurra a través de una modulación de la expresión o del estado de activación de la Cofilina 1. Este posible mecanismo concordaría con nuestra observación de que la expresión de la Cofilina 1 es más elevada en edades con altos niveles de plasticidad, y también con la observación previa de un aumento de la Cofilina 1 en animales tratados con fluoxetina (otra aproximación experimental que restaura altos niveles de plasticidad en ratones adultos) (Bornia, 2015).

## Conclusión y perspectivas

En conclusión, los datos obtenidos en el presente trabajo sugieren que la Cofilina 1 es un potencial candidato a la regulación de los procesos de plasticidad en la corteza visual del ratón. Para poder caracterizar en mayor detalle este posible rol, en el laboratorio planificamos realizar las siguientes aproximaciones:

- Estudiar la expresión y la localización espacio-temporal de la Cofilina 1 y de su forma fosforilada en la corteza visual del ratón durante el desarrollo y en distintas condiciones de plasticidad (por ejemplo plasticidad restaurada por tratamiento con fluoxetina).
- Verificar si la expresión / estado de activación de la Cofilina 1 es modulada por el input visual.
- Modular la expresión / estado de activación de la Cofilina 1 y analizar los posibles efectos sobre procesos de plasticidad estructural y funcional. Como moduladores de la Cofilina 1 estamos utilizando péptidos miméticos en estado fosforilado o menos, que actúan como inhibidores de la fosfatasa y de la quinasa respectivamente. Estos péptidos serán utilizado *in vitro* para estudiar los efectos sobre los procesos de plasticidad a largo plazo como la LTD y la LTP. También se utilizarán *in vivo* para estudiar los efectos sobre la densidad de las espinas dendríticas en un modelo de plasticidad estructural inducida por privación monocular. Finalmente, esperamos poder utilizar también estos péptidos *in vivo* para estudiar la plasticidad de la dominancia ocular.



## BIBLIOGRAFÍA

- Abe H, Obinata T, Minamide LS, Bamberg JR. (1996) *Xenopus laevis* actin-depolymerizing factor/cofilin: a phosphorylation-regulated protein essential for development. *J Cell Biol* **32**,871-85.
- Bamberg JR, Harris HE, Weeds AG. (1980) Partial purification and characterization of an actin depolymerizing factor from brain. *FEBS Lett.* **121**,178-82.
- Bardin J. (2012) Neurodevelopment: unlocking the brain. *Nature.*, **487**,24-6.
- Bavelier D, Levi DM, Li RW, Dan Y, Hensch TK. (2010) Removing brakes on adult brain plasticity: from molecular to behavioral interventions. *J Neurosci.* **30**, 14964-71.
- Bellenchi GC, Gurniak CB, Perlas E, Middei S, Ammassari-Teule M, Witke W. (2007) N-cofilin is associated with neuronal migration disorders and cell cycle control in the cerebral cortex. *Genes Dev.* **21**, 2347-57.
- Berardi N, Pizzorusso T, Maffei L. (2000) Critical periods during sensory development. *Curr Opin Neurobiol* **1**,138-145.
- Bernstein BW, Bamberg JR. (2010) ADF/cofilin: a functional node in cell biology. *Trends Cell Biol.* **4**,187-95.
- Bonhoeffer T, Yuste R. (2002) Spine motility. Phenomenology, mechanisms, and function. *Neuron.* **35**,1019-27.
- Bornia N. (2015) Tesis de maestría: Estudio de la expresión de variantes y de modificaciones postraduccionales de histonas en un modelo de plasticidad de la corteza visual. *Laboratorio de Neurociencias – “Unidad de Neuroplasticidad” Facultad de Ciencias UdelaR.*
- Bosch M, Castro J, Saneyoshi T, Matsuno H, Sur M, Hayashi Y. (2014) Structural and molecular remodeling of dendritic spine substructures during long-term potentiation. *Neuron* **82**,444-59.
- Buisseret P, Gary-Bobo E, Imbert M. (1982) Plasticity in the kitten's visual cortex: effects of the suppression of visual experience upon the orientational properties of visual cortical cells. *Brain res.* **256**,417-26.
- Calabrese B, Saffin JM, Halpain S. (2014) Activity-dependent dendritic spine shrinkage and growth involve downregulation of cofilin via distinct mechanisms. *PLoS One.* **9**, e94787.
- Calabrese B, Halpain S. (2014) Lithium prevents aberrant NMDA-induced F-actin reorganization in neurons. *Neuroreport.* **25**, 1331-7.
- Cao F, Zhou Z, Pan X, Leung C, Xie W, Collingridge G, Jia Z. (2017) Developmental regulation of hippocampal long-term depression by cofilin-mediated actin reorganization. *Neuropharmacology.* **112**,66-75.

Cerri C, Fabbri A, Vannini E, Spolidoro M, Costa M, Maffei L, Fiorentini C, Caleo M. (2011) Activation of Rho GTPases triggers structural remodeling and functional plasticity in the adult rat visual cortex. *J Neurosci.* **31**, 15163-72.

Cerri C, Pietrasanta M, Restani L. (2014) Structural underpinnings of functional plasticity in rodent visual cortex. *Arch Ital Biol.* **152**,179-89.

Chen LY, Rex CS, Casale MS, Gall CM, Lynch G. (2007) Changes in synaptic morphology accompany actin signaling during LTP. *J Neurosci.* **27**, 5363-72.

Crowley JC, Katz LC. (1999) Development of ocular dominance columns in the absence of retinal input. *Nat Neurosciences.* 1125-30.

Fagiolini M, Hensch TK. (2000) Inhibitory threshold for critical-period activation in primary visual cortex. *Nature.* **404**,183-6.

Galizia G, Lledo P-M. (2013) Neurosciences - From Molecule to Behavior: a university textbook. Springer Eds.

Gordon JA, Stryker MP. (1996) Experience-dependent plasticity of binocular responses in the primary visual cortex of the mouse. *J Neurosci.* **16**, 3274-86.

Görlich A, Wolf M, Zimmermann AM, Gurniak CB, Al Banchaabouchi M, Sassoè-Pognetto M, Witke W, Friauf E, Rust MB. (2011) N-cofilin can compensate for the loss of ADF in excitatory synapses. *PLoS One.* **6**, e26789.

Govek EE, Newey SE, Akerman CJ, Cross JR, Van der Veken L, Van Aelst L. (2004) The X-linked mental retardation protein oligophrenin-1 is required for dendritic spine morphogenesis. *Nat. Neurosci.* **7**,364-72.

Gray V, Karmiloff-Smith A, Funnell E, Tassabehji M. (2006) In-depth analysis of spatial cognition in Williams's syndrome: A critical assessment of the role of the LIMK1 gene. *Neuropsychologia.* **44**,679-85.

Gu J, Lee CW, Fan Y, Komlos D, Tang X, Sun C, Yu K, Hartzell HC, Chen G, Bamberg JR, Zheng JQ. (2010) ADF/cofilin-mediated actin dynamics regulate AMPA receptor trafficking during synaptic plasticity. *Nat Neurosci.* **13**, 1208-15.

Hall A. (1998) Rho GTPases and the actin cytoskeleton. *Science.* **279**,509-14.

Hammer O., Harper D. A. T., Ryan P. D. (2001) PAST: Paleontological statistics software package for education and data analysis. *Palaeontologia Electronica* 4, 9.

Harris KM, Kater SB. (1994) Dendritic spines: cellular specializations imparting both stability and flexibility to synaptic function. *Annu Rev Neurosci.* **17**,341-71.

Hensch TK. (2004) Critical period regulation. *Annu Rev Neurosci.*, **27**,549-79.

- Hensch TK, Fagiolini M, Mataga N, Stryker MP, Baekkeskov S, Kash SF. (1998) Local GABA circuit control of experience-dependent plasticity in developing visual cortex. *Science*. **282**, 1504-8.
- Hensch TK, Fagiolini M. (2005) Excitatory-inhibitory balance and critical period plasticity in developing visual cortex. *Prog Brain Res*. **147**,115-24.
- Hensch TK. (2005) Critical period mechanisms in developing visual cortex. *Curr Top Dev Biol*. **69**,215-37.
- Holtmaat A, Svoboda K. (2009) Experience-dependent structural synaptic plasticity in the mammalian brain. *Nat Rev Neurosci*. **10**,647-58.
- Hotulainen P, Llano O, Smirnov S, Tanhuanpää K, Faix J, Rivera C, Lappalainen P. (2009) Defining mechanisms of actin polymerization and depolymerization during dendritic spine morphogenesis. *J Cell Biol*. **185**,323-39.
- Lai KO, Ip NY. (2013) Structural plasticity of dendritic spines: the underlying mechanisms and its dysregulation in brain disorders. *Biochim Biophys Acta*. **1832**, 2257-63.
- Lauterborn JC, Kramár EA, Rice JD, Babayan AH, Cox CD, Karsten CA, Gall CM, Lynch G. (2017) Cofilin Activation Is Temporally Associated with the Cessation of Growth in the Developing Hippocampus. *Cereb Cortex*. **27**, 2640-2651.
- Li M, Cui Z, Niu Y, Liu B, Fan W, Yu D, Deng J. (2010) Synaptogenesis in the developing mouse visual cortex. *Brain Res Bull*. **81**,107-13.
- Li Z, Van Aelst L, Cline HT. (2000) Rho GTPases regulate distinct aspects of dendritic arbor growth in *Xenopus* central neurons in vivo. *Nat Neurosci*. **3**,217-25.
- Long MA, Cruikshank SJ, Jutras MJ, Connors BW. (2005) Abrupt maturation of a spike-synchronizing mechanism in neocortex. *J Neurosci*. **25**, 7309-16.
- Luo L, Jan L, Jan YN. (1996) Small GTPases in axon outgrowth. *Perspect Dev Neurobiol*. **4**,199-204.
- Maekawa S, Nishida E, Ohta Y, Sakai H. *J Biochem*. (1983) Isolation of low molecular weight actin-binding proteins from porcine brain. *J Biochem* **2**,377-85.
- Matsuzaki M, Honkura N, Ellis-Davies GC, Kasai H. (2004) Structural basis of long-term potentiation in single dendritic spines. *Nature* **429**,761-6.
- Mizuno K. (2013) Signaling mechanisms and functional roles of cofilin phosphorylation and dephosphorylation. *Cell Signal*. **2**,457-69.
- Nägerl UV, Eberhorn N, Cambridge SB, Bonhoeffer T. (2004) Bidirectional activity-dependent morphological plasticity in hippocampal neurons. *Neuron*. **44**,759-67.
- Nakayama AY, Luo L. (2000) Intracellular signaling pathways that regulate dendritic spine morphogenesis. *Hippocampus*. **10**,582-6.

Nimchinsky EA, Sabatini BL, Svoboda K. (2002) Structure and function of dendritic spines. *Annu Rev Physiol.* **64**,313-53.

Niwa R, Nagata-Ohashi K, Takeichi M, Mizuno K, Uemura T. (2002) Control of actin reorganization by Slingshot, a family of phosphatases that dephosphorylate ADF/cofilin. *Cell.* **108**,233-46.

Ohta Y, Kousaka K, Nagata-Ohashi K, Ohashi K, Muramoto A, Shima Y, Niwa R, Uemura T, Mizuno K. (2003) Differential activities, subcellular distribution and tissue expression patterns of three members of Slingshot family phosphatases that dephosphorylate cofilin. *Genes Cells.* **8**,811-24.

Okamoto K, Nagai T, Miyawaki A, Hayashi Y. (2004) Rapid and persistent modulation of actin dynamics regulates postsynaptic reorganization underlying bidirectional plasticity. *Nat Neurosci.* **10**, 1104-12.

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

Racz B, Weinberg RJ. (2006) Spatial organization of cofilin in dendritic spines. *Neuroscience.* **138**,447-56.

Rust MB, Gurniak CB, Renner M, Vara H, Morando L, Görlich A, Sassoè-Pognetto M, Banhaabouchi MA, Giustetto M, Triller A, Choquet D, Witke W. (2010) Learning, AMPA receptor mobility and synaptic plasticity depend on n-cofilin-mediated actin dynamics. *EMBO J.* **29**, 1889-902.

Rust MB. (2015) ADF/cofilin: a crucial regulator of synapse physiology and behavior. *Cell Mol Life Sci.* **72**, 3521-9.

Sale A, Berardi N, Spolidoro M, Baroncelli L, Maffei L. (2010) GABAergic inhibition in visual cortical plasticity. *Front Cell Neurosci.* **4**, 10.

Shen J, Colonnese MT. (2016) Development of Activity in the Mouse Visual Cortex. **36**,12259-12275.

Sin WC, Haas K, Ruthazer ES, Cline HT. (2002) Dendrite growth increased by visual activity requires NMDA receptor and Rho GTPases. *Nature.* **419**,475-80.

Sobczyk A, Scheuss V, Svoboda K. (2005) NMDA receptor subunit-dependent [Ca<sup>2+</sup>] signaling in individual hippocampal dendritic spines. *J Neurosci.* **25**, 6037-46.

Stephany CÉ, Chan LL, Parivash SN, Dorton HM, Piechowicz M, Qiu S, McGee AW. (2014) Plasticity of binocularity and visual acuity are differentially limited by nogo receptor. *J Neurosci.* **34**, 11631-40.

Sur M, Rubenstein JL. (2005) Patterning and plasticity of the cerebral cortex. *Science.* **310**,805-10.

Tackenberg C, Ghori A, Brandt R. (2009) Thin, stubby or mushroom: spine pathology in Alzheimer's disease. *Curr Alzheimer Res.* **6**,261-8.

Takesian AE, Hensch TK. (2013) Balancing plasticity/stability across brain development. *Prog Brain Res.* **207**,3-34.

- Tashiro A, Minden A, Yuste R. (2000) Regulation of dendritic spine morphology by the rho family of small GTPases: antagonistic roles of Rac and Rho. *Cereb Cortex*. **10**,927-38.
- Threadgill R, Bobb K, Ghosh A. (1997) Regulation of dendritic growth and remodeling by Rho, Rac, and Cdc42. *Neuron*. **19**,625-34.
- Trachtenberg JT (2015) Competition, inhibition, and critical periods of cortical plasticity. *Curr Opin Neurobiol*. **35**,44-8.
- Tropea D, Van Wart A, & Sur M. (2009) Molecular mechanisms of experience-dependent plasticity in visual cortex. *Biological Sciences*. **364**, 341-355.
- Tsubota T, Okubo-Suzuki R, Ohashi Y, Tamura K, Ogata K, Yaguchi M, Matsuyama M, Inokuchi K, Miyashita Y. (2015) Cofilin1 controls transcolumnar plasticity in dendritic spines in adult barrel cortex. *PLoS Biol*. **13**, e1002070
- Van Versendaal D, Levelt CN. (2016) Inhibitory interneurons in visual cortical plasticity. *Cell Mol Life Sci*. , **73**, 3677-91.
- Verkuyll JM, Matus A. (2006) Time-lapse imaging of dendritic spines in vitro. *Nat Protoc*. **1**, 2399-405.
- Vierci G, Pannunzio B, Bornia N, Rossi FM. (2016) H3 and H4 Lysine Acetylation Correlates with Developmental and Experimentally Induced Adult Experience-Dependent Plasticity in the Mouse Visual Cortex. *J Exp Neurosci*. **10**, 49-64.
- Vierci G. (2012) Tesis de grado: Análisis del rol de Creb en el colículo superior en tres modelos de plasticidad: fisiológica, inducida y reactivada.
- Wang Y, Dong Q, Xu XF, Feng X, Xin J, Wang DD, Yu H, Tian T, Chen ZY. (2013) Phosphorylation of cofilin regulates extinction of conditioned aversive memory via AMPAR trafficking. *J Neurosci*. **33**, 6423-33.
- Wiesel TN, Hubel DH. (1963) Single-cell responses in striate cortex of kittens deprived of vision in one eye. *J Neurophysiol*. **26**, 1003-17.
- Wiesel TN, Hubel DH. (1965) Extent of recovery from the effects of visual deprivation in kittens. *J Neurophysiol*. **6**, 1060-72.
- Yuste R, Bonhoeffer T. (2001) Morphological changes in dendritic spines associated with long-term synaptic plasticity. *Annu Rev Neurosci*. **24**, 1071-89.
- Zhou Q, Homma KJ, Poo MM. (2004) Shrinkage of dendritic spines associated with long-term depression of hippocampal synapses. *Neuron* **44**,749-57.
- Zito K, Murthy VN. (2002) Dendritic spines. *Curr Biol*. **12**(1):R5.