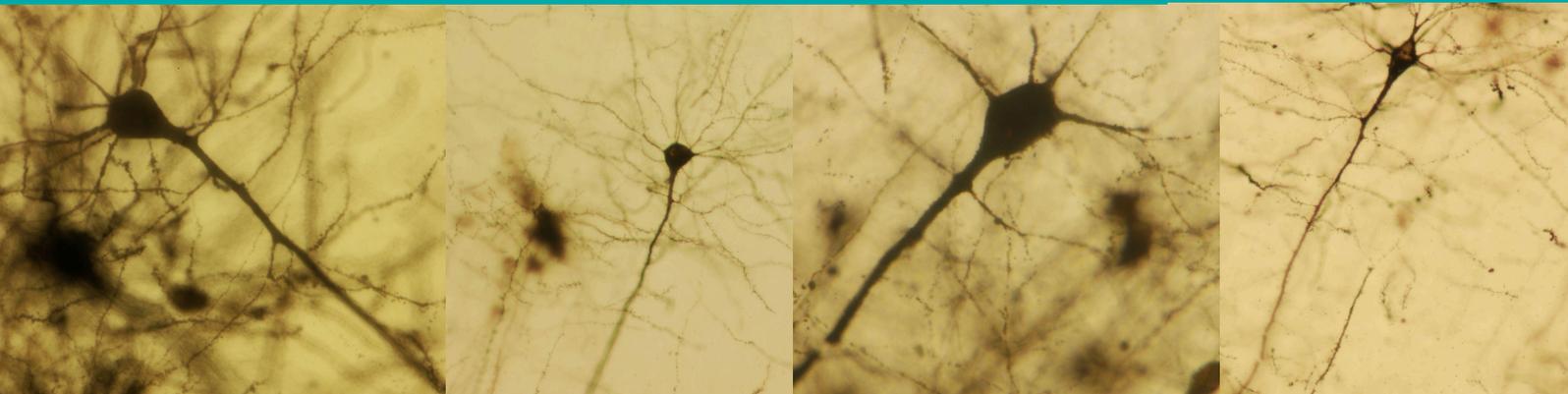


Tesina de grado de la Licenciatura en Ciencias Biológicas

Estudio de los efectos de la modulación de la cofilina 1 en la plasticidad de la corteza visual del ratón.

Emilia Hayek



Tutor: Francesco Mattia Rossi
Co-Tutor: Alejo Acuña
Laboratorio: Laboratorio de
Neurociencias, Facultad de Ciencias,
UDELAR.

Agradecimientos

Primero que nada quiero darle las gracias a Francesco, mi tutor, por permitirme realizar mi tesina de grado en su laboratorio, confiar en mí para participar en las líneas de investigación del laboratorio y guíarme en este proceso. En segundo lugar quiero agradecerle a Alejo que además de cumplir el rol de co-tutor, fue un apoyo tanto a nivel académico como personal en el tramo final de mi carrera.

También me gustaría agradecer a Ivanna, que fue no solamente mi tutora de PAIE, sino también un apoyo fundamental en el último tramo de mi carrera, que sin tener que hacerlo, siempre estuvo aconsejándome y guiándome para hacer este camino más fácil.

Agradecer a todas y todos los integrantes del piso 4 por abrirme las puertas e incluirme desde el momento uno en todas las charlas, actividades y encuentros.

Luego, pero no menos importante, agradecer a mi familia, pero principalmente a mi madre, mi padre y mi hermano, por estar ahí desde el día en que me anoté en la carrera, siempre haciendo que todo sea más sencillo. También a Pedro, por bancarme la cabeza en todo este proceso desde que me conoce, siempre creyendo en mí y apoyándome.

Por último, gracias a mis amigas y amigos, por siempre creer en que iba a llegar hasta acá y celebrar los pequeños logros juntos, y principalmente a mis compañeras y compañeros de facultad, que hicieron este camino mucho más liviano y llevadero. Quiero agradecer especialmente a Tati, por ser mi compañera y luego amiga desde el primer día que fuimos universitarias.

Sin ellos todo esto no hubiera sido igual de disfrutable, ¡Gracias!

Índice:

Resumen:	4
Introducción:	5
Plasticidad del Sistema Nervioso y períodos críticos.....	5
La corteza visual como modelo de estudio de la plasticidad.....	6
La cofilina 1 y su implicancia en los procesos de plasticidad neuronal.....	9
Introducción al proyecto.....	11
Hipótesis:	11
Objetivo general:	11
Objetivos específicos:	12
Materiales y métodos:	12
1. Animales experimentales.....	12
2. Manipulaciones:.....	12
2.1. Administración de los péptidos.....	12
2.2. Privación monocular de la visión.....	13
2.3. Eutanasia.....	13
3. Análisis de la agudeza visual.....	13
3.1. Test optomotor.....	13
3.2. Análisis y cuantificación de videos.....	15
4. Análisis de la densidad de espinas dendríticas.....	15
4.1. Tinción de Golgi.....	15
4.2. Procesamiento y cuantificación de las imágenes.....	16
5. Grupos experimentales.....	17
6. Estadística.....	17
Resultados:	17
1. La modulación de la actividad de la cofilina 1 restaura la plasticidad estructural en animales adultos.....	17
2. La modulación de la actividad de la cofilina 1 restaura la plasticidad de la visión en animales adultos.....	19
Discusión:	21
Conclusión:	24
Bibliografía:	25

Resumen:

La plasticidad neuronal dependiente de la experiencia es una propiedad fundamental del Sistema Nervioso, esencial en la formación de los circuitos neuronales. La misma se encuentra relacionada, por ejemplo, con los procesos de aprendizaje y memoria. Por lo tanto, comprender los mecanismos involucrados en este proceso es de suma importancia, no solo para entender la formación de estos circuitos, sino también para caracterizar posibles alteraciones en el desarrollo, y por tanto, el origen de algunos trastornos del desarrollo cerebral.

Esta forma de plasticidad se encuentra fuertemente potenciada dentro de una determinada ventana temporal llamada período crítico (PC) y una vez que este período concluye, disminuye significativamente.

La corteza visual (CV) primaria es uno de los modelos más utilizados para estudiar los procesos de plasticidad dependiente de la experiencia. Actualmente, se han identificado dos grandes grupos de mecanismos que participan en la plasticidad en la CV: funcionales y estructurales. Sin embargo, los mecanismos celulares y moleculares que subyacen a estos procesos aún no están del todo claros.

En este contexto, el grupo con el cual desarrollé mi Tesis de Grado, identificó varias proteínas que se expresan de forma diferencial en la CV, entre ratones jóvenes con altos niveles de plasticidad y ratones adultos no plásticos. Entre ellas identificaron a la cofilina 1, para la cual observaron que su expresión en la CV es alta en animales jóvenes plásticos, en comparación con animales adultos con escasa plasticidad. Todas estas evidencias sugirieron, por primera vez, que la cofilina 1 podría ser un candidato que participa en la regulación de la plasticidad en la CV del ratón.

En este proyecto verificamos si la modulación farmacológica de la cofilina 1 restaura en animales adultos altos niveles de plasticidad dependiente de la experiencia. En específico, utilizamos la clásica manipulación experimental de la Privación Monocular de la visión, la cual se ha demostrado que induce efectos a nivel funcional, estructural y de la visión en animales jóvenes plásticos pero no en adultos. La cofilina 1 se moduló por medio de la administración de péptidos que alteran su estado de fosforilación inhibiendo su actividad.

Nuestros resultados indican que la modulación de la cofilina 1 en animales adultos restaura altos niveles de plasticidad en la corteza visual. Esto lo observamos, a nivel estructural como una disminución en la densidad de espinas dendríticas en la corteza visual contralateral al ojo privado de visión, y a nivel de la visión como una disminución en la agudeza visual en el ojo privado de visión.

Esto demuestra por primera vez que la cofilina 1 está involucrada en la regulación de la plasticidad dependiente de la experiencia en la corteza visual.

Introducción:

Plasticidad del Sistema Nervioso y períodos críticos

El sistema nervioso (SN) traduce la información del mundo exterior a través de señales generadas por la actividad eléctrica asociada a las entradas sensoriales, organizando respuestas adaptativas a las condiciones ambientales cambiantes. Esta interacción con el entorno es fundamental para la supervivencia de las especies, ya que permite que un individuo perciba y responda adecuadamente a los cambios en las condiciones ambientales (Galizia & Lledó, 2013).

En respuesta a estos estímulos ambientales, el SN tiene la capacidad de cambiar, funcional y estructuralmente, propiedad conocida como plasticidad neuronal dependiente de la experiencia. Esta es una característica fundamental siendo de particular relevancia en los procesos de aprendizaje y memoria (Galizia & Lledó, 2013).

Esta forma de plasticidad se manifiesta fuertemente dentro de una determinada ventana temporal denominada período crítico (PC), durante el cual las redes neuronales son extremadamente sensibles a la experiencia. Una vez que este período concluye, la influencia de los estímulos ambientales sobre la organización del sistema nervioso disminuye significativamente (Galizia & Lledó, 2013). Es importante destacar que el momento del desarrollo en el que ocurre el periodo crítico varía entre distintos sistemas sensoriales y funcionales (Reh et al., 2020). Por ejemplo, en ratones, el período crítico en el sistema somato-sensorial comienza antes que en el sistema visual, y ambos ocurren antes del período crítico para el aprendizaje de funciones multimodales (Fig. 1) (Reh et al., 2020).

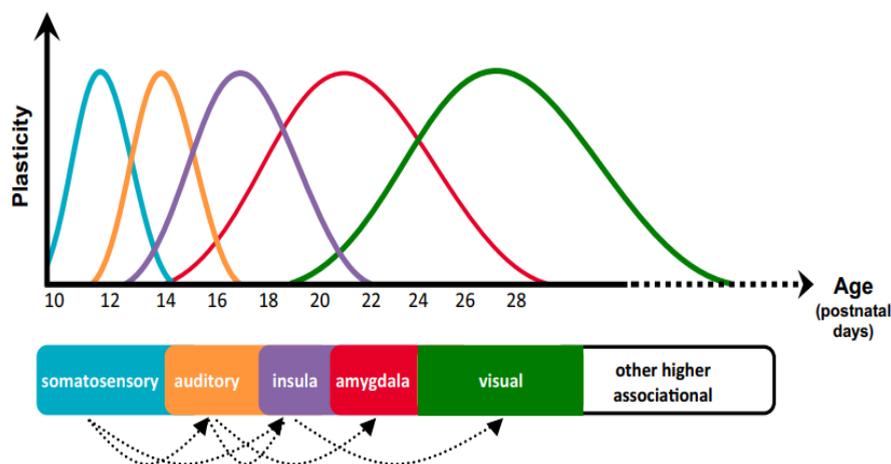


Figura 1. Esquema temporal de los períodos críticos de plasticidad en el cerebro de ratón. Ventanas temporales para la plasticidad máxima en la corteza somato-sensorial, la corteza auditiva, la corteza insular, la amígdala, la corteza visual y áreas cognitivas superiores (Figura tomada de Reh et al., 2020).

Entender los mecanismos involucrados en el desarrollo y la plasticidad de las conexiones es importante no sólo para comprender la formación de los circuitos neuronales,

sino también para especificar posibles desviaciones de un plan de desarrollo normal y, por lo tanto, la etiología de algunos trastornos del desarrollo cerebral (Tropea et al., 2009).

La corteza visual como modelo de estudio de la plasticidad

En este contexto, uno de los modelos experimentales más estudiados para analizar procesos de plasticidad cerebral es la corteza visual (CV) primaria (Galizia & Lledó, 2013). Una de las razones se debe a que la experiencia visual se puede manipular fácilmente y los efectos de las manipulaciones se pueden medir también con facilidad a nivel anatómico, fisiológico y molecular (Tropea et al., 2009).

En los mamíferos, la CV primaria es el primer punto a lo largo de la vía visual donde la información proveniente de ambos ojos converge a nivel de neuronas individuales, y muchas neuronas en esta área pueden ser activadas por estimulación a través de cualquiera de los ojos. Estas neuronas se encuentran en la zona de la corteza conocida como corteza visual binocular (CVb). Cada hemi-corteza (izquierda y derecha) recibe mayormente inputs proveniente del ojo contralateral, de modo que cada una es “dominada” por uno de los dos ojos. A esta propiedad se la conoce como dominancia ocular (Fig. 2). La dominancia ocular se evidencia como un mayor número de células corticales que responden al estímulo del ojo contralateral y un menor número que responde al estímulo del ojo ipsilateral. En algunos mamíferos superiores (monos, gatos, hurones), la dominancia ocular se evidencia también a nivel macroscópico. En estas especies las neuronas que responden exclusivamente a uno de los dos ojos se agrupan anatómicamente en una parte específica de la capa IV de la CV formando columnas, que se alternan con columnas donde se agrupan las células que responden al otro ojo (las columnas de dominancia ocular). (Fig. 2) (Levelt & Hubener, 2012).

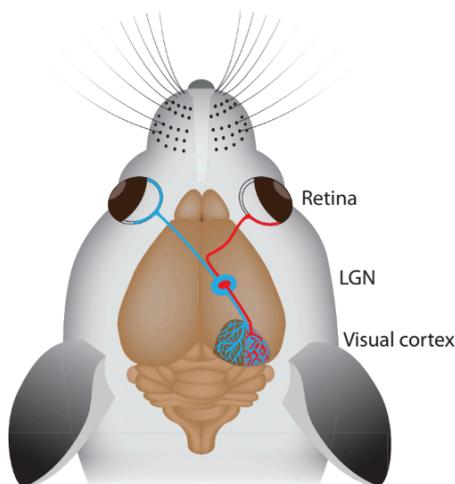


Figura 2. Esquema del sistema visual del ratón. La mayoría de los axones de las células ganglionares de la retina cruzan la línea media a nivel del quiasma óptico y terminan en el núcleo geniculado lateral (LGN) del hemisferio contralateral (azul). Un número muy pequeño de axones de la retina temporal no cruzan y terminan en el LGN ipsilateral (rojo). En el LGN, las entradas de ambos ojos permanecen segregadas. La parte medial de la corteza visual primaria (CVm, monocular) recibe entradas solo de la retina contralateral (azul), mientras que la parte lateral (CVb, binocular) también recibe proyecciones ipsilaterales (rojo). En esta región binocular de la CV, la mayoría de las neuronas responden a estímulos visuales presentados a cualquiera de los dos ojos, pero la entrada del ojo contralateral es más fuerte en general (Figura modificada de Levelt & Hubener, 2012).

Estudios pioneros permitieron identificar y caracterizar el PC de plasticidad dependiente de la experiencia en la CV, utilizando el clásico paradigma de privación

monocular (PM) de la visión. Este último consiste en cerrar temporalmente un ojo y, luego de un corto periodo de tiempo, re-abrirlo y analizar los efectos de esta manipulación (Wiesel & Hubel, 1963; Wiesel & Hubel, 1965). Se ha demostrado que a nivel funcional, la PM durante el PC reduce la dominancia del ojo privado temporalmente de la visión en la CV contralateral a dicho ojo, aumentando la dominancia del ojo que se mantuvo abierto (Fig. 3). Por otro lado, la PM tiene también efectos a nivel estructural. Estos se puede observar como una reducción de las ramificaciones axonales de las aferencias a la CV contralateral al ojo cerrado, y como un aumento de las del ojo que quedó abierto. También ocurre una reducción de las ramificaciones dendríticas y de la densidad de las espinas dendríticas en la CV contralateral al ojo que fue privado de visión (Levelt & Hübener, 2012). Finalmente, se observa también una fuerte afectación de la visión en el ojo que fue cerrado, observada como una disminución de la agudeza visual y de la sensibilidad al contraste (ambliopía) (Hensch, 2005). Por el contrario, cuando la PM es realizada en animales adultos, induce escasos o nulos efectos.

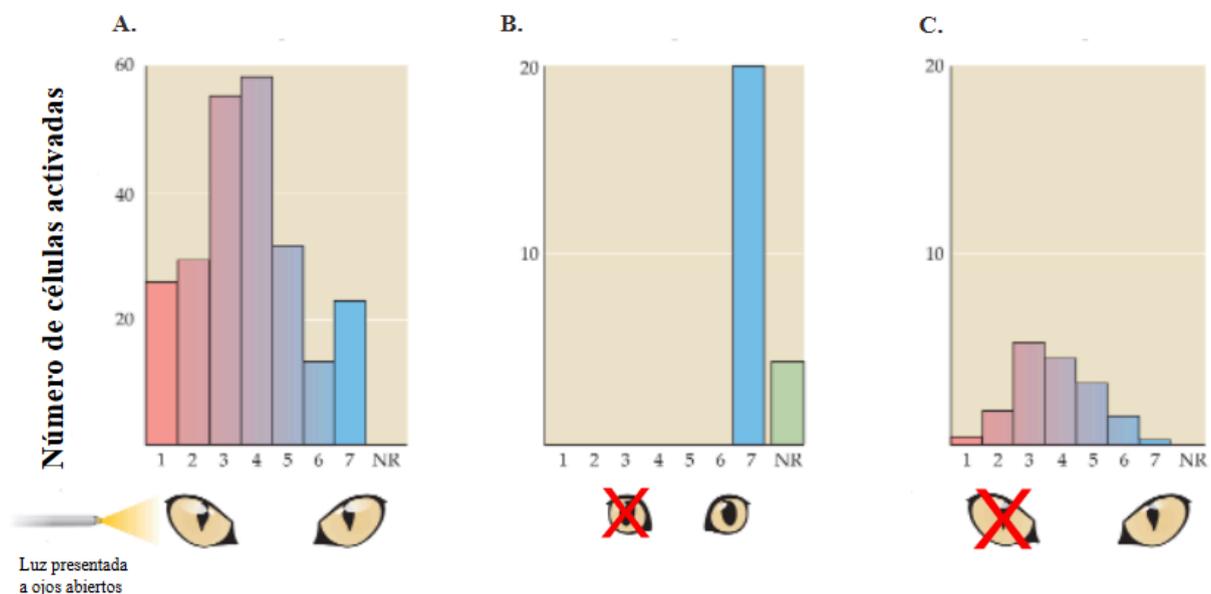


Figura 3. Plasticidad de la dominancia ocular (DO) en la corteza visual primaria de gato. Los histogramas muestran el número de células que pertenecen a alguna de las siete categorías de dominancia ocular, definidas según la frecuencia de respuestas a la estimulación de cada ojo respectivamente. (a) Distribución de las clases de dominancia ocular en la CV primaria de animales adultos normales. Las células del grupo 1 son activadas exclusivamente por la estimulación del ojo contralateral, las del grupo 7 por el ojo ipsilateral, las de los grupos 2-6 responden a ambos ojos. (b) La PM durante el PC de plasticidad genera un cambio notorio en la distribución de las clases de dominancia ocular, ya que ahora las células responden principalmente al ojo ipsilateral. (c) La PM en animales adultos fuera del PC de plasticidad no induce cambios fuertes en la dominancia ocular, aunque hay una reducción de la actividad cortical en general (Figura modificada de Purves et al., 2018).

Un aspecto relevante es que los efectos deletéreos de la privación de la visión pueden revertirse, por ejemplo, usando la oclusión inversa. Esta técnica consiste en reabrir el ojo que previamente fue privado de visión, y realizar la PM en el ojo que inicialmente se encontraba abierto (Berardi et al., 2003). Pero es fundamental aclarar que esta estrategia es

Los factores estructurales son aquellos que involucran moléculas encargadas de regular la formación y eliminación de sinapsis y la morfología de axones, dendritas y espinas dendríticas (McGee et al., 2005; Syken et al., 2006). Dentro de estos factores se encuentran frenos estructurales que impiden físicamente la poda y el crecimiento de las neuritas. Su eliminación genera una potente plasticidad en la edad adulta, que puede utilizarse para corregir trastornos del desarrollo neurológico. Algunos de ellos son proteínas relacionadas a la mielina, como NgR y PirB, que inhiben la formación de nuevas conexiones (McGee et al., 2005; Syken et al., 2006). Otros “frenos” consisten en componentes de la matriz extracelular, entre los que se encuentran los proteoglicanos de condroitín sulfato (CSPGs), que forman redes alrededor de las neuronas, limitando su capacidad de remodelación (“redes perineuronales”, PNNs) (Pizzorusso et al., 2006). Es importante mencionar que la maduración de las redes perineuronales coincide con el cierre del periodo crítico. Por último, si se degradan los CSPGs mediante condroitinasa-ABC en ratas adultas, la privación monocular genera un cambio en la dominancia ocular hacia el ojo no privado de visión. En resumen, la matriz extracelular madura inhibe la plasticidad dependiente de la experiencia y la degradación de los CSPG reactiva la plasticidad cortical (Fig. 5) (Pizzorusso et al., 2002).

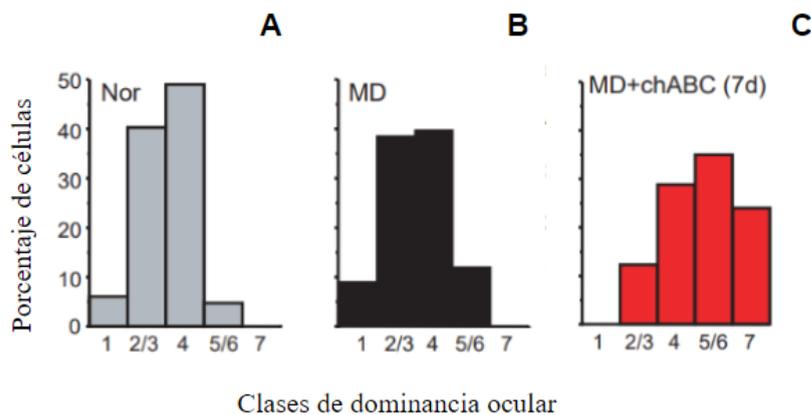


Figura 5. La degradación de CSPG restaura la plasticidad de la dominancia ocular en la corteza visual adulta. Gráficos de clases de dominancia ocular de ratas adultas (A) normales sin privación monocular (Nor), (B) normales con privación monocular (MD), (C) tratadas con condroitinasa-ABC con privación monocular (MD+chABC). No hay cambios de dominancia ocular en los animales adultos normales sin privación monocular ni en los animales con privación monocular durante 7 días. Sin embargo, se observa un cambio significativo de dominancia ocular hacia el ojo ipsilateral no privado de visión en animales tratados con chABC con privación monocular. (Figura modificada de Pizzorusso et al., 2002).

La cofilina 1 y su implicancia en los procesos de plasticidad neuronal

La principal línea de investigación de la “Unidad de Neuroplasticidad” del Laboratorio de Neurociencias, es el estudio de los mecanismos celulares y moleculares de plasticidad, utilizando como modelo experimental la CV del ratón. Recientemente, este grupo ha utilizado un enfoque proteómico para identificar perfiles proteicos diferenciales en la CV en ratones jóvenes plásticos, en comparación con ratones adultos que presentan bajos niveles

de plasticidad y en animales adultos tratados con fluoxetina (plasticidad alta restaurada farmacológicamente) (Ruiz-Perera et al., 2015; Bornia et al., 2020). Mediante esta aproximación, lograron identificar varias proteínas con expresión diferencial entre las distintas condiciones, entre ellas la cofilina 1. A partir de estos resultados estudiaron los niveles de expresión de la cofilina 1 en las distintas condiciones experimentales mencionadas anteriormente mediante western blot e inmunohistoquímica. Los niveles de esta proteína son altos en la CV de animales con altos niveles de plasticidad (tanto animales jóvenes, como adultos tratados con fluoxetina), y bajos en animales con escasa plasticidad. Además, se evidenció que la expresión proteica de la cofilina 1 está regulada durante el PC y que la PM de la visión modula su expresión durante el PC, pero no en el adulto (Laguardia et al., 2023). Todas estas evidencias sugirieron, por primera vez, que la cofilina 1 podría ser un candidato que participa en la regulación de la plasticidad en la CV del ratón.

La cofilina es una proteína despolimerizante de la actina perteneciente a la familia de proteínas ADF/Cofilina, que en los mamíferos consta de tres proteínas: cofilina 1 (no muscular/n-cofilina), cofilina 2 (muscular/m-cofilina) y ADF (Dextrina/Factor Despolimerizante de la Actina). La cofilina 1 y ADF son abundantes en el cerebro, particularmente en las sinapsis excitatorias (Racz & Weinberg, 2006; Bellenchi et al., 2007; Rust et al., 2010; Görlich et al., 2011).

La cofilina 1 puede unirse tanto a la actina G (globular, estado monomérico), como a la actina F (filamentosa, polímero lineal). Cuando se une a la actina F induce la ruptura del filamento de una manera dependiente de la concentración, generando extremos nuevos del filamento. Si hay una baja relación cofilina/actina la ruptura ocurre de forma más rápida y por lo tanto se da también de forma más rápida la despolimerización. Por el contrario, con una alta relación cofilina/actina, la ruptura se inhibe, favoreciendo la polimerización de la actina a través de la nucleación. Por lo tanto, la cofilina 1 es capaz de controlar la dinámica de la actina a través de la polimerización y la despolimerización (Namme et al., 2021).

La actividad de la cofilina 1 a su vez es regulada, a nivel molecular por fosforilación / desfosforilación, unión a otras moléculas regulatorias y modificaciones redox. La fosforilación / desfosforilación en el residuo conservado Ser-3, es la modificación postraduccional reconocida como el principal mecanismo regulador de su actividad (Yang et al., 1998; Meng et al., 2002). La cofilina 1 es activada por desfosforilación por fosfatasas de la familia slingshot (SSH1-3; siendo la SSH1 la más efectiva), mientras que es inactivada por fosforilación por las quinasas LIM (LIMK) (Namme et al., 2021).

Algunos estudios, realizados principalmente *in vitro* y en el hipocampo, han demostrado que a nivel postsináptico, la cofilina 1 es un factor fundamental en el control de la densidad y morfología de las espinas dendríticas, y también de la potenciación / depresión a largo plazo (LTP/LTD) a través de la modulación de la movilidad de los receptores glutamatérgicos de tipo AMPA. Además, del lado presináptico, se ha implicado a la cofilina 1 en los procesos que controlan la movilización y la exocitosis de las vesículas sinápticas (Kessels & Malinow, 2009; Rust et al., 2010; Hotulainen & Hoogenraad, 2010; Wolf et al., 2015).

Las espinas dendríticas son protuberancias que emergen de las dendritas de las neuronas que funcionan como compartimentos postsinápticos especializados y median la mayor parte de la transmisión sináptica excitatoria en el cerebro. (Zito & Murthy, 2002; Verkuyl & Matus, 2006; Cingolani & Goda, 2008). Su principal componente estructural es la actina, que en el citoesqueleto postsináptico no es una estructura estática, sino altamente dinámica (Namme, et al., 2021). Imágenes obtenidas por microscopía de dos fotones *in vivo* revelaron polimerización y despolimerización de actina dependiente de la actividad eléctrica en espinas dendríticas durante la plasticidad sináptica (Okamoto et al., 2004; Okamoto & Hayashi, 2006; Borovac et al., 2018; Gu et al., 2010).

Se sabe que la plasticidad estructural, incluyendo la estructura de las espinas dendríticas, es un componente importante en la función y eficacia sináptica, tanto en el lado presináptico como en el lado postsináptico. Hay varias evidencias que sustentan esta afirmación. Entre ellas, se sabe que la LTP implica un aumento en el tamaño de las espinas dendríticas, pudiendo dar como resultado la formación de nuevas sinapsis (Cingolani & Goda, 2008).

Introducción al proyecto

En resumen, aunque algunas evidencias y resultados preliminares del Laboratorio (Bornia et al., 2020; Laguardia et al., 2023) indican un rol de la cofilina 1 en modelos de plasticidad neuronal, poco se sabe sobre su rol en la plasticidad de la CV, su mecanismo de acción, y su relación con otros mecanismos de plasticidad ya caracterizados. Es por esto que actualmente, en el Laboratorio se continúa investigando sobre el posible rol de la cofilina 1 en este sistema, habiendo ya obtenido datos preliminares, aún no publicados, que confirman esta sugerencia. En específico, se observó que la modulación farmacológica *in vivo* de la actividad de la cofilina 1 (por administración *in vivo* del péptido inhibidor de su actividad PCOF) en ratones adultos no plásticos restaura altos niveles de plasticidad estructural, reflejado por una reducción de la densidad de espinas dendríticas en respuesta a la modulación del input visual por PM. Sin embargo, no se sabe cuáles son los efectos a nivel de la visión. Por lo tanto, en este proyecto se propone, en primer lugar, corroborar los datos preliminares sobre los efectos de la modulación de la cofilina 1 en la plasticidad estructural (densidad de espinas dendríticas) y verificar si esta modulación también induce efectos a nivel de la agudeza visual.

Hipótesis:

La modulación farmacológica de la actividad de la cofilina 1 restaura altos niveles de plasticidad neuronal en la corteza visual del ratón adulto.

Objetivo general:

Verificar si la modulación farmacológica de la actividad de la cofilina 1 aumenta la plasticidad dependiente de la experiencia en la CV de ratones adultos.

Objetivos específicos:

1. Verificar si la modulación de la actividad de la cofilina 1 en animales adultos incrementa su sensibilidad a los efectos de la PM sobre la densidad de espinas dendríticas en la CV binocular contralateral al ojo privado de visión.
2. Evaluar si la modulación de la actividad de la cofilina 1 en animales adultos restaura su sensibilidad a los efectos de la PM sobre la agudeza visual en el ojo previamente privado de visión.

Materiales y métodos

1. Animales experimentales

Como modelo de estudio se utilizaron ratones (*Mus musculus*) de la cepa C57B6/J, jóvenes adultos de aproximadamente 60 días de vida posnatal (~P60, n=40 total), mantenidos en condiciones estándar de temperatura ($20\pm 1^\circ\text{C}$), humedad ($\approx 50\%$) y ciclo de luz/oscuridad (14/10 horas), en el bioterio de la Unidad de Reactivos y Biomodelos de Experimentación de la Facultad de Medicina, UdelaR. Los experimentos en animales se han realizado en concordancia con los estándares del Comité de Ética en el Uso de Animales de la Facultad de Ciencias (CEUA) y han sido avalados por la Comisión Honoraria de Experimentación Animal (CHEA). Las manipulaciones experimentales de los animales fueron realizadas exclusivamente por Francesco M. Rossi, quién posee acreditación CNEA de tipo B y C2 (2021-2026). El protocolo de experimentación utilizado ha sido aprobado previamente por la CEUA, Facultad de Ciencias (#1131, ExpFCien 2400 11-000556-20).

2. Manipulaciones:

2.1. Administración de los péptidos

Con el fin de modular la actividad de la cofilina 1 se utilizó el péptido sintético PCOF (GenScript), que incluye los primeros 16 aminoácidos de la cofilina 1 (con el residuo Ser-3 fosforilado, secuencia: RKKRRQRRRMA{pSER}GVAVSDGVKVFN) conjugado al dominio proteico de TAT-HIV, el cual facilita la penetración de la barrera hematoencefálica y la membrana celular. El péptido PCOF compite con la cofilina 1 endógena fosforilada como sustrato de la fosfatasa (SSH1) celular, induciendo un aumento de la cofilina 1 endógena fosforilada, lo que genera una reducción de su actividad (Shaw & Bamburg, 2017). Como control, se utilizó el péptido que contiene solo el dominio TAT-HIV (péptido TAT, secuencia: RKKRRQRRR). Los péptidos se administraron *in vivo* por inyección en la vena lateral caudal (i.v., 100 μl , 15 pmol/g) (Aarts et al., 2002; Borsello et al., 2003; Duffney et al., 2015). Se trataron n=18 animales con el péptido TAT y n=22 con el péptido PCOF.

Resultados preliminares permitieron verificar que los animales tratados por vía intravenosa con el péptido PCOF no mostraron anomalías de comportamiento ni problemas de salud, sugiriendo que este reactivo no condujo al colapso de la red de actina ni indujo efectos secundarios no deseados.

2.2. Privación monocular de la visión

La privación monocular se realizó bajo anestesia con una mezcla de Ketamina/Xilazina/Acedan 100/10/3 mg/Kg (i.p) y se aplicó lidocaína en crema como analgésico local. Los párpados del ojo derecho del animal se suturaron con aguja e hilo de poliéster para cirugía cardiovascular (4-0 Ethibond). Luego de la recuperación de la anestesia, en el postoperatorio, se verificó el estado de los animales y de la sutura, utilizando eventualmente anestésico y antiinflamatorios locales. Luego de 3 días con el ojo cerrado, los animales son anestesiados y se procede a la reapertura del ojo utilizando pinzas y bisturí (Espinosa & Stryker, 1996; Tagawa et al., 2005). Se realizó la PM en n=28 animales.

2.3. Eutanasia

Los animales fueron sacrificados mediante dislocación cervical e inmediatamente se procedió con la disección de los cerebros bajo microscopio estereoscópico, los cuáles fueron procesados directamente para la tinción de Golgi.

3. Análisis de la agudeza visual

3.1. Test optomotor

El test optomotor, utilizado para cuantificar la agudeza visual (AV) a través de una medida conductual (Prusky et al., 2004) se realiza en un aparato que consiste en cuatro monitores formando una arena, con un espejo de piso y otro de techo. En el medio del espejo superior hay un agujero en el que se coloca una cámara (C930e webcam, Logitech) para grabar las pruebas y en el medio del espejo inferior un cilindro de plástico, de 5 cm de diámetro, que funciona de plataforma donde se coloca al animal (Fig. 6).

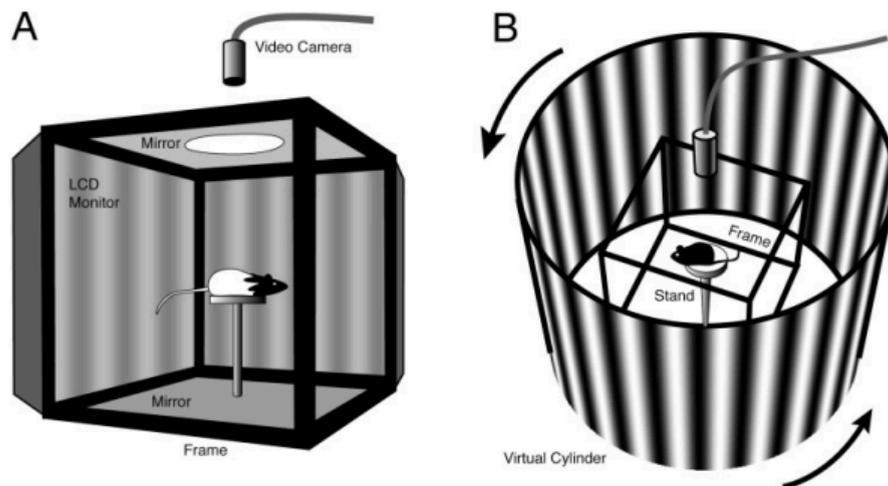


Figura 6. Representación esquemática del aparato donde se realiza el test optomotor. a) Vista lateral. Formado por cuatro monitores en los cuales se proyectan las líneas verticales formando así el “cilindro virtual”. Tanto de piso como de tapa hay un espejo donde se reflejan las líneas, extendiendo el estímulo hacia arriba y hacia abajo. En el medio, en la parte superior, se coloca una cámara con la que se registra la prueba y debajo, en el centro se encuentra la plataforma en la que se coloca al animal. b) Estímulo optocinético. A partir del software PsychoPy v3.0 (www.psychopy.org), los monitores proyectan una grilla de barras verticales blancas y negras, que el animal percibe como un cilindro ilusorio que gira a su alrededor. La frecuencia espacial, el contraste y la dirección de rotación de las barras en el cilindro se pueden cambiar en tiempo real. (Figura tomada de Douglas et al., 2005).

Una vez que el animal es colocado en la plataforma, se lo deja unos minutos para que se pueda aclimatar y luego comienza la prueba. Esta consiste en presentar al ratón un estímulo visual representado por una grilla de barras verticales blancas y negras que se mueven a una determinada velocidad (12 gr/seg), emitidas por los monitores a partir del software PsychoPy v3.0 (www.psychopy.org). Cada prueba dura 9 minutos en total, donde se muestran 9 frecuencias (medida del ancho de las barras) distintas que duran 1 minuto cada una, y donde el sentido de rotación de las barras (horario y antihorario) cambia cada 15 segundos. El ratón responde al estímulo con un movimiento de seguimiento de la cabeza en la misma dirección que el movimiento de las barras. Si el ratón sigue el estímulo con la cabeza de izquierda a derecha (movimiento en sentido horario), está percibiendo el estímulo con el ojo izquierdo, pero si el movimiento de seguimiento es de derecha a izquierda (sentido horario), lo está percibiendo con el ojo derecho. (Douglas et al., 2005). Esto nos permite analizar la agudeza visual para cada ojo de forma independiente.

El test se realiza 2 veces para cada animal (con un intervalo mínimo de 30 minutos entre los dos tests). Las distintas frecuencias (0.15, 0.25, 0.275, 0.3, 0.325, 0.35, 0.375, 0.4, 0.45 c/gr) se muestran aleatoriamente, menos la primera que es siempre 0.15 c/gr. Esta última es utilizada como control ya que es un estímulo de baja frecuencia espacial al cual todos los animales adultos deberían responder.

En el caso de que el animal se baje o caiga de la plataforma durante el experimento, se lo vuelve a subir inmediatamente y se continúa con el mismo. Si el ratón cae más de 4 veces en la misma prueba se descarta el experimento y se devuelve el ratón a la jaula.

El test optomotor se realiza una vez previamente a la administración de los péptidos y otra vez un día después de reabierto el ojo previamente privado de visión (Fig. 7).

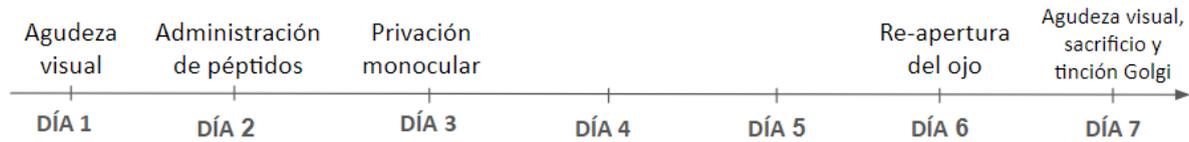


Figura 7. Esquema lineal de tiempo del protocolo de las manipulaciones experimentales. El día 1 se realiza el test optomotor de control, el día 2 se administra el péptido correspondiente (TAT o PCOF), el día 3 se realiza la PM, luego se deja al animal 3 días con el ojo cerrado, en el día 6 se reabre el ojo y finalmente en el día 7 se lleva a cabo el segundo test optomotor, se sacrifican los animales y se comienza con la tinción de Golgi.

3.2. Análisis y cuantificación de videos

Una vez concluidos todos los experimentos, los videos son analizados midiendo la cantidad de movimientos de seguimiento del estímulo independientemente para cada ojo a cada frecuencia. El valor de la frecuencia espacial más alto al cual aún hay una respuesta se toma como el valor de la agudeza visual. Para que una respuesta sea contada, debe cumplir con lo siguiente:

- La cabeza del animal debe moverse respecto a su cuerpo.
- El animal no debe estar realizando un comportamiento estereotipado. (movimientos de exploración en la plataforma, “grooming”, etc.).
- El movimiento de seguimiento (en el mismo sentido de rotación del estímulo) debe ser seguido por un movimiento rápido de reposicionamiento.

Se realiza una comparación de la agudeza visual entre el ojo derecho y el ojo izquierdo en todos los animales de los varios grupos experimentales tratados con el péptido TAT o con el péptido PCOF.

4. Análisis de la densidad de espinas dendríticas

4.1. Tinción de Golgi

Para analizar la densidad de las espinas dendríticas utilizamos la técnica de tinción de Golgi con el kit comercial eliteGolgi (#006690, Bioenno, Tech, LLC). El primer paso para realizar esta tinción es incubar a los cerebros durante 6 días en una solución de impregnación en

oscuridad. Pasado los 6 días, se realizan cortes coronales de corteza visual de 150 μm de espesor obtenidos en el vibratomo (LeicaGeoSystems VT1000S). Las secciones obtenidas al vibratomo se recogen en orden serial en una placa de 12 pocillos con Buffer Fosfato 0.1M (PB) y luego se procede a realizar una serie de lavados. Primero se realizan 3 lavados de 5 minutos en Buffer fosfato salino 0.01M con Triton X-100 al 0.3% (PBST), luego se transfieren a una solución B (“staining solution”) durante 5 minutos, se vuelven a lavar por 1 minuto en PBST 0.01M, se transfieren a una solución C (“clarity solution”) por 2.5 minutos y se termina con tres lavados finales de 5 minutos en PBST 0.01M. Las secciones se montan en portaobjetos previamente gelatinizados y al día siguiente, una vez secados, se deshidratan en alcohol a concentraciones crecientes (80%, 90% y 100%) y en xilol, realizando tres lavados de 5 minutos en cada solución. Por último, se colocan los cubreobjetos con medio de montaje (Entellan, Sigma).

4.2. Procesamiento y cuantificación de las imágenes

Una vez realizado el experimento de tinción de Golgi, se obtienen imágenes de los cortes utilizando un microscopio Microphot-FXA (Research Microscope, Nikon) con un aumento de 40x y una cámara D70S Digital Camera (Nikon) acoplada al microscopio. El análisis se realiza sobre dendritas apicales de neuronas piramidales de las capas II-III y V de la corteza visual binocular. Para identificar la corteza visual binocular se comparan las secciones con imágenes del atlas de cerebro de ratón (Paxinos & Franklin, 2007).

Solamente se analizan dendritas de aquellas neuronas que muestran una morfología típica de neurona piramidal (Braak et al., 1985; Spruston, 2008). Además, las dendritas elegidas deberán cumplir los siguientes criterios:

- a) encontrarse en las capas de interés.
- b) tener la dendrita apical lo suficientemente aislada para poder diferenciarla claramente de otras.
- c) que se pueda ver de forma clara una porción importante de la misma en el corte (largo completo o parcial).

El análisis de las imágenes se realiza utilizando el software libre Fiji (Fiji Is Just ImageJ, NIH, imagej.net/software/fiji/), donde primero se abren las imágenes seleccionadas para cuantificar. Luego se programa la escala a través de la herramienta (Analyze/Set Scale). Para todas las imágenes tomadas en el microscopio Microphot-FXA a un aumento de 40x se le indica al programa que 1588 pixels corresponden a 100 unidades de medida (definiendo como “1588” el valor “distance in pixels”, y como “100” el valor “known distance”). A continuación se modifican los parámetros de las imágenes para optimizar la visualización de las espinas. Se convierten a 8-bits usando la herramienta Image/Type/8-bit e Image/Adjust/Window/Level para modificar el contraste y la intensidad de la escala de blanco y negro. Luego se mide el largo de la dendrita utilizando la herramienta “Freehand line”. Se dibuja una línea a lo largo de la dendrita y luego se presiona Analyze/ Measure para obtener la medida. Finalmente con la herramienta de puntos se cuentan las espinas en el largo medido anteriormente.

Una vez contadas las espinas dendríticas, se divide el valor obtenido por el largo del segmento de la dendrita en análisis para así obtener una estimación de la densidad de espinas dendríticas. En total se cuantifican entre 10 y 20 dendritas por animal. Se realiza

una comparación de la densidad de espinas dendríticas entre la corteza visual binocular derecha e izquierda en todos los animales de los varios grupos experimentales tratados con el péptido TAT o con el péptido PCOF.

5. Grupos experimentales

Para este proyecto se utilizaron cuatro grupos de animales adultos:

1. Tratados con el péptido TAT sin privación monocular (n=6).
2. Tratados con el péptido PCOF sin privación monocular (n=6).
3. Tratados con el péptido TAT con privación monocular n=12).
4. Tratados con el péptido PCOF con privación monocular (n=16).

6. Estadística

Para el análisis estadístico se utiliza el software de análisis libre Past 4.13 (Hammer et al., 2001). Los valores obtenidos en las diferentes condiciones se comparan usando el test ANOVA con post hoc Mann-Whitney's y límite de significancia $p < 0,05$.

Resultados

1. La modulación de la actividad de la cofilina 1 restaura la plasticidad estructural en animales adultos.

Como primer objetivo de este trabajo nos planteamos corroborar los datos obtenidos previamente en el Laboratorio. En específico, verificar si la modulación de la actividad de la cofilina 1 en animales adultos restaura la plasticidad estructural. Para esto se estimó la densidad de espinas dendríticas comparando la CV contralateral (CVC) e ipsilateral (CVI) en las distintas condiciones experimentales.

Inicialmente se verificó que el tratamiento con los péptidos per se no afecta a la densidad de espinas dendríticas tanto en la corteza derecha (CVI) como en la izquierda (CVC). Los resultados muestran que no hay una diferencia estadística entre la CVI y la CVC en animales adultos tratados con el péptido control TAT (CVI TAT: $83,48 \pm 1,58$ vs. CVC TAT: $82,40 \pm 2,45$, n animales=6, n dendritas=14, $p=0,65$) ni tampoco en los animales tratados con el péptido PCOF (CVC PCOF: $84,20 \pm 1,92$, n animales=6, n dendritas=14, $p=0,81$) (Fig. 8). El test one way ANOVA indicó que no hay diferencias estadísticas entre las dos condiciones experimentales.

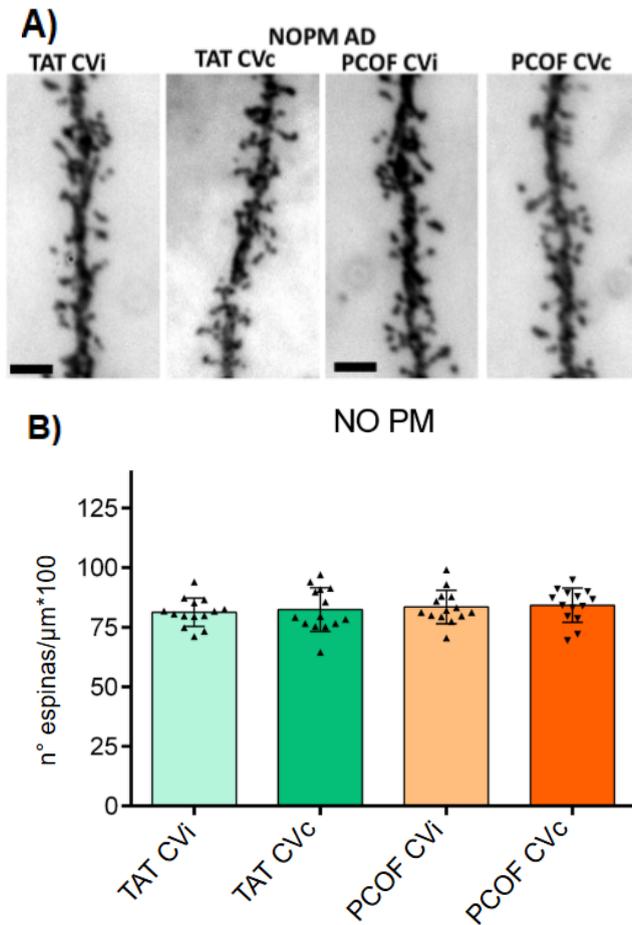


Figura 8. La administración de los péptidos PCOF y TAT no induce cambios en la densidad de espinas dendríticas en la CV de ratones adultos sin PM. A) Imágenes representativas obtenidas a 40x de una dendrita apical de la corteza visual ipsilateral (CVi, derecha) y contralateral (CVc, izquierda) de animales normales tratados con el péptido TAT o PCOF. Barra: 5μm. B) El gráfico indica los valores promedio±SEM de la densidad de espinas dendríticas (n° espinas/μm*100) en la CVi y CVc de los animales tratados con el péptido TAT o el péptido PCOF: TAT CVi: 83,48±1,58 vs. TAT CVc: 82,40±2,45, n animales=6, n dendritas=14, p=0,65; PCOF CVi: 83,48±1,87 vs. PCOF CVc: 84,20±1,92, n animales=6, n dendritas=14, p=0,81. Cada punto representa el valor de densidad de espinas dendríticas de dendritas individuales.

Luego se realizaron experimentos en animales adultos con PM. Como ya se mencionó anteriormente, luego del tratamiento con los péptidos, a los animales se les realizó la PM y 3 días después se les reabrió el ojo, se realizó el test optomotor y se sacrificaron para realizar la tinción de Golgi. En este caso, demostramos que en los animales tratados con el péptido TAT no hay diferencias significativas en la densidad de espinas dendríticas entre la CVi y la CVc al ojo privado de visión (CVi TAT: 81,42±2,91 vs. CVc TAT: 82,39±2,63, n animales=6, n dendritas=28, p=0,81), mientras que sí se observa una reducción de aproximadamente 54,82% en la densidad de espinas dendríticas en la CVc respecto a la CVi en los animales tratados con el péptido PCOF (CVi PCOF: 89,95±2,58 vs. CVc PCOF: 50,23±1,89, n animales=6, n dendritas=28, p<0,05) (Fig. 8). El test one way ANOVA indicó que solamente hay diferencia estadística entre los datos obtenidos en la CVc de los animales tratados con el péptido PCOF respecto a los demás grupos.

A)

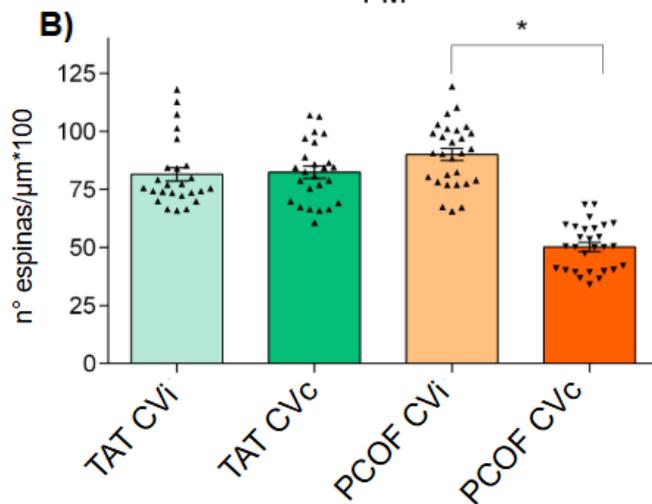
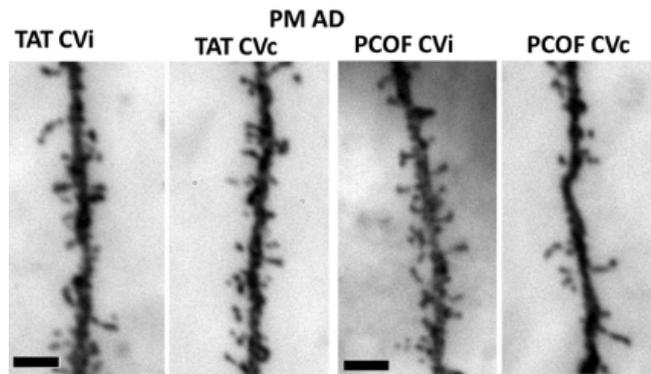


Figura 9. La administración del péptido PCOF, pero no TAT, induce cambios en la densidad de espinas dendríticas en la Cvc de ratones adultos con PM. A) Imágenes representativas obtenidas a 40x de una dendrita apical de la corteza visual ipsilateral (CVi, derecha) y contralateral (Cvc, izquierda) al ojo privado de visión (PM) de animales tratados con el péptido TAT o PCOF. Barra: 5µm. B) El gráfico indica los valores promedio±SEM de la densidad de espinas dendríticas (n° espinas/µm*100) en la CVi y Cvc de los animales tratados con el péptido TAT o el péptido PCOF: TAT Cvi: 81,42±2,91 vs. TAT Cvc: 82,39±2,63,

n animales=6, n dendritas=28, p=0,81; CVi PCOF: 89,95±2,58 vs. Cvc PCOF: 50,23±1,89, n animales=6, n dendritas=28, p<0,05. Cada punto representa el valor de densidad de espinas dendríticas de dendritas individuales.

2. La modulación de la actividad de la cofilina 1 restaura la plasticidad de la visión en animales adultos.

Con el objetivo de evaluar si la modulación de la actividad de la cofilina 1 en animales adultos restaura la plasticidad a nivel de la visión realizamos el test optomotor. Este test permite cuantificar la agudeza visual de cada animal, de forma independiente para cada ojo.

Previo a la administración de los péptidos se midió la AV en los cuatro grupos experimentales, demostrando que esta no varía entre el ojo izquierdo (OI) y el ojo derecho (OD). En específico se encontró que en los animales adultos P60, la AV del OD es de 0,38±0,01 c/gr y del OI es de 0,39±0,01 c/gr, y que no hay diferencias estadísticas entre ellos.

Luego se verificó que la administración de los péptidos *per se* no afecta la visión en animales adultos normales. Para esto se utilizaron animales adultos normales P60 que, al día siguiente de realizarse la primera prueba de AV, fueron tratados con los péptidos TAT (n=6) o PCOF (n=6). Pasado 5 días se repitió el test optomotor en estos mismos animales y se observó que la AV no cambia entre OI y OD tanto en los animales tratados con TAT (OI TAT: 0,38±0,01 vs. OD TAT: 0,41±0,01, n=6, p=0,91) así como en los tratados con PCOF (OI

PCOF: $0,39\pm 0,02$ vs. OD PCOF: $0,39\pm 0,01$, $n=6$, $p=0,89$) (Fig. 10). También se demostró que no hay diferencias estadísticas significativas entre los dos grupos de animales (one way ANOVA).

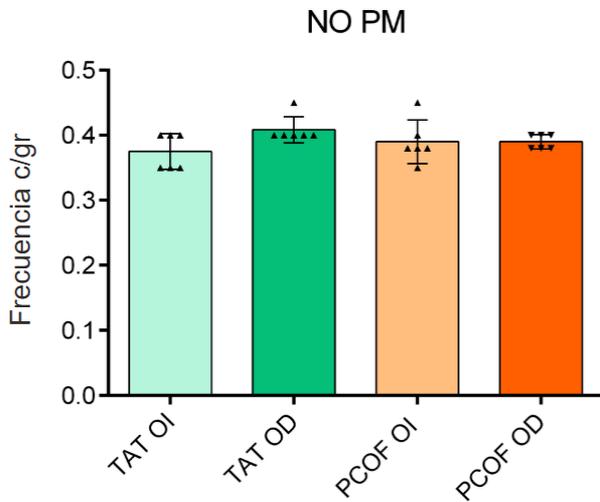


Figura 10. La administración de los péptidos TAT o PCOF no induce cambios en la AV de ratones adultos normales. El gráfico reporta el promedio±SEM de la agudeza visual (en c/gr) del ojo izquierdo (OI) y derecho (OD) en los animales tratados con el péptido TAT o el péptido PCOF. TAT OI: $0,38\pm 0,01$ vs. TAT OD: $0,41\pm 0,01$, $n=6$, $p=0,91$; PCOF OI: $0,39\pm 0,02$ vs. PCOF OD: $0,39\pm 0,01$, $n=6$, $p=0,89$. Cada punto representa el valor de AV de animales individuales.

Por último se realizó el test optomotor en animales adultos con PM tratados con el péptido TAT ($n=12$) o PCOF ($n=16$). La administración de los péptidos se realizó al día siguiente de la primera prueba de AV, al otro día se realizó la PM y 3 días después se reabrió el ojo para finalmente realizar el test el día 6. En este caso demostramos que no hay diferencia en los valores de AV entre OI y OD en los animales tratados con TAT (OI TAT: $0,39\pm 0,01$ vs. OD TAT: $0,39\pm 0,01$, $n=12$, $p=0,81$), mientras que sí hay una reducción de aproximadamente 31% en el ojo privado de visión (OD) en comparación con el ojo no privado de visión (OI) en los animales tratados con PCOF (OI PCOF: $0,38\pm 0,01$ vs. OD PCOF: $0,27\pm 0,01$, $n=16$, $*p<0,05$) (Fig. 11).

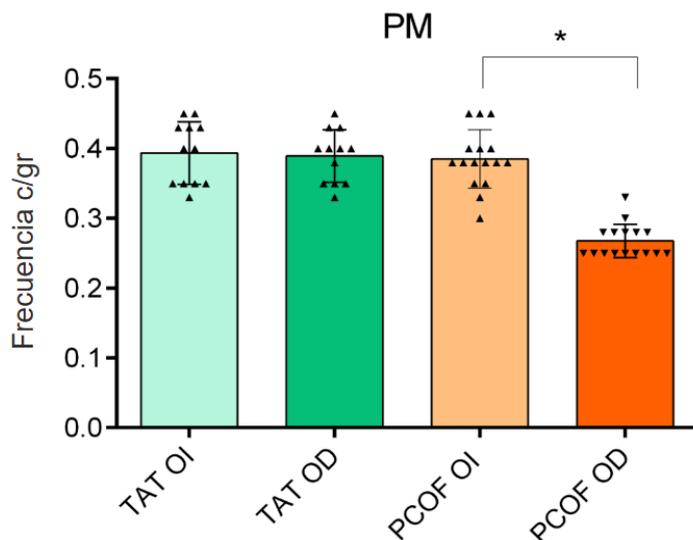


Figura 11. La administración del péptido PCOF, pero no TAT, induce cambios en la AV de ratones adultos con PM. El gráfico reporta el promedio±SEM de la agudeza visual (en c/gr) del ojo izquierdo (OI) y derecho (OD) en los animales tratados con el péptido TAT o el péptido PCOF. TAT OI: $0,39\pm 0,01$ vs. TAT OD: $0,39\pm 0,01$, $n=12$, $p=0,81$; PCOF OI: $0,38\pm 0,01$ vs. PCOF OD: $0,27\pm 0,01$, $n=16$, $*p<0,05$. Cada punto representa el valor de AV de animales individuales.

Discusión

En este proyecto nos propusimos aportar a la línea de investigación del Laboratorio de Neurociencias, el cual actualmente se dedica a tratar de caracterizar el rol de la cofilina 1 en los procesos de plasticidad cortical dependiente de la experiencia usando como modelo de estudio la corteza visual primaria de ratón. Este es reconocido como un modelo robusto y ampliamente caracterizado. Modificamos la experiencia visual utilizando el clásico paradigma de la privación monocular de la visión, del cual existen amplias evidencias que es una manipulación mediante la cual se pueden observar cambios que indican la presencia o no de capacidades plásticas (Mataga et al., 2004; Bukhari et al., 2015). Como ya resaltamos anteriormente, estas capacidades plásticas están presentes fuertemente durante el período crítico pero luego disminuyen drásticamente en la etapa adulta. Sin embargo, sabemos que existen diversas estrategias que restauran los altos niveles de plasticidad característicos del PC en animales adultos. De todos modos, los mecanismos moleculares y celulares que subyacen a la regulación de los niveles de plasticidad en la CV no están del todo claros.

Con este escenario y sabiendo previamente que la cofilina 1 es una proteína cuya expresión es modulada por la experiencia visual en la CV en el período crítico pero no en el adulto (Laguardia et al., 2023), nos preguntamos si es posible que sea una molécula potencialmente implicada en controlar los niveles de plasticidad cortical y en específico si la modulación farmacológica de su actividad puede facilitar la restauración de altos niveles de plasticidad en el adulto.

Para poner a prueba esta hipótesis, analizamos los efectos de la PM a nivel estructural, en la densidad de las espinas dendríticas, y a nivel de la visión, en específico en la agudeza visual. Esto fue realizado en animales adultos en los cuales se moduló farmacológicamente la actividad de la cofilina 1.

Los niveles de cofilina 1 se pueden modular mediante “knock out”, mutantes transgénicos condicionales, RNA de interferencia, o también se puede alterar su actividad mediante administración de fosfo-miméticos o péptidos sintéticos (Shaw & Bamburg, 2017). En este proyecto optamos por utilizar la administración de péptidos sintéticos. Estos se administran de forma directa, por lo que actúan rápidamente, además de que presentan baja toxicidad, penetran la barrera hematoencefálica y la membrana celular, actuando a nivel intracelular (gracias a la conjugación al dominio proteico de la TAT-HIV) (Shaw & Bamburg, 2017). Estos péptidos (primeros 16 aminoácidos de la cofilina 1 en su forma fosforilada o sin fosforilar), compiten con la cofilina 1 endógena como sustrato para la fosfatasa (SSH1) o la quinasa (LIMK1) responsables de la regulación de la cofilina 1, determinando así una reducción o un aumento de la actividad de esta, respectivamente (Shaw & Bamburg, 2017). Trabajos previos han demostrado que el tratamiento con estos péptidos induce efectivamente una modulación del estado de fosforilación de la cofilina 1 (Toda et al., 2006; Wang et al., 2013; Duffney et al., 2015; Rust, 2015; Deng et al., 2016).

Mediante esta metodología, demostramos que el tratamiento con el péptido PCOF (péptido en forma fosforilada) restaura altos niveles de plasticidad dependiente de la experiencia en ratones adultos. Esto lo observamos como una reducción de la densidad de espinas dendríticas en la CV contralateral al ojo privado de visión así como también en una

reducción en la agudeza visual en el ojo privado de visión, en los animales tratados con el péptido PCOF en comparación a los tratados con el péptido de control TAT.

En cuanto al cambio en la densidad de espinas dendríticas, existen varios trabajos que han utilizado este parámetro posterior a la PM como aproximación para detectar o no la presencia de plasticidad en la CV de animales adultos. Por ejemplo, tanto en Sajo et al., 2016, como en Bukhari et al., 2015, se analiza el recambio de espinas dendríticas luego de la PM en ratones adultos “knock out” para la proteína Lynx1. Esta es una molécula cuya expresión aumenta durante el desarrollo postnatal hacia la adultez, y que se ha demostrado limitar la plasticidad de dominancia ocular. Estos autores demostraron que al eliminar dicha proteína, la PM en animales adultos induce efectos similares a los observados si esta es realizada en el PC, incluido una reducción de la densidad de espinas dendríticas en la CV contralateral al ojo privado de visión (Bukhari et al., 2015; Sajo et al., 2016). Resultados similares se obtuvieron en el trabajo de Yusifov et al. (2021), en el cual observaron un aumento de la plasticidad estructural (aumento de la eliminación de las espinas dendríticas) luego de la PM en animales adultos “knock out” para la proteína postsináptica de densidad 95 (PSD-95), una proteína de andamiaje sináptico que desempeña un papel clave en la plasticidad sináptica (Yusifov et al., 2021).

Todos estos trabajos, al igual que el nuestro, demostraron mediante la misma aproximación, que hay determinadas moléculas que tienen un rol fundamental en los procesos de plasticidad cortical. Esta aproximación consta de usar a la reducción de la densidad de espinas dendríticas en la CV contralateral al ojo privado de visión como un índice de restauración de altos niveles de plasticidad en animales adultos.

Luego, como parámetro para determinar la presencia de cambios plásticos a nivel de la visión, analizamos la AV. Esta se puede medir a través de métodos electrofisiológicos (por ejemplo, mediante registros de potenciales visuales evocados) (Pizzorusso, 2006) o utilizando pruebas conductuales. Dentro de estas últimas encontramos las que son basadas en comportamientos de refuerzo positivo, como la prueba visual en un laberinto clásico o en agua (donde el animal debe asociar un estímulo visual, una rejilla sinusoidal proyectada en un monitor, con la comida o con el escape del agua) (Gianfranceschi et al., 1999, Prusky et al., 2000). Otro tipo de pruebas conductuales que se han desarrollado recientemente son de tipo optocinéticas, como el test optomotor utilizado en este proyecto. Una de las ventajas de este tipo de pruebas sobre las de refuerzo positivo, es que no es necesario un período de tiempo previo para que el animal aprenda las tareas para poder llevar a cabo el test (Prusky, 2004). Además de ser un test fácil de realizar, es accesible económicamente ya que se puede diseñar e implementar de forma sencilla. Sin embargo, este test es una medida de actividad subcortical, mientras que los de electrofisiología y los conductuales, como la prueba visual del agua son medidas a nivel cortical (Douglas et al., 2005). Igualmente, los valores obtenidos con el test optomotor son comparables con los obtenidos a través de las otras metodologías (Douglas et al., 2005; Durand et al., 2012; Kang et al., 2013). Existen varios trabajos donde se ha utilizado el test optomotor para determinar la presencia o no de plasticidad de la visión. Por ejemplo, en Kang et al. (2013) los autores estudian los efectos de la privación de la visión binocular sobre la plasticidad cortical (Kang et al., 2013). También hay otros estudios donde se analiza el rol del ambiente enriquecido sobre la plasticidad cortical (Greifzu et al., 2014; Löwel et al., 2018).

Todos estos trabajos, incluido el nuestro, coinciden en la metodología empleada para determinar la presencia de plasticidad cortical. Específicamente, utilizan la detección de la reducción de la agudeza visual en el ojo previamente privado de visión, medido a través del test optomotor, como herramienta para detectar la presencia de plasticidad cortical.

Cuáles pueden ser los mecanismos a través de los cuales la cofilina 1 está implicada en regular los niveles de plasticidad neuronal es de difícil interpretación al momento. Los hallazgos principales, realizados en varios modelos experimentales de plasticidad, indican un rol importante de la cofilina 1 en el control de la morfología de las espinas dendríticas, en el tráfico de receptores AMPA/NMDA en la sinapsis y en los procesos de plasticidad de tipo LTP/LTD (Namme et al., 2021; Hotulainen & Hogengaard, 2010, Rust et al 2015; Shaw & Bamberg, 2017). Se ha demostrado también que la modulación farmacológica de la actividad de la cofilina 1 (por administración de péptidos u otras estrategias) es asociada al “drug seeking” (Toda et al., 2006), a la recuperación de defectos presentes en el modelo murino de autismo Shank3 “knock out” (Duffney et al., 2015) y de patología de Alzheimer (Deng et al., 2016), a la extinción de la memoria (Wang et al., 2013) y al dolor neuropático (Qiu et al., 2016).

Todas estas evidencias apuntan a modificaciones que pueden también estar implicadas en los efectos de la cofilina 1 en el control de la plasticidad en la corteza visual.

Por otro lado, hasta el momento, no hay trabajos que intenten poner en relación los mecanismos ya conocidos que regulan la plasticidad en la corteza visual, como el desarrollo del tono inhibitorio o la maduración de la redes perineuronales, con la cofilina 1. De hecho, este es uno de los objetivos al que se está dedicando el Laboratorio de Neurociencias.

Finalmente, hay un único trabajo que puede relacionarse con los datos obtenidos en el presente proyecto. En Cerri et al. (2011), los autores administraron en la CV de ratas adultas el factor necrotizante citotóxico 1 (CNF1) demostrando que este induce un aumento de los niveles de plasticidad cortical (Cerri et al., 2011). Este factor es una toxina bacteriana que regula la dinámica de la actina y la estructura de los procesos neuronales a través de una activación persistente de las Rho GTPasas. Las Rho GTPasas (Rac1, Cdc42 y RhoA) son proteínas que regulan la actividad de la actina. La cofilina 1, también es una proteína que regula la dinámica de la actina, principalmente mediante fosforilación/desfosforilación en el residuo Ser-3. La quinasa encargada de desfosforilar a la cofilina 1 es la LIMK1, que es activada por Rac1, y LIMK2, activada por Rho y Cdc42 (Sumi et al., 1999; Name et al., 2021). Por lo que, se puede especular que en este trabajo la activación de las RhoGTPasas determinó un aumento de la plasticidad en la CV de ratas adultas a través de una activación de LIMK1 y, a su vez, de la fosforilación de la cofilina 1. Esto estaría en acuerdo con los resultados del presente proyecto en cuanto demostramos que la administración del péptido PCOF (el cuál induce un aumento de la forma fosforilada de la cofilina 1), induce un aumento de la plasticidad.

Conclusión

En este proyecto logramos demostrar que la modulación de la actividad de la cofilina 1 induce cambios a nivel anatómico y a nivel de la visión. A nivel anatómico genera una reducción de la densidad de espinas dendríticas en la corteza contralateral al ojo privado de visión, mientras que a nivel de la visión genera una disminución en la AV en el ojo al que previamente se le realizó PM en comparación al que se me mantuvo abierto. Estos resultados demuestran por primera vez que la cofilina 1 tiene un rol en la regulación de la plasticidad neuronal dependiente de la experiencia en la CV de ratones.

Quiero destacar que durante mi estadía en el Laboratorio de Neurociencias he adquirido los conocimientos sobre las distintas técnicas utilizadas en este proyecto, tanto histológicas como comportamentales. En particular, aprendí a realizar la prueba optomotora, lo que implicó no solo aprender a ejecutarla, sino también a reconocer las respuestas de los animales, analizar los datos de los videos obtenidos y procesar la información resultante. También, adquirí las habilidades para poder realizar la tinción de Golgi, lo que incluyó aprender a realizar cortes en el vibratomo y, al obtener las imágenes de las secciones, a seleccionar las neuronas relevantes para los objetivos de este proyecto.

Bibliografia

- Aarts, M., Liu, Y., Liu, L., Besshoh, S., Arundine, M., Gurd, J.W., Wang, Y. T., Salter, M. W. & Tymianski, M. (2002). Treatment of ischemic brain damage by perturbing NMDA receptor-PSD-95 protein interactions. *Science*. 298(5594), 846-50. doi: [10.1126/science.1072873](https://doi.org/10.1126/science.1072873)

- Bavelier, D., Levi, D. M., Li, R. W., Dan, Y. & Hensch, T. K. (2010). Removing brakes on adult brain plasticity: from molecular to behavioral interventions. *Journal of Neuroscience*. 30(45), 14964-71. doi: [10.1523/JNEUROSCI.4812-10.2010](https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4812-10.2010)

- Bellenchi, G. C., Gurniak, C. B., 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 & Development*. 21(18), 2347-57. doi: [10.1101/gad.434307](https://doi.org/10.1101/gad.434307)

- Berardi, N., Pizzorusso, T., Ratto, G. M. & Maffei, L. (2003). Molecular basis of plasticity in the visual cortex. *Trends in Neuroscience*. 26(7), 369-78. doi: [10.1016/S0166-2236\(03\)00168-1](https://doi.org/10.1016/S0166-2236(03)00168-1)

- Berardi, N., Sale, A. & Maffei, L. Brain structural and functional development: genetics and experience. (2015). *Developmental Medicine & Child Neurology*. 57, 4-9. doi: [10.1111/dmcn.12691](https://doi.org/10.1111/dmcn.12691)

- Borsello, T., Clarke, P. G., Hirt, L., Vercelli, A., Repici, M., Schorderet, D. F., Bogousslavsky, J. & Bonny, C. (2003). A peptide inhibitor of c-Jun N-terminal kinase protects against excitotoxicity and cerebral ischemia. *Nature Medicine*. 9(9), 1180-6. doi: [10.1038/nm911](https://doi.org/10.1038/nm911)

- Bornia, N., Taboada, A., Dapuetto, A., & Rossi, F. M. (2020). Identification of cofilin 1 as a candidate protein associated to mouse visual cortex plasticity. *Neuroscience Letters*. 731, 135056. doi: [10.1016/j.neulet.2020.135056](https://doi.org/10.1016/j.neulet.2020.135056)

- Borovac, J., Bosch, M., & Okamoto, K. (2018). Regulation of actin dynamics during structural plasticity of dendritic spines: Signaling messengers and actin-binding proteins. *Molecular and Cellular Neuroscience*. 91, 122–130. doi: [10.1016/j.mcn.2018.07.001](https://doi.org/10.1016/j.mcn.2018.07.001)

- Braak, H., & Braak, E. (1985). Golgi preparations as a tool in neuropathology with particular reference to investigations of the human telencephalic cortex. *Progress in Neurobiology*, 25(2), 93–139. doi: [10.1016/0301-0082\(85\)90001-2](https://doi.org/10.1016/0301-0082(85)90001-2)

- Bukhari, N., Burman, P. N., Hussein, A., Demars, M. P., Sadahiro, M., Brady, D. M. & Morishita, H. (2015). Unmasking Proteolytic Activity for Adult Visual Cortex Plasticity by the Removal of Lynx1. *Journal of Neuroscience*. 35(37), 12693–12702. doi: [10.1523/jneurosci.4315-14.2015](https://doi.org/10.1523/jneurosci.4315-14.2015)

- Cerri, C., Pietrasanta, M. & Restani, L. (2014). Structural underpinnings of functional plasticity in rodent visual cortex. *Archives Italiennes de Biologie*. 152(4), 179-89. doi: [10.12871/00039829201441](https://doi.org/10.12871/00039829201441)

- Cingolani, L. A., & Goda, Y. (2008). Actin in action: The interplay between the actin cytoskeleton and synaptic efficacy. *Nature Reviews Neuroscience*. 9(5), 344–356. doi: [10.1038/nrn2373](https://doi.org/10.1038/nrn2373)

- Douglas, R. M., Alam, N. M., Silver B. D., McGill, T. J., Tschetter, W. W. & Prusky, G. T. (2005). Independent visual threshold measurements in the two eyes of freely moving rats and mice using a virtual-reality optokinetic system. *Visual Neuroscience*. (5), 677-684. doi: [10.1017/S0952523805225166](https://doi.org/10.1017/S0952523805225166)

- Duffney, L. J., Zhong, P., Wei J., Matas, E., Cheng, J., Qin, L., Ma, K., Dietz, D. M., Kajiwara, Y., Buxbaum, J. D. & Yan, Z. (2015). Autism-like Deficits in Shank3-Deficient Mice Are Rescued by Targeting Actin Regulators. *Cell Reports*. 11(9), 1400-1413. doi: [10.1016/j.celrep.2015.04.064](https://doi.org/10.1016/j.celrep.2015.04.064)

- Durand, S., Patrizi, A., Quast, K. B., Hachigian, L., Pavlyuk, R., Saxena, A., Carninci, P., Hensch T. K. & Fagiolini M. (2012). NMDA receptor regulation prevents regression of visual cortical function in the absence of Mecp2. *Neuron*. 76(6), 1078-90. doi: [10.1016/j.neuron.2012.12.004](https://doi.org/10.1016/j.neuron.2012.12.004)

- Espinosa, J. S. & Stryker, M. P. (2012). Development and plasticity of the primary visual cortex. *Neuron*. 75(2), 230-49. doi: [10.1016/j.neuron.2012.06.009](https://doi.org/10.1016/j.neuron.2012.06.009)

- Galizia, C. G., & Lledo, P. (2013). *Neurosciences: From molecule to behavior: A university textbook* (1st ed.). Springer Spektrum.

- Gianfranceschi, L., Fiorentini, A., & Maffei, L. (1999). Behavioural visual acuity of wild type and bcl2 transgenic mouse. *Vision Research*. 39(3), 569–574. doi: [10.1016/s0042-6989\(98\)00169-2](https://doi.org/10.1016/s0042-6989(98)00169-2)

- Greifzu, F., Pielecka-Fortuna, J., Kalogeraki, E., Krempler, K., Favaro, P. D., Schluter, O. M., & Lowel, S. (2014). Environmental enrichment extends ocular dominance plasticity into adulthood and protects from stroke-induced impairments of plasticity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 111(3), 1150–1155. doi: [10.1073/pnas.1313385111](https://doi.org/10.1073/pnas.1313385111)

- Gu, J., Lee, C. W., Fan, Y., Komlos, D., Tang, X., Sun, C. & Zheng, J. Q. (2010). ADF/cofilin-mediated actin dynamics regulate AMPA receptor trafficking during synaptic plasticity. *Nature Neuroscience*. 13(10), 1208–1215. doi: [10.1038/nn.2634](https://doi.org/10.1038/nn.2634)

- Hammer, Ø., Harper, D. A. T., & Ryan, P. D. (2001). Past: Paleontological Statistics Software Package for Education and Data Analysis. *Palaeontologia Electronica*. 4(1). palaeo-electronica.org/2001_1/past/issue1_01.htm

- Hotulainen, P. & Hoogenraad, C. C.(2010). Actin in dendritic spines: connecting dynamics to function. *Journal of Cell Biology*. 189(4),619-29. doi: [10.1083/jcb.201003008](https://doi.org/10.1083/jcb.201003008)

- Huttunen, H. J., Palva, J. M., Lindberg, L., Palva, S., Saarela, V., Karvonen, E. & Uusitalo, H. (2018). Fluoxetine does not enhance the effect of perceptual learning on visual function in adults with amblyopia. *Scientific Reports*. 8(1). doi: [10.1038/s41598-018-31169-z](https://doi.org/10.1038/s41598-018-31169-z)
- Kang E., Durand S., LeBlanc J. J., Hensch T. K., Chen C. & Fagiolini M. (2013). Visual acuity development and plasticity in the absence of sensory experience. *Journal of Neuroscience*. 33(45), 17789-96. doi: [10.1523/JNEUROSCI.1500-13.2013](https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1500-13.2013)
- Löwel, S., Kalogeraki, E., Dehmel, S. & Makowiecki, K. (2018). Environmental conditions strongly affect brain plasticity. *e-Neuroforum*. 24(1), A19–A29. doi: [10.1515/nf-2017-a050](https://doi.org/10.1515/nf-2017-a050)
- Kessels, H. W., & Malinow, R. (2009). Synaptic AMPA Receptor Plasticity and Behavior. *Neuron*, 61(3), 340–350. doi:10.1016/j.neuron.2009.01.015
10.1016/j.neuron.2009.01.015
- Laguardia A., Dapuelto A., McCuiston H. & Rossi F. M. (2023). Cofilin 1 Is Dynamically Modulated During Postnatal Development and by Visual Input in the Mouse Visual Cortex. *Neuroscience*. 510, 147-156. doi: [10.1016/j.neuroscience.2022.11.024](https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2022.11.024)
- Levelt, C. N. & Hübener, M. (2012). Critical-period plasticity in the visual cortex. *Annual Review of Neuroscience*. 35, 309-30. doi: [10.1146/annurev-neuro-061010-113813](https://doi.org/10.1146/annurev-neuro-061010-113813)
- Mataga, N., Mizuguchi, Y. & Hensch, T. K. (2004). Experience-dependent pruning of dendritic spines in visual cortex by tissue plasminogen activator. *Neuron*. 44(6), 1031-41. doi: [10.1016/j.neuron.2004.11.028](https://doi.org/10.1016/j.neuron.2004.11.028)
- McGee, A. W., Yang, Y., Fischer, Q. S., Daw, N. W., & Strittmatter, S. M. (2005). Experience-driven plasticity of visual cortex limited by myelin and Nogo receptor. *Science*. 309(5744), 2222–2226. doi: [10.1126/science.1114362](https://doi.org/10.1126/science.1114362)
- Meng, Y., Takahashi, H., Meng, J., Zhang, Y., Lu, G., Asrar, S. & Jia, Z. (2004). Regulation of ADF/cofilin phosphorylation and synaptic function by LIM-kinase. *Neuropharmacology*. 47(5), 746–754. doi: [10.1016/j.neuropharm.2004.06.030](https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2004.06.030)
- Sajo, M., Ellis-Davies, G., & Morishita, H. (2016). Lynx1 Limits Dendritic Spine Turnover in the Adult Visual Cortex. *The Journal of Neuroscience*. 36(36), 9472–9478. doi: [10.1523/jneurosci.0580-16.2016](https://doi.org/10.1523/jneurosci.0580-16.2016)
- Namme, J. N., Bepari, A. K., & Takebayashi, H. (2021). Cofilin signaling in the CNS physiology and neurodegeneration. *International Journal of Molecular Sciences*. 22(19), 10727. doi: [10.3390/ijms221910727](https://doi.org/10.3390/ijms221910727)
- Okamoto, K. I., Nagai, T., Miyawaki, A., & Hayashi, Y. (2004). Rapid and persistent modulation of actin dynamics regulates postsynaptic reorganization underlying bidirectional plasticity. *Nature Neuroscience*. 7(10), 1104–1112. doi: [10.1038/nn1311](https://doi.org/10.1038/nn1311)

- Okamoto, K. I., Narayanan, R., Lee, S. H., Murata, K., & Hayashi, Y. (2007). The role of CaMKII as an F-actin-bundling protein crucial for maintenance of dendritic spine structure. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 104(15), 6418–6423. doi: [10.1073/pnas.0701656104](https://doi.org/10.1073/pnas.0701656104)
- Paxinos G. & Franklin K. (2007). *The mouse brain in stereotaxic coordinates*. Oxford, UK, Gulf Professional Publishing.
- Pizzorusso, T., Medini, P., Berardi, N., Chierzi, S., Fawcett, J. W., & Maffei, L. (2002). Reactivation of ocular dominance plasticity in the adult visual cortex. *Science*. 298(5596), 1248–1251. doi: [10.1126/science.1072699](https://doi.org/10.1126/science.1072699)
- Pizzorusso, T., Medini, P., Landi, S., Baldini, S., Berardi, N., & Maffei, L. (2006). Structural and functional recovery from early monocular deprivation in adult rats. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 103(22), 8517–8522. doi: [10.1073/pnas.0602657103](https://doi.org/10.1073/pnas.0602657103)
- Prusky, G. T., West, P. W. & Douglas, R. M. (2000). Behavioral assessment of visual acuity in mice and rats. *Vision Research*. 40(16), 2201-9. doi: [10.1016/s0042-6989\(00\)00081-x](https://doi.org/10.1016/s0042-6989(00)00081-x)
- Prusky, G. T., Alam, N. M., Beekman, S., & Douglas, R. M. (2004). Rapid Quantification of Adult and Developing Mouse Spatial Vision Using a Virtual Optomotor System. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. 45(12), 4611. doi: [10.1167/iovs.04-0541](https://doi.org/10.1167/iovs.04-0541)
- Purves, D., Augustine, G. J., Fitzpatrick, D., Hall, W. C., LaMantia, A.-S., Mooney, R. D., Platt, M. L., & White, L. E. (2018). *Neurosciences* (6th ed.). Sinauer Associates.
- Qiu, Y., Chen, W.Y., Wang & Z.Y. et al. (2016). Simvastatin Attenuates Neuropathic Pain by Inhibiting the RhoA/LIMK/Cofilin Pathway. *Neurochemical Research*. 41, 2457–2469. doi: [10.1007/s11064-016-1958-1](https://doi.org/10.1007/s11064-016-1958-1)
- Reh, R. K., Dias, B. G., Nelson, C. A., Kaufer, D., Werker, J. F., Kolb, B., Levine, J. D. & Hensch, T. K. (2020). Critical period regulation across multiple timescales. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. 117(38), 23242-23251. doi: [10.1073/pnas.1820836117](https://doi.org/10.1073/pnas.1820836117)
- Racz, B. & Weinberg, R. J. (2006). Spatial organization of cofilin in dendritic spines. *Neuroscience*. 138(2), 447-56. doi: [10.1016/j.neuroscience.2005.11.025](https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2005.11.025)
- Ruiz-Perera, L., Muniz, M., Vierci, G., Bornia, N., Baroncelli, L., Sale, A., & Rossi, F. M. (2015). Fluoxetine increases plasticity and modulates the proteomic profile in the adult mouse visual cortex. *Scientific Reports*. 5(1). doi: [10.1038/srep12517](https://doi.org/10.1038/srep12517)
- Rust, M. B., Gurniak, C. B., Renner, M., Vara, H., Morando, L., Görlich, A., Sassoè-Pognetto, M., Banachabouchi, M. A., Giustetto, M., Triller, A., Choquet, D., & Witke, W. (2010). Learning, AMPA receptor mobility and synaptic plasticity depend on n-cofilin-mediated actin dynamics. *The EMBO Journal*. 29(11), 1889–1902. doi: [10.1038/emboj.2010.72](https://doi.org/10.1038/emboj.2010.72)

- Rust, M. B. (2015). ADF/Cofilin: A crucial regulator of synapse physiology and behavior. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 72(18), 3521–3529. doi: [10.1007/s00018-015-1941-z](https://doi.org/10.1007/s00018-015-1941-z)
- Sale, A., Berardi, N., Spolidoro, M., Baroncelli, L., & Maffei, L. (2010). GABAergic inhibition in visual cortical plasticity. *Frontiers in Cellular Neuroscience*. 4(6). doi: [10.3389/fncel.2010.00010](https://doi.org/10.3389/fncel.2010.00010)
- Shaw, A. E., & Bamburg, J. R. (2017). Peptide regulation of cofilin activity in the CNS: A novel therapeutic approach for treatment of multiple neurological disorders. *Pharmacology & Therapeutics*. 175, 17–27. doi: [10.1016/j.pharmthera.2017.02.031](https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2017.02.031)
- Spruston, N. (2008). Pyramidal neurons: dendritic structure and synaptic integration. *Nature Reviews Neuroscience*, Vol. 9. 206–221. doi: [10.1038/nrn2286](https://doi.org/10.1038/nrn2286)
- Syken, J., GrandPre, T., Kanold, P. O., & Shatz, C. J. (2006). PIRB restricts ocular-dominance plasticity in visual cortex. *Science*. 313(5794), 1795–1800. doi: [10.1126/science.1128232](https://doi.org/10.1126/science.1128232)
- Tagawa, Y., Kanold, P. & Majdan, M. et al. (2005). Multiple periods of functional ocular dominance plasticity in mouse visual cortex. *Nature Neuroscience*. 8, 380–388. doi: doi.org/10.1038/nn1410
- Toda, S. (2006). Cocaine Increases Actin Cycling: Effects in the Reinstatement Model of Drug Seeking. *Journal of Neuroscience*. 26(5), 1579–1587. doi: [10.1523/jneurosci.4132-05.2006](https://doi.org/10.1523/jneurosci.4132-05.2006)
- Tropea, D., Van Wart, A., Sur, M. (2009). Molecular mechanisms of experience-dependent plasticity in visual cortex. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*. 364(1515), 341-55. doi: [10.1098/rstb.2008.0269](https://doi.org/10.1098/rstb.2008.0269)
- Verkuyl, J. M., & Matus, A. (2006). Time-lapse imaging of dendritic spines in vitro. *Nature Protocols*. 1(5), 2399–2405. doi: [10.1038/nprot.2006.357](https://doi.org/10.1038/nprot.2006.357)
- Vetencourt, J., Sale, A., Viegi, A., Baroncelli, L., De Pasquale, R., F. O'Leary, O., Castrén E., & Maffei, L. (2008). The antidepressant fluoxetine restores plasticity in the adult visual cortex. *Science*. 320(5874), 385–388. doi: [10.1126/science.1150516](https://doi.org/10.1126/science.1150516)
- Wang, Y., Dong, Q., Xu, X.-F., Feng, X., Xin, J., Wang, D.-D. & Chen, Z.-Y. (2013). Phosphorylation of Cofilin Regulates Extinction of Conditioned Aversive Memory via AMPAR Trafficking. *Journal of Neuroscience*. 33(15), 6423–6433. doi: [10.1523/jneurosci.5107-12.2013](https://doi.org/10.1523/jneurosci.5107-12.2013)

- Wiesel, T. N., & Hubel, D. H. (1963). Single-cell responses in striate cortex of kittens deprived of vision in one eye. *Journal of Neurophysiology*. 26(6), 1003–1017. doi: [10.1152/jn.1963.26.6.1003](https://doi.org/10.1152/jn.1963.26.6.1003)

- Wiesel TN & Hubel DH. (1965). Comparison of the effects of unilateral and bilateral eye closure on cortical unit responses in kittens. *Journal of Neurophysiology*. 28(6), 1029-40. doi: [10.1152/jn.1965.28.6.1029](https://doi.org/10.1152/jn.1965.28.6.1029)

- Wolf, M., Zimmermann, AM., Görlich, A., Gurniak, C. B., Sassoè-Pognetto, M., Friauf, E., Witke, W., & Rust, M. B. (2015). ADF/Cofilin Controls Synaptic Actin Dynamics and Regulates Synaptic Vesicle Mobilization and Exocytosis. *Cerebral Cortex*. 25(9),2863-75. doi: [10.1093/cercor/bhu081](https://doi.org/10.1093/cercor/bhu081)

- Yusifov, R., Tippmann, A., Staiger, J. F., Schlüter, O. M. & Löwel, S. (2021). Spine dynamics of PSD-95-deficient neurons in the visual cortex link silent synapses to structural cortical plasticity. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. 118(10),e2022701118. doi: [10.1073/pnas.2022701118](https://doi.org/10.1073/pnas.2022701118)

- Zito, K., & Murthy, V. N. (2002). Dendritic spines. *Current Biology*, 12(1), R5. doi: [10.1016/s0960-9822\(01\)00636-4](https://doi.org/10.1016/s0960-9822(01)00636-4)

- Yang, N., Higuchi, O., Ohashi, K., Nagata, K., Wada, A., Kangawa, K., Nishida, E., Mizuno, K. (1998). Cofilin phosphorylation by LIM-kinase 1 and its role in Rac-mediated actin reorganization. *Nature*. 393(6687), 809-12. doi: [10.1038/31735](https://doi.org/10.1038/31735). PMID: [9655398](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9655398/)