
Tesina de grado de la Licenciatura en Ciencias Biológicas

Análisis de la inducción por luz de la expresión del gen *Arc* por hibridación *in situ* como herramienta para estudiar la plasticidad de dominancia ocular en la corteza visual.

Eugenia Lucía Calero López

Tutor: Francesco Mattia Rossi

Co-tutor: Alejo Ignacio Acuña Alemán

Laboratorio: Laboratorio de Neurociencias,
“Unidad de Neuroplasticidad”, Facultad de Ciencias, Udelar.

Diciembre 2025

Agradecimientos

Quiero agradecer en primer lugar a mi tutor y co-tutor, Francesco y Alejo, por la dedicación, la paciencia y la constante disposición durante todo este proceso. A Francesco, por brindarme la oportunidad de realizar mi tesina de grado bajo su tutoría, integrarme al laboratorio y a las líneas de investigación de la Unidad, y por acompañar y fomentar mi aprendizaje durante este recorrido. A Alejo, por su apoyo y predisposición, por su paciencia incluso en los momentos más tediosos, logrando que el trabajo cotidiano fuera más ameno, y por ser un sostén fundamental tanto en lo académico como en lo personal durante mi paso por el laboratorio.

Agradezco también a todas y todos los integrantes del piso 4, por recibirme desde el primer día con calidez, abrirme las puertas e incluirme, generando un ambiente de trabajo sumamente enriquecedor, tanto a nivel académico como humano, en el que siempre me sentí muy cómoda.

Por otra parte, quiero agradecer a mi familia y a mis amigos, por el apoyo incondicional a lo largo de todo este proceso, por su paciencia al escucharme hablar una y otra vez sobre la carrera, y por la disposición con la que me acompañaron en millones de ocasiones, incluso escuchándome recitar temas que muchas veces ni entendían, pero siempre con interés.

Especialmente, quiero agradecer a las amigas y amigos que hice durante mi trayecto en la facultad, quienes transformaron por completo la experiencia de cursar la carrera, haciéndola mucho más disfrutable. Además de compartir largas jornadas de estudio, me llevo vínculos que sé que van a ser para toda la vida.

Sin el acompañamiento de todas estas personas, este recorrido habría sido considerablemente más desafiante y, sin dudas, mucho menos disfrutable. Muchas gracias!

TABLA DE CONTENIDOS

Resumen	5
Lista de abreviaturas.....	5
Introducción.....	8
La corteza visual como modelo de estudio de la plasticidad cerebral	9
Bases moleculares de la plasticidad dependiente de experiencia en la corteza visual	11
Abordajes para el estudio de la plasticidad de dominancia ocular	13
Objetivo general.....	15
Objetivos específicos.....	15
Materiales y métodos.....	16
1. Animales.....	16
2. Manipulaciones.....	16
2.1. Enucleación monocular, dark rearing y exposición a la luz.....	16
2.2. Obtención de cerebros.....	16
3. Obtención del plásmido con el inserto del ADN de Arc.....	17
4. Análisis de la inducción de la expresión de Arc.....	17
4.1. Preparación de la sonda.....	17
A. Amplificación por PCR.....	17
B. Verificación del producto de PCR por electroforesis en gel de agarosa.....	19
C. Purificación del producto de PCR.....	19
D. Transcripción <i>in vitro</i> y purificación de la sonda.....	20
E. Dot blot.....	20
4.2. Preparación de las secciones cerebrales.....	21
4.3. Hibridación <i>in situ</i>	22
4.4. Análisis de las imágenes.....	24
5. Grupos experimentales.....	24
Resultados.....	26

1. Puesta a punto de la metodología de hibridación <i>in situ</i> para detectar la expresión del ARNm de <i>Arc</i> en la corteza visual del ratón.....	26
2. Analizar la inducción por luz de la expresión de <i>Arc</i>	35
3. Analizar la modificación de la extensión de la señal de <i>Arc</i> en animales plásticos durante el período crítico.....	36
Discusión.....	39
Relevancia de la metodología basada en el estudio de la expresión del ARNm de <i>Arc</i>	39
Optimización de la producción de sondas de ARN.....	40
Hibridación <i>in situ</i>	41
Aumento de la extensión mediolateral de la inducción de <i>Arc</i> en la CVb.....	42
Conclusiones.....	44
Perspectivas.....	44
Referencias bibliográficas.....	45
Anexo.....	48

Resumen

La plasticidad dependiente de la experiencia es un proceso fundamental mediante el cual el sistema nervioso ajusta su estructura y función en respuesta a los estímulos sensoriales, permitiéndole adaptarse a cambios ambientales. Este proceso clave es de particular importancia durante la vida postnatal temprana, en un período de alta sensibilidad a la experiencia denominado período crítico.

Un modelo clásico para estudiar los mecanismos detrás de estos procesos es evaluar la plasticidad de dominancia ocular. Este fenómeno describe los cambios en la representación cortical de cada ojo tras alterar la experiencia visual en animales jóvenes a través de manipulaciones como la enucleación monocular, la cual consiste en la remoción quirúrgica de un ojo y se ha demostrado que induce efectos a nivel funcional, estructural y de la visión. Debido a que la plasticidad disminuye drásticamente en la adultez, comprender los mecanismos que permiten modularla nuevamente es relevante tanto para la neurobiología básica como para el desarrollo de posibles terapias para patologías como la ambliopía.

El laboratorio en el que se desarrolló este trabajo estudia los mecanismos celulares y moleculares de la plasticidad en la corteza visual, con particular interés en determinar si ciertas moléculas pueden reabrir ventanas de plasticidad en animales adultos. Para ello es necesario contar con herramientas experimentales que permitan evaluar la plasticidad de dominancia ocular.

La inducción por luz de la expresión del gen *Arc* constituye un marcador funcional ideal, ya que su expresión se induce de manera rápida y robusta tras la actividad sináptica. La hibridación *in situ* para detectar la expresión de *Arc* representa una estrategia anátomo-funcional que permite mapear la activación cortical inducida por estímulos visuales, y evaluar así la plasticidad de la corteza visual.

El objetivo central de este trabajo fue poner a punto la técnica de hibridación *in situ* para *Arc* en la corteza visual del ratón, y validar su uso para estudiar la plasticidad de dominancia ocular, y eventualmente, su modulación farmacológica. Para ello se generó una sonda de ARN complementaria al ARNm de *Arc* marcada con digoxigenina mediante PCR y transcripción *in vitro* y se implementaron dos protocolos de hibridación *in situ*, uno fluorescente y otro colorimétrico, hasta obtener una señal específica y reproducible de la expresión del ARNm de *Arc* en la corteza visual del ratón. Con el fin de verificar la validez de esta técnica para el estudio de la plasticidad, comparamos la distribución de la señal de *Arc* en la corteza visual entre un ratón al cual se le realizó la privación de la visión por enucleación monocular durante 3 días, y otro control, ambos jóvenes. Logramos evidenciar un aumento en la extensión mediolateral de la expresión de *Arc* en la CV ipsilateral al ojo estimulado de los animales privados de visión, lo cual refleja un cambio plástico.

En conjunto, el trabajo permitió establecer en el laboratorio una metodología funcional robusta para evaluar la plasticidad visual mediante la expresión inducida de *Arc* por luz. Esta herramienta quedará disponible para evaluar en futuros proyectos distintos factores moduladores de la plasticidad.

Lista de abreviaturas

3D	3 días
AD	Adulto
AP	Fosfatasa alcalina
ARN	Ácido Ribonucleico
AS	Anti-sentido
CSPGs	Condroitín-sulfato proteoglicanos
CV	Corteza Visual
CVb	Corteza Visual binocular
DAPI	4',6-diamidino-2-fenilindol
DO	Dominancia ocular
DR	Sigla por su nombre en inglés: <i>Dark rearing</i>
EM	Enucleación monocular
GABA	Ácido gamma-amino butírico
IVT	Sigla por su nombre en inglés: <i>in vitro transcription</i>
L	Luz
MABT	Técnica/Solución Buffer de Ácido Maleico
MPM	Marcador de Peso Molecular
NBT/BCIP	Nitro blue tetrazolium / 5-Bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate
NGL	Núcleo Geniculado Lateral
S	Sentido
SNC	Sistema Nervioso Central
SN	Sistema Nervioso
PBS	Buffer Fosfato Salino
PBS-T	Buffer Fosfato Salino- Tween
PC	Período crítico
PCR	Sigla por su nombre en inglés, <i>Polimerase</i>

Chain Reaction

PDO

Plasticidad de dominancia ocular

PM

Privación monocular

PNNs

Sigla por su nombre en inglés, *Perineuronal Networks*

ZB

Zona Binocular

Introducción

El Sistema Nervioso Central (SNC) traduce la información del mundo exterior a través de señales generadas por la actividad eléctrica transducida a partir de entradas sensoriales y coordina respuestas adaptativas frente a condiciones ambientales cambiantes. Tal función es posible gracias a su capacidad de ajustar su organización estructural y su función en respuesta a influencias del entorno. Esta propiedad, conocida como plasticidad dependiente de la experiencia, surge de la interacción del organismo con su ambiente, permitiéndole percibir y responder de manera adecuada a las variaciones ambientales. Constituye un proceso clave mediante el cual los circuitos neuronales son moldeados por estímulos externos, resultando especialmente importante en los procesos de aprendizaje y memoria (Galizia y Lledó, 2013).

Si bien factores intrínsecos median el ensamblaje inicial de los circuitos neurales en el cerebro, es la experiencia durante la vida postnatal temprana la que transforma los circuitos inmaduros en una conectividad organizada que sustenta las funciones cerebrales adultas. La actividad eléctrica provocada por la experiencia sensorial impulsa la formación de los circuitos neuronales, promoviendo el establecimiento, la eliminación y la reorganización de las conexiones sinápticas (Katz y Shatz, 1996).

Estas etapas del desarrollo de un organismo en las que los circuitos neuronales presentan una alta sensibilidad a la experiencia se definen como períodos críticos (PC). Durante los PC, las conexiones neuronales del cerebro se encuentran en constante modificación, consolidando los circuitos que resultan más adaptativos y que funcionan de manera más consistente (Hensch, 2016). En consecuencia, la adecuada estimulación sensorial durante los PC resulta fundamental para el establecimiento de una percepción adecuada. Al finalizar estos períodos, el cerebro se vuelve menos susceptible a la influencia del entorno y, por el contrario, la falta de exposición a experiencias adecuadas durante estos períodos afecta permanentemente tanto las funciones sensoriales como el comportamiento (Berardi et al., 2000).

Se han identificado PC de plasticidad en distintas modalidades sensoriales en todas las especies evaluadas hasta ahora. Su duración suele evaluarse en función de los efectos de la privación sensorial o de la recuperación posterior a esta (Galizia y Lledó, 2013), y decrece gradualmente, con una duración característica proporcional a la duración de vida de cada especie (Berardi et al., 2000). Esta reducción de la plasticidad a medida que transcurre el desarrollo es probable que confiera al organismo una mayor capacidad de adaptación a condiciones variables en etapas tempranas de la vida, mientras que asegura una arquitectura neuronal estable y eficiente para enfrentar condiciones más predecibles en la vida adulta (Newport et al., 2020).

Es importante destacar que la noción de períodos críticos de plasticidad cerebral aumentada durante el desarrollo no se limita únicamente a sistemas sensoriales, sino que se extiende a funciones motoras o cognitivas (Newport et al., 2001). Resulta fundamental considerar los mecanismos celulares y moleculares que subyacen a la plasticidad neuronal en diferentes especies de vertebrados e invertebrados (Galizia y Lledó, 2013).

La corteza visual como modelo de estudio de la plasticidad cerebral

El rol de la experiencia sensorial temprana en el desarrollo funcional y estructural de los circuitos neurales ha sido ampliamente estudiado en el sistema visual en desarrollo de los mamíferos. Gran parte de los conceptos actuales se fundamentan en el desarrollo de las columnas de dominancia ocular en la corteza visual (CV) (Katz y Shatz, 1996).

En los mamíferos, las células ganglionares de cada retina proyectan a diversas estructuras subcorticales, entre ellas, el Núcleo Geniculado Lateral (NGL) del tálamo. Antes de llegar al NGL la mayoría de los axones de cada ojo cruzan al hemisferio contralateral, es decir, al que se ubica en el lado opuesto al ojo en consideración; mientras que una pequeña proporción permanece en el hemisferio ipsilateral. Desde el NGL, las neuronas proyectan a la CV primaria que se divide en dos zonas: la monocular (recibe solo proyecciones del ojo contralateral) y la binocular (ZB) (recibe de ambos ojos, pero con dominancia del contralateral) (Shatz y Stryker, 1978; Daw et al., 1992) (**Figura 1**).

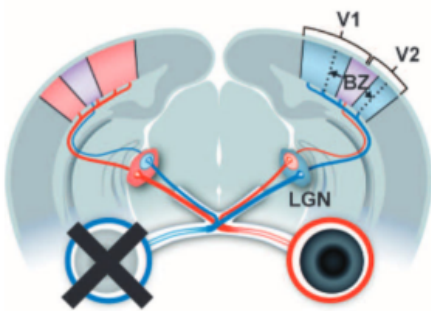


Figura 1. Esquema del sistema visual del ratón. Cada retina (derecha: rojo, izquierda: azul) proyecta principalmente al núcleo geniculado lateral (LGN) contralateral, que a su vez proyecta hacia la corteza visual primaria (V1). Una pequeña zona binocular (BZ, violeta) en V1 recibe información de ambos ojos. En respuesta a la privación de la visión en un ojo (por ejemplo, el izquierdo), la representación del ojo abierto (derecho; ipsilateral) se expande (flechas). (Figura extraída de Bochner et al., 2014).

Las aferencias provenientes del NGL hacia la ZB de la CV primaria se segregan a nivel de la capa 4, formando un patrón de franjas alternas. Esto ocurre en especies que poseen la distribución anatómica de columnas de DO, como primates, gatos y hurones (Crair et al., 2001; Adams et al., 2007). Estas constituyen la base estructural del sistema de columnas de dominancia ocular (DO), que determinan la respuesta diferencial de cada ojo frente a los estímulos visuales (Katz y Shatz, 1996). En el sistema visual del ratón, si bien hay una adaptación de la corteza visual binocular en respuesta a la privación monocular, no se encuentra el sistema de columnas de DO.

La actividad eléctrica, tanto la generada espontáneamente como la causada por estímulos sensoriales, dirige la formación de los circuitos neurales y promueve el establecimiento, eliminación y reorganización de las conexiones sinápticas (Galizia y Lledó, 2013). Por ejemplo, la segregación de proyecciones de la retina en franjas específicas correspondientes a cada ojo a nivel del NGL ocurre durante la vida embrionaria. Esta segregación anatómica es inicialmente impulsada por disparos sincrónicos de potenciales de acción generados espontáneamente en la retina previo a la apertura del ojo. Señales intrínsecas guían las proyecciones aferentes desde la retina hacia diversas estructuras subcorticales y corticales, conformando así el sustrato neuronal para el mapa retinotópico del campo visual. Lo mismo ocurre para otras características funcionales del sistema visual, que dependen parcialmente de procesos innatos. Sin embargo, una vez establecidos los patrones básicos de conectividad neural, la experiencia sensorial juega un papel clave en el

refinamiento de las conexiones sinápticas en el cerebro, siendo de particular importancia durante etapas tempranas del desarrollo cerebral (Galizia y Lledó, 2013).

Los experimentos pioneros de Hubel y Wiesel demostraron la importancia de la experiencia visual en la organización de las columnas de dominancia ocular en gatos (Wiesel y Hubel, 1970; Hubel y Wiesel, 1977; Katz y Shatz, 1996). Mediante el paradigma de privación monocular de la visión (PM), que consiste en cerrar temporalmente uno de los ojos del animal, observaron que, cuando ésta manipulación se realiza durante el PC (en gatos, 3.^a–12.^a semana postnatal, con pico en torno a P30: 4.^a semana), provoca una reorganización significativa a nivel anatómico y funcional en la zona binocular de la corteza visual primaria.

En particular, la PM induce una expansión de las columnas inervadas por el ojo que quedó abierto y una reducción de las columnas inervadas por el ojo privado de visión. Asimismo, utilizando registros eléctricos, se ha demostrado que la PM durante el PC genera un desplazamiento de la dominancia ocular hacia el no privado de visión (Hubel y Wiesel, 1969; Drager, U.C., 1978; Fagiolini et al., 1994; Gordon y Stryker, 1996; Sawtell et al., 2003; Tagawa et al., 2005) (**Figura 2**).

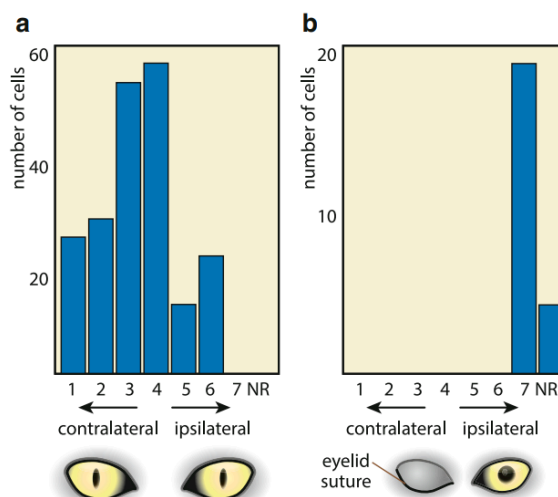


Figura 2. Histogramas de la distribución de las clases de dominancia ocular en la CV de gatos jóvenes normales y con PM.

Las células en los grupos de DO 1 y 7 son activadas exclusivamente por la estimulación del ojo contralateral e ipsilateral, respectivamente. Las células de las clases 2/3 muestran una marcada dominancia del ojo contralateral, mientras que las de las clases 5/6 tienen una marcada dominancia ipsilateral. Las células de la clase 4 son igualmente activadas por ambos ojos. **(a)** En la CV de gatos criados normalmente, el ojo contralateral estimula la mayoría de las neuronas corticales visuales. **(b)** En gatos criados con PM, las células dejan de responder al ojo contralateral privado y pasan a estar dominadas por el ojo ipsilateral. La PM en gatos adultos no altera la distribución de la dominancia ocular en la corteza estriada, aunque reduce la actividad general. NR: células no responsivas. (Figura extraída de Galizia y Lledó, 2013).

Por otro lado, cuando la privación de la visión se realiza en ambos ojos durante el PC, la mayoría de células corticales continúan respondiendo a ambos ojos, sin evidenciar una reducción en las columnas de dominancia ocular. Tales hallazgos sugieren que las

aferencias provenientes de ambos ojos compiten por el territorio cortical, y que es la actividad relativa, en lugar de la absoluta, de cada ojo la que determina el resultado de dicho proceso competitivo (Galizia y Lledó, 2013).

En consecuencia, períodos prolongados de PM durante el PC resultan en un fortalecimiento compensatorio de las respuestas del ojo abierto (Gordon y Stryker, 1996; Frenkel y Bear, 2004; Kaneko et al., 2006; Mrsic-Flogel et al., 2007; Tropea et al., 2009), mientras que el ojo privado se vuelve ambliópico, manifestando un deterioramiento de su agudeza visual y sensibilidad al contraste (Galizia y Lledó, 2013). En cambio, en animales adultos esta misma manipulación produce pocos o ningún cambio, indicando que el grado de plasticidad en esta etapa es muy limitado o nulo.

Lo mismo ocurre con la manipulación de la experiencia visual mediante enucleación monocular (EM), es un paradigma clásico que permite inducir y analizar cambios plásticos tanto a nivel anatómico como funcional (Mataga et al., 2004; Tagawa et al., 2005, Van Brussel et al., 2011).

Esta capacidad del sistema visual de modificar la representación cortical relativa de cada ojo se denomina plasticidad de dominancia ocular (PDO) (Galizia y Lledó, 2013), y constituye un ejemplo representativo de la plasticidad de los circuitos neuronales dependiente de experiencia (Bochner, et al., 2014).

El estudio de la PDO resulta clave para comprender los mecanismos mediante los cuales el cerebro se adapta a las experiencias sensoriales, con implicaciones que abarcan desde el rendimiento visual, la memoria, hasta la recuperación posterior a lesiones cerebrales. A su vez, el entendimiento de cómo las conexiones sinápticas se debilitan en condiciones de privación sensorial puede contribuir a identificar estrategias terapéuticas orientadas a revertir dichos cambios, con posibles aplicaciones en el tratamiento de patologías como la ambliopía (Smith et al., 2008). En este contexto, adquiere relevancia la reapertura del período de plasticidad en el cerebro adulto, con el fin de evaluar el potencial de recuperación funcional ante estas patologías.

Bases moleculares de la plasticidad dependiente de la experiencia en la corteza visual

Los mecanismos moleculares que sustentan los procesos de plasticidad en la CV primaria han sido ampliamente estudiados. Estos pueden dividirse, de manera general, en mecanismos funcionales y mecanismos estructurales.

Por un lado, los mecanismos funcionales involucran cambios en el balance entre el tono excitatorio e inhibitorio (E/I). Por otro lado, existen cambios estructurales que se relacionan con modificaciones en la organización y composición del tejido nervioso que se establecen a medida que se da el desarrollo del animal, lo que restringe drásticamente la generación de nuevas conexiones neuronales en el cerebro adulto (Bavelier et al., 2010).

Durante el desarrollo temprano, la excitación domina los circuitos corticales. Sin embargo, hay evidencia acumulada que apoya el rol de la modificación del balance excitación/inhibición (E/I) en la apertura del PC (Bavelier et al., 2010). Esta regulación

depende en gran medida de la maduración tardía de un subtipo particular de interneuronas GABAérgicas, las parvalbúmina positivas, que controlan las conexiones inhibitorias locales (Hensch et al., 2005). Dado que el desarrollo de la inhibición se retrasa con respecto al de la excitación, este desfase podría proveer un lapso de tiempo (PC) durante el cual la organización de los circuitos corticales es particularmente influenciada por la experiencia sensorial (Berardi et al., 2000).

La inhibición mediada por GABA ejerce un fuerte control sobre el PC en la PDO. Su consolidación establece el umbral necesario para el comienzo del PC, permitiendo que las neuronas de la CV detecten diferencias en la actividad de las aferencias de la retina que compiten entre ellas (Galizia y Lledó, 2013). Esta hipótesis está sustentada por experimentos en animales transgénicos que carecen de la Glutamato Descarboxilasa 65 (GAD65), una isoforma de la enzima sintetizadora de GABA, en los cuales la plasticidad dependiente de la experiencia en respuesta a la PM en el sistema visual durante el PC es deficiente. Notablemente, en estos animales, los niveles normales de plasticidad pueden restaurarse en cualquier etapa de la vida incrementando la transmisión GABAérgica en la CV, por ejemplo, con la administración de benzodiazepinas (Hensch et al., 1998, Fagiolini y Hensch, 2000).

En este contexto, se ha propuesto que si se reduce la inhibición a nivel cortical se retrasa el comienzo del PC, lo que sugiere la existencia de un umbral mínimo de inhibición que es necesario sobrepasar. De manera análoga, el desarrollo temprano de la inhibición mediada por GABA puede determinar un cierre temprano del PC (**Figura 3**). Así, se postula la presencia de un segundo umbral de inhibición durante el desarrollo que, una vez superado, señala el cierre de este período de plasticidad aumentada (Feldman, 2000, Hanover et al., 1999).

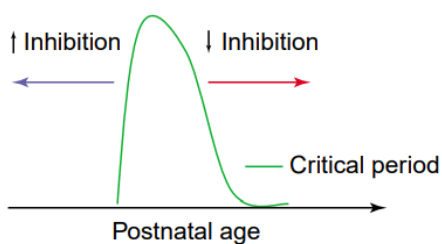


Figura 3. Relación entre inhibición intracortical y el PC en la CV. Efectos de un nivel disminuido (flecha abajo) o aumento temprano (flecha arriba) de inhibición sobre el curso temporal del período crítico (línea verde). (Figura extraída de Berardi et al., 2003).

Por otro lado, los mecanismos estructurales de la plasticidad consisten principalmente en la reorganización de la matriz extracelular que ocurre durante el PC. Estos mecanismos permiten la consolidación estructural resultado de las competencias entre entradas sensoriales, promoviendo la movilidad de las espinas dendríticas y su posterior recorte (*pruning*).

La matriz extracelular del SNC está compuesta principalmente por glicoproteínas denominadas condroitín-sulfato proteoglicanos (CSPGs), que desempeñan un papel esencial en la formación de barreras estructurales (Berardi et al., 2003). En el SNC adulto, una fracción de los CSPGs están generalmente condensados en estructuras especializadas

llamadas redes perineuronales (PNNs), las cuales envuelven completamente cuerpos neuronales y dendritas. En la CV, el proceso de condensación de CSPGs en PNNs comienza durante el desarrollo tardío y se completa tras el cierre del PC (Hockfield et al., 1990, Koppe et al., 1997, Bruckner et al., 2000, Pizzorusso et al., 2002).

Diversas técnicas experimentales han confirmado la relación entre las PNNs y la regulación del PC. Por ejemplo, mantener a animales en completa oscuridad (*dark rearing*), condición que prolonga el PC en la CV, previene a su vez la formación de PNNs (Berardi et al., 2000). Asimismo, la remoción farmacológica de CSPGs en animales adultos es capaz de reactivar la plasticidad en la CV, lo que sugiere que la maduración de las PNNs durante el desarrollo puede contribuir a la reducción progresiva de plasticidad que ocurre en la CV al finalizar el PC (Berardi et al., 2003).

Abordajes para el estudio de la plasticidad de dominancia ocular

Para el estudio de la PDO se utilizan corrientemente varios enfoques metodológicos (Wiesel et al., 1963A, 1963B; Hensch et al., 2018). Entre los métodos anatómicos se incluyen la detección de las columnas de dominancia ocular, el análisis de la extensión de las ramificaciones de las proyecciones tálamo-corticales o la densidad de espinas dendríticas. Por otra parte, los métodos fisiológicos abarcan el registro de la dominancia ocular por técnicas electrofisiológicas o imagenológicas (Smith et al., 2008).

Más recientemente, algunos grupos de investigación han implementado una estrategia alternativa y complementaria a estos métodos funcionales (Tagawa et al., 2005; Syken et al., 2006; William et al., 2012; Jenks et al., 2017). Se trata de una técnica anátomo-funcional basada en el análisis de la inducción por luz de la expresión del ARNm del gen de expresión temprana *Arc* por hibridación *in situ*. Esta técnica permite analizar el patrón espacial de distribución de las entradas funcionales que representan a cada ojo en la CV.

Arc es un gen de expresión temprana, enriquecido en el cerebro y regulado rápidamente por la actividad neuronal. Su expresión basal en la corteza de adultos se encuentra regulada por la actividad sináptica natural, según evidenciado por reducciones rápidas del ARNm de *Arc* luego de la interrupción de la actividad de aferentes visuales o administración de un antagonista del receptor NMDA. Su ARNm experimenta un transporte rápido hacia las dendritas y traducción sináptica local. La proteína interactúa con endofilina y dinamina, dando lugar a la formación de un endosoma de tráfico postsináptico que modifica selectivamente la expresión de receptores de glutamato tipo AMPA en las sinapsis excitatorias (Worley et al., 1995).

Se ha observado que al estimular un solo ojo con luz, la extensión medio-lateral de la expresión de *Arc* en la corteza visual ipsilateral al ojo estimulado, corresponde a la extensión de la corteza visual binocular de la CV. En animales jóvenes, que presentan una alta capacidad plástica, luego de realizar la PM durante 3 días, la extensión de la expresión de *Arc* en la CV ipsilateral aumenta en el sentido medio-lateral. En contraste, en animales adultos con plasticidad reducida, este cambio no ocurre (Tagawa et al., 2005).

Por lo tanto, esta aproximación experimental constituye una herramienta útil, que puede ser utilizada para detectar la presencia de plasticidad dependiente de la experiencia en la CV integrando información estructural y funcional.

La principal línea de investigación de la “Unidad de Neuroplasticidad” del Laboratorio de Neurociencias, donde he desarrollado mi tesis de grado, se centra en el análisis de los mecanismos celulares y moleculares de la plasticidad en la corteza visual del ratón. Recientemente el Laboratorio se encuentra analizando el potencial rol de dos moléculas en los procesos de plasticidad del Sistema Nervioso.

Una es el psicodélico no-clásico ibogaina, un alcaloide presente en la raíz de la planta *Tabernanthe iboga* (Alper et al., 2001; Maiciculatis et al., 2008; Wasko et al., 2018; Underwood et al., 2021). La ibogaína se ha estudiado para diferentes propósitos médicos y perfiles farmacológicos, siendo su efecto más estudiado el tratamiento para el desorden de uso de sustancias (Ishikawa et al., 2008; da Silva Brum et al., 2016; Gómez-Calderón et al., 2017; Freissmuth et al., 2018; Cameron et al., 2020). En los últimos años, se han explorado otras indicaciones terapéuticas, como el tratamiento del trastorno de estrés postraumático (PTSD) (Davis et al., 2020), y los síntomas depresivos (Noller et al., 2018; Brown et al., 2019).

La otra molécula es la cofilina 1, una proteína de la familia de las proteínas despolimerizantes de la actina, que ha sido implicada en varios procesos de plasticidad sináptica. Por ejemplo, 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).

Resultados preliminares del Laboratorio sugieren que ambas moléculas son capaces de inducir altos niveles de plasticidad en la corteza visual de animales adultos. Concretamente, se ha observado que en animales adultos tratados con ibogaína, así como con un péptido que modula la actividad de la cofilina 1, la PM vuelve a inducir cambios a nivel estructural y una reducción de la visión. Sin embargo, se desconoce cuáles son los efectos en la plasticidad funcional en la CV. Por ende, a través de este proyecto se buscó realizar la puesta a punto de la hibridación *in situ* para el gen *Arc* como herramienta para detectar la plasticidad en la corteza visual, y, a futuro, disponer de esta metodología para verificar si dichas moléculas son capaces de modular la PDO en animales adultos.

Objetivo general

Implementar en el Laboratorio de Neurociencias de la Facultad de Ciencias, UdelaR, la técnica de hibridación *in situ* para detectar la expresión de *Arc*, y verificar su uso como herramienta para estudiar la plasticidad de dominancia ocular en la corteza visual.

Objetivos específicos

1. Poner a punto la metodología de hibridación *in situ* para detectar la expresión del ARNm de *Arc* en la corteza visual del ratón.
2. Analizar la inducción por luz de la expresión de *Arc*.
3. Analizar la modificación de la extensión de la señal de *Arc* en animales plásticos durante el PC.

Materiales y métodos:

1. Animales

Se utilizaron ratones (*Mus musculus*) de la cepa C57B6/J, jóvenes de aproximadamente 28 días de vida posnatal (P28) y adultos (P60), 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 (URBE) de la Facultad de Medicina, UdelaR. Los experimentos en animales se realizaron en concordancia con los estándares del Comité de Ética en el Uso de Animales de la Facultad de Ciencias (CEUA) y son avalados por la Comisión Honoraria de Experimentación Animal (CHEA). Las manipulaciones de los animales experimentales fueron realizadas por Francesco M. Rossi, acreditación CNEA de tipo B y C2 (2021-2026). El protocolo de experimentación ha sido aprobado por la CEUA, Facultad de Ciencias (#1621, ExpFCien 240012-000026-22).

2. Manipulaciones

2.1. Enucleación monocular, dark rearing y exposición a la luz

Para analizar la inducción por luz de la expresión cortical del gen *Arc* en la CV, fue necesario estimular únicamente uno de los dos ojos. Por esta razón, los animales fueron enucleados monocularmente (EM) bajo anestesia intraperitoneal con Ketamina/Xilazina/Acedan 100/10/3 mg/Kg. La enucleación se realizó mediante la extracción quirúrgica de un ojo, utilizando pinzas y tijeras finas, realizando un corte a la altura del nervio óptico. A continuación, se suturaron los párpados con aguja e hilo de poliéster para cirugía cardiovascular (4-0 Ethibond) y se aplicó adhesivo quirúrgico. En el cuidado postoperatorio se administraron antibióticos y analgésicos. Tras un periodo de recuperación luego de la EM, los ratones fueron mantenidos en completa oscuridad (*dark rearing*, DR) durante un período de 16 a 18 horas, con el objetivo de minimizar la expresión endógena de *Arc*. Para inducir su expresión, los animales fueron expuestos a luz brillante (L) con una lámpara LED de 12 W, durante 30 minutos y luego sacrificados. En el caso del estudio de la PDO, los animales también fueron enucleados monocularmente pero se mantuvieron en esa condición durante 3 días. Posteriormente, permanecieron en oscuridad total, y, antes del sacrificio, se expusieron al mismo estímulo lumínico durante 30 minutos.

2.2. Obtención de cerebros

Los ratones fueron sacrificados mediante dislocación cervical y decapitación. Luego se procede al congelamiento de los tejidos. Para esto inicialmente se utilizó un primer protocolo que consistió en: disponer los cerebros en una cajita de aluminio reforzado, incluirlos en Tissue Tek (Sakura), y luego sumergir la cajita en nitrógeno líquido, para finalmente almacenarlos a -80°C

Dado que la calidad de los tejidos luego de la congelación con este protocolo limitaba la posibilidad de obtener señales consistentes en el tejido cerebral, este se modificó según se describe a continuación, permitiendo optimizar el rendimiento experimental: una vez extraídos los cerebros se congelaron directamente con un refrigerante instantáneo (Localizador de falla térmica refrigerante, Electroquímica, DLTA) e inmediatamente se almacenaron a -80°C ,

3. Obtención del plásmido con el inserto del ADN de Arc

Se partió de un vector pBluescript SK (-) de 3.0kb conteniendo el inserto con la secuencia del gen *Arc* (NM_19361) de 998 pb (nt 358-1355) (donación de Y. Bozzi, Università di Trento, Italia), esquematizado en la **Figura 4**. Dicho vector se utilizó para transformar bacterias quimio-competentes de *E. Coli* XL1 con el vector de interés a través de un shock térmico.

El vector contiene un gen de resistencia a la ampicilina, por lo cual, para identificar las colonias con inserto, se sembró la mezcla de transformación en placas de LB Agar conteniendo 100 µg/mL de ampicilina. De esta manera se seleccionaron los clones que internalizaron el vector en el proceso de transformación. Se procedió a amplificar estos clones por cultivo estándar, y extraer el ADN plasmídico utilizando el kit comercial GeneJET (Thermo Scientific, K0503). Se analizó la pureza y concentración del ADN extraído a través de Nanodrop Lite y su tamaño e integridad con un gel de agarosa. Posteriormente fueron secuenciados por la empresa MacroGen, Corea, para verificar la secuencia del inserto.

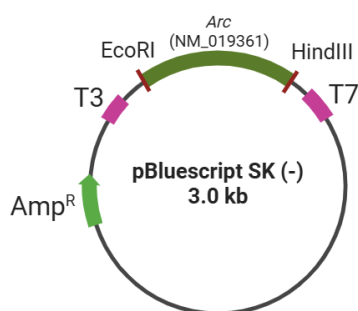


Figura 4. Vector pBluescript SK (-) de 3.0kb conteniendo el inserto con la secuencia del gen *Arc* (NM_19361) de 998 pb (nt 358-1355).

4. Análisis de la inducción de la expresión de Arc

Para los experimentos de hibridación *in situ* se adaptó un protocolo previamente establecido en el Laboratorio de Biología Celular de la Facultad de Ciencias (Preza 2003, Tesis de Doctorado). Sin embargo, la cantidad de sonda obtenida mediante este protocolo resultó baja y su detección en los experimentos de hibridación *in situ* presentó poca consistencia, por lo cual se introdujeron modificaciones, permitiendo optimizar el rendimiento y reproducibilidad experimental.

En las siguientes secciones se detallan las metodologías utilizadas.

4.1. Preparación de la sonda

A. Amplificación por PCR

Se amplificó un fragmento del gen *Arc* (NM_019361), correspondiente a los nucleótidos 358–1355 (998 pb), clonado en el vector pbluescript II SK (-) (**Figura 4**), mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). Con el objetivo de optimizar la obtención del

producto, se ensayaron distintas condiciones experimentales, especialmente la temperatura de hibridación (*annealing*), el uso de distintos *primers*, y el uso de distintas polimerasas.

Protocolo Q5HF

La reacción de PCR se realizó utilizando la enzima Q5® High-Fidelity DNA Polymerase (New England Biolabs), dNTP mix (Roche, 11277073910), primers T3 y T7 (Macrogen), agua Mili-Q y el *buffer* específico provisto por el fabricante, formulado para maximizar la fidelidad de la polimerasa. Se realizó un mix con todos los reactivos excepto el molde (plásmido), que se distribuyó en alícuotas individuales según el número de reacciones requeridas. Luego de realizadas las alícuotas se agregó el molde, y se incluyó un control negativo (alícuota a la que se le agregó agua, en vez del molde).

Los *primers* utilizados fueron:

- a) Primer T7: 5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3'
- b) Primer T3: 5'-ATTAACCCTCACTAAAG-3'

La reacción de amplificación se llevó a cabo siguiendo un protocolo de ciclos térmicos optimizados para garantizar alta fidelidad y eficiencia, según se detalla a continuación:

- **Desnaturalización:** 98°C durante 30s
- 35 ciclos:
 - **Desnaturalización:** 98°C durante 5 s
 - **Annealing:** 58°C durante 20 s
 - **Extensión:** 72°C durante 20 s
- **Extensión final:** 72°C durante 2 minutos.
- **Hold:** 20°C.

La temperatura de *melting* se obtuvo a través de la página web <https://tmcaculator.neb.com/#!/main>, recomendada por la empresa New England Biolabs, de donde proviene el kit de PCR utilizado. A partir de ésta temperatura se calculó la temperatura de *annealing* a utilizar en los ciclos de la reacción.

Protocolo Mango

Se realizó la reacción de PCR con los mismos reactivos mencionados en el protocolo Q5HF, pero utilizando la enzima Mango Taq (BIO-21083, Meridian Bioscience).

A su vez, se contaba con un primer T3 no óptimo para la realización de la PCR, por lo que se diseñó y adquirió otra versión, que incorporaba nucleótidos adicionales:

- c) Primer T3: 5'-CGCAATTAACCCTCACTAAAG-3'

Para determinar la temperatura de *annealing* óptima de la reacción se realizó una PCR en gradiente, manteniendo constantes todos los componentes de la mezcla y variando únicamente este parámetro en cada tubo. Los ciclos térmicos seguidos fueron:

- **Desnaturalización:** 94°C durante 3 minutos

- 35 ciclos:
 - **Desnaturalización:** 94°C durante 15 s
 - **Annealing:** 15 s, con las temperaturas 50°C, 52,4°C, 53,9°C, 58,4°C, 60°C.
 - **Extensión:** 72°C durante 30 s
- **Extensión final:** 72°C durante 2 minutos.
- **Hold:** 20°C.

Una vez establecida la temperatura de *annealing* óptima, se realizaron dos reacciones de PCR a mayor escala (con un mayor volumen de reacción por tubo) utilizando dicha condición con el fin de obtener una mayor cantidad de producto para su posterior utilización como moldes para la producción de la sonda a utilizar en los experimentos de hibridación *in situ*.

B. Verificación del producto de PCR por electroforesis en gel de agarosa

La integridad y efectividad del proceso se evaluaron mediante electroforesis en gel de agarosa, técnica que permite la separación y visualización de ácidos nucleicos según su tamaño.

Para verificar el producto amplificado (tamaño esperado: ~1000 pb), se realizaron geles de agarosa al 1% disolviendo la agarosa en buffer TAE, junto con un agente intercalante para la posterior visualización del ADN (GoodView, SBS, Genetech, Protocolo Q5HF o Bromuro de Etidio, Eurobio, GEPBET02AF, Protocolo Mango). Una vez solidificado el gel, se cubrió la cuba con buffer TAE 1X, que contribuye a la conducción de la corriente y mantiene la estabilidad del ADN durante la corrida.

Las muestras se prepararon para la siembra realizando diluciones sobre parafilm, utilizando Buffer de Carga (Thermo Scientific, R1161), agua miliQ y el producto de amplificación. Se sembraron en los distintos carriles del gel las muestras amplificadas, el control negativo (sin el ADN molde), y un marcador de peso molecular (MPM, Gene-Ruler SM1331). También se siembra en un carril del gel el plásmido entero para verificar su integridad.

Una vez cargadas las muestras, se conectó la fuente de poder, y se aplicó un voltaje de 100 V durante aproximadamente 30 minutos. Al finalizar la corrida, el gel se colocó en un transiluminador para observar las bandas correspondientes a los productos sembrados.

El análisis del producto de amplificación adecuado se realizó evaluando la integridad de las bandas obtenidas por el producto de PCR y comparando su altura de migración con las bandas del MPM. Dado que el MPM contiene fragmentos de ADN de tamaños conocidos, la comparación permite estimar el peso molecular del producto amplificado. De esta manera, se confirmó que el producto de PCR obtenido tiene una longitud aproximada de 1000 pb, correspondiente al fragmento del gen *Arc*. Este análisis, permite verificar si la amplificación por PCR tuvo éxito.

C. Purificación del producto de PCR

El fragmento de ADN amplificado se purificó con el kit comercial de Zymo Research (d4013), siguiendo el protocolo indicado por el fabricante. Este paso es necesario para asegurar la obtención de un producto de alta pureza, garantizando que pueda ser utilizado

como molde en la etapa de transcripción. Luego se utilizó Nanodrop (espectrofotometría de micro volúmenes, NANODROP 2000 Thermo Scientific) para estimar pureza (utilizando la medida de absorbancia a 260/280 nm) y concentración (A260).

D. Transcripción *in vitro* y purificación de la sonda

Para la producción de la sonda sentido (control negativo) o antisentido, se llevaron a cabo transcripciones *in vitro* utilizando como molde el fragmento del gen *Arc* previamente amplificado por PCR y purificado. Dado que estos procedimientos implican el manejo de ARN, se llevaron a cabo en una superficie libre de RNasa, empleando materiales y reactivos libres de RNasa (*Anexo*).

La reacción de transcripción se realizó en presencia de la RNA polimerasa T7 o T3 (Thermo Scientific, EP0111), que producirán las sondas antisentido y sentido, respectivamente. El mix de la reacción incluyó el Dig RNA Labelling Mix 1X (11277073910, Roche), que contiene UTP marcado con digoxigenina (DIG); buffer de transcripción 1X (incluido con RNA polimerasa), agua Mili-Q e inhibidor de RNasa (Thermo Scientific, EO0381), con el fin de evitar la degradación del ARN sintetizado durante la reacción. La solución de transcripción se incubó a 37°C durante 2 horas para permitir la reacción de síntesis de ARN.

Finalizada la incubación, se tomó una alícuota del producto y se trató con DNasa (Thermo Scientific, EN0521) para eliminar el molde de ADN, incubando durante 15 minutos a 37°C. Se realizaron múltiples reacciones de transcripción, y en etapas posteriores se escaló el volumen de estas con el objetivo de generar una mayor cantidad de sonda para su uso en la hibridación *in situ*.

La purificación del ARN transcrito se llevó a cabo utilizando el kit comercial RNA Clean & Concentrator-5 (R1015, Zymo Research), siguiendo el protocolo del fabricante. Se reservaron alícuotas tanto del ARN purificado tratado con DNasa como sin tratar, con el propósito de evaluar la integridad y pureza del producto.

La verificación de la integridad de las sondas se realizó mediante electroforesis en gel de agarosa 1%, empleando materiales estériles y libres de RNasa. En los distintos carriles se sembraron la sonda tratada con DNasa, para confirmar la obtención de un producto libre de contaminantes de ADN, y la sonda sin tratar.

E. Dot blot

El dot blot es una técnica de inmunodetección o hibridación que permite la detección, identificación y cuantificación de moléculas específicas, como ácidos nucleicos o proteínas en una muestra. Consiste en depositar directamente pequeñas cantidades de muestra sobre una membrana, donde estas quedan inmovilizadas. Posteriormente, se emplean sondas o anticuerpos marcados para revelar la presencia de la molécula de interés mediante métodos colorimétricos, quimioluminiscentes o fluorescentes (Mishra, 2022; Bhat, y Rao, 2020). En el caso de ácidos nucleicos, permite la detección específica de ADN o ARN.

En este proyecto, se empleó la técnica con el objetivo de estimar la concentración de las sondas de ARN y evaluar cualitativamente el grado de marcado con DIG.

Se utilizó una membrana de nylon Hybond-N⁺ (Amersham), sobre la cual se aplicaron diluciones seriadas (1/1, 1/10, 1/100 y 1/1000) de las sondas sentido, antisentido y de una sonda control de ADN marcada con DIG (DNA DIG labelling #109567 Boehringer). Las muestras se colocaron sobre la membrana, que luego se cubrió con papel Whatman y se incubó durante 30 minutos a 60°C.

Posteriormente, se procedió al revelado. Se realizó el entrecruzamiento (*cross-linking*) de los ácidos nucleicos a la membrana mediante irradiación UV durante 1 minuto en un transiluminador. La membrana se incubó con la solución B1 durante 5 minutos y luego con la solución B2 (ver *Anexo*) durante 20 minutos. Se incubó con anticuerpo anti-DIG conjugado a fosfatasa alcalina (Anti-Digoxigenin, Fab fragments, Roche, 1142634910) diluido 1:2000 en solución B1 durante 20 minutos. A continuación, se realizaron dos lavados de 10 minutos en B1 y un lavado rápido en solución B3 (ver *Anexo*).

El revelado se llevó a cabo en oscuridad, incubando la membrana durante 5–10 minutos con los sustratos específicos de la fosfatasa alcalina: NBT (Nitro blue tetrazolium) y BCIP (5-Bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate) en solución B3, a concentraciones finales de 330 µg/mL y 167 µg/mL, respectivamente (Sigma, 11681451001). La reacción enzimática resultante genera un precipitado de color violeta, permitiendo visualizar un patrón de intensidades proporcional al grado de marcado con DIG de las muestras aplicadas. La reacción fue detenida con agua ultrapura (mQ).

Una vez revelada, se obtuvo un patrón de intensidad de señales para cada dilución seriada. Las señales correspondientes a las sondas sentido y antisentido sintetizadas mediante transcripción *in vitro* fueron comparadas con la intensidad de la sonda control, cuya concentración conocida (~10 ng/µL) permitió estimar de forma aproximada la concentración de las sondas. A su vez, este análisis permitió verificar el correcto marcaje con DIG, asegurando la especificidad y sensibilidad del procedimiento.

4.2. Preparación de las secciones cerebrales

Con el fin de evaluar la inducción de la expresión del gen *Arc* en la corteza visual binocular, se empleó la técnica de hibridación *in situ* con sondas de ARN complementarias al ARNm de interés. Para ello, se obtuvieron secciones cerebrales de 20 µm de espesor utilizando un criostato (Cryocut-E 97 00 51; Reichert-Jung), y se recolectaron sobre portaobjetos Starfrost (adhesive, Knittel Glass). Las secciones fueron almacenadas a -80°C hasta su uso.

Con el objetivo de optimizar la obtención de secciones en la región específica de la corteza visual binocular (una zona acotada dentro de la extensión más amplia de la corteza visual), se ensayaron distintas estrategias de corte y recolección. Para verificar la localización anatómica de las secciones, se realizaron tinciones con DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol), un fluoróforo que se une fuertemente a regiones ricas en ADN delimitando los núcleos celulares. Estas tinciones facilitaron la evaluación histológica del tejido mediante microscopía de fluorescencia y la identificación de la región cortical de interés.

Con el fin de facilitar la referencia histológica de las secciones cerebrales obtenidas mediante cortes en criostato a lo largo del eje antero-posterior del cerebro, se aplicó un esquema de muestreo: se recolectó una sección cada 60 µm dentro del mismo portaobjetos. Para ello, las secciones se distribuyeron en distintos grupos de portaobjetos (designados A,

B, C, etc.), cada uno conteniendo series de 5 o 6 cortes separados por 20 μm . De esta manera, cada portaobjetos contenía secciones espaciadas regularmente a intervalos de 60 μm . Este procedimiento se repitió en múltiples tandas, lo que permitió seleccionar posteriormente las secciones más adecuadas para los ensayos de hibridación *in situ*.

4.3. Hibridación *in situ*

Mediante la transcripción *in vitro* se generó una sonda marcada con Dig-UTP, lo que permitió su posterior detección a través de un anticuerpo anti-DIG conjugado a una enzima. Durante la etapa de optimización del protocolo de hibridación *in situ*, se ensayaron dos protocolos de detección, que variaban en la enzima utilizada en la reacción para detectar la sonda: detección mediante fluorescencia usando la peroxidasa de rábano (HRP) y mediante colorimetría usando la fosfatasa alcalina (AP), esta última siendo el enfoque más ampliamente reportado en la literatura para este tipo de experimentos (Tagawa et al., 2005; Skyen et al., 2006; Jenks et al., 2017).

En ambos protocolos, se trabajó bajo condiciones libres de RNAsas hasta la incubación con el anticuerpo primario. Para ello, se utilizó una mesa específica para el uso de ARN, los materiales fueron esterilizados en horno (3 h a 140°C), y las soluciones se trataron con dietilpirocarbonato (DEPC, 1:1000) durante toda la noche y se autoclavaron durante 40 minutos, según se detalla en el *Anexo*.

Primero, las secciones cerebrales fueron fijadas durante 30 minutos con paraformaldehído (PFA) al 4% en PBS directamente sobre portaobjetos en cámara húmeda. Luego de la fijación, los portaobjetos se trasladaron a *coplins* y se realizaron los siguientes lavados para permeabilizar los tejidos: tres lavados de 5 minutos en PBS libre de RNAsas, uno de 5 minutos en trietanolamina 0,1 M, uno de 10 minutos en trietanolamina 0,1 M con anhídrido acético al 0,25% y finalmente dos lavados de 5 minutos en PBS libre de RNAsas (ver *Anexo*).

A continuación, se realizó una etapa de pre-hibridación, en la cual los portaobjetos fueron colocados nuevamente en cámaras húmedas tras eliminar el exceso de PBS, y se incubaron durante 1 hora a 65°C con solución de prehibridación precalentada. Esta solución contiene todos los componentes de la solución de hibridación, a excepción de la sonda, y su función principal es bloquear sitios inespecíficos y minimizar uniones no específicas (ver *Anexo*). Los portaobjetos se cubrieron con parafilm o con cubreobjetos para asegurar una mayor retención de la solución.

Finalizada la prehibridación, se retiraron los parafilm o cubreobjetos y el exceso de solución. Se procedió a la hibridación con sondas complementarias al ARNm de *Arc*, así como sondas en orientación sentido (como control negativo), generadas por transcripción *in vitro*. Se incubaron con solución de hibridación durante 12-20 horas a 65°C, con los portaobjetos cubiertos.

En pasos posteriores a la hibridación, los protocolos difieren en la estrategia de detección de la sonda empleada: fluorescente y colorimétrica. A continuación, se detallan las diferencias.

Protocolo Fluorescencia

En ambos casos se realizaron lavados post-hibridación, seguidos de un bloqueo previo a la incubación con el anticuerpo primario. Los portaobjetos se trasladaron nuevamente a *coplins* para efectuar los lavados correspondientes.

En el protocolo basado en fluorescencia, los lavados consistieron en incubaciones de 30 y 45 minutos en solución SSC 0,2X preparada con agua miliQ libre de RNAsas (ver *Anexo*), seguidas de dos lavados adicionales de 45 minutos cada uno en solución MABT.

Posteriormente, las secciones se incubaron durante 2 horas a temperatura ambiente en cámara húmeda con solución de bloqueo con suero (*Anexo*), con el fin de evitar uniones inespecíficas del anticuerpo.

Transcurrido este tiempo, se retiró el exceso de solución y se incubaron los portaobjetos durante toda la noche a 4°C con el anticuerpo primario anti-digoxigenina conjugado a la peroxidasa (anti-DIG HRP, Roche), diluido 1:500 en solución de bloqueo sin suero. Para esta etapa, los portaobjetos se cubrieron con parafilm en cámara húmeda.

Al día siguiente, previo a la revelación de la señal, se realizaron lavados en *coplins*: tres en MABT y uno rápido en PBS con imidazol 0,1 M pH 7,4. La señal se reveló incubando durante 5 minutos en oscuridad con una solución de revelado conteniendo peróxido de hidrógeno al 0,001% y tiramida-FITC 1:100 (ver *Anexo*). Posteriormente, se efectuaron lavados en *coplins*: uno rápido y dos de 5 minutos en PBST. Luego, los portaobjetos se incubaron durante 8 minutos en oscuridad con DAPI (1:10 000 en PBST), seguidos de lavados con PBST y PBS. Finalmente, se procedió al montaje utilizando una solución de montaje para fluorescencia (Fluoroshield, F6182), sobre la cual se colocaron los cubreobjetos, sellados posteriormente con esmalte.

Protocolo Colorimétrico

De manera análoga, este protocolo incluyó lavados post-hibridación. Inicialmente, se realizó un lavado rápido en SSC 1X (con formamida al 50%), seguido de dos lavados de 40 minutos en SSC 1X con 50% de formamida a 65°C (siendo este el único paso efectuado directamente sobre los portaobjetos), y finalmente dos lavados de 30 minutos en MABT bajo agitación a temperatura ambiente.

Posteriormente, los portaobjetos se incubaron durante 2 horas a temperatura ambiente en cámara húmeda con solución de bloqueo con suero. Transcurrido este tiempo, se retiró el exceso de solución y se incubaron toda la noche a 4°C con el anticuerpo primario conjugado a la fosfatasa alcalina, diluido 1:2000 en solución de bloqueo sin suero, cubiertos con portaobjetos.

Al día siguiente, se realizaron lavados previo a la revelación, incubando los portaobjetos en *coplins* durante 2 horas en MABT bajo agitación. La detección se realizó mediante reacción colorimétrica. En este caso, los portaobjetos se incubaron dos veces durante 10 minutos en solución AP buffer (ver *Anexo*). Posteriormente, se añadió a esta solución el cromógeno

NBT/BCIP en una proporción de 20 µl/ml, y cubriendo los portaobjetos con parafilm para evitar evaporación. La reacción colorimétrica se dejó desarrollar durante varias horas a temperatura ambiente, y se continuó la incubación toda la noche a 4°C.

Al próximo día, los portaobjetos se enjuagaron durante 5–10 minutos en buffer fosfato 0,1 M (PB) y luego se lavaron de manera individual aproximadamente 10 veces en agua destilada. A continuación, se dejaron secar unos minutos sobre papel absorbente y se conservaron en oscuridad hasta su montaje. Una vez completamente secos, se ensamblaron utilizando un medio de montaje (Entellan, Sigma, 1079610100) y se cubrieron con cubreobjetos.

4.4. Análisis de las imágenes

Las imágenes de fluorescencia se obtuvieron utilizando el Microscopio Zeiss AxioZoom V16), con una cámara Axiocam 305 mono acoplada al microscopio. Las imágenes se capturaron con una intensidad del 50%, 3 segundos de exposición, con un aumento de 2X y usando excitación y emisión específicas de 357 y 470 nm para detectar la señal de DAPI y FITC, respectivamente.

Las imágenes correspondientes a los experimentos utilizando Fosfatasa Alcalina se obtuvieron con la lupa Stemi 508, acoplada a la cámara Axiocam Erc5s.

El análisis de las imágenes se realizó utilizando el software libre Fiji (Fiji Is Just ImageJ, NIH, imagej.net/software/fiji/). Las imágenes correspondientes al protocolo colorimétrico de detección de la sonda, en primer lugar se invirtió los colores (*Edit* → *Invert*) y luego se modificó a escala de grises (*Image* → *Lookup Tables* → *Grays*).

Primero, se sustrae a todas las imágenes a cuantificar una señal de fondo obtenida en el tejido por fuera de la corteza visual primaria. Para ello, con la herramienta “*segmented line*” se trazó una línea de 30 píxeles en la sección que presenta menor intensidad de señal. Se calcularon la señal promedio y el desvío estándar de los píxeles que componen la línea.

Luego, se delineó una línea a lo largo de la zona binocular de la CV primaria, con un grosor que abarque todas las capas de la CV desde medial hacia lateral. Para darle curvatura a la línea, se usa la herramienta “*spline fit*”. Con la herramienta “*plot profile*” se obtuvo un gráfico que indica la intensidad promedio de la señal de todos los píxeles que forman una línea perpendicular a la línea trazada. Se aplicó un filtro de pase bajo triangular a la señal resultante. La longitud de la zona binocular se definió como la zona alrededor del valor más alto de intensidad, con una intensidad mayor a 2SD sobre el promedio de la señal de fondo.

5. Grupos Experimentales

Según los distintos objetivos específicos, se utilizaron los siguientes grupos experimentales:

1. Evaluar la realización de la hibridación *in situ* para detectar el ARNm de *Arc*. Se usaron animales adultos controles sin tratamientos.
2. Evaluar la realización de la inducción por luz de la expresión de *Arc*. Se usaron animales adultos con EM, mantenidos en DR y expuestos a la luz (EM DR L) y se compararon con animales adultos con EM, mantenidos en DR pero no expuestos a la luz (EM DR).

3. Evaluar la realización de estos experimentos para la detección de PDO en animales plásticos (PC).

Se usaron animales jóvenes que se les realizó EM y se mantuvieron privados de la visión durante 3 días (EM 3d), mantenidos en DR y expuestos a la luz (PC EM 3d DR L). Se compararon con animales jóvenes con EM, que no estuvieron 3 días privados de la visión: se indujo directamente la expresión de *Arc* a través de un período de DR y exposición a la luz (PC EM DR L).

Resultados

1. Puesta a punto de la metodología de hibridación *in situ* para detectar la expresión del ARNm de *Arc* en la corteza visual del ratón.

Para llevar a cabo el primer objetivo específico, se diseñó y generó la sonda de *Arc*, según se describe en la sección de “*Materiales y métodos*”.

En primer lugar, se realizaron PCR con el protocolo Q5HF correspondiente a la enzima Q5® High-Fidelity DNA Polymerase (New England Biolabs). Se visualiza el producto de la reacción a través de una electroforesis en gel de agarosa en la **Figura 5a**. En el carril 1 se observa un producto único de amplificación a la altura correspondiente a 1 kb de la banda del MPM. Debido a que es el tamaño esperado para el gen *Arc* contenido en el vector amplificado, se considera que la reacción de amplificación fue exitosa. Por otro lado, en el carril 2 se sembró el control negativo de la reacción (sin el ADN molde), donde se visualiza una banda de intensidad tenue a la misma altura que la observada en el carril 1, por lo que podría corresponder a una contaminación al momento de preparar la solución cargada en dicho carril. Finalmente, en el carril 3 se sembró una solución conteniendo el plásmido entero E2B. La banda que se observa es acorde al tamaño esperado para el plásmido, ya que se encuentra a una altura de aproximadamente 4 kb según las bandas del MPM.

Sin embargo, como no se obtuvo el rendimiento adecuado para realizar varias tandas de hibridación *in situ*, se realizó una PCR en gradiente de temperaturas para la enzima Mango Taq, con la cual logramos determinar la temperatura óptima para la fase de *annealing* de la reacción en la cual se maximiza la generación de producto. Este se verificó a través de electroforesis en gel de agarosa al 1% (**Figura 5b**), en el cual se observa un único producto de amplificación a la misma altura que la banda correspondiente a los 1 kb del MPM, en todos los carriles. Este es el esperado para el tamaño del gen *Rat Arc* (NM_019361), de 998 pb. En todos los carriles se observan bandas únicas de intensidad fuerte, indicando una cantidad considerable de ADN. Se resolvió utilizar la temperatura de *annealing* de 60°C (carril 6), con la cual se observan escasas impurezas.

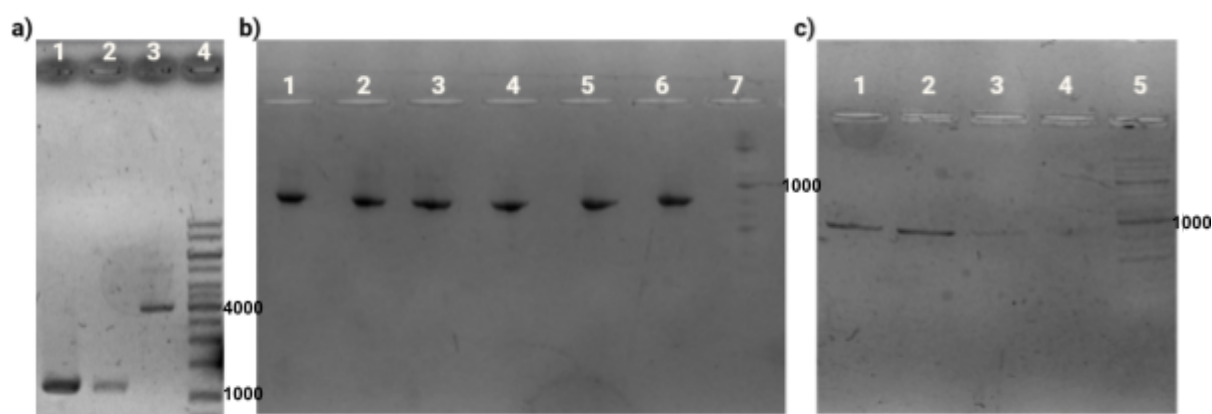


Figura 5. Electroforesis en gel de agarosa 1% para verificar los productos de las reacciones de PCR.

a) Verificación del producto de PCR realizada con la enzima Q5HF. Carril 1: producto de PCR, carril 2: control negativo sin el ADN molde, carril 3: plásmido E2B, carril 4: MPM. **b)** Verificación de los

productos de PCR en gradiente realizada con la enzima Mango Taq. Carriles n 1-6: productos de PCR ; 7: MPM. **c)** Verificación de los productos de PCR realizada con la enzima Mango Taq. Carril 1-4: productos de PCR, distintos volúmenes de producto sembrados. 1: 5 µl, 2: 2,5 µl, 3: 1,25 µl, 4: 0,62 µl. Carril 5: MPM. **(a, b, c).** A la derecha del MPM se indica la cantidad de bases a las que corresponde la/s banda/s de referencia del MPM.

A partir de la condición óptima establecida se realizaron amplificaciones para distintas instancias de experimentos utilizando alrededor de 20 ng del plásmido diluido (E2B 1:20). Los productos obtenidos se verificaron nuevamente mediante electroforesis en gel de agarosa, según se muestra en la **Figura 5c**. En los carriles 1 al 4 se cargaron volúmenes decrecientes del producto de amplificación con el fin de estimar su concentración. Para ello, se comparó la intensidad de las bandas resultantes de la PCR con la del MPM, que corresponden a concentraciones conocidas de ADN. Se observó que las bandas de los carriles 1 y 2 presentaron una intensidad superior a la del MPM, lo cual sugiere que la concentración de ADN en dichas muestras es mayor que la del marcador, aun cuando no se determinó el valor exacto de dicha concentración.

Una vez realizada la amplificación por PCR de *Arc* y verificado su producto, se purificó y cuantificó utilizando el espectrofotómetro NanoDrop (espectrofotometría de micro volúmenes), su pureza (representada por la relación Abs_{260}/Abs_{280}) y concentración (en ng/µL). Se disponen los valores en la tabla a continuación.

Tabla 1. Comparación de valores de pureza (Abs_{260}/Abs_{280}) y concentración (ng/µL) de los productos de la amplificación de *Arc* utilizando los protocolos 1 y 2.

	Protocolo Q5HF	Protocolo Mango
Pureza (Abs_{260}/Abs_{280})	1,92	1,85
Concentración (ng/µL)	93,1 ng/µL	255,6 ng/µL

Como se detalla en la **tabla 1**, utilizando ambos protocolos se logró obtener un producto de pureza (Abs_{260}/Abs_{280}) mayor a 1,8, adecuado para proseguir con el diseño experimental. Este valor umbral que seleccionamos es ampliamente aceptado como representación de una pureza suficiente para que, en este caso, se dé la transcripción de la región flanqueada por la enzima polimerasa. Si bien en ambos casos los valores se encuentran en el rango esperado para poder llevar a cabo los siguientes pasos experimentales, se evidencia una diferencia considerable en la concentración de molde de ADN obtenido con los distintos protocolos.

Una vez purificado el molde de ADN, se procedió a realizar la transcripción *in vitro* (IVT) para la obtención de las sondas de ARN utilizando 2 µg de ADN molde por reacción de 20 µl.

En primer lugar, se realizó una IVT a partir de los productos obtenidos por PCR utilizando el protocolo correspondiente a la enzima Q5HF. Los productos de transcripción se verificaron mediante electroforesis en gel de agarosa 1% RNase-Free. En la **Figura 6**, en los carriles 1 y 2 se cargaron las sondas antisentido y sentido, respectivamente. En ambos se observa un producto a la altura aproximada de la banda de 1 kb del MPM, esperado para *Arc*, indicando

que la reacción de transcripción ocurrió de forma exitosa. Se aprecia, además, que la banda correspondiente a la sonda antisentido (carril 1) presenta una intensidad menor, reflejando una concentración inferior respecto a la sonda sentido (carril 2).

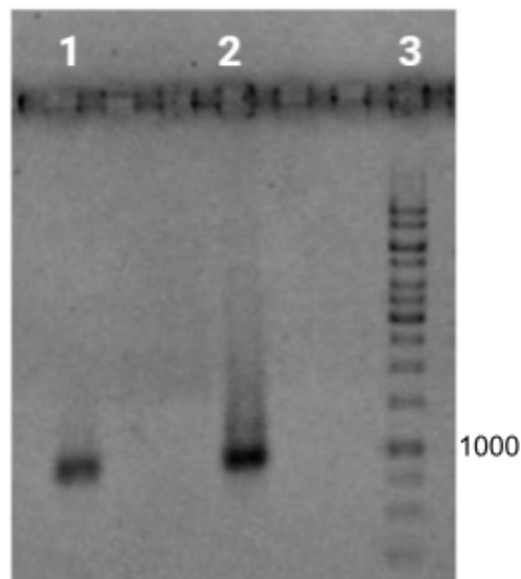


Figura 6. Electroforesis en gel de agarosa 1% RNase-Free para visualizar los productos de la transcripción *in vitro*.

Verificación del producto de transcripción *in vitro* generada a partir del protocolo Q5HF de PCR para la sonda antisentido (carril 1) y sentido (carril 2). Carril 3: MPM. A la derecha del MPM se indica la cantidad de bases a las que corresponde la banda de referencia del MPM.

Las sondas generadas mediante transcripción *in vitro* fueron posteriormente purificadas con un kit comercial y evaluadas por la técnica de dot blot. Según se observa en la **Figura 7**, las sondas fueron correctamente marcadas con DIG ya que se observa una señal producto de la reacción colorimétrica. El patrón de intensidad de la sonda control corresponde al de un ADN marcado con DIG a 10 ng/μl.

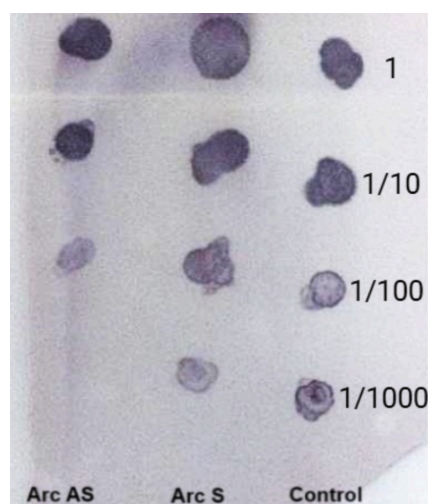


Figura 7. Dot blot para las sondas generadas por IVT con el protocolo Q5HF, comparada con una sonda control de concentración conocida (10 ng/μl), marcadas con digoxigenina. Sonda antisentido (Arc AS) y sentido (Arc S) de *Arc*, comparada con la sonda control.

Se observó un patrón de intensidades de la señal de las sondas antisentido y sentido menor que la correspondiente a la sonda control, por lo que se estima que la concentración de estas sondas que se encuentran marcadas es menor a 10 ng/μl. A su vez, la concentración de la sonda antisentido marcada fue menor que la de la sonda sentido, ya que la marcación presenta una menor intensidad. Concuerd a con la intensidad de las bandas visualizadas en la electroforesis en gel de agarosa, aunque con esta técnica se evidencia únicamente la sonda que se encuentra marcada con DIG (**Figura 6**).

Por otro lado, se realizó una transcripción *in vitro* con el protocolo Mango, a partir del producto de PCR generado con la enzima Mango Taq, y con el primer c). El producto de la reacción se verificó con una electroforesis en gel de agarosa 1%, y se visualiza en la **Figura 8**.

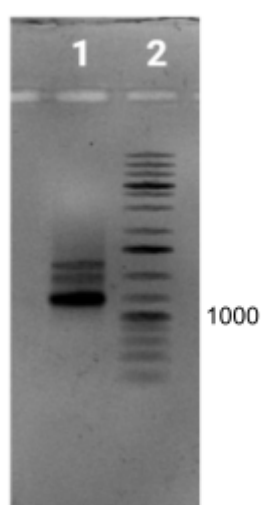


Figura 8. Electroforesis en gel de agarosa 1% RNase-Free para visualizar el producto de la transcripción *in vitro*. Verificación del producto de transcripción *in vitro* generada a partir del

protocolo Mango de PCR para la sonda antisentido (carril 1). Carril 2: MPM. A la derecha del MPM se indica la cantidad de bases a las que corresponde la banda de referencia del MPM.

En este protocolo, en la transcripción *in vitro* se generó únicamente la sonda antisentido utilizando la polimerasa T7 la cual se visualiza en el carril 1 del gel de agarosa (**Figura 8**). En el carril 1 se evidencian varias bandas, que corresponden a estructuras secundarias que puede adoptar el transcrito, como pueden ser tallos, bucles, etc. Esto sucede ya que la electroforesis se realizó en un gel nativo y no desnaturizante, permitiendo que el ARN conserve dichas estructuras secundarias y no migre exclusivamente en función del tamaño. No obstante, predomina en intensidad una banda correspondiente al tamaño esperado para *Arc*, con una intensidad superior a la de las bandas del MPM (carril 2).

Por otra parte, en la **Figura 9** se visualiza la sonda antisentido producto de transcripción *in vitro* generada en otro experimento a partir del protocolo 2. En el carril 1 se observa la sonda obtenida tras la transcripción y purificación sembrada directamente, mientras que en el carril 2 se realizó un tratamiento adicional con DNAsa a la misma sonda, previo a la siembra en el gel.

Al realizar un tratamiento con DNAsa, se observa una banda de mayor intensidad correspondiente al ARN, lo que puede indicar la obtención de un producto de mayor pureza y concentrado al eliminar fragmentos de ADN restantes de los pasos previos de generación de la sonda.

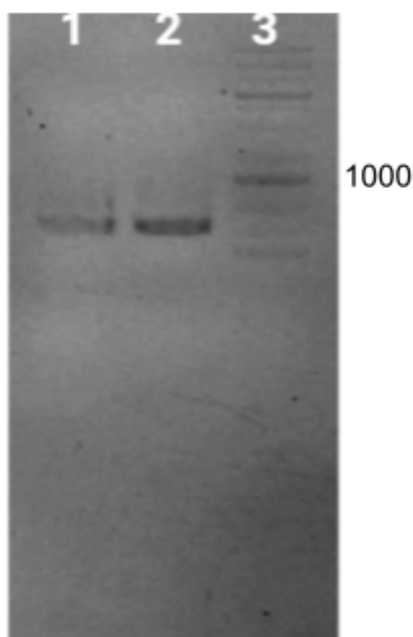


Figura 9. Electroforesis en gel de agarosa 1% RNase-Free para visualizar los productos de la transcripción *in vitro*.

Verificación del producto de transcripción *in vitro* generada a partir del protocolo 2 de PCR para la sonda antisentido (carril 1), y la sonda antisentido tras tratamiento con DNAsa. Carril 3: MPM. A la derecha del MPM se indica la cantidad de bases a las que corresponde la banda de referencia del MPM.

Posteriormente, al evaluar la sonda antisentido obtenida con el protocolo 2 a través de dot blot se evidencia una señal colorimétrica, indicando que la sonda fue correctamente marcada con DIG. Por otro lado, el patrón de intensidad en las diluciones de la sonda antisentido es mayor que el de la sonda control, por lo cual se estima que su concentración es mayor a 10 ng/μl. Este resultado coincide con lo que se observa en las **Figuras 8 y 9**, donde la intensidad de las bandas de los carriles 1 y 2, respectivamente, son mayores a las del MPM, indicando de la misma manera una concentración alta de ARN.

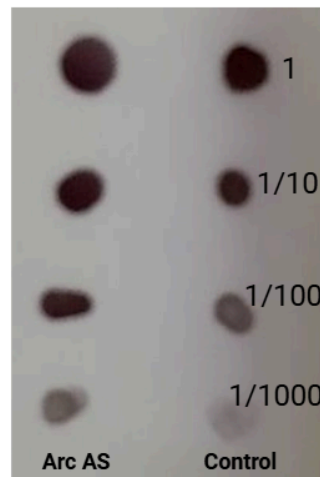


Figura 10. Dot blot para las sondas generadas por IVT con el protocolo 2, comparada con una sonda control de concentración conocida (10 ng/μl), marcadas con digoxigenina.
Sonda antisentido (Arc AS) comparada con la sonda control.

Una vez obtenida la sonda, realizamos la recolección de las secciones cerebrales utilizando las distintas variaciones metodológicas mencionadas bajo la sección 3.2. de *Materiales y métodos* para optimizar la obtención de secciones que se encuentren dentro de la corteza visual binocular. Dentro de estas pruebas, se realizaron tinciones con el fluoróforo DAPI, para verificar la histología de los tejidos seccionados, según se visualiza en la **Figura 11**.

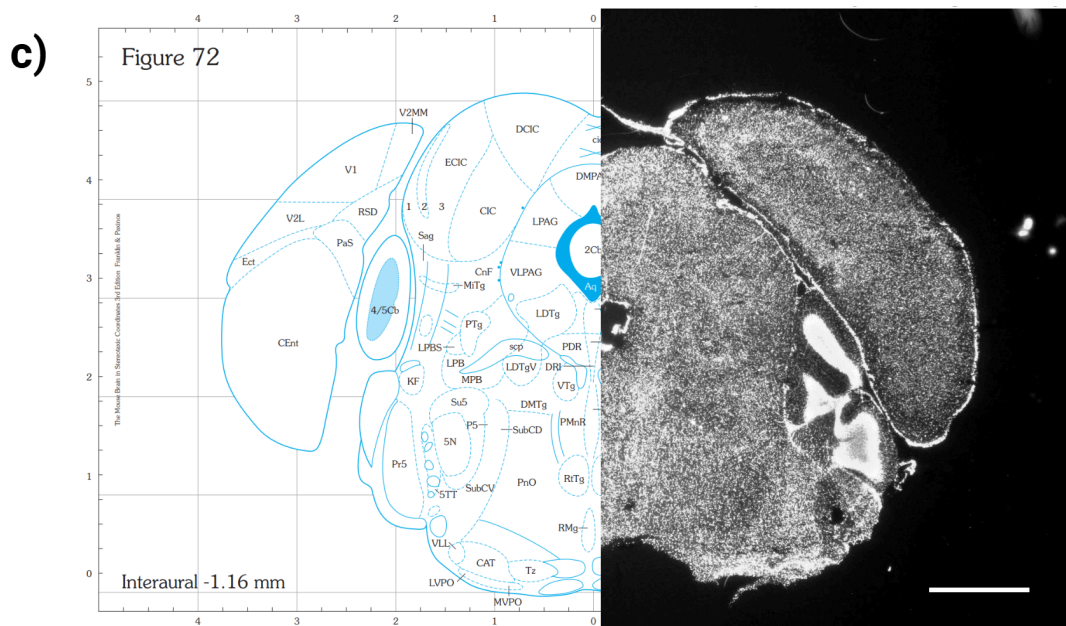


Figura 11. Secciones coroneales del cerebro de ratón.

A la izquierda de cada figura, recorte del *Mouse Brain Atlas in Stereotaxic Coordinates* (Franklin & Paxinos, 3ª edición). A la derecha, recorte de una sección cerebral teñida con DAPI en blanco y negro, a la misma altura del eje anteroposterior. Altura del eje anteroposterior: **a)** -2 **b)** 3.7 **c)** -4.9. Barras de escala, 1 mm.

La tinción con DAPI permitió identificar estructuras anatómicas de referencia y, de este modo, determinar la posición de las secciones a lo largo del eje anteroposterior del cerebro del ratón.

En la **Figura 11a** se observa el hipocampo dorsal, lo que indica que la sección corresponde a una región relativamente rostral, anterior a la ubicación de la corteza visual binocular (CVb). Por tanto, esta sección no resulta adecuada para la hibridación *in situ* dirigida a la CVb. En cambio, la **Figura 11b** muestra una sección intermedia, en la cual el hipocampo se encuentra completo y lateral, y no se observan estructuras extremadamente rostrales ni caudales. Esta organización anatómica es indicativa de una altura aproximada a la de la corteza visual binocular, por lo que se seleccionaron secciones cerebrales que se ubican en esta región para realizar la hibridación *in situ*.

En la **Figura 11c**, en cambio, se identifican estructuras caudales como el cerebelo, lo que evidencia que la sección pertenece a una región excesivamente posterior, más allá del nivel donde se localiza la CVb.

Tras la delimitación anatómica de las secciones, se realizó la hibridación *in situ* siguiendo los protocolos de fluorescencia y colorimétrico de detección de la sonda (**Figura 12**). La detección específica del transcrito de *Arc* confirmó la eficacia del protocolo de fluorescencia y validó las condiciones experimentales establecidas para proseguir con la puesta a punto. Una vez que logramos realizar la hibridación *in situ* para animales normales y específica para la sonda de *Arc*, sin ningún protocolo de estimulación, podemos realizar la inducción por luz de la expresión de *Arc*.

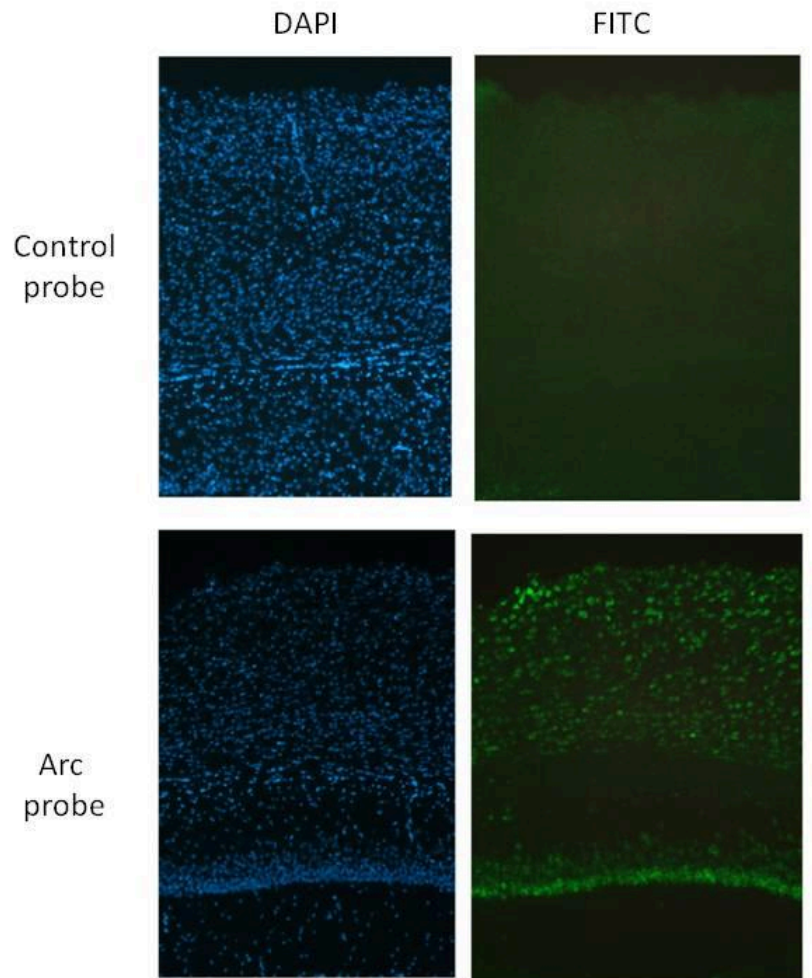


Figura 12. Hibridación *in situ* para el ARNm de *Arc*.

En el panel izquierdo tinción con DAPI y en el derecho con FITC. En las imágenes superiores se visualiza las secciones de corteza visual de ratón adulto con sonda control, y en las inferiores con la sonda antisentido para *Arc*.

2. Analizar la inducción por luz de la expresión de *Arc*.

Para llevar a cabo este objetivo utilizamos cerebros de ratones jóvenes a los cuales les realizamos el protocolo de estimulación descrito en “Materiales y métodos”. Posteriormente realizamos la hibridación *in situ* con el primer protocolo, como se observa en la **Figura 13**.

Logramos inducir la expresión del gen *Arc* a través de un estímulo lumínico otorgado únicamente al ojo abierto, ya que se observa una clara señal de la sonda en la CV ipsilateral al ojo estimulado, que correspondería con la ubicación de la CV binocular.

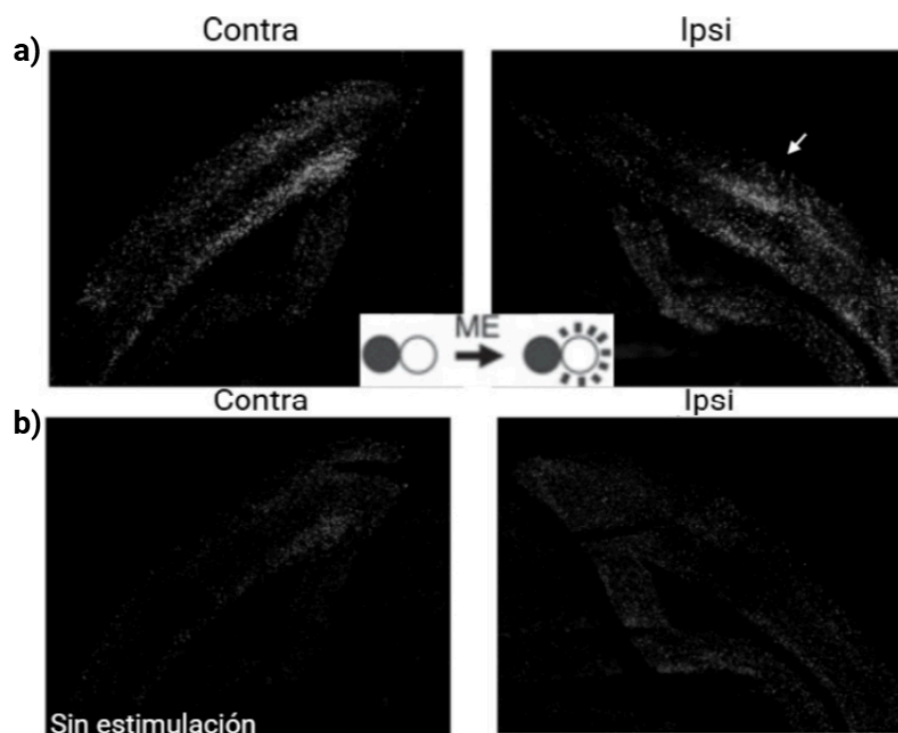


Figura 13. Hibridación *in situ* para el ARNm de *Arc*.

a) Patrón de inducción de la expresión de *Arc* en animales jóvenes. La flecha indica la expresión de *Arc* en la corteza visual binocular ipsilateral al ojo estimulado. **b)** No se observa inducción de *Arc* en la CV en ausencia de estimulación visual.

3. Analizar la modificación de la extensión de la señal de *Arc* en animales plásticos durante el periodo crítico.

Análisis con el protocolo 1

Una vez que verificamos la correcta inducción por luz de la expresión de *Arc*, evaluamos la modificación de la extensión mediolateral de la señal de la inducción de *Arc* en la CVb ipsilateral al ojo estimulado, en animales que se encuentran en el período crítico. Tal análisis se llevó a cabo con el protocolo de estimulación descrito en “Materiales y métodos”. En la **Figura 14** se observan resultados de la hibridación *in situ* con el protocolo 1.

Se logró evidenciar la PDO en animales jóvenes, correspondientes al período crítico, mediante un incremento en la extensión mediolateral de la señal de *Arc* en la CVb ipsilateral al ojo estimulado (**Figura 14**), luego del protocolo de estimulación (ME 3d DR L), en comparación con los animales ME DR L.

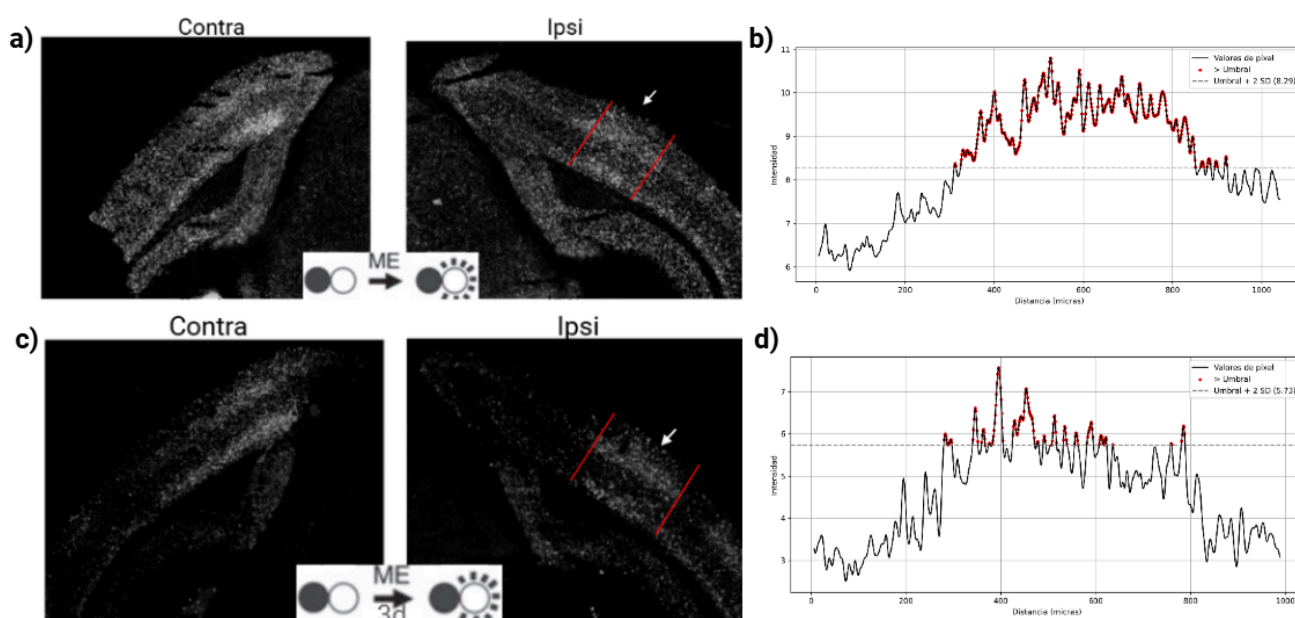


Figura 14. Hibridación *in situ* para el ARNm de *Arc* a través del protocolo 1 y cuantificación de la extensión en la CVb ipsilateral al ojo estimulado.

a y c) Extensión de la inducción de la expresión de *Arc* posterior al protocolo de estimulación. La flecha indica la expresión de *Arc* en la corteza visual binocular ipsilateral al ojo estimulado.

b y d) Análisis de la extensión medio-lateral de la expresión. La parte en rojo de las gráficas corresponde al área delimitada por las líneas rojas en las figuras a y c. Se puede notar un aumento de la extensión de la expresión de *Arc* en animales jóvenes con EM durante 3 días durante el período crítico (aprox. 607 μ m) con respecto a animales jóvenes de control (aprox. 507 μ m).

Análisis con el protocolo 2

Como especificado en los métodos, el protocolo 1 no dio resultados consistentes en la señal de expresión de *Arc*, por lo que se realizaron varias modificaciones hasta definir el protocolo 2. La diferencia principal siendo la utilización de la fosfatasa alcalina como método de detección.

Asimismo, el experimento se replicó utilizando el protocolo 2, en animales jóvenes con protocolo de estimulación igual al mencionado para el primer protocolo, donde se observó un patrón de marcaje de *Arc* similar (**Figura 15**). En este caso, la señal se distinguió con mayor consistencia y nitidez, lo que sugiere una mejor definición de la marcación bajo las condiciones de este protocolo.

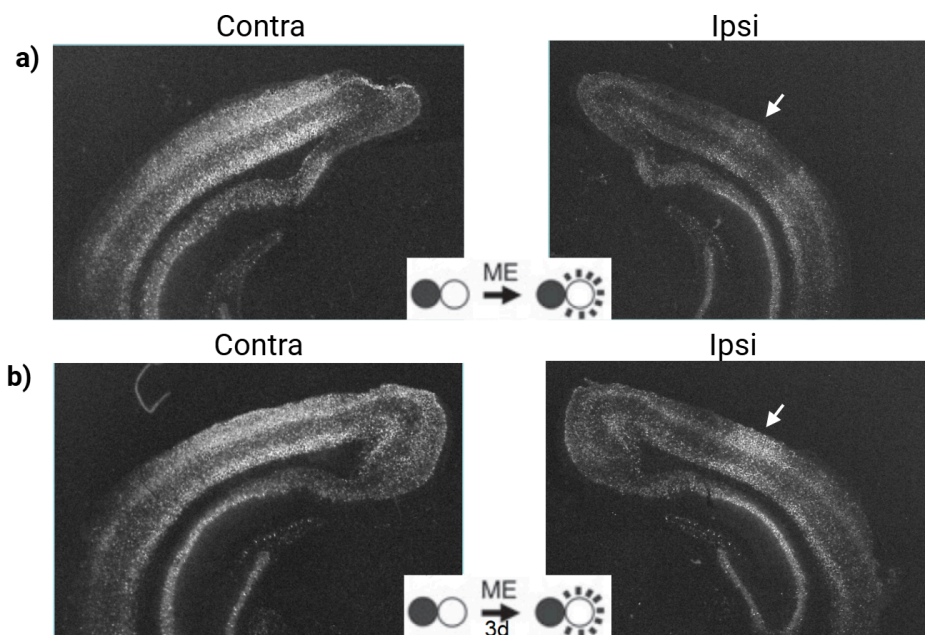


Figura 15. Hibridación *in situ* para el ARNm de *Arc* a través del protocolo 2 y cuantificación de la extensión de la CVb ipsilateral al ojo estimulado.

a) Extensión de la inducción de la expresión de *Arc* posterior al protocolo de estimulación. **b)** Aumento de la extensión mediolateral de la expresión de *Arc* en animales jóvenes con 3 días de EM.

A su vez, pudimos observar que la extensión mediolateral de la expresión de *Arc* tiene una tendencia a aumentar tras el protocolo de enucleación monocular durante 3 días, según se evidencia en la **Figura 16**. El análisis se realizó sobre la CV entera (**Figura 16a**) así como en las capas superiores e inferiores de la CV (**Figura 16c y b**, respectivamente) donde también se puede observar una tendencia al aumento según el análisis realizado en distintas secciones de un mismo animal.

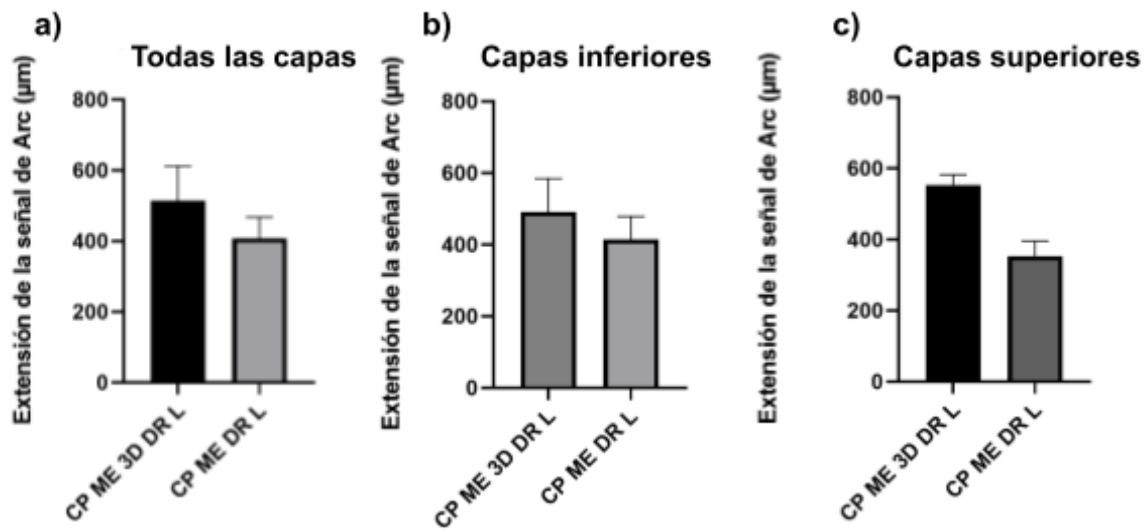


Figura 16. Extensión mediolateral de la señal de Arc en la CVb en μm .

Comparación de la extensión mediolateral de la señal de Arc en la CV ipsilateral al ojo estimulado en μm entre grupos con distintos protocolos de estimulación: CP ME DR L vs CP ME3D DR L. **a)** Medida en todas las capas de la CV **b)** Medida en las capas inferiores de la CV. **c)** Medida en las capas superiores de la CV.

Discusión

El objetivo central de esta tesina fue establecer en el Laboratorio una técnica robusta y accesible para evidenciar procesos de plasticidad dependiente de la experiencia en la corteza visual primaria del ratón, un modelo ampliamente validado para el estudio de la plasticidad cerebral (Hooks y Chen, 2020). El modelo del ratón emergió como modelo porque ofrece ventajas únicas incluyendo herramientas moleculares y genéticas para monitorear, marcar y manipular subtipos neuronales o circuitos específicos (Huberman y Niell, 2011). Más aún, se lograron grandes avances en apoyar la idea que los mecanismos de plasticidad en mamíferos pueden estudiarse en ratón y que sus sistemas sensoriales son más complejos que lo que se creía originalmente (Nys, et al., 2015).

La manipulación de la experiencia visual mediante enucleación monocular (EM) es un paradigma clásico que permite inducir y analizar cambios plásticos tanto a nivel anatómico como funcional (Mataga et al., 2004; Tagawa et al., 2005, Van Brussel et al., 2011). En el presente trabajo, se optó por implementar este abordaje en lugar de la privación monocular (PM), dado que era necesario realizar la remoción quirúrgica de uno de los ojos del ratón con el fin de asegurar la estimulación exclusiva del ojo remanente. En este contexto, y considerando que la enucleación monocular era un procedimiento indispensable para el diseño experimental, se decidió emplearla como estrategia principal de manipulación de la experiencia visual.

El enfoque de este trabajo es especialmente relevante para nuestro Laboratorio, que investiga los mecanismos celulares y moleculares de la plasticidad cortical, incluyendo el papel de moléculas como cofilina 1 (Dapuetto et al., 2025) e ibogaína (Acuña, tesis doctorado, 2025).

Relevancia de la metodología basada en el estudio de la expresión del ARNm de *Arc*

Esta metodología resulta de particular interés para nuestro Laboratorio. Si bien ya ha implementado aproximaciones anatómicas o comportamentales, como el análisis de la densidad de espinas dendríticas o pruebas de agudeza visual, se buscaba incorporar un enfoque complementario, previamente caracterizado y técnicamente accesible. En este sentido, el análisis de la inducción por luz de la expresión del gen de expresión temprana *Arc* mediante hibridación *in situ* constituye un método particularmente útil.

Arc es un gen de expresión temprana cuya inducción es altamente dependiente de la actividad neuronal (Jenks et al., 2017) y su expresión deja un rastro duradero en secciones de tejidos (Morgan y Curran, 1991; Kaczmarek y Chaudhuri, 1997; Guzowski et al., 1999). Su uso es especialmente adecuado dado que su expresión se induce de forma muy marcada y rápida tras la estimulación visual (Tagawa et al., 2005).

La inducción de *Arc* por estimulación lumínica durante el conocido PC del ratón permite visualizar cambios en la representación cortical de los ojos y constituye un marcador confiable de plasticidad ocular y reorganización funcional (Tagawa et al., 2005, Rudinsky et al., 2012; Hrvatin et al., 2017). Específicamente, esta técnica permite evaluar de forma confiable el patrón espacial de distribución de las entradas funcionales que representan a

cada ojo en la CV, así como analizar funcionalmente las entradas del ojo ipsilateral. De este modo, permite determinar cómo estas se alteran a nivel de la corteza visual ipsilateral al ojo estimulado tras intervenciones que alteran la experiencia visual (Tagawa et al., 2005, Hrvatin et al., 2017). Estudios que emplean esta técnica han reportado que la privación monocular durante el PC expande y fortalece la inducción de Arc en la CV ipsilateral al ojo no privado de visión (Tagawa et al., 2005), cambios que se corresponden con los observados en estudios electrofisiológicos (Fagiolini et al., 1994; Gordon y Stryker, 1996; Sawtell et al., 2003).

Optimización de la producción de sondas de ARN

Para llevar a cabo el experimento, en primer lugar fue necesario generar la sonda de ARN de Arc en una cantidad suficiente para realizar varias tandas de experimentos. El objetivo ideal sería usar 12 portaobjetos por experimento de hibridación *in situ*, cada uno con 5 secciones y empleando 3 portaobjetos por animal, de manera de poder comparar adecuadamente las distintas condiciones en un mismo experimento.

Dado que cada portaobjetos requiere un volumen de aproximadamente 200 microlitros de sonda a una concentración de alrededor de 0,2 nanogramos por microlitro, fue necesario definir un protocolo que permitiera obtener tal cantidad de sonda a través de la metodología más rápida y eficaz posible. Por esta razón, realizamos cambios en el protocolo inicial (protocolo 1), optimizando ciertos parámetros que nos permitieron obtener una mayor producción de la sonda a través del protocolo 2.

Existen diversas estrategias para la producción de sondas de ARN a partir de una secuencia molde de ADN insertada dentro en un plásmido. Una manera consiste en clonar la secuencia de interés directamente sobre el plásmido, a partir de los promotores de la ARN polimerasa como T3 o T7. El plásmido se digiere con una enzima de restricción que corta corriente abajo del inserto, generando un molde linearizado. Luego, se realiza la transcripción *in vitro* directamente sobre el plásmido linealizado con la ARN polimerasa correspondiente, obteniendo así la sonda de ARN (Melton et al., 1984; Schenborn y Mierendorf, 1985; Milligan y Uhlenbeck, 1989; Krieg, P., 1990). Este es un método robusto, bien caracterizado (Melton et al., 1984; Krieg y Melton, 1987), y permite la síntesis de grandes cantidades de ARN. Sin embargo, requiere la preparación y purificación de plásmidos en cantidad y puede generar transcritos indeseados si no se completa la digestión adecuadamente. Además, los generados dependen de la disponibilidad de sitios de restricción apropiados para linealizar el plásmido sin afectar la región de interés (Schenborn y Mierendorf, 1985).

Una alternativa consiste en amplificar por PCR la región de interés incluyendo en la secuencia amplificada promotores de ARN polimerasas, y utilizar el producto directamente como molde para una IVT. Este método es rápido, evita la manipulación y purificación de plásmidos y digestiones enzimáticas. Además, permite diseñar fácilmente moldes de cualquier región del gen aunque no haya sitios de corte para enzimas de restricción y reduce el riesgo de contaminación con transcritos indeseados (Weier y Rosette, 1988; Green y Sambrook, 2020). Por esta razón, optamos por este método, al tratarse de un procedimiento estándar de laboratorio, accesible y fácil de realizar.

Para la generación de un molde de la sonda se realizaron experimentos de PCR que fueron exitosos. No obstante, se decidió modificar el protocolo original mediante el ajuste de uno de los primers y la enzima utilizada. Con el protocolo 2 logramos obtener un producto de amplificación de *Arc* a una concentración mucho mayor, lo que facilitó la realización de múltiples experimentos. En los pasos posteriores, (transcripción *in vitro*) se logró producir adecuadamente la sonda antisentido (AS) y sentido (S, para el protocolo 1). Adicionalmente, para optimizar el protocolo experimental se verificó la histología con DAPI y se implementó una recolección estratégica de las secciones cerebrales. Este enfoque permitió localizar correctamente la CV binocular a lo largo del eje anteroposterior del cerebro, asegurando que estamos a la altura correcta. Esto fue fundamental para confirmar que la señal observada correspondía efectivamente a *Arc* y que la marcación era consistente en la CVb tras la estimulación del ojo no privado, lo cual respalda la especificidad del protocolo.

Hibridación *in situ*

Una vez obtenidos los materiales para realizar la hibridación *in situ*, procedimos con el primer objetivo específico de esta tesina: verificar si podíamos marcar a *Arc*, la cual llevamos a cabo sin protocolo de estimulación en animales adultos. Efectivamente, logramos de manera exitosa realizar el marcaje de *Arc*. Asimismo, la ausencia de señal con la sonda utilizada como control negativo confirmó que la marcación observada correspondía específicamente a la hibridación de la sonda de *Arc*.

En línea con el segundo objetivo específico, logramos inducir la expresión de *Arc* en la CVb de animales jóvenes a través de un estímulo lumínico. Este paso fue necesario para evaluar posteriormente la inducción de la expresión de *Arc* en condiciones de privación monocular. Con el protocolo 1, basado en el revelado con fluorescencia, la marcación de la zona correspondiente a la CVb se evidenció claramente en la CV ipsilateral al ojo estimulado, tras 30 minutos de estimulación monocular. El patrón de expresión, la extensión de la activación y su ubicación coincidieron con lo reportado en la bibliografía para la CVb (Tagawa et al., 2005). A su vez, la ubicación de la señal dentro del corte varió gradualmente a medida que avanzamos a lo largo del eje anteroposterior. La expresión de *Arc* también estuvo presente en toda la extensión de la CV contralateral al ojo estimulado.

Observamos que la inducción de *Arc* depende de la estimulación visual, ya que en el grupo de animales que no recibieron los 30 minutos de estímulo lumínico no se observó una señal de *Arc* con tal intensidad. Este resultado coincide con lo esperado según reportes de trabajos previos (Tagawa et al., 2005). En cuanto al protocolo 2, no se realizaron controles en ausencia de estímulo lumínico, dado que esto ya había sido verificado con el protocolo 1, y el patrón e intensidad de inducción de la expresión de *Arc* observado fue similar al evidenciado con el primer protocolo, lo cual sugiere fuertemente que se debe al marcaje específico de *Arc* inducido en la CVb por luz. Es importante destacar que en los resultados de los experimentos que utilizaron el segundo protocolo de síntesis de sonda, no se incluyeron controles negativos con la sonda sentido, ya que tras hacer hibridación *in situ* con dicha sonda se observaba una señal, aunque la misma era tenue. Consideramos que podría deberse a una contaminación durante la preparación de soluciones con las respectivas sondas. Dado que el objetivo central de esta tesina era lograr la visualización clara y específica de *Arc* en la CVb, esta dificultad no impidió continuar con los análisis. Si

bien es fundamental realizar experimentos con una sonda como control negativo para reforzar la interpretación de los resultados, estamos confiados en la especificidad de la señal observada, ya que se corresponde estrechamente con lo descrito previamente por otros autores (Tagawa et al., 2005). Sin embargo, consideramos la necesidad de realizar estas verificaciones como perspectiva a futuro.

Aumento de la extensión mediolateral de la inducción de *Arc* en la CVb

Por último, el tercer objetivo específico consistió en verificar el aumento de la extensión mediolateral de la inducción de la expresión de *Arc*, a través del protocolo de estimulación de enucleación monocular, un período de oscuridad y un estímulo lumínico (ME DR L) vs enucleación monocular, 3 días de privación de la visión, período de oscuridad y estímulo lumínico (ME 3D DR L).

Logramos evidenciar una tendencia al aumento de la extensión mediolateral de la señal de *Arc* en la CV ipsilateral al ojo no privado luego de 3 días de privación monocular en comparación con animales no privados de visión. Dicho efecto se evidenció en todas las capas de la CV, y se mantuvo al desglosar la señal de *Arc* en capas. Este resultado es consistente con resultados reportados previamente tanto para modelos de ratón (Tagawa et al., 2005) como en otros modelos animales, incluidos gatos (Shatz et al., 1978) y monos (Hubel et al., 1977; LeVay, Wiesel y Hubel, 1980). En dichos trabajos evidencian el efecto del rearreglo anatómico de las entradas funcionales de ambos ojos reflejado en una expansión de las columnas de dominancia ocular inervadas por el ojo abierto, en particular en la capa 4 (Hubel et al., 1977; Shatz et al., 1978; LeVay, Wiesel y Hubel, 1980); o entre las 2-4 (Tagawa et al., 2005).

La validez de esta técnica depende de qué tan fielmente la inducción de *Arc* refleje el estado funcional de las entradas de ambos ojos en la CV. Diversos estudios demostraron que el patrón de inducción de *Arc* tras estimulación monocular en ratón reproduce adecuadamente la conocida representación de los ojos ipsilateral y contralateral basado en registros con microelectrodos (Gordon y Stryker, 1996; Hubener, M. 2003), potenciales evocados visuales (visual evoked potential, VEP) (Porciatti et al., 1999; Sawtell et al., 2003), técnicas ópticas (Antonini et al., 1999; Schuett et al., 2002; Kalatsky et al., 2003) y trazadores neuronales anatómicos (Drager et al., 1974; Antonini et al., 1999).

El método de inducción de *Arc* presenta, además, una ventaja: permite evaluar la representación del ojo ipsilateral en la CV a una altura del desarrollo neonatal que no puede ser estudiado utilizando otras técnicas como VEP, registros con microelectrodos u otros métodos de imagenología óptica o anatómicos (Tagawa et al., 2005). Contar con una metodología reproducible para detectar plasticidad en la CV en todas las etapas del desarrollo es esencial para evaluar los mecanismos de potenciales moduladores de la plasticidad como cofilina 1 e ibogaína. Se ha demostrado que la manipulación de la expresión de *Arc* o de la dinámica de la actina (regulada por cofilina 1) puede restaurar o potenciar la plasticidad en la corteza visual adulta, abriendo nuevas vías para intervenciones terapéuticas (Jenks et al., 2017; Dapuerto et al., 2025).

En conclusión, la implementación y optimización de la detección de *Arc* por hibridación *in situ* en la CV del ratón constituye una herramienta sólida y sensible para el estudio de la PDO y sus mecanismos moleculares. Añade una forma de evaluar funcionalmente la extensión espacial de la representación del ojo ipsilateral en la CV y permite la evaluación de potenciales moduladores moleculares de la plasticidad.

Conclusiones

El objetivo de esta tesina fue incorporar a la línea activa del Laboratorio de Neurociencias una metodología que permita evaluar la PDO en la CV primaria del ratón, que sea complementaria a las técnicas que ya se realizaban. Logramos implementar la metodología del análisis de la inducción de la expresión del gen de expresión temprana *Arc* en el modelo del ratón, la cual permite evaluar de manera funcional las entradas del LGN hacia la CV directamente.

Si bien la puesta a punto presenta una serie de limitaciones, incluyendo la restante validación experimental debido a la falta de experimentos exitosos utilizando la sonda sentido, el escaso número de animales analizados y la pendiente verificación de la ausencia de PDO en animales adultos, consideramos que logramos avanzar considerablemente con la implementación de la técnica.

Con el paradigma de privación de la visión para evaluar la presencia de cambios plásticos, modificaciones en la extensión mediolateral de la inducción de *Arc* en la CV ipsilateral al ojo estimulado se han reportado como evidencia de tales cambios. Efectivamente, pudimos evidenciar una tendencia al aumento en la extensión de la inducción de *Arc* en la corteza visual de animales jóvenes entre un ratón al cual se le realizó la privación de la visión por enucleación monocular durante 3 días, en comparación con animales control. Según lo reportado previamente, este resultado indicaría la presencia de una respuesta plástica en animales jóvenes, reflejando el rearrreglo funcional de las entradas de ambos ojos según el balance de la actividad de ambos.

Perspectivas

A futuro, en el laboratorio se proyecta la continuidad de los experimentos con el objetivo de fortalecer la solidez de los resultados obtenidos. Esto incluirá el aumento del tamaño muestral, la confirmación de la ausencia de PDO en animales adultos, donde esperamos que no haya modificación en la extensión de la señal de *Arc*, y la obtención de resultados reproducibles mediante el uso de una sonda como control negativo. La implementación de estas estrategias permitirá realizar un análisis más robusto, alcanzar significancia estadística y validar que la señal detectada mediante esta metodología corresponde efectivamente a la PDO.

Asimismo, una vez establecida la técnica en el laboratorio, se dispondrá para evaluar si se logra evidenciar la PDO en animales adultos a través de la modulación farmacológica del período crítico.

Referencias bibliográficas

- Alper, K., et al. (2001). *The Alkaloids Chemistry and Biology*, 56, 1-38.
- Antonini, A., et al., (1999). *J. Neurosci.* 19, 4388–4406 (1999).
- Berardi, N., et al. (2000). *Current Opinion in Neurobiology*, 10(1), 138-145.
- Bavelier, D., et al. (2010). *The Journal of Neuroscience*, 30(45), 14964–14971.
- Bochner, D. N., et al. (2014). *Nature Communications*, 5, 4973.
- Brown, T. K., et al. (2019). *American Journal of Drug and Alcohol Abuse*, 45(2), 227-237.
- Bruckner, G. et al. (2000) *J. Comp. Neurol.* 428, 616–629
- Cameron, L. P., et al. (2020). *Nature*, 582(7812), 319-324.
- da Silva Brum, E., et al. (2016). *Current Alzheimer Research*, 13(5), 514-529.
- Dapuelto, A., et al. (2025). bioRxiv.
- Davis, A. K., et al. (2020). *JAMA Psychiatry*, 78(5), 481-489.
- Daw, N. W., et al. (1992). *Journal of Neurophysiology*, 67(1), 197-208.
- Drager, U.C. (1974). *Brain Res.* 82, 284–292 (1974).
- Fagiolini, M., et al. (1994). *Vision Research*, 34(6), 709-720.
- Fagiolini, M., & Hensch, T. K. (2000). *Nature*, 404(6774), 183–186.
- Feldman, D. E. (2000). *Nature Neuroscience*, 3(3), 303–304.
- Frenkel, M. Y., & Bear, M. F. (2004). *Neuron*, 44(6), 917-923.
- Freissmuth, M., et al. (2018). *Nature Reviews Drug Discovery*, 17(8), 601-617.
- Galizia, C. G., & Lledo, P. (2013). *Springer Spektrum*.
- Gómez-Calderón, C., et al. (2017). *Chemistry & Biodiversity*, 14(8), e1700128.
- Gordon, J. A., & Stryker, M. P. (1996). *Journal of Neuroscience*, 16(10), 3274-3286.
- Green, M., & Sambrook, J. (2020). *Cold Spring Harbor protocols*, 2020 1, pdb.prot100628 .
- Guzowski, J.F., et al. (1999). *Nat. Neurosci.* 2, 1120–1124.
- Hanover, J. L., et al. (1999). *The Journal of Neuroscience*, 19(RC40), 1–5.
- Hensch, T. K., et al. (1998). *Science*, 282(5393), 1504–1508.
- Hensch, T. K. (2005). *Nature Reviews Neuroscience*, 6(11), 877–888.
- Hensch, T. K. (2016). *Scientific American*, 314(1), 64-71.

- Hensch, T. K., et al. (2018). *Neuron*, 98(3), 534-545.
- Hockfield, S., et al. (1990). *Cold Spring Harb. Symp. Quantit. Biol.* 55, 505–514.
- Hooks, B., & Chen, C. (2020). *Neuron*, 106, 21-36.
- Hotulainen, P., & Hoogenraad, C. C. (2010). *Journal of Cell Biology*, 189(4), 619–629.
- Hrvatin, S., et al. (2017). *Nature neuroscience*, 21, 120 - 129.
- Hubel, D. H., & Wiesel, T. N. (1969). *J. Physiol.*, 206, 419-436
- Hubel, D. H., & Wiesel, T. N. (1977). *Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, 198(1130), 1-59.
- Hubener, M. (2003). *Curr. Opin. Neurobiol.* 13, 413–420
- Ishikawa, M., et al. (2008). *Pharmaceuticals*, 1(3), 82-91.
- Jenks, K., et al. (2017). *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 114, 9182 - 9187.
- Jenks, K., & Shepherd, J. (2019). *Cell reports*, 30, 1982 - 1994.e4.
- Kaczmarek, L. & Chaudhuri, A. (1997). *Brain Res. Rev.* 23, 237–256.
- Kalatsky, V.A. & Stryker, M.P. (2003). *Neuron* 38, 529–545
- Kaneko, M., et al. (2006). *Neuron*, 52(5), 877-884.
- Kessels, H. W., & Malinow, R. (2009). *Neuron*, 61(3), 340–350.
- Koppe, G. et al. (1997). *Cell Tissue Res.* 288, 33–41
- Krieg, P. (1990). *Nucleic acids research*, 18 21, 6463 .
- Krieg, P., & Melton, D. (1987). *Methods in enzymology*, 155, 397-415
- Maiciulaitis, R., et al. (2008). *Drug Development Research*, 69(7), 450-456.
- Mataga, N., et al. (2004). *American Journal of Human Genetics*, 75(4), 656–663.
- Melton, D., et al. (1984). *Nucleic acids research*, 12 18, 7035-56 .
- Milligan, J., & Uhlenbeck, O. (1989). *Methods in enzymology*, 180, 51-62 .
- Mrsic-Flogel, T. D., et al. (2007). *Neuron*, 54(6), 961-972.
- Morgan, J.I. (1991). *Annu. Rev. Neurosci.* 14, 421–451 (1991).
- Newport, E. L., et al. (2001). The MIT Press, 481-502.
- Noller, G. E., et al. (2018). *Current Topics in Behavioral Neurosciences*, 36, 91-113.
- Pizzorusso, T. et al. (2002). *Science* 298, 1248–1251

- Porciatti, V., et al., (1999). *Vision Res.* 39, 3071–3081 (1999).
- Rudinskiy, N., et al. (2012). *Nature neuroscience*, 15, 1422 - 1429.
- Rust, M. B., et al. (2010). *The EMBO Journal*, 29(11), 1889–1902
- Sawtell, N.B., et al. (2003). *Neuron*. 38, 977–985 (2003)
- Schenborn, E., & Mierendorf, R. (1985). *Nucleic acids research*, 13 17, 6223-36.
- Schuett, S., et al. (2002). *J. Neurosci.* 22, 6549–6559.
- Shatz, C. J., & Stryker, M. P. (1978). *Journal of Physiology*, 281(1), 267-283.
- Shatz, C. J., & Katz, L. C. (1996). *Science*, 274(5290), 1133–1138.
- Syken, J., et al. (2006). *Science* 313, 1795–1800.
- Smith, G. B., et al. (2008). *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 363(1492), 357-367.
- Tagawa, Y., et al. (2005). *Nature Neuroscience*, 45(1), 109-121.
- Tropea, D., et al. (2009). *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(39), 16805-16810.
- Underwood, A. H., et al. (2021). *Current Biology*, 31(7), 1457-1466.
- Van Brussel, L., et al. (2011). *Cerebral cortex*, 21 9, 2133-46 .
- Wasko, B. M., et al. (2018). *Cell Reports*, 25(10), 2979-2986.
- Weier, H., & Rosette, C. (1988). *Nucleic acids research*, 16 24, 11836 .
- Wiesel, T. N., & Hubel, D. H. (1970). *Journal of Comparative Neurology*, 140(3), 301-326.
- Wolf, M., et al. (2015). *Cerebral Cortex*, 25(10), 2853–2865.
- Mishra, V. (2022). Dot-Blotting: A Quick Method for Expression Analysis of Recombinant Proteins. *Current Protocols*, 2. <https://doi.org/10.1002/cpz1.546>.
- Bhat, A., & Rao, G. (2020). Dot-Blot Hybridization Technique. , 303-321. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-0334-5_34.

Anexo

SOLUCIONES

Trietanolamina 0,1 M (pH 7–8)

Diluir trietanolamina (TEA, Sigma-Aldrich, N.º cat. 90279, 100%, 7,53 M) en una relación 1:75,3 en agua Mili-Q libre de RNAsas (con 0,1% DEPC durante toda la noche y autoclavada). Agregar 300 µL de HCl al 18,5%, y ajustar pH. Completar el volumen final con mQ libre de RNAsas.

SSC 20x (Solución salina citratada)

Contiene 3 M NaCl y 300 mM citrato trisódico, ajustado a pH 7.0 con HCl. 175,3 g de NaCl (Sigma-Aldrich) y 88,2 g de Citrato de Trisodio (Sigma-Aldrich), disolver en 800 mL de agua Mili-Q. Ajustar pH a 7,0. Completar a 1 L con agua Milli-Q. Agregar 0,1% DEPC y autoclavar.

Solución de pre-hibridación

50% formamida, 10% dextrán sulfato, 1 mg/mL de ARN de levadura, 1x solución de Denhardt's, SSC 5x. Completar a volumen con mQ libre de RNAsas.

Solución de hibridación

La sonda de ARN se desnaturaliza durante 3 minutos a 80 °C y luego se diluye a 0,2 ng/µL en la solución de pre-hibridación.

MABT 1x (Maleic Acid Buffer + Tween 20)

MAB (buffer de ácido maleico, pH 7.5) y Tween 20 al 0,1% (v/v).

Solución de bloqueo

Blocking Reagent (Roche) al 2% en MABT 1x, calentar a 65 °C hasta su completa disolución. Una vez disuelto, agregar suero de cabra inactivado (Normal Goat Serum) al 10% final (previamente inactivado a 60 °C durante 30 minutos). Llevar a volumen con MABT. Preparar una fracción sin suero.

Solución de reacción fluorescente

PBS con imidazol (PBS-IM 0,1M), 1% de tiramida-FITC, 0,001% de H₂O₂.

AP Buffer (Alkaline Phosphatase buffer)

100 mM de NaCl 2 M, 50 mM de MgCl₂ 1 M, 100 mM de Tris-HCl 1 M pH 9,5, 0,1 % de Tween 20 puro y Levamisol 5 mM (agregar desde stock). Completar a 50 mL con agua destilada.

Tratamiento de soluciones y materiales libre de RNAsas

Para todos los procedimientos que implican manipulación de ARN, se utilizaron soluciones y materiales tratados para eliminar RNAsas:

- **Soluciones:** preparar agua y PBS 1x tratadas con DEPC al 0,1% (1:1000). Agitar vigorosamente, dejar incubar toda la noche con la tapa ligeramente abierta, y luego autoclavar (una vez por 40 minutos o dos veces por 20 minutos).
- **Vidrios:** calentar a 180 °C durante al menos 3 horas en estufa.
- **Plásticos:** utilizar tips, tubos Falcon, tubos Eppendorf y cajas portaobjetos certificados como RNase-Free, o destinar material exclusivamente para uso en hibridación *in situ*.

Dot blot

Buffer 1 (B1)

Tris 100 mM y NaCl 150 mM. Llevar a pH 7.5 con HCl.

Buffer 2 (B2)

B1 + 0,5% blocking reagent Roche. Para disolverlo calentar alrededor de 1 hora a 65°C y vortex.

Buffer 3 (B3)

Tris Hcl 100 mM, NaCl 100 mM y MgCl₂ 50 mM. Llevar a pH 9.5 con HCl.

Tabla 2. Diferencias entre los dos protocolos utilizados para la generación de la sonda y la hibridación *in situ*.

	Protocolo 1	Protocolo 2
PCR	Polimerasa: Q5HF.	Polimerasa: Mango Taq.
	Primer: T3 a) (en sección 4.1.1)	Primer: T3 b) (sección 4.1.1)
Geles de agarosa para verificar productos	Intercalante: Goodview.	Intercalante: Bromuro de Etidio.
Preparación de las secciones cerebrales	Congelamiento: Tissue Tek y nitrógeno líquido.	Congelamiento: localizador de falla térmica (refrigerante instantáneo)
Hibridación <i>in situ</i>	Detección de sonda: inmunohistoquímica con enzima peroxidasa y sustrato tiramida:FITC.	Detección de sonda: inmunohistoquímica con fosfatasa alcalina y sustrato NBT-BCIP.