



Programa de Desarrollo de las Ciencias Básicas

Área: Biología

Sub área: Neurociencias



Tesis de Maestría

Búsqueda de proteínas responsables de la reactivación de la plasticidad en la corteza visual de ratón adulto.

Lic. Lucía M. Ruiz Perera

Laboratorio de Neurociencias

Facultad de Ciencias

UdelaR

Director de tesis: Dr. Francesco M. Rossi

Tribunal de tesis:

Presidente: Dra. Patricia Cassina

Vocales: Dra. Adriana Parodi y Dra. Nathalia Vitureira.

1. Tabla de contenido

1.	Tabla de contenido	2
2.	Lista de abreviaciones	5
3.	Agradecimientos	7
4.	Resumen	9
5.	Introducción.....	10
5.1	Plasticidad neuronal dependiente de la experiencia.....	10
5.2	El sistema visual	11
5.3	El rol de la experiencia visual en los procesos de plasticidad.....	15
5.4	Mecanismos moleculares de plasticidad	18
5.5	Estrategias que restauran la visión en el adulto	21
5.6	El caso particular de la fluoxetina	23
5.7	La serotonina en el sistema visual y su rol en el mecanismo de la fluoxetina.....	26
6.	Justificación y objetivos	28
6.1	Justificación.....	28
6.2	Objetivo general.....	29
6.3	Objetivos específicos	29
7.	Materiales y métodos	30
7.1	Mantenimiento y tratamiento de animales.....	30
7.2	Análisis de los niveles tisulares de monoaminas por HPLC.....	31
7.3	Preparación de muestras para 2D.	32
7.4	Cuantificación proteica	33
7.5	Primera dimensión - Isoelectroenfoque.	33
7.6	Equilibración y segunda dimensión - 2DPAGE.	35
7.7	Tinción.....	36
7.7.1	Tinción de nitrato de plata	36
7.7.2	Tinción de Coomassie coloidal	37

7.8 Experimentos de proteómica diferencial.....	37
7.9 Análisis de imágenes y obtención de datos.....	37
7.10 Análisis estadístico	40
7.10.1 Análisis estadístico primario	40
7.10.2 Análisis estadístico secundario: test de Mann Withney en datos seleccionados normalizados.....	42
7.11 Espectrometría de masa	43
7.12 Análisis bioinformático	43
7.13 Western blot.....	44
8. Resultados.....	47
8.1 Puesta a punto de la metodología de electroforesis bidimensional.....	47
8.1.1 Preparación de la muestra	47
8.1.2 Protocolos de isoelectroenfoco.....	48
8.2 Experimentos de proteómica diferencial entre muestras de ratones adultos tratados con fluoxetina y controles.....	54
8.2.1 Electroforesis bidimensional.....	54
8.2.2 Análisis de imágenes, obtención de datos y estadística	57
8.3 Espectrometría de masa	59
8.4 Análisis bioinformático	63
8.5 Análisis por Western blot.....	71
9. Análisis cromatográfico por HPLC: efectos neuroquímicos de la fluoxetina.....	73
10. Discusión	75
10.1 Puesta a punto de la metodología de proteómica diferencial	75
10.2 Neuroproteómica aplicada al estudio de la plasticidad cortical.....	76
10.2.1 Aspectos metodológicos.....	76
10.2.2 Variabilidad entre geles: un aspecto a minimizar.....	77
10.2.3 Identificación de proteínas moduladas por fluoxetina.....	78
10.3 Análisis de las proteínas identificadas en el estudio de proteómica diferencial.....	79
10.3.1 Efectos de la fluoxetina sobre expresión génica: comparación con trabajos previos.....	79

10.3.2	Posible rol de las proteínas identificadas en la plasticidad cortical.....	80
10.4	Caracterización de los efectos neuroquímicos mediados por el tratamiento crónico con fluoxetina	86
11.	Conclusiones	88
12.	Perspectivas	91
13.	Referencias bibliográficas	92
14.	Anexo.	103
	Estudio funcional para evidenciar la presencia de plasticidad en la corteza visual inducida por el tratamiento crónico con fluoxetina en ratones.	103

2. Lista de abreviaciones

2D-PAGE.....	electroforesis de geles de poliacrilamida bidimensionales
5-HIAA.....	5-hidroxi-indolacético
5HT.....	serotonina, 5-hidroxitriptamina
AMPA.....	Receptores tipo AMPA (α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol-propionato).
BDNF.....	Factor neurotrófico derivado de cerebro
CEUA.....	Comité de Ética en el Uso de Animales
CG.....	células ganglionares
CHAPS.....	3-[(3-Colamidopropil)- dimetilamonio]-propano sulfonato (detergente)
CHEA.....	Comisión Honoraria de Experimentación Animal
CNEA.....	Comisión Nacional de Experimentación Animal
CV.....	corteza visual
DA.....	dopamina
DIGE.....	“Difference Gel Electrophoresis” (Electroforesis diferencial de geles)
DOPAC.....	3,4-dihidroxifenilacético
DTT.....	Ditiotreitol
E/I.....	balance a nivel cortical entre el tono excitatorio y el tono inhibitorio
GABAR.....	Receptores tipo GABA (ácido gamma-amino butírico).
GO.....	ontología de genes
HDAC.....	enzima deacetilasa de histonas
HPLC-ECD.....	cromatografía líquida de alta resolución con detección electroquímica
HRP.....	peroxidasa de rábano
HVA.....	ácido homovanílico
IEF.....	isoelectroenfoque
IGF-1.....	factor de crecimiento insulínico de tipo 1
INTOD.....	densidad óptica integral
iTRAQ.....	“isobaric tag for relative and absolute quantitation” (etiqueta isobárica para la cuantificación absoluta y relativa)
KO.....	knockout
LTD.....	proceso de depresión a largo plazo
LTP.....	proceso de potenciación a largo plazo
ME.....	Matriz extracelular
NADH / NAD ⁺	nicotinamida adenina di nucleótido en su forma reducida/oxidada

NCBI.....National Center for Biotechnology Information
NGdl.....núcleo geniculado dorso-lateral
NMDAR.....Receptores tipo NMDA (N-Metil-D-aspartato)
NO.....óxido nítrico
OD.....densidad óptica media
P70.....70 días postnatales
PANTHER.....protein annotation through evolutionary relationship
PBS.....buffer fosfato salino
PBST.....solución de Tween 20 al 0.1% en PBS
PC.....Período crítico
PEV.....Potenciales Evocados Visuales
pI.....punto isoeléctrico
PM.....privación monocular de la visión
SDS.....dodecil sulfato de sodio
SDS-PAGE.....electroforesis de geles de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio
SEM.....error estándar de la media
SNC.....sistema nervioso central
SR.....sutura reversa
STRING.....Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes/Proteins
TCA.....ácido tricloroacético
UATE.....Unidad de Animales Transgénicos y Experimentación
Uniprot.....Universal Protein Resource

3. Agradecimientos

Quisiera expresar mi más profundo y sincero agradecimiento a todas las personas que me han acompañado durante esta fase y que de alguna manera formaron parte de este trabajo.

Quiero agradecer especialmente a Francesco, por abrirme las puertas de su laboratorio y guiarme en este camino.

Quiero agradecer a los miembros del tribunal, Patricia Cassina, Nathalia Vitureira y Adriana Parodi por sus comentarios y sugerencias que perfeccionaron esta tesis.

A mis compañeros de laboratorio de neurociencias, a Naty y a Gaby que me acompañaron durante este largo trecho y me ayudaron mucho, y a Mariana que se integró hace poco. A todos los compañeros del piso 4 que también me acompañaron: Ruben, Leo, Yuyo, Pelo, Helena, Daiana, Adriana M, Adriana O, Fede, Nacho, Memo, Zorro, Matías.

Quiero agradecer a los compañeros de la Sección de Biología Celular: Cristina, Flavio, Nibia, María, Grace, Nico y Jime.

Y quiero agradecer especialmente a mis compañeros de laboratorio de Cultivo de Tejidos a Andrea, Daniel, Gonza y Maite.

A Walter Norbis y Annabel Ferreira, les agradezco mucho las conversaciones que tuvimos sobre estadística, me ayudaron a reflexionar mucho.

Este trabajo no habría sido posible sin la ayuda y la colaboración del Laboratorio de Cultivo de Tejidos, de la UATE, de UByPA y la colaboración con A. Sale del Istituto di Neuroscienze del CNR di Pisa, Italia. Agradezco la buena onda y la disposición de todos los integrantes, que siempre me ayudaron y me aconsejaron.

También quiero agradecer a Leonor Thompson, y Andrea Villarino, que nos aconsejaron en la técnica de los geles bidimensionales y así nos iniciamos en esta aventura. A Adriana Parodi, que también nos brindó su experiencia sobre proteómica. A J. Andrés Abin, que nos ayudó con las pruebas de la cromatografía.

Quiero agradecer especialmente a F. Palacios y M. Marin, por el anticuerpo contra SOD1 y a C. Quijano por el anticuerpo anti SOD2 y a D. Agrati por la donación de la fluoxetina.

A mi familia, a mis padres por el apoyo incondicional, a mi hermano por sus consejos y por ayudarme en este camino, y a mi hermana que me apoya siempre.

A mis amig@s, que me escuchan y aconsejan, y me han acompañado siempre, aunque no los vea tan seguido. No los nombro a todos porque la lista es larga...

A Naty H. con quien compartimos gran parte de la carrera.

A Fede, por su amor incondicional y por acompañarme en esta travesía.

Finalmente quiero agradecer a las fuentes de financiación que hicieron posible la realización de esta tesis, a la ANII, por la beca de Maestría y por el Proyecto ANII FCE y a PEDECIBA que me aceptó en el programa de postgrado.

4. Resumen

El sistema nervioso (SN) posee una capacidad única de modificar y adaptar su conformación anatómica y funcional con facilidad en función de cambios que ocurren en su entorno. Esta capacidad, denominada plasticidad neuronal, es necesaria para el correcto desarrollo del SN y para la adquisición gradual en el tiempo de todas las funciones nerviosas, desde la locomoción hasta los procesos cognitivos superiores. Varios estudios han demostrado que existen ventanas temporales en las cuales esta capacidad plástica es alta, mientras que con el pasar del tiempo esta capacidad disminuye. Hoy en día se piensa que la escasa recuperación funcional característica de varias patologías neuronales, puede explicarse por la reducción en la capacidad plástica del sistema nervioso adulto. Por esto, en los últimos años se han buscado estrategias que determinen un aumento de los niveles de plasticidad con la finalidad de facilitar la recuperación funcional en determinadas patologías. El sistema visual es un sistema clásico para el estudio de procesos de plasticidad dependientes de experiencia y estudios pioneros en este han identificado algunas estrategias que potencian la plasticidad en el adulto y permiten la recuperación de defectos en la visión (ambliopía). Uno de los más relevantes es la administración de fluoxetina, por ser un tratamiento no invasivo y de fácil aplicación en la clínica. Sin embargo, los mecanismos subyacentes a la restauración de la plasticidad en el individuo adulto y que controlan los niveles de plasticidad son aún desconocidos.

El presente trabajo tiene como objetivo contribuir a la caracterización de estos mecanismos a nivel molecular mediante el desarrollo de la proteómica diferencial sobre muestras de corteza visual de ratones C57B6 adultos tratados con fluoxetina (plasticidad restaurada) y controles (plasticidad disminuida). Utilizando la electroforesis bidimensional se han identificado 29 spots con una intensidad óptica diferencial entre las dos condiciones. A partir de los resultados obtenidos se lograron identificar por espectrometría de masa 22 proteínas, de las cuales 10 presentan mayor nivel en los ratones tratados con fluoxetina y 12 presentan menor nivel. Las proteínas identificadas están implicadas en diversos procesos celulares, entre ellos el control de la estructura del citoesqueleto, la endocitosis y la exocitosis, el transporte, la señalización intracelular, el control del estado redox de la célula, el metabolismo y la degradación proteica. Estas proteínas son candidatas potenciales a la regulación de la plasticidad cortical y nos permitirán caracterizar mejor el cuadro general de los mecanismos subyacentes a este proceso.

5. Introducción

5.1 Plasticidad neuronal dependiente de la experiencia

El desarrollo del sistema nervioso es un proceso extremadamente complejo. Desde las funciones sensoriales hasta las funciones cognitivas de orden superior, todas ellas, pasan a través de períodos críticos de alta sensibilidad durante los cuales los circuitos neuronales correspondientes pueden ser modificados de manera radical por la experiencia. Esta habilidad se define como plasticidad neuronal. Durante estas fases críticas las capacidades de adquisición de habilidades diversas, que conforman el aprendizaje, son particularmente altas pero con el pasar del tiempo estas ventanas de posibilidades disminuyen o se cierran haciendo más difícil el aprendizaje posterior (Berardi et al., 2000, Berardi et al., 2003, Hensch, 2005, Tropea et al., 2009). Además, luego de que los circuitos neuronales son establecidos, el tratamiento de patologías producidas por un posible desvío del desarrollo normal resulta muy ineficaz. Entender cómo funcionan los procesos biológicos que subyacen a los períodos críticos de plasticidad es de suma importancia, ya que este conocimiento permitiría reabrir o modificar la duración de estas ventanas de plasticidad y así poder corregir defectos o patologías del sistema nervioso que resulten de un desarrollo anómalo.

Al parecer, el efecto de la experiencia sobre el cerebro se puede separar en tres fases principales. En el caso de la visión y de otras funciones sensoriales este efecto comienza luego del nacimiento y disminuye casi totalmente durante la infancia. En el caso del lenguaje y de otras funciones cognitivas de orden superior, este presenta una apertura más tardía y si bien disminuye con el paso del tiempo, nunca termina completamente. El hecho de que estas fases ocurran en modo secuencial permite la adquisición de habilidades cada vez más complejas (Fig. 1).

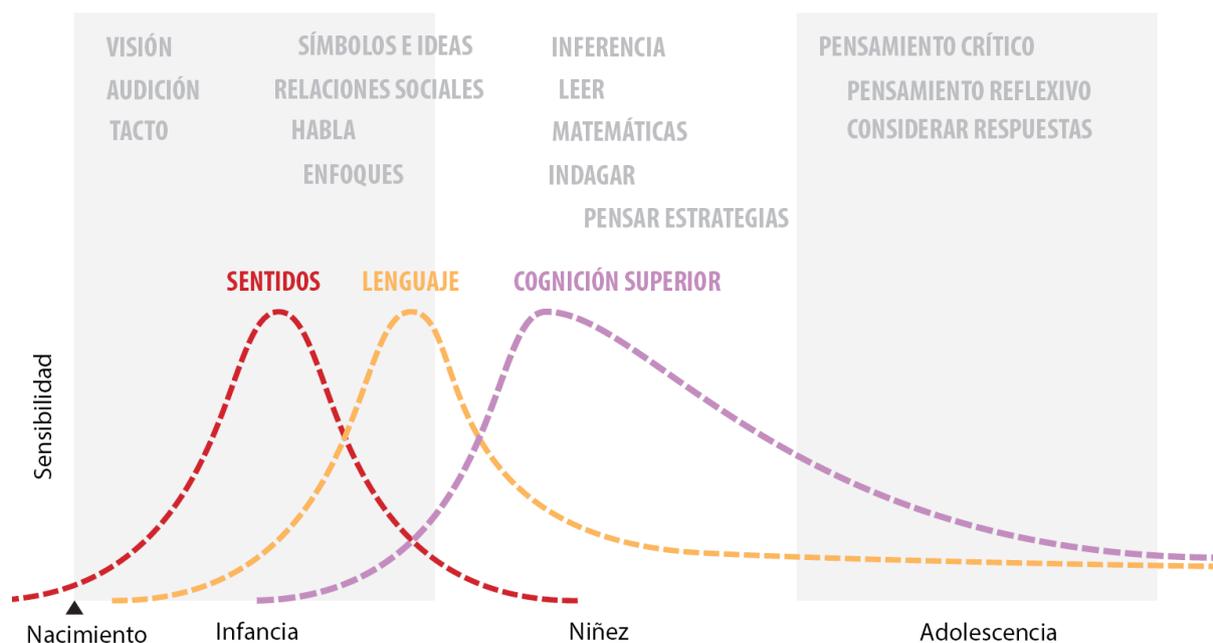


Figura 1: La sensibilidad al aprendizaje del cerebro humano puede dividirse en tres amplias fases. El período crítico de las regiones corticales consagradas a la visión y a otras funciones sensoriales (en rojo) abre al nacer y cierra rápidamente durante la infancia. Los correspondientes al lenguaje (en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

5.2 El sistema visual

Dentro de los sistemas sensoriales, el sistema visual es uno de los más utilizados para el estudio de la plasticidad cerebral dependiente de la experiencia, por la facilidad de manipular experimentalmente la entrada sensorial, y porque su organización anatómico-funcional está ampliamente caracterizada (Hooks and Chen, 2007, Morishita and Hensch, 2008, Leamey et al., 2009).

El sistema visual es el responsable de procesar la información que determina la percepción visual. La visión es procesada a través de tres estaciones principales que están organizadas de forma jerárquica: la retina, que se encarga de la transducción de la información obtenida de la luz en señales eléctricas, el núcleo geniculado dorso-lateral (NGdl) del tálamo, que tiene función de relé y la corteza visual primaria (CV1 o corteza estriada). La retina de los vertebrados, está dispuesta en el ojo de manera tal que la luz debe atravesar todas sus capas celulares para contactar los fotorreceptores. La retina está formada por tres capas celulares, la más externa se denomina capa nuclear externa, es el lugar en donde se encuentran los cuerpos celulares de los fotorreceptores, los conos y los bastones. La siguiente capa denominada capa nuclear interna contiene los cuerpos celulares de las interneuronas de la retina, excitatorias e inhibitorias. Entre las que se distinguen las células horizontales, las células bipolares y las amácrinas. Finalmente, la capa más interna es la capa

de células ganglionares (CG) cuyas proyecciones axonales forman el nervio óptico, la vía de la retina hacia el resto del sistema nervioso. Entre las capas celulares se ubican dos capas de procesos celulares, las capas plexiforme interna y externa que corresponden a los sitios de conexiones sinápticas entre las neuronas de la retina.

La retina procesa la información proveniente del campo visual. Se puede dividir este campo en hemicampos visuales izquierdo y derecho cuando las fóveas de ambos ojos se fijan en un solo punto en el espacio. El hemicampo visual izquierdo se proyecta sobre la hemiretina nasal del ojo izquierdo y la hemiretina temporal del ojo derecho. El hemicampo visual derecho se proyecta sobre la hemiretina nasal del ojo derecho y la hemiretina temporal del ojo izquierdo (figura 2). De esta manera, la región central del campo visual se denomina zona binocular, la luz que se origina allí ingresa en ambos ojos. Mientras que en cada mitad del campo visual, también hay una zona monocular, la luz de la porción temporal de los hemicampos visuales sólo proyecta sobre la hemiretina nasal del ojo del mismo lado (ipsilateral). Debido a que la porción monocular sólo está representada en un ojo, como no hay solapamiento en esta región si se daña esa región de la hemiretina, se pierde la visión monocular.

Los axones de todas las células ganglionares de la retina salen de la misma por una región circular que se encuentra en la retina nasal, el disco óptico, donde se agrupan formando el nervio óptico. Esta región de la retina carece de fotorreceptores, siendo insensible a la luz, por lo que constituye un punto ciego. Los axones del nervio óptico recorren un trayecto continuo al quiasma óptico en la base del di encéfalo, donde los axones provenientes de la retina nasal se entrecruzan, dirigiéndose al hemisferio cerebral opuesto al de procedencia (contralateral). Por el contrario, los axones provenientes de la retina temporal no cruzan (manteniéndose en el mismo lado, ipsilateral) y se juntan con las proyecciones correspondientes al lado nasal de la retina del ojo contrario. Una vez han atravesado el quiasma, los axones de las células ganglionares de cada lado forman el tracto óptico, que contiene fibras nerviosas de ambos ojos y representan el campo visual contralateral.

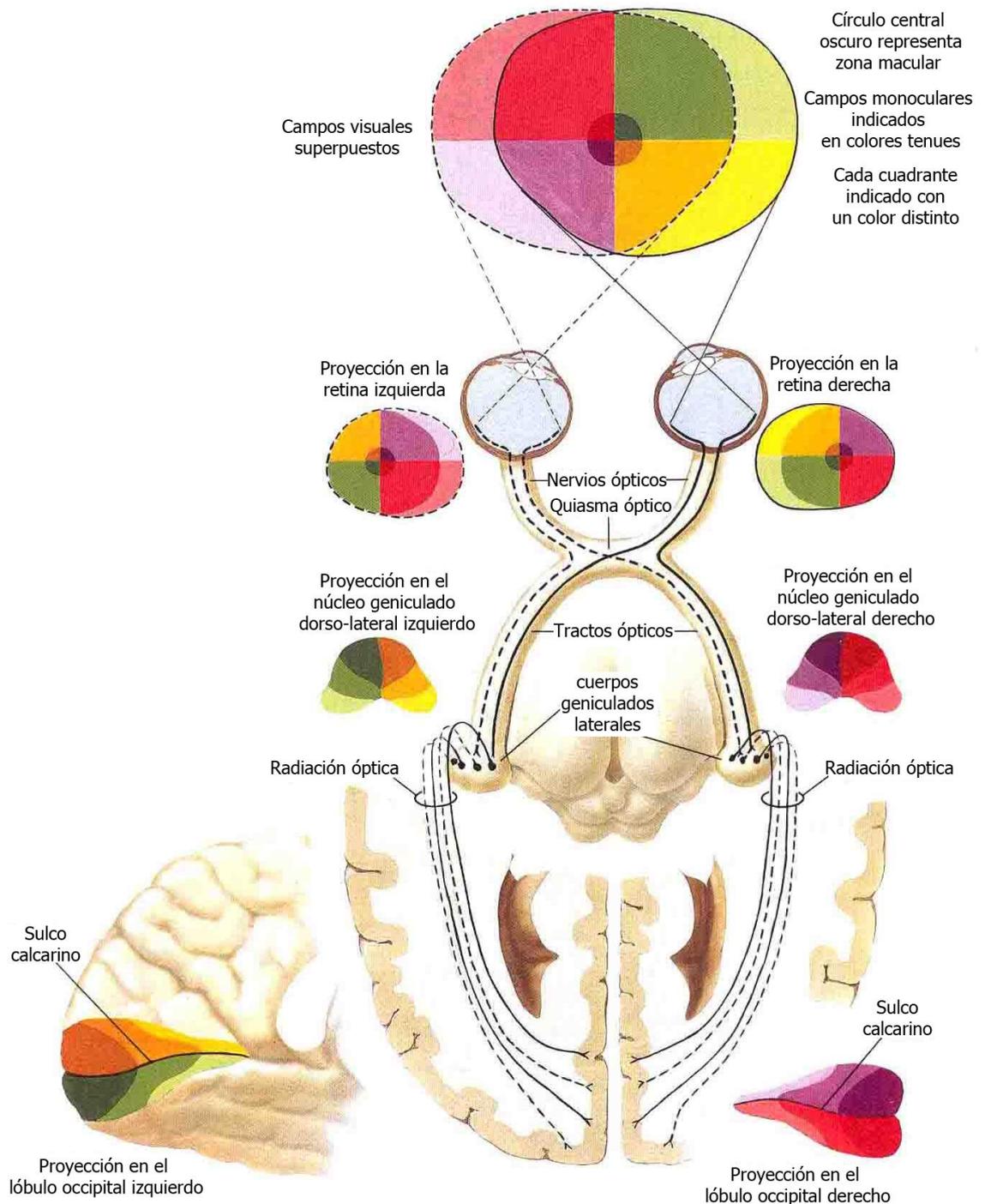


Figura 2: Campo visual. Se muestra la superposición de los hemicampos visuales izquierdo y derecho cuando las fóveas de los dos ojos se fijan en un único punto en el espacio. La zona coloreada oscura corresponde a la región binocular y la zona más clara a la región monocular. La región central corresponde a la zona macular. Se indica la proyección de cada hemicampo visual sobre la retina de cada ojo, que se proyecta luego al NGld y a la corteza visual como se indica para cada región coloreada (Netter, 2010).

Al avanzar en el tracto óptico las proyecciones de los axones alcanzan el núcleo geniculado dorso-lateral, allí cada lámina del núcleo recibe la entrada visual de un sólo ojo, de este modo la información procedente de los dos ojos es procesada de forma separada y en paralelo. Esa

distribución de las proyecciones neuronales en territorios ojo-específicos se encuentra completamente desarrollada cuando el sistema llega a su maduración completa. En fases más tempranas del desarrollo, las proyecciones de los axones se encuentran distribuidas de forma difusa y comparten territorios comunes. Posteriormente, las fibras correspondientes a cada ojo se restringen a capas específicas a través de un proceso de segregación que incluye la selección y la retracción de las proyecciones.

El número de capas en el NGdl varía entre especies, en los primates existen seis capas principales que contienen las neuronas que envían proyecciones a la corteza visual primaria. Estas capas se disponen de forma alternada, en capas que reciben proyecciones del ojo ipsilateral y capas que reciben proyecciones del ojo contralateral. Entre dichas capas principales hay capas intercalares, pobladas por neuronas koniocelulares (fig. 3).

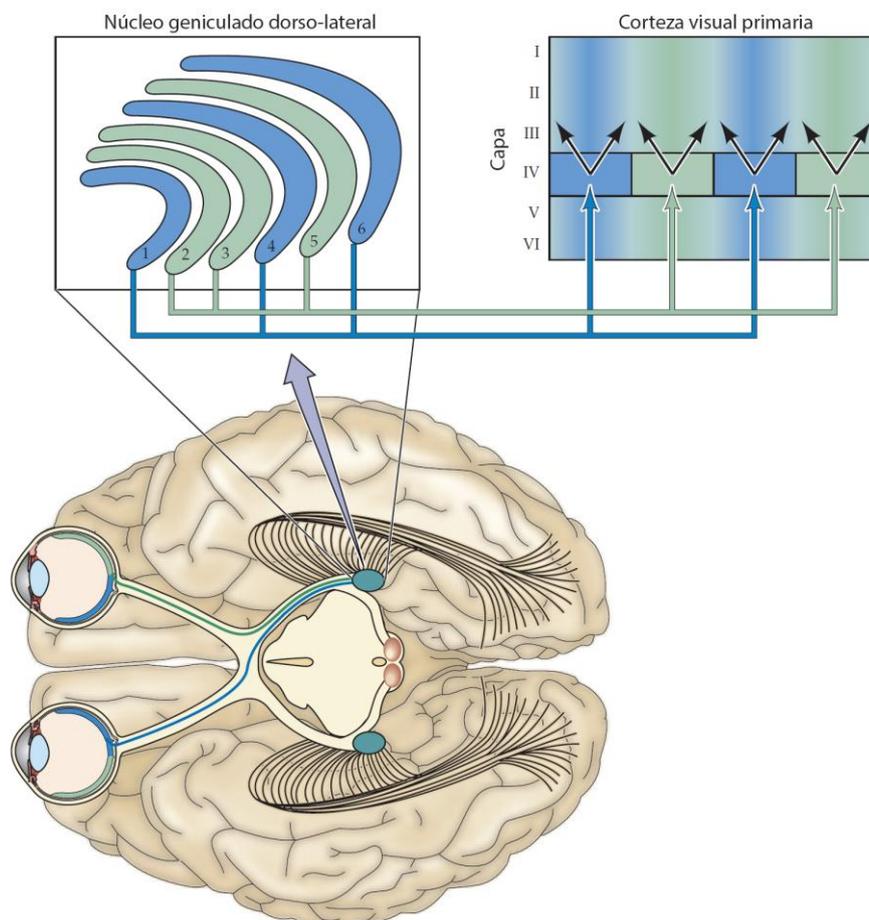


Figura 3: Territorios ojo-específicos en el sistema visual. Cada NGdl está constituido por capas que reciben proyecciones del ojo ipsilateral, alternadas por capas que reciben proyecciones del ojo contralateral. Esta distribución se mantiene en las proyecciones del tálamo a la corteza visual primaria, en donde los axones provenientes del Núcleo geniculado dorso-lateral terminan en una serie de bandas alternadas específicas para cada ojo, llamadas columnas de dominancia ocular (Modificado de Purves et al., 2004).

Por ende, las neuronas en el NGdl del tálamo proyectan sus axones a las porciones monocular y binocular de la corteza visual primaria, donde inervan principalmente la capa IV. En muchas especies, las aferencias del NGdl que proyectan a la porción binocular se disponen en parches o bandas alternadas en la capa IV, manteniendo la segregación en zonas ojo-específicas, denominadas columnas de dominancia ocular. De esta forma, las células en el interior de la capa IV responden exclusivamente a la estimulación de un ojo, ya sea el ojo izquierdo o el derecho (figura 3) (Wiesel and Hubel, 1965, Shatz and Stryker, 1978, LeVay et al., 1980).

Más allá de este punto, las señales de los dos ojos se combinan a nivel celular, es decir, las neuronas de las capas que se encuentran por encima y por debajo de la capa IV integran las aferencias provenientes de los dos ojos, y responden a estímulos visuales presentados a cualquiera de los ojos. Sin embargo la fuerza relativa de las entradas de los ojos varía de una neurona a la otra, por lo que existen distintas clases de dominancia ocular, entre las cuales se encuentran las que comprenden las neuronas que responden por igual a ambos ojos, las de las neuronas que responden exclusivamente a uno de los ojos y las de las neuronas que responden en mayor medida a uno de los dos ojos.

Otras propiedades de estímulo tales como la orientación, el color, la dirección del movimiento, y la frecuencia espacial también tienden a estar distribuidos en patrones que se repiten y están relacionados entre sí en un orden de organización superior. En resumen, la corteza estriada se compone de módulos repetidos, que contienen toda la maquinaria neuronal necesaria para analizar una variedad de atributos del estímulo diferentes en una pequeña región del espacio visual. Esta disposición en columnas en el sistema visual está organizada de manera tal que hay interconexiones entre estas, que permiten generar un nivel de abstracción mayor en el procesamiento de la información visual.

5.3 El rol de la experiencia visual en los procesos de plasticidad

El efecto de la experiencia sobre el sistema visual ha sido caracterizado inicialmente en varios trabajos de D. Hubel y T. Wiesel (Wiesel and Hubel, 1963, Wiesel and Hubel, 1965, Berardi et al., 2000). Estos investigadores utilizaron el protocolo de privación monocular de la visión (PM), que consiste en bloquear de forma temporaria la entrada sensorial en un sólo ojo, para probar el efecto de la visión sobre el desarrollo de la corteza visual y el mantenimiento de las conexiones neuronales. Una manera de evidenciar el efecto de la PM a nivel anatómico es analizar la distribución de las columnas de dominancia ocular. Para esto se inyecta un ojo con un trazador neuronal transináptico que es incorporado en las células ganglionares y es transferido a las neuronas del NGdl, donde marca

todas sus proyecciones a nivel cortical. Mediante esta técnica se pudo evidenciar que la PM en un animal joven determina alteraciones dramáticas en la corteza visual sin afectar la estructura ni la función de la retina: las terminales de las fibras del NGdl provenientes del ojo cerrado se retraen, reduciendo su territorio de inervación en la corteza visual que pasa a ser ocupado por las terminales de las fibras del NGdl provenientes del ojo abierto, que expanden su territorio de inervación. Como consecuencia de esto las columnas de dominancia ocular del ojo privado de la visión se reducen y las columnas del ojo que fue mantenido abierto se expanden.

A nivel funcional (fig. 4A), las células corticales pueden clasificarse en base a las clases de dominancia ocular que indican cuanto responden las células al ojo contralateral respecto al ipsilateral. Las células de la clase 1 se definen por responder únicamente a la estimulación del ojo contralateral, mientras que las de la clase 7 responden en su totalidad a la estimulación del ojo ipsilateral. Las neuronas que responden por igual a ambos ojos corresponden a la clase 4 y las clases intermedias responden en mayor medida a uno de los dos ojos (Purves et al., 2004).

Desde el punto de vista fisiológico, se ha observado que la PM en el animal joven determina un fuerte cambio en la distribución de las clases de dominancia ocular que se puede evidenciar con la disminución del índice de binocularidad respecto al adulto normal. En particular, el número de neuronas corticales conectadas funcionalmente con el ojo privado de la visión y que responden a su estimulación disminuye drásticamente, mientras que el número de neuronas que responden al ojo abierto aumentan (figura 4 A y B).

Desde el punto de vista comportamental, el efecto de la PM observado sobre la visión se puede reconocer como una reducción o pérdida permanente de la agudeza visual (una medida de la resolución espacial) y de la sensibilidad al contraste, este déficit se denomina característicamente como ambliopía (Prusky and Douglas, 2003).

Otra forma de evaluar el efecto de la experiencia visual sobre la fisiología cortical es medir la binocularidad en animales con PM. Para ello se registran mediante electrofisiología los potenciales evocados visuales (PEV) *in vivo*, en la CV1 binocular contralateral al ojo privado de la visión (estimulando un ojo u otro) y se calcula el índice de binocularidad cortical como la relación de los PEV contralaterales/ipsilaterales.

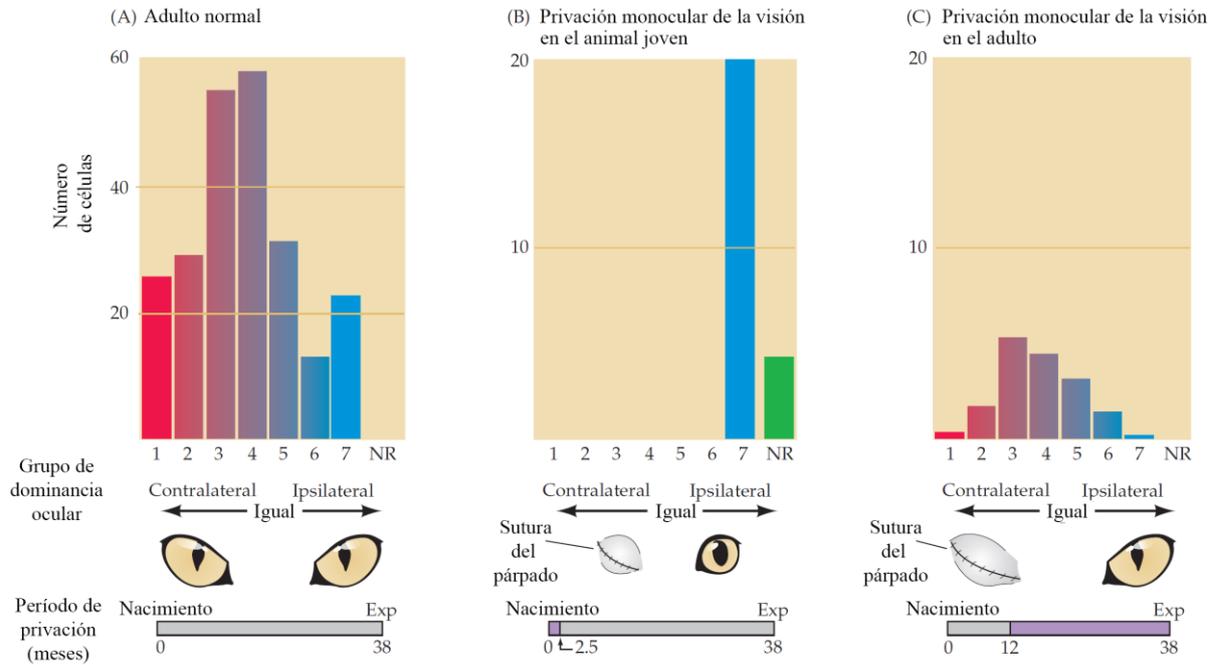


Figura 4: Alteraciones en la organización funcional de la corteza visual por privación monocular. Efectos de la PM en la distribución de las clases de dominancia ocular de las neuronas corticales. Las células de la clase 1 son activadas exclusivamente por el ojo contralateral; las células de la clase 7 son activadas exclusivamente por el ojo ipsilateral; mientras que las células de la clase 2-6 son activadas por los dos ojos. A) Distribución en animales adultos normales (controles). B) Distribución en animales adultos que fueron sometidos a PM durante el PC. C) Distribución en animales adultos que fueron sometidos a PM fuera del PC (Modificado de Purves et al., 2004).

Estos mismos investigadores demostraron que, contrariamente a lo anterior, si la PM se realiza en animales adultos no determina mayores efectos a nivel funcional o estructural (Figura 4C). En su conjunto, estas observaciones demostraron la necesidad de una experiencia visual correcta en etapas tempranas de la vida para el desarrollo normal de la corteza visual primaria, ya que en etapas posteriores (adultas) la experiencia tiene un efecto limitado porque el nivel de plasticidad del sistema es muy bajo (Berardi et al., 2000, Tropea et al., 2009).

El descubrimiento de que la privación monocular de la visión realizada en el animal joven durante un lapso de tiempo breve produce cambios a largo plazo en las propiedades funcionales de la CV1, pero no si es realizada en el animal adulto, llevó a su establecimiento como paradigma experimental para pensar la presencia de la plasticidad cortical. Actualmente, tanto el cambio en la distribución de las clases de dominancia ocular como en el índice de binocularidad cortical, inducidos por PM son ampliamente utilizados como medida de la plasticidad en la corteza visual.

Como mencionamos antes, a nivel comportamental la PM determina ambliopía, que consiste en una fuerte disminución de la agudeza visual y de la sensibilidad al contraste, lo que produce una reducción en la percepción de la profundidad. En el hombre, la ambliopía, es una

patología severa que está asociada con varios desórdenes visuales que ocurren en la niñez como el estrabismo, la anisometropía y la catarata congénita, y se caracteriza por déficit de la visión espacial, disminución de la sensibilidad al contraste y de la agudeza visual. La ambliopía es la causa más común de pérdida de la visión durante la infancia con una incidencia de 2 a 5% en la población (Kiorpes et al., 1998, Berardi et al., 2000, Mittelman, 2003, Holmes and Clarke, 2006, Maya Vetencourt et al., 2009). Los descubrimientos de Hubel y Wiesel permitieron comprender que las intervenciones para revertir esta patología de la visión tenían que hacerse cuando el sistema era todavía plástico. Por ende la ambliopía puede curarse si se realiza un tratamiento en fases tempranas de la vida (en niños antes de los 9 años de edad) cuando el cerebro todavía mantiene la capacidad de modificarse (plasticidad) y se puede recuperar así la función afectada. Por el contrario, tratamientos en fases posteriores menos plásticas no logran recuperar los déficits y la ambliopía se vuelve irreversible (Holmes and Clarke, 2006, Wu and Hunter, 2006). De manera similar, se puede revertir la ambliopía causada por la PM, ocluyendo temporalmente el ojo sano durante el PC, al colocar un parche sobre el mismo y dejando el ojo ambliope abierto (tratamiento conocido como sutura reversa, SR). Este tratamiento permite la recuperación de la visión en fases juveniles, pero no hay una recuperación funcional si la SR se realiza en fases adultas.

5.4 Mecanismos moleculares de plasticidad

Los mecanismos celulares y moleculares subyacentes a los procesos de plasticidad no han sido completamente caracterizados. Sin embargo, la hipótesis actual sugiere que el nivel de plasticidad está dado por el resultado de una compleja interacción entre la influencia ambiental y los mecanismos fisiológicos, que promueven la activación de programas de expresión génicos específicos de la plasticidad. Los factores que determinan el nivel de plasticidad se pueden separar en dos clases, los factores funcionales, que modulan el balance a nivel cortical entre el tono excitatorio y el tono inhibitorio (E/I) y los factores estructurales que conforman principalmente la matriz extracelular cuyo grado de fluidez y/o rigidez permite o no modificaciones de las proyecciones neuronales, influyendo así sobre la reorganización plástica de las conexiones sinápticas (fig. 5).

Considerando el balance E/I se ha demostrado en varios sistemas neuronales incluyendo la corteza visual, que en primer lugar ocurre el desarrollo de las conexiones excitatorias y luego ocurre el desarrollo de los circuitos inhibitorios. Al aumentar el tono inhibitorio se modifica la relación E/I, alcanzando un umbral inicial, que determina la apertura del PC (fig. 5, plástico) en el cual los circuitos neuronales en el sistema visual son altamente susceptibles a la experiencia sensorial. El

sistema inhibitorio continúa desarrollándose y luego se estabiliza manteniéndose a nivel constante durante la vida adulta. Este segundo umbral en la relación E/I determina el cierre del PC y como consecuencia un período con bajo nivel de plasticidad (fig. 5, consolidado).

Esto ha sido demostrado en varios trabajos. Por ejemplo, ratones “knockout” (KO) que carecen de una isoforma de la enzima de la síntesis de GABA (ácido gamma-aminobutírico), GAD65, muestran niveles reducidos de inhibición cortical. En dichos ratones, no se observó la apertura del período crítico de plasticidad (a través del protocolo de privación monocular) mientras que la potenciación farmacológica de la inhibición (mediante administración de agonistas de los receptores GABA-A) en estos animales, recupera el nivel normal de plasticidad (Hensch et al., 1998, Fagiolini and Hensch, 2000).

En otros ratones transgénicos que sobre-expresan en forma precoz el factor neurotrófico derivado del cerebro (“brain derived neurotrophic factor, BDNF”), la maduración de las neuronas inhibitorias GABAérgicas se acelera modificando el balance E/I, lo que desencadena un inicio y un cierre anticipado del PC de plasticidad (Huang et al., 1999). La aplicación de benzodiazepinas en animales jóvenes también acelera la maduración de los circuitos GABAérgicos desencadenando la apertura prematura del período crítico (Fagiolini and Hensch, 2000). Además, la reducción farmacológica de la transmisión GABAérgica (por infusión de BDNF u otras drogas) en animales adultos donde la plasticidad es reducida o nula, restaura niveles de plasticidad similares a los característicos del PC (Maya Vetencourt et al., 2008, Harauzov et al., 2010) .

El establecimiento de la conectividad neuronal en el PC también se encuentra, en parte, bajo el control de elementos estructurales de la matriz extracelular (ME) como los proteoglicanos de condroitín sulfato (PGCS) y otros elementos como las proteínas asociadas a mielina (NgR, Nogo A/B, PirB entre otras), que limitan o restringen la plasticidad. Los PGCS forman estructuras especializadas denominadas redes peri-neuronales (RPN), que envuelven a las interneuronas GABAérgicas corticales. Durante el PC, las redes se encuentran en un estado fluido, permisivo para el crecimiento y la movilidad de los axones y de las dendritas y por tanto puede ocurrir la reorganización de las conexiones neuronales. Más adelante, cuando finaliza el PC, en paralelo con el aumento en el tono inhibitorio, las RPN adquieren un estado más rígido e inhiben la reorganización de las conexiones, actuando como un freno que limita entonces la plasticidad (Hensch, 2005, Morishita and Hensch, 2008). La degradación selectiva de los PGCS que forman las redes peri-neuronales, mediante la administración exógena de la enzima condroitinasa ABC en la corteza visual de animales adultos, induce la reactivación de la plasticidad (Pizzorusso et al., 2002). Esto sugiere que en el adulto las RPN previenen la reorganización de los circuitos que se mantienen estables luego de su madurez.

Por otro lado, la maduración de la mielina también coincide con el cierre del PC (Hensch, 2005, Morishita and Hensch, 2008) y actuaría como un freno, limitando la movilidad y el crecimiento neurítico lo que resulta en la disminución en la capacidad de reorganización. Por ejemplo, en ratones KO para el receptor o para el ligando de Nogo-A la plasticidad persiste en el adulto (McGee et al., 2005). A su vez PirB (receptor pareado tipo inmunoglobulina B, que muestra una alta afinidad por Nogo-A) restringe la plasticidad en la corteza visual en el desarrollo (Syken et al., 2006, Atwal et al., 2008). Además de estas moléculas, en la mielina existen otras (Nogo A/B, MAG y OMgp) que causan un fuerte efecto de inhibición del crecimiento axonal, limitando así la plasticidad cortical (Yiu and He, 2006).

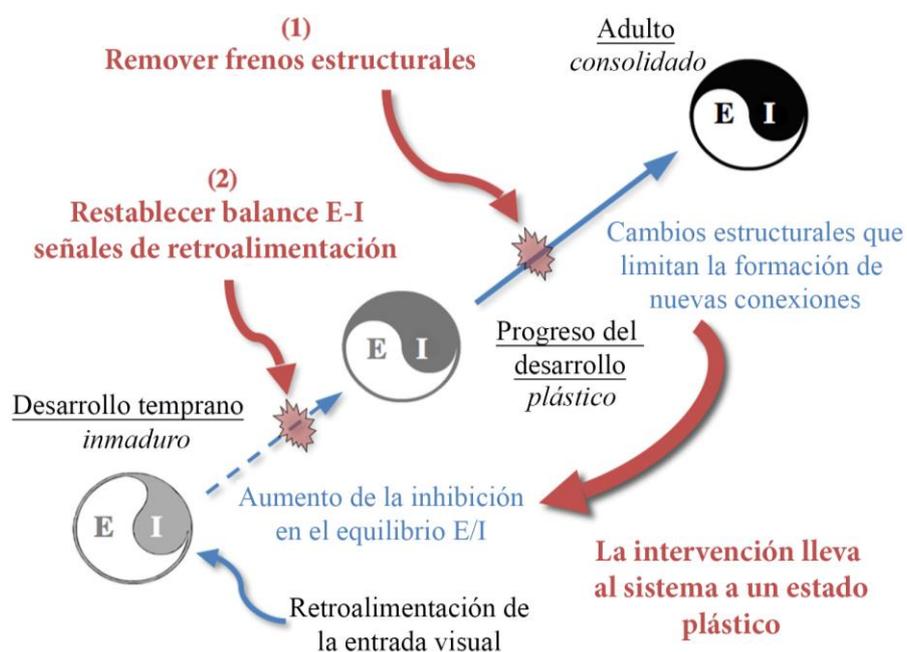


Figura 5: La evolución de las capacidades plásticas a lo largo de la vida (flechas azules; E / I, equilibrio entre el tono excitatorio y el tono inhibitorio) sugiere posibles mecanismos para potenciar el aprendizaje y la recuperación de la función en el adulto (flechas rojas). (1) Remoción de los frenos estructurales para promover el re cableado modificando, por ejemplo, las redes peri-neuronales, la mielina, o el estado epigenético. (2) El restablecimiento local de la relación E/I a un estado juvenil donde domine la excitación, también puede promover eficazmente la plasticidad en la edad adulta. Manipulaciones no invasivas, tales como el tratamiento con fluoxetina o la exposición a ambientes enriquecidos en condiciones que estimulan la actividad sensorial y motora, pueden provocar diversas respuestas neuromoduladoras, quizás a través de señales de retroalimentación de centros de control superior, para potenciar la plasticidad del cerebro y el aprendizaje en los adultos (Modificado de Bavelier et al., 2010).

En los últimos años, se han utilizado análisis a gran escala principalmente a través de un enfoque genómico con el fin de identificar los genes y los respectivos programas de expresión que están involucrados en la regulación de los niveles de plasticidad. Estudios en la modulación de la expresión génica inducida por la experiencia visual (en animales criados en oscuridad total o PM), realizados a nivel transcripcional, han mostrado la modificación en la expresión de varios genes, que

han sido clasificados en diversas categorías funcionales (crecimiento neuronal, sinaptogénesis, transmisión inhibitoria, mielinización y plasticidad entre otras). Parte de este conjunto de genes regulado por la experiencia en el período crítico, se superpone con el grupo de genes regulados fuera de este, mientras que algunos de ellos son diferentes (Prasad et al., 2002, Lachance and Chaudhuri, 2004, Ossipow et al., 2004, Majdan and Shatz, 2006, Tropea et al., 2006, Lyckman et al., 2008). Asimismo, la relevancia en la plasticidad cortical de algunos de estos genes fue confirmada, demostrando que el uso de este tipo de enfoque metodológico es muy conveniente. Algunos ejemplos son la identificación inesperada de proteínas importantes en la respuesta inmune a antígenos en el cerebro, es el caso del MHC-I (complejo mayor de histocompatibilidad de tipo 1; Corveille et al., 1998), que afecta la plasticidad cortical al ser inactivado *in vivo* (Huh et al., 2000, Syken et al., 2006, Shatz, 2009) y la identificación de una proteína de unión al IGF-1, que llevó a la confirmación de que la aplicación exógena de IGF-1 previene el efecto de la PM sobre la dominancia ocular en el PC (Tropea et al., 2006, Ciucci et al., 2007). Estos estudios apuntan a que un gran número de genes puede estar implicado en la regulación de los procesos de plasticidad cerebral y que habría entonces un patrón de huellas moleculares determinado que registre la acción de la experiencia visual de distinta forma, en función del nivel de plasticidad cortical que puede variar durante toda la vida del animal. De esta forma, mientras algunos grupos de genes se expresan durante toda la vida del individuo, otros son específicos del período crítico y otros se expresan únicamente en las fases adultas. Esta expresión diferencial determina el potencial de plasticidad en función del tiempo y explica la diferencia entre la alta capacidad plástica característica del PC y la disminuida plasticidad del adulto (Majdan and Shatz, 2006, Tropea et al., 2006).

5.5 Estrategias que restauran la visión en el adulto

Como mencionamos antes, varias patologías del desarrollo pueden ser tratadas con eficacia si las intervenciones se llevan adelante cuando el sistema es todavía plástico, durante el período crítico de plasticidad, pero no en fases más avanzadas. Desafortunadamente, esto no siempre es realizable. Un mayor conocimiento de los factores que determinan el nivel de plasticidad es, en consecuencia, fundamental para poder implementar estrategias eficaces para la recuperación funcional una vez que haya finalizado el PC. La hipótesis es que manipulando experimentalmente en el adulto los factores que determinan la plasticidad, se podría reactivar el fenómeno de plasticidad y así facilitar la recuperación de determinadas funciones afectadas.

En los últimos años se han identificado algunos tratamientos que restauran o potencian la plasticidad en la corteza visual de adultos y permiten la recuperación de la ambliopía. Entre estos se

encuentran, la exposición de animales a ambientes enriquecidos en condiciones especiales que estimulan la actividad sensorial y motora (Sale et al., 2007), el mantenimiento de los animales en condiciones de oscuridad total (He et al., 2007), la restricción calórica (Spolidoro et al., 2011), el tratamiento farmacológico crónico con fluoxetina, un antidepresivo muy conocido (Maya Vetencourt et al., 2008), y la administración exógena de IGF-1 ("Insulin-like Growth Factor 1"; Maya-Vetencourt et al., 2012). Todas estas estrategias *per se* (en ausencia de PM), no modifican la respuesta de base de las células corticales, ni afectan la binocularidad del animal, lo que no implica que no existan modificaciones a nivel molecular. Estas estrategias promueven la plasticidad cerebral en la vida adulta, mediante la modificación del balance E/I cortical (Maya-Vetencourt and Origlia, 2012). La exposición a ambientes enriquecidos así como, la planificación de la dieta saludable (restricción calórica), el tratamiento con fluoxetina, y la administración exógena de IGF-1 están asociadas a una marcada reducción del tono inhibitorio, mientras que el mantenimiento de los animales en condiciones de oscuridad disminuye el nivel de los receptores GABA-A en relación a los receptores glutamatérgicos de tipo AMPA (AMPA). El efecto producido por estas aproximaciones resulta en un aumento del tono excitatorio en relación al tono inhibitorio, modificando así el balance E/I (Maya-Vetencourt and Origlia, 2012).

De esta manera, el proceso de reactivación de la plasticidad en el sistema visual adulto es un evento multifactorial que comprende la acción de diferentes mecanismos celulares y moleculares, cuya suma resulta en la activación de las vías intracelulares de transducción de señales que regulan la expresión de los genes específicos de la plasticidad.

Asimismo, animales que presentan ambliopía causada por la PM en la fase juvenil (durante el período crítico), logran recuperar la visión cuando son tratados con alguna de estas aproximaciones en la fase adulta, en conjunto con el tratamiento clásico de la ambliopía, la sutura reversa (Sale et al., 2007, He et al., 2007, Maya Vetencourt et al., 2008, Spolidoro et al., 2011, Maya-Vetencourt et al., 2012). Estas estrategias poseen, por tanto, una relevancia fundamental desde el punto de vista clínico, debido a que son procedimientos no invasivos, que constituyen alternativas prometedoras y potencialmente aplicables para la reactivación de la plasticidad cortical en humanos.

En particular, el estudio de animales tratados con fluoxetina es de fundamental importancia ya que de manera muy promisoría se están llevando a cabo algunos ensayos clínicos para probar el tratamiento con fluoxetina para la ambliopía en los seres humanos, utilizándola como componente activo. Dichos ensayos están siendo realizados en Nueva Zelanda y Finlandia, y los mismos se encuentran en la segunda fase de desarrollo (Hermopharma, 2012).

5.6 El caso particular de la fluoxetina

La fluoxetina es un antidepresivo ampliamente utilizado que actúa inhibiendo la recaptación de la serotonina (5-hidroxitriptamina, 5HT) en la hendidura sináptica. Su administración crónica, además de producir un efecto terapéutico a largo plazo en el tratamiento de la depresión, induce cambios en el cerebro que podrían estar relacionados con el proceso de la plasticidad neuronal. Por ejemplo, induce un aumento en la expresión de BDNF en el hipocampo y de su receptor primario TrkB (Nibuya et al., 1995, Castren, 2004) y también promueve la neurogénesis y la sinaptogénesis (Hajszan et al., 2005, Malberg et al., 2000).

En el 2008 un grupo de investigadores con el fin de evaluar si el tratamiento crónico con fluoxetina induce plasticidad en la corteza visual, utilizaron dos modelos clásicos para evidenciar la presencia de plasticidad en la misma, por un lado el cambio en la distribución de clases de dominancia ocular inducido por la privación monocular en las neuronas de la CV1 y por otro lado la recuperación de la visión en el animal adulto ambliope por la PM a largo plazo (fig. 6). En ambos casos, existe un efecto marcado y restringido al período crítico durante el desarrollo postnatal, donde la plasticidad es elevada. Mientras que en el animal adulto no se observan cambios inducidos por ninguno de los dos métodos, debido a la disminución de la plasticidad que ocurre con la edad (Huang et al., 1999, Fagiolini and Hensch, 2000). Cuando se probaron los dos modelos en ratas, se observaron cambios tanto a nivel de la distribución de clases de dominancia ocular, en los animales tratados con fluoxetina y privados de la visión monocular (en favor del ojo sano), como a nivel de la recuperación de la visión en las ratas adultas ambliopes tratadas con fluoxetina, no así en las ratas adultas controles (Maya Vetencourt et al., 2008). De esta manera, se demostró que el tratamiento crónico con fluoxetina potencia la plasticidad neuronal en el sistema visual de ratas adultas (Maya Vetencourt et al., 2008). De esta forma, se puede concluir que la administración crónica de fluoxetina, representa una estrategia no invasiva que induce la potenciación de la plasticidad en el cerebro adulto en un grado similar al observado durante el período crítico (Morishita and Hensch, 2008, Maya-Vetencourt and Origlia, 2012).

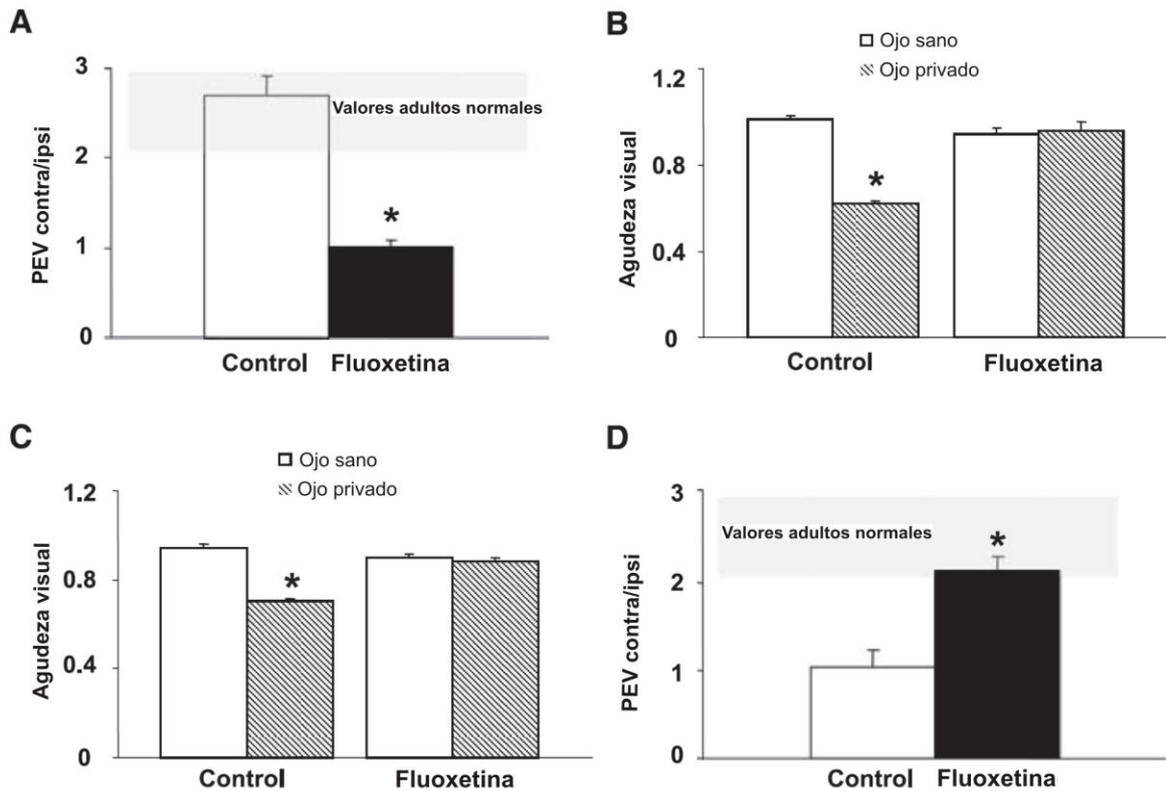


Figura 6: Reactivación de la plasticidad cortical visual en ratas adultas tratadas crónicamente con fluoxetina. (A) La PM induce cambios en las clases de dominancia ocular en ratas adultas tratadas con fluoxetina, en las neuronas corticales visuales a favor del ojo no manipulado, pero no lo modifica en los animales adultos controles. (B) y (C) Muestran la recuperación de la agudeza visual (AV) en ratas adultas ambliopes tratadas crónicamente con fluoxetina junto con la sutura reversa. La AV del ojo inicialmente privado de la visión, fue evaluada por electrofisiología (B) y comportamiento (C) siendo menor a la del ojo sano en animales adultos controles, no así en las ratas adultas tratadas. (D) Muestra la recuperación de la dominancia ocular (binocularidad) en ratas adultas ambliopes luego del tratamiento crónico con fluoxetina junto con la sutura reversa. El PEV C/I fue mayor en la corteza visual de las ratas adultas tratadas con fluoxetina respecto a los controles, y se encuentra en el rango de los animales adultos con visión normal. Las barras de error muestran el SEM; el asterisco muestra significancia estadística (Maya Vetencourt et al., 2008).

En las ratas adultas binoculares tratadas con fluoxetina no se observan cambios a nivel de los potenciales evocados visuales (PEV) contralaterales/ipsilaterales, lo que es consistente con que el tratamiento con fluoxetina *per se* no es capaz de modificar las propiedades de respuesta de base de las neuronas de la CV1 ni la binocularidad en ausencia de PM (Maya Vetencourt et al., 2008). No obstante, sí se observan modificaciones en los niveles basales de GABA extracelular, lo que se condice con la idea de que la disminución del tono inhibitorio (inducido por el tratamiento con fluoxetina) puede modificar el balance E/I en favor de un estado más plástico.

Por otro lado, también se observó la ocurrencia de una forma particular de LTP (inducida en la sustancia blanca y registrada en las capas II y III de la CV1), característica del animal joven, y que normalmente está ausente en los animales adultos (fig. 7 B) lo que indica que en estas ratas se está induciendo plasticidad cortical. A su vez, se observó un aumento en la expresión de BDNF en la

corteza visual de los animales tratados con fluoxetina, que también estaría relacionado con la presencia de plasticidad (fig. 7C). Por ello, las ratas adultas binoculares tratadas crónicamente con fluoxetina son un modelo de estudio sumamente útil, en la búsqueda de los mecanismos moleculares que median los procesos de plasticidad de la corteza visual en el animal adulto. En este sentido, en un estudio reciente de microarreglos de ADN se ha demostrado que la fluoxetina induce la modulación de varios genes relacionados con el modelado de la cromatina, el desarrollo del sistema nervioso y la plasticidad en la corteza visual (Tiraboschi et al., 2013).

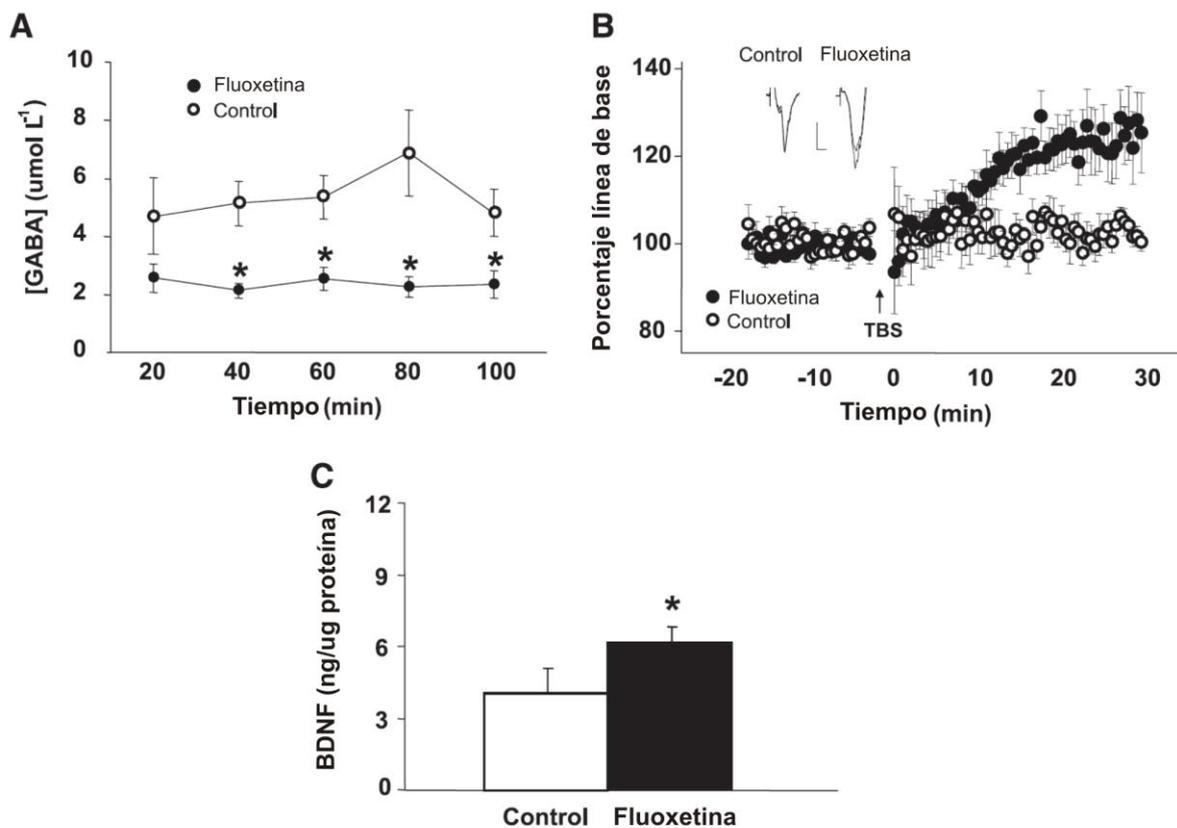


Figura 7: Disminución de la inhibición intracortical y aumento de la expresión de BDNF en la corteza visual de rata adulta luego del tratamiento crónico con fluoxetina. (A) Microdialisis in vivo muestra que los niveles basales de GABA son significativamente menores en las ratas adultas tratadas crónicamente con fluoxetina comparadas con las ratas controles. (B) Potenciación a largo plazo (LTP) en la corteza visual adulta. El LTP en las capas II – III, fue significativamente mayor en la corteza visual de ratas adultas tratadas que en los controles. La barra de escala corresponde a 50% de la amplitud de línea de base y 5 ms. (C) Niveles proteicos de BDNF luego del tratamiento crónico, cuantificados por el método de ELISA. La expresión de BDNF fue significativamente mayor en la corteza visual de las ratas adultas tratadas crónicamente con fluoxetina respecto a los controles.

5.7 La serotonina en el sistema visual y su rol en el mecanismo de la fluoxetina.

El mecanismo de acción de los antidepresivos, luego de la administración aguda, es la facilitación de la transmisión serotoninérgica o noradrenérgica (Nestler, 1998), pero esta facilitación no explica la acción terapéutica a largo plazo que requiere de varias semanas de exposición al antidepresivo en el tratamiento crónico. La fluoxetina es un inhibidor de la recaptación de la serotonina (5-hidroxitriptamina, 5HT), por lo que incrementa los niveles de serotonina extracelular en la hendidura sináptica (van Harten, 1993), potenciando así la transmisión serotoninérgica. Sin embargo, los mecanismos neuroquímicos a través de los cuales actúa no están bien caracterizados.

Las fibras serotoninérgicas se originan en los núcleos del rafe y se extienden a todas las áreas corticales, innervando todas las capas de la corteza. Existen variaciones en la densidad y en la distribución laminar de las fibras en distintas regiones y también entre distintas especies. Las terminales sinápticas de estas fibras realizan contactos sinápticos principalmente con neuronas piramidales y también con interneuronas GABAérgicas. Estos contactos, son más comunes en las espinas dendríticas, aunque también pueden encontrarse en el soma celular (Pineyro and Blier, 1999).

Existen varios tipos de receptores serotoninérgicos, la mayoría de estos están presentes en la neocorteza. El efecto de la serotonina es variable dependiendo de la composición de los receptores a nivel postsináptico, y de la interacción con otros sistemas neuromoduladores, pudiéndose producir un efecto facilitador o supresor de la actividad neuronal. La activación de los receptores 5HT1 resulta en un aumento en la conductancia de potasio a través de la membrana que conlleva a la disminución de la excitabilidad neuronal. Por el contrario, los receptores 5HT2 y 5HT4 aumentan la excitabilidad celular y la tasa de descarga al disminuir la conductancia del potasio, lo que desencadena la despolarización de la membrana plasmática. Finalmente los receptores 5HT3 median la transmisión sináptica rápida (Gu, 2002).

En la corteza visual primaria, los receptores del tipo 5HT 1A se encuentran principalmente en las neuronas piramidales. Se ha demostrado que la administración de serotonina en la corteza visual de animales adultos induce efectos sobre la plasticidad muy similares a los obtenidos a través de la fluoxetina y que el efecto de esta es mediado por receptores serotoninérgicos del tipo 1A (Maya Vetencourt et al., 2011), si bien otros receptores pueden contribuir en menor nivel. En este sentido, se sabe que en la corteza visual hay receptores 5HT2C, cuya distribución varía en función de la especie, también hay receptores 5HT3, que se encuentran en neuronas GABAérgicas; receptores 5HT6, que están presentes en los astrocitos y finalmente receptores 5HT1B, 5HT2B y 5HT4, que se

expresan en las células endoteliales, lo que sugiere que están asociados a los vasos sanguíneos (Gu, 2002, Pineyro and Blier, 1999).

Por otra parte, la serotonina puede tener un efecto autorregulatorio e inhibitorio sobre su propia liberación, mediado por autorreceptores. Este efecto podría explicar la acción terapéutica a largo plazo del tratamiento crónico con fluoxetina y con otros antidepresivos, en donde inicialmente habría un aumento en el nivel de serotonina extracelular y luego por un efecto compensatorio habría una disminución de la misma. En este sentido, se ha observado que la serotonina actúa sobre autorreceptores de tipo 1A, que actúan reduciendo el influjo de Ca^{2+} e incrementando la conductancia del potasio, lo que disminuye la excitabilidad neuronal (Pineyro and Blier, 1999). Por ende la fluoxetina podría estar modulando el tono serotoninérgico así como el de otros neuromoduladores.

Esto a su vez estaría desencadenando una cascada de señales que finalmente promueve cambios a nivel de la estructura de la cromatina que media la expresión de genes tempranos específicos, como el BDNF que se expresa activamente en los animales tratados crónicamente, aumentando de esta forma el nivel de plasticidad en el adulto (Maya Vetencourt et al., 2008). Asimismo, se vio que la expresión de BDNF asociada al tratamiento con fluoxetina tiene una relación con el estado de acetilación de las histonas, ya que este se ve aumentado en las regiones promotoras de BDNF dependientes de actividad y también se condice con la disminución de la expresión de enzima deacetilasa de histonas (HDAC) (Maya Vetencourt et al., 2011).

No obstante varios factores, como el BDNF, han sido identificados e implicados en la regulación de la plasticidad en la corteza visual, ya sea en el período crítico como en los procesos que reactivan la plasticidad en el adulto, el cuadro completo de los mecanismos moleculares involucrados en la determinación del nivel de plasticidad no está totalmente caracterizado y se desconoce si los genes implicados en regular los niveles de plasticidad en los distintos momentos de la vida son exactamente los mismos.

6. Justificación y objetivos

6.1 Justificación

Basado en las evidencias antes mencionadas, se puede extrapolar que el estudio de la plasticidad dependiente de la experiencia es fundamental, y el conocimiento detallado de los mecanismos involucrados en este proceso es esencial en la identificación de estrategias para el tratamiento de patologías del sistema nervioso asociadas al desarrollo incorrecto mediado por la estimulación sensorial anormal. En este sentido, es particularmente relevante el análisis en animales tratados con fluoxetina, por un lado, por el potencial de su aplicación clínica, ya que promueve no sólo la reactivación del nivel de plasticidad en adultos, sino también la recuperación en roedores ambliopes, y por otro lado, debido a su amplio uso en humanos, por su acción como antidepresivo. Estas evidencias provenientes de experimentos realizados en ratas fueron confirmados recientemente en ratones (ver anexo 1), por lo que en este proyecto utilizamos ratones como modelo de estudio.

En este trabajo nos proponemos utilizar un abordaje proteómico a gran escala para identificar las proteínas responsables de la reactivación del alto nivel de plasticidad en animales adultos binoculares tratados con fluoxetina de forma crónica, y contribuir así a definir de una manera más detallada a los mecanismos regulatorios de este proceso. La ventaja principal de este tipo de aproximación radica en la posible identificación de nuevas proteínas potencialmente implicadas en la regulación de la plasticidad que hasta el momento fueran desconocidas o al menos no estuvieran asociadas previamente con una función específica en la plasticidad. Además, la plasticidad en la corteza visual resulta de modificaciones estructurales y funcionales que ocurren a largo plazo en los circuitos neuronales, por lo que no pueden explicarse exclusivamente por la regulación transcripcional y pos-transcripcional. Igualmente, para la plasticidad de dominancia ocular es indispensable la síntesis proteica en la corteza visual (Taha and Stryker, 2002). Además, en algunos casos no hay una relación entre el nivel de expresión de los ARNm y las proteínas, debido posiblemente a sus diferentes vidas medias (Anderson and Seilhamer, 1997, Gygi et al., 1999).

La proteómica plantea un enfoque innovador, siendo una metodología que complementa a la genómica y a la transcriptómica, y es esencial porque permite identificar a las proteínas, los actores principales de las funciones celulares. A su vez, permite caracterizar modificaciones postraduccionales que son fundamentales en la regulación de la actividad proteica (Putignano et al., 2007, Taniura et al., 2007), siendo una técnica que tan sólo dos grupos de investigación practican en el estudio de la plasticidad en la corteza visual (Van den Bergh et al., 2003a, Van den Bergh et al.,

2006, Dahlhaus et al., 2011). Estos grupos implementaron la proteómica funcional para ayudar a develar los mecanismos moleculares de la plasticidad cerebral que conducen la respuesta de la corteza cerebral sensorial de mamíferos a la privación del estímulo durante el desarrollo y la edad adulta. Estos estudios de detección a gran escala proporcionaron una lista de proteínas con funciones en el metabolismo, el crecimiento de neuritas y la guía axonal, la formación de sinapsis, la estabilización del citoesqueleto, y la liberación de neurotransmisores (Van den Bergh et al., 2003a, Van den Bergh et al., 2003b, Van den Bergh et al., 2006, Dahlhaus et al., 2011), que han permitido ahondar en la identificación de mediadores moleculares en este tipo de procesos plásticos, algunos de los cuales fueron posteriormente validados (Cnops et al., 2006, Cnops et al., 2007).

6.2 Objetivo general

El objetivo general de este trabajo es, identificar en la corteza visual de ratones adultos, proteínas cuyo nivel sea modulado por el tratamiento con fluoxetina en comparación con animales de control no tratados. De esta manera esperamos contribuir a la caracterización de un conjunto de proteínas candidatas, cuya actividad puede ser la base de la determinación de los niveles de plasticidad cortical. Dichas huellas moleculares pueden permitir el desarrollo de nuevas terapias para la recuperación de la función y del daño cerebral.

6.3 Objetivos específicos

- 1- Puesta a punto de la metodología de electroforesis en geles bidimensionales (2D-PAGE).
- 2- Identificación de proteínas moduladas por el tratamiento crónico con fluoxetina en ratones adultos binoculares.
- 3- Validación de los resultados obtenidos analizando el nivel de las proteínas mediante Western blot.
- 4- Seleccionar las proteínas que presenten potencial relevancia en el control de procesos de plasticidad para estudios futuros.

7. Materiales y métodos

7.1 Mantenimiento y tratamiento de animales.

Se utilizaron ratones (*Mus musculus*) de la cepa C57B6/J adultos (~P70), de la misma masa corporal aproximada (≈ 28 g), que fueron mantenidos en condiciones estándar de temperatura ($20 \pm 1^\circ$ C), humedad ($\approx 50\%$) y ciclo de luz/oscuridad (14/10 horas), en el bioterio de la Unidad de Animales Transgénicos y Experimentación (UATE) del Institut Pasteur de Montevideo.

Para el tratamiento con fluoxetina hidrocloreuro, la dosis (13-18 mg/Kg/día) y la duración del mismo (3-4 semanas) fueron seleccionadas en función de lo indicado por estudios previos, ya que dosis similares potencian la plasticidad en adultos (ratas: Maya Vetencourt et al., 2008, Maya Vetencourt et al., 2011; ratones: Sale et al., 2011, datos no publicados ver figura 7) y son eficaces a nivel celular, molecular y funcional (Dulawa et al., 2004, Rantamaki et al., 2007, Maya Vetencourt et al., 2008, Karpova et al., 2009, Maya Vetencourt et al., 2011). La fluoxetina (Selectchemie AG, Suiza, donación de Laboratorios Gador S.A., Uruguay y de D. Agrati, Facultad de Ciencias) se administró en una concentración de 0.1 mg/ml en el agua de los bebederos (en botellas protegidas de la luz), y fue cambiada cada 3-4 días por solución fresca. Para estimar la dosis de fluoxetina (mg/Kg/día) consumida efectivamente se midió el volumen de líquido tomado durante y al final del tratamiento y se dividió por el número de animales, el número de días de duración del tratamiento y la masa corporal media por ratón (ver Tabla 1). Los ratones controles fueron mantenidos en las mismas condiciones, sin la adición de fluoxetina en el agua.

Tabla 1: Cálculo de la dosis de fluoxetina clorhidrato utilizada en los experimentos.

Jaula	Nº animales por jaula	volumen consumido por jaula	volumen consumido por ratón	mg fluoxetina consumido por ratón	días de tratamiento	peso medio por ratón	mg/kg/día/ratón
1	3	471	157	15.70	31	28.1	18.02
2	6	789	132	13.15	29	27.9	16.25
3	6	784	131	13.07	31	28	15.05
4	5	463	93	9.26	24	27.8	13.88

Ratones utilizados en la puesta a punto de la extracción proteica, en la metodología de la proteómica y en los experimentos de proteómica diferencial. Se muestra el número de animales y el volumen de agua consumido por jaula. Se calculó el volumen consumido por ratón en cada jaula, que se multiplicó por el coeficiente de dilución de fluoxetina clorhidrato (0.1mg/ml), obteniendo la cantidad consumida por ratón. En base al número de días de tratamiento y el peso medio del ratón se obtuvo la dosis en mg por kg por día por ratón.

Luego del tratamiento, los animales fueron sacrificados por dislocación cervical. Inmediatamente después, se realizó la disección de los tejidos de interés en PBS 1X (buffer fosfato salino) previamente enfriado a 4°C. Para ello, se extrajo el cerebro y se disecaron las regiones correspondientes a la corteza visual primaria y a la corteza cerebral parietal, que fueron congeladas inmediatamente en nitrógeno líquido y guardadas en el congelador a -80° C hasta su posterior utilización.

Los experimentos en animales fueron realizados en concordancia con los estándares del comité de ética de la Comisión Honoraria de Experimentación Animal (CHEA, Facultad de Ciencias, UdelaR), del Comité de Ética en el Uso de Animales (CEUA, Institut Pasteur de Montevideo), y avalados por la Comisión Nacional de Experimentación Animal (CNEA). Asimismo, para realizar estos experimentos obtuve la acreditación correspondiente a la categoría B, otorgada por la CNEA.

7.2 Análisis de los niveles tisulares de monoaminas por HPLC

Con el fin de analizar las diferencias en los niveles tisulares de algunos neuromoduladores luego del tratamiento crónico con fluoxetina, y para comparar lo observado con los datos de tratamiento agudo (Beyer and Cremers, 2008), se cuantificaron los niveles tisulares de serotonina (5HT) y del ácido 5-hidroxi-indolacético (5HIAA), su principal metabolito, y de la dopamina (DA) y sus metabolitos, el ácido 3,4-dihidroxifenilacético (DOPAC) y el ácido homovanílico (HVA). Estos fueron cuantificados mediante la técnica de cromatografía líquida de alta resolución con detección electroquímica (HPLC-ECD).

Al momento de realizar el análisis, los tejidos (cortezas parietales) fueron pesados y sonicados en ácido perclórico 0,1 M en hielo. El homogenato fue centrifugado por 15 min a 15.000 rpm y el sobrenadante recuperado. Para la cuantificación relativa se utilizaron soluciones estándares de las monoaminas y sus metabolitos. Para el análisis se inyectaron 50 µl de muestra en un sistema de HPLC conformado por una bomba de HPLC marca BASi modelo PM-80 fijado con un flujo de 1.2 ml/min y un detector electroquímico 4C-LC fijado a un potencial de oxidación de 0,70 V. Se utilizó una columna de HPLC Phenomenex, modelo luna C-18 de 4,6 x 150 mm, con un tamaño de partícula de 5µm. La fase móvil utilizada consiste en buffer citrato (0.15 M, pH 3,0), octilsulfato de sodio (0.6 mM), acetonitrilo (4%) y tetrahidrofurano (2%).

7.3 Preparación de muestras para 2D.

El protocolo estándar finalmente utilizado consiste en:

- 1) Transferir la muestra de tejido de corteza visual (las 2 cortezas visuales de cada ratón, 17-20 mg) a 150 µl de solución de lisis (7M urea, 2M tiourea, 4% CHAPS (3-[[3-Colamidopropil]- dimetilamonio]-propano sulfonato), 56,25mM Dithiotritiol (DTT), inhibidor de proteasas).
- 2) Homogeneización en hielo.
- 3) Sonicar en baño durante 1 minuto.
- 4) Dejar una hora a temperatura ambiente para la completa solubilización de las proteínas.
- 5) Sonicar durante 1 minuto.
- 6) Centrifugar a 13.000g durante 20 minutos a 4º C y recuperar el sobrenadante, repetir este paso.
- 7) Almacenar el sobrenadante en el congelador a -20º C.
- 8) Descongelar el sobrenadante almacenado y realizar la precipitación con ácido tricloroacético (TCA) en acetona para eliminar posibles impurezas (ej. ADN y lípidos). Se utilizó una solución precipitante constituida por 20% de TCA en acetona 4,5 mM de DTT (TAD) y una solución co-precipitante constituida por acetona 4,5 mM DTT (AD).
- 9) Luego de descongelar, separar las muestras equitativamente en 4 tubos de microcentrifuga (cada tubo contiene ~100 µg de proteína total).
- 10) Adicionar 300 µl de TAD a cada tubo y mezclar por inversión o vortex, incubando en hielo (4º C) por 15 minutos.
- 11) Adicionar 300 µl de AD y mezclar con vortex brevemente.
- 12) Centrifugar a 13.000g por 10 minutos a 4º C y descartar el sobrenadante.
- 13) Lavar con 40 µl de AD, adicionarlo sobre el sedimento e incubar por 5 minutos en hielo.
- 14) Centrifugar (a 13.000g por 10 minutos a 4º C) y remover el lavado.
- 15) Agregar 25 µl de agua milliQ sobre el sedimento y mezclar con vortex (5-10 s), dispersando el pellet.
- 16) Agregar 1 ml de AD, previamente enfriado por al menos 1 hora a -20º C, mezclar con vortex hasta dispersar totalmente el sedimento e incubar a -20º C por 30 minutos, vortexeando por 20-30s cada 10 minutos.
- 17) Centrifugar (a 13.000g por 10 minutos a 4º C) y remover el sobrenadante, dejando secar el pellet por algunos minutos (menos de 5).
- 18) Volver a suspender el sedimento en 50 µl totales de solución de lisis con DTT y dejar solubilizar a temperatura ambiente, mezclando con vortex varias veces para solubilizar plenamente el sedimento.

19) Centrifugar y recuperar el sobrenadante que se divide en alícuotas y se almacena a -20° C.

La puesta a punto del protocolo de preparación de la muestra proteica se describe en la sección 9.1.1 de resultados.

7.4 Cuantificación proteica

La cuantificación de proteínas se realiza inmediatamente antes de comenzar el isoelectroenfoque, mediante el método de Bradford en microplaca (Olson and Markwell, 2001), con el siguiente protocolo:

- 1) Se preparan los estándares de seroalbúmina bovina (de 0-14 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) y las muestras de concentración desconocida (0,5-1 μl) en un volumen final de 140 μl .
- 2) Se agrega 20 μl de NaOH 1 M para mejorar la solubilidad de las proteínas, que pueden precipitar con el contacto directo del reactivo de Bradford.
- 3) Se adiciona 40 μl de reactivo de Bradford 5X (0.05% Azul brillante de Coomassie G-250, 23,75% etanol, 42,5% ácido fosfórico) a cada pocillo de la placa y mezclar.
- 4) Incubar durante 5 minutos a temperatura ambiente.
- 5) Detectar la absorbancia a 595 nm en un lector de placas.
- 6) Preparar la curva de calibración, graficando absorbancia a 595 nm en función de la concentración proteica y determinar la concentración proteica de las muestras a partir de la ecuación obtenida.

7.5 Primera dimensión - Isoelectroenfoque.

Protocolos de isoelectroenfoque

En primer lugar, se realizó la puesta a punto del protocolo de isoelectroenfoque (IEF), para luego poder seleccionar el protocolo más conveniente para la separación de las proteínas de la muestra de cerebro, particularmente de la corteza visual. En esta fase de preparación de la metodología se realizaron varios experimentos de geles bidimensionales para probar los protocolos de isoelectroenfoque, utilizando muestras de corteza visual de 9 ratones (en donde se utilizaron las dos cortezas visuales de cada ratón, para extraer la muestra proteica por ratón).

En principio se utilizó el sistema ZOOM IPGRRunner (Invitrogen) en el que se llevaron a cabo tres protocolos de IEF que se describen en la tabla 2. Antes del IEF, los strips (ZOOM Strip pH 3-10NL) fueron rehidratados en una solución de 8M Urea, 2% CHAPS, 0.002% azul de bromofenol, 10 mM DTT, 1% Amfolitos (ZOOM Carrier Ampholytes pH 3-10), en una proporción de 155 $\mu\text{l}/\text{strip}$.

Tabla 2: Protocolos de isoelectroenfoque utilizados con el sistema ZOOM IPGRunner.

Protocolo Isoelectroenfoque	1	2	3
Rehidratación Overnight	a temperatura ambiente	a temperatura ambiente	a temperatura ambiente
Etapas 1	175 V 15 min, 43.75 Vh Escalón mantenido	175 V 30 min, 87.50 Vh Escalón mantenido	175 V 36 min, 105 Vh Escalón mantenido
Etapas 2	350 V 15 min, 87.5 Vh Escalón mantenido	350 V 30 min, 175 Vh Escalón mantenido	350 V 36 min, 210Vh Escalón mantenido
Etapas 3	350 - 2000 V 45 min, 881.25 Vh En gradiente	350 - 2000 V 75 min, 1468.75Vh En gradiente	350 - 2000 V 90 min, 1762 Vh En gradiente
Etapas 4	Escalón 2000 V 80 min, 2667 Vh Escalón mantenido	2000 V 120 min, 4000 Vh Escalón mantenido	2000 V 144 min, 4800 Vh Escalón mantenido
Voltaje hora total	3679.5 Vh	5731.25 Vh	6877 Vh

Posteriormente se utilizó el sistema IPGphor II (Amersham Biosciences), en el que se realizaron dos protocolos de IEF que se describen en la tabla 3. En este sistema se realizó la rehidratación de los strips (immobiline DryStrip gels, Amersham) en una solución de 7M urea, 2M tiourea, 2% CHAPS, 0,002% azul de bromofenol, 18mM DTT, 0,5% IPGbuffer (amfolitos, Amersham Biosciences, Uppsala, Suecia) en una proporción de 125 µl/strip.

Tabla 3: Protocolos de isoelectroenfoque utilizados con el sistema IPGphor II.

Protocolo Isoelectroenfoque	4	5
Rehidratación pasiva	12 horas overnight a 20°C	16 horas overnight a 20°C
Etapa 1	150V 30 min, 37,5Vh En gradiente	300V 30 min, 150Vh Escalón mantenido
Etapa 2	300V 2 horas, 600Vh Escalón mantenido	300 a 1000V 30 min, 325Vh En gradiente
Etapa 3	500V 1 hora, 500Vh Escalón mantenido	1000 a 5000V 1h20, 4000Vh En gradiente
Etapa 4	1000V 1 hora, 1000Vh Escalón mantenido	5000V, 4000Vh Escalón mantenido
Etapa 5	1000 a 5000V 1 hora, 3000Vh En gradiente	-
Etapa 6	5000V 3.4 horas, 16982Vh	-
Voltaje hora total	22120 Vh	8475Vh

En ambos sistemas se realizó la rehidratación pasiva de los strips. En el caso del sistema ZOOM IPGRunner, se hace en un contenedor descartable (ZOOM IPGRunner Cassette), a temperatura ambiente, mientras que en el caso del sistema de Amersham se realiza en barquitos de cerámica en el mismo equipo que luego continúa con el protocolo de IEF. En ambos casos, se utilizaron strips de 7 cm de longitud con un rango de pH de 3 a 10 no lineal.

En cada una de las corridas de los experimentos realizados con muestras de ratones tratados y controles, se llevó a cabo la rehidratación y el IEF (protocolo 5) consecutivo de 4 strips, 2 con una muestra de control (en duplicado) y 2 con una muestra de tratado (en duplicado). Cada experimento fue repetido dos veces.

7.6 Equilibración y segunda dimensión - 2DPAGE.

Posteriormente al IEF, las tiras son equilibradas en dos etapas, en agitación suave por 15 minutos, en una solución conteniendo 6M urea, 30% (v/v) glicerol, 2% (w/v) SDS. En la primera etapa, se adiciona a la solución de equilibración DTT en una concentración de 10mg/ml y en la

segunda etapa se adiciona iodoacetamida (23,2mg/ml), luego se realiza la electroforesis de SDS-PAGE. Los strips son colocados sobre geles de poliacrilamida al 12% de 1mm de espesor, luego de colocar el marcador de peso molecular en uno de los extremos del gel. A continuación se coloca la agarosa al 0,5 % y se deja polimerizar unos minutos. Se agrega el buffer de corrida y se procesan los 4 geles juntos en el vertical Protean II xi Multi-Cell (BioRad, Hercules, CA, USA). La corrida electroforética se realizó de dos formas. Los strips que fueron obtenidos de los protocolos 1 a 4, bajo los parámetros de Voltaje constante, 15 minutos a 80 V y 1 hora y 30 minutos a 150 V, mientras que los obtenidos con el protocolo 5 a corriente constante, 5-10 minutos a 10 mA y 40-50 minutos a 20mA.

7.7 Tinción

7.7.1 Tinción de nitrato de plata

El protocolo estándar consiste en los siguientes pasos:

- 1) Lavar el gel de poliacrilamida en un recipiente con agua milliQ, por al menos 5 minutos.
- 2) Incubar el gel en solución de fijación (10% Acido acético, 50% Etanol, 0.5ml/l formaldehido 36.5%), durante al menos 1 hora en agitación suave y conservar la solución luego de su uso.
- 3) Lavar 3 veces durante 5 min con 100 ml de Solución de Lavado (etanol 50%).
- 4) Lavar 1 min con agua milliQ.
- 5) Enjuagar rápidamente (por menos de 1 minuto) con 100ml de solución de sensibilización (tiosulfato de sodio pentahidratado al 0,02%).
- 6) Lavar 3 veces durante 1 minuto con agua milliQ.
- 7) Incubar durante 20 minutos con 100ml de solución de nitrato de plata (AgNO_3 0,2%, formalina 0,075%) en oscuridad.
- 8) Lavar 3 veces durante 1 minuto con agua mQ.
- 9) Incubar con 100ml de solución de revelado (Na_2CO_3 3%, $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0.0004%, formalina 0.05%) hasta que se visualicen los spots.
- 10) Detener la reacción con la solución de fijación o con una solución de ácido acético al 5% (durante 10 minutos aproximadamente).
- 11) Descartar la solución de fijación y lavar el gel dos veces con 50 mL de solución de lavado durante 15 minutos. De esta forma se remueve el ácido acético del gel lo que previene que las bandas del gel se oscurezcan con el tiempo.

12) Finalmente conservar en solución de conservación (25% Etanol y 3 % glicerol, ó ácido acético 1%) hasta su posterior utilización o secado.

7.7.2 Tinción de Coomassie coloidal

Consiste en:

- 1) Fijar el gel en una solución de ácido acético 10% y etanol 40% durante 30 minutos.
- 2) Retirar el fijador y colocar el gel en la solución de Coomassie coloidal (8% sulfato de amonio, 0.8% ácido fosfórico, 0.08% Azul de Coomassie G-250, 20% Etanol), dejar en agitación, durante toda la noche y hasta por 7 días.
- 3) Lavar repetidas veces con agua milliQ para remover el colorante residual.
- 4) Almacenar en agua milliQ, si es necesario agregar azida de sodio (al 0,02% o menos).

Para obtener una coloración homogénea todos los geles del mismo experimento fueron procesados en conjunto.

7.8 Experimentos de proteómica diferencial

En los experimentos de proteómica de geles bidimensionales se utilizaron muestras de corteza visual de ratones adultos controles (n=3, C1, C2, C3) y de ratones adultos tratados crónicamente con fluoxetina (n=3, F1, F2, F3). Para el primer experimento (A) se realizaron dos geles con la misma muestra de control (C1) y dos con la misma muestra de tratado (F1) para evaluar la variabilidad intra-experimental. Más adelante, en otro experimento (A') se realizó el duplicado del experimento A, para verificar la reproductibilidad entre experimentos 2D-PAGE independientes. Luego se procedió de la misma forma para las muestras C2 y F2 (experimentos B y B'). Finalmente se realizó el experimento (C) con 4 geles: dos con la misma muestra de control (C3) y dos con la misma muestra de tratado (F3). De este modo, se obtuvieron 20 geles bidimensionales, 10 de control y 10 de fluoxetina, en los que se cargó 60 µg de proteína total y fueron coloreados con Coomassie coloidal.

7.9 Análisis de imágenes y obtención de datos.

Los geles bidimensionales de ambos grupos experimentales fueron escaneados en formato tif utilizando el programa Labscan (Genebio Amersham Biosciences) para adquirir las imágenes con una resolución de 300 dpi y de 16 bits/pixel, y posteriormente analizados con el programa Melanie 6.0 (Genebio Amersham Biosciences).

Para el análisis de la imagen, debido a la gran cantidad de spots y a su patrón de distribución, decidimos dividir la imagen de cada gel en 6 áreas parcialmente superpuestas, utilizando spots característicos y claramente distinguibles para delimitarlas (fig.8).

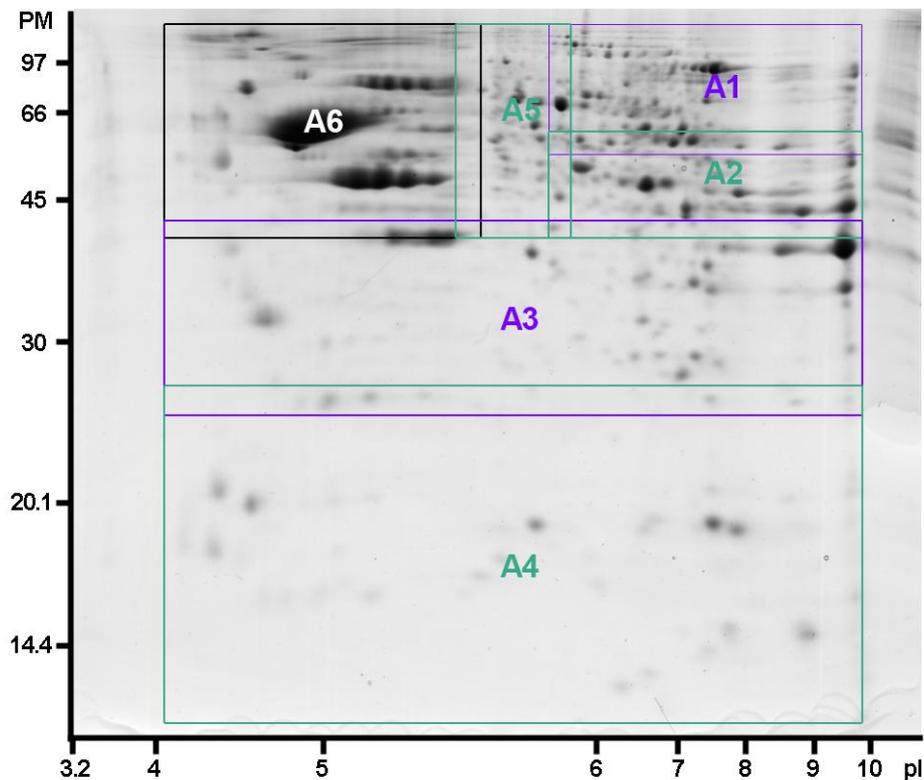


Figura 8: Gel bidimensional de corteza visual de ratón control (60 μg de proteína) al 12%, teñido con Coomassie coloidal. Se muestra el área del gel subdividida en las 6 áreas de estudio, indicadas con un recuadro y la letra A seguida de los números 1 a 6. PM: peso molecular en kilo Daltons, pl: punto isoeléctrico.

Detección de los spots

Para la detección de los spots se fijan tres parámetros: Smooth, que optimiza la detección de spots reales y la separación de spots que se superponen a través de un algoritmo; Min Area, que permite eliminar artefactos menores al área mínima fijada, como partículas de polvo y aberraciones de los geles y Saliency, parámetro que se basa en la curvatura del spot e indica cuánto sobresale éste del entorno. Dentro de cada área se fijaron los tres parámetros para la detección de spots como está indicado en la tabla.

Tabla 4: parámetros de la detección de spots para cada área. Se indica el Smooth, Min Area y Saliency utilizado en cada área de estudio.

	Área 1	Área 2	Área 3	Área 4	Área 5
Smooth	2	2	2	2	2
Min Area	25	30	50	100	20
Saliency	500	450	400	450	600

Luego de la detección automática, se procedió a la inspección visual para eliminar los puntos que no correspondían a spots (partículas de polvo o superficie irregular del gel) y en algunos casos se modificaron y adicionaron spots manualmente.

Comparación de los geles

Posteriormente se asignaron “landmarks” (puntos de referencia) a determinados spots, que estaban claramente definidos en todos los geles del grupo de estudio, para poder proceder a la fase de matching (comparación de spots entre geles). En cada área se agregaron varios puntos de referencia, que fueron necesarios para realizar la comparación. En el área 1 se utilizaron 6, en el área 2 se utilizaron 4, en el área 3 se utilizaron 5 y en el área 5 se utilizaron 3 puntos de referencia, respectivamente. En esta fase, se eligió el gel con el mayor número de spots como gel de referencia (“master gel”) para la comparación. Todos los geles son comparados al gel de referencia y de esta forma se obtiene, para cada “matched spot” (spot pareado) un número de identificación (ID) que es el mismo en todos los geles en los que aparece el spot.

Luego de la comparación automática, se procedió a la inspección visual y al análisis de los perfiles tridimensionales para eliminar los pares de spots que no se correspondían y si era necesario se corrigieron, y eventualmente se adicionaron otros manualmente.

Para la asignación de los valores calculados de peso molecular y de punto isoeléctrico a los spots, se calibraron las imágenes de los geles 2D utilizando los valores de los PM estándar (BioRad, Sigma, Fermenta) y los datos del gradiente de pH de los strips utilizados (Invitrogen, Amersham). El programa Melanie 6.0 calcula los valores de pI interpolando los valores de calibración de los dos puntos más cercanos, mientras que para el PM hace una interpolación logarítmica.

Formación de clases

Luego de la comparación todos los geles son agrupados en una clase, de este modo, se puede obtener un reporte intra-clase con los datos correspondientes a cada spot pareado comparado satisfactoriamente en la etapa anterior.

Al realizar el análisis intra clase seleccionamos las variables a estudiar, en este caso se seleccionó la intensidad y el volumen. El programa calcula la intensidad de un spot como la intensidad máxima calibrada de los pixeles del spot, de la cual se elimina la intensidad de fondo, que corresponde al valor mínimo de los pixeles del entorno del spot. El volumen del spot, por otra parte, se calcula como el volumen por encima del contorno del spot, que va desde el pico del mismo hasta el 75% de su altura, por lo que es una medida de la densidad óptica integrada.

Posteriormente los datos fueron pasados a una hoja de cálculo de Excel para su posterior análisis estadístico. En este paso se realizó la separación de los datos para cada spot según el tratamiento utilizado, en columnas de control y de fluoxetina.

Luego de realizar el estudio primario en el que se tomaron todos los geles para dilucidar si había diferencias entre los spots de los grupos de geles, se realizó un análisis posterior en el que se eligieron las tres mejores parejas de geles, una por cada experimento realizado (cada pareja correspondiente a una muestra de ratón control y a una de tratado, $n=3$) para verificar si la diferencia que mostraron algunos de los spots presentaba relevancia estadística. Por pareja se entiende los dos geles que corrieron en el mismo casete donde la homogeneidad es más elevada. En este caso, se utilizaron los spots que mostraron diferencias en el estudio primario y se eliminaron los restantes. Para ello se realizó una copia del “matchset” (conjunto de datos pareados) correspondiente a cada área, en la cual se eliminaron los spots que no presentaron cambios significativos previamente, manteniendo así el mismo número total de spots en cada gel. De esta manera, se pudo utilizar la variable de porcentaje de volumen, que corresponde al cociente entre el volumen de cada spot y la sumatoria de los volúmenes de todos los spots del gel multiplicado por cien.

Luego se creó la clase a partir de cada matchset y se obtuvo la tabla de datos de porcentaje de volumen para cada spot analizado. Los datos fueron pasados a una hoja de cálculo en la cual se realizó el análisis estadístico correspondiente.

7.10 Análisis estadístico

7.10.1 Análisis estadístico primario

El análisis estadístico primario se realizó mediante subrutinas del programa Matlab 7.10.0 (R2010a), éste es un entorno de lenguaje de alto nivel e interactivo para cálculos numéricos, visualización y programación, además de contener herramientas para el análisis estadístico.

Análisis de los datos crudos: test t de Student y U de Mann Whitney

Con el fin de identificar los spots de proteínas que presentaban diferencias entre controles y tratados, se realizó el análisis estadístico de los datos de intensidad y de volumen de cada spot. En aquellos casos en donde las muestras presentaban homogeneidad de varianza y una distribución posiblemente normal, se realizó el test t de Student, para muestras no pareadas de varianzas homogéneas. Este test, parte de la hipótesis nula en la cual las diferencias entre las medias de las dos poblaciones comparadas es cero y la hipótesis alternativa en la cual, las medias de las muestras

son diferentes. Se fijó entonces un valor de alfa (α) de 0.05 y se tomó el siguiente criterio de decisión: Si el p valor obtenido era mayor al valor crítico de 0.05, se aceptó la hipótesis nula (no hay diferencias entre las medias de ambas poblaciones), mientras que si el p valor era menor al alfa asignado, se rechazó la hipótesis nula y se aceptó la alternativa (existen diferencias entre las medias de las poblaciones que se compararon). En los casos en donde las dos condiciones, distribución normal y homogeneidad de varianzas no se cumplieron, se realizó el test U de Mann Whitney no paramétrico que compara las medianas de muestras de las dos poblaciones de estudio. Se utilizó para comprobar la heterogeneidad de dos muestras independientes utilizando rangos. Este test no asume distribución normal, pero sí que la distribución de las dos poblaciones tiene la misma forma. En la prueba de hipótesis, la hipótesis nula es que las dos muestras fueron tomadas de poblaciones con medianas iguales y la alternativa es que las medianas entre dichas poblaciones difieren. El criterio de decisión fue el siguiente: Si el p valor era mayor al alfa asignado, entonces se aceptó la hipótesis nula, ambas poblaciones presentan la misma mediana. En el caso contrario, si el p valor obtenido era menor a 0.05, se rechazó la hipótesis nula y se aceptó la alternativa, las poblaciones presentan medianas distintas.

Normalidad

Se utilizó el test de Lilliefors, una adaptación del test de Kolmogorov-Smirnov no paramétrico, usado para probar si la distribución de los datos de dos muestras, es igual y consistente con una distribución normal (Stephens, 1970). El estadístico mide la distancia máxima entre la distribución observada y una distribución normal con la misma media y desviación estándar como la de las muestras analizadas, y confirma si dicha distancia es mayor a la que debería ser simplemente por el azar. La prueba de hipótesis consiste en la hipótesis nula, los datos presentan una distribución normal y en la hipótesis alternativa, los datos no tienen distribución normal. Se fijó el valor crítico, alfa (α), de 0.05 y el criterio de decisión que se tomó fue: Si el p valor era mayor a 0.05, se aceptó la hipótesis nula, los datos tienen posiblemente una distribución normal. Si el p valor era menor al alfa fijado, se rechazó la hipótesis nula y se aceptó la alternativa, los datos no presentan una distribución normal.

Homogeneidad de varianzas

Se utilizó el test de Levene, un estadístico que permite discriminar si las varianzas de poblaciones tomadas de muestras distintas son homogéneas (homocedasticidad) o no. La prueba de hipótesis se basa en la hipótesis nula de que las varianzas de las muestras estudiadas son iguales y la hipótesis alternativa en la que las varianzas son distintas. Se fijó el valor de α de 0.05 y el criterio de

decisión fue el que sigue a continuación: Si el p valor era mayor al valor crítico de 0.05, se aceptó la hipótesis nula, siendo las varianzas de ambas muestras comparadas homogéneas. Si el p valor resultante era menor al valor crítico (0.05), se rechazó la hipótesis nula y se aceptó la hipótesis alternativa, las varianzas son heterogéneas (Levene, 1960).

Análisis de los datos transformados

Posteriormente, se realizó una transformación de los datos de intensidad y de volumen, para estandarizar dichos datos con respecto a los valores de control. De esta forma, se obtuvo la razón (ratio) de los valores de fluoxetina y de los valores de control sobre los valores de control ($F/C \times 100$; $C/C \times 100$), en forma de porcentaje, para cada uno de los spots analizados.

En este caso, no se realizaron los estadísticos correspondientes al estudio de normalidad y homogeneidad de varianzas porque ambas condiciones no se pueden establecer, ya que los valores del grupo control corresponden al 100% en todas las ocasiones, el valor no cambia. Por ello, se realizó directamente el test no paramétrico U de Mann Whitney para vislumbrar si existían diferencias entre las medianas de las poblaciones en estudio. Se utilizó la misma prueba de hipótesis que describiéramos con anterioridad y el alfa elegido, o sea el error que se está dispuesto a cometer cuando se comparan los datos que fue en todos los casos 0.05.

7.10.2 Análisis estadístico secundario: test de Mann Withney en datos seleccionados normalizados

En esta fase se partió de los resultados del análisis estadístico previo, tomando los spots que tuvieron diferencias entre los grupos experimentales, se realizó un análisis posterior para ver que tan relevantes eran las diferencias observadas. Se utilizaron 6 datos por spot, obtenidos de tres parejas de geles, de tres muestras de CV1 de ratones controles y de 3 ratones tratados. En esta instancia se utilizó el porcentaje de volumen (% Volume) como variable de estudio, considerando que el análisis se llevó adelante sólo sobre el mismo número restringido de spots en todos los geles analizados. Esta variable tiene en consideración variaciones debidas a diferencias en la carga proteica y en la tinción de los geles, considerando el volumen de todos los spots detectados en cada gel.

Realizamos el test U de Mann Whitney para comparar si existían diferencias entre las medianas de los dos grupos experimentales en estudio, como se explicó en la sección 7.10.1 de materiales y métodos. En este caso, debido a que tenemos un número de animales pequeño ($n=3$), tomamos un valor crítico de alfa de 0.10. Para esta parte del análisis se utilizó el programa Past 2.14 de análisis libre (Hammer and Harper, 2001).

7.11 Espectrometría de masa.

Para descartar posibles errores en la selección de spots para enviar a espectrometría de masa, se confirmó visualmente la diferencia entre los spots en los geles, en los diagramas de la vista tridimensional y en los histogramas intra-clase, además de verificar la facilidad de extraer el spot del gel, de esta forma se conformó una lista de spots de interés.

Los spots de proteínas seleccionados para su identificación por espectrometría de masa fueron recortados de los dos mejores geles manualmente, colocados en un tubo de microcentrifuga y almacenados a 4° C hasta su posterior procesamiento. Para la decoloración del gel se adicionó 100 µl de una solución al 50% (v/v) de bicarbonato de amonio 0.2 M pH 8.0 y acetonitrilo y se incubó por 30 minutos a 30° C en un termomixer a 1.400 rpm. Luego de mezclar se descartó la solución y se repitió el paso dos veces. El gel fue deshidratado con la adición de 100 µl de acetonitrilo e incubado en las mismas condiciones, luego se descartó el acetonitrilo y se dejó secando en la cámara de flujo. Se realizó la digestión proteolítica “in gel” con la adición de 10 µl de una solución de tripsina (0.1 µg/µl tripsina en 67 mM bicarbonato de amonio pH 8.0) a cada spot procesado, se dejó digiriendo toda la noche en estufa a 37° C. Los péptidos fueron extraídos con 100 µl de una solución de 60% acetonitrilo en 0.1% ácido trifluoroacético, y se concentraron por centrifugación bajo vacío hasta un volumen final de aproximadamente 20 min. Se realizó el desalado de la muestra y la concentración de la misma usando microcolumnas comerciales de fase reversa C18 (OMIX Pipette tips, Varian). La elución de los péptidos de la columna se llevó a cabo directamente sobre la placa de muestras del espectrómetro de masa con 2 µl de la solución de matriz ácido alfa-ciano-4-hidroxi-cinámico (CHCA en 60% de acetonitrilo, 0.1% de ácido trifluoroacético).

Los espectros fueron obtenidos en un espectrómetro de masa MALDI-TOF/TOF (4800 MALDI TOF/TOF Analyzer AB Applied Biosystem MSD Sciex), en el modo reflector positivo y la calibración interna con fragmentos auto líticos de tripsina. Las proteínas fueron identificadas por mapeo peptídico, a partir de las masas de los péptidos utilizando el motor de búsqueda MASCOT (Matrix Science, www.matrixscience.com).

7.12 Análisis bioinformático

En esta fase se utilizaron las bases de datos de NCBI (National Center for Biotechnology Information) y de Uniprot (Universal Protein Resource; www.uniprot.org) para identificar la localización subcelular de las proteínas identificadas en el análisis proteómico. Para esto, se usaron exclusivamente evidencias procedentes de publicaciones identificables (TAS, Traceable Author

Statement), de ensayos directos (IDA, Inferred from Direct Assay), de patrón de expresión (IEP, Inferred from Expression Pattern), de fenotipos mutantes (IMP, Inferred from Mutant Phenotype), de interacción física (IPI, Inferred from Physical Interaction) y de interacción genética (IGI, Inferred from Genetic Interaction). Se utilizó solo información relativa a las proteínas de la especie *Mus musculus*. También se utilizó información de PANTHER (protein annotation through evolutionary relationship; www.pantherdb.org/) para identificar los procesos biológicos relacionados con las proteínas identificadas y el programa STRING (Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes/Proteins; string-db.org/) para identificar potenciales interacciones entre las proteínas.

Estos programas permiten analizar y clasificar a gran escala datos del genoma obtenidos por secuenciación, proteómica o experimentos de expresión génica. Son construidos en base a varios genomas completos organizados en familias y subfamilias de genes y sus relaciones evolutivas están capturadas en los árboles filogenéticos, alineamientos múltiples de secuencia y modelos estadísticos. Los genes se clasifican de acuerdo a su función utilizando principalmente familias y subfamilias que son anotadas con los términos de ontología (ontología de genes (GO) y clase de proteínas). El programa String está dedicado a la identificación de interacciones proteína-proteína conocidas y predictivas y utiliza numerosas fuentes incluyendo repositorios experimentales, métodos de predicción computacional y colecciones de textos públicos, actuando así como una base de datos que correlaciona todas las pruebas de interacción en un conjunto común de genomas y proteínas. De esta forma, integra cuantitativamente la interacción de datos de estas fuentes para un gran número de organismos, y transfiere la información entre estos organismos cuando es aplicable. La base de datos actualmente cubre 5.214.234 proteínas de 1.133 organismos (Jensen et al., 2009).

7.13 Western blot.

Se realizó el Western blot de muestras proteicas de corteza visual de ratones controles y tratados, utilizando los anticuerpos primarios que se detallan a continuación: anticuerpo contra la superóxido dismutasa 1 (anti-SOD1 de conejo, 1:2000, gentilmente donado por M. Marin, Facultad de Ciencias) y anti-SOD2 de ratón (1:2000, Santa Cruz Biotechnology, gentilmente donado por C. Quijano, Facultad de Medicina), y anticuerpo anti-actina de conejo (1:2000, Sigma-Aldrich). Los anticuerpos secundarios utilizados fueron: anticuerpo anti-ratón conjugado a peroxidasa de rábano (HRP, producido en cabra, 1:10000, Sigma) y anticuerpo anti-conejo unido a HRP (producido en cabra, 1:5000, Sigma). El anticuerpo anti-SOD1 reconoce una banda de 20-22kDa (Palacios et al., 2010), el anti-SOD2 reconoce una banda de 25kDa y el anticuerpo anti-actina reconoce una banda de 42kDa respectivamente.

Preparación de muestras

Se realizó la extracción de proteínas transfiriendo el tejido a 100-150 μ l de buffer de lisis (Tris 50 mM, EDTA 1 mM, NaF 100 mM, PMSF 0.1 mM, Na_3VO_4 2 mM, 1% Triton X-100, 10% Glycerol), se realizó la homogeneización mecánica de las muestras que fueron incubadas por 30 minutos en hielo. Se centrifugó el lisado a 13000g por 1 hora a 4^o C y se recuperó el sobrenadante. Una alícuota del mismo fue utilizada en la estimación de la concentración de proteínas según el método de Bradford en microplaca descrito previamente. Al sobrenadante restante se le adicionó buffer de carga 4X en cantidad necesaria (2% SDS, Tris 0.375 M, 10% Glycerol, 5% betamercaptoethanol, 0.2% Bromophenol Blue) para realizar la separación de proteínas en electroforesis.

Electroforesis

Se preparó el gel de poliacrilamida al 10% y se realizó la electroforesis de SDS-PAGE en una dimensión con el buffer de corrida (25 mM Tris, 0.192 M Glicina, 0.1% SDS). Se realizó una pre-corrida de 15 minutos a 120 V, se cargó 30 μ g de proteína de cada muestra y se realizó la separación de las muestras a voltaje constante, 15 minutos a 120 V y 1 hora 160 V.

Transferencia

Luego de la electroforesis las proteínas del gel fueron transferidas a membrana de nitrocelulosa (GE Healthcare). Luego de la equilibración de la membrana y el gel junto con los accesorios del equipo en buffer de transferencia (25 mM Tris, 192 mM glicina, 20% metanol, pH 8.3) a 4^o C se realizó la transferencia fijando los parámetros a voltaje constante, a 100 V durante 2 horas. Al finalizar la transferencia, para verificar el proceso se colorearon los geles con Azul brillante de Coomassie (0.1% azul de Coomassie R-250, 50% etanol, 7% ácido acético) y las membranas con Rojo de Ponceau al 0.5% en ácido acético al 1%. Se realizaron los lavados con PBS y el bloqueo en leche al 5% en PBST (Tween 20 0.1% en PBS) durante una hora a temperatura ambiente, con agitación suave. Posteriormente se incubó la membrana con el anticuerpo primario en PBST, durante la noche. Se realizaron varios lavados con PBS-T y luego se incubó con el anticuerpo secundario correspondiente por una hora. Se realizaron varios lavados y luego el revelado de la membrana.

Revelado

Para el revelado se incubó la membrana de nitrocelulosa con la solución del sustrato químico luminiscente (LumiGLO, Cell Signaling Technology) por 1 minuto en agitación. Luego se coloca la

membrana en el casete y se expone la película de rayos X (Agfa) en oscuridad. Se retira la película y se coloca en la solución de revelado durante algunos minutos. Se enjuaga, se coloca en la solución fijadora y luego se enjuaga en agua corriente por varios minutos. Para cada membrana se utilizaron varias películas de rayos X expuestas por intervalos de tiempo de distinta duración (10-30 min.)

Análisis de la imagen

Para establecer la intensidad de las señales obtenidas en el análisis de Western blot de forma semi-cuantitativa, se utilizó el sistema de análisis libre NIH Image J 1.46r. Las bandas obtenidas fueron cuantificadas utilizando una ventana dibujada a mano para incluir una banda por cada medida. Para cada banda se calculó el índice de plata precipitada en la emulsión, al multiplicar la densidad óptica media (OD) por el área total de la banda, resultando en la densidad óptica integral (INTOD). La cuantificación de la señal de actina en cada membrana fue utilizada exclusivamente como un control adicional para verificar que la misma carga proteica fue utilizada en cada gel. Para cada experimento se utilizaron 3 muestras. Para controlar la variabilidad inter-experimental cada experimento de Western blot fue repetido dos veces. Los datos de los gráficos se presentan como el promedio \pm el error estándar de la media (SEM).

Estadística

Para identificar la significancia estadística en la modulación de los resultados de Western blot obtenidos, los datos fueron analizados utilizando el test U de Mann Whitney, con un valor crítico $p < 0.05$. El análisis estadístico mencionado en esta sección, fue llevado a cabo utilizando el programa de análisis libre Past 2.14 (Hammer and Harper, 2001).

8. Resultados

8.1 Puesta a punto de la metodología de electroforesis bidimensional.

8.1.1 Preparación de la muestra

El primer objetivo de esta tesis era la puesta a punto de la metodología para lograr obtener geles bidimensionales con una resolución de spots adecuada para el estudio de proteómica diferencial planteado. La preparación y obtención de una muestra de buena calidad con cantidades mínimas de impurezas es el primer paso fundamental para realizar este tipo de estudio. En este trabajo inicialmente se utilizó un protocolo de preparación de muestra reportado por un grupo de investigación que estudia la plasticidad en la corteza visual de gato utilizando DIGE (Bergh and Arckens, 2008). Con dicho protocolo las muestras proteicas quedaban con un aspecto viscoso y poco soluble. Por lo cual se procedió a realizar diferentes pruebas con el objetivo de mejorar las mismas. Inicialmente pensamos que el problema podía deberse a una lisis incompleta o mal fraccionamiento, por lo que procedimos a incluir tres ciclos consecutivos de congelación y descongelación de las muestras (con nitrógeno líquido o incubando dos horas en el congelador a -20°C) y posteriormente centrifugando las muestras a alta velocidad (13.000g) durante 20 minutos a 4°C . Sin embargo el aspecto de las muestras no mejoró considerablemente. Finalmente, los cambios sustanciales se lograron al aumentar el volumen de la solución de lisis utilizada para disolver la muestra (pasamos de 17-20 mg de muestra/100 μl de solución de lisis, a 17-20 mg de muestra/150 μl de solución de lisis), al eliminar el Tris y al agregar un agente reductor de puentes disulfuro (DTT 56 mM) a la solución de lisis. Por último, y no menos importante, se agregó un paso de precipitación con TCA en acetona, que se sabe permite la eliminación de impurezas no proteicas (ADN, lípidos, etc.) que pueden interactuar con las proteínas en la muestra e interferir con la migración en la separación proteica en los geles de electroforesis bidimensional. En la metodología figura el protocolo optimizado.

Por lo tanto, a lo largo de este trabajo se aportaron varias modificaciones al protocolo de extracción proteica lográndose mejorar la calidad de la muestra y posterior resolución de los spots separados en la electroforesis 2D-PAGE.

8.1.2 Protocolos de isoelectroenfoque

Con el fin de separar la muestra proteica de corteza visual de ratón en un patrón de spots bien definido, se probaron diferentes protocolos de isoelectroenfoque en la primera dimensión. Se utilizó un número variable de etapas, con distintos potenciales eléctricos y tiempo de duración. El Protocolo 1 se utilizó para separar una carga proteica de 10 μg , obteniéndose un perfil proteico de spots bien separados, con una buena resolución de los mismos (fig. 9).

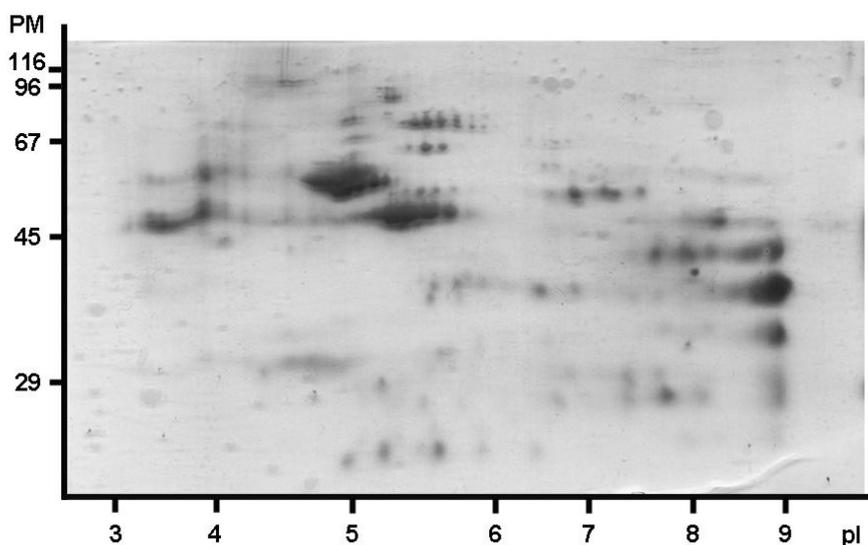


Figura 9: Gel bidimensional al 12%, de corteza visual de ratón control, teñido con nitrato de plata. Se cargó 10 μg de proteína y se utilizó el protocolo 1 de isoelectroenfoque (IPGRunner, Invitrogen). PM: peso molecular en kilo Daltons, pI: punto isoeléctrico. Gel representativo de dos experimentos realizados con muestras de 2 ratones.

Con el objetivo de aumentar el número de spots para tener más material para la posterior identificación por espectrometría de masa, se decidió aumentar la carga proteica a enfocar. Realizamos una prueba con una carga de 40 μg de proteína total y un nuevo protocolo de IEF adaptado a una mayor cantidad de proteína (protocolo 2, fig. 10).

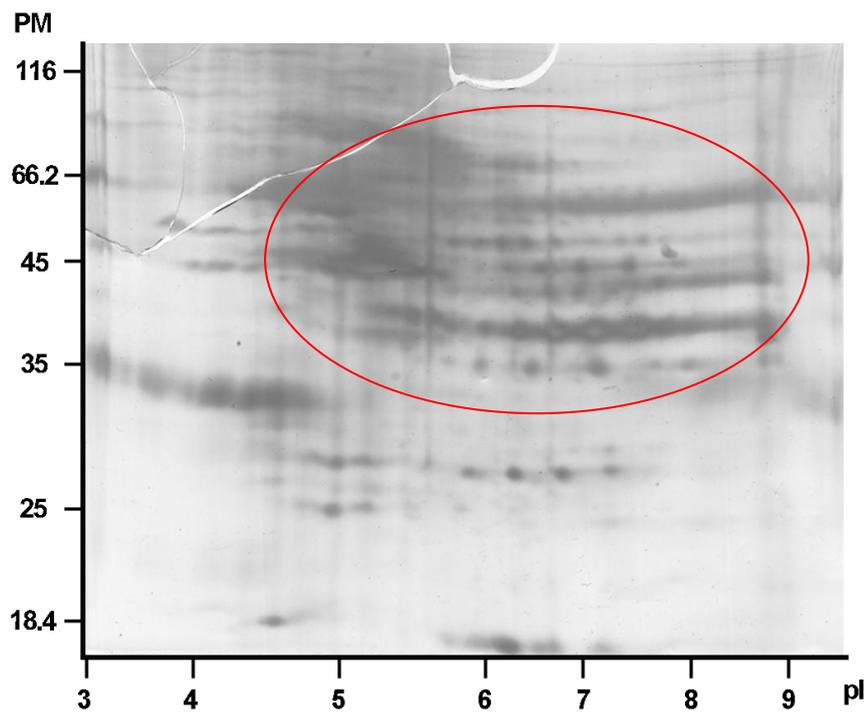


Figura 10: Gel bidimensional al 12%, de corteza visual de ratón control, teñido con nitrato de plata. Se cargó 40 μg de proteína y se utilizó el protocolo 2 de isoelectroenfoque (IPGRunner, Invitrogen). PM: peso molecular en kilo Daltons, pI: punto isoeléctrico. Gel representativo de 2 experimentos realizados con la muestra de un ratón.

Como se observa, por ejemplo, en la región indicada en la figura 10, si bien se observa un patrón de puntos, la resolución es menor a la de la figura 9 ya que los spots no se encuentran completamente separados y hay un exceso en la coloración que tal vez se deba a la mayor carga proteica. Por lo tanto con el objetivo de lograr focalizar mejor los diferentes spots utilizamos el protocolo 3 (fig. 11) el cuál presenta un voltaje hora mayor al anterior, cuidando no exceder las limitaciones del equipo.

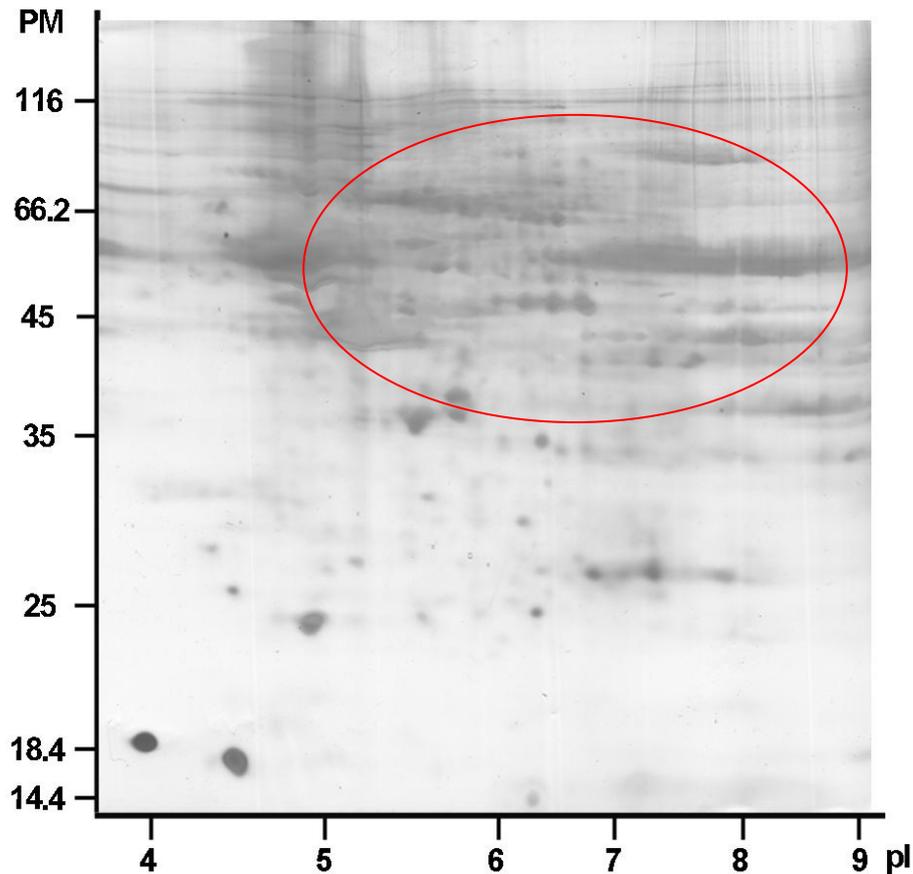


Figura 11: Gel bidimensional al 12%, de corteza visual de ratón control, teñido con nitrato de plata. Se cargó 40 μg de proteína y se utilizó el protocolo 3 de isoelectroenfoque (IPGRunner, Invitrogen). PM: peso molecular en kilo Daltons, pl: punto isoeléctrico. Gel representativo de 2 experimentos realizados con la muestra de un ratón.

En esta imagen se puede observar una mejoría en la separación de los spots en la región inferior, pero en la región superior tal como se indica, se pueden observar spots que están muy concentrados, y no se distinguen como puntos definidos y separados unos de otros. Asimismo en esa región la coloración es intensa impidiendo la visualización de algunos spots seguramente por la elevada concentración de proteínas.

Todos los experimentos de esta primera etapa fueron realizados en el equipo de isoelectroenfoque IPGRunner (Invitrogen). Al no obtenerse una definición suficientemente buena de los spots separados con los protocolos utilizados, era recomendable aumentar el voltaje durante la separación (por ejemplo de 2000 V a 5000V) cosa que no permitía el equipo de Invitrogen. Por ende, decidimos cambiar de sistema, al IPGphor II (Amersham Biosciences) que si lo permitía. Para hacer una prueba, utilizamos el protocolo 4, alcanzando 22120 Vh, mucho mayor al previamente utilizado (6877 Vh) y comparamos la resolución de los spots obtenida (fig. 12).

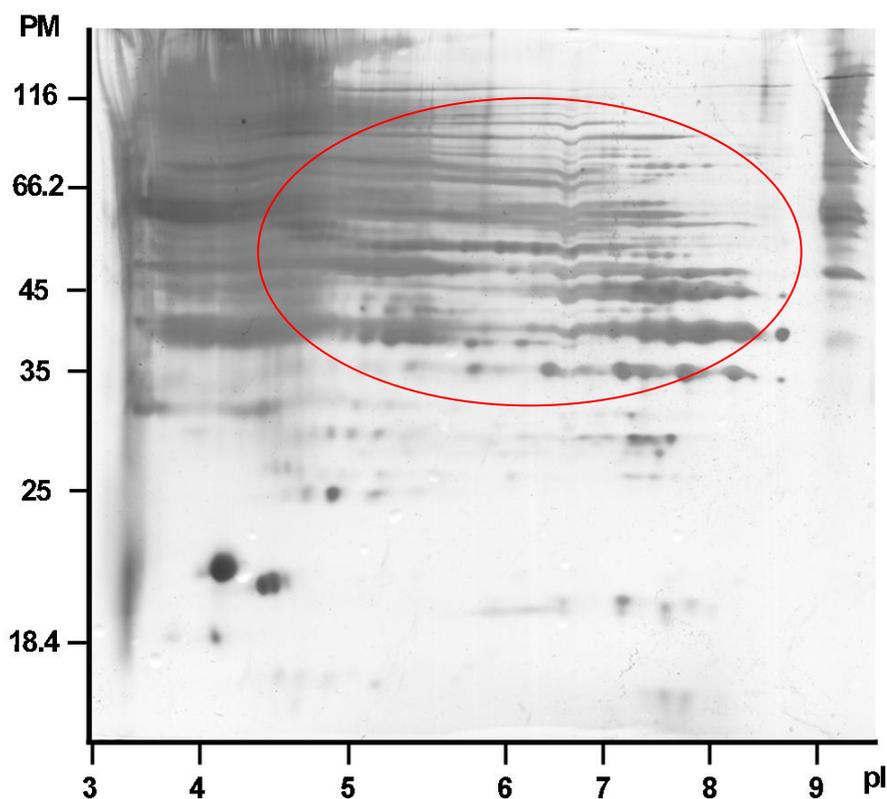


Figura 12: Gel bidimensional al 12%, de corteza visual de ratón control, teñido con nitrato de plata. Se cargó 40 μg de proteína y se utilizó el protocolo 4 de isoelectroenfoque (IPGphor, Amersham). PM: peso molecular en kilo Daltons, pI: punto isoelectrico. Gel representativo de un experimento realizado con la muestra de 2 ratones.

Con dicho protocolo 4 se obtiene un patrón de puntos alineados, pero estos siguen sin distinguirse unos de otros, faltando por tanto un mayor grado de separación para obtener puntos bien delimitados. En este caso, los puntos están muy marcados, pero no se diferencia el spot de forma circular típica sino que parece difuminado posiblemente debido a una sobre focalización de los spots por exceso de V_h totales. Por ende, este protocolo no mejoró la resolución de los spots respecto al protocolo 3, observándose también una coloración de fondo muy marcada.

De esta manera, fue necesario modificar nuevamente el protocolo de IEF y para ello definimos el protocolo 5. El resultado del perfil de spots obtenido mediante este último se puede observar en la figura 13. En la misma se observa un patrón de spots aceptable, es decir que la mayoría de los spots se observan como un punto definido.

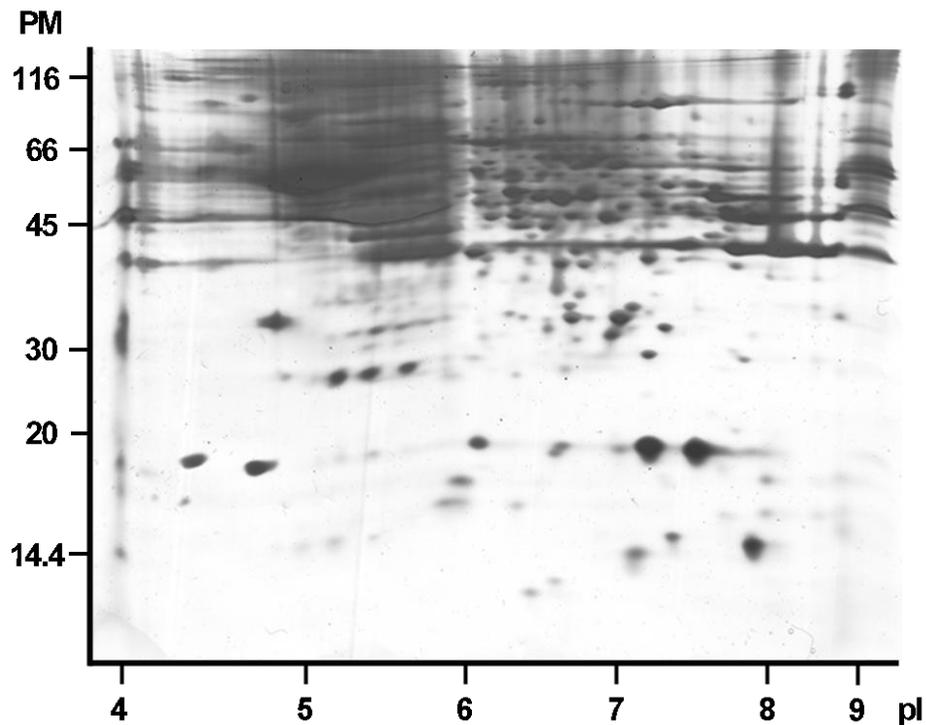


Figura 13: Gel bidimensional al 12%, de corteza visual de ratón control, teñido con nitrato de plata. Se cargó 50 μg de proteína y se utilizó el protocolo 5 de isoelectroenfoco (IPGphor, Amersham). PM: peso molecular en kilo Daltons, pI: punto isoeléctrico. Gel representativo de 2 experimentos realizados con la muestra de un ratón.

Las proteínas de los geles fueron visualizadas utilizando la tinción de nitrato de plata. La misma, observamos, deja una coloración de fondo bastante intensa en gran parte del gel. Por ello, repetimos el experimento (utilizando nuevamente el protocolo 5) pero cambiamos a la tinción con Coomassie coloidal para ver si la resolución de los spots se mantenía y si el ruido de fondo también se mantenía, se minimizaba o se eliminaba (fig. 14).

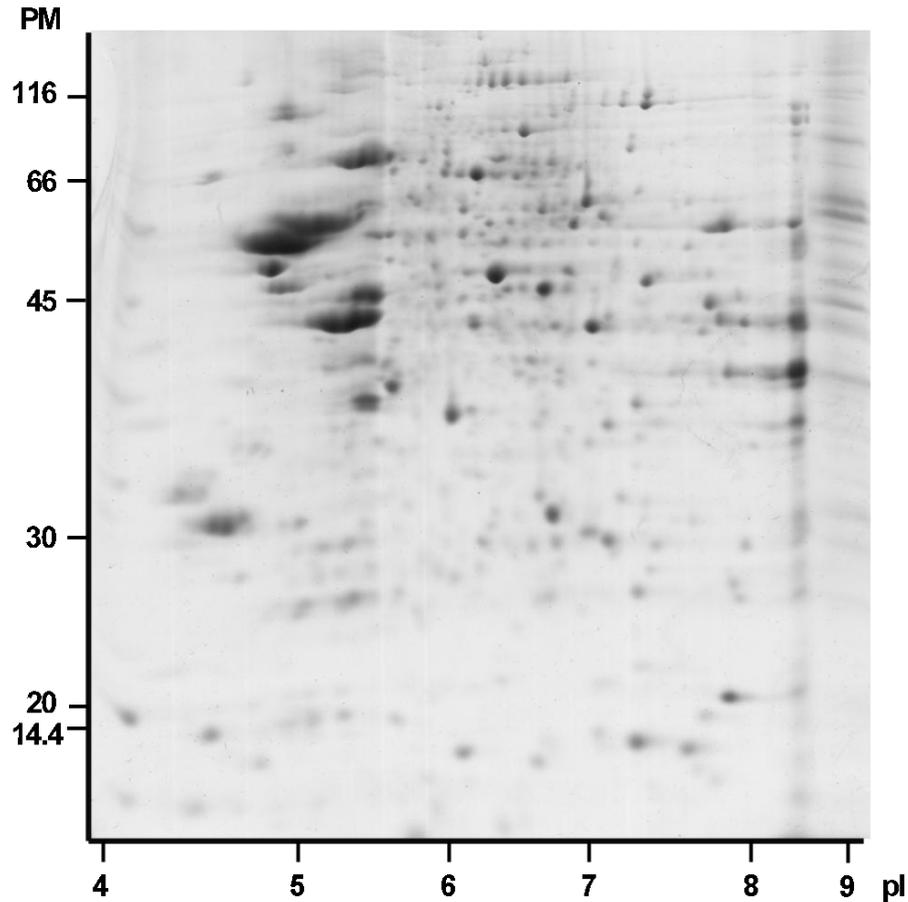


Figura 14: Gel bidimensional al 12%, de corteza visual de ratón control, teñido con Coomassie coloidal. Se cargó 50 μg de proteína total y se utilizó el protocolo 5 de isoelectroenfoque (IPGphor, Amersham). PM: peso molecular en kilo Daltons, pl: punto isoeléctrico. Gel representativo de 3 experimentos, realizados con muestras de 2 ratones.

Como se puede observar en la figura, la definición de los spots mejora por la disminución del ruido de fondo, claramente se ve un mayor número de spots. Los mismos se observan bien delimitados en forma circular distribuidos en la superficie del gel.

Por lo tanto, el protocolo seleccionado para el análisis de las muestras de ratones tratados o no con fluoxetina fue el protocolo n° 5 (descrito en materiales y métodos) y la tinción de Coomassie coloidal.

8.2 Experimentos de proteómica diferencial entre muestras de ratones adultos tratados con fluoxetina y controles.

El segundo objetivo de este trabajo era la identificación de proteínas moduladas por el tratamiento crónico con fluoxetina en ratones adultos binoculares, para lo que era fundamental obtener geles 2D-PAGE de muestras proteicas de ratones adultos tratados y ratones adultos controles. Con estos geles se planificó llevar adelante una comparación utilizando el software de análisis de la imagen (Melanie 6.0, GeneBio) para identificar spots con niveles de intensidad óptica diferentes entre las dos condiciones. Luego, identificar por espectrometría de masa las proteínas correspondientes a dichos spots, que representan potenciales candidatos a la regulación de la plasticidad inducida por fluoxetina.

8.2.1 Electroforesis bidimensional.

Para los experimentos de electroforesis bidimensional se utilizaron muestras de corteza visual provenientes de un total de 6 animales, 3 animales controles (C1, C2, C3) y 3 tratados con fluoxetina (F1, F2, F3). En el primer experimento de 2D-PAGE (A) se realizaron 4 geles: dos con la misma muestra de control (C1) y dos con la misma muestra de tratado (F1) para evaluar la variabilidad intra-experimental. Se realizó posteriormente un nuevo experimento de 2D-PAGE (A') duplicado del experimento A, con el objetivo de verificar la reproductibilidad entre experimentos 2D-PAGE independientes. Se procedió de la misma forma para las muestras C2 y F2 (experimentos B y B'). Finalmente se realizó el experimento (C) con 4 geles: dos con la misma muestra de control (C3) y dos con la misma muestra de tratado (F3). De este modo, se obtuvieron 20 geles bidimensionales, 10 de control y 10 de fluoxetina, en los que se cargó 60 µg de proteína total y fueron coloreados con Coomassie coloidal.

En la figura 15 se muestran dos geles 2D de corteza visual de un ratón control y tratado, en la que se diferencia el patrón de distribución de spots de cada uno.

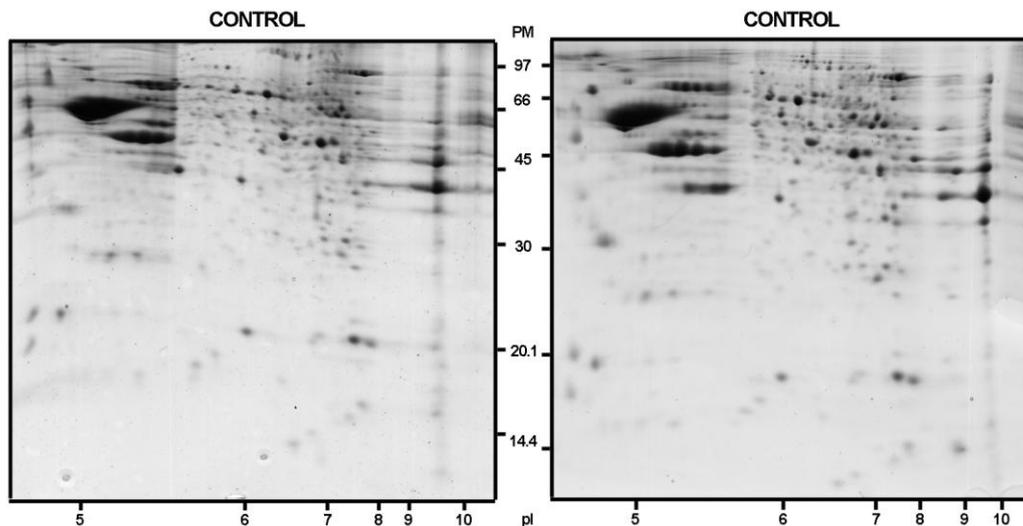


Figura 15: Geles bidimensionales al 12 %, de corteza visual de ratón control y tratado (60 μ g de proteína), teñidos con Coomassie coloidal. PM: peso molecular en kilo Daltons y pI, punto isoeléctrico. Geles representativos de 5 experimentos, realizados con muestras tres ratones controles.

La comparación visual de estos geles nos indica que el patrón de distribución de los spots es muy similar indicando que la metodología se implementó correctamente y que la variabilidad debida a esta es reducida. Para identificar diferencias en la coloración de spots entre las dos condiciones experimentales control y fluoxetina (fig. 16) se utilizó el programa Melanie 6.0 (GeneBio). En el panel de la figura 17 se pueden observar en mayor detalle algunas regiones de los geles, en donde están indicados spots con intensidad de coloración distinta entre las dos situaciones estudiadas. En algunos la intensidad de los spots es mayor en los paneles de control (spots n° 6, 7, 11, 12, 14 y 15, en rojo) y en otros es mayor en los paneles de tratado (spots n° 1-5, 8-10, 13 y 16, en rojo).

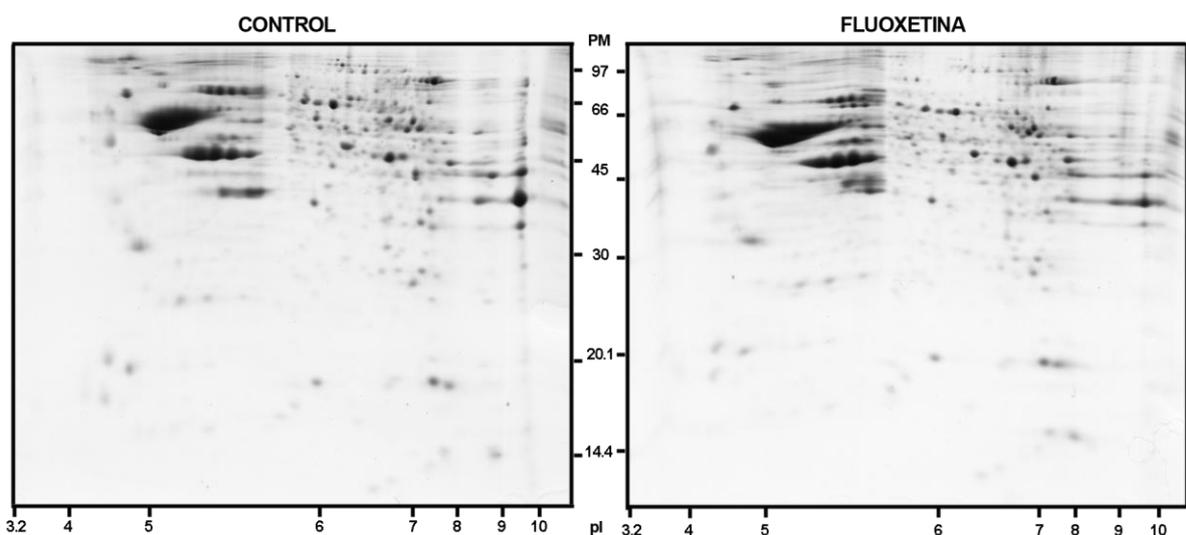


Figura 16: Geles bidimensionales al 12 %, de corteza visual de ratón control y tratado (60 μ g de proteína), teñidos con Coomassie coloidal. PM: peso molecular en kilo Daltons y pI, punto isoeléctrico. Geles representativos de 5 experimentos, realizados con muestras de tres ratones controles y tres ratones tratados con fluoxetina.

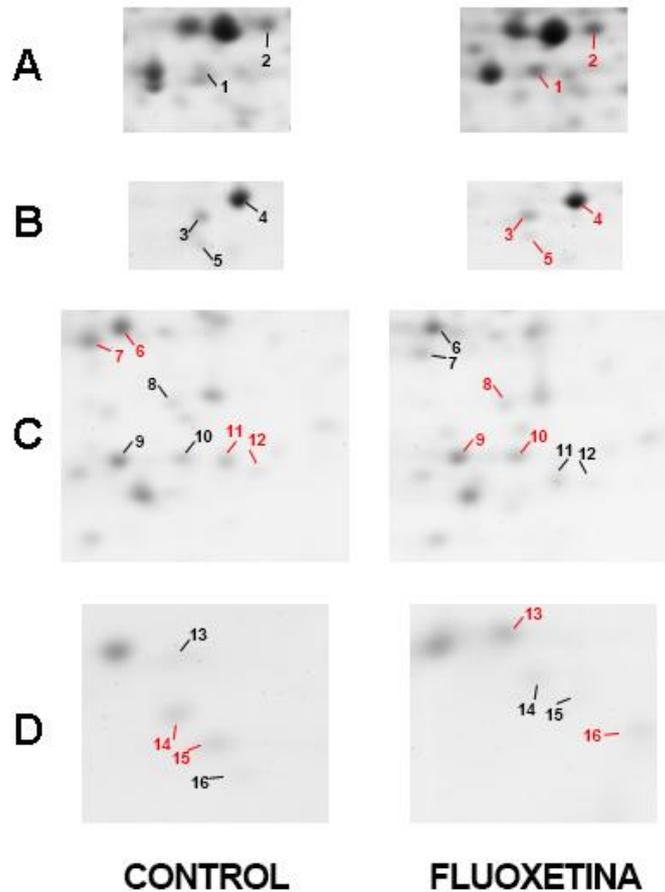


Figura 17: Se muestran cuatro recuadros A, B, C y D, detalle de las imágenes de geles bidimensionales de control y tratado mostradas en la fig. 15. En las cuatro regiones se indica con números algunos de los spots con diferencias entre la corteza visual de control y tratado. En rojo se indican los spots con mayor intensidad de coloración y en negro los que tienen menor intensidad.

El programa Melanie 6.0 permite la visualización tridimensional (3D) de los spots, una herramienta que se utilizó para facilitar la selección y comparación de los mismos. En la figura 18 se muestra la vista 3D de dos spots que se observaron antes (ver fig. 17 A). En ambos casos se observa una diferencia de intensidad, que es mayor en el gel del ratón tratado, con respecto al control.

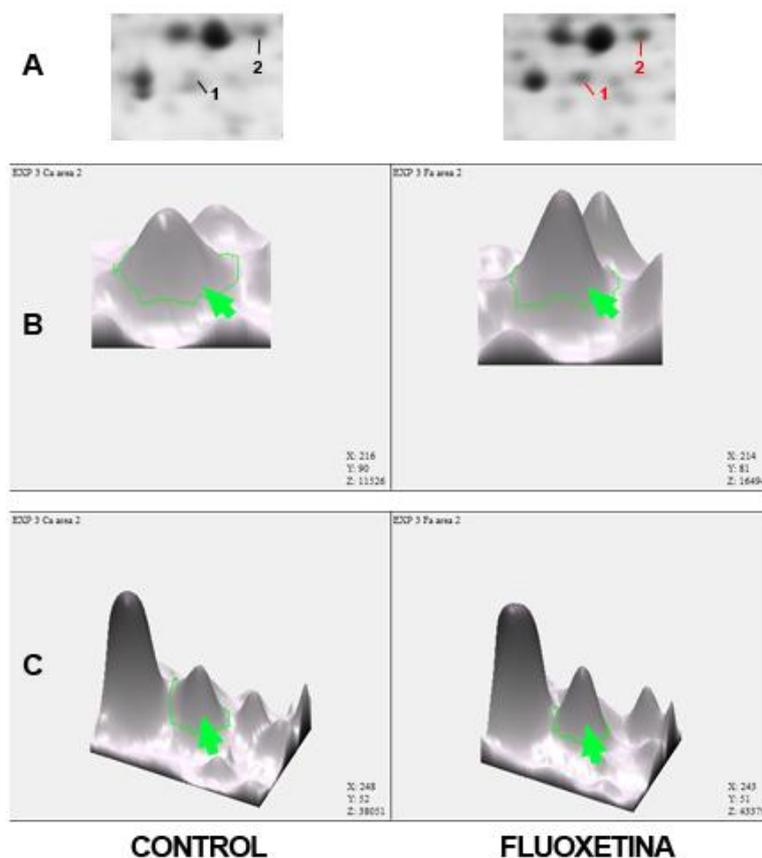


Figura 18: Vista tridimensional de spots obtenida con Melanie 6.0. En A el detalle de la región de los geles bidimensionales control y fluoxetina, donde se indican los dos spots. En B se observa la vista tridimensional del spot 1 y en C la del spot 2, ambos indicados con una flecha (en verde).

8.2.2 Análisis de imágenes, obtención de datos y estadística

Se procesaron las veinte imágenes obtenidas de los geles de control y de tratado, que fueron subdivididas en 6 áreas parcialmente superpuestas (ver fig.8) para ser analizadas como se mencionó previamente (ver sección 9 de Materiales y métodos). Para la detección automática de los spots se fijaron los tres parámetros ya descritos (ver tabla 4) y se analizaron 5 de las áreas subdivididas. El análisis identificó un número promedio de 342 spots/gel (entre 300 y 520 spots por gel). En la fase de “matching”, la comparación automática entre geles produjo un número promedio de 300 spots pareados/gel (entre 250 y 440 por gel), correspondiente a un 87.2 % de los spots identificados.

En esta fase del análisis no se utilizó el porcentaje de volumen de cada spot, por la gran variabilidad en el número de spots entre los geles. Por ello, para cada spot comparado se obtuvo una tabla de datos con el valor de la intensidad y del volumen para cada gel. Se utilizaron exclusivamente los valores de los spots representados en los tres grupos de experimentos, es decir provenientes de los 6 ratones utilizados. El número mínimo de valores por spot utilizado fue de 6 (tres de control y tres de tratado). A partir de los datos obtenidos en cada área, de intensidad y volumen, se realizó el

análisis estadístico para determinar cuáles spots presentaban una diferencia significativa entre las dos situaciones experimentales como se indicó anteriormente. En primer lugar se analizaron los datos crudos y posteriormente, los datos estandarizados respecto a los valores de control, utilizando las parejas de geles que fueron procesadas en conjunto. En el análisis de los datos crudos se estudiaron 350 spots y en el análisis de la estandarización respecto al control, 305 (sección 10 de materiales y métodos).

A partir de la integración de los resultados obtenidos de los datos crudos y estandarizados se obtuvo una lista de 53 spots que presentaban diferencias significativas entre los grupos experimentales. De estos se seleccionaron 39 spots eliminando los que estaban en el límite de la significancia (no convincentes), además de descartar aquellos cuya visibilidad era extremadamente baja/débil.

Para confirmar si los spots identificados en el análisis primario presentaban diferencias significativas se llevó adelante un análisis ulterior. Para esto se detectaron los 39 spots en las tres mejores parejas de geles, obtenidas de tres de los animales controles y 3 de los tratados con fluoxetina. Esto permitió utilizar como variable el porcentaje de Volumen que tiene en consideración variaciones debidas a diferencias en la carga proteica y en la tinción de los geles, y por ello es una medida más adecuada y confiable. A través de este estudio se confirmó la variación de 29 spots de los 39 identificados en el análisis primario (fig. 19), que fueron cortados y digeridos para su análisis por espectrometría de masa.

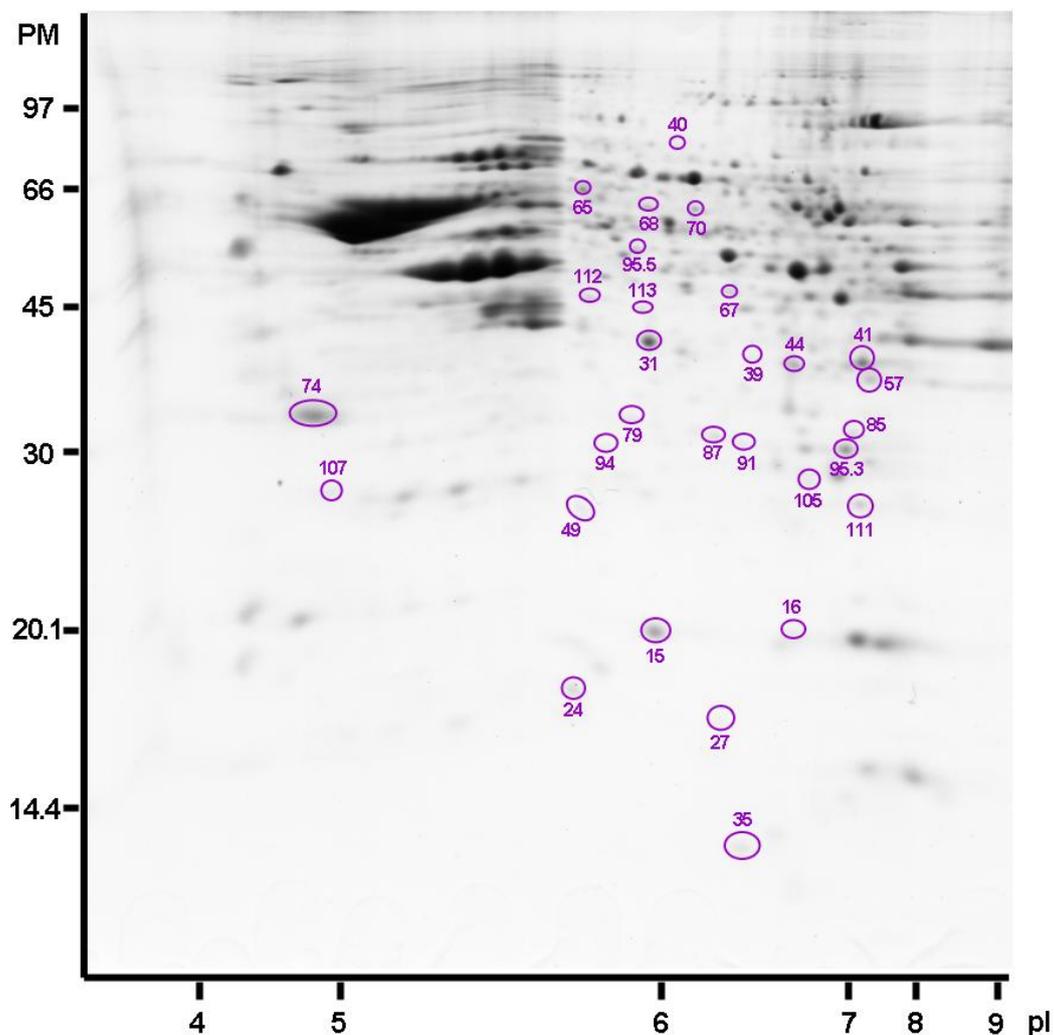


Figura 19: Gel bidimensional al 12%, de corteza visual de ratón (60 μg proteína), teñido con Coomassie coloidal. Se muestran los 29 spots que fueron enviados a analizar por espectrometría de masa. PM: peso molecular en kilo Daltons, y pI: punto isoeléctrico.

8.3 Espectrometría de masa

De los 29 spots que se expresaron diferencialmente, logamos identificar una proteína en 24 de ellos (tabla 5 y 6), lo que muestra un 83% de éxito en la metodología empleada. En aquellos que no pudo detectarse (5 spots) la razón posible fue la presencia de contaminación con queratina o la baja cantidad de material proteico presente en los spots. Además, dos proteínas fueron identificadas en dos spots cada una, por ende, como resultado de la espectrometría de masa se identificaron en total 22 proteínas diferentes, lo que corresponde a 1.1 spots por proteína.

A través del análisis estadístico se identificó que 12 de estas proteínas presentan un menor nivel en los ratones tratados con una disminución que va del 15 al 40% del valor de control (tabla 5),

mientras que 10 proteínas presentan un aumento del nivel en los ratones tratados que va del 20 al 90% (tabla 6).

Se obtuvieron los valores de peso molecular (PM) y de punto isoeléctrico (pI) teóricos de las 22 proteínas utilizando información obtenida en NCBI y se compararon con los valores de PM y pI correspondientes, determinados utilizando el programa Melanie 6.0 sobre los geles. En este estudio se observó que existe una diferencia entre estos valores que para el PM abarca un rango que va de 1.3 a 21 kDa, y para el pI de 0.01 a 2.72 unidades de pH. A continuación, para definir si las proteínas se comportan en la migración en los geles 2D de acuerdo a lo esperado teóricamente se definió un umbral de 8 kDa y 0.5 puntos de pI. De las 22 proteínas analizadas, 7 no presentan diferencias, 7 presentan diferencias en el pI, 6 en el PM, y 4 en ambos parámetros. Estas diferencias no son sorprendentes teniendo en cuenta que las proteínas en su ambiente celular sufren diferentes tipos de modificaciones postraduccionales, tales como el clivaje de secuencias específicas y la introducción de diversas modificaciones en residuos específicos (fosforilación de serinas, treoninas y tirosinas, acetilación de lisinas, entre otras). Todas estas modificaciones pueden alterar el pI y/o el PM de las proteínas.

Por otro lado, dos de las proteínas fueron identificadas en dos spots, la triosa isomerasa de fosfato (TPI) y la proteína canal selectiva a aniones dependiente de voltaje 1 (VDAC1). Para ambas proteínas la intensidad de la señal de los dos spots disminuyó en los animales tratados con fluoxetina. La TPI fue identificada en los spots nº 91 y 95.3 (fig. 19). Estos spots presentan un PM calculado (34 kDa) similar al teórico. En el caso del pI el spot 95.3 presenta un valor calculado de 7.0 similar al teórico, mientras que el spot 91 presenta un valor de pI de 6.3, menor al teórico. La proteína VDAC1 se identificó en los spots nº 57 y 94. Los valores teóricos de la VDAC1 son 30.7 kDa de PM y 8.62 de pI. Los valores calculados para el spot 57 son diferentes del teórico (40.7 kDa de PM y 7.3 de pI) mientras que para el spot 94, la proteína presenta un masa molecular similar a la teórica y un pI 2.72 unidades menor al teórico. Como mencionamos antes, estas diferencias pueden ser debidas a modificaciones postraduccionales en las proteínas que alteran su migración relativa en los geles, ya sea en la primera (pI) y/o en la segunda dimensión (PM). Podría ser interesante analizar este aspecto focalizándose en la búsqueda de modificaciones postraduccionales, por ejemplo utilizando otro tipo de espectrometría de masa más sensible u otras metodologías.

Tabla 5: Proteínas con menor nivel en CV de ratones tratados con fluoxetina identificadas por espectrometría de masa.

Spot	ID	Proteína	Score	F/C ± SEM	pI	PM (kDa)	Localización	Proceso biológico
15	AAA40121	Superóxido dismutasa 1, Cu/Zn (SOD1)	57	0.76±0.07	6.23	15.7	CP/MIT	SI/R
16	AAA39826	Proteína asociada al proceso de tumor metastásico NM23, parcial (NM23)	86	0.73±0.06	8.44	18.6	CP/NU	M
31	AAA37423	Malato deshidrogenasa citoplásmica (MDH1)	194	0.65±0.14	6.16	36,4	CP	M
41	AAH05509	L-Lactato deshidrogenasa A, parcial (LDHA)	92	0.81±0.07	8.18	34,4	CP	M
44	EDL35843	Esterasa D, hidrolasa de S-formil-glutatión, isoforma CRA_b (ESD)	204	0.81±0.05	8.27	33,1	CP/VES	M
49	NP_001230698	Proteína de control de la división celular 42 (Cdc42)	146	0.80±0.05	6.73	21.2	MPL/CQ	SI/OC
57	NP_035824	proteína de canal selectiva a aniones dependiente de voltaje 1 (VDAC1)	129	0.62±0.12	8.62	30,7	MPL/ MMIT	SI
65	NP_031978	proteína precursora de la isomerasa de disulfuro A3 (PDIA3)	186	0.70±0.01	5.88	56.6	RE/MEL	M/R
68	--	No identificada	--	0.85±0.06	--	--	--	--
70	NP_058662	D-3- fosfoglicerato deshidrogenasa (PHGDH)	197	0.80±0.04	6.12	56.5	CP	M
74	EDL08815	proteína de activación tirosina 3-monooxigenasa/triptófano 5-monooxigenasa, polipéptido zeta, isoforma CRA_b (14-3-3 zeta/delta)	323	0.83±0.12	4.71	29	CP/MEL/ NU/MIT	SI
91	CAA37420	triosa fosfato isomerasa (TPI)	150	0.75±0.09	6.90	26.6	CP	M
94	NP_035824	proteína de canal selectiva a aniones dependiente de voltaje 1 (VDAC1)	132	0.61±0.06	8.62	30.7	MPL/ MMIT	SI
95.3	CAA37420	triosa fosfato isomerasa (TPI)	306	0.86±0.02	6.90	26.6	CP	M
105	BAE22828	subunidad alfa 2 del proteasoma (PSMA2)	103	0.78±0.04	8.31	27.4	CP/NU/ PSA	DP

Todas las proteínas fueron identificadas en *Mus musculus*. Se indica el número de spot y el número de identificación de cada proteína según la base de datos del NCBI. Luego, el score de Mascot (probabilidad de que la correspondencia entre los péptidos obtenidos y una proteína sea un evento casual ($-10 \cdot \log_{10}(P)$), donde P es la probabilidad absoluta), el promedio del cociente de los valores de fluoxetina y de control por spot \pm SEM. Se indica el proceso biológico en el que intervienen. M: metabolismo, SI: señalización intracelular, DP: degradación proteica, R: regulación del estado redox, OC: organización del citoesqueleto. Se indica la localización subcelular de las proteínas; CP: citoplasma, VES: vesículas, MPL: membrana plasmática, MMIT: membrana mitocondrial, MEL: melanosomas, NU: núcleo, MIT: mitocondria, PSA: proteasoma, CQ: citoesqueleto, RE: retículo endoplásmico.

Tabla 6: Proteínas con mayor nivel en CV de ratones tratados con fluoxetina, identificadas por espectrometría de masa.

Spot	ID	Proteína	Score	F/C ± SEM	pI	PM (kDa)	Localización	Proceso biológico
24	NP_062283	profilina 2 (PFN2)	186	1.43 ± 0.21	6.55	15	CQ	OC/E
27	NP_032274	proteína de unión a nucleótido de las triadas de histidina 1 (HINT1)	57	1.61 ± 0.11	6.36	13.7	CP/NU	SI
35	NP_080832	cadena liviana de la dineína 2 (DYN2)	65	1.37 ± 0.21	6.81	10.3	CQ	T
39	--	No identificada	--	1.38 ± 0.13	--	--	--	--
40	--	No identificada	--	1.68 ± 0.40	--	--	--	--
67	AAH47530	proteína relacionada a la actina 2, parcial (ARP2)	109	1.88 ± 0.26	6.31	44.6	CQ	OC/T
79	--	No identificada	--	1.44 ± 0.09	--	--	--	--
85	NP_077198	enzima dihidropteridina reductasa quinoide (QDPR)	99	1.45 ± 0.31	7.67	25.5	CP/MIT	M/R
87	NP_036098	Subunidad alfa 6 del proteasoma (PSMA6)	116	1.52 ± 0.20	6.34	27.3	CP/NU/PSA	DP
95.5	--	No identificada	--	1.18 ± 0.11	--	--	--	--
107	NP_033455	proteína tumoral traduccionalmente controlada (TCTP)	66	1.34 ± 0.06	4.76	19.4	CP	SI/OC
111	AAH18173	superóxido dismutasa 2, parcial (SOD2)	148	1.90 ± 0.30	8.67	24	MIT	M/SI/R
112	NP_080543	“adaptin ear-binding coat-associated protein 1” (NECAP1, proteína adaptadora)	120	1.89 ± 0.38	5.97	29.6	MPL/MVES	T/E
113	NP_620087	Proteína activadora de la serina-treonina fosfatasa 2A (PTPA)	66	1.82 ± 0.28	5.95	36.6	CP/NU	SI

Todas las proteínas fueron identificadas en *Mus musculus*. Se indica el número de spot y el número de identificación de cada proteína según la base de datos del NCBI. Luego, el score de Mascot (probabilidad de que la correspondencia entre los péptidos obtenidos y una proteína sea un evento casual ($-10 \cdot \log_{10}(P)$, donde P es la probabilidad absoluta), el promedio del cociente de los valores de fluoxetina y de control por spot ± SEM. Se indica el proceso biológico en el que intervienen, OC: organización del citoesqueleto, T: transporte, M: metabolismo, R: regulación del estado redox, DP: degradación proteica, SI: señalización intracelular, E: endo/exocitosis. Se indica la localización subcelular de las proteínas; CQ: citoesqueleto, CP: citoplasma, MIT: mitocondria, NU: núcleo, PSA: proteasoma, MPL: membrana plasmática, MVES: membrana de vesículas de clatrina.

8.4 Análisis bioinformático

Para obtener más información sobre las proteínas identificadas en el estudio de proteómica diferencial se llevó adelante un análisis bioinformático utilizando varias bases de datos (NCBI, Uniprot, String y Panther). A través de este análisis se recaudó principalmente información sobre la localización subcelular, el proceso biológico en el cual estas proteínas están implicadas y la función general. Recordamos que para este análisis se utilizó exclusivamente información obtenida de trabajos experimentales identificables y publicados (detalles en Materiales y Métodos). A continuación una breve descripción de las 22 proteínas identificadas.

Proteínas identificadas por espectrometría de masa.

ARP2 (proteína relacionada a la actina 2): Localización, citoesqueleto - Procesos Biológicos, organización del citoesqueleto/transporte.

ARP2 forma parte de un complejo proteico denominado Arp2/3 compuesto por dos proteínas relacionadas con la actina (ARP2 y 3) y otras cinco proteínas ARPC1, 2, 3, 4 Y 5. El complejo Arp2/3 contacta el extremo del filamento de actina y junto con un factor promotor de la nucleación media la formación de ramas de actina sobre el filamento, esto produce redes de actina, con bifurcaciones como resultado de la formación de ramas (Kessels et al., 2011).

Cdc42 (proteína de control de la división celular 42): Localización, citoesqueleto/membrana plasmática - Procesos Biológicos, organización del citoesqueleto/señalización intracelular.

Es una GTPasa de la familia de las GTPasas Rho, que participa en varias vías de señalización intracelular. Su rol como proteína reguladora de la actina es particularmente interesante, ya que activa vías de señalización mediadas por quinasas, que provocan cambios del citoesqueleto de actina e inducen la activación de factores de transcripción dentro del núcleo. Cdc42 actúa en procesos celulares tales como el crecimiento polarizado, la morfogénesis y también la migración celular (Schmitz et al., 2000, Auer et al., 2011).

PFN2 (profilina 2): Localización, citoesqueleto/membrana plasmática – Procesos Biológicos, organización del citoesqueleto/exo / endocitosis.

Tiene la capacidad de unirse a monómeros de actina (actina G o globular) y a polifosfoinosítidos de la membrana, modulando el proceso de polimerización de la actina (Pollard et al., 2000). Además, la profilina desempeña un papel esencial en la formación de redes de filamentos

de actina ramificada, mediante la activación de WASP a través de la unión a su dominio central rico en prolina.

NECAP1 (“**adaptin ear-binding coat-associated protein 1**”): Localización, membrana plasmática/membrana vesicular – Procesos Biológicos, transporte/exo / endocitosis.

Es una proteína que participa directamente en el proceso de endocitosis mediado por clatrina junto a otras proteínas como AP1G1, AP2A1 componentes de los complejos adaptadores AP-1 y AP-2 (Ritter et al., 2003, McPherson and Ritter, 2005).

DYN2 (**cadena liviana de la dineína 2**): Localización, citoesqueleto – Procesos Biológicos, transporte.

Es uno de los componentes accesorios no catalíticos del complejo de dineína 1 citoplasmática, que actúa como un motor para la motilidad retrógrada intracelular de vesículas y organelos a lo largo de los microtúbulos, y además puede jugar un papel en el cambio o en el mantenimiento de la distribución espacial de las estructuras del citoesqueleto. A nivel sináptico estos procesos han sido asociados a la fisiología, desarrollo y patología cerebral (Hirokawa et al., 2010, Fainzilber et al., 2011, Park et al., 2011, van den Berg and Hoogenraad, 2012).

HINT1 (**proteína de unión a nucleótido de las triadas de histidina 1**): Localización, citoplasma/núcleo - Procesos Biológicos, señalización intracelular.

También llamada proteína de interacción de la PKC 1 (“Protein kinase C-interacting protein 1”, PKCI-1) es una proteína de la superfamilia de las triadas de histidina (HIT), compuesta por hidrolasas y transferasas de nucleótido (Brenner, 2002). Es una proteína que está presente en varios tejidos incluyendo el sistema nervioso (Liu et al., 2008), en el cual interactúa con el receptor opioide Mu (MOR) (Rodríguez-Muñoz et al., 2011).

VDAC1 (**proteína de canal selectiva a aniones dependiente de voltaje 1**): Localización, membrana plasmática/membrana mitocondrial – Procesos Biológicos, señalización intracelular.

Pertenece a la familia de pequeñas proteínas que forman poros en la membrana mitocondrial externa de todos los eucariotas, donde permite la difusión de pequeñas moléculas hidrofílicas, y recientemente ha sido identificada también en la membrana plasmática, donde está involucrada en la regulación del volumen celular y la apoptosis (Buettner et al., 2000, Graham et al., 2010). Las proteínas VDAC juegan un rol importante en el flujo de metabolitos entre el citosol y el compartimento mitocondrial. Varias isoformas han sido asociadas a distintos procesos biológicos

desde la apoptosis, la plasticidad sináptica, la bioenergética muscular y la reproducción (Okada et al., 2004, Ujwal et al., 2008, Graham et al., 2010).

PTPA (proteína activadora de la serina-treonina fosfatasa 2A): Localización, citoplasma – Procesos Biológicos, señalización intracelular.

Posee actividad de isomerasa peptidil-prolil cis/trans, y cataliza la isomerización cis/trans de los enlaces peptídicos imídicos de prolina en oligopéptidos, por lo que acelera el plegamiento de las proteínas. Actúa como una subunidad reguladora de la proteína serina/treonina fosfatasa 2A (PP2A) modulando su actividad o su especificidad al sustrato, mediante la inducción de un cambio conformacional en la subunidad catalítica (Chao et al., 2006).

14-3-3 zeta/delta (proteína de activación tirosina 3-monooxigenasa/triptófano 5-monooxigenasa): Localización, citoplasma/mitocondria/núcleo/melanosoma - Procesos Biológicos, señalización intracelular.

Forma parte de un grupo de proteínas 14-3-3 que es muy abundante en el cerebro de los mamíferos y se une a los sitios fosforilados de muchas proteínas, modulando de este modo la acción de las proteínas implicadas en el ciclo celular y el control de la transcripción, la transducción de señales, el tráfico intracelular, y la regulación de los canales iónicos (Berg et al., 2003).

SOD1 (superóxido dismutasa 1): Localización, citoplasma/mitocondria – Procesos Biológicos, redox.

Es una proteína involucrada en el metabolismo oxidativo, que cataliza la conversión de radicales libres como el superóxido (anión) en oxígeno molecular en el citoplasma celular, disminuyendo sus efectos tóxicos en la célula. Defectos en el gen de SOD1 en humanos causan esclerosis lateral amiotrófica (ELA) una enfermedad neurodegenerativa familiar (Rosen et al., 1993).

SOD2 (superóxido dismutasa 2): Localización, mitocondria – Procesos Biológicos, metabolismo/señalización intracelular/redox.

Otra enzima que también está relacionada con el control del metabolismo oxidativo y se encarga de eliminar radicales libres (como el superóxido) a nivel mitocondrial.

MDH1 (malato deshidrogenasa): Localización, citoplasma – Procesos Biológicos, metabolismo.

Es una enzima que cataliza la reacción de oxidación del (S)-malato a oxalacetato utilizando NAD^+ como aceptor de electrones y participa de la regulación del metabolismo celular.

TPI (triosa fosfato isomerasa): Localización, citoplasma – Procesos Biológicos, metabolismo.

La TPI es una enzima de la vía glicolítica que cataliza la conversión reversible de gliceraldehído-3-fosfato en dihidroxiacetona fosfato, por lo que juega un rol importante en varias vías metabólicas, siendo esencial en la producción de energía.

ESD (esterasa D, hidrolasa de S-formil-glutación): Localización, citoplasma/vesículas – Procesos Biológicos, metabolismo.

Es una serina-hidrolasa involucrada en la detoxificación de formaldehído, que tiene actividad de hidrolasa y carboxilesterasa.

LDHA (L-Lactato deshidrogenasa A): Localización, citoplasma – Procesos Biológicos, metabolismo.

Es una enzima que cataliza la conversión de L-lactato y NAD^+ a piruvato y NADH en la glicólisis anaeróbica. Se encuentra predominantemente en el tejido muscular, y se han encontrado múltiples transcriptos que codifican distintas isoformas (Pretsch et al., 1998, Kaundal and Sharma, 2011). Mutaciones en este gen han sido asociadas con anemia hemolítica y muerte temprana en ratones (Pretsch et al., 1993, Rathour et al., 1997).

PHGDH (D-3- fosfoglicerato deshidrogenasa): Localización, citoplasma – Procesos Biológicos, metabolismo.

Es una enzima de la familia de las oxido-reductasas, que está involucrada en el primer paso de la vía de la biosíntesis de L-serina a partir del 3-fosfo-glicerato (Ichihara and Greenberg, 1955, Snell, 1984). La deficiencia de esta enzima causa un decremento del nivel de serina libre, glicina, taurina, GABA, glutamina y treonina en la médula espinal y la cabeza. Esta deficiencia produce defectos del sistema nervioso central, que presenta un tubo neural más corto, un retraso del crecimiento general, y un atrofia a nivel de la médula espinal torácica (Kawakami et al., 2009).

PDIA3 (proteína precursora de la isomerasa de disulfuro A3): Localización, retículo endoplásmico/melanosoma – Procesos Biológicos, metabolismo/redox.

Pertenece a la familia de las proteínas isomerasas de disulfuro. Es una enzima que cataliza la formación de los puentes disulfuro entre los residuos de cisteína (actividad oxido-reductasa), permitiendo el correcto plegamiento de la proteína en cuestión (actividad chaperona). En la célula se encuentra principalmente en el retículo endoplásmico y en los melanosomas.

QDPR (enzima dihidropteridina reductasa quinoide): Localización, citoplasma/mitocondria – Procesos Biológicos, metabolismo/redox.

Cataliza la reacción de A 5, 6, 7, 8-tetrahidropteridina a 6,7-dihidropteridina, utilizando NAD⁺ ó NADP⁺ como aceptor de electrones. De esta forma, participa en la biosíntesis de aminoácidos y de ácido fólico, siendo la tetrahidrobiopterina (BH-4) un cofactor esencial para las enzimas hidroxilasas de tres aminoácidos aromáticos: la fenilalanina, la tirosina, y el triptófano (Dianzani et al., 1998). Además, BH-4 es utilizado en la degradación de fenilalanina y en la biosíntesis de los neurotransmisores como la serotonina, la melatonina, la dopamina, la noradrenalina, la adrenalina, y también es un cofactor de las sintasas de óxido nítrico para la producción de óxido nítrico (NO) (Turner et al., 1974, Gorren and Mayer, 2002).

PSMA2 y PSMA6 (subunidades alfa 2 y alfa 6 del proteasoma): Localización, citoplasma/núcleo/proteosoma – Procesos Biológicos, degradación proteica.

El proteasoma es un complejo de proteínas multicatalítico que se caracteriza por su capacidad para escindir los enlaces peptídicos con alta especificidad. Este tiene una actividad proteolítica dependiente de ATP y se compone de un núcleo de proteasoma 20S y dos subunidades reguladoras 19S. La PSMA2 presenta fosforilaciones en residuos de tirosina, que pueden ser importantes para la importación nuclear y puede tener un efecto regulador potencial en otro u otros componentes del complejo del proteasoma, a través de la fosforilación de otras tirosinas (Gomes et al., 2006).

TCTP (proteína tumoral traduccionalmente controlada): Localización, citoplasma – Procesos Biológicos, organización citoesqueleto/señalización intracelular.

Participa en la unión del calcio y la estabilización de los microtúbulos y pertenece a la familia TCTP. Parece interactuar consigo misma y también interactúa con STEAP3. Es una proteína sintetizada en las células en la fase temprana de crecimiento del tumor ascítico de Ehrlich (Bohm et al., 1989).

NM23 (proteína asociada al proceso de tumor metastásico NM23): Localización, citoplasma – Procesos Biológicos, metabolismo.

Tiene un papel importante en la síntesis de nucleósidos trifosfatos distintos del ATP. La NM23 posee actividad nucleósido-di-fosfato quinasa, proteína serina/treonina quinasa específica, geranilo y pirofosfato de farnesilo quinasa, proteína-histidina quinasa y 3'-5'exonucleasa. Está implicada en la proliferación celular, la diferenciación y el desarrollo, la transducción de señales,

endocitosis de receptor acoplado a la proteína G, y la expresión génica. Se requiere para el desarrollo neuronal incluyendo patrones neurales y la determinación del destino celular (Lombardi and Mileo, 2003, Postel, 2003).

Localización subcelular

En este análisis se identificaron 11 categorías distintas de localización subcelular. En la Tabla 7 se indica la lista de proteínas pertenecientes a cada categoría y en la figura 20 se muestra el porcentaje que representa cada categoría respecto al total.

Tabla 7: Se indica el número de proteínas comprendidas dentro de las categorías de localización subcelular y el nombre de cada una de ellas.

Localización (n=11)	Citoplasma	Núcleo	Citoesqueleto	Mitocondria	Membrana plasmática	Proteasoma	Melanosoma	Membrana vesicular	Vesículas	Membrana mitocondrial	Reticulo endoplásmico
n proteínas (n=39)	14	6	4	4	3	2	2	1	1	1	1
Proteínas	QDPR PSMA6 TCTP HINT1 PTPA MDH1 LDHA ESD 14-3-3z/d TPI PSMA2 SOD1 NM23 PHGDH	PSMA6 HINT1 PTPA 14-3-3z/d PSMA2 NM23	ARP2 PFN2 DYN2 Cdc42	QDPR SOD1 SOD2 14-3-3z/d	NECAP1 VDAC1 Cdc42	PSMA6 PSMA2	14-3-3z/d PDIA3	NECAP1	ESD	VDAC1	PDIA3

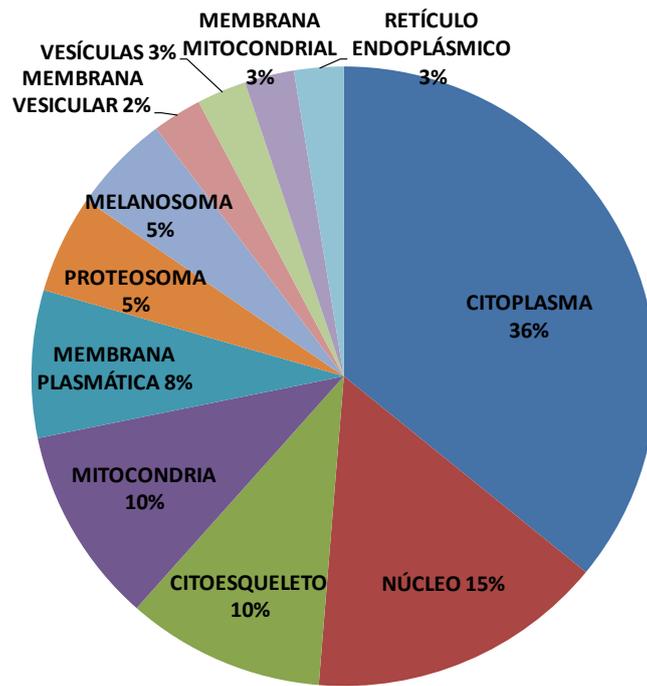


Figura 20: el gráfico muestra la distribución porcentual de las categorías relativas a la localización subcelular clasificadas en función del número de proteínas pertenecientes a cada categoría.

Procesos biológicos

Las proteínas fueron asignadas a 7 categorías distintas de procesos biológicos en los que participan. En la Tabla 8 se indica la lista de proteínas pertenecientes a cada categoría y en la figura 21 se muestra el porcentaje que representa cada categoría respecto al total.

Tabla 8: se indica el número de proteínas comprendidas dentro de las categorías de procesos biológicos y el nombre de cada una de ellas.

Proceso biológico (n=7)	Metabolismo	Señalización intracelular	Organización del citoesqueleto	Transporte	Redox	Exo / Endocitosis	Degradación proteica
n proteínas (n=32)	9	8	4	3	4	2	2
Proteínas	QDPR MDH1 LDHA ESD TPI NM23 PDIA3 PHGDH SOD2	Cdc42 TCTP HINT1 PTPA 14-3-3 zeta/delta SOD2 VDAC1 SOD1	ARP2 PFN2 Cdc42 TCTP	ARP2 NECAP1 DYN2	SOD2 SOD1 PDIA3 QDPR	PFN2 NECAP1	PSMA6 PSMA2

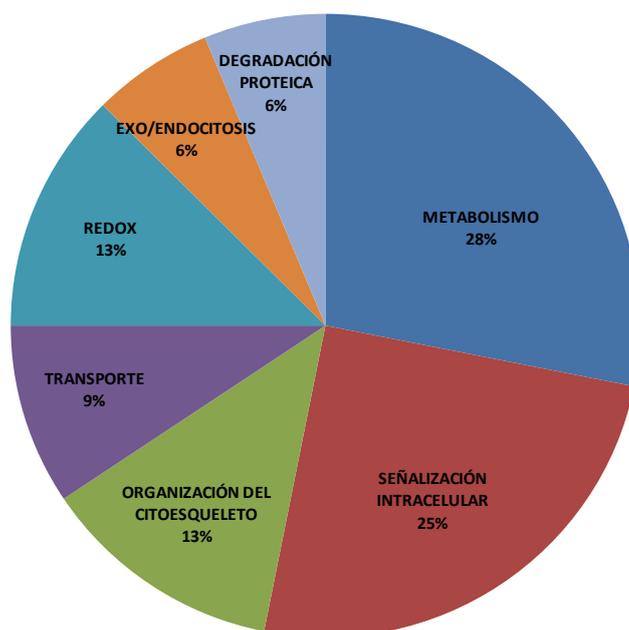


Figura 21: el gráfico muestra la distribución porcentual de las categorías relativas a los procesos biológicos clasificadas en función del número de proteínas pertenecientes a cada categoría.

8.5 Análisis por Western blot

Con el fin de convalidar las diferencias de intensidad óptica entre spots de los geles de controles y de fluoxetina, identificadas utilizando el análisis de la imagen, se decidió realizar experimentos de Western blot. Hasta el momento se logró convalidar la modulación de dos de las proteínas identificadas por espectrometría de masa. En particular, se realizaron Western blot utilizando anticuerpos contra SOD1 y contra SOD2. Se utilizó también el anticuerpo anti actina (Sigma) para normalizar los valores de SOD1 y SOD2 a los de una proteína de control. Los resultados preliminares (muestras de 3 ratones controles y 3 tratados, realizados en duplicado) indican que la señal de SOD1 disminuye aprox. en un 40%, en la corteza visual de los animales tratados con fluoxetina en comparación con los controles, mientras que la señal de SOD2 aumenta aprox. en un 35% (figura 22). En conclusión, los datos obtenidos por Western blot confirman los datos obtenidos utilizando el análisis de la imagen, es decir una disminución de la señal para SOD1 y un aumento para SOD2 en los animales tratados con fluoxetina respecto a los controles (ver Tabla 5 y 6).

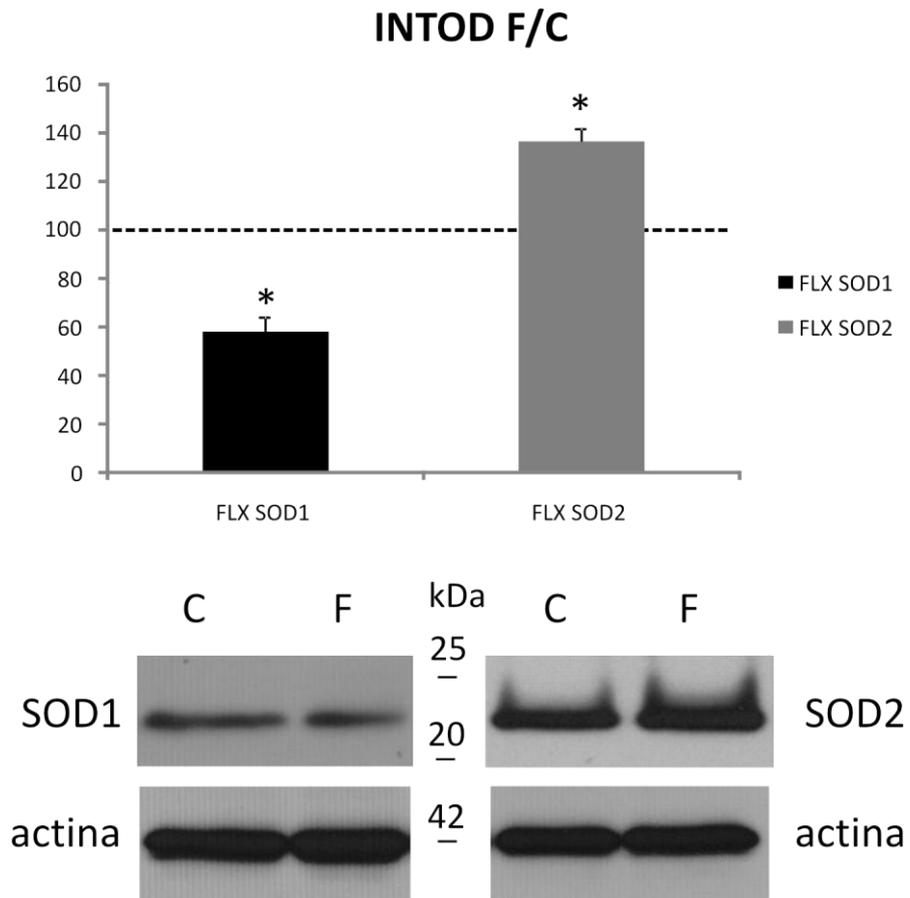


Figura 22: El gráfico en el panel superior indica el promedio de la densidad óptica integrada de SOD1 y SOD2 (relativo a actina) en animales tratados normalizado a los controles, \pm el SEM. La línea punteada indica el 100% correspondiente a la señal obtenida en los animales controles. Los asteriscos indican diferencias significativas según el test U de Mann Whitney para un $p < 0.05$. En el panel inferior se muestran dos imágenes representativas del Western blot de SOD1 y SOD2 para 2 muestras de CV1 de control (C) y tratado (F) respectivamente y el control de carga con actina para cada uno (se utilizaron muestras de 3 ratones controles y 3 ratones tratados con fluoxetina, realizando cada experimento por duplicado).

9. Análisis cromatográfico por HPLC: efectos neuroquímicos de la fluoxetina.

La fluoxetina es un antidepresivo que pertenece a la clase de Inhibidores Selectivos de la Recaptación de Serotonina (ISRS). Este fármaco determina un aumento de la concentración de serotonina en biofase a nivel de las presinapsis serotoninérgicas, pero también de otros neuromoduladores como la noradrenalina y la dopamina.

Durante esta Tesis decidimos empezar un estudio con el fin de caracterizar los efectos neuroquímicos del tratamiento crónico con fluoxetina, midiendo los niveles tisulares de serotonina, dopamina y sus respectivos metabolitos en la corteza parietal de ratones tratados y controles cuyas cortezas visuales se utilizaron para los experimentos de proteómica. Este trabajo inicial se realizó con el apoyo de J. A. Abin del Departamento de Neuroquímica del Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable mediante la técnica de cromatografía líquida de alta resolución con detección electroquímica.

Los datos obtenidos (datos en la Tabla 9 y gráfico en la Fig. 23) son preliminares, dado que el número de muestras con el que se realizó el análisis fue reducido (n=4 animales controles y n=3 animales tratados), y estos presentaron un alta variabilidad. No obstante se puede observar una reducción significativa de los niveles de 5HT y de 5HIAA ($p=0.015$) en los animales tratados con fluoxetina respecto a los controles. La razón entre 5HIAA y 5HT, indicativo del recambio de serotonina, también muestra un aumento leve en los animales tratados respecto a los controles. Mientras que los datos de dopamina y sus metabolitos no presentaron mayores diferencias entre ambos grupos experimentales.

Tabla 9: Efecto neuroquímicos del tratamiento con fluoxetina hidrocloreuro en la acumulación de DOPAC, DA, HVA, 5HT y 5HIAA en ratones adultos.

Tratamiento	N	DA	%	DOPAC	%	HVA	%	5HT	%	5HIAA	%	5HIAA/5HT	%
Control	4	675±336	100	118±24	100	149±19	100	1490±127	100	272±16	100	0.18±0.02	100
Fluoxetina	3	561±310	83	118±24	117	115±27	77	732±111	49	191±2	70	0.28±0.05	150

Se indica la media ± el SEM en ng/g de tejido. DA: dopamina, DOPAC: ácido 3,4-dihidroxifenilacético, HVA: ácido homovanílico, 5HT: serotonina, 5HIAA: ácido 5-hidroxi-indolacético, 5HIAA/5HT: razón entre 5HIAA y 5HT.

Acumulación de metabolitos

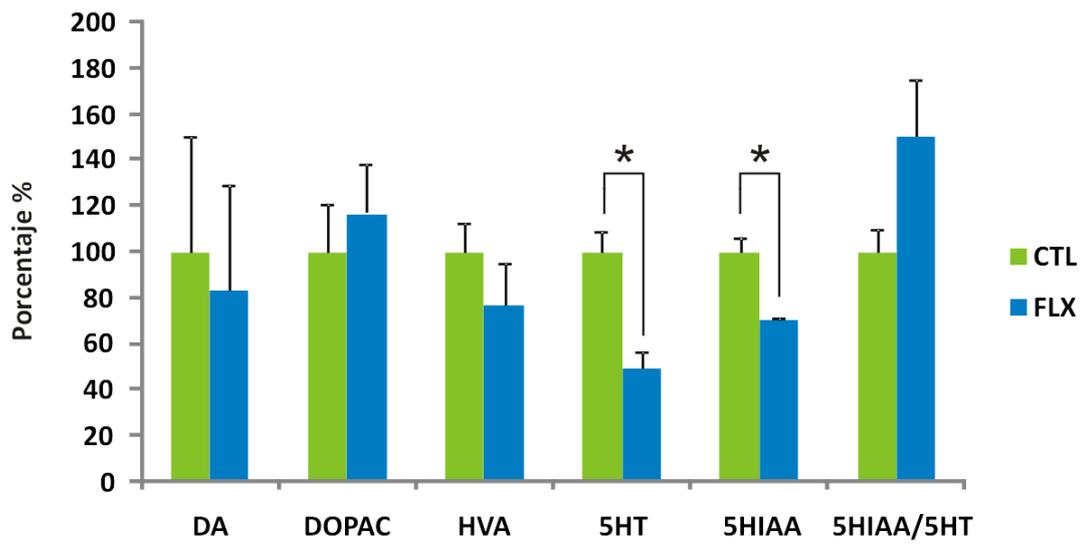


Figura 23: El gráfico muestra el porcentaje promedio de acumulación de los metabolitos de la dopamina y de la serotonina \pm el SEM, en la corteza parietal de ratones controles (n=4) y tratados con fluoxetina (n=3), normalizado al valor de control. DA: dopamina, DOPAC: ácido 3,4-dihidroxifenilacético, HVA: ácido homovanílico, 5HT: serotonina, 5HIAA: ácido 5-hidroxi-indolacético, 5HIAA/5HT: razón entre 5HIAA y 5HT. Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas según el test t de student, con un $p < 0.05$.

10. Discusión

Esta tesis se enmarcó en un proyecto aún en curso cuyo objetivo general es identificar nuevas proteínas candidatas a la regulación de los procesos de plasticidad en la corteza visual de ratón. Como modelo experimental elegimos el tratamiento crónico con fluoxetina, ya que fue demostrado que éste reactiva la plasticidad en la corteza visual de animales adultos.

Para alcanzar este objetivo utilizamos una aproximación de proteómica diferencial que consiste en separar las muestras de interés a través de electroforesis bidimensional, seleccionar los spots que presentan niveles diferentes entre las condiciones de interés e identificar las proteínas por espectrometría de masa. Durante esta tesis logramos identificar 22 proteínas candidatas a la regulación de la plasticidad cortical. Más adelante pretendemos probar *in vivo* el rol de algunas de estas proteínas en los procesos de plasticidad. Para ello se prevé modular *in vivo* la expresión de una proteína (por farmacología, transgénesis u otro) y verificar los efectos de la PM sobre las clases de dominancia ocular por electrofisiología y sobre la agudeza visual como parámetros clásicos de plasticidad cortical.

10.1 Puesta a punto de la metodología de proteómica diferencial

En este trabajo, con el fin de obtener una muestra proteica de buena calidad, se aportaron varias modificaciones al protocolo de extracción proteica y de tinción utilizado inicialmente, logrando así un protocolo optimizado para la preparación de muestras de corteza visual de ratón. En lo que concierne a la puesta a punto del IEF, se puede concluir que el protocolo más adecuado para separar una carga proteica de 10 µg y obtener un patrón de spots bien separado es el nº 1 utilizando la tinción con nitrato de plata para su coloración, mientras que para separar una carga de 50 o 60 µg de proteína el protocolo más adecuado es el nº 5 utilizando la tinción de Coomassie coloidal que da lugar a un menor ruido de fondo. En conclusión el primer objetivo de la tesis fue alcanzado, la puesta a punto de la metodología de proteómica (2D-PAGE) aplicable a nuestras muestras. El punto de partida para la realización de los estudios de proteómica diferencial. La metodología más novedosa hoy en día para estudios de este tipo es la "Difference Gel Electrophoresis" (DIGE), que consiste en marcar previamente las dos muestras a comparar con dos fluoróforos distintos y cargarlas en el mismo gel. Este método disminuye la variabilidad entre geles y permite una cuantificación relativa gracias a la presencia de una tercera muestra marcada con un tercer fluoróforo distinto que se utiliza como estándar de normalización (Van den Bergh and Arckens, 2004). Desafortunadamente

esta metodología no está aún disponible en el Uruguay. Por esta razón se eligió la metodología clásica de electroforesis bidimensional diferencial donde cada muestra se debe cargar en un gel por separado y se procede a comparar dos geles por vez. Por tanto, esto implica una mayor variabilidad de los resultados obtenidos que se puede compensar parcialmente aumentando el número de experimentos realizados. Sin embargo no descartamos en un futuro cercano la utilización del DIGE, teniendo en cuenta que el equipo y programa necesario para este ya están en Uruguay.

10.2 Neuroproteómica aplicada al estudio de la plasticidad cortical.

10.2.1 Aspectos metodológicos.

El proteoma es un conjunto de proteínas de una célula, un tejido, o un organismo en un momento particular y en condiciones fisiológicas específicas. Este es extremadamente complejo y dinámico, y cambia por ejemplo con el paso del tiempo (la edad) reflejando incluso el efecto de diferentes factores ambientales sobre la función y características de las proteínas, así como también por factores genéticos y por el desarrollo de enfermedades (Alzate, 2010). De esta forma, la proteómica se encarga de estudiar el proteoma, y permite identificar a gran escala, un conjunto de proteínas en un tejido en ciertas condiciones específicas, y determinar cómo el nivel de un subconjunto de estas proteínas es modificado por la influencia de algún factor externo como puede ser una droga.

En este trabajo, evidenciamos cambios diferenciales en el nivel de algunas proteínas en la corteza visual de ratones en dos condiciones experimentales, plasticidad reducida y plasticidad restaurada. Probablemente sólo hayamos descubierto una fracción de las proteínas que se expresan diferencialmente en la CV1 de ratones, teniendo en cuenta que solamente obtuvimos entre 300 y 500 spots distintos en nuestros geles, lo que representa tan sólo una fracción de las diez mil proteínas o más que se expresan en el cerebro de los mamíferos.

Uno de los pasos fundamentales es conocer las limitaciones en lo que respecta a la muestra que estamos analizando. Durante la preparación de la muestra hay que tener en cuenta que en cada paso adicional en el cuál buscamos purificar la muestra, aumentamos la probabilidad de perder proteínas. Por otro lado proteínas hidrofóbicas, tales como las proteínas de la membrana necesitan para poder ser analizadas por 2D-PAGE de métodos específicos de extracción y separación específicos. En el caso de proteínas poco abundantes se puede tratar de analizar fracciones

enriquecidas en estas obtenidas mediante metodologías como el HPLC de fase reversa. Otro punto fundamental es la correcta elección del strip de pH a utilizar en la primera dimensión. Como primera aproximación en este trabajo se utilizaron strips de rango amplio de pH, de 3 a 10 (no lineal) pero analizaremos en el futuro un rango más estrecho de pH, para intentar aumentar la resolución en algunas regiones y/o aumentar el número de spots.

10.2.2 Variabilidad entre geles: un aspecto a minimizar.

El siguiente punto que planteamos consistía en verificar que el patrón de spots obtenidos en un experimento se podía reproducir en otros (replicas), permitiendo así su comparación. Por ello, en este trabajo se realizaron un total de 20 geles bidimensionales provenientes de tres animales tratados y tres animales controles. Inicialmente se utilizaron todos los geles para el análisis de imagen que reveló una alta variabilidad en la coloración de los geles y en la identificación del número de spots totales. Teniendo en cuenta que el protocolo fue siempre el mismo, pensamos que esta variabilidad pudo deberse a problemas técnicos no detectados durante el experimento (por ejemplo, discrepancia en la cantidad de proteína cargada en cada gel, error en la preparación de alguna solución).

Esta variabilidad nos impidió utilizar desde el inicio la variable porcentaje del Volumen (% Volume) sobre los 20 geles por lo que se decidió realizar un análisis primario utilizando las variables de Intensidad y Volumen sobre un total de 300 spots, lográndose detectar 39 spots con niveles diferenciales entre las dos condiciones. Como estas variables no tienen en consideración variaciones en cada gel debidas a diferencias en la cantidad de proteína total y a diferencias en la tinción, los resultados pueden estar sujetos a error, siendo el análisis menos potente. Por lo tanto para tener certeza del resultado decidimos llevar adelante un análisis secundario en el que se utilizaron exclusivamente los 39 spots previamente identificados, esta vez re-analizados utilizando el porcentaje del Volumen como parámetro del estudio. Este análisis se hizo sobre 3 parejas de geles (control/fluoxetina) en los cuales los 39 spots eran siempre identificables, lográndose verificar diferencias en 29 spots. Las parejas de geles que comparten el mismo casete durante la electroforesis bidimensional presentaron una variabilidad menor en la distribución, número total de spots y coloración, posiblemente porque recibieron un tratamiento y potencial eléctrico más homogéneo. De lo mencionado anteriormente, pudimos concluir que la sistematización del proceso es fundamental para minimizar o compensar la variabilidad entre los geles conjuntamente con el aumento del número de muestras analizadas.

10.2.3 Identificación de proteínas moduladas por fluoxetina.

A partir de los resultados de espectrometría de masa, identificamos proteínas en 24 de los 29 spots analizados. De los 5 spots no identificados, para aquellos donde la cantidad de proteína no fue suficiente, podríamos pensar en cortar varios spots de diferentes replicas, teniendo en cuenta que se necesitan unos 20 ng de proteína para identificar una proteína por espectrometría de masa (Alzate, 2010). Además, para minimizar la contaminación con queratina en el laboratorio hemos destinado material exclusivo para la 2D-PAGE así como implementado las precauciones personales adecuadas en el momento de la manipulación de los geles.

Por lo tanto, considerando que dos proteínas (TPI y VDAC1) fueron encontradas en más de un spot, identificamos exitosamente 22 proteínas que se expresan diferencialmente, de las cuales 10 presentan mayor nivel de proteína en los ratones tratados con fluoxetina y 12 menor nivel. El número relativamente reducido de proteínas identificadas en este estudio con nivel diferencial podría ser causado por las dimensiones de los geles (10 cm) y el rango de pH (3-10NL) de los strips utilizados, que influyen sobre la resolución espacial final de los spots. Sin embargo, en otros estudios similares en los cuales se han utilizado strips de mayor tamaño (18 cm) y rango de pH más estrechos (4-7; 6-9; 5,5-6,7) o metodologías más sofisticadas (“two dimensional gel electrophoresis”, 2D-DIGE; “isobaric tag for relative and absolute quantitation”, iTRAQ) se han encontrado un número de proteínas con nivel diferencial en un rango similar (Van den Bergh et al., 2003a, Van den Bergh et al., 2006, Dahlhaus et al., 2011). Específicamente, en un trabajo de proteómica en la corteza visual de gato durante el desarrollo, se encontró que alrededor de 28-37 proteínas presentaron un nivel diferencial (Van den Bergh et al., 2003a, Van den Bergh et al., 2003b, Van den Bergh et al., 2006) y en un estudio de proteómica en sinaptosomas de corteza visual de ratón alrededor de 35-84 proteínas (Dahlhaus et al., 2011) en función de las distintas condiciones estudiadas (período crítico, PC con privación monocular, adulto control, adulto en ambiente de oscuridad total).

Considerando oportuno convalidar los resultados obtenidos en el análisis de imagen de los geles 2D utilizando otras metodologías, utilizamos el análisis por Western blot, que permite un estudio semi-cuantitativo de los resultados. De esta forma, analizamos dos de las proteínas que presentaban diferencias entre controles y tratados (SOD1 y SOD2) con anticuerpos específicos y así pudimos confirmar que la señal de SOD1 disminuye en la corteza visual de los animales tratados con fluoxetina en comparación con los controles, mientras que la señal de SOD2 aumenta, de modo similar al observado en el análisis de imagen de los geles 2D.

10.3 Análisis de las proteínas identificadas en el estudio de proteómica diferencial

Como fue mencionado anteriormente, el objetivo de este trabajo era identificar proteínas, candidatas a la regulación de procesos de plasticidad en la corteza visual. Para esto se llevó adelante un análisis bioinformático sobre las proteínas identificadas en los experimentos de proteómica diferencial utilizando distintas estrategias. Se utilizó principalmente la base de datos de UniProt y de NCBI para determinar la localización subcelular, y la base de datos de Panther para determinar la participación en determinados procesos biológicos relevantes, y el programa String para identificar potenciales interacciones entre las proteínas. Por otra parte, se realizó la búsqueda bibliográfica en PubMed para identificar específicamente la eventual participación de dichas proteínas en procesos de plasticidad en general y también en la modulación por fluoxetina. También se compararon los resultados con trabajos previos de proteómica en corteza visual de ratón (Dahlhaus et al., 2011) y gato (Van den Bergh et al., 2003a, Van den Bergh et al., 2003b, Van den Bergh et al., 2006) en los cuales el objetivo principal era la identificación de proteínas candidatas a la regulación de la plasticidad, de forma similar al presente trabajo, y en el cerebro de rata durante el desarrollo (Fountoulakis et al., 2000).

10.3.1 Efectos de la fluoxetina sobre expresión génica: comparación con trabajos previos

Analizando la literatura sobre la posible modulación por fluoxetina del nivel de las proteínas identificadas por proteómica en este trabajo se encontraron sólo algunos artículos relacionados con algunas de ellas. Se ha reportado que la fluoxetina modula los niveles de SOD1 en la región CA1 del hipocampo de gerbos (Kim et al., 2007), la expresión del ARNm de NM23 en células de linfoma de Burkitt *in vitro* (Serafeim et al., 2003) y la expresión del ARNm y los niveles proteicos de 14-3-3 zeta/delta en células basófilas de leucemia de ratas *in vitro* (Baik et al., 2005). En uno de los trabajos más interesantes se estudió la regulación de la expresión génica mediante microarreglos de ADN en la corteza visual de ratas adultas tratadas de forma crónica con fluoxetina (Tiraboschi et al., 2013). De los 197 genes que fueron identificados sólo dos coinciden con las proteínas identificadas en nuestro trabajo, LDHA y PDIA3. Esto puede deberse por un lado a las diferentes metodologías utilizadas, considerando que en algunos casos no hay una relación proporcional entre el nivel de expresión de los ARNm y las proteínas, teniendo en cuenta la diferente estabilidad, nivel de síntesis, degradación y regulación que puede existir entre ambas moléculas. Por otro lado, el tratamiento

utilizado en dicho trabajo tiene una duración de 23 días, mientras que el utilizado en nuestro trabajo es de 28 días, por lo que pueden existir diferencias en la expresión de genes debidas a la diferencia temporal en el tratamiento. A su vez pueden existir algunas diferencias de expresión de ARN y de proteínas entre las dos especies utilizadas, rata y ratón. Este tipo de discrepancia no es una novedad considerando que en otros trabajos donde se comparan resultados de transcriptómica y proteómica no se han encontrado correlaciones (Van den Bergh et al., 2003a).

10.3.2 Posible rol de las proteínas identificadas en la plasticidad cortical.

En resumen, en este trabajo se identificaron 22 proteínas expresadas de modo diferencial en la corteza visual de ratones tratados con fluoxetina comparados con los controles. En forma especulativa discutimos como dichas proteínas podrían estar modulando la plasticidad en la corteza visual utilizando la información recaudada a través del análisis bioinformático y bibliográfico. Para una mayor claridad, dividimos la discusión en función de los procesos biológicos en los cuales las distintas proteínas fueron asignadas.

ORGANIZACIÓN DEL CITOESQUELETO (ARP2, Cdc42, PFN2 y TCTP): de las cuatro proteínas pertenecientes a esta categoría tres nos parecieron extremadamente interesantes: ARP2, Cdc42 y PFN2.

En primer lugar, porque se ha demostrado en trabajos previos que estas proteínas juegan un rol importante en distintos tipos de procesos plásticos en varias áreas cerebrales, como se detalla a continuación. **ARP2** participa en la formación y maduración de las espinas dendríticas y sinapsis, en la internalización de receptores de tipo AMPA y en el proceso de depresión a largo plazo en el hipocampo (Rocca et al., 2008, Nakamura et al., 2011, Rocca et al., 2013) y en el cerebro anterior (Kim et al., 2013), posiblemente contribuyendo a la etiología de los desórdenes psiquiátricos complejos y a procesos subyacentes como las funciones cognitivas, por ejemplo el aprendizaje y la memoria (Wegner et al., 2008). **Cdc42** participa también en las modificaciones estructurales de las espinas dendríticas dependientes de la actividad, en neuronas de hipocampo (Kim et al., 2013, Murakoshi et al., 2011), en la maduración e integración de neuronas recién nacidas del hipocampo adulto (Vadodaria and Jessberger, 2013), en la espinogénesis en neuronas serotoninérgicas en monos (Rivera and Bethea, 2013), en la maduración y el crecimiento sináptico (Li et al., 2000, Sin et al., 2002, Shen et al., 2006), así como en eventos mediados por neurotrofinas (La Torre et al., 2013), en la movilidad del cono de crecimiento y en la formación de filopodios y en el tráfico de vesículas

neuronales (Leemhuis et al., 2010). Por otra parte, se ha demostrado que la modulación farmacológica de esta proteína está asociada con procesos de potenciación a largo plazo, de potenciación de la neurotransmisión, del aprendizaje y de la memoria (Musilli et al., 2013, Borrelli et al., 2013), así como también ha sido asociada con la incapacidad intelectual del cromosoma X (Dubos et al., 2012, Ramakers et al., 2012), y la esquizofrenia (Ide and Lewis, 2010). **PFN2** está involucrada en la dinámica del citoesqueleto, el tránsito de membrana y el transporte nuclear, también en la diferenciación neuronal y en la plasticidad sináptica (Birbach, 2008), y en los cambios a largo plazo que ocurren en las respuestas sinápticas asociadas con la formación de memoria dependiente de receptores NMDA (Ackermann and Matus, 2003, Neuhoff et al., 2005).

Un trabajo reciente de proteómica en corteza visual de ratón identificó a la Cdc42 y a la PFN2 como proteínas potencialmente implicadas en procesos de plasticidad dependiente de la experiencia sensorial en el desarrollo. Se ha observado que el nivel de Cdc42 es elevado durante el PC y disminuye en el adulto, mientras que el nivel de PFN2 es modulado por la entrada visual (Dahlhaus et al., 2011). En este mismo trabajo no se ha identificado ARP2, sin embargo se ha identificado otra subunidad (ARPC4B) que participa en la conformación del mismo complejo ARP2/3 en el que participa ARP2.

En segundo lugar, porque existen varias evidencias que indican que las tres proteínas interactúan físicamente entre sí: ARP2 interactúa directamente con Cdc42 y a través de otras proteínas interactúan con PFN2 (Kessels et al., 2011). Además, estas proteínas participan en conjunto con los reordenamientos necesarios del citoesqueleto para la formación y eliminación de espinas dendríticas y en la plasticidad morfológica de las mismas, incluyendo su forma, número y movilidad (Hotulainen and Hoogenraad, 2010).

En resumen, en este trabajo se ha observado que el tratamiento con fluoxetina, que induce la restauración de la plasticidad en el animal adulto, modula los niveles de proteínas implicadas en procesos de plasticidad estructural principalmente a nivel de las espinas dendríticas (ARP2, Cdc42 y PFN2) y potencialmente a nivel de la red de microtúbulos en el citoesqueleto (TCTP). Como fue mencionado en la introducción, los procesos de plasticidad neuronal a largo plazo incluyen una componente estructural, como la formación, modulación y dinámica de los contactos sinápticos y se ha demostrado que la fluoxetina juega un rol importante en este proceso (Rubio et al., 2013, Ampuero et al., 2010, Huang et al., 2012). En la corteza visual los procesos de plasticidad estructural han sido ampliamente descritos y además se ha demostrado recientemente que el tratamiento con fluoxetina induce la modulación de las espinas dendríticas en la corteza visual de ratones adultos (Chen et al., 2011). A partir de esto, podemos sugerir que el efecto de la fluoxetina sobre dichos

procesos estaría siendo mediado a través de la regulación de algunas proteínas, entre las cuales se encontrarían ARP2, Cdc42 y PFN2 identificadas en este trabajo.

EXO/ENDOCITOSIS (PFN2 y NECAP1) y **TRANSPORTE** (ARP2, NECAP y DYN2): de las proteínas identificadas en estas categorías nos limitamos a discutir dos. NECAP1 para la categoría exo/endocitosis y DYN2 para la de Transporte.

La modulación de la transmisión sináptica es un proceso extremadamente complejo y regulado, en el cuál los procesos de exo/endocitosis y de transporte son fundamentales. En este trabajo se han identificado varias proteínas que participan en la regulación de ambos procesos. Por ejemplo, la proteína **NECAP1** que se ha demostrado participa en la modulación de los procesos de endocitosis neuronal, a nivel postsináptico, de receptores de tipo AMPA y GABA, y a nivel presináptico está involucrada en el reciclaje de vesículas sinápticas durante la liberación de los neurotransmisores (Ritter et al., 2003) influyendo así a través de la modulación de la transmisión sináptica sobre procesos de plasticidad (Man et al., 2000, Dale et al., 2002, Wu et al., 2004, Murshid et al., 2006, Wang et al., 2008, Traub, 2009). Además, en otro estudio de proteómica, se ha demostrado en la corteza visual de ratón que una de las proteínas que interactúan con NECAP1 en la formación del complejo proteico necesario para la endocitosis (en particular: AP2A1, AP-2 complex subunit alpha-1) es modulada durante el desarrollo y por la experiencia sensorial (Dahlhaus et al., 2011). En resumen, estas observaciones son muy interesantes, considerando que la restauración de la plasticidad en la corteza visual adulta, ya sea por fluoxetina u otros tratamientos, ocurre a través de la modulación del equilibrio E/I para el cual es fundamental la relación entre receptores excitatorios e inhibitorios a nivel sináptico (ver Introducción).

Otro factor relevante en el control a largo plazo de la funcionalidad sináptica es el proceso de transporte desde y hacia la sinapsis. En este caso encontramos que la fluoxetina modula el nivel de la proteína **DYN2**, que está implicada directamente en el transporte de BDNF (Park et al., 2008), de algunas metaloproteasas de la matriz (Sbai et al., 2008), de neurologina y PSD95, y también de receptores de tipo GABA (Heisler et al., 2011), y a consecuencia de esto, en procesos de potenciación a largo plazo ("long term potentiation", LTP) y depresión a largo plazo ("long term depression", LTD) en el hipocampo (Schapitz et al., 2010). Las moléculas transportadas por la DYN2, son fundamentales en la determinación del equilibrio E/I (BDNF y los mismos receptores GABA) y de los procesos de plasticidad estructural a través de la remodelación de la matriz extracelular (metaloproteasas; ver introducción). Además se ha demostrado que el nivel de DYN2 es modulado por la experiencia sensorial en la corteza visual de ratón (Dahlhaus et al., 2011).

Podemos sugerir que la restauración de la plasticidad inducida por fluoxetina en la corteza visual de ratones adultos ocurre también a través de la regulación de procesos de endocitosis y de transporte que modulan la disponibilidad de moléculas necesarias para que tenga lugar este proceso.

SEÑALIZACION INTRACELULAR (Cdc42, TCTP, HINT1, PTPA, 14-3-3 zeta/delta, SOD2, VDAC1, SOD1): de las ocho proteínas asignadas a esta categoría, las más interesantes para discutir en el contexto de la plasticidad son HINT1, PTPA, 14-3-3 zeta/delta y VDAC1.

La proteína **HINT1** es conocida también como proteína de interacción de la proteína quinasa C1 (PKC1), moduladora de varias vías de señalización intracelular, y por esto podría jugar un rol interesante en la plasticidad de la corteza visual. Sin embargo, mientras la participación de varias quinasas, como la ERK1/2, la PKA y la CaMKII, ha sido ampliamente caracterizada en los procesos de plasticidad de la corteza visual (Berardi et al., 2003), no hay evidencias de una participación directa de la PKC1 en dichos procesos. No obstante, el interés en la proteína HINT1 reside en la observación de su rol como proteína de estabilización de la interacción entre receptores opioides y NMDA (Rodríguez-Muñoz et al., 2011). A través de estudios de genética y de expresión en humanos, y también de estudios moleculares y comportamentales en ratón, se ha demostrado su participación en esquizofrenia, en desórdenes bipolares, en ansiedad, y en síndrome de Down (Weitzdoerfer et al., 2001, Chen et al., 2008, Varadarajulu et al., 2011, Varadarajulu et al., 2012, Jackson et al., 2012, Martins-de-Souza et al., 2012). Los receptores opioides han sido identificados en la corteza visual y además, recientemente se ha demostrado que dichos receptores pueden modular las respuestas GABAérgicas corticales, influyendo así en la regulación del tono inhibitorio y en consecuencia de la plasticidad (Li et al., 2007a, Li et al., 2007b, Li et al., 2006).

La **PTPA** es un activador de la fosfatasa 2A (PP2A) por lo que su acción ha sido relacionada con varios procesos de plasticidad, entre ellos LTP y LTD en el hipocampo (Wang et al., 2012, Bolognin et al., 2012, Mauna et al., 2011, Schnabel et al., 2001), LTP en el cerebelo (Belmeguenai and Hansel, 2005), señalización en taupatías (Sontag et al., 2012), activación de sinapsis silenciosas a través de la interacción con receptores NMDA (Chan and Sucher, 2001, Woo and Nguyen, 2002) y también en procesos de apoptosis (Fellner et al., 2003). La única fosfatasa que se ha demostrado participar en el proceso de plasticidad de la corteza visual es la calcineurina que posiblemente interfiere con las modificaciones estructurales a nivel de las espinas dendríticas (Yang et al., 2005). No hay información sobre un rol potencial de la PP2A a nivel de la corteza visual pero es posible hipotetizar que pueda modular la plasticidad en esta área de forma similar a lo demostrado en el hipocampo y el cerebelo. En otro trabajo de proteómica en la corteza visual de ratón se ha

observado que la subunidad catalítica de otra fosfatasa, la PP2B, es modulada por la experiencia visual (Dahlhaus et al., 2011).

Al unirse a sitios fosforilados de varias proteínas blanco y modulando su acción, la **14-3-3 zeta/delta** ha sido implicada en un amplio rango de funciones. Es particularmente relevante la demostración de que esta proteína puede modular la acción de los receptores NMDA *in vitro* (Chen et al., 2007) y que en *C. elegans* es necesaria para procesos de aprendizaje, memoria, desarrollo embrionario y neuroplasticidad comportamental (Philip et al., 2001). Se ha demostrado también que esta proteína es modulada por la experiencia visual en la corteza visual de ratón (Dahlhaus et al., 2011), mientras que en rata y gato se han identificado otras isoformas (14-3-3 beta/alfa, y 14-3-3 gamma) moduladas durante el desarrollo, con un pico en el PC (Fountoulakis et al., 2000; Van den Bergh et al., 2006).

Estudios recientes en animales transgénicos indican un rol directo de **VDAC1** en el buffering del calcio en mitocondrias localizadas a nivel sináptico (Levy et al., 2003), en procesos de aprendizaje espacial, condicionamiento al miedo y plasticidad sináptica en hipocampo (Weeber et al., 2002), y un rol potencial de protección contra la toxicidad causada por genes relacionados con la patología de Alzheimer (Manczak et al., 2013). La homeóstasis del calcio intracelular actúa a varios niveles sobre la transmisión y eficacia sináptica. La modulación de VDAC1 por fluoxetina podría estar regulando la plasticidad a través de dicho mecanismo. Es interesante notar que en trabajos previos se ha identificado una modulación durante el desarrollo y por la experiencia visual en la corteza visual de ratón y de gato no solo de VDAC1 pero también de VDAC2 y VDAC3 (Dahlhaus et al., 2011; Van den Bergh et al., 2006), que cumplen roles similares, reforzando la posibilidad de que estas proteínas estén implicadas en la regulación de la plasticidad cortical a través del control de la homeostasis del calcio u otros metabolitos (Lemasters and Holmuhamedov, 2006).

REDOX (SOD2, SOD1, PDIA3 y QDPR): estas cuatro proteínas han sido implicadas en el control del estado redox intracelular actuando en distintos modos.

El estado redox intracelular puede afectar la funcionalidad celular en una enorme variedad de modos. En este contexto nos interesa destacar que la regulación del estado redox intracelular, en la cual **SOD1** y **SOD2** juegan un rol importante, ha sido implicada directamente en distintos procesos de plasticidad neuronal en varias áreas cerebrales (Hu et al., 2007, Cheng et al., 2010). Además, defectos en el gen de SOD1 en humanos causan esclerosis lateral amiotrófica (ELA) una enfermedad neurodegenerativa familiar (Rosen et al., 1993). A su vez, se ha observado que los niveles de SOD1 y SOD2 son modulados durante el desarrollo en la corteza visual de ratón y de gato (Fountoulakis et al., 2000; Van den Bergh et al., 2006). Por otro lado se ha demostrado que la fluoxetina puede

proteger contra daños oxidativos en distintos modelos experimentales (Zafir et al., 2008, Galecki et al., 2009, Moretti et al., 2012, Moretti et al., 2013). Por lo que podemos sugerir que la modulación de la regulación del estado redox por el tratamiento con fluoxetina podría modificar el nivel de plasticidad cortical.

METABOLISMO (QDPR, MDH1, LDHA, ESD, TPI, NM23, PDIA3, PHGDH y SOD2): en esta categoría encontramos el mayor número de proteínas. Dichas proteínas están implicadas en el control del metabolismo celular en el sentido más amplio, desde la oxido-reducción dependiente de NAD de varios blancos hasta el control de la glicólisis para la producción de energía.

En este contexto, nos parece interesante la **MDH1** porque se ha demostrado que su expresión y actividad son moduladas por la restricción calórica que media efectos benéficos en el cerebro en envejecimiento (Poon et al., 2006), y se ha demostrado que participa en procesos de plasticidad a largo plazo en el hipocampo (Matsuura et al., 2013). Además, en trabajos de proteómica previos, se ha observado la modulación de MDH1 durante el desarrollo en rata, ratón y gato (Fountoulakis et al., 2000, Van den Bergh et al., 2006, Dahlhaus et al., 2011). La restricción calórica, es una condición experimental que ha recibido particular atención en los últimos años como potencial terapia no invasiva para la recuperación funcional en desórdenes del sistema nervioso central. En el caso de la corteza visual se ha observado que la restricción calórica en el adulto restaura la plasticidad (Spolidoro et al., 2011), por ende podemos suponer que la fluoxetina puede actuar también a este nivel a través de la modulación de MDH1.

En otros trabajos, también se ha detectado la modulación de otras de las proteínas identificadas en este estudio. En particular, TPI, que aumenta en la corteza visual de rata y de gato con la edad (Fountoulakis et al., 2000, Van den Bergh et al., 2006); LDHA, que es modulada por la experiencia visual (Dahlhaus et al., 2011) mientras que la cadena B de LDH aumenta en el PC en gato (Van den Bergh et al., 2006); y finalmente PDIA3, cuyo nivel es elevado durante el PC en rata y gato (Fountoulakis et al., 2000; Van den Bergh et al., 2006) y es modulado por la experiencia visual en ratón (Dahlhaus et al., 2011).

DEGRADACIÓN PROTEICA (PSMA2 y PSMA6): en esta categoría encontramos dos proteínas que participan en el complejo del proteasoma.

No obstante no hay evidencia directa de la participación de **PSMA2** y de **PSMA6** en los procesos de plasticidad neuronal, es interesante notar que la regulación de la funcionalidad del proteasoma ha sido relacionada en los últimos años con procesos de señalización neuronal dependientes de la actividad eléctrica (Hamilton et al., 2012) y con la regulación de la transmisión

sináptica por medio de receptores glutamatérgicos metabotrópicos (Rezvani et al., 2012). Un estudio reciente ha demostrado que el ejercicio físico voluntario puede aportar beneficios funcionales en los casos de traumas cerebrales reclutando mecanismos de regulación del proteasoma (Szabo et al., 2010). Este es relevante considerando que el mantenimiento de animales experimentales adultos en ambiente enriquecido de estímulos sensorio-motores, en el cuál la actividad física tiene un rol importante, podría, al igual que la fluoxetina, reabrir la plasticidad cortical utilizando dicho mecanismo.

10.4 Caracterización de los efectos neuroquímicos mediados por el tratamiento crónico con fluoxetina

Para analizar los posibles efectos del tratamiento con fluoxetina en los ratones a nivel neuroquímico se realizaron ensayos para medir los niveles cerebrales de la 5HT, DA y de sus respectivos metabolitos. Los resultados de 5HT y 5HIAA son contradictorios con la idea que la fluoxetina sea un potenciador del tono serotoninérgico, ya que en este caso esperaríamos un aumento de los niveles de 5HT, una reducción de 5HIAA y la reducción del recambio de serotonina. Sin embargo, si bien la administración aguda de fluoxetina produce la facilitación de la transmisión serotoninérgica, el tratamiento crónico y su acción terapéutica no se pueden explicar solamente por este, considerando que para que desaparezcan los síntomas clínicos de la depresión se precisan semanas de tratamiento (Nestler, 1998).

Luego de una búsqueda bibliográfica exhaustiva no encontramos datos sobre los efectos de la fluoxetina similares a los obtenidos en nuestro trabajo. No obstante, una posible explicación de los resultados obtenidos, es la existencia de un mecanismo compensatorio inhibitorio, determinado por la excitación incesante de la transmisión serotoninérgica inducida por la adición continua de fluoxetina al sistema. El aumento extracelular de serotonina, podría activar el efecto compensatorio de los autorreceptores a nivel de la terminal presináptica, lo que induciría una disminución de la serotonina liberada a la hendidura sináptica que podría estar mediada por receptores del tipo 1A (Pineyro and Blier, 1999).

En uno de los trabajos más cercano al nuestro, se observó un aumento de los niveles de 5HT en la corteza visual de ratas adultas que fueron criadas en ambiente enriquecido, una estrategia no invasiva distinta que también restaura la plasticidad en la corteza visual de animales adultos (Baroncelli et al., 2010), éste también resultó contradictorio al compararlo con nuestros resultados si bien se trata de un tratamiento muy diferente.

En cuanto al tratamiento crónico con fluoxetina, existen varias explicaciones posibles para la discordancia potencial entre nuestros datos preliminares y los esperados. Mientras que los efectos de la fluoxetina en el tratamiento agudo están muy bien caracterizados, en el caso del tratamiento crónico los datos son pocos, poco claros y no son fácilmente comparables entre sí. Por ejemplo, se han observado modulaciones de los niveles de las distintas moléculas analizadas aquí en función de distintos parámetros. Por un lado, el tratamiento crónico puede realizarse por la vía oral, en la cual la droga se diluye en el agua del bebedero y el animal la ingiere *ad libitum*, o bien por la vía intraperitoneal, en la cual se realizan inyecciones repetidas diariamente, de esta manera la simple diferencia en la vía de administración utilizada puede afectar los resultados obtenidos. Por otro lado es de fundamental importancia la cepa de animales empleada, ya que se han observado efectos muy distintos entre cepas distintas (Dulawa et al., 2004). También existen efectos distintos en función del área cerebral analizada, y del modo de detección, por ejemplo la medición en extractos cerebrales es totalmente distinta a la detección por microdiálisis *in vivo* (Beyer and Cremers, 2008, Clark et al., 1996).

En resumen, si bien los datos obtenidos hasta el momento sobre los efectos neuroquímicos de la fluoxetina en el tratamiento crónico de ratones adultos no son concluyentes, esperamos poder obtener una mejor descripción en un futuro próximo.

11. Conclusiones

Los mecanismos moleculares que regulan los niveles de plasticidad en la corteza visual son poco conocidos. En este trabajo utilizamos un acercamiento mediante proteómica diferencial, para identificar potenciales candidatos que participen en dicho proceso. Para ello utilizamos el modelo de plasticidad restaurada farmacológicamente con fluoxetina. Mediante este abordaje, logramos identificar un total de 22 proteínas de las cuales 10 presentan un mayor nivel en los ratones tratados y 12 presentan un nivel menor. Estas proteínas están implicadas en varios procesos celulares, entre ellos, el control de la estructura del citoesqueleto, la endocitosis y la exocitosis, el transporte, la señalización intracelular, el control del estado redox de la célula, el metabolismo y la degradación proteica.

Pudimos verificar además, que diez de las 22 proteínas obtenidas en este proyecto fueron descritas en varios trabajos previos, estando implicadas directamente en la modulación de distintos procesos de plasticidad neuronal (tabla 10). Estas observaciones sugieren fuertemente que dichas proteínas pueden estar regulando el proceso de plasticidad también en la corteza visual, y por ende las consideramos prioritarias para un análisis más detallado de su rol potencial.

Tabla 10: lista de proteínas identificadas por espectrometría de masa que están implicadas en procesos de plasticidad y referencias.

PROTEINAS	PROCESOS DE PLASTICIDAD REGULADOS	Referencias
ARP2	- plasticidad estructural (espinas dendríticas) - internalización AMPAR - LTD	Rocca et al., 2008; Nakamura et al., 2011; Kim et al., 2013; Rocca et al., 2013.
Cdc42	- plasticidad estructural (espinas dendríticas) - neurogénesis - trafico de vesículas sinápticas - LTP	Leemhuis et al., 2010; Murakpshi et al., 2011; Borrelli et al., 2013; Jessberger S., 2013; Kim et al., 2013; Musilli et al., 2013; Vadodaria et al., 2013.
PFN2	- plasticidad estructural (espinas dendríticas) - sinaptogénesis - LTP NMDA-dependiente	Birbach, 2008; Ackermann and Matus, 2003; Neuhoff et al., 2005.
NECAP1	- endocitosis de AMPAR y GABAR - reciclaje de vesículas sinápticas	Ritter et al., 2003.
DYN2	- LTP - LTD	Schapitz et al., 2010.
HINT1	- estabilización NMDAR/MuOpR y GABAR	Li et al., 2006; Li et al., 2007a; Li et al., 2007b; Rodríguez-Muñoz et al., 2011.
14-3-3 zeta/delta	- plasticidad comportamental (<i>C. elegans</i>) - interacción con NMDAR	Philip et al., 2001; Chen et al., 2007.
VDAC1	- transmisión y eficacia sináptica	Weeber et al., 2002; Levy et al., 2003.
SOD1	- varios (vía redox)	Rosen et al., 1993; Hu et al., 2007; Cheng et al., 2010.
MDH1	- LTP	Matsuura et al., 2013.

Por otro lado, no se han encontrado evidencias de un rol directo en procesos de plasticidad neuronal de las otras 12 proteínas. Sin embargo, los procesos biológicos en los cuales participan, indican que dichas proteínas podrían tener un rol en la regulación de la plasticidad a nivel general (tabla 11), y por esto es interesante explorar de manera más detallada, también su rol potencial en la corteza visual.

Tabla 11: lista de proteínas identificadas por espectrometría de masa y procesos biológicos que podrían estar modulando directa o indirectamente la plasticidad.

PROTEÍNAS	PROCESO DE PLASTICIDAD POTENCIAL
TCTP	- señalización vía calcio intracelular - plasticidad estructural (microtúbulos)
PTPA	- LTP - LTD - activación sinapsis silenciosas
SOD2	- varios (vía redox)
PDIA3	- varios (vía redox) - plegamiento proteínas
TPI LDHA	- energía
ESD	- detoxificación
PHGDH	- desarrollo neuronal
QDPR	- biosíntesis neurotransmisores
NM23	- desarrollo neuronal - señalización intracelular - endocitosis - expresión génica
PSMA2 PSMA6	- señalización intracelular - transmisión sináptica (mGluR)

12. Perspectivas

Las perspectivas de este trabajo consisten en:

- llevar adelante un estudio más completo sobre la variación en el nivel de proteínas entre las dos condiciones experimentales. Esto se llevará a cabo aumentando el n experimental de los geles 2D obtenidos con strips de rango de pI amplio (pI 3-10) y utilizando strips de rango más estrecho (pI 4-7 y pI 6-11). Esto permitirá aumentar la resolución en los geles del patrón de distribución de los spots y posiblemente facilitará la identificación de otras proteínas con nivel diferencial.
- confirmar la información obtenida en los experimentos de proteómica a través de estudios de Western blot e inmunohistoquímica.
- seleccionar algunas de las proteínas identificadas para analizar en mayor detalle su posible rol como candidatos de la regulación de la plasticidad en la corteza visual. A partir de los datos obtenidos en este trabajo consideramos que es prioritario estudiar las proteínas implicadas en la reorganización del citoesqueleto a nivel de las espinas dendríticas (ARP2, Cdc42 y PFN2), dado su conocido rol funcional. Para ello, estamos considerando realizar estudios *in vitro*, en los cuáles se puede modificar experimentalmente el nivel de expresión de estas proteínas y luego verificar la plasticidad estructural, al analizar la estructura y la dinámica de las espinas dendríticas. Por otro lado la modulación de la expresión de dichas proteínas puede obtenerse *in vivo* (por farmacología, transgénesis u otro) para luego analizar la plasticidad funcional utilizando métodos de electrofisiología (plasticidad de dominancia ocular) y comportamiento (agudeza visual).
- llevar a cabo estudios de proteómica diferencial también en otras condiciones experimentales, en particular en animales que estén en el pico del período crítico de plasticidad, y en animales adultos criados en ambiente enriquecido (otro modelo de plasticidad restaurada). La comparación de los resultados obtenidos en las diversas condiciones permitirá delinear un cuadro más completo y claro de los mecanismos moleculares subyacentes a la plasticidad en la corteza visual.
- caracterizar de forma más precisa los efectos del tratamiento crónico con fluoxetina en adultos sobre los sistemas neuromoduladores de serotonina y dopamina.

13. Referencias bibliográficas

- ACKERMANN, M. & MATUS, A. 2003. Activity-induced targeting of profilin and stabilization of dendritic spine morphology. *Nat Neurosci*, 6, 1194-200.
- ALZATE, O. 2010. Neuroproteomics.
- AMPUERO, E., RUBIO, F. J., FALCON, R., SANDOVAL, M., DIAZ-VELIZ, G., GONZALEZ, R. E., EARLE, N., DAGNINO-SUBIABRE, A., ABOITIZ, F., ORREGO, F. & WYNEKEN, U. 2010. Chronic fluoxetine treatment induces structural plasticity and selective changes in glutamate receptor subunits in the rat cerebral cortex. *Neuroscience*, 169, 98-108.
- ANDERSON, L. & SEILHAMER, J. 1997. A comparison of selected mRNA and protein abundances in human liver. *ELECTROPHORESIS*, 18, 533-537.
- ATWAL, J. K., PINKSTON-GOSSE, J., SYKEN, J., STAWICKI, S., WU, Y., SHATZ, C. & TESSIER-LAVIGNE, M. 2008. PirB is a Functional Receptor for Myelin Inhibitors of Axonal Regeneration. *Science*, 322, 967-970.
- AUER, M., HAUSOTT, B. & KLIMASCHEWSKI, L. 2011. Rho GTPases as regulators of morphological neuroplasticity. *Annals of Anatomy - Anatomischer Anzeiger*, 193, 259-266.
- BAIK, S. Y., JUNG, K. H., CHOI, M. R., YANG, B. H., KIM, S. H., LEE, J. S., OH, D. Y., CHOI, I. G., CHUNG, H. & CHAI, Y. G. 2005. Fluoxetine-induced up-regulation of 14-3-3zeta and tryptophan hydroxylase levels in RBL-2H3 cells. *Neurosci Lett*, 374, 53-7.
- BARDIN, J. 2012. Neurodevelopment: unlocking the brain. *Nature*, 487, 24-6.
- BARONCELLI, L., SALE, A., VIEGI, A., MAYA VETENCOURT, J. F., DE PASQUALE, R., BALDINI, S. & MAFFEI, L. 2010. Experience-dependent reactivation of ocular dominance plasticity in the adult visual cortex. *Exp Neurol*, 226, 100-9.
- BAVELIER, D., LEVI, D. M., LI, R. W., DAN, Y. & HENSCH, T. K. 2010. Removing brakes on adult brain plasticity: from molecular to behavioral interventions. *J Neurosci*, 30, 14964-71.
- BELMEGUENAI, A. & HANSEL, C. 2005. A role for protein phosphatases 1, 2A, and 2B in cerebellar long-term potentiation. *J Neurosci*, 25, 10768-72.
- BERARDI, N., PIZZORUSSO, T. & MAFFEI, L. 2000. Critical periods during sensory development. *Curr Opin Neurobiol*, 10, 138-45.
- BERARDI, N., PIZZORUSSO, T., RATTO, G. M. & MAFFEI, L. 2003. Molecular basis of plasticity in the visual cortex. *Trends Neurosci*, 26, 369-78.
- BERG, D., HOLZMANN, C. & RIESS, O. 2003. 14-3-3 proteins in the nervous system. *Nature Reviews Neuroscience*, 4, 752-762.
- BERGH, G. V. D. & ARCKENS, L. 2008. Protein Profiling Based on Two-Dimensional Difference Gel Electrophoresis.
- BEYER, C. E. & CREMERS, T. I. 2008. Do selective serotonin reuptake inhibitors acutely increase frontal cortex levels of serotonin? *Eur J Pharmacol*, 580, 350-4.
- BIRBACH, A. 2008. Profilin, a multi-modal regulator of neuronal plasticity. *Bioessays*, 30, 994-1002.
- BOHM, H., BENNDORF, R., GAESTEL, M., GROSS, B., NURNBERG, P., KRAFT, R., OTTO, A. & BIELKA, H. 1989. The growth-related protein P23 of the Ehrlich ascites tumor: translational control, cloning and primary structure. *Biochem Int*, 19, 277-86.
- BOLOGNIN, S., BLANCHARD, J., WANG, X., BASURTO-ISLAS, G., TUNG, Y. C., KOHLBRENNER, E., GRUNDKE-IQBAL, I. & IQBAL, K. 2012. An experimental rat model of sporadic Alzheimer's disease and rescue of cognitive impairment with a neurotrophic peptide. *Acta Neuropathol*, 123, 133-51.
- BORRELLI, S., MUSILLI, M., MARTINO, A. & DIANA, G. 2013. Long-lasting efficacy of the cognitive enhancer cytotoxic necrotizing factor 1. *Neuropharmacology*, 64, 74-80.
- BRENNER, C. 2002. Hint, Fhit, and GalT: Function, Structure, Evolution, and Mechanism of Three Branches of the Histidine Triad Superfamily of Nucleotide Hydrolases and Transferases†. *Biochemistry*, 41, 9003-9014.

- BUETTNER, R., PAPOUTSOGLU, G., SCEMES, E., SPRAY, D. C. & DERMIETZEL, R. 2000. Evidence for secretory pathway localization of a voltage-dependent anion channel isoform. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97, 3201-3206.
- CASTREN, E. 2004. Neurotrophic effects of antidepressant drugs. *Curr Opin Pharmacol*, 4, 58-64.
- CIUCCI, F., PUTIGNANO, E., BARONCELLI, L., LANDI, S., BERARDI, N. & MAFFEI, L. 2007. Insulin-like growth factor 1 (IGF-1) mediates the effects of enriched environment (EE) on visual cortical development. *PLoS One*, 2, e475.
- CLARK, R. N., ASHBY, C. R., JR., DEWEY, S. L., RAMACHANDRAN, P. V. & STRECKER, R. E. 1996. Effect of acute and chronic fluoxetine on extracellular dopamine levels in the caudate-putamen and nucleus accumbens of rat. *Synapse*, 23, 125-31.
- CNOPS, L., HU, T. T., BURNAT, K., VAN DER GUCHT, E. & ARCKENS, L. 2006. Age-dependent alterations in CRMP2 and CRMP4 protein expression profiles in cat visual cortex. *Brain Res*, 1088, 109-19.
- CNOPS, L., HU, T. T., EYSEL, U. T. & ARCKENS, L. 2007. Effect of binocular retinal lesions on CRMP2 and CRMP4 but not Dyn I and Syt I expression in adult cat area 17. *Eur J Neurosci*, 25, 1395-401.
- CORRIVEAU, R. A., HUH, G. S. & SHATZ, C. J. 1998. Regulation of class I MHC gene expression in the developing and mature CNS by neural activity. *Neuron*, 21, 505-20.
- CHAN, S. F. & SUCHER, N. J. 2001. An NMDA receptor signaling complex with protein phosphatase 2A. *J Neurosci*, 21, 7985-92.
- CHAO, Y., XING, Y., CHEN, Y., XU, Y., LIN, Z., LI, Z., JEFFREY, P. D., STOCK, J. B. & SHI, Y. 2006. Structure and mechanism of the phosphotyrosyl phosphatase activator. *Mol Cell*, 23, 535-46.
- CHEN, J., LEE, C. T., ERRICO, S. L., BECKER, K. G. & FREED, W. J. 2007. Increases in expression of 14-3-3 eta and 14-3-3 zeta transcripts during neuroprotection induced by delta9-tetrahydrocannabinol in AF5 cells. *J Neurosci Res*, 85, 1724-33.
- CHEN, J. L., LIN, W. C., CHA, J. W., SO, P. T., KUBOTA, Y. & NEDIVI, E. 2011. Structural basis for the role of inhibition in facilitating adult brain plasticity. *Nat Neurosci*, 14, 587-94.
- CHEN, Q., WANG, X., O'NEILL, F. A., WALSH, D., KENDLER, K. S. & CHEN, X. 2008. Is the histidine triad nucleotide-binding protein 1 (HINT1) gene a candidate for schizophrenia? *Schizophr Res*, 106, 200-7.
- CHENG, A., HOU, Y. & MATTSON, M. P. 2010. Mitochondria and neuroplasticity. *ASN Neuro*, 2, e00045.
- DAHLHAUS, M., WAN LI, K., VAN DER SCHORS, R. C., SAEIPOUR, M. H., VAN NIEROP, P., HEIMEL, J. A., HERMANS, J. M., LOOS, M., SMIT, A. B. & LEVELT, C. N. 2011. The Synaptic Proteome during Development and Plasticity of the Mouse Visual Cortex. *Molecular & Cellular Proteomics*, 10.
- DALE, L. B., BABWAH, A. V. & FERGUSON, S. S. 2002. Mechanisms of metabotropic glutamate receptor desensitization: role in the patterning of effector enzyme activation. *Neurochem Int*, 41, 319-26.
- DIANZANI, I., DE SANCTIS, L., SMOOKER, P. M., GOUGH, T. J., ALLIAUDI, C., BRUSCO, A., SPADA, M., BLAU, N., DOBOS, M., ZHANG, H. P., YANG, N., PONZONE, A., ARMAREGO, W. L. & COTTON, R. G. 1998. Dihydropteridine reductase deficiency: physical structure of the QDPR gene, identification of two new mutations and genotype-phenotype correlations. *Hum Mutat*, 12, 267-73.
- DUBOS, A., COMBEAU, G., BERNARDINELLI, Y., BARNIER, J. V., HARTLEY, O., GAERTNER, H., BODA, B. & MULLER, D. 2012. Alteration of synaptic network dynamics by the intellectual disability protein PAK3. *J Neurosci*, 32, 519-27.
- DULAWA, S. C., HOLICK, K. A., GUNDERSEN, B. & HEN, R. 2004. Effects of chronic fluoxetine in animal models of anxiety and depression. *Neuropsychopharmacology*, 29, 1321-30.
- FAGIOLINI, M. & HENSCH, T. K. 2000. Inhibitory threshold for critical-period activation in primary visual cortex. *Nature*, 404, 183-186.

- FAINZILBER, M., BUDNIK, V., SEGAL, R. A. & KREUTZ, M. R. 2011. From synapse to nucleus and back again--communication over distance within neurons. *J Neurosci*, 31, 16045-8.
- FELLNER, T., LACKNER, D. H., HOMBAUER, H., PIRIBAUER, P., MUDRAK, I., ZARAGOZA, K., JUNO, C. & OGRIS, E. 2003. A novel and essential mechanism determining specificity and activity of protein phosphatase 2A (PP2A) in vivo. *Genes Dev*, 17, 2138-50.
- FOUNTOULAKIS, M., HARDMAIER, R., SCHULLER, E. & LUBEC, G. 2000. Differences in protein level between neonatal and adult brain. *ELECTROPHORESIS*, 21, 673-678.
- GALECKI, P., SZEMRAJ, J., BIENKIEWICZ, M., FLORKOWSKI, A. & GALECKA, E. 2009. Lipid peroxidation and antioxidant protection in patients during acute depressive episodes and in remission after fluoxetine treatment. *Pharmacol Rep*, 61, 436-47.
- GIANFRANCESCHI, L., SICILIANO, R., WALLS, J., MORALES, B., KIRKWOOD, A., HUANG, Z. J., TONEGAWA, S. & MAFFEI, L. 2003. Visual cortex is rescued from the effects of dark rearing by overexpression of BDNF. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100, 12486-91.
- GOMES, A. V., ZONG, C., EDMONDSON, R. D., LI, X., STEFANI, E., ZHANG, J., JONES, R. C., THYPARAMBIL, S., WANG, G. W., QIAO, X., BARDAG-GORCE, F. & PING, P. 2006. Mapping the murine cardiac 26S proteasome complexes. *Circ Res*, 99, 362-71.
- GORREN, A. C. & MAYER, B. 2002. Tetrahydrobiopterin in nitric oxide synthesis: a novel biological role for pteridines. *Curr Drug Metab*, 3, 133-57.
- GRAHAM, B. H., LI, Z., ALESII, E. P., VERSTEKEN, P., LEE, C., WANG, J. & CRAIGEN, W. J. 2010. Neurologic dysfunction and male infertility in Drosophila porin mutants: a new model for mitochondrial dysfunction and disease. *J Biol Chem*, 285, 11143-53.
- GU, Q. 2002. Neuromodulatory transmitter systems in the cortex and their role in cortical plasticity. *Neuroscience*, 111, 815-35.
- GYGI, S. P., ROCHON, Y., FRANZA, B. R. & AEBERSOLD, R. 1999. Correlation between Protein and mRNA Abundance in Yeast. *Molecular and Cellular Biology*, 19, 1720-1730.
- HAJSZAN, T., MACLUSKY, N. J. & LERANTH, C. 2005. Short-term treatment with the antidepressant fluoxetine triggers pyramidal dendritic spine synapse formation in rat hippocampus. *Eur J Neurosci*, 21, 1299-303.
- HAMILTON, A. M., OH, W. C., VEGA-RAMIREZ, H., STEIN, I. S., HELL, J. W., PATRICK, G. N. & ZITO, K. 2012. Activity-dependent growth of new dendritic spines is regulated by the proteasome. *Neuron*, 74, 1023-30.
- HAMMER, O. & HARPER, D. A. T. A. R., P. D. 2001. PAST: PALEONTOLOGICAL STATISTICS SOFTWARE PACKAGE FOR EDUCATION AND DATA ANALYSIS. *Palaeontologia Electronica*, 4, 9.
- HARAUZOV, A., SPOLIDORO, M., DICRISTO, G., DE PASQUALE, R., CANCEDDA, L., PIZZORUSSO, T., VIEGI, A., BERARDI, N. & MAFFEI, L. 2010. Reducing intracortical inhibition in the adult visual cortex promotes ocular dominance plasticity. *J Neurosci*, 30, 361-71.
- HE, H. Y., RAY, B., DENNIS, K. & QUINLAN, E. M. 2007. Experience-dependent recovery of vision following chronic deprivation amblyopia. *Nat Neurosci*, 10, 1134-6.
- HEISLER, F. F., LOEBRICH, S., PECHMANN, Y., MAIER, N., ZIVKOVIC, A. R., TOKITO, M., HAUSRAT, T. J., SCHWEIZER, M., BAHRING, R., HOLZBAUR, E. L., SCHMITZ, D. & KNEUSSEL, M. 2011. Musclin regulates actin filament- and microtubule-based GABA(A) receptor transport in neurons. *Neuron*, 70, 66-81.
- HENSCH, T. K. 2005. Critical period plasticity in local cortical circuits. *Nat Rev Neurosci*, 6, 877-88.
- HENSCH, T. K., FAGIOLINI, M., MATAGA, N., STRYKER, M. P., BAEKKESKOV, S. & KASH, S. F. 1998. Local GABA Circuit Control of Experience-Dependent Plasticity in Developing Visual Cortex. *Science*, 282, 1504-1508.
- HERMOPHARMA 2012.
- HIROKAWA, N., NIWA, S. & TANAKA, Y. 2010. Molecular motors in neurons: transport mechanisms and roles in brain function, development, and disease. *Neuron*, 68, 610-38.
- HOLMES, J. & CLARKE, M. 2006. Amblyopia. *Lancet*, 367, 1343-1351.

- HOOKS, B. M. & CHEN, C. 2007. Critical Periods in the Visual System: Changing Views for a Model of Experience-Dependent Plasticity. *Neuron*, 56, 312-326.
- HOTULAINEN, P. & HOOGENRAAD, C. C. 2010. Actin in dendritic spines: connecting dynamics to function. *J Cell Biol*, 189, 619-29.
- HU, D., KLANN, E. & THIELS, E. 2007. Superoxide dismutase and hippocampal function: age and isozyme matter. *Antioxid Redox Signal*, 9, 201-10.
- HUANG, G. J., BEN-DAVID, E., TORTIELLA, A., EDWARDS, A., FLINT, J. & SHIFMAN, S. 2012. Neurogenomic evidence for a shared mechanism of the antidepressant effects of exercise and chronic fluoxetine in mice. *PLoS One*, 7, e35901.
- HUANG, Z. J., KIRKWOOD, A., PIZZORUSSO, T., PORCIATTI, V., MORALES, B., BEAR, M. F., MAFFEI, L. & TONEGAWA, S. 1999. BDNF regulates the maturation of inhibition and the critical period of plasticity in mouse visual cortex. *Cell*, 98, 739-55.
- HUH, G. S., BOULANGER, L. M., DU, H., RIQUELME, P. A., BROTZ, T. M. & SHATZ, C. J. 2000. Functional requirement for class I MHC in CNS development and plasticity. *Science*, 290, 2155-9.
- ICHIHARA, A. & GREENBERG, D. M. 1955. PATHWAY OF SERINE FORMATION FROM CARBOHYDRATE IN RAT LIVER. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 41, 605-609.
- IDE, M. & LEWIS, D. A. 2010. Altered cortical CDC42 signaling pathways in schizophrenia: implications for dendritic spine deficits. *Biol Psychiatry*, 68, 25-32.
- JACKSON, K. J., WANG, J. B., BARBIER, E., CHEN, X. & DAMAJ, M. I. 2012. Acute behavioral effects of nicotine in male and female HINT1 knockout mice. *Genes Brain Behav*.
- JENSEN, L. J., KUHN, M., STARK, M., CHAFFRON, S., CREEVEY, C., MULLER, J., DOERKS, T., JULIEN, P., ROTH, A., SIMONOVIC, M., BORK, P. & VON MERING, C. 2009. STRING 8--a global view on proteins and their functional interactions in 630 organisms. *Nucleic Acids Res*, 37, D412-6.
- KARPOVA, N. N., LINDHOLM, J., PRUUNSILD, P., TIMMUSK, T. & CASTREN, E. 2009. Long-lasting behavioural and molecular alterations induced by early postnatal fluoxetine exposure are restored by chronic fluoxetine treatment in adult mice. *Eur Neuropsychopharmacol*, 19, 97-108.
- KAUNDAL, M. & SHARMA, S. 2011. Analysis of isoproterenol-induced changes in gastrocnemius muscle and serum lactate dehydrogenase expression in mice. *Singapore Med J*, 52, 274-82.
- KAWAKAMI, Y., YOSHIDA, K., YANG, J. H., SUZUKI, T., AZUMA, N., SAKAI, K., HASHIKAWA, T., WATANABE, M., YASUDA, K., KUHARA, S., HIRABAYASHI, Y. & FURUYA, S. 2009. Impaired neurogenesis in embryonic spinal cord of Phgdh knockout mice, a serine deficiency disorder model. *Neurosci Res*, 63, 184-93.
- KESSELS, M. M., SCHWINTZER, L., SCHLOBINSKI, D. & QUALMANN, B. 2011. Controlling actin cytoskeletal organization and dynamics during neuronal morphogenesis. *Eur J Cell Biol*, 90, 926-33.
- KIM, D. H., LI, H., YOO, K. Y., LEE, B. H., HWANG, I. K. & WON, M. H. 2007. Effects of fluoxetine on ischemic cells and expressions in BDNF and some antioxidants in the gerbil hippocampal CA1 region induced by transient ischemia. *Exp Neurol*, 204, 748-58.
- KIM, I. H., RACZ, B., WANG, H., BURIANEK, L., WEINBERG, R., YASUDA, R., WETSEL, W. C. & SODERLING, S. H. 2013. Disruption of Arp2/3 results in asymmetric structural plasticity of dendritic spines and progressive synaptic and behavioral abnormalities. *J Neurosci*, 33, 6081-92.
- KIORPES, L., KIPER, D. C., O'KEEFE, L. P., CAVANAUGH, J. R. & MOVSHON, J. A. 1998. Neuronal correlates of amblyopia in the visual cortex of macaque monkeys with experimental strabismus and anisometropia. *J Neurosci*, 18, 6411-24.
- LA TORRE, A., DEL MAR MASDEU, M., COTRUFO, T., MOUBARAK, R. S., DEL RIO, J. A., COMELLA, J. X., SORIANO, E. & URENA, J. M. 2013. A role for the tyrosine kinase ACK1 in neurotrophin signaling and neuronal extension and branching. *Cell Death Dis*, 4, e602.

- LACHANCE, P. E. & CHAUDHURI, A. 2004. Microarray analysis of developmental plasticity in monkey primary visual cortex. *J Neurochem*, 88, 1455-69.
- LEAMEY, C. A., VAN WART, A. & SUR, M. 2009. Intrinsic patterning and experience-dependent mechanisms that generate eye-specific projections and binocular circuits in the visual pathway. *Current Opinion in Neurobiology*, 19, 181-187.
- LEEMHUIS, J., BOUCHE, E., FROTSCHER, M., HENLE, F., HEIN, L., HERZ, J., MEYER, D. K., PICHLER, M., ROTH, G., SCHWAN, C. & BOCK, H. H. 2010. Reelin signals through apolipoprotein E receptor 2 and Cdc42 to increase growth cone motility and filopodia formation. *J Neurosci*, 30, 14759-72.
- LEMASTERS, J. J. & HOLMUHAMEDOV, E. 2006. Voltage-dependent anion channel (VDAC) as mitochondrial governor--thinking outside the box. *Biochim Biophys Acta*, 1762, 181-90.
- LEVAY, S., WIESEL, T. N. & HUBEL, D. H. 1980. The development of ocular dominance columns in normal and visually deprived monkeys. *J Comp Neurol*, 191, 1-51.
- LEVENE, H. 1960. Robust tests for equality of variances. *Stanford University Press*, 278-292.
- LEVY, M., FAAS, G. C., SAGGAU, P., CRAIGEN, W. J. & SWEATT, J. D. 2003. Mitochondrial regulation of synaptic plasticity in the hippocampus. *J Biol Chem*, 278, 17727-34.
- LI, P., PRASAD, S. S., MITCHELL, D. E., HACHISUKA, A., SAWADA, J. I., AL-HOUSSEINI, A. M. & GU, Q. 2006. Postnatal expression profile of OBCAM implies its involvement in visual cortex development and plasticity. *Cereb Cortex*, 16, 291-9.
- LI, Y., HE, L., CHEN, Q. & ZHOU, Y. 2007a. Changes of micro-opioid receptors and GABA in visual cortex of chronic morphine treated rats. *Neurosci Lett*, 428, 11-6.
- LI, Y., WANG, H., NIU, L. & ZHOU, Y. 2007b. Chronic morphine exposure alters the dendritic morphology of pyramidal neurons in visual cortex of rats. *Neurosci Lett*, 418, 227-31.
- LI, Z., VAN AELST, L. & CLINE, H. T. 2000. Rho GTPases regulate distinct aspects of dendritic arbor growth in *Xenopus* central neurons in vivo. *Nat Neurosci*, 3, 217-25.
- LIU, Q., PUCHE, A. & WANG, J. 2008. Distribution and Expression of Protein Kinase C Interactive Protein (PKCI/HINT1) in Mouse Central Nervous System (CNS). *Neurochemical Research*, 33, 1263-1276.
- LOMBARDI, D. & MILEO, A. M. 2003. Protein interactions provide new insight into Nm23/nucleoside diphosphate kinase functions. *J Bioenerg Biomembr*, 35, 67-71.
- LYCKMAN, A. W., HORNG, S., LEAMEY, C. A., TROPEA, D., WATAKABE, A., VAN WART, A., MCCURRY, C., YAMAMORI, T. & SUR, M. 2008. Gene expression patterns in visual cortex during the critical period: synaptic stabilization and reversal by visual deprivation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105, 9409-14.
- MAJDAN, M. & SHATZ, C. J. 2006. Effects of visual experience on activity-dependent gene regulation in cortex. *Nat Neurosci*, 9, 650-9.
- MALBERG, J. E., EISCH, A. J., NESTLER, E. J. & DUMAN, R. S. 2000. Chronic antidepressant treatment increases neurogenesis in adult rat hippocampus. *J Neurosci*, 20, 9104-10.
- MAN, H. Y., JU, W., AHMADIAN, G. & WANG, Y. T. 2000. Intracellular trafficking of AMPA receptors in synaptic plasticity. *Cell Mol Life Sci*, 57, 1526-34.
- MANCZAK, M., SHEIKO, T., CRAIGEN, W. J. & REDDY, P. H. 2013. Reduced VDAC1 Protects Against Alzheimer's Disease, Mitochondria, and Synaptic Deficiencies. *J Alzheimers Dis*, 37, 679-690.
- MARTINS-DE-SOUZA, D., GUEST, P. C., HARRIS, L. W., VANATTOU-SAIFOUNDINE, N., WEBSTER, M. J., RAHMOUNE, H. & BAHN, S. 2012. Identification of proteomic signatures associated with depression and psychotic depression in post-mortem brains from major depression patients. *Transl Psychiatry*, 2, e87.
- MATSUURA, K., NAKAMURA-HIROTA, T., TAKANO, M., OTANI, M., KADOYAMA, K. & MATSUYAMA, S. 2013. Proteomic analysis of time-dependent changes in proteins expressed in mouse hippocampus during synaptic plasticity induced by GABA receptor blockade. *Neurosci Lett*.

- MAUNA, J. C., MIYAMAE, T., PULLI, B. & THIELS, E. 2011. Protein phosphatases 1 and 2A are both required for long-term depression and associated dephosphorylation of cAMP response element binding protein in hippocampal area CA1 in vivo. *Hippocampus*, 21, 1093-104.
- MAYA-VETENCOURT, J. F., BARONCELLI, L., VIEGI, A., TIRABOSCHI, E., CASTREN, E., CATTANEO, A. & MAFFEI, L. 2012. IGF-1 restores visual cortex plasticity in adult life by reducing local GABA levels. *Neural Plast*, 2012, 250421.
- MAYA-VETENCOURT, J. F. & ORIGLIA, N. 2012. Visual cortex plasticity: a complex interplay of genetic and environmental influences. *Neural Plast*, 2012, 631965.
- MAYA VETENCOURT, J., CALEO, M. & MAFFEI, L. 2009 Frontiers of neural plasticity: can we treat amblyopia in adulthood? . *Opht. Int. Winter* 45-50.
- MAYA VETENCOURT, J. F., SALE, A., VIEGI, A., BARONCELLI, L., DE PASQUALE, R., O'LEARY, O. F., CASTREN, E. & MAFFEI, L. 2008. The antidepressant fluoxetine restores plasticity in the adult visual cortex. *Science*, 320, 385-8.
- MAYA VETENCOURT, J. F., TIRABOSCHI, E., SPOLIDORO, M., CASTREN, E. & MAFFEI, L. 2011. Serotonin triggers a transient epigenetic mechanism that reinstates adult visual cortex plasticity in rats. *Eur J Neurosci*, 33, 49-57.
- MCGEE, A. W., YANG, Y., FISCHER, Q. S., DAW, N. W. & STRITTMATTER, S. M. 2005. Experience-Driven Plasticity of Visual Cortex Limited by Myelin and Nogo Receptor. *Science*, 309, 2222-2226.
- MCPHERSON, P. S. & RITTER, B. 2005. Peptide motifs: building the clathrin machinery. *Mol Neurobiol*, 32, 73-87.
- MITTELMAN, D. 2003. Amblyopia. *Pediatr Clin North Am*, 50, 189-96.
- MORETTI, M., BUDNI, J., DOS SANTOS, D. B., ANTUNES, A., DAUFENBACH, J. F., MANOSSO, L. M., FARINA, M. & RODRIGUES, A. L. 2013. Protective effects of ascorbic acid on behavior and oxidative status of restraint-stressed mice. *J Mol Neurosci*, 49, 68-79.
- MORETTI, M., COLLA, A., DE OLIVEIRA BALEN, G., DOS SANTOS, D. B., BUDNI, J., DE FREITAS, A. E., FARINA, M. & SEVERO RODRIGUES, A. L. 2012. Ascorbic acid treatment, similarly to fluoxetine, reverses depressive-like behavior and brain oxidative damage induced by chronic unpredictable stress. *J Psychiatr Res*, 46, 331-40.
- MORISHITA, H. & HENSCH, T. K. 2008. Critical period revisited: impact on vision. *Curr Opin Neurobiol*, 18, 101-7.
- MURAKOSHI, H., WANG, H. & YASUDA, R. 2011. Local, persistent activation of Rho GTPases during plasticity of single dendritic spines. *Nature*, 472, 100-4.
- MURSHID, A., SRIVASTAVA, A., KUMAR, R. & PRESLEY, J. F. 2006. Characterization of the localization and function of NECAP 1 in neurons. *J Neurochem*, 98, 1746-62.
- MUSILLI, M., NICOLIA, V., BORRELLI, S., SCARPA, S. & DIANA, G. 2013. Behavioral effects of Rho GTPase modulation in a model of Alzheimer's disease. *Behav Brain Res*, 237, 223-9.
- NAKAMURA, Y., WOOD, C. L., PATTON, A. P., JAAFARI, N., HENLEY, J. M., MELLOR, J. R. & HANLEY, J. G. 2011. PICK1 inhibition of the Arp2/3 complex controls dendritic spine size and synaptic plasticity. *EMBO J*, 30, 719-30.
- NESTLER, E. J. 1998. Antidepressant treatments in the 21st century. *Biol Psychiatry*, 44, 526-33.
- NETTER, F. H. 2010. *Atlas of Human Anatomy*.
- NEUHOFF, H., SASSOE-POGNETTO, M., PANZANELLI, P., MAAS, C., WITKE, W. & KNEUSSEL, M. 2005. The actin-binding protein profilin I is localized at synaptic sites in an activity-regulated manner. *Eur J Neurosci*, 21, 15-25.
- NIBUYA, M., MORINOBU, S. & DUMAN, R. S. 1995. Regulation of BDNF and trkB mRNA in rat brain by chronic electroconvulsive seizure and antidepressant drug treatments. *J Neurosci*, 15, 7539-47.
- OKADA, S. F., O'NEAL, W. K., HUANG, P., NICHOLAS, R. A., OSTROWSKI, L. E., CRAIGEN, W. J., LAZAROWSKI, E. R. & BOUCHER, R. C. 2004. Voltage-dependent Anion Channel-1 (VDAC-1)

- Contributes to ATP Release and Cell Volume Regulation in Murine Cells. *The Journal of General Physiology*, 124, 513-526.
- OLSON, B. J. S. C. & MARKWELL, J. 2001. Assays for Determination of Protein Concentration. *Current Protocols in Protein Science*. John Wiley & Sons, Inc.
- OSSIPOW, V., PELLISSIER, F., SCHAAD, O. & BALLIVET, M. 2004. Gene expression analysis of the critical period in the visual cortex. *Mol Cell Neurosci*, 27, 70-83.
- PALACIOS, F., COTA, G., HORJALES, S., LIMA, A., BATTISTONI, J., SOTELO-SILVEIRA, J. & MARIN, M. 2010. An antibody-based affinity chromatography tool to assess Cu, Zn superoxide dismutase (SOD) G93A structural complexity in vivo. *Biotechnol J*, 5, 328-34.
- PARK, J. J., CAWLEY, N. X. & LOH, Y. P. 2008. A bi-directional carboxypeptidase E-driven transport mechanism controls BDNF vesicle homeostasis in hippocampal neurons. *Mol Cell Neurosci*, 39, 63-73.
- PARK, M., WATANABE, S., POON, V. Y., OU, C. Y., JORGENSEN, E. M. & SHEN, K. 2011. CYY-1/cyclin Y and CDK-5 differentially regulate synapse elimination and formation for rewiring neural circuits. *Neuron*, 70, 742-57.
- PHILIP, N., ACEVEDO, S. F. & SKOULAKIS, E. M. 2001. Conditional rescue of olfactory learning and memory defects in mutants of the 14-3-3zeta gene leonardo. *J Neurosci*, 21, 8417-25.
- PINEYRO, G. & BLIER, P. 1999. Autoregulation of serotonin neurons: role in antidepressant drug action. *Pharmacol Rev*, 51, 533-91.
- PIZZORUSSO, T., MEDINI, P., BERARDI, N., CHERZI, S., FAWCETT, J. W. & MAFFEI, L. 2002. Reactivation of ocular dominance plasticity in the adult visual cortex. *Science*, 298, 1248-51.
- POLLARD, T. D., BLANCHOIN, L. & MULLINS, R. D. 2000. Molecular mechanisms controlling actin filament dynamics in nonmuscle cells. *Annu Rev Biophys Biomol Struct*, 29, 545-76.
- POON, H. F., SHEPHERD, H. M., REED, T. T., CALABRESE, V., STELLA, A. M., PENNISI, G., CAI, J., PIERCE, W. M., KLEIN, J. B. & BUTTERFIELD, D. A. 2006. Proteomics analysis provides insight into caloric restriction mediated oxidation and expression of brain proteins associated with age-related impaired cellular processes: Mitochondrial dysfunction, glutamate dysregulation and impaired protein synthesis. *Neurobiol Aging*, 27, 1020-34.
- PORCIATTI, V., PIZZORUSSO, T. & MAFFEI, L. 1999. The visual physiology of the wild type mouse determined with pattern VEPs. *Vision Res*, 39, 3071-81.
- POSTEL, E. H. 2003. Multiple biochemical activities of NM23/NDP kinase in gene regulation. *J Bioenerg Biomembr*, 35, 31-40.
- PRASAD, S. S., KOJIC, L. Z., LI, P., MITCHELL, D. E., HACHISUKA, A., SAWADA, J., GU, Q. & CYNADER, M. S. 2002. Gene expression patterns during enhanced periods of visual cortex plasticity. *Neuroscience*, 111, 35-45.
- PRETSCH, W., CHATTERJEE, B., FAVOR, J., MERKLE, S. & SANDULACHE, R. 1998. Molecular, genetic and biochemical characterization of lactate dehydrogenase-A enzyme activity mutations in *Mus musculus*. *Mamm Genome*, 9, 144-9.
- PRETSCH, W., MERKLE, S., FAVOR, J. & WERNER, T. 1993. A mutation affecting the lactate dehydrogenase locus *Ldh-1* in the mouse. II. Mechanism of the LDH-A deficiency associated with hemolytic anemia. *Genetics*, 135, 161-70.
- PRUSKY, G. T. & DOUGLAS, R. M. 2003. Developmental plasticity of mouse visual acuity. *European Journal of Neuroscience*, 17, 167-173.
- PURVES, D., AUGUSTINE, G. J., FITZPATRICK, D., HALL, W. C., LAMANTIA, A.-S., MCNAMARA, J. O. & WILLIAMS, S. M. (eds.) 2004. *Principles of neuroscience*.
- PUTIGNANO, E., LONETTI, G., CANCEDDA, L., RATTO, G., COSTA, M., MAFFEI, L. & PIZZORUSSO, T. 2007. Developmental downregulation of histone posttranslational modifications regulates visual cortical plasticity. *Neuron*, 53, 747-59.
- RAMAKERS, G. J., WOLFER, D., ROSENBERGER, G., KUCHENBECKER, K., KREIENKAMP, H. J., PRANGEKIEL, J., RUNE, G., RICHTER, K., LANGNAESE, K., MASNEUF, S., BOSL, M. R., FISCHER, K. D., KRUGERS, H. J., LIPP, H. P., VAN GALEN, E. & KUTSCHE, K. 2012. Dysregulation of Rho

- GTPases in the alphaPix/Arhgef6 mouse model of X-linked intellectual disability is paralleled by impaired structural and synaptic plasticity and cognitive deficits. *Hum Mol Genet*, 21, 268-86.
- RANTAMAKI, T., HENDOLIN, P., KANKAANPAA, A., MIJATOVIĆ, J., PIEPPONEN, P., DOMENICI, E., CHAO, M. V., MANNISTO, P. T. & CASTREN, E. 2007. Pharmacologically diverse antidepressants rapidly activate brain-derived neurotrophic factor receptor TrkB and induce phospholipase-Cgamma signaling pathways in mouse brain. *Neuropsychopharmacology*, 32, 2152-62.
- RATHOUR, N. P., SINGH, P. P. & SINGH, V. N. 1997. Changes in LDH isozyme pattern in uterine fluid of mice during early pregnancy. *Horm Metab Res*, 29, 462-4.
- REZVANI, K., BAALMAN, K., TENG, Y., MEE, M. P., DAWSON, S. P., WANG, H., DE BIASI, M. & MAYER, R. J. 2012. Proteasomal degradation of the metabotropic glutamate receptor 1alpha is mediated by Homer-3 via the proteasomal S8 ATPase: Signal transduction and synaptic transmission. *J Neurochem*, 122, 24-37.
- RITTER, B., PHILIE, J., GIRARD, M., TUNG, E. C., BLONDEAU, F. & MCPHERSON, P. S. 2003. Identification of a family of endocytic proteins that define a new alpha-adaptin ear-binding motif. *EMBO Rep*, 4, 1089-95.
- RIVERA, H. M. & BETHEA, C. L. 2013. Ovarian steroids increase PSD-95 expression and dendritic spines in the dorsal raphe of ovariectomized macaques. *Synapse*.
- ROCCA, D. L., AMICI, M., ANTONIOU, A., SUAREZ, E. B., HALEMANI, N., MURK, K., MCGARVEY, J., JAAFARI, N., MELLOR, J. R., COLLINGRIDGE, G. L. & HANLEY, J. G. 2013. The small GTPase Arf1 modulates Arp2/3-mediated actin polymerization via PICK1 to regulate synaptic plasticity. *Neuron*, 79, 293-307.
- ROCCA, D. L., MARTIN, S., JENKINS, E. L. & HANLEY, J. G. 2008. Inhibition of Arp2/3-mediated actin polymerization by PICK1 regulates neuronal morphology and AMPA receptor endocytosis. *Nat Cell Biol*, 10, 259-71.
- RODRÍGUEZ-MUÑOZ, M., SÁNCHEZ-BLÁZQUEZ, P., VICENTE-SÁNCHEZ, A., BAILÓN, C., MARTÍN-AZNAR, B. & GARZÓN, J. 2011. The histidine triad nucleotide-binding protein 1 supports mu-opioid receptor–glutamate NMDA receptor cross-regulation. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 68, 2933-2949.
- ROSEN, D. R., SIDDIQUE, T., PATTERSON, D., FIGLEWICZ, D. A., SAPP, P., HENTATI, A., DONALDSON, D., GOTO, J., O'REGAN, J. P., DENG, H. X. & ET AL. 1993. Mutations in Cu/Zn superoxide dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis. *Nature*, 362, 59-62.
- RUBIO, F. J., AMPUERO, E., SANDOVAL, R., TOLEDO, J., PANCETTI, F. & WYNEKEN, U. 2013. Long-term fluoxetine treatment induces input-specific LTP and LTD impairment and structural plasticity in the CA1 hippocampal subfield. *Front Cell Neurosci*, 7, 66.
- SALE, A., MAYA VETENCOURT, J. F., MEDINI, P., CENNI, M. C., BARONCELLI, L., DE PASQUALE, R. & MAFFEI, L. 2007. Environmental enrichment in adulthood promotes amblyopia recovery through a reduction of intracortical inhibition. *Nat Neurosci*, 10, 679-81.
- SBAI, O., FERHAT, L., BERNARD, A., GUEYE, Y., OULD-YAHOUI, A., THIOULLOY, S., CHARRAT, E., CHARTON, G., TREMBLAY, E., RISSO, J. J., CHAUVIN, J. P., ARSANTO, J. P., RIVERA, S. & KHRESTCHATISKY, M. 2008. Vesicular trafficking and secretion of matrix metalloproteinases-2, -9 and tissue inhibitor of metalloproteinases-1 in neuronal cells. *Mol Cell Neurosci*, 39, 549-68.
- SCHAPITZ, I. U., BEHREND, B., PECHMANN, Y., LAPPE-SIEFKE, C., KNEUSSEL, S. J., WALLACE, K. E., STEMPPEL, A. V., BUCK, F., GRANT, S. G., SCHWEIZER, M., SCHMITZ, D., SCHWARZ, J. R., HOLZBAUR, E. L. & KNEUSSEL, M. 2010. Neuroligin 1 is dynamically exchanged at postsynaptic sites. *J Neurosci*, 30, 12733-44.
- SCHMITZ, A. A., GOVEK, E. E., BOTTFNER, B. & VAN AELST, L. 2000. Rho GTPases: signaling, migration, and invasion. *Exp Cell Res*, 261, 1-12.

- SCHNABEL, R., KILPATRICK, I. C. & COLLINGRIDGE, G. L. 2001. Protein phosphatase inhibitors facilitate DHPG-induced LTD in the CA1 region of the hippocampus. *Br J Pharmacol*, 132, 1095-101.
- SERAFEIM, A., HOLDER, M. J., GRAFTON, G., CHAMBA, A., DRAYSON, M. T., LUONG, Q. T., BUNCE, C. M., GREGORY, C. D., BARNES, N. M. & GORDON, J. 2003. Selective serotonin reuptake inhibitors directly signal for apoptosis in biopsy-like Burkitt lymphoma cells. *Blood*, 101, 3212-9.
- SHATZ, C. J. 2009. MHC class I: an unexpected role in neuronal plasticity. *Neuron*, 64, 40-5.
- SHATZ, C. J. & STRYKER, M. P. 1978. Ocular dominance in layer IV of the cat's visual cortex and the effects of monocular deprivation. *J Physiol*, 281, 267-83.
- SHEN, W., WU, B., ZHANG, Z., DOU, Y., RAO, Z. R., CHEN, Y. R. & DUAN, S. 2006. Activity-induced rapid synaptic maturation mediated by presynaptic cdc42 signaling. *Neuron*, 50, 401-14.
- SIN, W. C., HAAS, K., RUTHAZER, E. S. & CLINE, H. T. 2002. Dendrite growth increased by visual activity requires NMDA receptor and Rho GTPases. *Nature*, 419, 475-80.
- SNELL, K. 1984. Enzymes of serine metabolism in normal, developing and neoplastic rat tissues. *Adv Enzyme Regul*, 22, 325-400.
- SONTAG, J. M., NUNBHAKDI-CRAIG, V., WHITE, C. L., 3RD, HALPAIN, S. & SONTAG, E. 2012. The protein phosphatase PP2A/B α binds to the microtubule-associated proteins Tau and MAP2 at a motif also recognized by the kinase Fyn: implications for tauopathies. *J Biol Chem*, 287, 14984-93.
- SPOLIDORO, M., BARONCELLI, L., PUTIGNANO, E., MAYA-VETENCOURT, J. F., VIEGI, A. & MAFFEI, L. 2011. Food restriction enhances visual cortex plasticity in adulthood. *Nat Commun*, 2, 320.
- STEPHENS, M. A. 1970. Use of the Kolmogorov-Smirnov, Cramer-von Mises and related statistics without extensive tables. *Journal of the Royal Statistical Society*, 32, 115-122.
- SYKEN, J., GRANDPRE, T., KANOLD, P. O. & SHATZ, C. J. 2006. PirB restricts ocular-dominance plasticity in visual cortex. *Science*, 313, 1795-800.
- SZABO, Z., YING, Z., RADAK, Z. & GOMEZ-PINILLA, F. 2010. Voluntary exercise may engage proteasome function to benefit the brain after trauma. *Brain Res*, 1341, 25-31.
- TAHA, S. & STRYKER, M. P. 2002. Rapid ocular dominance plasticity requires cortical but not geniculate protein synthesis. *Neuron*, 34, 425-36.
- TANIURA, H., SNG, J. C. & YONEDA, Y. 2007. Histone modifications in the brain. *Neurochem Int*, 51, 85-91.
- TIRABOSCHI, E., GUIRADO, R., GRECO, D., AUVINEN, P., MAYA-VETENCOURT, J. F., MAFFEI, L. & CASTREN, E. 2013. Gene expression patterns underlying the reinstatement of plasticity in the adult visual system. *Neural Plast*, 2013, 605079.
- TRAUB, L. M. 2009. Tickets to ride: selecting cargo for clathrin-regulated internalization. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 10, 583-96.
- TROPEA, D., KREIMAN, G., LYCKMAN, A., MUKHERJEE, S., YU, H., HORNG, S. & SUR, M. 2006. Gene expression changes and molecular pathways mediating activity-dependent plasticity in visual cortex. *Nat Neurosci*, 9, 660-8.
- TROPEA, D., VAN WART, A. & SUR, M. 2009. Molecular mechanisms of experience-dependent plasticity in visual cortex. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 364, 341-55.
- TURNER, A. J., PONZIO, F. & ALGERI, S. 1974. Dihydropteridine reductase in rat brain: regional distribution and the effect of catecholamine-depleting drugs. *Brain Res*, 70, 553-8.
- UJWAL, R., CASCIO, D., COLLETIER, J. P., FAHAM, S., ZHANG, J., TORO, L., PING, P. & ABRAMSON, J. 2008. The crystal structure of mouse VDAC1 at 2.3 Å resolution reveals mechanistic insights into metabolite gating. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105, 17742-7.
- VADODARIA, K. C. & JESSBERGER, S. 2013. Maturation and integration of adult born hippocampal neurons: signal convergence onto small Rho GTPases. *Front Synaptic Neurosci*, 5, 4.
- VAN DEN BERG, R. & HOOGENRAAD, C. C. 2012. Molecular motors in cargo trafficking and synapse assembly. *Adv Exp Med Biol*, 970, 173-96.

- VAN DEN BERGH, G. & ARCKENS, L. 2004. Fluorescent two-dimensional difference gel electrophoresis unveils the potential of gel-based proteomics. *Curr Opin Biotechnol*, 15, 38-43.
- VAN DEN BERGH, G., CLERENS, S., CNOPS, L., VANDESANDE, F. & ARCKENS, L. 2003a. Fluorescent two-dimensional difference gel electrophoresis and mass spectrometry identify age-related protein expression differences for the primary visual cortex of kitten and adult cat. *Journal of Neurochemistry*, 85, 193-205.
- VAN DEN BERGH, G., CLERENS, S., FIRESTEIN, B. L., BURNAT, K. & ARCKENS, L. 2006. Development and plasticity-related changes in protein expression patterns in cat visual cortex: a fluorescent two-dimensional difference gel electrophoresis approach. *Proteomics*, 6, 3821-32.
- VAN DEN BERGH, G., CLERENS, S., VANDESANDE, F. & ARCKENS, L. 2003b. Reversed-phase high-performance liquid chromatography prefractionation prior to two-dimensional difference gel electrophoresis and mass spectrometry identifies new differentially expressed proteins between striate cortex of kitten and adult cat. *ELECTROPHORESIS*, 24, 1471-1481.
- VAN HARTEN, J. 1993. Clinical pharmacokinetics of selective serotonin reuptake inhibitors. *Clin Pharmacokinet*, 24, 203-20.
- VARADARAJULU, J., LEBAR, M., KRISHNAMOORTHY, G., HABELT, S., LU, J., BERNARD WEINSTEIN, I., LI, H., HOLSBOER, F., TURCK, C. W. & TOUMA, C. 2011. Increased anxiety-related behaviour in Hint1 knockout mice. *Behav Brain Res*, 220, 305-11.
- VARADARAJULU, J., SCHMITT, A., FALKAI, P., ALSAIF, M., TURCK, C. W. & MARTINS-DE-SOUZA, D. 2012. Differential expression of HINT1 in schizophrenia brain tissue. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci*, 262, 167-72.
- WANG, J. W., DAVID, D. J., MONCKTON, J. E., BATTAGLIA, F. & HEN, R. 2008. Chronic fluoxetine stimulates maturation and synaptic plasticity of adult-born hippocampal granule cells. *J Neurosci*, 28, 1374-84.
- WANG, X., TAKATA, T., BAI, X., OU, F., YOKONO, K. & SAKURAI, T. 2012. Pyruvate prevents the inhibition of the long-term potentiation induced by amyloid-beta through protein phosphatase 2A inactivation. *J Alzheimers Dis*, 30, 665-73.
- WEEBER, E. J., LEVY, M., SAMPSON, M. J., ANFLOUS, K., ARMSTRONG, D. L., BROWN, S. E., SWEATT, J. D. & CRAIGEN, W. J. 2002. The role of mitochondrial porins and the permeability transition pore in learning and synaptic plasticity. *J Biol Chem*, 277, 18891-7.
- WEGNER, A. M., NEBHAN, C. A., HU, L., MAJUMDAR, D., MEIER, K. M., WEAVER, A. M. & WEBB, D. J. 2008. N-wasp and the arp2/3 complex are critical regulators of actin in the development of dendritic spines and synapses. *J Biol Chem*, 283, 15912-20.
- WEITZDOERFER, R., STOLZLECHNER, D., DIERSSEN, M., FERRERES, J., FOUNTOULAKIS, M. & LUBEC, G. 2001. Reduction of nucleoside diphosphate kinase B, Rab GDP-dissociation inhibitor beta and histidine triad nucleotide-binding protein in fetal Down syndrome brain. *J Neural Transm Suppl*, 347-59.
- WIESEL, T. N. & HUBEL, D. H. 1963. Single-Cell Responses in Striate Cortex of Kittens Deprived of Vision in One Eye. *J Neurophysiol*, 26, 1003-17.
- WIESEL, T. N. & HUBEL, D. H. 1965. Comparison of the effects of unilateral and bilateral eye closure on cortical unit responses in kittens. *J Neurophysiol*, 28, 1029-40.
- WOO, N. H. & NGUYEN, P. V. 2002. "Silent" metaplasticity of the late phase of long-term potentiation requires protein phosphatases. *Learn Mem*, 9, 202-13.
- WU, C. & HUNTER, D. G. 2006. Amblyopia: diagnostic and therapeutic options. *Am J Ophthalmol*, 141, 175-184.
- WU, K., LEN, G. W., MCAULIFFE, G., MA, C., TAI, J. P., XU, F. & BLACK, I. B. 2004. Brain-derived neurotrophic factor acutely enhances tyrosine phosphorylation of the AMPA receptor subunit GluR1 via NMDA receptor-dependent mechanisms. *Brain Res Mol Brain Res*, 130, 178-86.

- YANG, Y., FISCHER, Q. S., ZHANG, Y., BAUMGARTEL, K., MANSUY, I. M. & DAW, N. W. 2005. Reversible blockade of experience-dependent plasticity by calcineurin in mouse visual cortex. *Nat Neurosci*, 8, 791-6.
- YIU, G. & HE, Z. 2006. Glial inhibition of CNS axon regeneration. *Nature Reviews Neuroscience*, 7, 617-627.
- ZAFIR, A., ARA, A. & BANU, N. 2008. In vivo antioxidant status: a putative target of antidepressant action. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 33, 220-8.

14. Anexo.

Estudio funcional para evidenciar la presencia de plasticidad en la corteza visual inducida por el tratamiento crónico con fluoxetina en ratones.

Considerando que las evidencias que demuestran que el tratamiento crónico con fluoxetina en animales adultos restaura la plasticidad cortical provienen de estudios realizados en ratas (Maya Vetencourt et al., 2008, Maya Vetencourt et al., 2011), para confirmar que el efecto de la fluoxetina sobre la potenciación de la plasticidad cortical en el adulto es similar entre ratones y ratas, y así validar el modelo experimental de ratón, se realizó un estudio funcional en este. En ese sentido, se organizó una colaboración con el Istituto di Neuroscienze del CNR di Pisa, Italia, donde se obtuvieron anteriormente los datos en ratas.

En estos experimentos se verificó el efecto de la privación monocular (PM) en la binocularidad, en los ratones adultos controles y ratones adultos tratados crónicamente con fluoxetina. Para medir el nivel de plasticidad, se utilizó la metodología de registros electrofisiológicos *in vivo* siguiendo protocolos experimentales clásicos (ver detalles en Porciatti et al., 1999, Gianfranceschi et al., 2003). En particular, se registraron los potenciales evocados visuales (PEV) en la CV1 binocular contralateral al ojo privado de la visión, que son utilizados clásicamente como medida de la plasticidad (evaluación de la agudeza visual y de alteraciones binoculares). De esta forma se mide la respuesta en la corteza visual binocular a la estimulación del ojo ipsilateral y del ojo contralateral y luego se realiza la razón entre la respuesta contralateral/ipsilateral, índice que indica el grado de binocularidad. Se ha demostrado que la privación monocular modifica este índice durante el período crítico pero no en animales adultos, reflejando la presencia de plasticidad dependiente de la experiencia visual en animales jóvenes pero no en adultos. La binocularidad se midió en animales adultos controles (P98), animales adultos privados de la visión (durante 3 días de P95 a P98) y animales adultos privados de la visión tratados con fluoxetina (fluoxetina de P70 a P98, PM de P95 a P98). En el gráfico (fig. A1) se reporta el índice de binocularidad en animales adultos controles (P98) que es aprox. $2,59 \pm 0,46$, lo que demuestra la predominancia de proyecciones contralaterales. Mientras que, en animales adultos privados de la visión, la PM (3 días de P95 a P98) no modifica la binocularidad en la CV1 (razón PEV C/I $2,83 \pm 0,18$). Por el contrario, sí se observa un cambio significativo en los ratones adultos tratados con fluoxetina y privados de la visión en un ojo, lo que determina un cambio en la distribución de dominancia ocular en favor del ojo abierto (razón PEV C/I $1,34 \pm 0,04$; fluoxetina de P70 a P98, PM de P95 a P98). Estos experimentos demuestran que

en ratones adultos la fluoxetina también induce modificaciones plásticas de manera muy parecida a lo observado en ratas.

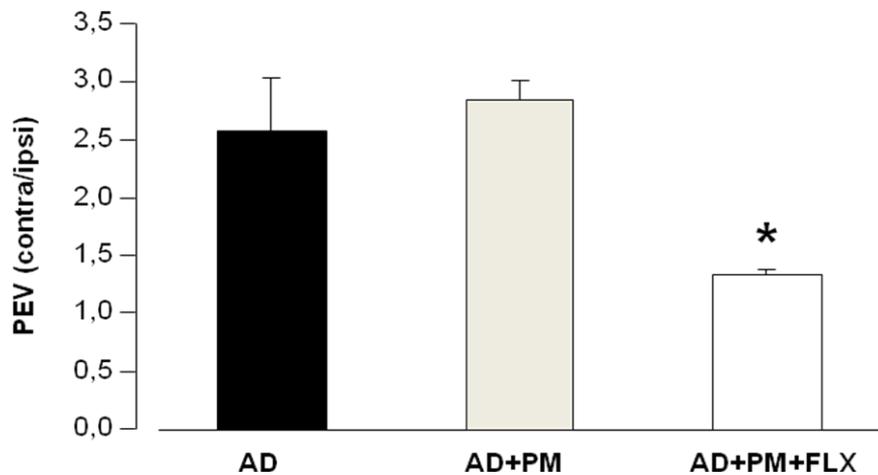


Figura A1: El gráfico muestra el índice de binocularidad en la corteza visual, que se calcula como la razón entre los potenciales evocados visuales (PEV) de la corteza visual contralateral/ipsilateral. La binocularidad se midió en animales adultos controles (AD, P98), animales adultos sometidos a privación monocular de la visión (durante 3 días de P95 a P98, AD+PM) y animales tratados crónicamente con fluoxetina por 4 semanas y sometidos a privación monocular de la visión (fluoxetina de P70 a P98, PM de P95 a P98, AD+PM+FLX). El asterisco indica diferencias estadísticamente significativas para test t de student, con un valor de $p < 0,05$ ($n=4$).

Procedimiento experimental

La dosis de fluoxetina se administró en una concentración de 0.1 mg/ml en el agua de los bebederos durante 4 semanas (de P70 a P98), tal como se realizó en los experimentos de proteómica. Para la PM (de P95 a P98) los animales fueron anestesiados con isoflurano (2% in O₂, 0.6 l/min) y los párpados fueron suturados utilizando utensilios de cirugía estériles. El cierre de los párpados y la cicatrización se verificaron diariamente, y se excluyeron del estudio sujetos con mínimas reaperturas espontáneas. Se vigiló para evitar inflamación o infección utilizando aplicaciones tópicas de antibióticos y cortisona.

Para el registro de electrofisiología *in vivo*, los animales fueron anestesiados con uretano (Sigma; 0,4 ml/hg, al 20% en solución salina i.p.) y colocados en un aparato de estereotaxia. Durante todo el experimento se registró la temperatura corporal manteniéndola a 37°C y se monitoreó de modo continuo electrocardiograma y electroencefalograma. Se procedió a la remoción de una parte pequeña del cráneo (4x4 mm) que recubre la corteza visual. Luego se removió la dura madre, y se insertó una micropipeta (2 MΩ) conteniendo NaCl 3M en la corteza en forma perpendicular al plano estereotáxico 3,2-3,5 mm lateral al punto lambda. Los ojos fueron mantenidos en posición fija y abiertos, utilizando anillos metálicos ajustables dispuestos en la porción externa del bulbo ocular.

Se analizaron posibles modificaciones de la binocularidad en la corteza visual registrando los Potenciales Evocados Visuales (PEV). Para esto, se bajó el electrodo a una profundidad de 100-400 μm en la corteza visual (CV) donde los PEV presentan amplitud máxima. La señal se registró con filtro pasa banda de 0.1-100 Hz, se amplificó y analizó mediante programas de computadora (Huang et al., 1999). Durante el registro a través de un ojo, el otro se cubrió con cinta adhesiva negra. Los estímulos visuales consistieron en bandas sinusoidales horizontales de distintas frecuencias espaciales y contraste (VSG2/2 card running custom software), presentados en una pantalla (20-22 cm; luminancia 15 cd/m²) posicionada a 20 cm de los ojos del animal y centrada en el campo receptivo. La binocularidad se determinó midiendo los PEV obtenidos en la CV estimulando el ojo contralateral y los PEV obtenidos estimulando el ojo ipsilateral a la corteza registrada. Luego se calculó la razón entre ambos (PEV contralateral/ipsilateral), el índice de binocularidad. Los PEV se registraron a tres penetraciones distintas en la corteza visual binocular y a 100 y 400 μm de profundidad a cada penetración.