

Tesis de Maestría

**Estudio de la expresión de variantes y de modificaciones
postraduccionales de histonas en un modelo de
plasticidad de la corteza visual.**

Lic. Natalia Bornia De León

Laboratorio de Neurociencias – “Unidad de Neuroplasticidad”

Facultad de Ciencias

UdelaR

Director de tesis: Dr. Francesco M. Rossi

Tribunal de tesis:

Presidente: Dra. Mónica Brauer

Vocales: Dra. Cecilia Scorza

Dra. Rosario Durán

TABLA DE CONTENIDOS

RESUMEN	5
INTRODUCCIÓN	7
Plasticidad neuronal dependiente de la experiencia	7
Organización anatómica y funcional del sistema visual en mamíferos.....	8
Rol de la experiencia visual en los procesos de plasticidad.....	10
Estrategias experimentales para censar la presencia de plasticidad cortical	13
Mecanismos funcionales y estructurales que controlan el periodo crítico de plasticidad en la corteza visual.....	13
Procesos inhibitorios regulan el nivel de plasticidad en la corteza visual.....	14
Componentes de la matriz extracelular son clave en la determinación del nivel de plasticidad.....	15
La maduración de la mielina intracortical disminuye la plasticidad.....	16
Las neurotrofinas median la plasticidad dependiente de la experiencia	16
Estrategias para la reactivación de la plasticidad en el adulto.....	18
La fluoxetina como estrategia de reactivación de la plasticidad.....	19
Regulación génica de la plasticidad	24
Mecanismos epigenéticos de regulación génica.....	24
Variantes de histonas y su impacto en la regulación génica.....	28
Regulación epigenética de la plasticidad en la corteza visual.....	33
Modificaciones epigenéticas inducidas por el tratamiento con fluoxetina.....	33
Técnica para el estudio de variantes de histonas y sus MPT	34
JUSTIFICACIÓN	36
OBJETIVOS	38
Objetivo general.....	38
Objetivos específicos.....	38
MATERIALES Y MÉTODOS	39
Mantenimiento y tratamiento de animales experimentales	39
Preparación de muestras experimentales.....	40

Extracción con sales	40
Extracción con ácido.....	40
Cuantificación proteica	41
Electroforesis unidimensional	41
SDS-PAGE para la separación unidimensional de histonas.	41
Geles unidimensionales de ácido acético-urea (AU).....	42
Western blot.....	43
Sobre geles SDS (dodecil sulfato de sodio).....	43
Sobre geles AU (ácido acético / urea)	44
Electroforesis bidimensional (2D).....	44
Primera dimensión: AUT (ácido acético, urea, Tritón X-100)	44
Segunda dimensión: SDS (dodecil sulfato de sodio)	45
Segunda dimensión: AU (ácido acético, urea).....	46
Tinción de los geles.	47
Tinción con nitrato de plata.....	47
Tinción con Coomassie coloidal	47
Tinción con azul de Coomassie	48
Experimentos de proteómica diferencial	48
Análisis de imágenes y obtención de datos	48
Detección de los spots	48
Comparación de los geles	49
Formación de clases y análisis intra-clase	49
Análisis estadístico	49
Espectrometría de masa	50
Análisis bioinformático a partir de los espectros de masa	51
RESULTADOS	53
PRIMERA PARTE. Puesta a punto de una estrategia metodológica específica para el estudio de histonas.	53
1.1. Producción de muestras de corteza visual enriquecidas en histonas para su análisis posterior	53
1.2. Puesta a punto de las metodologías de geles bidimensionales AUTxSDS y AUTxAU.	57

1.3. Selección de spots potencialmente correspondientes a histonas para su análisis posterior.....	63
SEGUNDA PARTE. Identificación de las variantes de histonas y otras proteínas presentes en la muestra, y estudio de la modulación de su expresión en función del nivel de plasticidad.	68
2.1 Identificación de las variantes de histonas y otras proteínas presentes en la muestra	68
2.2 Estudio de la modulación de la expresión de variantes de histonas y otras proteínas identificadas en función del nivel de plasticidad.	73
DISCUSIÓN	79
PRIMERA PARTE. Puesta a punto de una estrategia metodológica específica para el estudio de histonas.	79
Técnicas de extracción.	79
Técnicas de separación e identificación de variantes de histonas.	80
SEGUNDA PARTE. Identificación de las variantes de histonas y otras proteínas presentes en la muestra, y estudio de la modulación de su expresión en función del nivel de plasticidad.	83
Identificación de variantes de histonas en la corteza visual	83
Modulación de las variantes de histonas identificadas en función del nivel de plasticidad.	84
Identificación de otras proteínas no histonas presentes en la muestra, y modulación de su expresión.	87
CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS	93
BIBLIOGRAFIA.....	95

RESUMEN

La capacidad de los circuitos neuronales de modificar y reorganizar sus conexiones en respuesta a la experiencia se denomina plasticidad. Esta capacidad es muy alta durante periodos críticos del desarrollo y disminuye drásticamente con el pasar del tiempo. Existen varias patologías en las cuales los procesos de plasticidad son afectados, como en los síndromes de Rett y Down, autismo y esquizofrenia. Para identificar estrategias de tratamiento de estas patologías, es fundamental adquirir mayor conocimiento de los mecanismos moleculares subyacentes. La corteza visual primaria es uno de los modelos experimentales mejor caracterizados para el estudio de la plasticidad cerebral en los mamíferos. La hipótesis actual es que existen programas génicos diferenciales y específicos que determinan el nivel de plasticidad en estos circuitos neuronales. Uno de los principales mecanismos de regulación de la expresión génica son los mecanismos epigenéticos. En esta tesis proponemos analizar, utilizando una aproximación desde la proteómica, algunos procesos epigenéticos que determinan el nivel de plasticidad en la corteza visual de ratón; en particular, buscamos identificar cambios en el patrón de expresión y de modificaciones postraduccionales de las histonas en diferentes condiciones de plasticidad: alta, en animales jóvenes; reducida, en adultos; y reactivada mediante tratamiento farmacológico con el conocido antidepresivo fluoxetina en animales adultos.

La gran similitud en las propiedades fisicoquímica y de secuencia entre las variantes de histonas plantea un desafío metodológico, haciendo necesaria la implementación de una estrategia metodológica específica para el estudio de estas proteínas. En este trabajo se utilizaron muestras de corteza visual enriquecidas en histonas obtenidas por extracción ácida. La presencia de histonas fue confirmada por SDS-PAGE, Western blot y espectrometría de masa. Las muestras fueron sometidas a electroforesis en geles bidimensionales formulados especialmente para la separación de variantes de histonas y sus modificaciones postraduccionales (AUT/SDS y AUT/AU). Este análisis nos permitió identificar algunas variantes de las principales isoformas de las histonas, que incluyen una variante de H1 (H1.0), dos variantes de H2A, una variante de H3 (presumiblemente H3.3) y la isoforma canónica de H4. Por otro lado, logramos identificar otras proteínas no-histonas presentes en la muestra (Myelin basic protein, Cofilin-1, Peptidyl-prolyl-cis-trans isomerase A, alpha and beta globin, 40S ribosomal protein S10, 40S ribosomal protein S16, NADH deshydrogenase).

A través del análisis de imagen de los geles, se compararon los niveles de expresión de las histonas y otras proteínas identificadas entre animales con alta vs baja plasticidad fisiológica (jóvenes vs adultos) y entre animales adultos con baja plasticidad fisiológica vs adultos con alta plasticidad reactivada

farmacológicamente (mediante tratamiento crónico con fluoxetina). Este análisis reveló una regulación dinámica de la expresión de las proteínas estudiadas en función del nivel de plasticidad cortical.

En cuanto a la modulación de las variantes de histonas, encontramos cambios en la expresión de la variante H1.0, de las dos variantes de H2A, la de H2B y la de H3. En cuanto a la modulación de otras proteínas, todas variaron su expresión en función del nivel de plasticidad excepto la beta globina.

Como perspectiva, planificamos implementar mejoras en esta estrategia metodológica y utilizar otras estrategias adicionales con la finalidad de confirmar el rol de estas proteínas en el control de los procesos de plasticidad cortical y de identificar otras variantes de histonas y MPT.

INTRODUCCIÓN

PLASTICIDAD NEURONAL DEPENDIENTE DE LA EXPERIENCIA

La construcción y el mantenimiento de la arquitectura del sistema nervioso dependen de la maduración de los circuitos neuronales que se establecen durante el desarrollo embrionario. En primer lugar, las conexiones se generan siguiendo el programa genético y luego son modificadas estructural y funcionalmente por patrones de actividad neuronal inicialmente espontáneos y luego resultado de estimulaciones externas.

La capacidad de los circuitos neuronales de modificar y reorganizar sus conexiones en respuesta a la experiencia se denomina plasticidad (Berardi et al., 2003; Tropea et al., 2009). La experiencia tiene un rol fundamental en la correcta formación de los circuitos neuronales, en particular durante periodos específicos del desarrollo posnatal denominados periodos críticos (PC).

Durante los periodos críticos, los circuitos neuronales son particularmente sensibles a la experiencia, de modo que la capacidad de adquisición de habilidades diversas, que conforman el aprendizaje, es alta. Esta capacidad disminuye progresiva y dramáticamente con el pasar del tiempo, siendo muy reducida o completamente ausente en las fases adultas (Hensch, 2005). En los adultos los circuitos neuronales son modificables sólo en modo limitado, y la experiencia tiene muy escasa influencia sobre su organización anatómica y funcional, haciendo más difícil el aprendizaje (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.

La sensibilidad a la experiencia en la formación de los circuitos neuronales se puede separar en tres fases principales. En el caso de la visión y de otras funciones sensoriales comienza luego del nacimiento y disminuye casi totalmente durante la infancia. En el caso del lenguaje y de otras funciones cognitivas de orden superior, ésta presenta un comienzo más tardío 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 (Figura 1).

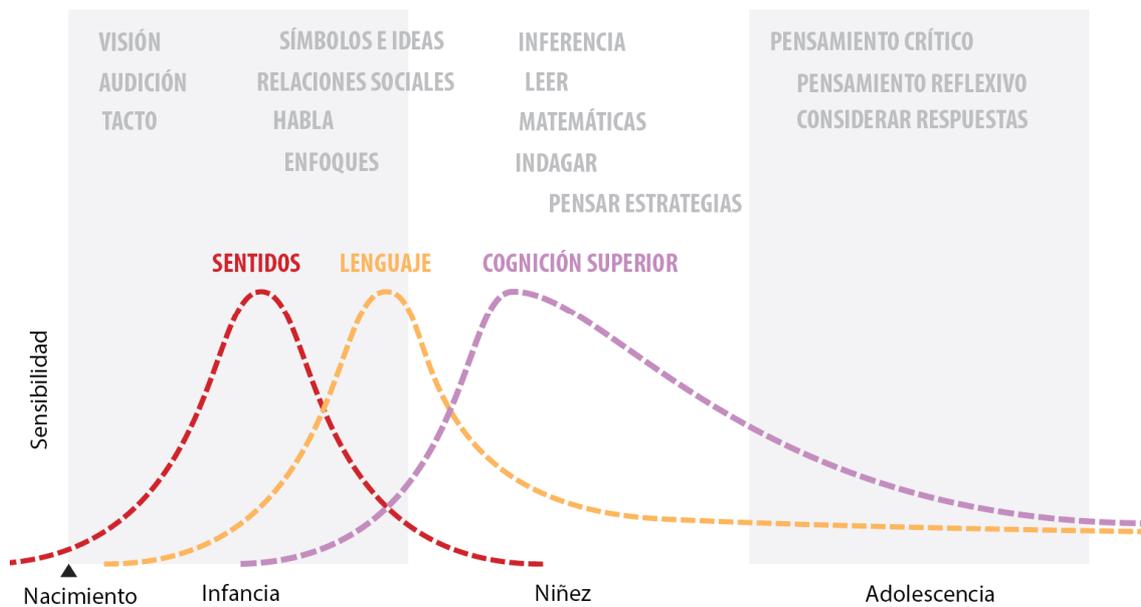


Figura 1. La sensibilidad al aprendizaje del cerebro humano puede dividirse en tres amplias fases. El periodo crítico de las regiones corticales consagradas a la visión y a otras funciones sensoriales (en rojo) abre al nacer y cierra rápidamente durante la infancia. Los correspondientes al lenguaje (en 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).

Entender cuáles son y cómo funcionan los procesos biológicos que subyacen a los periodos 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 en el cerebro adulto.

ORGANIZACIÓN ANATÓMICA Y FUNCIONAL DEL SISTEMA VISUAL EN MAMÍFEROS.

Dentro de los sistemas sensoriales, el sistema visual es uno de los más utilizados como modelo experimental para el estudio de los procesos de 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 información visual es procesada en primera instancia a nivel de la retina. Las células ganglionares de la retina proyectan a diversas estructuras subcorticales; la mayoría proyecta al núcleo geniculado dorso-lateral (NGdL) del tálamo y al colículo superior. Desde el NGdL, las neuronas talámicas proyectan a la corteza visual primaria donde las fibras se segregan formando un patrón de bandas alternado llamado columnas de dominancia ocular, cada una de las cuales contiene células corticales que responden principalmente a la estimulación de uno u otro ojo (LeVay et al., 1980) (Figura 2).

La organización columnar de la corteza visual primaria fue inicialmente evidenciada anatómicamente en monos y gatos, mediante la inyección de un trazador trans-neuronal radiactivo en un ojo del animal, el

cual es transportado anterógradamente a las neuronas del NGdL y de allí a las neuronas en la capa IV de la corteza visual primaria. Las aferencias provenientes de cada ojo fueron evidenciadas mediante autorradiografía como parches alternados dominados por un ojo o el otro distribuidos a lo largo del área binocular de la corteza visual primaria (Figura 3 A).

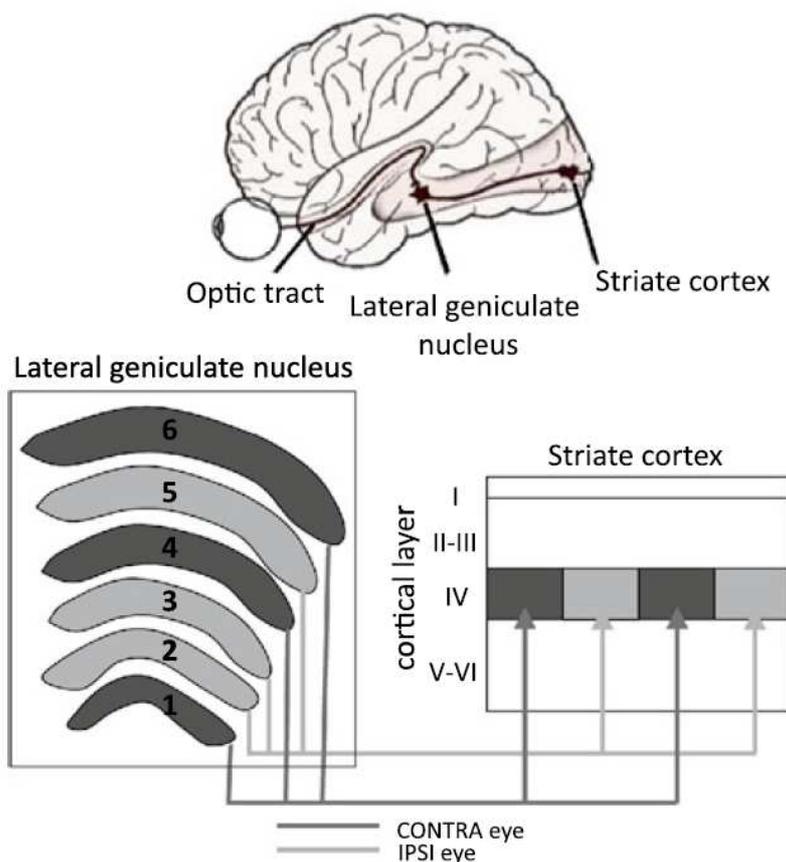


Figura 2. Organización columnar de la corteza visual primaria. Las aferentes que provienen de los dos ojos se mantienen separadas en distintas capas a nivel del NGdL. En muchas especies, incluyendo la mayoría de los primates y carnívoros, estas proyecciones aferentes se mantienen segregadas en columnas de dominancia ocular en la capa IV de la corteza visual primaria. Las neuronas de la capa IV proyectan sus axones a otras capas de la corteza, etapa en la cual la información de los dos ojos converge en neuronas individuales (modificado de Galizia and Lledo, 2013).

Las columnas adyacentes reciben inputs de la misma región del campo visual, una de cada ojo. En las capas más superficiales y más profundas 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; de hecho, las neuronas corticales pueden clasificarse en base a las clases de dominancia ocular que indican cuánto 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 (Wiesel and Hubel, 1965; Shatz and Stryker, 1978; LeVay et al., 1980) (Figura 4 A).

ROL DE LA EXPERIENCIA VISUAL EN LOS PROCESOS DE PLASTICIDAD

La existencia de periodos críticos de plasticidad dependiente de una correcta entrada sensorial ha sido identificada en la corteza visual de varias especies, incluyendo el ser humano (Berardi et al., 2000). 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 demostraron que al bloquear de modo temporario la entrada sensorial proveniente de un ojo (a través de un protocolo de experimentación llamado privación monocular, que consiste en cerrar un ojo mediante cirugía, PM), se altera dramáticamente la organización anatómica y funcional del área cortical conectada a dicho ojo. La privación monocular determina tales efectos exclusivamente si es realizada durante la fase sensible a modificaciones en el ambiente, el periodo crítico, mientras que en animales adultos los efectos de la privación sensorial no determinan grandes modificaciones (Berardi et al., 2000; Tropea et al., 2009), confirmándose así que las capacidades plásticas de los sistemas neuronales se reducen con el pasar del tiempo.

Una manera de evidenciar los efectos de la privación monocular **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, marcando todas sus proyecciones sobre la corteza visual. Mediante esta técnica se pudo evidenciar que la privación monocular 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 provenientes del ojo cerrado reducen su territorio de inervación en la corteza visual dejando que sea ocupado por las terminales de las fibras provenientes del ojo abierto, las cuales expanden su territorio de inervación. Como consecuencia, las columnas de dominancia ocular del ojo privado de visión se reducen y las columnas del ojo que fue mantenido abierto se expanden (Figura 3).

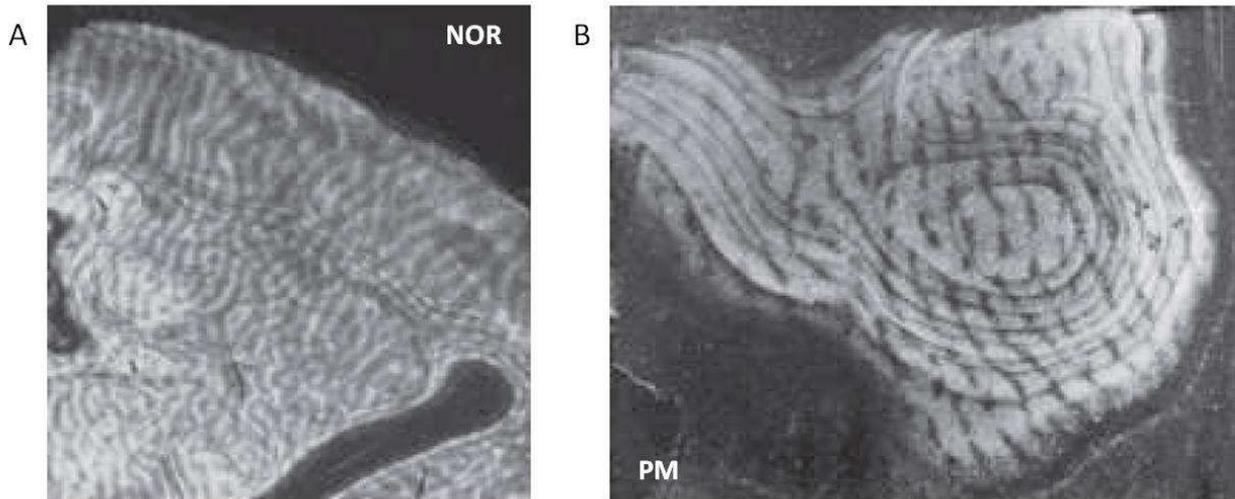


Figura 3. Distribución de las columnas de dominancia ocular y efecto de la privación monocular en la corteza visual del mono macaco (reconstrucción de varios cortes a través de la capa IV de la corteza visual primaria). A) La radiografía de campo oscuro en monos normales muestra columnas de dominancia ocular como bandas alternantes de un ancho similar. B) La radiografía de campo oscuro luego de la privación monocular (desde las 2 semanas de edad hasta los 18 meses) muestra que las columnas que son inervadas por el ojo normal (blancas) son mucho más anchas de lo normal, mientras que las inervadas por el ojo privado de visión (negras) están retraídas (modificado de Purves et al., 2004).

A nivel funcional, se ha observado que la privación monocular durante el periodo crítico, provoca un cambio en la distribución de las clases de dominancia ocular. En particular, se observa que el número de células corticales conectadas funcionalmente con el ojo privado de visión y que responden a la estimulación de éste disminuye drásticamente, mientras que aumenta el número de células que responden al ojo abierto (Figura 4 B). En animales adultos, la privación monocular no provoca grandes efectos en la distribución de clases de dominancia ocular (Figura 4 C).

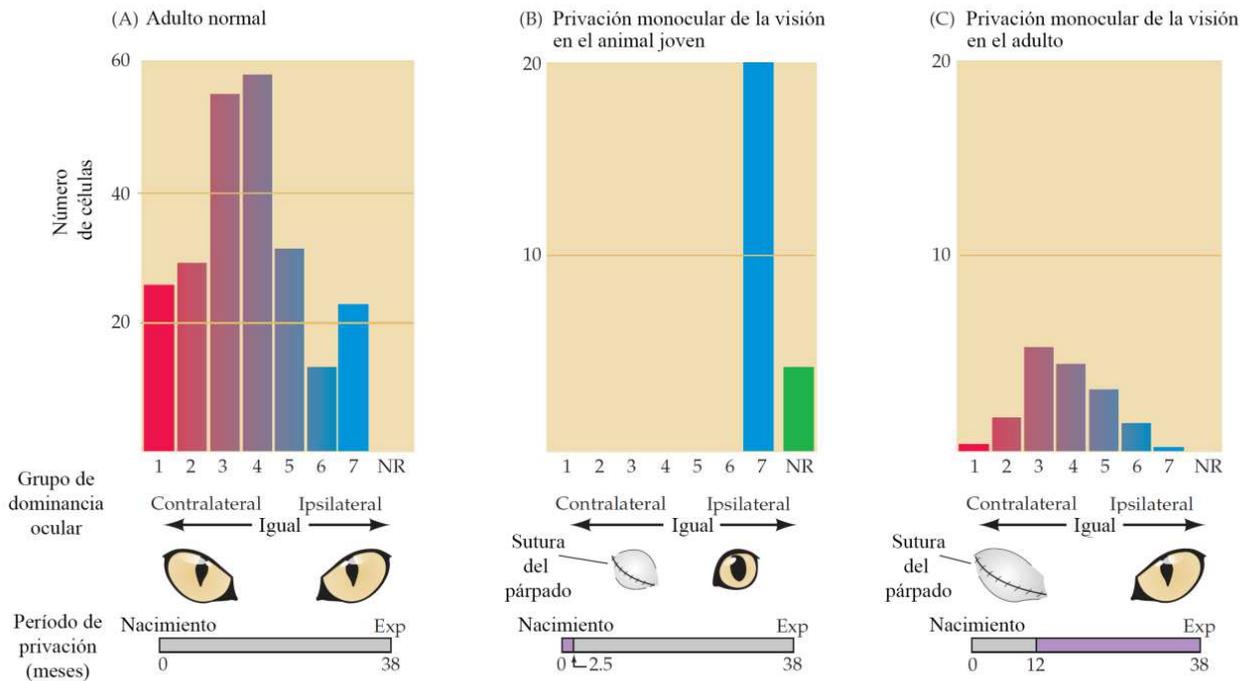


Figura 4. Distribución de las clases de dominancia ocular y efectos de la privación monocular. Las células de la clase 1 son activadas exclusivamente por el ojo contralateral; las células de la clase 7 son activadas exclusivamente por el ojo ipsilateral; las células de la clase 4 son igualmente activadas por los dos ojos, mientras que las células de la clase 2/3 son preferentemente activadas por el ojo ipsilateral y las de las clases 6/7 son activadas preferentemente por el ojo contralateral. A) Distribución de las clases de dominancia ocular en animales adultos normales (38 meses de edad). B) Distribución de las clases de dominancia ocular en animales adultos que fueron sometidos a privación monocular durante el PC (del nacimiento a los 2.5 meses de edad). C) Distribución de las clases de dominancia ocular en animales adultos que fueron sometidos a privación monocular fuera del PC (12-38 meses de edad) (modificado de Purves et al., 2004).

A nivel comportamental, el efecto de la privación monocular sobre la visión se manifiesta como una reducción o pérdida permanente de la agudeza visual (una medida de la resolución espacial), de la sensibilidad al contraste y una reducción en la percepción de la profundidad. Este déficit se denomina ambliopía (Prusky and Douglas, 2003). En el ser humano, 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. 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. De hecho, se sabe que en roedores, los efectos de la privación monocular se pueden revertir ocluyendo temporalmente el ojo sano mediante sutura del párpado (tratamiento conocido como sutura reversa, SR), dejando el ojo ambliope abierto de manera que sus proyecciones se extiendan en la corteza visual a la vez que se retraen las que

proviene del otro ojo. 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.

De manera similar a lo que ocurre en otras especies, en humanos se puede revertir la ambliopía ocluyendo temporalmente el ojo sano durante el PC, al colocar un parche sobre el mismo y dejando el ojo ambliope abierto. Este tratamiento permite la recuperación de la visión si se realiza 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). Por el contrario, los 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).

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).

ESTRATEGIAS EXPERIMENTALES PARA CENSAR LA PRESENCIA DE PLASTICIDAD CORTICAL

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 corteza visual, pero no si es realizada en el animal adulto, llevó a su establecimiento como paradigma experimental para censar la presencia de la plasticidad cortical. Existen varias metodologías experimentales utilizadas para detectar estos cambios (Morishita and Hensch, 2008). Entre las más utilizadas se encuentran la determinación de alteraciones en la distribución de las clases de dominancia ocular (ver Figura 4), y en el índice de binocularidad cortical (medido como relación entre la amplitud de los potenciales visuales evocados por el ojo contralateral respecto al ipsilateral, PEV contra/ipsi, ver Figura 7 A).

Cabe recordar que la presencia de plasticidad puede comprobarse mediante varias estrategias experimentales. Entre éstas, algunas se basan en medir los cambios en la fisiología o anatomía corticales inducidos por la modulación del input visual, como la privación monocular por sutura, la enucleación monocular, la inducción de estrabismo, etc. mientras que otras en medirlos en condiciones normales, como la detección de modificaciones en la comunicación neuronal durante el desarrollo (por ejemplo procesos de plasticidad a corto o largo plazo LTP, LTD, etc.). Por lo que la plasticidad no es inducida por la manipulación experimental, sino que es una propiedad intrínseca de los circuitos neuronales en una determinada situación.

MECANISMOS FUNCIONALES Y ESTRUCTURALES QUE CONTROLAN EL PERIODO CRÍTICO DE PLASTICIDAD EN LA CORTEZA VISUAL

La hipótesis vigente acerca de los mecanismos que controlan el periodo crítico de plasticidad plantea que éste es determinado por el desarrollo natural de una secuencia temporal de eventos moleculares que

determinan su apertura, duración y cierre (Hensch et al., 1998; Fagiolini and Hensch, 2000; Fagiolini et al., 2004; Hensch, 2005; Katagiri et al., 2007; Morishita and Hensch, 2008).

PROCESOS INHIBITORIOS REGULAN EL NIVEL DE PLASTICIDAD EN LA CORTEZA VISUAL.

El balance a nivel cortical entre el tono excitatorio e inhibitorio tiene un rol clave en la determinación del nivel de plasticidad en la corteza visual (Figura 5). En varios sistemas neuronales, incluyendo la corteza visual, las conexiones excitatorias se desarrollan prematuramente y luego ocurre el desarrollo de los circuitos inhibitorios. La maduración de la inhibición GABAérgica establece un primer umbral para la plasticidad dependiente de la experiencia, al permitir a las neuronas corticales detectar diferencias en la actividad entre las aferentes talámicas que compiten por inervarlas. De hecho, ratones transgénicos con niveles de inhibición intracortical reducidos, debido a la ausencia de una isoforma de la enzima sintetizadora de GABA (glutamato decarboxilasa de 65 kDa, GAD65), no muestran susceptibilidad a la privación monocular en ningún momento de su vida. Esta deficiencia en la plasticidad dependiente de la experiencia es revertida si se aumenta la transmisión inhibitoria mediante el tratamiento con benzodiazepinas (agonistas de los receptores tipo GABA_A) (Hensch et al., 1998; Fagiolini and Hensch, 2000).

A medida que el desarrollo continúa, el tono inhibitorio continúa aumentando hasta alcanzar un segundo umbral que determina el cierre del periodo crítico de plasticidad. Animales transgénicos que muestran una maduración acelerada de los circuitos inhibitorios intracorticales, debido a la sobreexpresión del factor neurotrófico derivado del cerebro, BDNF (que acelera la maduración de las neuronas inhibitorias GABAérgicas), presentan un inicio y cierre precoces del periodo crítico (Huang et al., 1999). La aplicación de benzodiazepinas en animales jóvenes normales también acelera la maduración de los circuitos GABAérgicos desencadenando la apertura prematura del período crítico (Fagiolini and Hensch, 2000). Por otra parte, se ha observado que en el adulto el tratamiento con BDNF provoca el efecto opuesto sobre el tono inhibitorio, es decir, lo disminuye. Esta alteración del balance E/I favorece la reapertura de la plasticidad en los adultos, efecto que puede ser bloqueado mediante la administración de Diazepam, un potenciador del tono inhibitorio (Maya Vetencourt et al., 2008; Harauzov et al., 2010).

La inhibición desencadena el inicio de la plasticidad a través de los receptores GABA_A que contienen la subunidad $\alpha 1$. Estos receptores son muy abundantes en las sinapsis entre los axones de las "basket cells" (una clase de interneuronas GABAérgicas parvalbúmina-positivas que extienden sus axones horizontalmente atravesando las columnas de dominancia ocular) y el soma de las neuronas piramidales. Estudios recientes indican que la experiencia visual controla el curso temporal del periodo crítico al promover la transferencia de la homeoproteína Otx2 desde la retina hasta la corteza visual. Una vez en la corteza visual, Otx2 promueve la maduración de las interneuronas GABAérgicas parvalbúmina-positivas (Sugiyama et al., 2008).

Como se mencionó anteriormente, la señalización GABAérgica inhibitoria e hiperpolarizante mediada por receptores ionotrópicos GABA_A es fundamental para el desarrollo y la plasticidad dependientes

de la experiencia en la corteza visual. Sin embargo, durante el desarrollo temprano (hasta la primera o segunda semana postnatal en roedores) el transmisor GABA ejerce un efecto depolarizante y fundamentalmente excitatorio (Sernagor et al., 2010; Ben-Ari et al., 2012). Recientemente, ha sido evidenciado que esta transmisión GABAérgica depolarizante también juega un rol importante en el control de los mecanismos de plasticidad. Al interferir brevemente con dicha transmisión (desde P3 hasta P8), se prolonga el periodo crítico de plasticidad en los circuitos corticales visuales sin afectar el desarrollo general del sistema visual. Los efectos sobre la plasticidad fueron acompañados por una neurotransmisión inhibitoria amortiguada, una regulación a la baja de la expresión de BDNF, y una reducción de la densidad de redes perineuronales. El aumento farmacológico de la señalización de BDNF durante la interferencia de la transmisión GABAérgica depolarizante rescató los efectos sobre la plasticidad y sus reguladores, restringiendo la duración del periodo crítico a los valores normales. Por lo tanto, la acción depolarizante de GABA ejerce un control a largo plazo en la modulación de la duración del periodo crítico de plasticidad, mediante algún mecanismo en el cual la señalización por BDNF es crucial (Deidda et al., 2015).

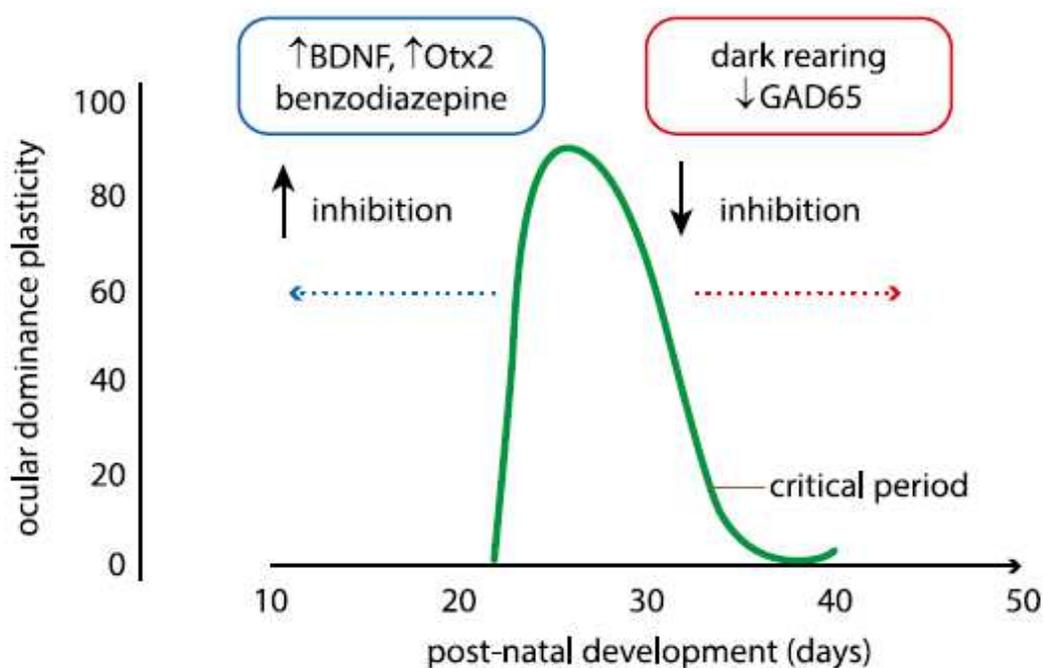


Figura 5. Procesos inhibitorios controlan el curso temporal del periodo crítico. La sensibilidad a la privación monocular en ratones está restringida al periodo crítico, que comienza una semana después de la apertura de los ojos y tiene su pico un mes luego del nacimiento. El inicio de la plasticidad puede ser retrasado si se impide la maduración de la inhibición cortical (mediante la delección de GAD65 o manteniendo a los animales en la oscuridad) (flecha roja). El aumento de la transmisión GABAérgica (mediante la administración de benzodiazepinas, BDNF u Otx2) provoca un inicio precoz del periodo crítico (flecha azul, modificado de Galizia and Lledo, 2013).

COMPONENTES DE LA MATRIZ EXTRACELULAR SON CLAVE EN LA DETERMINACIÓN DEL NIVEL DE PLASTICIDAD

Los efectos causados por la experiencia sensorial temprana en la remodelación de los circuitos corticales son preservados a lo largo de la vida por la aparición de factores moleculares en la matriz

extracelular (MEC) que restringen la plasticidad. De hecho, algunos componentes de la MEC en el sistema nervioso central deben ser removidos para que ocurran los efectos de plasticidad inducidos por la PM. Por ejemplo, la actividad proteolítica de tPA (tissue plasminogen activator) se eleva luego de la privación monocular durante el periodo crítico. Cuando tPA es inhibida farmacológicamente, los efectos de la privación monocular son reducidos, lo cual muestra que tPA tiene un rol permisivo para la plasticidad. En ratones knock out para tPA, la plasticidad está severamente comprometida, y puede ser rescatada mediante la administración exógena de tPA, sugiriendo que su actividad proteolítica está involucrada en la plasticidad estructural de las dendritas (Mataga et al., 2002).

Ciertas proteínas en la MEC juegan un rol importante en terminar el periodo crítico, al ejercer un efecto sobre la maduración de las conexiones inhibitorias. El componente mayoritario de la MEC son los condroitín sulfato proteoglicanos (CSPG). A medida que maduran los circuitos inhibitorios, estos CSPG forman estructuras especializadas llamadas redes perineuronales que envuelven interneuronas GABAérgicas corticales y bloquean estructuralmente la reorganización de sus conexiones, limitando la plasticidad (Hensch, 2005; Morishita and Hensch, 2008). La degradación selectiva de los CSPG que forman las redes perineuronales, 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 redes perineuronales previenen la reorganización de los circuitos que se mantienen estables luego de su madurez.

LA MADURACIÓN DE LA MIELINA INTRACORTICAL DISMINUYE LA PLASTICIDAD

Además de la MEC, también entran en juego una serie de factores mielínicos cuya maduración ocurre en paralelo con el cierre del PC y que también actuarían como “frenos” para la movilidad y crecimiento neuríticos. Se sabe que en la mielina existen varias moléculas que causan un fuerte efecto de inhibición del crecimiento y la movilidad axonal, lo que resulta en la disminución de la capacidad de reorganización de las conexiones, limitando la plasticidad (McGee et al., 2005; Yiu and He, 2006). En particular, las proteínas de la vaina de mielina Nogo-A y MAG (glicoproteína asociada a la mielina) se unen al receptor Nogo (NgR) y actúan como inhibidoras de la plasticidad. Dichos receptores se expresan en neuronas corticales, y su activación induce cascadas de señalización intracelular que inhiben el crecimiento neurítico. En ratones knock out para el receptor o para su ligando Nogo-A, la susceptibilidad a la privación monocular persiste en el adulto, confirmando que mecanismos dependientes de NgR participan directamente en restringir la plasticidad dependiente de la experiencia en la corteza visual (McGee et al., 2005). A su vez PirB (receptor pareado tipo inmunoglobulina B), que muestra una alta afinidad por Nogo-A y MAG, restringe la plasticidad en la corteza visual en el desarrollo (Syken et al., 2006; Atwal et al., 2008).

LAS NEUROTROFINAS MEDIAN LA PLASTICIDAD DEPENDIENTE DE LA EXPERIENCIA

Las neurotrofinas son factores de crecimiento liberados por células neuronales y gliales que promueven el crecimiento de neuronas blanco, favoreciendo el desarrollo de sus arborizaciones dendríticas y/o de los axones. El factor de crecimiento de nervios (Nerve Growth Factor, NGF), el BDNF y la neurotrofina 4 (NT-4), son tres neurotrofinas que han sido vinculadas a varias formas de plasticidad sináptica en la corteza visual. Estas neurotrofinas interactúan con dos tipos de receptores en la superficie de sus neuronas diana. Todas se unen con relativamente baja afinidad al receptor de membrana p75, y a receptores específicos de alta afinidad, a través de los que median sus efectos en la sobrevivencia celular y crecimiento neurítico. Estos receptores son TrkA para NGF y TrkB para BDNF y NT-4. Estos actúan, a través de segundos mensajeros (PKA, ERK 1/2, CaMKII), controlando factores de transcripción como CREB, los cuales activan a los promotores tipo CRE, alterando la expresión génica. Típicamente las neurotrofinas funcionan de manera dependiente de la actividad, por lo tanto las neuronas más activas son las que más se benefician de su acción y son las que crecen más. Este mecanismo es ideal para la plasticidad dependiente de la experiencia: las aferentes eléctricamente activas compiten por una cantidad limitada de neurotrofinas, y aquellas aferentes que son más activas son las que más crecen prolongando sus ramificaciones e invadiendo más territorio cortical.

La primera demostración de que las neurotrofinas juegan un papel importante en la plasticidad de la corteza visual surge de la observación de que la administración de NGF exógeno en la corteza evita los efectos de la privación monocular en la rata durante el periodo crítico (Maffei et al., 1992). Este hallazgo sugiere que durante los procesos de plasticidad cortical las proyecciones genículo-corticales compiten por un factor neurotrófico que es producido y liberado por las neuronas corticales de una manera dependiente de la actividad. De acuerdo con esta hipótesis, se demostró que la infusión de BDNF o NT-4 en la corteza visual de gato joven impide la correcta formación de las columnas de dominancia ocular durante el desarrollo (Cabelli et al., 1995). En los roedores, BDNF se expresa en la retina y es transportado anterógradamente a lo largo del nervio óptico al núcleo geniculado lateral y el colículo superior. Los niveles de BDNF en la retina no sólo influyen el desarrollo del núcleo geniculado lateral y del colículo superior, sino también la plasticidad de dominancia ocular en la corteza. En particular, la privación monocular reduce los niveles de BDNF en la retina privada de visión, mientras que la microinyección de BDNF en el ojo privado de visión contrarresta el cambio en la dominancia ocular tras la sutura del párpado. A partir de esta evidencia experimental, se concluye que BDNF sería un crítico mediador de los efectos de la experiencia sensorial temprana en la maduración estructural y funcional de la corteza visual. La actividad aferente visual induce la producción y liberación de BDNF, que promueve el desarrollo de los circuitos inhibitorios, fundamental para el desarrollo de las funciones visuales normales. En armonía con esto, la sobreexpresión de BDNF en el cerebro anterior permite el desarrollo normal de las propiedades fisiológicas básicas de la corteza visual, en animales

mantenidos en condición de oscuridad total, es decir en ausencia total de experiencia visual (Gianfranceschi et al., 2003).

ESTRATEGIAS PARA LA REACTIVACIÓN DE LA PLASTICIDAD EN EL ADULTO.

De manera muy prometedora, estudios recientes en roedores han comenzado a develar múltiples estrategias para la reactivación de la plasticidad en el adulto y para la recuperación de la visión, que eventualmente podrían ser utilizadas para el tratamiento de patologías en humanos. Teniendo en cuenta la serie de eventos moleculares que ocurren durante el desarrollo normal e influyen la duración del PC, existirían dos tipos de estrategias para el restablecimiento de la plasticidad:

- 1) reajuste de la relación entre tono excitatorio e inhibitorio (balance E/I);
- 2) remoción de los “frenos” moleculares que limitan la plasticidad estructural en el adulto.

Algunas de las alternativas identificadas para reajustar el balance E/I son: la administración crónica del conocido antidepresivo fluoxetina (Maya Vetencourt et al., 2008), que es un inhibidor de la recaptación de serotonina; la exposición de los animales a un ambiente enriquecido en estímulos sensorio-motores (Sale et al., 2007); y el mantenimiento de los animales en condiciones de oscuridad (He et al., 2006). Se ha demostrado que tanto el tratamiento con fluoxetina como la exposición a un ambiente enriquecido reducen la transmisión inhibitoria (GABAérgica), modificando el balance E/I. Estos efectos pueden ser revertidos potenciando el tono inhibitorio, por ejemplo vía administración de Diazepam, un potente agonista de los receptores GABAérgicos (Sale et al., 2007; Maya Vetencourt et al., 2008; Sale et al., 2009; Sale et al., 2010).

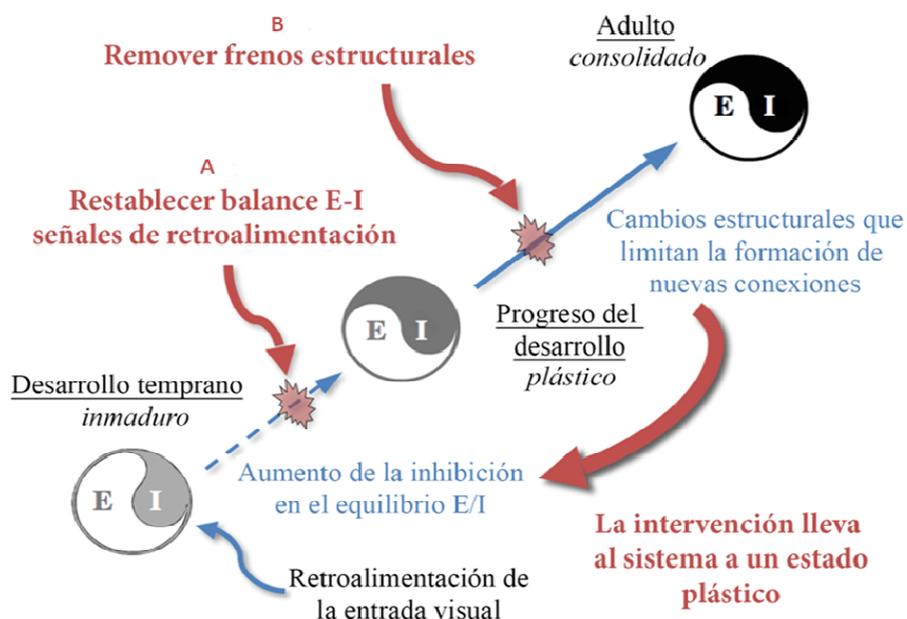


Figura 6. Estrategias emergentes para la recuperación de la visión basadas en el desarrollo normal. A) Restablecimiento del balance excitatorio/inhibitorio (E/I). El inicio del PC depende de la maduración de los circuitos inhibitorios que se desarrollan tardíamente con respecto a los excitatorios, lográndose un primer umbral en el equilibrio E/I (flecha azul punteada). A medida que continúan desarrollándose los circuitos inhibitorios, se alcanza un segundo umbral en el equilibrio E/I que marca el fin del PC de plasticidad (flecha azul continua). Por lo tanto, una estrategia para llevar al sistema a un estado más plástico es reajustar el balance E/I a un estado como el que se presenta en el PC. El tratamiento crónico con fluoxetina, la exposición a ambientes enriquecidos, y el mantenimiento de animales en condiciones de oscuridad, llevan a este resultado. B) Remoción de factores moleculares que limitan la plasticidad (“frenos estructurales”): como consecuencia del reajuste E/I, ocurren reorganizaciones estructurales que consolidan al sistema, limitando la plasticidad (flecha azul continua). Han sido identificados varios “frenos” moleculares que inhiben el crecimiento neurítico en el adulto, entre ellos los condroitín sulfato proteoglicanos (CSPG) que forman las redes perineuronales (RPN), y los factores derivados de la mielina (Nogo A/B, MAG, OMgp), que, actuando a través de la vía de señalización mediada por el receptor de Nogo, limitan la plasticidad en el adulto. Su remoción es otra estrategia prometedora para la recuperación de la acuidad visual (modificado de Morishita and Hensch, 2008).

El mantenimiento de los animales en condiciones de oscuridad disminuye el nivel de receptores GABA_A en relación a los receptores glutamatérgicos de tipo AMPA, determinando un aumento del tono excitatorio en relación al tono inhibitorio (He et al., 2007). A través de estos protocolos experimentales se ha logrado no sólo la reactivación de la plasticidad en animales adultos sino también la recuperación de la visión en animales ambliopes privados de visión en fases tempranas. La relevancia de estas tres aproximaciones radica en que son no invasivas, por lo cual son importantes para identificar estrategias clínicas. De particular interés es la fluoxetina, dado su alto uso y difusión en la población como potente antidepresivo (Figura 6 A).

En cuanto a la reactivación de la plasticidad en el adulto mediante la remoción de “frenos” estructurales, una de las estrategias utilizadas es la administración de proteasas que devuelven la MEC a un estado “fluido” y permisivo. En particular ha sido demostrado que la administración intracortical de condroitinasa ABC (ChABC) determina la reapertura de la plasticidad al degradar los CSPG que forman las redes perineuronales. Además, este tratamiento también permite la recuperación de la visión en animales adultos con defectos visuales causados durante el PC (Pizzorusso et al., 2006) (Figura 6 B).

LA FLUOXETINA COMO ESTRATEGIA DE REACTIVACIÓN DE LA PLASTICIDAD.

La fluoxetina es un antidepresivo ampliamente utilizado que actúa inhibiendo la recaptación de la serotonina (5-hidroxitriptamina, 5-HT) 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; Castrén, 2004) y también promueve la neurogénesis y la sinaptogénesis (Malberg et al., 2000; Hajsan et al., 2005).

Con el fin de evaluar si el tratamiento crónico con fluoxetina reactiva la plasticidad en la corteza visual de ratas adultas, Maya Vetencourt et al., 2008, midieron si existían cambios en el índice de

binocularidad cortical al someter a animales adultos tratados con fluoxetina al protocolo de privación monocular. Como se mencionó anteriormente, la privación monocular ejerce un efecto marcado y restringido al PC, no observándose efectos en el adulto. Sin embargo, observaron que en animales adultos sometidos al tratamiento crónico con fluoxetina por aproximadamente 3-4 semanas, la privación monocular sí provocó cambios en el índice de binocularidad (Figura 7 A), lo que sugiere que el tratamiento es capaz de reactivar la plasticidad en la corteza visual de la rata adulta.

Por otro lado, estos investigadores evaluaron si la fluoxetina, además de reactivar la plasticidad en el cerebro adulto, permitía recuperar la agudeza visual en el animal adulto ambliope. Para ello, sometieron a animales a una PM prolongada desde su juventud, obteniendo adultos ambliopes. Estos adultos fueron divididos en dos grupos, uno de los cuales fue tratado crónicamente con fluoxetina. A todos se les practicó la sutura reversa, que consiste en abrir el ojo que había permanecido cerrado, y cerrar el que había permanecido abierto. Observaron que aquellos animales que fueron sometidos al tratamiento con fluoxetina, recuperaron la agudeza visual en el ojo que había permanecido cerrado y la binocularidad, no observándose recuperación en animales no tratados (Maya Vetencourt et al., 2008) (Figura 7 B y C). 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 periodo crítico y que permite la recuperación de la visión en animales ambliopes (Morishita and Hensch, 2008; Maya-Vetencourt and Origlia, 2012).

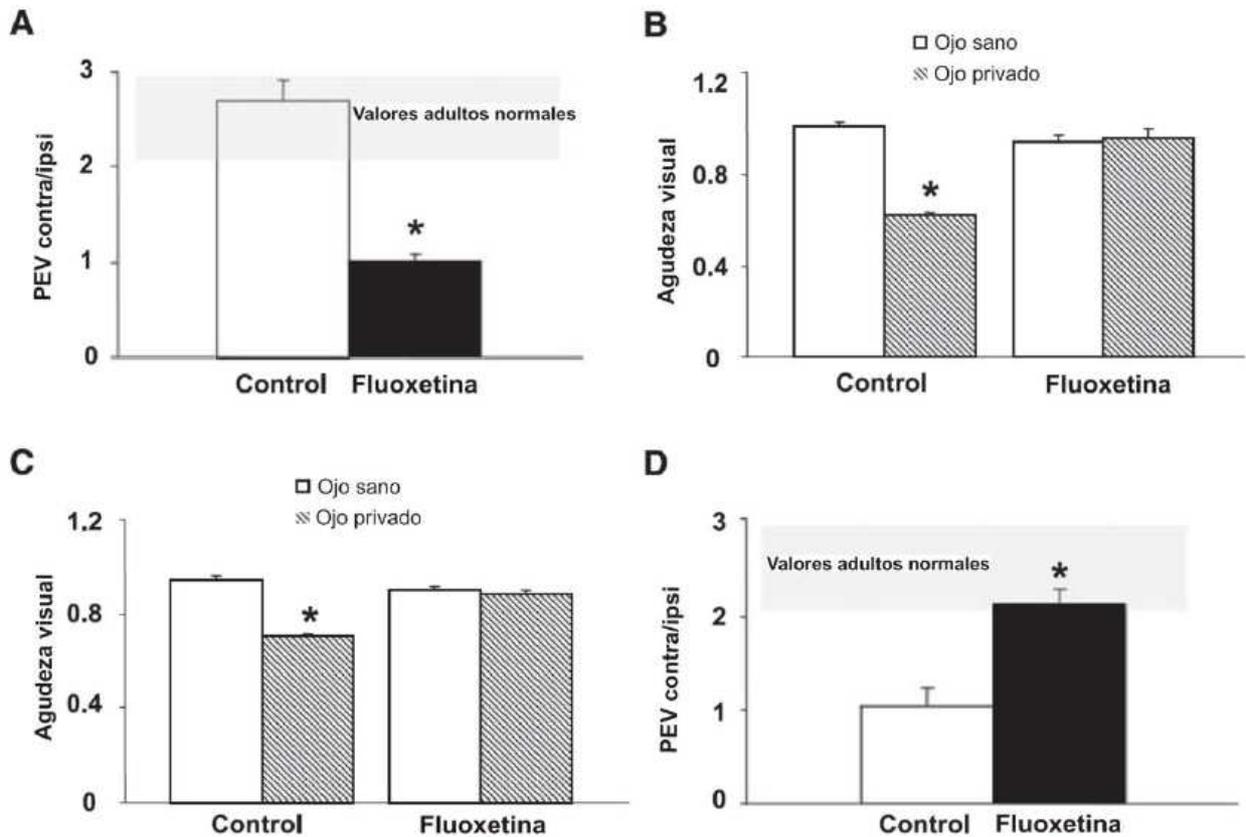


Figura 7. Efectos de la fluoxetina sobre la plasticidad cortical. A) La PM induce cambios en la dominancia ocular en ratas adultas tratadas con fluoxetina a favor del ojo abierto, mientras que en animales adultos sin tratamiento no se observan modificaciones en este parámetro. B) y C) El tratamiento con fluoxetina junto con la sutura reversa permiten la recuperación de la agudeza visual en ratas adultas ambliopes tratadas. La agudeza visual fue evaluada por electrofisiología (B) y comportamiento (C). La agudeza visual en animales adultos sometidos a PM a largo plazo fue menor para el ojo inicialmente privado de la visión en comparación con el ojo abierto; sin embargo, el tratamiento con fluoxetina junto con la sutura reversa restaura la agudeza visual del ojo que había sido privado de visión a niveles comparables con los del ojo que había permanecido abierto. D) Evaluación mediante PEV contra/ipsi del efecto del tratamiento crónico con fluoxetina junto a la sutura reversa en la dominancia ocular. Se observa una recuperación de la dominancia ocular (binocularidad) en ratas adultas ambliopes luego del tratamiento. El PEV contra/ipsi fue mayor en la corteza visual de las ratas adultas tratadas con fluoxetina respecto a las ratas adultas no tratadas, 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 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 corteza visual 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 (Figura 8 A), apoyando 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. Además, 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 (Figura 8 C) (Maya Vetencourt et al., 2008). Otra estrategia para censar la presencia de plasticidad consiste en medir *in vitro* sobre rodajas de corteza visual la ocurrencia de potenciación sináptica a largo plazo (“long-term potentiation”, LTP) en las capas II/III estimulando la materia blanca (“theta-burst stimulation”). La ocurrencia de LTP disminuye de forma dependiente de la edad y se correlaciona estrechamente con la disminución en la susceptibilidad a la PM que ocurre durante el desarrollo *in vivo* (Huang et al., 1999; Berardi et al., 2000; Cancedda et al., 2004). En ratas adultas tratadas con fluoxetina se observó la ocurrencia de LTP, característica del animal joven, y que normalmente está ausente en los animales adultos (Figura 8 B) lo que indica que en estos animales se está induciendo plasticidad cortical por el tratamiento con fluoxetina. Por ello, las ratas adultas 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.

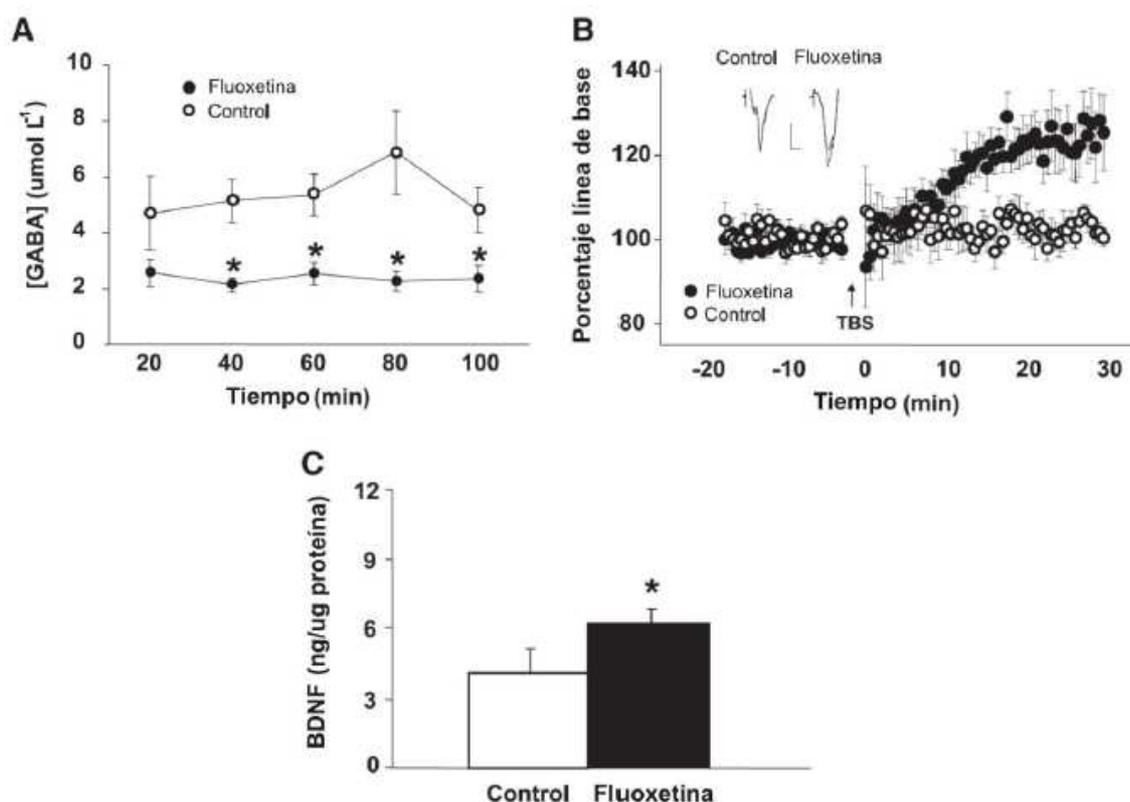


Figura 8. Disminución de la inhibición intracortical y aumento de la expresión de BDNF en la corteza visual de rata adulta luego del tratamiento crónico con fluoxetina. A) Microdiálisis *in vivo* muestra que los niveles basales de GABA son significativamente menores en las ratas adultas tratadas crónicamente 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 (Maya Vetencourt et al., 2008).

Recientemente en nuestro laboratorio (en colaboración con el Instituto di Neuroscienze del CNR di Pisa, Italia) hemos demostrado que la fluoxetina determina la reapertura de la plasticidad cortical también en el ratón adulto (Ruiz-Perera et al., 2015) (Figura 9). Este dato es relevante porque valida al ratón como modelo de estudio de los efectos de la fluoxetina sobre la plasticidad cortical, modelo en el que los procesos de plasticidad han sido bien caracterizados y que presenta muchas ventajas, entre ellas la de poder utilizar animales genéticamente modificados. En estos experimentos evaluamos el efecto de la privación monocular en el índice de binocularidad en ratones adultos normales y en ratones adultos tratados crónicamente con fluoxetina. Observamos que en ratones adultos tratados con fluoxetina la PM sí provocó cambios en el índice de binocularidad mientras que no ejerció este efecto en animales adultos no tratados (Figura 9). Estos experimentos demuestran que también en ratones adultos la fluoxetina induce modificaciones plásticas de manera muy similar a lo observado en ratas.

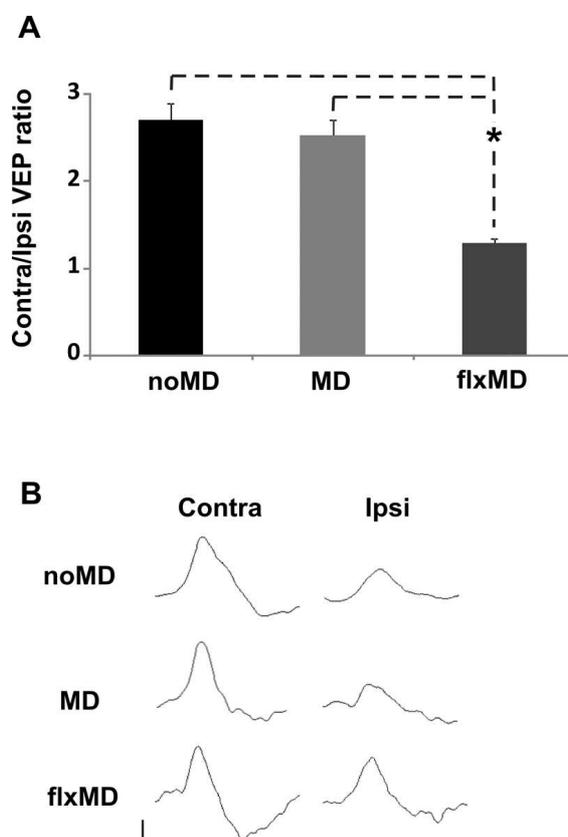


Figura 9. La fluoxetina reactiva la plasticidad de dominancia ocular en la corteza visual del ratón adulto. A) Relación entre los potenciales evocados visuales contralaterales/ipsilaterales en ratones adultos no privados de visión (noMD), en adultos con PM por 3 días (MD) y en ratones adultos tratados crónicamente con fluoxetina y sometidos a PM por 3 días (flxMD). Los PEV contra/ipsi en ratones adultos normales (noMD) es alrededor de 2.7 indicando la predominancia de fibras que cruzan en las proyecciones de la retina (noMD: $n = 5$, PEV contra/ipsi = 2.71 ± 0.19). Los registros muestran que 3 días de PM no afectan la relación C/I en animales adultos normales (MD: $n = 6$, PEV contra/ipsi = 2.53 ± 0.18), pero sí en animales adultos sometidos a tratamiento crónico con fluoxetina (flxMD: $n = 6$, PEV contra/ipsi = 1.30 ± 0.05). B) Ejemplos de registros de potenciales visuales evocados a la estimulación del ojo contralateral o ipsilateral a la hemicorteza en la cual se realizan los registros. Barras de calibración: $50\mu\text{V}$, 100 ms. (Ruiz-Perera et al., 2015).

REGULACIÓN GÉNICA DE LA PLASTICIDAD

La experiencia sensorial determina modificaciones funcionales y estructurales en el sistema nervioso que son a largo plazo, estables en el tiempo, y que necesariamente son resultado de cambios en la expresión génica. 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 sometidos a 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 periodo crítico, se superpone con el grupo de genes regulados fuera de éste, 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 en el cerebro de proteínas importantes en la respuesta inmune a antígenos, es el caso del MHC-I (complejo mayor de histocompatibilidad de tipo 1; Corriveau 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 registra 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 periodo crítico y otros se expresan únicamente en las fases adultas. Esta expresión diferencial determinaría el potencial de plasticidad en función del tiempo y explicaría la diferencia entre la alta capacidad plástica característica del PC y la disminuida plasticidad del adulto (Majdan and Shatz, 2006; Tropea et al., 2006).

MECANISMOS EPIGENÉTICOS DE REGULACIÓN GÉNICA.

Uno de los principales mecanismos reguladores de la expresión génica son los programas epigenéticos. El término epigenética se refiere a modificaciones heredables que alteran la expresión génica sin afectar la secuencia de ADN. Los factores que contribuyen a la regulación epigenética son numerosos e incluyen: microARN, metilación del ADN, y modificaciones postraduccionales (MPT) de las histonas nucleosomales. La suma total de todos estos cambios se denomina epigenoma. A diferencia del genoma, el

epigenoma es altamente variable entre células y fluctúa en el tiempo en cada célula. Por lo tanto, hay al menos tantos epigenomas como tipos celulares.

Los microARNs son pequeñas moléculas de ARN no codificante, de aproximadamente 22 nucleótidos de largo, que actúan como reguladores negativos a nivel post-transcripcional. Se unen complementariamente a la región 3'UTR (región que no se traduce) del ARNm blanco impidiendo su traducción al inducir su clivaje por endonucleasas que reconocen y degradan ARN doble cadena, lo cual hace posible que un solo micro ARN controle la expresión de múltiples genes que poseen la misma secuencia en esta región del ARNm. Tanto la metilación del ADN como las MPT de las histonas son marcas epigenéticas que alteran la estructura de la cromatina, cambiando la accesibilidad de la maquinaria de transcripción a ciertos genes, aumentando o inhibiendo su transcripción. Evidencia experimental reciente ha mostrado que los microARNs juegan un papel muy importante en la regulación de la plasticidad dependiente de la experiencia. Se observó que un microARN específico del cerebro, miR-134, se localiza en el compartimento sinapto-dendrítico y media el efecto de las neurotrofinas como BDNF en la plasticidad estructural de las espinas dendríticas en neuronas de hipocampo de rata (Schratt et al., 2006). En la corteza visual, miR-132 (un microARN inducido por CREB), actúa como un mediador molecular de la actividad de la experiencia visual en los circuitos en desarrollo; probablemente cumple dicho efecto actuando sobre procesos de plasticidad estructural como la modulación a nivel de las espinas dendríticas (Vo et al., 2005; Wayman et al., 2008; Edbauer et al., 2010; Hansen et al., 2010; Impey et al., 2010). Ha sido descrito que miR-132 aumenta su expresión en ratones inmediatamente luego de la apertura de los ojos, y este aumento es retrasado si los animales son mantenidos en oscuridad. La inhibición *in vivo* de miR-132 provoca que la privación monocular durante el periodo crítico no tenga efectos sobre la distribución de clases de dominancia ocular y afecta la maduración de las espinas dendríticas (Mellios et al., 2011). Por otra parte, se ha visto que la privación monocular reduce la expresión de miR-132 en la corteza contralateral al ojo privado de visión; si esta reducción es contrarrestada mediante una infusión de oligonucleótidos miR-132 se bloquea completamente la plasticidad de dominancia ocular (Tognini et al., 2011), lo cual sugiere que miR-132 juega un rol crítico en la plasticidad de los circuitos de la corteza visual.

La metilación del ADN es una modificación química que consiste en el agregado por una enzima metiltransferasa de grupos metilo sobre residuos citosina (C) que se encuentran incluidos dentro de secuencias repetidas (CG) del ADN. Los residuos CpG metilados mantienen a la cromatina en un estado "silenciado", inhibiendo la actividad de los promotores incluidos en esa región del genoma, y por lo tanto impidiendo la transcripción de los genes controlados por dichos promotores. Las modificaciones epigenéticas constituyen un importante mecanismo mediante el cual la experiencia sensorial en los primeros años de vida influye en el comportamiento. Esto ha sido demostrado para el caso del cuidado maternal; las crías de rata que reciben mayor cuidado maternal durante el desarrollo postnatal, muestran, en etapas

posteriores de la vida, un mejor desempeño en las pruebas de aprendizaje y memoria, y son menos ansiosas comparadas con las que reciben menos cuidado maternal (Francis et al, 1999). Este comportamiento sería resultado de modificaciones epigenéticas que ocurren durante la primera semana de vida postnatal; el cuidado maternal promueve la expresión del receptor de glucocorticoides, y este fenómeno se acompaña de un estado de metilación de ADN disminuido en el área promotora del gen del receptor en el hipocampo. Esta disminución de la metilación es acompañada de un aumento en los niveles de acetilación de la lisina 9 de la histona H3, marca que se correlaciona con una activación de la transcripción génica (Weaver et al, 2004). Ha sido establecido que la metilación del ADN también juega un rol importante en los procesos de adicción (Nestler, 2014). Se ha observado que la exposición a la cocaína y a las anfetaminas altera los niveles de las enzimas metilasas y demetilasas del ADN (en particular MeCP2 y DNMT3, respectivamente) en el Núcleo Accumbens (Anier et al., 2010; Deng et al., 2010; Im et al., 2010; LaPlant et al., 2010). Estos resultados ponen de relieve la complejidad de la regulación del comportamiento mediante metilación del ADN.

Las MPT de las histonas en general provocan un cambio en la carga neta en los nucleosomas, lo cual puede llevar a cambios estructurales en la cromatina mediante la alteración de las interacciones de los nucleosomas con el ADN. Los nucleosomas se encuentran empaquetando el ADN en las células eucariotas. Son estructuras formadas por un octámero de histonas altamente conservadas (dos dímeros H2A-H2B y un tetrámero H3-H4) (Figura 10 A), y se asocian entre sí a través de la histona H1 estableciendo un mayor nivel de compactación del ADN (fibra de 30 nm). Los extremos N-terminales de las histonas nucleosomales proyectan hacia afuera e interactúan con el ADN, y son susceptibles de sufrir MPT. Se conocen varias MPT que se acumulan en las colas N-terminales de las histonas, entre las cuales se encuentran acetilación, metilación, ubiquitinación, ADP-ribosilación, sumoilación y fosforilación (Figura 10 B).

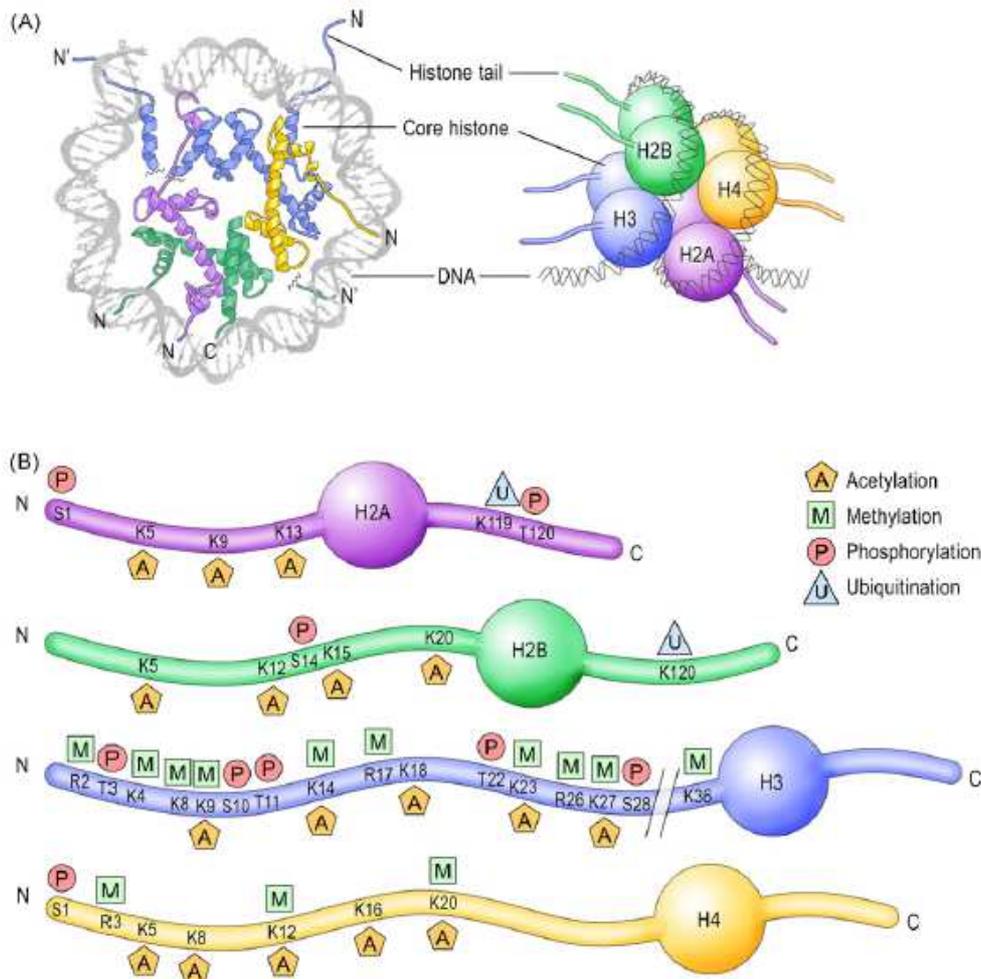


Figura 10. Marcas epigenéticas en la cola de las histonas. A) A la izquierda se muestra un esquema de una mitad de un nucleosoma asociado al ADN; a la derecha se representa la estructura del nucleosoma, formado por un octámtero de histonas compuesto por 4 histonas principales H2A, H2B, H3 and H4. B) Representación esquemática de los extremos N y C terminales de las histonas principales y sus MPT residuo-específicas (Graff and Mansuy, 2008).

La acetilación de las histonas está asociada generalmente con la activación transcripcional. La adición del grupo acetilo neutraliza la carga positiva del grupo amino de la lisina (K), lo que disminuye la afinidad entre la cola de la histona y el ADN, relajándose la estructura de la cromatina (Brownell and Allis, 1996). En contraste, la metilación de la histona tiene un doble impacto en la actividad transcripcional y está asociada tanto a genes transcritos activamente como a silenciados (Peters and Shubeler, 2005; Klose and Zhang, 2007). La metilación de histonas se produce en diferentes formas, desde mono-, di- o tri-metilación de residuos de lisina, y juega un rol complejo en la regulación de la expresión de genes. Los grupos metilo también se pueden añadir a los residuos de arginina (R), que se encuentran mono y dimetilados, pero su impacto en la organización de la cromatina es poco conocido (Shilatifard, 2006). La fosforilación de las histonas, similar a la acetilación, es más comúnmente asociada con la activación transcripcional, presumiblemente porque crea una fuerza de repulsión entre la carga negativa de las fosfo-histonas y el ADN. Esta fuerza de repulsión decondensa la cromatina y aumenta su accesibilidad a la maquinaria transcripcional

(Loury and Sassone-Corsi, 2003). La ubiquitinación de las colas de las histonas ha sido correlacionada con la activación transcripcional y también se ha identificado como un requisito previo para la posterior metilación de las histonas (He and Lehming, 2003; Shilatifard, 2006). Sin embargo, sus funciones precisas siguen sin estar claras. Por último, la sumoilación es la menos entendida de las MPT de las histonas. En la levadura, se produce en las cuatro principales histonas y regula negativamente la transcripción, posiblemente interfiriendo con la acetilación de histonas y la ubiquitinación (Shiio and Eisenman, 2003; Nathan et al., 2006). Su papel en los mamíferos no se ha establecido todavía (Graff and Mansuy, 2008).

Las enzimas que median estas diversas modificaciones covalentes de las histonas pueden ser entendidas como "escritoras" o "borradoras". Por ejemplo, las acetiltransferasas de histonas (HAT) catalizan la acetilación de las histonas, y las histona desacetilasas (HDAC) catalizan su desacetilación, mientras que las metiltransferasas de histonas (HMTs) catalizan la metilación de histonas y demetilinasas (HDM) catalizan su demetilación. La especificidad de las numerosas HAT y HDAC para residuos específicos K sigue sin comprenderse completamente. En contraste, distintas HMTs y HDMs controlan la metilación de residuos específicos K y R e incluso la valencia de metilación, es decir los estados mono-, di-, o tri-metilados. Las consecuencias funcionales de modificaciones de las histonas están mediadas en parte a través de "lectores", que son proteínas que se unen a residuos modificados específicos y afectan la actividad transcripcional (Strahl et al., 2000; Turner, 2000; Jenuwein and Allis, 2001; Jaenisch and Bird, 2003). Por ejemplo, las diferentes familias de proteínas remodeladoras de la cromatina, que utilizan la energía derivada de ATP para modificar el espaciado de los nucleosomas y su condensación, reconocen formas específicas de histonas modificadas y aumentan o reprimen la actividad de los genes cercanos. En última instancia, se cree que cientos de proteínas son reclutadas coordinadamente para controlar la transcripción de un gen. Así, las colas de las histonas sirven como plataformas de integración de señales de extraordinaria complejidad, en las cuales las MPT se combinan en un "código de histonas" que especifican funciones únicas y que direccionan la actividad de numerosos factores de transcripción, cofactores y la maquinaria transcripcional en general (Strahl et al., 2000; Fischle et al., 2003; Peterson et al., 2004; Levenson et al., 2005).

VARIANTES DE HISTONAS Y SU IMPACTO EN LA REGULACIÓN GÉNICA.

Desde un punto de vista estructural, las variantes de histonas se pueden clasificar en familias homomorfas y heteromorfas, dependiendo de la extensión en que su secuencia de aminoácidos se aparta de las principales isoformas canónicas (cuyos genes son por lo general expresados durante la fase S del ciclo celular). Las variantes homomorfas involucran sólo unos pocos cambios de aminoácidos (por ejemplo H2A.1 y H2A.2; H3.1, H3.2 y H3.3), mientras que las variantes heteromorfas implican cambios que afectan a grandes porciones de la histona (por ejemplo H2A.X; H2A.Z; macroH2A, mH2A; H2A.Bbd; y la proteína centromérica A, CENP-A) (Ausió, 2006) (Figura 11).

En contraste con las histonas canónicas, que se ensamblan para formar nucleosomas durante la replicación del ADN (fase S), las variantes de histonas se pueden incorporar en regiones específicas del genoma a lo largo del ciclo celular. Hallazgos recientes sugieren que las variantes de histonas se asocian con factores que median su deposición en dominios especializados de la cromatina. Los mecanismos de recambio y deposición selectiva aún no se entienden completamente. Nuevas pruebas indican que las variantes de histonas y factores asociados son esenciales para el control epigenético de la expresión génica y otras respuestas celulares. Por lo tanto, las variantes de histonas y los complejos que intervienen en su intercambio probablemente desempeñan un papel importante en el control de la estructura cromosómica, y su desregulación posiblemente esté relacionada con el cáncer, la infertilidad, los trastornos mentales, el envejecimiento y las enfermedades degenerativas (Kusch and Workman, 2007).

Las variantes heteromorfas de la histona H2A (Figura 11) exhiben sobre todo variaciones en la secuencia en las porciones N y C-terminales con mayor predominancia de aquellas que afectan el carboxilo terminal, el cual es crítico para la estabilidad del octámero de histonas (Eickbush et al., 1988). La variante H2A.Bbd tiene solamente un 48% de identidad con respecto a la H2A canónica (Figura 11 A). Los nucleosomas que contienen H2A.Bbd presentan una conformación relajada en comparación con los nativos, adoptando una estructura más abierta que recuerda mucho a lo que se observa en los nucleosomas conteniendo histonas altamente acetiladas. Curiosamente, se encontró que H2A.Bbd co-localiza con histonas acetiladas, y es posible imaginar que ambas modificaciones estructurales actúan sinérgicamente para producir un dominio de cromatina que es más susceptible a la transcripción (Ausió, 2006).

Hasta la fecha, la variante H2A.Z es una de las pocas que se ha demostrado que es indispensable para la supervivencia. A nivel funcional, el papel de esta variante sigue siendo extremadamente polémico, habiendo quienes la asocian con la inactivación génica y quienes la asocian con la activación (o con ambas). En apoyo de la función silenciadora de la transcripción, recientemente se ha asociado a H2A.Z con la proteína de unión a la heterocromatina (HP). Igualmente, existe evidencia que apoya su papel en la activación de la transcripción, como el hallazgo de la asociación de esta variante con complejos implicados en la transcripción tales como SWR1 (Ausió, 2006).

La variante H2A.X parece tener un rol en mantener la integridad cromosómica. Participa en procesos de reparación del ADN, en la recombinación durante la meiosis y en la replicación del ADN, así como también en la apoptosis. A pesar de todo esto, aún faltan estudios estructurales de esta variante y sólo una cantidad limitada de información está disponible. Es posible que, como sucede con H2A.Z, su importante rol estructural esté mediado por sus propias MPT y por asociaciones con complejos de remodelación de la cromatina (Ausió, 2006).

La macro H2A (mH2A) es una variante heteromorfa recientemente descubierta que fue identificada por primera vez en el cromosoma X inactivo femenino en mamíferos. También ha sido encontrada en

machos de vertebrados durante la espermatogénesis, donde se asocia a la cromatina pericéntrica. Esta variante de la histona H2A existe como dos isoformas que son producto del empalme alternativo de genes: mH2A1.1, que se acumula a lo largo de la diferenciación y el desarrollo, y mH2A1.2, que tiene un nivel constante de expresión. Estudios recientes revelaron que mH2A estabiliza el nucleosoma, e interfiere con la unión de factores de transcripción, actuando así como un represor transcripcional (Ausió, 2006).

En cuanto a las variantes de la histona H3, la H3.3 constituye un muy buen ejemplo de variante homomorfa en la que pequeños cambios en la secuencia tienen importantes implicancias funcionales. En los seres humanos, sólo cuatro aminoácidos son diferentes en la composición de esta histona en comparación con la principal isoforma canónica H3.1. Sin embargo, las dos variantes exhiben diferencias funcionales importantes. En contraste con H3.1, se ha demostrado que H3.3 se acumula en algunos tejidos durante el desarrollo tanto en humanos como en ratones, y que se enriquece en las regiones transcritas activamente del genoma donde reemplaza H3.1 durante la elongación transcripcional (Ausió, 2006). H3.2 contiene sobre todo MPT silenciadoras que han sido asociada a la heterocromatina (Hake, 2006). H3.1 puede contener tanto marcas asociadas a la activación de la transcripción como a su represión, siendo estas últimas diferentes a las que se encuentran en H3.2 (Hake, 2006).

CENP-A es una variante de la histona H3 que se encuentra en la cromatina centromérica. Como con H2A.Z, esta variante es indispensable para la supervivencia. Desde un punto de vista estructural, la proteína se compone de una secuencia N-terminal esencial que varía entre especies tanto en longitud como en composición, seguida de un dominio que en el caso de los humanos, muestra 62% de identidad con la H3 canónica. Se ha demostrado recientemente que CENP-A y H4 forman tetrámeros más compactos y rígidos que los formados por las isoformas canónicas. A nivel de la fibra de cromatina, la larga cola N-terminal interactúa con el ADN enlazador y participa, junto con la histona H1, en el mantenimiento de la estructura de orden superior de la fibra de cromatina (Ausió, 2006).

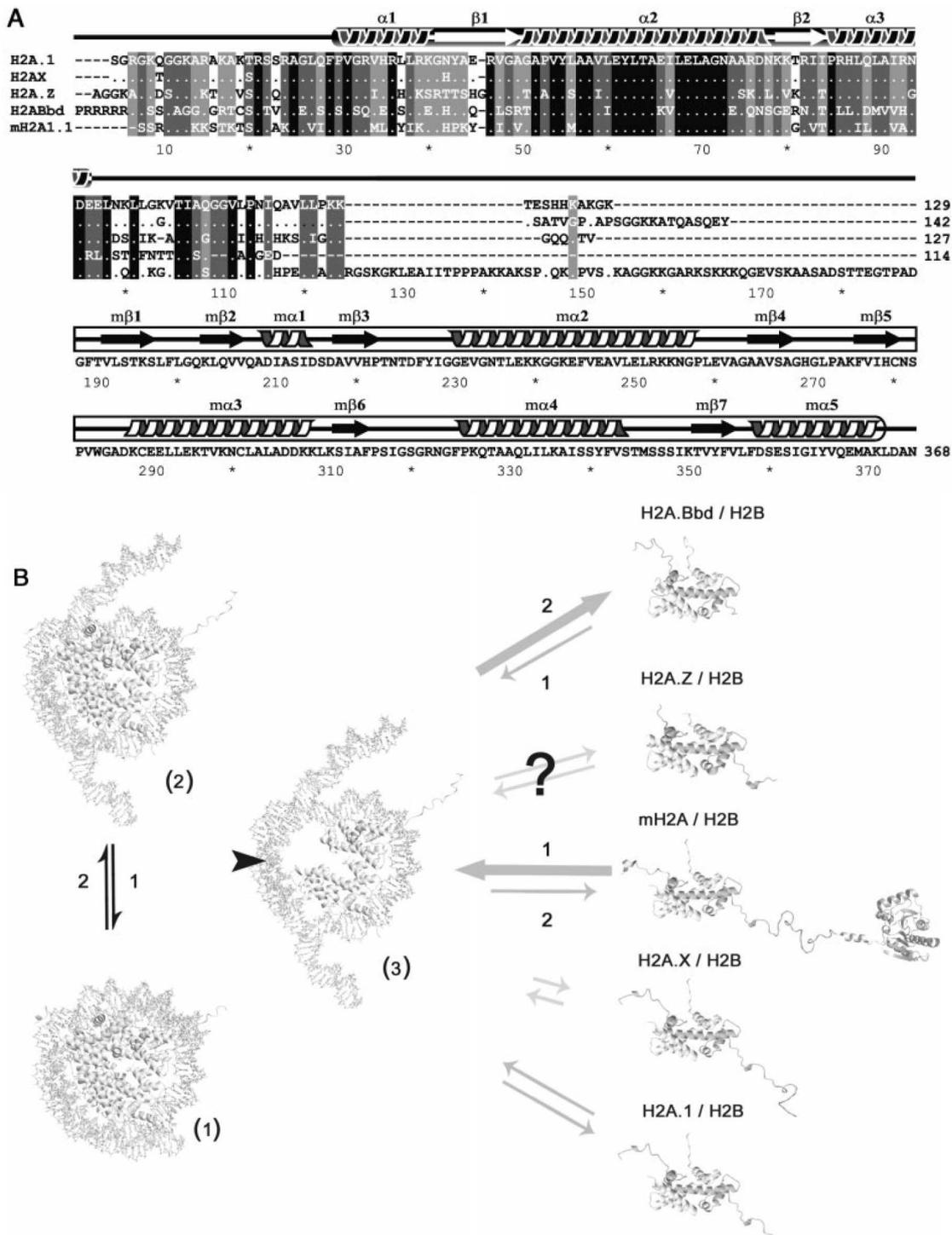


Figura 11. Variantes de la histona H2A y su implicancia en la dinámica y conformación de los nucleosomas. A) Alineación de secuencias aminoacídicas de variantes heteromorfas humanas de la histona H2A. El grado de similitud entre las diferentes secuencias es proporcional a la intensidad de las áreas sombreadas. B) Los nucleosomas son complejos de nucleoproteínas altamente dinámicos. En solución, el ADN asociado con el octámero de histona rápidamente fluctúa entre un estado cerrado (1) y una conformación abierta (2). El recambio del dímero H2A-H2B (3) tiene un papel muy importante en esta transición. Las diferentes intensidades de las flechas grises muestran la importancia de las variantes de H2A en desplazar el equilibrio hacia una conformación abierta o una cerrada. Las flechas más cortas indican un bajo nivel de recambio. (Ausió, 2006).

En gran contraste con H2A y H3, H2B y particularmente H4 presentan un bajo nivel de variabilidad en la secuencia de aminoácidos, un hecho que se ha atribuido, al menos en parte, al papel preferencial que estas histonas juegan en el mantenimiento de las interacciones que mantienen unido al octámero de histonas en el nucleosoma. Sin embargo, la cola N-terminal de la histona H2B sobresale del nucleosoma y puede formar interacciones inter-nucleosomales que desempeñan un papel importante en la movilidad y la dinámica de los nucleosomas. Por lo tanto, la variación de la histona dentro de este dominio puede tener importantes implicancias en la conformación de la cromatina. Curiosamente, la mayor parte de la variabilidad observada en H2B parece ocurrir en el esperma de vertebrados y de invertebrados, y en los gametos masculinos de las plantas. En los seres humanos, tres variantes de testículo específicos se han descrito: TH2B, hTSH2B (H2B específica de testículo humana), y H2BFWT. Los largos dominios N-terminales de histonas de esperma de equinodermo participan en la compactación de la cromatina que se observa en el esperma de estos organismos. Esta compactación probablemente sea resultado de la neutralización de la carga negativa de ADN mediante el establecimiento de interacciones internucleosomales. En cuanto a las variantes de vertebrados, hTSH2B es la única variante que se ha caracterizado recientemente en detalle. Como en el caso de H2A.Bbd, se encontró que hTSH2B bajó la estabilidad del octámero de histonas. La fuente de variación de la secuencia de hTSH2B con respecto a la isoforma canónica reside principalmente en la ocurrencia de las transiciones de aminoácidos a los residuos S / T. Por tanto, es posible que los efectos estructurales de esta variante de H2B en el nucleosoma y la fibra de cromatina sean mediadas por fosforilación. Aún son necesarios estudios estructurales sobre las otras variantes de H2B para poder comprender sus efectos sobre la organización de la cromatina (Ausió, 2006).

En cuanto a la histona H1, su papel principal es mantener y estabilizar el plegamiento de la cromatina. En comparación con las demás histonas, la histona H1 se asocia a la cromatina de una manera menos estrecha y mucho más móvil (Caron and Thomas, 1981) Hasta la fecha, han sido identificadas en mamíferos once variantes de histona H1: siete variantes somáticas (H1.1-H1.5, H1.0 y H1X), tres variantes espermatogénicas (H1t, H1T2 y H1LS1) y una ovocito específica (H1foo). Excepto H1.1-H1.5, la mayoría de las otras variantes se expresan en la célula de manera independiente de la replicación (es decir, no se sintetizan e introducen en la cromatina en la fase S) y su regulación es dependiente del desarrollo (Khochbin and Wolffe, 1994). El rápido y dinámico intercambio de histona H1 entre los diferentes segmentos de la cromatina es un determinante muy importante de la extensión de la fibra y de su plegado. Experimentos recientes han demostrado la existencia de dramáticas diferencias en las afinidades de unión de las diferentes variantes de H1 a la cromatina (Th'ng et al., 2005). Además, las variantes de las histonas H1 pueden operar en conjunto con una "red" de otras proteínas de unión a la cromatina, como proteínas del grupo de alta movilidad (HMG), proteínas HP1 o proteínas MeCP2 (Bustin et al., 2005; Luger and Hansen, 2005), para definir si la cromatina es "permissiva" a la transcripción (eucromatina) o "represiva" (heterocromatina). La

distribución no aleatoria de las variantes de la histona H1 en el genoma ha sido bien documentada (Parseghian et al., 2001) y se ha demostrado que estas variantes afectan diferencialmente la expresión génica *in vivo* (Alami et al., 2003). Por ejemplo, la histona H1.2 es capaz de unirse preferentemente a una secuencia reguladora del gen de la histona H3.2 (Kaludov et al., 1997), ha sido directamente involucrada en la apoptosis inducida por la rotura de doble cadena del ADN (Konishi et al., 2003), e interactúa con MSX1 (un factor de transcripción involucrado en la expresión de genes miogénica) (Lee et al., 2004). Por lo tanto, aunque la especificidad funcional de las variantes de la histona H1 no parece ser tan bien definida como para las otras variantes de las histonas principales, toda la evidencia anterior sugiere que su variabilidad estructural es funcionalmente relevante.

REGULACIÓN EPIGENÉTICA DE LA PLASTICIDAD EN LA CORTEZA VISUAL.

Recientemente ha sido demostrado que los programas epigenéticos cumplen una importante función en la regulación de la plasticidad en la corteza visual. En particular se ha observado que aumentando el nivel de acetilación de las histonas (mediante administración intracortical de inhibidores de la enzima histona desacetilasa) se reactiva la plasticidad y se revierten los déficits visuales en roedores adultos. Además se ha observado que la disminución durante el desarrollo de algunas MPT de histonas asociadas a la activación de la expresión génica (ej. fosfo-acetilación de H3 y H4) están asociadas al cierre del PC de plasticidad (Putignano et al., 2007; Silingardi et al., 2010). Se ha visto que el aumento de la expresión de miR-132 que ocurre luego de la apertura de los ojos (descrito anteriormente), está mediado por modificaciones epigenéticas en la región promotora del gen que codifica para dicho micro ARN. En particular, se observan MPT en la histona H3 que se asocian a un aumento de la transcripción (acetilación en lisinas 9 y 14, fosforilación en serina 10, fosfo-acetilación y dimetilación en lisina 4) (Tognini et al., 2011).

MODIFICACIONES EPIGENÉTICAS INDUCIDAS POR EL TRATAMIENTO CON FLUOXETINA.

Como se mencionó anteriormente, el tratamiento con fluoxetina induce la reactivación de la plasticidad y permite la recuperación de la visión en animales adultos. Además de los efectos sobre el balance E/I en la corteza visual, se ha demostrado que la fluoxetina provoca un aumento en la expresión del factor neurotrófico BDNF (Maya Vetencourt et al., 2008). A partir de esta observación se buscaron modificaciones epigenéticas en la región promotora del gen *Bdnf*, en particular en la acetilación en la histona H3, que en general promueve el aumento de la transcripción. Efectivamente, utilizando métodos de inmunoprecipitación de la cromatina con un anticuerpo anti-H3 acetilada, se demostró que la fluoxetina provoca un aumento de la acetilación de la H3 asociada al promotor del *Bdnf* (Maya Vetencourt et al., 2011). Una de las enzimas responsables de modular el nivel de acetilación de histonas en el sistema nervioso central es la histona desacetilasa (HDAC). Los autores buscaron si el tratamiento con fluoxetina determina

algún cambio en la expresión de la HDAC; se vio que los niveles de transcripción del gen *Hdac5* disminuyen como resultado del tratamiento con fluoxetina (Maya Vetencourt et al., 2011).

Recientemente ha sido demostrado que NPAS4 (factor de transcripción que juega un papel importante en el desarrollo del cerebro y en la supervivencia neuronal (Lin et al., 2008), cuya expresión es dependiente de la experiencia visual, es un mediador clave de la plasticidad en el sistema visual de rata adulta y que actúa vía BDNF sobre el balance E/I (Maya Vetencourt et al., 2012). La administración farmacológica *per se* de NPAS4 determina la restauración de la plasticidad en la corteza visual de adulto. Por otro lado, NPAS4 es un mediador clave en la modulación de la plasticidad por tratamiento crónico con fluoxetina. Este tratamiento induce un aumento en la expresión de NPAS4 a través de una reducción en la tri-metilación de la lisina 27 de la histona H3 en la región promotora del gen (Maya Vetencourt et al., 2012).

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). Por lo tanto, es razonable suponer que existen modificaciones epigenéticas aún no descritas inducidas por el tratamiento con fluoxetina, entre ellas cambios en los niveles de expresión de algunas variantes de histonas y cambios en sus MPT.

TÉCNICA PARA EL ESTUDIO DE VARIANTES DE HISTONAS Y SUS MPT

Las histonas son proteínas muy conservadas evolutivamente entre los eucariotas que presentan ciertas características particulares: son extremadamente básicas (debido a su alto contenido en lisina y arginina), tienen bajo peso molecular, y presentan alta homología de secuencia entre sus variantes. Por ejemplo, en el caso de la H3.3 sólo cuatro aminoácidos son diferentes en la composición de esta histona en comparación con la principal isoforma canónica H3.1; en H3.3, la A31 es reemplazada por una S31, y A87, G90 y S96 reemplazan a S87, M90, y C96 respectivamente. La gran similitud en las propiedades fisicoquímicas de las variantes de histonas plantea un desafío metodológico al estudiarlas, obligando al uso de técnicas diseñadas específicamente para este fin (ver Discusión).

En este trabajo la técnica que seleccionamos fue la de electroforesis bidimensional específica para el estudio de histona, seguida por espectrometría de masa. Esta electroforesis bidimensional se basa en la realización de geles AUTxSDS y geles AUTxAU. Los geles AUTxSDS permiten la separación de variantes de histonas, y los geles AUTxAU permiten separar las histonas según sus MPT. Como primera dimensión, en los dos casos, se utilizan geles AUT que permiten separar a las variantes homomorfas de las heteromorfas, retardando la migración de las primeras con respecto a las segundas. La separación de las variantes de histonas se logra mediante una reducción en la movilidad electroforética diferencial que es un resultado directo de la presencia de detergentes no iónicos. Los detergentes provocan la formación de micelas entre el detergente y las regiones hidrófobas de las histonas, un proceso que es extremadamente sensible a pequeñas diferencias en la hidrofobicidad de cada proteína (Zweidler, 1978). Los geles de segunda

dimensión son de dos tipos: de dodecil sulfato de sodio (SDS), que separa a las histonas de acuerdo con su masa molecular, y los geles de ácido acético/urea (AU), que separan a las histonas en función de su relación carga/masa, permitiendo separar isoformas con distintas MPT (Panyim and Chalkley, 1969). La urea en el gel actúa como un agente de desnaturalización y el ácido acético permite la separación de las histonas según su carga. Esta combinación de métodos que difieren en el principio de separación de las proteínas, permite obtener fracciones de histonas de alta pureza y con gran resolución (Green and Do, 2009).

JUSTIFICACIÓN

El estudio de los mecanismos celulares y moleculares que determinan el nivel de plasticidad cerebral dependiente de la experiencia a lo largo de la vida es de gran relevancia, tanto para entender los procesos del desarrollo fisiológico, como también los procesos patológicos relacionados. De manera muy prometedora, en los últimos años se han identificado algunas estrategias que, modulando algunos de los factores ya conocidos de regulación de la plasticidad, permiten la potenciación de ésta en animales adultos normalmente poco plásticos, y, aún más importante, permiten la recuperación de funciones en determinadas neuropatologías.

En este trabajo, pretendemos contribuir al conocimiento de los mecanismos moleculares que determinan el nivel de plasticidad utilizando como modelo experimental la corteza visual del ratón, un modelo paradigmático en el estudio de los procesos de plasticidad cortical. Este conocimiento es fundamental para identificar posibles estrategias de recuperación de la visión en adultos con patologías no tratadas a tiempo, como el estrabismo y la anisometropía.

La hipótesis actual es que el nivel de plasticidad es determinado por la activación de programas de expresión génica específicos, con grupos de genes activados durante los periodos críticos de alta plasticidad y otros fuera de estos periodos. Entender la expresión diferencial de dichos programas génicos y su rol potencial en el control de los niveles de plasticidad es fundamental para poder contribuir a este conocimiento.

Uno de los principales mecanismos de regulación de la expresión génica, cuyo rol en el desarrollo y plasticidad del sistema nervioso ha recibido mucha atención en los últimos años, son los mecanismos epigenéticos.

En este proyecto pretendemos identificar cambios epigenéticos, aún no descritos, potencialmente implicados en el control de la plasticidad en la corteza visual del ratón, con especial énfasis en el estudio de las histonas. Para esto elegimos una aproximación desde la proteómica. Considerando la gran similitud en las propiedades fisicoquímicas de las histonas, parte de esta tesis se dedicó a la puesta a punto de una técnica diseñada específicamente para el estudio de estas proteínas. Dicha técnica se basa en la utilización de un tipo de electroforesis bidimensional que permite una alta resolución en la separación de histonas, seguida por análisis por espectrometría de masa.

La identificación de los perfiles proteómicos diferenciales entre condiciones de alta plasticidad (animales jóvenes), baja plasticidad (adultos) y alta plasticidad reactivada en adultos por tratamiento farmacológico con fluoxetina, permitirá identificar potenciales candidatos a la regulación de este proceso. Este último tratamiento es particularmente relevante ya que la fluoxetina, de amplio uso en humanos por su

acción como antidepresivo, ha mostrado ser efectiva en la reactivación de la plasticidad en la corteza visual de adultos y en la recuperación de la visión en animales ambliopes. Por lo tanto, constituye una estrategia no invasiva potencialmente aplicable en la clínica en el tratamiento de patologías de la visión.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

El objetivo general de este trabajo es contribuir a la caracterización de los mecanismos moleculares que determinan altos niveles de plasticidad de la corteza visual en condiciones fisiológicas durante el desarrollo, y reactivados por el tratamiento con fluoxetina en adultos.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Puesta a punto de una estrategia metodológica específica para el estudio de histonas.

1.1. Producción de muestras de corteza visual enriquecidas en histonas para su análisis posterior.

Se identificaron estrategias metodológicas para obtener muestras enriquecidas en histonas.

1.2. Puesta a punto de las metodologías de geles bidimensionales AUTxSDS y AUTxAU.

Se implementó la metodología de proteómica basada en la realización de geles bidimensionales específicos para obtener spots separados con alta resolución.

1.3. Selección de spots potencialmente correspondientes a histonas para su análisis posterior.

Se utilizaron distintas metodologías para la selección de spots a analizar posteriormente.

2. Identificación de las variantes de histonas y otras proteínas presentes en la muestra, y estudio de la modulación de su expresión en función del nivel de plasticidad.

2.1. Identificación de las variantes de histonas y otras proteínas presentes en la muestra por espectrometría de masa.

Se utilizó la metodología de espectrometría de masa para la identificación de los spots seleccionados en los geles bidimensionales.

2.2. Estudio de la modulación de la expresión de histonas y otras proteínas identificadas, en función del nivel de plasticidad

Para la comparación del perfil proteómico entre las condiciones experimentales, se realizó análisis de imagen sobre los geles bidimensionales usando el software Melanie 6.0.

2.2.1. Comparación entre animales en periodo crítico de plasticidad (alta plasticidad fisiológica) y adultos (baja plasticidad fisiológica)

2.2.2. Comparación entre animales adultos normales (baja plasticidad fisiológica) y tratados con fluoxetina (alta plasticidad inducida por fármaco)

MATERIALES Y MÉTODOS

MANTENIMIENTO Y TRATAMIENTO DE ANIMALES EXPERIMENTALES

Se utilizaron ratones (*Mus musculus*) de la cepa C57B6/J juveniles (pico del periodo crítico de plasticidad para la corteza visual, P28), y adultos (~P70). Los animales fueron mantenidos en condiciones estándar de temperatura ($20^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$), humedad (aproximadamente 50%) y ciclo de luz/oscuridad 14/10 horas respectivamente, en jaulas cada una con un máximo de 6 animales, en el bioterio de la Unidad de Animales Transgénicos y Experimentación (UATE) del Institut Pasteur de Montevideo.

Para el tratamiento con fluoxetina hidrocloreuro de animales adultos, 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 roedores adultos (ratas: Maya Vetencourt et al., 2008; Maya Vetencourt et al., 2011; ratones: Begenisic et al., 2014; Ruiz-Perera et al., 2015) 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; Ruiz-Perera et al., 2015). La fluoxetina (Selectchemie AG, Suiza, donación de Laboratorios Gador S.A., Uruguay y de D. Agrati, Facultad de Ciencias, UdelaR) 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. Los ratones adultos controles fueron mantenidos en las mismas condiciones, sin la adición de fluoxetina en el agua.

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 al hipocampo, 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.

PREPARACIÓN DE MUESTRAS EXPERIMENTALES.

Para la extracción de histonas se utilizaron técnicas estándar de enriquecimiento en histonas. Para ello, se utilizaron como protocolos de base los que se detallan en Shechter et al., 2007 y Green and Do, 2009, sobre los cuales se hicieron pequeños ajustes. Los protocolos finalmente utilizados se detallan a continuación.

EXTRACCIÓN CON SALES

1. Transferir la muestra de tejido de corteza visual (aproximadamente 20 mg para cada ratón) a 400 μ l de buffer de homogenización (Hepes 10mM, EGTA 0.1mM, Sacarosa 0.28M pH 7.4) conteniendo inhibidores de Serina proteasas 1mM PMSF (fluoruro de fenilmetilsulfonilo) y 10 μ l/ml Aprotinina, e inhibidores de fosfatasa 1mM NOV (sodio ortovanadato, inhibidor de tirosina fosfatasa y de fosfatasa alcalina), 20mM NaF (Fluoruro de sodio).
2. Homogeneizar en hielo con mortero. Extraer una fracción que representará el extracto total.
3. Centrifugar a 1500g durante 10 minutos a 4°C.
4. Extraer una fracción del sobrenadante (S1) que representará el extracto citoplásmico.
5. Resuspender el pellet (P1) conteniendo la fracción nuclear en 100 μ l de solución de sal de baja concentración (20mM Hepes, 25% glicerol, 2mM MgCl₂, 0.1M KCl, 5mM Dithiotritiol, DTT).
6. Centrifugar a 1500g durante 10 minutos a 4°C.
7. Extraer una fracción del sobrenadante (S2).
8. Resuspender el pellet (P2) en 100 μ l de solución de sal de alta concentración (20mM Hepes, 25% glicerol, 2mM MgCl₂, 1M KCl, 1mM EDTA, 5mM DTT) y mezclar enérgicamente con vórtex.
9. Mantener en hielo durante 35 minutos vortexando ocasionalmente.
10. Centrifugar a 13200 rpm durante 30 minutos a 4°C.
11. Extraer el sobrenadante (S3) que contiene las proteínas nucleares.
12. Resuspender pellet (P3) en 100 μ l de buffer de resuspensión (120mM NaCl, 20mM Hepes, 0.1mM DTT, 0.1mM EGTA).

EXTRACCIÓN CON ÁCIDO

1. Colocar las cortezas visuales (de aproximadamente 20 mg) en 600 μ l de buffer de lisis hipotónico (10mM Tris pH 7.5, 1 mM EDTA, 1mM NOV, 1mM PMSF, 10 μ g/ml Aprotinina, 1% Igepal CA-630).
2. Homogeneizar suavemente con mortero manual en tubo eppendorf a 4°C y dejar 30 minutos.
3. Centrifugar a 18000g durante 15 minutos a 4°C.
4. Descartar el sobrenadante, y recuperar el pellet.
5. Agregar 500 μ l de solución ácida (0.2M HCl, 10% glicerol).
6. Agitar enérgicamente en vórtex hasta disolver el pellet.

7. Centrifugar a 18000g durante 30 minutos a 4°C.
8. Descartar el pellet, recuperar el sobrenadante.
9. Precipitar las proteínas básicas presentes en el sobrenadante con 10 volúmenes de acetona fría (mantenida a -20°C, al menos durante 15 minutos antes de usar).
10. Agitar en vórtex inmediatamente.
11. Centrifugar a 18000g durante 30 minutos a 4°C.
12. Descartar el pellet, recuperar el sobrenadante.
13. Lavar el pellet sin romperlo, con acetona fría y centrifugar a 18000g durante 10 minutos a 4°C.
14. Secar al aire a temperatura ambiente durante 10 minutos (no resecar).
15. Resuspender el pellet en:
 - para geles SDS: 50 µl de buffer de resuspensión (7M urea, 2M Tiourea, 4% CHAPS, 60mM DTT).
 - para geles conteniendo urea (AUT ó AU): 50 µl de buffer AULB (acetic/urea loading buffer) (8M urea, 5% ácido acético, 5% β-mercaptoetanol, 0.02% cristal violeta).

CUANTIFICACIÓN PROTEICA

La cuantificación de proteínas se realizó mediante el método de Bradford en microplaca (Olson and Markwell, 2001), según el siguiente protocolo:

1. Se preparan los estándares de seroalbúmina bovina (de 0 a 14 µg/µl) y las muestras de concentración desconocida (0.5 y 1 µl) en un volumen final de 140 µl.
2. Se agrega 20 µl de NaOH 1M 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 se mezcla.
4. Se incuba durante 5 minutos a temperatura ambiente.
5. Se detecta la absorbancia a 595 nm en un lector de placas.
6. Se prepara la curva de calibración, graficando absorbancia a 595 nm en función de la concentración proteica, y se determina la concentración proteica de las muestras a partir de la ecuación obtenida.

ELECTROFORESIS UNIDIMENSIONAL

SDS-PAGE PARA LA SEPARACIÓN UNIDIMENSIONAL DE HISTONAS.

Para la realización de geles unidimensionales (SDS-PAGE) se utilizó el siguiente protocolo:

1. Preparar gel de corrida de acrilamida/bisacrilamida (15%T, 2.67 %C en 0.325M Tris pH 8.8, 0.1% SDS, 0.05% APS, 0.05% TEMED, ddH₂O; stock: 30%T, 2.67%C correspondiente a 29.2 g/100 ml de acrilamida y 0.8 g/100 ml de bisacrilamida).

2. Recubrir el gel con isobutanol al 50%.
3. Dejar polimerizar al menos una hora a temperatura ambiente.
4. Preparar gel concentrador de acrilamida/bisacrilamida (6 %T, 2.67 %C en 0.125M Tris pH 6.8, 0.1% SDS, 0.05% APS, 0.1% TEMED, ddH₂O).
5. Remover el isobutanol y enjuagar con agua destilada. Agregar el gel concentrador sobre el gel de corrida, e insertar el peine apropiado.
6. Dejar polimerizar una hora a temperatura ambiente.
7. Remover el peine, enjuagar con agua destilada, cargar 30 µg de muestra (resuspendida en buffer de resuspensión, como se detalla en el protocolo de extracción ácida), y 5 µl de marcador de peso molecular (Precision Plus Protein, Unstained Standards, BioRad).
8. Ensamblar el equipo de electroforesis, llenar con buffer de corrida para SDS-PAGE (0.1% SDS, 0.192% Glicina, 0.025M Tris pH 8.8, ddH₂O), y correr a 80V hasta que el azul de bromofenol alcance el gel de corrida. Luego subir el voltaje a 120V. Correr hasta que el azul de bromofenol alcance al borde del gel.
9. Desensamblar y teñir con Azul de Coomassie.

GELES UNIDIMENSIONALES DE ÁCIDO ACÉTICO-UREA (AU)

1. Ensamblar los moldes de geles (con separadores de 1.5 mm), y preparar gel de corrida de acrilamida/bisacrilamida (12.08 %T, 0.66 %C, 8.6M Urea, 5% ácido acético glacial, 1% TEMED, 0.1% APS).
2. Verter la solución en el molde y dejar que polimerice por 1 hora.
3. Recubrir el gel con buffer de recubrimiento AU (0.02% cristal violeta, 8.6M urea, 5% ácido acético glacial, ddH₂O). Dejar que polimerice 1 hora adicional.
4. Ensamblar el equipo de electroforesis, llenar las cámaras con buffer de corrida (5% ácido acético) y realizar una pre-electroforesis usando un voltaje constante de 200V hasta que el cristal violeta salga del gel. Los electrodos se enchufan al revés (ver luego).
5. Preparar sellante de agarosa (1% agarosa, 0.2% cristal violeta, buffer de recubrimiento AU) y volcar sobre el gel de corrida hasta arriba de todo. Insertar peine apropiado.
6. Dejar polimerizar unos minutos, remover el peine y cargar la muestra disuelta en buffer AULB.
7. Ensamblar el aparato de electroforesis, llenar con 5% ácido acético (AURB: buffer de corrida ácido acético-urea) y correr a voltaje constante de 100V hasta que el cristal violeta alcance el borde inferior del gel. Los electrodos se enchufan al revés (proteínas cargadas positivamente que migran hacia el polo negativo, lo cual difiere de la electroforesis SDS convencional donde las proteínas están cargadas negativamente y migran hacia el polo positivo).

8. Remover el gel, enjuagar con ddH₂O y teñir o transferir a membrana según corresponda.

WESTERN BLOT

SOBRE GELES SDS (DODECIL SULFATO DE SODIO)

Se realizaron ensayos de Western blot sobre geles SDS obtenidos de experimentos de SDS-PAGE en una dimensión, y sobre geles SDS obtenidos luego de ensayos de dos dimensiones AUTxSDS. Una vez terminada la electroforesis en los geles SDS, las proteínas fueron transferidas a membrana de nitrocelulosa (GE healthcare). Luego de la equilibración de la membrana y del gel junto con los accesorios del equipo en buffer de transferencia (25mM Tris, 192mM glicina, 20% metanol, pH 8.3) a 4°C, se realizó la transferencia fijando los parámetros a voltaje constante, a 100 V durante 2 horas. Al finalizar la transferencia, para verificar la eficiencia del 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 PBS-T (0.1% Tween-20 en PBS) durante una hora a temperatura ambiente, con agitación suave. Posteriormente se incubó la membrana con el anticuerpo primario en PBS-T, 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 (ver lista de anticuerpos utilizados en Tabla 1)

Tabla 1: Anticuerpos utilizados en los análisis de Western blot:

Anticuerpo primario	Marca	Concentración
H2A (conejo)	Cell Signaling	1:1000
H2B (conejo)	Cell Signaling	1:1000
H3 (conejo)	Cell Signaling	1:2000
H4 (ratón)	Cell Signaling	1:1000
P(Ser10)H3 (conejo)	Santa Cruz Biotechnology	1:1000
Ac(Lys9)H3 (conejo)	Cell Signaling	1:2000
Ac(Lys8)H4 (conejo)	Cell Signaling	1:5000

Anticuerpo secundario	Marca	Concentración
Conejo	Cell Signaling	1:5000
Ratón	Cell Signaling	1:10000

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 cassette 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 minutos). En una segunda fase se logró la puesta a punto del revelado de la señal utilizando como sistema de detección el GBOX Chemi system (SYNGENE) como método alternativo. El mismo permite visualizar la señal luminosa de modo continuo en el tiempo.

SOBRE GELES AU (ACIDO ACÉTICO / UREA)

Para estos ensayos se utilizaron anticuerpos que reconocen específicamente la histona H3 y una de sus formas modificadas, la histona H3 acetilada en lisina⁹. Una vez culminada la electroforesis, el gel AU es marcado en uno de sus extremos para orientación y es transferido para su equilibración, junto a la membrana de nitrocelulosa, a un recipiente plástico con ácido acético al 0.7% (buffer de transferencia) e incubado con agitación suave por 15-30 minutos a 4°C. Luego de la equilibración de la membrana y del gel, se realizó la transferencia fijando los parámetros a voltaje constante, a 100 V durante 1 hora. Los electrodos se enchufan al revés (ver antes). A partir de este punto, se procede de igual manera que para el Western blot sobre geles SDS.

ELECTROFORESIS BIDIMENSIONAL (2D)

PRIMERA DIMENSIÓN: AUT (ÁCIDO ACÉTICO, UREA, TRITÓN X-100)

1. Ensamblar los moldes de geles usando separadores de 0.75mm y preparar la solución de gel de corrida AUT de acrilamida/bisacrilamida (12.08 %T, 0.66 %C, 6M Urea, 5% ácido acético glacial, 0.4% tritón X-100, 0.1% APS, 1% TEMED).
2. Verter la solución entre los vidrios, dejando aproximadamente 2.5 cm para el gel concentrador AUT. Dejar que polimerice por 1 hora.
3. Cubrir el gel con buffer de recubrimiento del gel (0.02% cristal violeta, 6M urea, 0.4% Tritón, 5% ácido acético glacial, ddH₂O). Dejar que polimerice 1 hora adicional.
4. Ensamblar el equipo de electroforesis, llenar las cámaras con buffer de corrida AURB (5% ácido acético).
5. Realizar un pre-electroforesis usando un voltaje constante de 200V, hasta que el cristal violeta alcance el borde del gel. Los electrodos se enchufan al revés.
6. Remover el gel del equipo de electroforesis y sacar el AURB que queda por encima del gel.
7. Preparar el gel concentrador AUT de acrilamida/bisacrilamida (9.07 %T, 0.66 %C, 85% buffer para gel concentrador, 0.0005% riboflavina, 0.5% TEMED). Buffer para gel concentrador: 6.0M urea, 10mM acetato de potasio, 0.5% ácido acético glacial, ddH₂O.

La riboflavina se utiliza como un fotoiniciador para la polimerización de geles de poliacrilamida. En presencia de la luz, se forman radicales libres en solución acuosa, los cuales provocan que la acrilamida y bis-acrilamida polimericen para formar una matriz de gel. El catalizador TEMED se añade para acelerar la formación de radicales libres. La riboflavina se utiliza comúnmente en el gel concentrador para electroforesis no desnaturizante de poliacrilamida porque las proteínas nativas pueden ser sensibles a los iones de iniciadores comúnmente utilizados en la preparación de geles, como APS. Otra ventaja de riboflavina sobre el APS es que no se iniciará la polimerización hasta que se ilumine el gel.

8. Mezclar y colocar sobre el gel de corrida hasta arriba del todo, luego insertar peine apropiado. Dejar que el gel polimerice por al menos una hora, irradiándolo con una fuente de luz brillante.
9. Remover el peine, enjuagar con AURB, y llenar los pocillos con solución de protaminas (5% ácido acético, 5mg/ml protamina sulfato, 5 mg/ml cisteamina, ddH₂O).

Las protaminas son proteínas básicas que desplazan in situ a las histonas de la cromatina, permitiendo su liberación y posterior ingreso al gel durante la corrida electroforética.

10. Agregar la muestra por debajo de la solución de protaminas usando jeringa tipo Hamilton.
11. Ensamblar el equipo, llenar con AURB, y correr a 200V y detener inmediatamente después de que el cristal violeta salga del gel. Los electrodos se enchufan al revés (proteínas cargadas positivamente).

SEGUNDA DIMENSIÓN: SDS (DODECIL SULFATO DE SODIO)

Una vez terminada la primera dimensión (pasos del 1 al 11) se procede de la siguiente manera:

12. Remover el gel AUT del molde, lavarlo con agua y luego incubar con buffer de pre-equilibración (50mM Tris-HCl pH 6.8, 20ug/ml azul de bromofenol, ddH₂O) por 1-24 horas con agitación suave.
13. Ensamblar el molde de gel (separadores de 1.5mm), y preparar solución para gel de corrida SDS-PAGE 15% (15%T, 2.67 %C en 0.325M Tris pH 8.8, 0.1% SDS, 0.05% APS, 0.05% TEMED, ddH₂O). Verter la solución de gel permitiendo que queden aprox. 2.5cm desde el borde. Cubrir con isobutanol y dejar polimerizar por 1 hora.
14. Preparar gel concentrador de acrilamida/bisacrilamida (6 %T, 2,67 %C en 0.125M Tris pH 6.8, 0.1% SDS, 0.05% APS, 0.1% TEMED, ddH₂O). Remover el isobutanol y enjuagar con agua destilada. Agregar el gel concentrador sobre el gel de corrida y verterlo en el molde del gel hasta 1cm por debajo del borde del vidrio (para que entre la tira de la primera dimensión). Cubrir con isobutanol y dejar polimerizar durante 1 hora.
15. Cortar cada carril de los geles AUT preequilibrados identificando la orientación de los mismos.

16. Incubar con agitación los carriles cortados en buffer de equilibración (50mM Tris-HCl pH 6.8, 0.2% SDS, 0.2% β -mercaptoetanol, 20% glicerol, 20 μ g/ml azul de bromofenol, ddH₂O) por 2 horas, cambiando cada 30 minutos.
17. Colocar un carril del gel AUT cortado entre los vidrios, asegurando que quede en contacto con la superficie del gel concentrador.
18. En un pedacito de papel filtro, agregar 5 μ l de marcador de peso molecular mezclado con 5 μ l de solución de agarosa (0.5% agarosa en buffer de corrida para SDS-PAGE). Colocar el papel entre los vidrios, al lado de la tira AUT.
19. Agregar solución de agarosa entre los vidrios hasta arriba de todo, y dejar polimerizar unos minutos.
20. Ensamblar el equipo de electroforesis, llenar con buffer de corrida para SDS-PAGE (0.1% SDS, 0.192% Glicina, 0.025M Tris pH 8.8, ddH₂O), y correr a 80V hasta que el azul de bromofenol alcance el gel de corrida. Luego subir el voltaje a 120V. Correr hasta que el azul de bromofenol alcance al borde del gel.
21. Desensamblar y teñir o transferir a membrana de nitrocelulosa según corresponda.

SEGUNDA DIMENSIÓN: AU (ÁCIDO ACÉTICO, UREA)

Una vez terminada la primera dimensión (pasos del 1 al 11) se procede de la siguiente manera:

12. Ensamblar los moldes de geles (con separadores de 1.5mm), y preparar gel de corrida de acrilamida/bisacrilamida (12.08 %T, 0.66 %C, 8.6M Urea, 5% ácido acético glacial, 1% TEMED, 0.1% APS).
13. Verter la solución en el molde y dejar que polimerice por 1 hora.
14. Recubrir el gel con buffer de recubrimiento AU (0.02% cristal violeta, 8.6M urea, 5% ácido acético glacial, ddH₂O). Dejar que polimerice 1 hora adicional.
15. Ensamblar el equipo de electroforesis, llenar las cámaras con buffer de corrida AURB (5% ácido acético) y realizar una pre-electroforesis usando un voltaje constante de 200V hasta que el cristal violeta salga del gel. Los electrodos se enchufan al revés.
16. Lavar el gel AUT con ddH₂O. Cortar los carriles individuales.
17. Insertar cada carril entre los vidrios del gel AU, de modo que queden en estrecho contacto con el gel. Sacar el buffer de recubrimiento residual.
18. Preparar sellante de agarosa (1% agarosa, 0.2% cristal violeta, buffer de recubrimiento AU) y volcar sobre el gel de corrida hasta arriba de todo, teniendo cuidado que la tira quede en estrecho contacto con el gel. Dejar polimerizar unos minutos.
19. Ensamblar el aparato de electroforesis, llenar con 5% ácido acético (AURB: buffer de corrida ácido acético-urea) y correr a voltaje constante de 100V hasta que el cristal violeta alcance el

borde inferior del gel. Los electrodos se enchufan al revés, ya que se trata de proteínas cargadas positivamente.

20. Remover el gel, enjuagar con ddH₂O y teñir o transferir a membrana según corresponda.

TINCIÓN DE LOS GELES.

TINCIÓN CON NITRATO DE PLATA.

El protocolo estándar consiste en los siguientes pasos:

1. Lavar el gel de poliacrilamida en un recipiente con ddH₂O, por al menos 5 minutos.
2. Incubar el gel en solución de fijación (10% Acido acético, 50% Etanol, 0.05% formalina), durante al menos 1 hora en agitación suave y conservar la solución luego de su uso.
3. Lavar 3 veces durante 5 minutos con 100ml de Solución de Lavado (etanol 50%).
4. Lavar 1 minuto con ddH₂O.
5. Enjuagar rápidamente (por menos de 1 minuto) con 100ml de solución de sensibilización (0.02% tiosulfato de sodio pentahidratado).
6. Lavar 3 veces durante 1 minuto con ddH₂O.
7. Incubar durante 20 minutos con 100ml de solución de nitrato de plata (0.2% AgNO₃, 0.075% formalina) en oscuridad.
8. Lavar 3 veces durante 1 minuto con ddH₂O.
9. Incubar con 100ml de solución de revelado (3% Na₂CO₃, 0.0004% Na₂S₂O₃.5H₂O, 0.05% formalina) hasta que se visualicen las bandas o 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 50ml 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.

TINCIÓN CON COOMASSIE COLOIDAL

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)
3. Dejar en agitación, durante toda la noche y hasta por 7 días.
4. Lavar repetidas veces con ddH₂O para remover el colorante residual.
5. Almacenar en ddH₂O.

TINCIÓN CON AZUL DE COOMASSIE

1. Colocar el gel en la solución de azul brillante de Coomassie previamente filtrada (50% etanol, 0.05% v/v azul brillante de Coomassie R-250 - previamente disuelto en agua, 10% ácido acético, 40% ddH₂O). Dejar en agitación hasta por 4 horas.
2. Remover el colorante y añadir solución de desteñido (30% etanol, 10% ácido acético, ddH₂O) hasta que las bandas o spots se vean bien definidos y el fondo del gel quede sin tinción.
3. Almacenar en ddH₂O.

EXPERIMENTOS DE PROTEÓMICA DIFERENCIAL

En los experimentos de proteómica de geles bidimensionales se utilizaron muestras de corteza visual de ratones en el periodo crítico de plasticidad (P28), adultos (~P100) y adultos tratados crónicamente con fluoxetina.

Para comparar la expresión de proteínas entre ratones en periodo crítico (PC) y ratones adultos (AD), realizamos n=5 experimentos de electroforesis bidimensional AUTxSDS, y n=3 experimentos AUTxAU. Para comparar la expresión de proteínas entre ratones adultos (AD) y ratones adultos tratados con fluoxetina (FLX) se realizaron n=7 experimentos de electroforesis bidimensional AUTxSDS. En cada experimento se realizaron dos geles con muestras de PC vs AD o de AD vs FLX.

ANÁLISIS DE IMÁGENES Y OBTENCIÓN DE DATOS

Los geles bidimensionales de ambos grupos experimentales fueron escaneados con el escáner UMAX PowerLook 1120 en formato TIFF utilizando el programa Labscan 5.0 (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).

DETECCIÓN DE LOS SPOTS

Para la detección automática de los spots con el programa Melanie 6.0 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. Los valores de parámetros utilizados fueron: smooth (6); Min area (16); Saliency (20). 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, eliminaron y adicionaron spots manualmente.

COMPARACIÓN DE LOS GELES

Para proceder a la fase de comparación de spots entre geles (“matching”), se asignaron “landmarks” (puntos de referencia) a determinados spots, que estaban claramente definidos en todos los geles del grupo de estudio. 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 eliminaron y adicionaron otros manualmente.

FORMACIÓN DE CLASES Y ANÁLISIS INTRA-CLASE

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 la variable a estudiar, en este caso se seleccionó el porcentaje de volumen (%Vol). Esta medida toma en cuenta variaciones entre geles distintos debidas a diferencias en la cantidad de proteína cargada y en la tinción, al considerar la intensidad total o volumen de todos los spots de cada gel. Esto significa que en un gel donde globalmente los spots son más oscuros que en otro, la mayoría de los volúmenes de spots es mayor. Sin embargo, la mayor parte del %Vol debe ser similar a los de la imagen en comparación, por lo menos para geles con patrones de spots similares.

El porcentaje de volumen se calcula según la ecuación

$$\%Vol = \frac{Vol}{\sum_{s=1}^n Vol_s} \times 100$$

donde **Vol** es el volumen del spot **S** en un gel conteniendo **n** spots.

El volumen del spot 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.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para el análisis estadístico, se utilizó el porcentaje de volumen como variable de estudio, considerando que el análisis se llevó adelante sobre el mismo número restringido de spots en todos los geles analizados. Debido a la alta variabilidad que presentaron los datos crudos, estos fueron normalizados. De esta forma, se obtuvo la razón entre los valores de periodo crítico y los de adulto, y los de adulto sobre los de adulto (PC/AD; AD/AD); y la de los valores de adulto tratado con fluoxetina sobre adulto, y los de adulto sobre adulto (FLX/AD; AD/AD). 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 medias de las poblaciones en estudio. Para esta parte del análisis se utilizó el programa Past 2.14 de análisis libre (Hammer and Harper, 2001). El test U de Mann Whitney es un test no paramétrico que compara las medias de muestras de las dos poblaciones de estudio. 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 medias iguales y la alternativa es que las medias entre dichas poblaciones difieren. El criterio de decisión fue el siguiente: si el p valor era mayor al alfa asignado (0.05), entonces se aceptó la hipótesis nula, ambas poblaciones presentan la misma media. 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 medias distintas.

ESPECTROMETRÍA DE MASA

Para el análisis MALDI-TOF-TOF de spots de geles bidimensionales

- Recortar manualmente los spots seleccionados de los geles y colocarlos en tubo de microcentrífuga. Almacenar a 4°C hasta su posterior procesamiento.
- Decolorar con solución de desteñido de plata.
- Deshidratar mediante la adición de acetonitrilo.
- Descartar el acetonitrilo y secar en cámara de flujo.
- Añadir 10 µl de solución de tripsina (0.1µg/µl tripsina en 67mM bicarbonato de amonio pH 8.0) a cada spot procesado, para realizar la digestión de las proteínas. La tripsina efectúa cortes en las proteínas en el extremo C-terminal de los residuos KS excepto cuando el siguiente residuo es P. Dejar digiriendo toda la noche en estufa a 37°C.
- Extraer los péptidos agregando 100µl de solución de 60% acetonitrilo en 0.1% ácido trifluoroacético,
- Concentrar los péptidos por centrifugación bajo vacío durante 45 min a 30°C (hasta un volumen final de aproximadamente 20µl).
- Realizar el “clean up” de la muestra para eliminar las sales y para concentrar la misma usando microcolumnas comerciales de fase reversa C18 (OMIX Pipette tips, Varian).
- Realizar la elución de los péptidos de la columna directamente sobre la placa de muestras del espectrómetro de masa con 2µl de la solución de matriz ácido alfa-ciano-4-hidroxi-cinámico (CHCA en 60% de acetonitrilo, 0.1% de ácido trifluoroacético).

- Obtener los espectros de masa en el espectrómetro MALDI-TOF/TOF (4800 MALDI TOF/TOF Analyzer AB Applied Biosystem MSD Sciex), en el modo reflector positivo. La calibración interna se llevó a cabo usando los fragmentos autolíticos de tripsina.
- Adquirir espectros de iones de péptidos seleccionados disociados mediante colisión (MS/MS)

Las proteínas fueron identificadas usando los valores de m/z medidos en los modos de adquisición de MS y MS / MS y utilizando el motor de búsqueda MASCOT (Matrix Science, <http://www.matrixscience.com>) en el modo de búsqueda "Sequence Query". La base de datos utilizada fue NCBI nr. Los parámetros de búsqueda que se utilizaron fueron: taxonomía: *Mus musculus*; masa de la proteína: sin restricciones; tolerancia de masa de péptidos: 0.06 Da; tolerancia de masa de fragmentos: 0,35 Da; clivajes trípticos perdidos permitidos: 1. Un score significativo de la proteína ($p=0,05$) y el score significativo de al menos un ión péptido por proteína ($p=0,05$) se utilizaron como criterios para la identificación positiva. El score es calculado como: $-10 \cdot \text{LOG}_{10}(P)$, donde P es la probabilidad absoluta.

Para el análisis nano-LC-LTQ de bandas en geles unidimensionales

- Las bandas recortadas manualmente de los geles se procesan y digieren con tripsina como se describió en el protocolo para análisis por MALDI-TOF-TOF. Luego de la digestión con tripsina, se procede como se detalla:
- Realizar el "clean up" de las muestras y secarlas bajo vacío.
- Resuspender en ácido fórmico al 0,1% (v / v) en agua.
- Inyectar las muestras en el sistema nano-HPLC (Proxeon easynLC, Thermo Scientific) equipado con una columna de fase reversa (columna C18, 3 mm; 75 mm ID 3 10 cm; Proxeon, Thermo Scientific). Separar los péptidos en un gradiente lineal de acetonitrilo 0,1% ácido fórmico (0-60% en 60 min) a un flujo de 400 nL / min.
- Obtener los espectros de masa en el espectrómetro LTQ Velos nano-ESI-lineal ion trap (Thermo Scientific).
- Identificar las proteínas mediante búsquedas en la base de datos SwissProt , utilizando los siguientes parámetros: tipo de búsqueda: MS/MS Ion Search; enzima: tripsina; modificaciones variables: Oxidación (M), Acetilación (K); masa de la proteína: sin restricciones; tolerancia de masa de péptidos: 1.5 Da; tolerancia de masa de fragmentos: 0,8 Da; clivajes trípticos perdidos permitidos: 3. Un score significativo de la proteína ($p=0,05$) y el score significativo de al menos un ión péptido por proteína ($p=0,05$) se utilizaron como criterios para la identificación positiva. El score es calculado como: $-10 \cdot \text{LOG}_{10}(P)$, donde P es la probabilidad absoluta.

ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO A PARTIR DE LOS ESPECTROS DE MASA

Las proteínas y sus posibles modificaciones postraduccionales fueron identificadas por mapeo peptídico, a partir de las masas de los péptidos utilizando el motor de búsqueda MASCOT (Matrix Science, www.matrixscience.com).

Para la identificación de la localización subcelular de las proteínas así como de su principal función biológica, se utilizaron las bases de datos de NCBI (National Center for Biotechnology Information) y de Uniprot (Universal Protein Resource; www.uniprot.org). 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*.

RESULTADOS

PRIMERA PARTE. PUESTA A PUNTO DE UNA ESTRATEGIA METODOLÓGICA ESPECÍFICA PARA EL ESTUDIO DE HISTONAS.

1.1. PRODUCCIÓN DE MUESTRAS DE CORTEZA VISUAL ENRIQUECIDAS EN HISTONAS PARA SU ANÁLISIS POSTERIOR

ESTRATEGIAS DE EXTRACCIÓN PROTEICA.

Para obtener muestras enriquecidas en histonas de corteza visual de ratón, se decidió comparar dos protocolos de extracción estándar: la extracción con sales y la extracción ácida (Shechter et al., 2007; Green and Do, 2009). Fueron necesarias algunas modificaciones de los protocolos originales para poner a punto la técnica.

Para la extracción ácida, las muestras son homogeneizadas en buffer de lisis hipotónico, conteniendo inhibidores de fosfatasas y proteasas de manera de preservar la estructura de las proteínas y sus modificaciones postraduccionales. Posteriormente la muestra se homogeniza mecánicamente y se centrifuga. A continuación las histonas son extraídas mediante la adición de HCl. Se centrifuga y se recupera el sobrenadante conteniendo las histonas. Finalmente, estas proteínas se precipitan mediante la adición de acetona a -20°C , y luego se resuspenden en buffer de resuspensión.

Para la extracción con sales, las muestras de tejido nervioso son homogeneizadas en buffer hipotónico conteniendo inhibidores de proteasas y fosfatasas. La muestra luego es centrifugada y el pellet es resuspendido en solución de baja concentración de sales. Se centrifuga nuevamente y el pellet se resuspende en solución de alta concentración de sales. Se centrifuga y en el sobrenadante quedan contenidas las proteínas nucleares (incluidas las histonas).

CUANTIFICACIÓN PROTEICA.

La cuantificación proteica se realizó mediante dos metodologías distintas (BCA y Bradford en micro placa), de manera de asegurar que los componentes del buffer de resuspensión, así como la muestra misma (enriquecida en histonas) no interfirieran en las reacciones. En ambos casos se realizó una curva estándar de seroalbúmina bovina (BSA) con concentraciones conocidas de referencia, para comparar con la muestra desconocida. Los resultados no variaron entre ambas metodologías. A partir de este punto, decidimos mantener la técnica de Bradford en micro placa, por su facilidad y la necesidad de menor cantidad de muestra, que hace muy práctica la medida de concentración proteica.

Las concentraciones proteicas obtenidas en las diferentes muestras estuvieron en el rango de 5 a 10 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$.

VERIFICACIÓN DE LA PRESENCIA DE HISTONAS EN LA MUESTRA.

Para confirmar la presencia de histonas en la muestra, se decidió llevar adelante tres tipos de análisis distintos. En primer lugar se comparó el patrón de bandas obtenido en un gel SDS-PAGE unidimensional cargando 20µg de muestra de corteza visual enriquecida en histonas (obtenida por extracción ácida y por extracción con sales) con la distribución de las isoformas de histonas principales como se describe en la bibliografía (Shechter et al., 2007). Se observó que el perfil de distribución de las principales bandas visibles en geles de poliacrilamida al 15% teñidos con azul de Coomassie es muy similar (Figura 12).

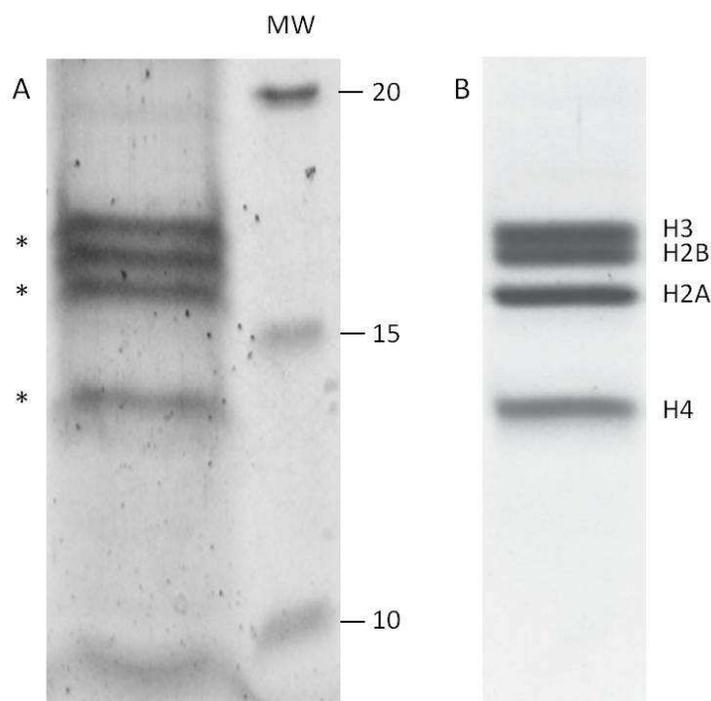


Figura 12. Comparación del perfil de bandas de muestras enriquecidas en histonas en geles SDS-PAGE al 15% teñidos con azul de Coomassie (se muestran solo extractos obtenidos por extracción ácida). A) Extracto de corteza visual (los asteriscos indican las bandas analizadas por espectrometría de masa). B) Western blot de extracto de células HeLa indicando la distribución de las histonas H2A, H2B, H3 y H4 (Shechter et al., 2007). MW: peso molecular en KDa.

A continuación, como forma de evidenciar la presencia de histonas en los extractos obtenidos, y de comparar los extractos obtenidos con los dos métodos, se hizo un análisis por espectrometría de masa de las principales bandas identificadas en los geles SDS-PAGE (indicadas con asteriscos en la Figura 12), potencialmente correspondientes a las principales isoformas según el resultado de la comparación previa. El análisis se realizó con el espectrómetro LTQ-Velos ESI-Hybrid triple quadrupole Ion-Trap (Thermo). En ambos tipos de extracto se identificaron múltiples variantes de las histonas confirmando así la calidad de la metodología de enriquecimiento en histonas utilizada. Sin embargo, en la muestra obtenida por extracción ácida se identificaron más variantes que en la muestra obtenida por extracción con sales (Tabla 2 y 3).

Tabla 2. Histonas presentes en muestra obtenida por extracción ácida.

ID	Score	Mass (Da)	Matches	Sequence	emPAI	Full name
H2A_PLAFA	244	14114	62	3	0.91	Histone H2A
H2AV_DROME	388	14972	87	6	2.41	Histone H2A.v
H2A1B_HUMAN	774	14127	132	12	3.55	Histone H2A type 1-B/E
H2A1C_HUMAN	98	14097	3	1	0.54	Histone H2A type 1-C
H2A2B_MOUSE	1009	14005	79	5	4.73	Histone H2A type 2-B
H2A4_RAT	581	14275	140	11	2.60	Histone H2A type 4
H2AE_PSAMI	638	13323	73	5	2.13	Histone H2A, embryonic
H2A_HIPHI	224	5544	55	2	1.73	Histone H2A (Fragment)
H2B1_ASHGO	67	14276	98	12	0.90	Histone H2B.1
H2BE1_PSAMI	127	13553	146	7	0.96	Histone H2B.1, embryonic
H2B12_XENLA	180	13897	4	1	0.25	Histone H2B 1.2
H2B1C_HUMAN	1583	13898	279	23	16.42	Histone H2B type 1-C/E/F/G/I
H2B1N_BOVIN	923	13915	282	21	12.98	Histone H2B type 1-N
H2BE_STRPU	129	13619	149	14	0.95	Histone H2B, embryonic
H3_CAEEL	71	15366	50	13	0.49	Histone H3
H32_USTMA	82	15333	49	13	0.49	Histone H3.2
H4_SOLST	538	11378	59	6	5.32	Histone H4
H4_ACRAS	106	11374	5	2	0.30	Histone H4
H48_CHICK	629	11432	71	8	9.69	Histone H4 type VIII

Tabla 3. Histonas presentes en muestra obtenida por extracción con sales.

ID	Score	Mass (Da)	Matches	Sequence	emPAI	Full name
H2AJ_MACFA	543	13981	33	3	1.39	Histone H2A.J
H2AV_RABIT	91	13472	5	3	0.97	Histone H2A.V
H2A3_LYTPI	266	12062	21	3	1.72	Histone H2A, sperm
H2A1_RAT	206	14069	6	2	0.91	Histone H2A type 1
H2A1_BOVIN	65	14083	3	1	0.24	Histone H2A type 1b
H2B1_CHICK	473	13914	21	7	8.01	Histone H2B 1/2/3/4/6
H2B1N_BOVIN	426	13915	33	9	16.42	Histone H2B type 1-N
CENPA_XENTR	59	17065	1	1	0.20	Histone H3-like
H4_MYTTR	729	11360	49	8	13.25	Histone H4

Tablas 2 y 3. Se muestran los detalles del análisis por espectrometría de masa para las proteínas identificadas con éxito. Se indica el score de Mascot (probabilidad de que la correspondencia entre los péptidos obtenidos y una proteína sea un evento casual), la masa molecular (Mass), el número de péptidos pareados (matches), el número de secuencias pareadas (Sequence), el emPAI (Exponentially Modified Protein Abundance Index, que ofrece, de forma aproximada, la cuantificación relativa de una proteína en una mezcla, y se define como la relación entre el número de péptidos

observados y el número de péptidos observables para una proteína), y el nombre completo de las proteínas identificadas (full name).

Finalmente, se realizaron experimentos de Western blot utilizando anticuerpos específicos que reconocen las formas principales de las histonas: H2A, H2B, H3 y H4. Luego de la electroforesis en geles SDS-PAGE al 15% con 20µg de extractos, las proteínas se transfirieron a membranas de nitrocelulosa que se incubaron con los anticuerpos primarios (ver Tabla 1). Luego de incubar con los anticuerpos secundarios específicos (ver Tabla 1), se reveló la señal luminosa como se describe en la sección Materiales y Métodos. Cada anticuerpo reconoció una banda principal (aprox. 14 kDa para H2A y H2B, 17 kDa para H3, 11 kDa para H4), confirmando así la presencia en los extractos de todas las principales formas de las histonas (Figura 13).

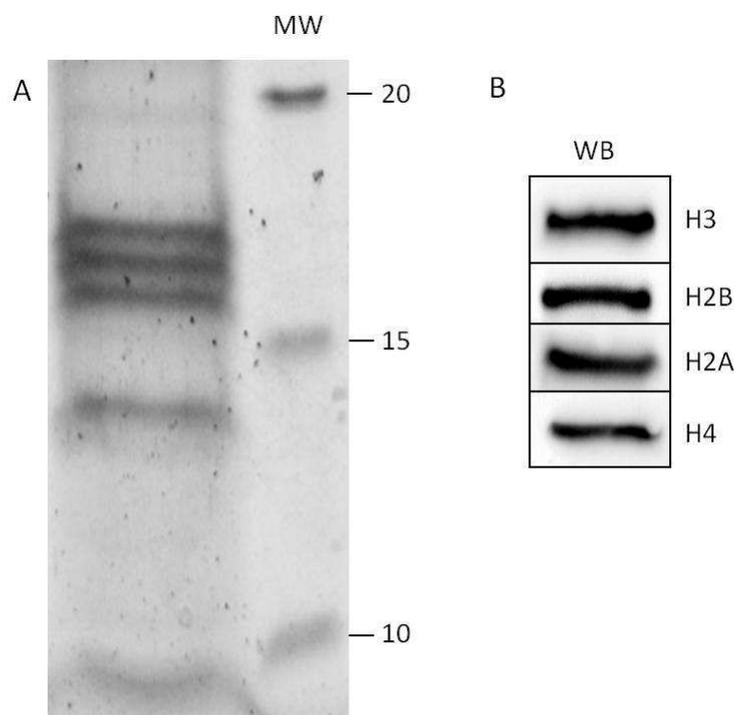


Figura 13. El patrón de bandas se corresponde con las formas mayoritarias de histonas, y es comparable con datos de la bibliografía. A) Gel SDS-PAGE al 15% teñido con azul de Coomassie. Se cargaron 20µg de muestra enriquecida en histonas de corteza visual de ratón adulto, obtenida mediante extracción ácida. B) Análisis por Western blot utilizando anticuerpos contra H2A, H2B, H3 y H4 (ver Materiales y Métodos para los detalles).

Para verificar que el proceso de extracción no afectara a las principales MPT de las histonas, se realizaron ensayos de Western blot utilizando anticuerpos que reconocen las histonas H3 y H4 con determinadas MPT. En detalle, se utilizó un anticuerpo que reconoce específicamente la histona H3 fosforilada en la serina10, otro que reconoce la H3 acetilada en lisina9, y otro la H4 acetilada en lisina8 (ver Tabla 1). Los anticuerpos anti-P(Ser10)H3 y anti-Ac(Lys9)H3 reconocieron una banda principal del peso molecular correspondiente a la histona H3 (17 kDa), mientras que el anticuerpo anti-Ac(Lys8)H4 reconoció

una banda principal del peso molecular correspondiente a la histona H4 (11 kDa), indicando que ambas MPT son preservadas en los extractos utilizados (Figura 14).

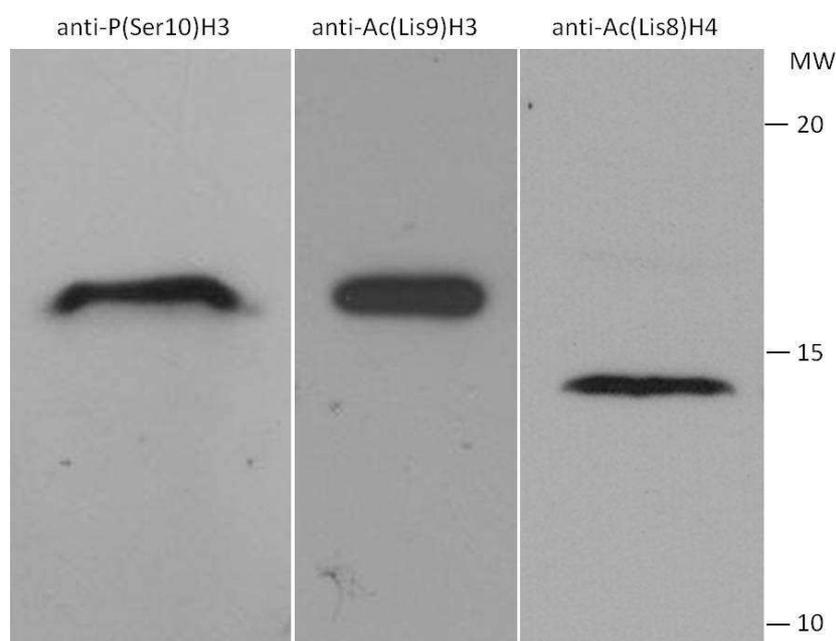


Figura 14. Las modificaciones postraduccionales de histonas son preservadas en los extractos de muestra de corteza visual. Western blot con anticuerpos anti-P(Ser10)H3, anti-Ac(Lys9)H3 y anti-Ac(Lys8)H4, reconocen bandas específicas. MW: peso molecular en kDa.

En conclusión, estos experimentos indican que la metodología utilizada para la preparación de las muestras permite obtener muestras enriquecidas en histonas, con presencia de múltiple variantes, comparable con lo descrito en la bibliografía y que conservan las principales MPT. Dado que la extracción ácida resultó menos laboriosa de la extracción con sales, y que los resultados del análisis por espectrometría de masa sugieren la presencia de más variantes en las muestras obtenidas por extracción ácida que con sales, se decidió continuar los experimentos utilizando esta metodología de extracción.

1.2. PUESTA A PUNTO DE LAS METODOLOGÍAS DE GELES BIDIMENSIONALES AUTxSDS Y AUTxAU.

El siguiente paso fue llevar adelante la puesta a punto de la metodología elegida para identificar histonas en muestras de corteza visual del ratón, la electroforesis bidimensional, de manera de obtener la mayor resolución posible. Para esto se utilizaron protocolos ya existentes en los cuales se utiliza la técnica de electroforesis bidimensional utilizando como primera dimensión geles que contienen ácido acético, urea y Tritón X-100 (AUT) y en la segunda geles compuestos por dodecil sulfato de sodio (SDS) o ácido acético y urea (AU). Como se describió, estos geles permiten la resolución de variantes de histonas y de histonas con MPT (Shechter et al. 2007; Green and Do, 2009).

GELES BIDIMENSIONALES AUTxSDS

Como ha sido descrito en los métodos, la electroforesis bidimensional en geles AUTxSDS y AUTxAU consiste en correr la muestra en la primera dimensión utilizando geles AUT, recortar un carril correspondiente a una muestra, y colocar este carril de modo horizontal sobre el gel utilizado para la segunda dimensión (SDS o AU). Luego, correr la segunda dimensión y proceder finalmente a la coloración. Para obtener geles bidimensionales en los cuales la distribución y resolución de los spots proteicos sean bien definidas, es imprescindible que las proteínas sean óptimamente separadas en los geles de primera dimensión. Para verificar este punto, se prepararon geles AUT y se cargaron los carriles con distinta cantidad proteica (30-70 μ g) de muestras de corteza visual de ratón adulto obtenidas por extracción ácida, se corrió la electroforesis y se tiñeron los geles con Coomassie coloidal. Como se puede observar en la Figura 15, la coloración permitió identificar un patrón de bandas bien definidas y separadas, de modo similar a resultados presentes en literatura (Shechter et al., 2007).

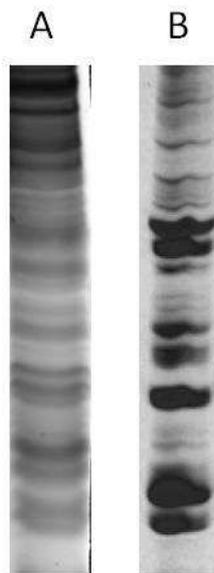


Figura 15. Electroforesis unidimensional sobre geles AUT de muestras proteicas. A) Patrón de bandas obtenido cargando 70 μ g de muestras de corteza visual de ratón adulto obtenidas por extracción ácida sobre geles AUT teñidos con Coomassie coloidal. B) Patrón de bandas obtenido cargando un extracto ácido de histonas de mamífero sobre geles AUT teñidos con nitrato de plata (Shechter et al., 2007).

Una vez obtenidos geles unidimensionales AUT en los cuales el patrón de bandas es bien definido, se procedió con la puesta a punto del protocolo de electroforesis bidimensional AUTxSDS. Se colocó una tira recortada del gel AUT sobre el gel SDS, se procedió a la electroforesis y se tiñó el gel SDS.

Para verificar la calidad de los experimentos AUTxSDS, se utilizaron tres tipos de coloración distintos de los geles: la tinción con Azul de Coomassie, con Coomassie coloidal y con nitrato de plata. Se corrieron tres experimentos cargando la misma cantidad proteica de muestra de corteza visual y se procedió a la tinción con los tres métodos distintos. Como se puede observar en la Figura 16, la tinción que permitió

visualizar el mayor número de spots con la mejor resolución fue la tinción con plata, por lo que seleccionamos este método para futuros experimentos.

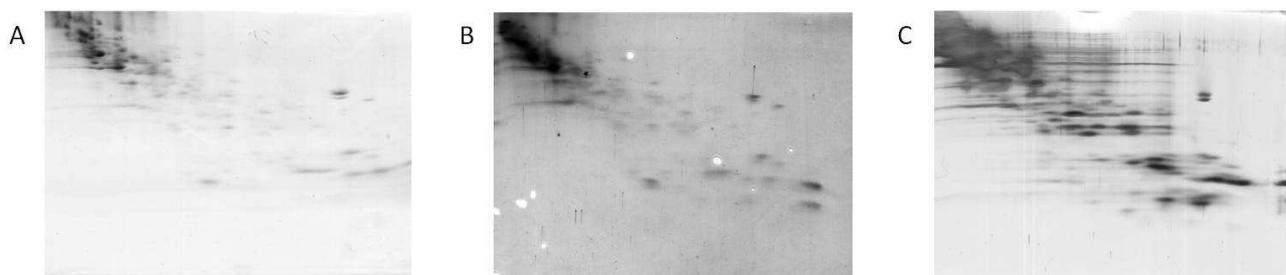


Figura 16. Comparación de geles SDS (segunda dimensión de la electroforesis bidimensional AUTxSDS) teñidos con distintos métodos de tinción. Geles SDS con 70 μ g de extracto ácido de histonas de corteza cerebral de ratón, teñidos con A) Azul de Coomassie, B) Coomassie coloidal, y C) nitrato de plata.

Como se indica en los protocolos originales, en los experimentos de electroforesis bidimensional sobre geles AUTxSDS es posible cargar un marcador de peso molecular en el gel de la segunda dimensión (SDS) para poder identificar con más detalle los spots proteicos. Para esto es necesario que el marcador no se mezcle con la muestra de interés y que quede bien definido en el gel. En un primer ensayo se depositaron 5 μ l del marcador sobre un pedacito de papel filtro, se dejó secar al aire, y se insertó a un extremo del gel SDS al lado de la tira de AUT con la muestra de interés. Finalmente, se selló con una preparación de agarosa de manera de inmovilizar el papel filtro y la tira del gel AUT sobre el gel SDS para asegurarse que el marcador y las proteínas de la muestra puedan entrar al gel por separado. Sin embargo, utilizando esta estrategia, una vez teñido el gel SDS, observamos que el marcador difundía en el gel, mezclándose con la muestra y no lográndose una buena definición del mismo (Figura 17 A). Luego de probar diferentes estrategias, finalmente optamos por depositar el marcador de peso molecular sobre el papel filtro luego de haberlo mezclado con una preparación de agarosa al 50%. En este modo, la agarosa sella el papel filtro no permitiendo la difusión del marcador, como se puede observar en la Figura 17 B.

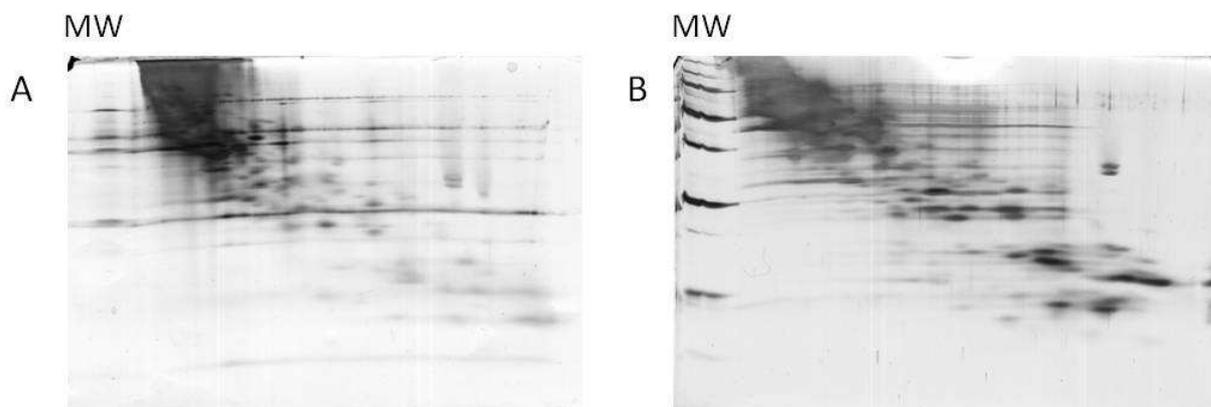


Figura 17. Comparación de dos estrategias de inserción del marcador de peso molecular sobre geles AUTxSDS. A) Gel AUTxSDS teñido con nitrato de plata, donde se depositó el marcador de peso molecular directamente sobre el papel filtro. En este caso el marcador de peso molecular difundió en el gel. B) Gel AUTxSDS teñido con nitrato de plata donde el marcador de peso molecular se disolvió en sellante de agarosa al 50%, antes de depositarlo sobre el papel filtro. La mejor resolución se obtuvo con el segundo método, en B), donde se pueden observar bien definidas las bandas del marcador en el borde lateral izquierdo del gel. MW: peso molecular.

Como resumen, se muestra el esquema final de ensamblaje del marcador de peso molecular y de la tira de gel AUT que se utilizó para realizar experimentos de electroforesis bidimensional AUTxSDS (Figura 18).

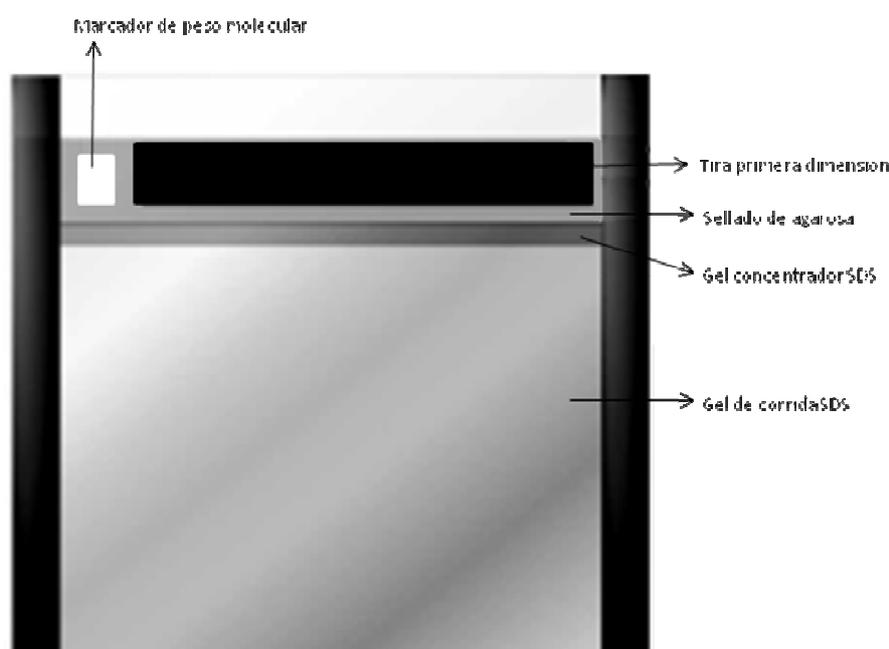


Figura 18. Esquema final de ensamblado de un gel AUTxSDS para la realización de la segunda dimensión.

Para continuar con la optimización de la resolución de los spots proteicos en los experimentos de electroforesis bidimensional AUTxSDS teñidos con nitrato de plata, se decidió probar distintas cantidades proteicas de muestra de corteza visual. En varios experimentos se cargaron diferentes cantidades de muestra (entre 30 y 70 μ g), se corrieron los experimentos en geles AUTxSDS y se procedió a la tinción con nitrato de plata. Como se puede observar en la Figura 19, en los geles con 45 μ g de muestra experimental se obtuvo la mejor definición de los spots proteicos, por lo que se continuó el trabajo utilizando esta cantidad de muestra.

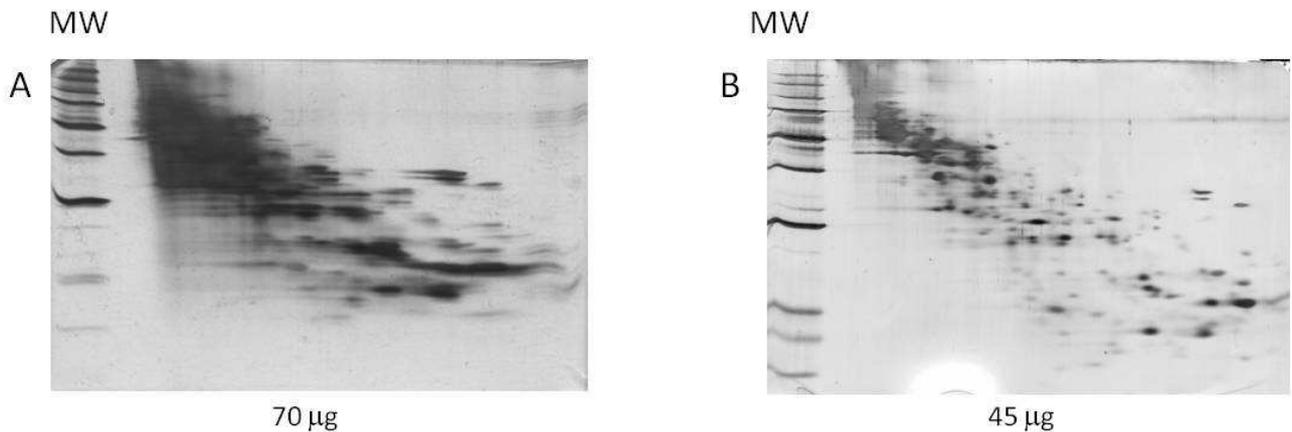


Figura 19. Comparación de la resolución de spots proteicos obtenidos en geles AUTxSDS teñidos con nitrato de plata con distintas cantidades de extracto proteico: A) 70µg y B) 45µg. MW: peso molecular.

GELES BIDIMENSIONALES AUTxAU

En el caso de la electroforesis bidimensional sobre geles AUTxAU, se corre la muestra en la primera dimensión sobre geles AUT, se recorta un carril correspondiente a una muestra, y se coloca este carril de modo horizontal sobre el gel AU. Habiendo ya comprobado la metodología para obtener geles AUT de buena calidad, se procedió a colocar una tira de un gel AUT cargado con 45 µg de muestra de corteza visual directamente sobre un gel AU, y el gel se tiñó con nitrato de plata. En este caso, no se pone un marcador de peso molecular visto que, contrariamente a lo que sucede con los geles SDS, los geles AU no separan las proteínas en función de su peso molecular. Como se muestra en la Figura 20, utilizando la electroforesis bidimensional AUTxAU se logró obtener una óptima separación de los spots proteicos comparable con la obtenida por Green and Do, 2009, sobre otros tipos de muestra, demostrando así la validez de esta metodología.

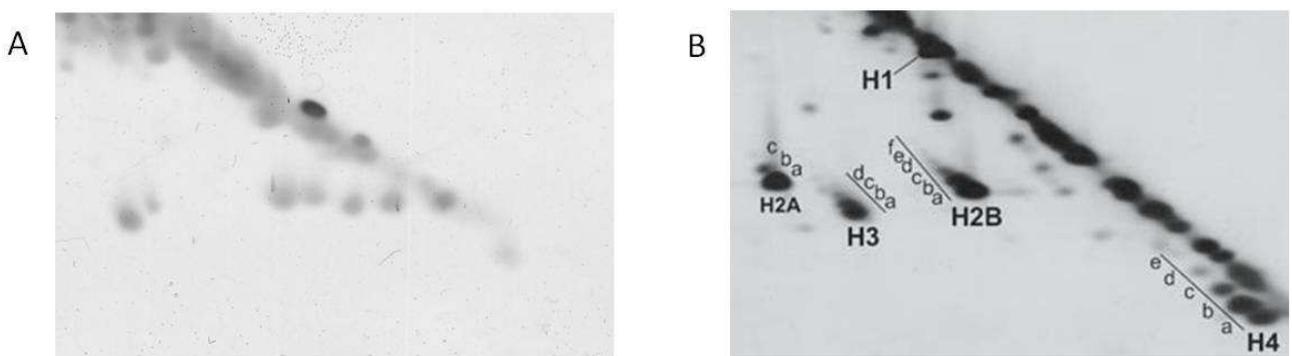


Figura 20. Comparación de la resolución de los spots proteicos obtenidos por electroforesis bidimensional en geles AUTxAU. A) Gel bidimensional AUTxAU teñido con nitrato de plata en el que se cargaron 45 µg de extracto ácido de histonas proveniente de corteza visual de ratón. B) Gel AUTxAU teñido con nitrato de plata donde se cargó un extracto de histonas proveniente de *Neurospora crassa* (Green and Do, 2009).

Como se describió previamente, los geles AU son particularmente indicados para separar histonas con distintas modificaciones postraduccionales (MPT). Para verificar este aspecto, decidimos utilizar la técnica de Western blot, utilizando un anticuerpo que reconoce específicamente la histona H3 y otro anticuerpo que reconoce exclusivamente la histona H3 con una acetilación en la lisina9 (Ac(Lys9)H3). Específicamente, cargamos un gel AU unidimensional con la misma cantidad (30 μ g) de una muestra de corteza visual en varios carriles y se procedió a la electroforesis, a la transferencia sobre membrana de nitrocelulosa, y a la inmunodetección. Como se muestra en la Figura 21, el anticuerpo anti H3 reconoció varias bandas potencialmente correspondientes a histonas H3 con distintas MPT, mientras que el anticuerpo anti Ac(Lys9)H3 reconoció sólo una fracción de éstas. Este experimento sugiere que las bandas identificadas por ambos anticuerpos corresponden a histona H3 acetilada en lisina9, mientras que las identificadas exclusivamente por el anticuerpo anti H3 corresponden a la H3 con MPT distintas. Estos resultados, similares a los que se muestran en la bibliografía (Shechter et al., 2007), sugieren que la metodología de geles AU efectivamente separa histonas con distintas MPT.

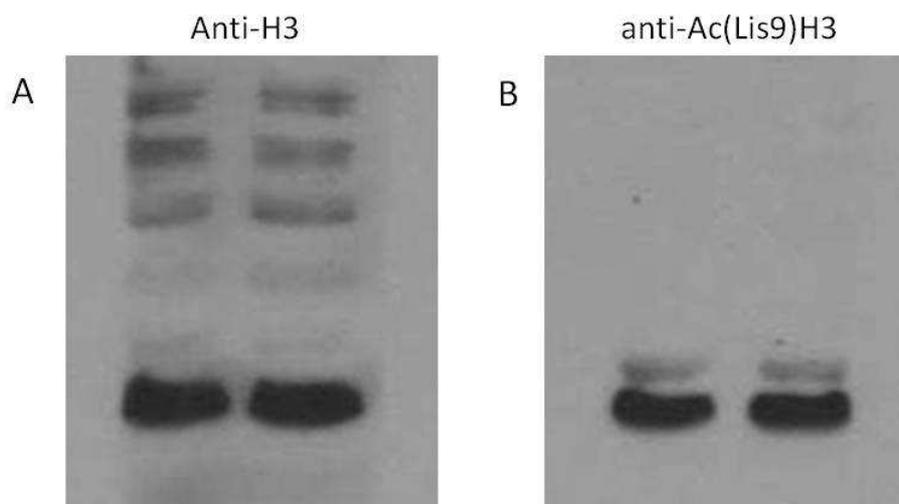


Figura 21. Western blot sobre gel AU de una dimensión. En todos los carriles se cargaron 30 μ g de la misma muestra de corteza visual. En A) se utilizó el anticuerpo primario anti-H3 y en B) el anticuerpo primario anti-Ac(Lys9)-H3.

1.3. SELECCIÓN DE SPOTS POTENCIALMENTE CORRESPONDIENTES A HISTONAS PARA SU ANÁLISIS POSTERIOR.

A continuación seleccionamos un número restringido de spots proteicos obtenidos en los geles bidimensionales potencialmente correspondientes a histonas y variantes de éstas, para luego identificarlos a través del análisis por espectrometría de masa.

SELECCIÓN DE SPOTS EN GELES AUTxSDS.

Para la selección de los spots en los geles AUTxSDS se utilizaron varios criterios que aportaron información complementaria. En primer lugar se utilizó el programa de análisis de la imagen Melanie 6.0 para identificar los spots que fueran bien definidos en todos los geles. Este análisis se llevó a cabo sobre las imágenes de todos los geles AUTxSDS obtenidos cargando 45µg de muestra de corteza visual de ratón obtenida por extracción ácida y teñidos con nitrato de plata. Luego de la detección automática de los spots, mediante inspección visual y análisis de los perfiles tridimensionales de los spots, se eliminaron de la selección todos aquellos spots que no estuvieran presentes en todos los geles o que pudieran ser resultado de artefactos en el gel (como partículas de polvo, manchas de la tinción).

El otro criterio que se utilizó en el caso de los geles AUTxSDS fue el valor del peso molecular estimado para cada spot, utilizando como referencia el marcador de peso molecular. De esta manera, se incluyeron en la selección sólo aquellos spots cuyos pesos moleculares estuvieran en el entorno de los valores descritos para las histonas, entre 10 y 37 kDa.

Para verificar que la selección de spots incluyera histonas, se realizaron experimentos de Western blot sobre los geles AUTxSDS transferidos a membranas de nitrocelulosa utilizando anticuerpos primarios que reconocen específicamente las cuatro isoformas principales de las histonas: anticuerpos contra las histonas H2A, H2B, H3 y H4. Para esto se realizaron cuatro experimentos de electroforesis bidimensional en geles AUTxSDS en los cuales se corrió la misma cantidad de la misma muestra de corteza visual. Luego de la transferencia a membranas, se procedió a la inmunodetección con los varios anticuerpos. Como se muestra en la Figura 22 A, B y C, los anticuerpos dieron lugar a distintos tipos de señales de inmunodetección (por razones técnicas no logramos obtener una señal clara con el anticuerpo anti H2A). Superponiendo las imágenes de las membranas utilizadas para la inmunodetección con los anticuerpos a la imagen de un gel cargado con la misma muestra teñido con nitrato de plata (y no transferido a membrana), fue posible determinar la posición de la señal obtenida por Western blot para cada anticuerpo en el gel entero y de este modo la correspondencia a determinados spots (Figura 22).

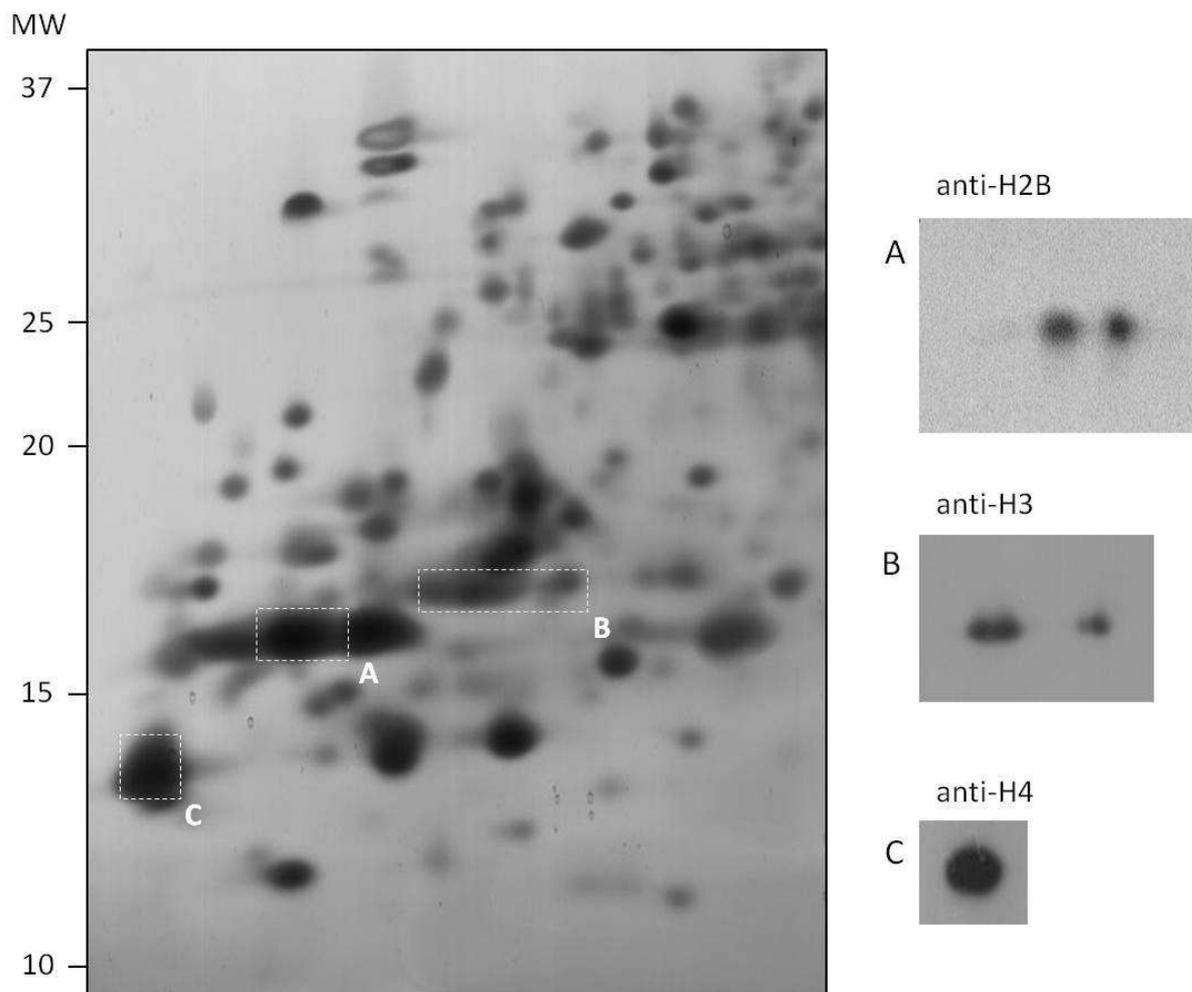


Figura 22. Gel bidimensional AUTxSDS en que se cargaron 45 μ g de extracto ácido de corteza visual de ratón adulto normal, teñido con nitrato de plata. A, B y C: análisis de Western blot para la principales isoformas de histonas. Las regiones correspondientes a las señales obtenidas por Western blot se indican mediante recuadros blancos en el gel.

Los resultados obtenidos por Western blot, son muy similares a lo descrito en otros trabajos en los cuales se identificaron además varias isoformas de las histonas (Figura 23). Por lo tanto, se seleccionaron los spots correspondiente a las señales obtenidas por inmunodetección y también spots que se encuentran alrededor de éstos que por su posición en el gel pudieran corresponderse con aquellos descritos previamente como histonas en la bibliografía.

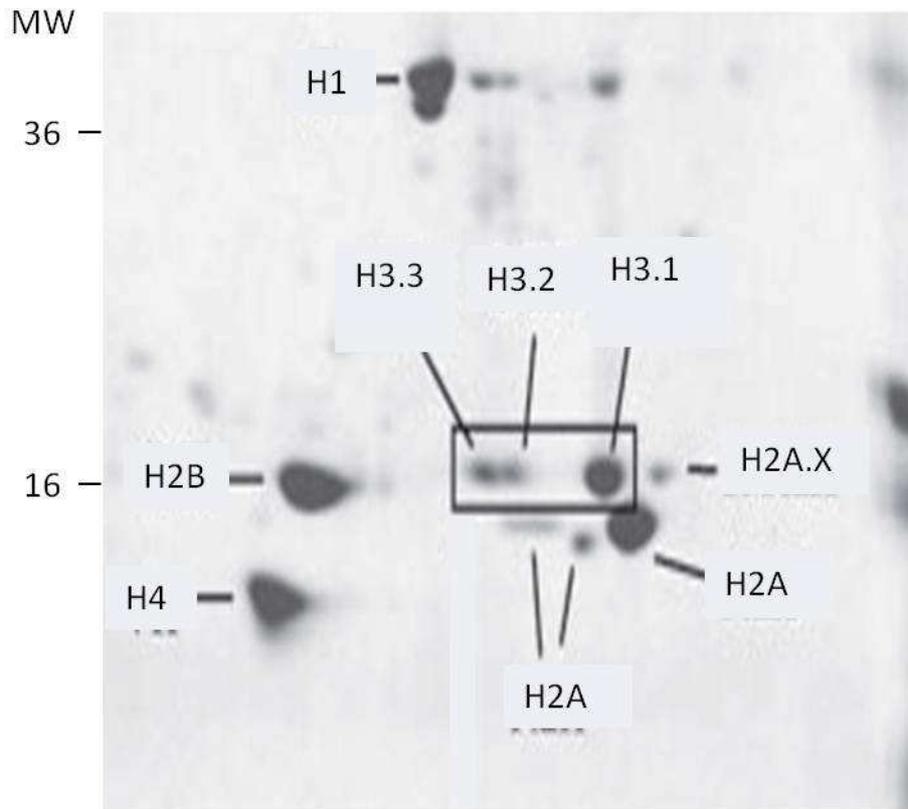


Figura 23. Gel bidimensional AUTxSDS donde se cargó un extracto de histonas de mamífero. La localización de las isoformas de las histonas son señaladas en el gel (Hake et al., 2006).

Finalmente, considerando los resultados del análisis primario con el software de análisis de la imagen, los ensayos de Western blot, los valores de pesos moleculares, y lo previamente documentado en la bibliografía, se seleccionó un total de 29 spots para su análisis por espectrometría de masa (Figura 24).

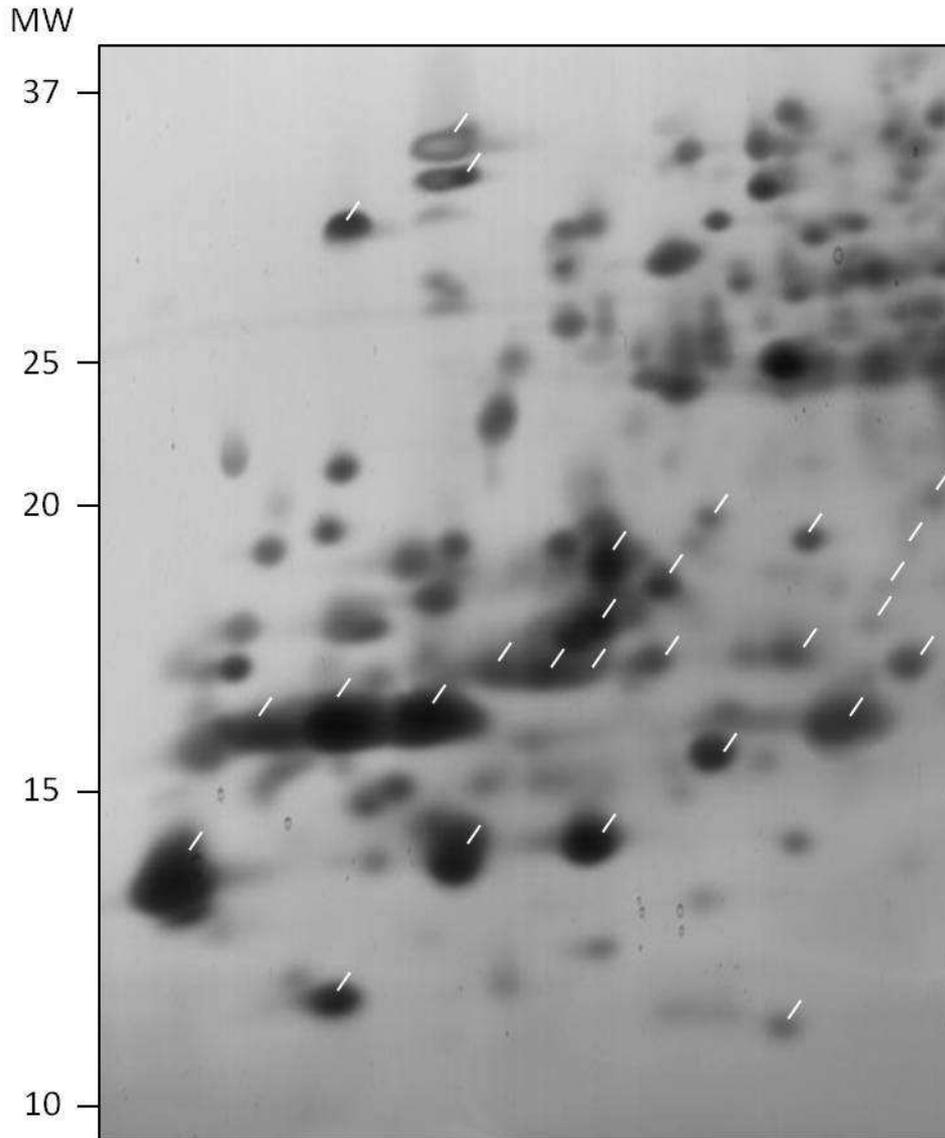


Figura 24. Gel bidimensional AUTxSDS en que se cargaron 45 μ g de extracto ácido de corteza visual de ratón, teñido con nitrato de plata. Las líneas blancas señalan los 29 spots seleccionados para su análisis por espectrometría de masa.

SELECCIÓN DE SPOTS EN GELES AUTxAU

En el caso de los geles bidimensionales AUTxAU, para la selección de spots proteicos se utilizó como único parámetro que éstos se presentaran bien definidos en los geles. Para ello, se realizó una detección automática de los spots utilizando el software Melanie 6.0. A continuación, mediante inspección visual y análisis de los perfiles tridimensionales de los spots, se eliminaron todos aquellos que no estuvieran presentes en todos los geles o que pudieran ser resultado de artefactos en el gel (partículas de polvo, manchas de la tinción). Además, se compararon los geles obtenidos (Figura 20) con lo previamente descrito en la bibliografía (Green and Do, 2009). De esta forma, en total se seleccionaron 23 spots para su análisis posterior por espectrometría de masa (Figura 25).

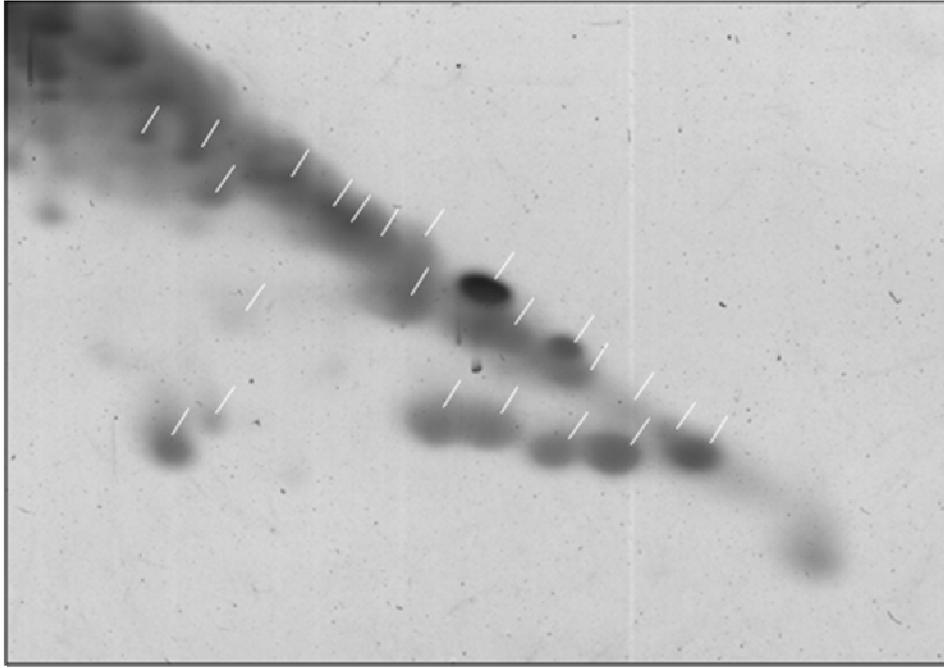


Figura 25. Gel bidimensional AUTxAU donde se cargaron 45 μ g de extracto ácido de histonas de corteza visual de ratón durante el periodo crítico (P28), teñido con nitrato de plata. Las líneas blancas indican los 23 spots seleccionados para su análisis por espectrometría de masa.

Mediante la técnica descrita, obtuvimos geles bidimensionales AUTxSDS y AUTxAU que nos permitieron la separación de algunas variantes de histonas en spots con buena resolución. Esto fue confirmado llevando adelante análisis de espectrometría de masa (ver segunda parte, sección 2.1).

SEGUNDA PARTE. IDENTIFICACIÓN DE LAS VARIANTES DE HISTONAS Y OTRAS PROTEÍNAS PRESENTES EN LA MUESTRA, Y ESTUDIO DE LA MODULACIÓN DE SU EXPRESION EN FUNCIÓN DEL NIVEL DE PLASTICIDAD.

Una vez puesta a punto la metodología que nos permite el estudio de las variantes de histonas y sus MPT, se procedió a la identificación y la comparación del patrón de expresión de estas proteínas entre las condiciones PC vs AD (alta vs baja plasticidad fisiológica) y AD vs FLX (baja vs alta plasticidad inducida por fármaco en animales adultos). Mediante este estudio, se buscó identificar algunas modificaciones epigenéticas que estén asociadas a la determinación del nivel de plasticidad.

2.1 IDENTIFICACIÓN DE LAS VARIANTES DE HISTONAS Y OTRAS PROTEÍNAS PRESENTES EN LA MUESTRA

Los spots seleccionados en los geles bidimensionales como potenciales candidatos a ser histonas, fueron extraídos manualmente y enviados para su análisis por espectrometría de masa utilizando el espectrómetro de masa MALDI-TOF/TOF (4800 MALDI TOF/TOF Analyzer AB Applied Biosystem MSD Sciex).

IDENTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS EN GELES AUTxSDS POR ESPECTROMETRÍA DE MASA.

De un total de 29 spots analizados, fue posible la identificación con éxito de 14 spots (48% del total). En la Figura 26 se muestra un gel bidimensional AUTxSDS en el cual se cargaron 45µg de extracto ácido de corteza visual de ratón adulto teñido con nitrato de plata, donde se indican los 29 spots seleccionados para el análisis por espectrometría de masa. De estos, los numerados de 1 a 14 corresponden a los identificados con éxito, y los otros a spots no identificados.

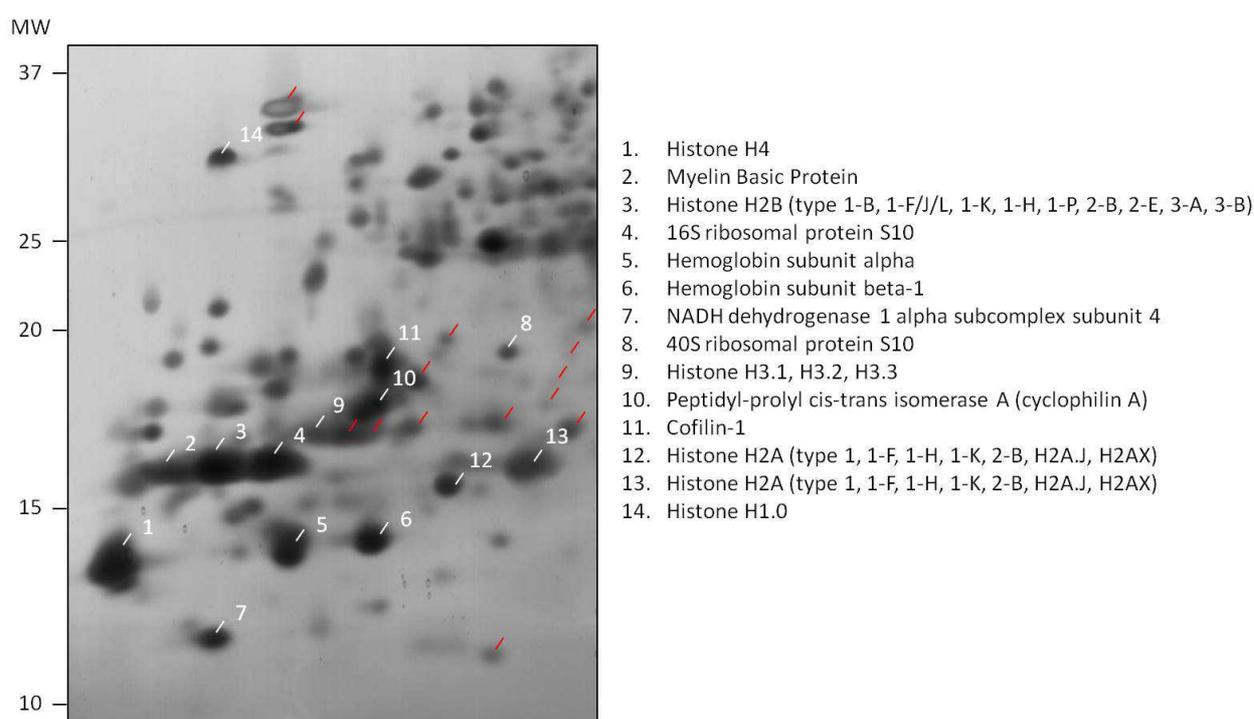


Figura 26. Gel bidimensional AUTxSDS en que se cargaron 45µg de extracto ácido de corteza visual de ratón adulto, teñido con nitrato de plata. Los 29 spots seleccionados fueron extraídos manualmente y analizados mediante espectrometría de masa. Los spots numerados de 1 a 14 (en blanco) corresponden a los identificados con éxito (ver lista a la derecha), y los otros a spots no identificados (líneas rojas).

En la Tabla 4, se muestra la lista de las 14 proteínas identificadas a partir de los espectros de masa utilizando el motor de búsqueda MASCOT. En el caso de los spots 3, 9, 12 y 13, entre paréntesis se señalan varias isoformas de las histonas identificadas (H2B, H3 y H2A). En estos casos, los péptidos obtenidos en el análisis por MALDI-TOF no permitieron adjudicar identidad a una única isoforma, por lo que la proteína contenida en cada uno de estos spots podría corresponder a cualquiera de las isoformas señaladas.

El análisis de los espectros de masa permitió identificar únicamente dos MPT (meK80 y 2meK80) en uno solo de los spots analizados (spot 9, correspondiente a la histona H3). Estas MPT no han sido asociadas a ningún proceso biológico conocido.

Tabla 4. Identificación de proteínas mediante espectrometría de masa MALDI-TOF-TOF en geles AUTxSDS

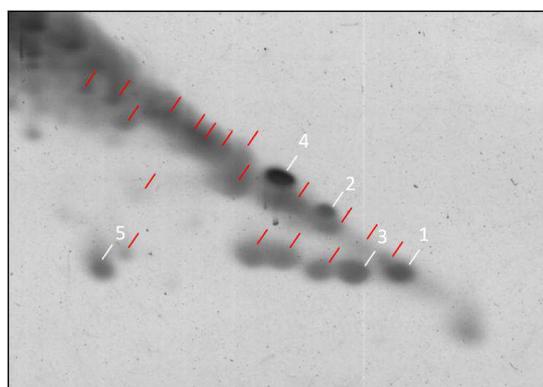
Spot	Full name	ID	Score	Mass (Da)	pI	Matched sequences	Matched peptides	% coverage	Sequences confirmed by MS/MS
1	Histone H4	H4_MOUSE	110	11360	11,18	3	3	21	K.VFLENVIR.D R.ISGLIYEETR.G R.GVLKVFLENVIR.D
2	Myelin basic protein	MBP_MOUSE	75	14202	10,72	2	2	16	K.YLATASTMDHAR.H R.TQDENPVVHFFK.N
3	Histone H2B (type 1-C/E/F/G/I, 1-D, 1-F/J/L, 1-H, 1-K, 1-P, 2-B, 2-E, 2-F, 3-A, 3-B)	H2B_MOUSE	75	13994	10.31	1	1	11	K.AMGIMNSFVNDI.FER.I
4	40S ribosomal protein S16	RS16_MOUSE	59	16445	10.21	1	1	7	K.GPLQSVQVFGFR.K
5	Hemoglobin subunit alpha	HBA_MOUSE	145	15085	7.96	2	2	21	K.IGGHGAEYGAEALER.M K.TYFPHFVSHGSAQVK.G
6	Hemoglobin subunit beta-1	HBB1_MOUSE	37	15840	7.12	1	1	6	R.LLVVYPWTQR.Y
7	NADH dehydrogenase 1 alpha subcomplex subunit 4	NDUA4_MOUSE	53	9327	9.52	2	2	45	R.LALFNPVSWDR.K K.KHPSLIPLFVFIGAGGTGAALVVMR.L
8	40S ribosomal protein S10	RS10_MOUSE	44	18916	10.15	1	1	8	K.AEAGAGSATEFQFR.G
9	Histone H3 (H3.1-H3.2-H3.3)	H3_MOUSE	131	12054	10.60	4	3	20	K.STELLIR.K R.YRPGTVALR.E R.EIAQDFKTDLR.F + Methyl (K) R.EIAQDFKTDLR.F + Dimethyl (K)
10	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase	PPIA_MOUSE A	182	17971	7.74	3	2	19	M.VNPTVFFDITAD DEPLGR.V + Acetyl (Protein N-term)

(cyclophilin A)									
									R.IIPGFMCQGGDF TR.H R.IIPGFMCQGGDF TR.H
11	Cofilin-1	COF1_	124	18560	8.22	2	2	10	K.KEDLVFIFWAPE NAPLK.S K.EDLVFIFWAPEN APLK.S
		MOUSE							
12	Histone H2A (type 1, 1-A, 1-D, 1-H, 1-K, 1-F; H2A.Z, H2A.V)	H2A_H2A_M	42	14135	10.60	1	1	6	R.AGLQFPVGR.V
13	Histone H2A (type 1, 1-A, 1-D, 1-H, 1-K, 1-F; H2A.Z, H2A.V)	H2A_H2A_M	40	14135	10.60	1	1	6	R.AGLQFPVGR.V
14	Histone H1.0	H10_M	49	20861	10.90	1	1	6	K.YSDMIVAAIQAE K.N
		OUSE							

Tabla 4. Lista de los 14 spots identificados en los geles AUTxSDS. Se indica nombre completo de las proteínas identificadas (full name), código de acceso de la base de datos SwissProt (ID), Score de Mascot (probabilidad de que la correspondencia entre los péptidos obtenidos y una proteína sea un evento casual), masa molecular teórica (Mass), punto isoeléctrico (pI), número de secuencias pareadas (matched sequences), número de péptidos pareados (matched peptides), porcentaje de cobertura de secuencia (% coverage), y secuencias de péptidos confirmadas por MS/MS (sequences confirmed by MS/MS)

IDENTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS EN GELES AUTxAU POR ESPECTROMETRÍA DE MASA.

De los 23 spots analizados, solamente 5 fueron identificados por MALDI-TOF, que corresponde al 22% del total. En la Figura 27 se muestra un gel bidimensional AUTxAU en el cual se cargaron 45µg de extracto ácido de corteza visual de ratón durante el PC teñido con nitrato de plata, donde se indican los 23 spots seleccionados para el análisis por espectrometría de masa. De estos los numerados de 1 a 5 corresponden a los identificados con éxito, y los otros a spots no identificados.



1. Myelin Basic Protein
2. Histone H1.0
3. Histone H2B (type 1-C/E/F/G/I, 1-D, 1-F/J/L, 1-H, 1-K, 1-P, 2-B, 2-E, 2-F, 3-A, 3-B)
4. Hemoglobin subunit alpha
5. Histone H2A (type 1, 1-B/E, 1-C, 1-D, 1-F, 1-H, 1-K 2-A, 3, H2A.J)

Figura 27. Gel bidimensional AUTxAU donde se cargaron 45µg de extracto ácido de histonas de corteza visual de ratón durante el periodo crítico (P28), teñido con nitrato de plata. Los 23 spots seleccionados fueron extraídos manualmente

y analizados mediante espectrometría de masa. Los spots numerados de 1 a 5 (en blanco) corresponden a los identificados con éxito (ver lista a la derecha), y los otros a spots no identificados (líneas rojas).

En la Tabla 5, se muestra la lista de las 5 proteínas identificadas a partir de los espectros de masa utilizando el motor de búsqueda MASCOT. En el caso de los spots 3 y 5, entre paréntesis se señalan varias isoformas de las histonas identificadas (H2B y H2A). En estos casos, los péptidos obtenidos en el análisis por MALDI-TOF-TOF no permitieron adjudicar identidad a una única isoforma, por lo que la proteína contenida en cada uno de estos spots podría corresponder a cualquiera de las isoformas señaladas.

Tabla 5. Identificación de proteínas mediante espectrometría de masa MALDI-TOF-TOF en geles AUTxAU

Spot	Full name	ID	Score	Mass (Da)	pI	Matched sequences	Matched peptides	% coverage	Sequences confirmed by MS/MS
1	Myelin basic protein	MBP_ MOUS E	72	14202	10.72	1	1	7	R.TQDENPVVHFF K.N
2	Histone H1.0	H10_M OUSE	61	20861	10.90	1	1	6	K.YSDMIVAAIQA EK.N
3	Histone H2B (type 1- C/E/F/G/I, 1-D, 1- F/J/L, 1-H, 1-K, 1-P, 2- B, 2-E, 2-F, 3-A, 3-B)	H2B_M OUSE	46	13994	10.31	2	1	11	K.AMGIMNSFVN DIFER.I K.AMGIMNSFVN DIFER.I + Oxidation (M)
4	Hemoglobi n subunit alpha	HBA_ MOUS E	115	15085	7.96	2	2	21	K.IGGHGAEYGAE ALER.M K.TYFPHFDVSHG SAQVK.G
5	Histone H2A (type 1, 1-A, 1-D, 1-H, 1-K, 1- F; H2A.Z, H2A.V)	H2A_ MOUS E	77	14737	10.60	1	1	13	R.VTIAQGGVLPNI QAVLLPK.K

Tabla 5. Lista de los 5 spots identificados en los geles AUTxAU. Se indica nombre completo de las proteínas identificadas (full name), código de acceso de la base de datos SwissProt (ID), Score de Mascot (probabilidad de que la correspondencia entre los péptidos obtenidos y una proteína sea un evento casual), masa molecular teórica (Mass), punto isoeléctrico (pI), número de secuencias pareadas (matched sequences), número de péptidos pareados (matched

peptides), porcentaje de cobertura de secuencia (% coverage), y secuencias de péptidos confirmadas por MS/MS (sequences confirmed by MS/MS)

2.2 ESTUDIO DE LA MODULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE VARIANTES DE HISTONAS Y OTRAS PROTEÍNAS IDENTIFICADAS EN FUNCIÓN DEL NIVEL DE PLASTICIDAD.

Una vez identificadas las histonas y otras proteínas presentes en la muestra, se procedió a la comparación de los niveles de expresión de estas proteínas en función del nivel de plasticidad. Para ello, se realizaron experimentos de electroforesis bidimensional utilizando muestras de corteza visual de ratones con distintos niveles de plasticidad. Una vez obtenidos los geles, se compararon utilizando el software de análisis de la imagen Melanie 6.0 (GeneBio) para identificar spots con niveles de intensidad óptica diferentes entre las condiciones. El análisis de la imagen se llevó a cabo exclusivamente sobre los spots de los geles que habían sido identificados como proteínas en el estudio por espectrometría de masa. Se utilizó la variable porcentaje de volumen (%Vol), que tiene en consideración variaciones en los geles debidas a diferencias en la carga proteica y a la tinción (ver Materiales y Métodos). Para el análisis estadístico, se realizó el test no paramétrico U de Mann Whitney sobre los datos normalizados para vislumbrar si existían diferencias entre las medias de las poblaciones en estudio.

COMPARACIÓN ENTRE ANIMALES EN PERIODO CRÍTICO DE PLASTICIDAD Y ADULTOS

En primer lugar, realizamos la comparación de variantes de histonas y otras proteínas en la corteza visual de ratones en periodo crítico (P28, PC) (altos niveles de plasticidad fisiológica) versus ratones adultos (~P100, AD) (baja plasticidad fisiológica).

Para los experimentos de electroforesis bidimensional AUTxSDS se utilizaron muestras de corteza visual provenientes de un total de 10 animales, 5 animales en periodo crítico y 5 animales adultos normales. Se realizaron 5 experimentos, en cada uno se compararon dos geles: uno donde se cargó el extracto de histonas de corteza visual del animal PC y otro donde se utilizó el extracto proveniente del animal AD. Estos geles se realizaron de forma paralela, de manera de reducir la variabilidad inter-experimental. De este modo, se obtuvieron 10 geles bidimensionales AUTxSDS, 5 de PC y 5 de AD, en los que se cargaron 45µg de proteína total y fueron coloreados con tinción de nitrato de plata. En la Figura 28 se muestran dos geles bidimensionales AUTxSDS representativos de corteza visual de ratones PC y AD.

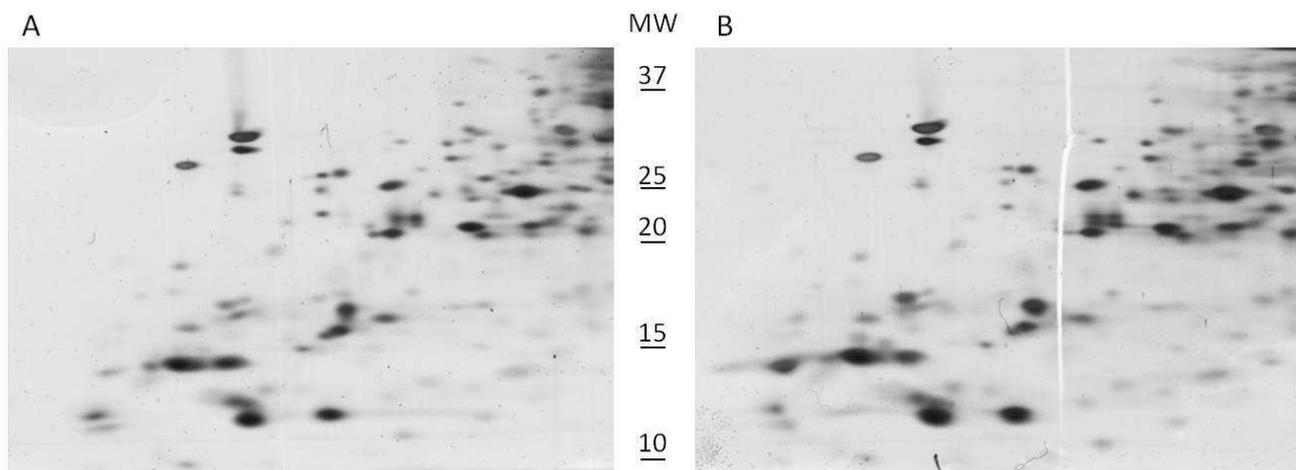


Figura 28. Geles bidimensionales AUTxSDS teñidos con nitrato de plata, en los que se cargaron 45 μ g de proteína total. A) muestra de corteza visual de ratón en periodo crítico (PC). B) muestra de corteza visual de ratón adulto (AD). MW: peso molecular en KDa.

Para los experimentos de electroforesis bidimensional AUTxAU se utilizaron muestras de corteza visual provenientes de un total de 6 animales, 3 animales en periodo crítico y 3 animales adultos normales. Se realizaron 3 experimentos, en cada uno se compararon dos geles, tal como se describió anteriormente para los geles AUTxSDS. De este modo, se obtuvieron 6 geles bidimensionales AUTxAU, 3 de PC y 3 de AD, en los que se cargaron 45 μ g de proteína total y fueron coloreados con tinción de nitrato de plata. En la Figura 29 se muestran dos geles bidimensionales AUTxAU representativos de corteza visual de ratones PC y AD.

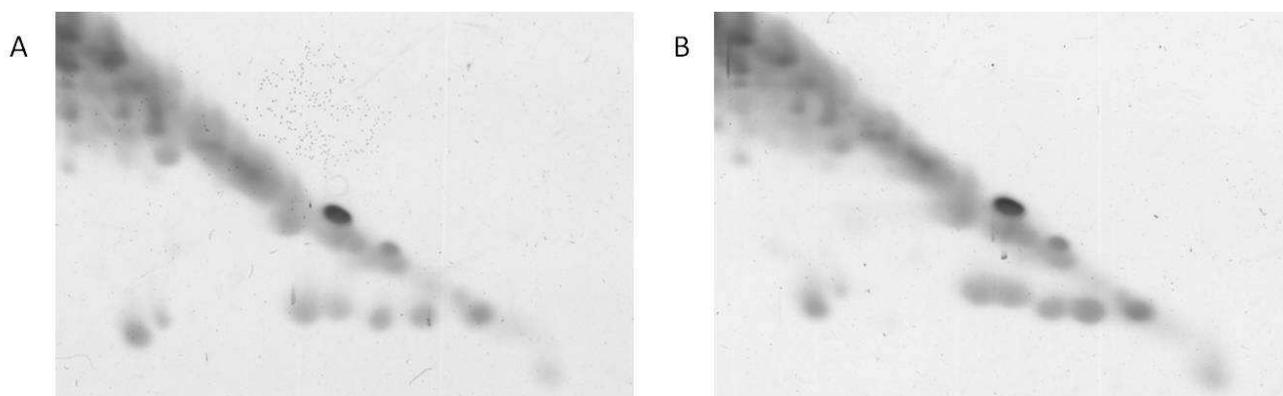


Figura 29. Geles bidimensionales AUTxAU teñidos con nitrato de plata, en los que se cargaron 45 μ g de proteína total. A) Muestra de corteza visual de ratón en periodo crítico (PC). B) muestra de corteza visual de ratón adulto (AD).

La comparación del patrón de distribución de los spots obtenidos en los geles AUTxSDS y en los AUTxAU, es muy similar entre las dos condiciones experimentales analizadas (PC y AD), sugiriendo que las metodologías se implementaron correctamente y que la variabilidad debida a éstas es reducida.

Al realizar el análisis de imagen de geles AUTxSDS, encontramos que de las 14 proteínas identificadas, 11 presentaron variaciones significativas entre las dos condiciones.

En detalle, 6 proteínas presentaron mayor expresión en la condición de alta plasticidad fisiológica (PC). Estas son las histonas H2B y H3, y las proteínas RS16, RS10, PPIA y COF1.

Por otra parte, 5 proteínas fueron más expresadas en la condición de baja plasticidad fisiológica (AD). Entre ellas, 2 corresponden a variantes de la histona H2A. Las restantes son MBP, HBA y NDU4A. (Tabla 6).

En los geles AUTxAU, de las 5 proteínas identificadas, 3 presentaron variaciones significativas: 1 aumenta en el periodo crítico (HBA) y 2 aumentan en el adulto (MBP y la histona H2A) (Tabla 7).

Tabla 6. Comparación del patrón de expresión de las 14 proteínas identificadas en geles AUTxSDS entre las condiciones PC vs AD.

Spot N°	Código de acceso	Nombre completo	PC/AD ± SEM
1	H4_MOUSE	Histone H4	1,21 ± 0,23
2	MBP_MOUSE	Myelin basic protein	0,42 ± 0,18*
3	H2B_MOUSE	Histone H2B (type 1-C/E/F/G/I, 1-D, 1-F/J/L, 1-K, 1-H, 1-P, 2-B, 2-E, 2-F, 3-A, 3-B)	1,23 ± 0,08*
4	RS16_MOUSE	40S ribosomal protein S16	2,39 ± 0,44*
5	HBA_MOUSE	Hemoglobin subunit alpha	0,79 ± 0,04*
6	HBB1_MOUSE	Hemoglobin subunit beta-1	0,86 ± 0,06
7	NDUA4_MOUSE	NADH dehydrogenase 1 alpha subcomplex subunit 4	0,70 ± 0,09*
8	RS10_MOUSE	40S ribosomal protein S10	2,12 ± 0,35*
9	H3_MOUSE	Histone H3 (H3.1-H3.2-H3.3)	2,72 ± 0,30*
10	PPIA_MOUSE	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A (cyclophilin A)	1,34 ± 0,09*
11	COF1_MOUSE	Cofilin-1	1,36 ± 0,15*
12	H2A_MOUSE	Histone H2A (type 1, 1-A, 1-D, 1-H, 1-K, 1-F; H2A.Z, H2A.V)	0,69 ± 0,05*
13	H2A_MOUSE	Histone H2A (type 1, 1-A, 1-D, 1-H, 1-K, 1-F; H2A.Z, H2A.V)	0,54 ± 0,08*
14	H10_MOUSE	Histone H1.0	0,85 ± 0,18

Tabla 6. Lista de los 14 spots identificados en los geles AUTxSDS. Se indica nombre completo, código de acceso de la base de datos SwissProt, y el promedio del valor de porcentaje de volumen normalizado entre periodo crítico y adulto (PC/AD) con sus correspondientes desvíos estándar. En rojo se resaltan aquellas proteínas más expresadas en la condición de alta plasticidad (PC) y en azul las más expresadas cuando la plasticidad es baja (AD)

Tabla 7. Comparación del patrón de expresión de las 5 proteínas identificadas en geles AUTxAU entre las condiciones PC vs AD.

Spot N°	Código de acceso	Nombre completo	PC/AD ± SEM
1	MBP_MOUSE	Myelin basic protein	0,54 ± 0,06*
2	Histone H1.0	H10_MOUSE	1,28 ± 0,25
3	H2B_MOUSE	Histone H2B (type 1-C/E/F/G/I, 1-D, 1-F/J/L, 1-H, 1-K, 1-P, 2-B, 2-E, 2-F, 3-A, 3-B)	1,22 ± 0,18
4	HBA_MOUSE	Hemoglobin subunit alpha	1,27 ± 0,10*
5	H2A_MOUSE	Histone H2A (type 1, 1-B/E, 1-C, 1-D, 1-F, 1-H, 1-K 2-A, 3, H2A.J)	0,61 ± 0,15*

Tabla 7. Lista de los 5 spots identificados en los geles AUTxAU. Se indica nombre completo, código de acceso de la base de datos SwissProt, y el promedio del valor de porcentaje de volumen normalizado entre periodo crítico y adulto (PC/AD), con sus correspondientes desvíos estándar. En rojo se resaltan aquellas proteínas más expresadas en la condición de alta plasticidad (PC) y en azul las más expresadas cuando la plasticidad es baja (AD)

COMPARACIÓN ENTRE ANIMALES ADULTOS NORMALES (BAJA PLASTICIDAD FISIOLÓGICA) Y TRATADOS CON FLUOXETINA (ALTA PLASTICIDAD INDUCIDA POR FÁRMACO)

Para esta comparación se realizaron 7 experimentos de electroforesis bidimensional AUTxSDS, en los que se utilizaron un total de 14 animales, 7 adultos normales (AD) y 7 adultos tratados con fluoxetina (FLX). Para todos los experimentos, se utilizaron animales provenientes de la misma camada (hermanos de la misma edad). Se obtuvieron 14 geles bidimensionales AUTxSDS, 7 de AD y 7 de FLX, en los que se cargaron 45µg de proteína total y fueron coloreados con tinción de nitrato de plata. En la Figura 30 se muestran dos geles bidimensionales AUTxSDS representativos de corteza visual de ratones AD y FLX, en la que se puede observar que el patrón de expresión de spots es bien resuelto.

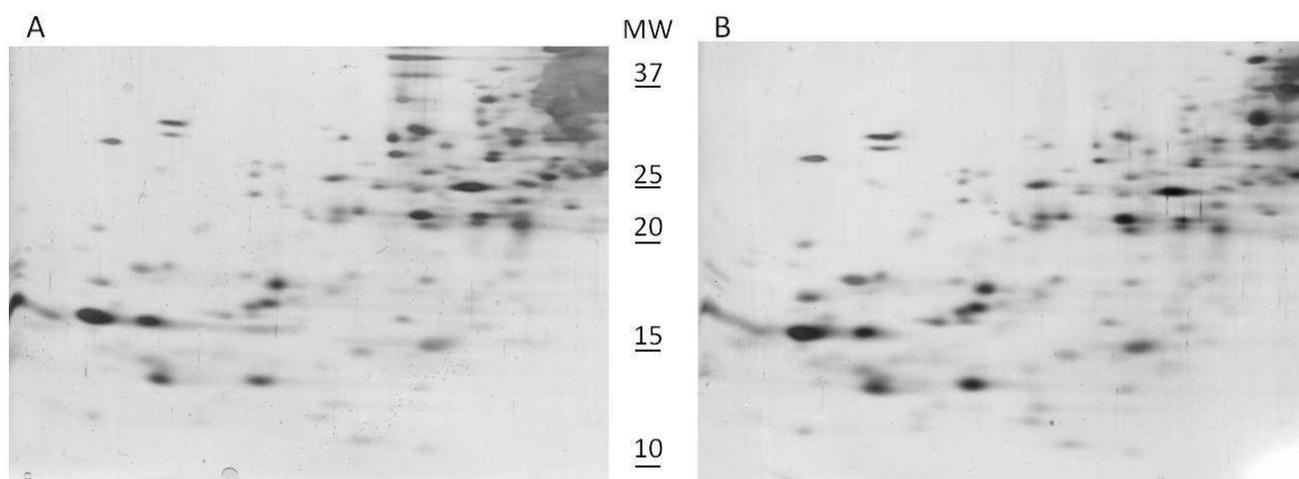


Figura 30. Geles bidimensionales AUTxSDS teñidos con nitrato de plata, en los que se cargaron 45µg de proteína total. A) muestra de corteza visual de ratón adulto sin tratamiento (AD). B) muestra de corteza visual de ratón adulto tratado con fluoxetina (FLX).

Para la comparación adulto normal vs adulto tratado con fluoxetina no se realizaron experimentos de electroforesis bidimensional con geles AUTxAU.

Al realizar el análisis de imagen de los geles AUTxSDS, encontramos que de las 14 proteínas identificadas, 5 presentaron variaciones significativas en su expresión. De ellas, 4 presentan mayor expresión en los adultos tratados con fluoxetina. Entre ellas encontramos a las dos variantes de la histona H2A, a la histona H1 y a la proteína COF1. La histona H2B presentó mayor expresión en la condición de baja plasticidad (adulto no tratado) (Tabla 8).

Tabla 8. Comparación del patrón de expresión de las 14 proteínas identificadas en geles AUTxSDS entre las condiciones FLX vs AD.

Spot N°	Código de acceso	Nombre completo	FLX/AD ± SEM
1	H4_MOUSE	Histone H4	0,79 ± 0,06
2	MBP_MOUSE	Myelin basic protein	0,95 ± 0,26
3	H2B_MOUSE	Histone H2B (type 1-C/E/F/G/I, 1-D, 1-F/J/L, 1-K, 1-H, 1-P, 2-B, 2-E, 2-F, 3-A, 3-B)	0,76 ± 0,10*
4	RS16_MOUSE	40S ribosomal protein S16	0,81 ± 0,12
5	HBA_MOUSE	Hemoglobin subunit alpha	0,99 ± 0,07
6	HBB1_MOUSE	Hemoglobin subunit beta-1	1,23 ± 0,14
7	NDUA4_MOUSE	NADH dehydrogenase 1 alpha subcomplex subunit 4	1,41 ± 0,20
8	RS10_MOUSE	40S ribosomal protein S10	1,51 ± 0,24
9	H3_MOUSE	Histone H3 (H3.1-H3.2-H3.3)	1,15 ± 0,21
10	PPIA_MOUSE	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A (cyclophilin A)	1,06 ± 0,09
11	COF1_MOUSE	Cofilin-1	1,19 ± 0,09*
12	H2A_MOUSE	Histone H2A (type 1, 1-A, 1-D, 1-H, 1-K, 1-F; H2A.Z, H2A.V)	1,52 ± 0,28*
13	H2A_MOUSE	Histone H2A (type 1, 1-A, 1-D, 1-H, 1-K, 1-F; H2A.Z, H2A.V)	1,46 ± 0,20*
14	H10_MOUSE	Histone H1.0	1,40 ± 0,52*

Tabla 6. Lista de los 14 spots identificados en los geles AUTxSDS. Se indica nombre completo, código de acceso de la base de datos SwissProt, y el promedio del valor de porcentaje de volumen normalizado entre adulto tratado con fluoxetina y adulto normal (FLX/ AD), con sus correspondientes desvíos estándar. En rojo se resaltan aquellas proteínas más expresadas en la condición de alta plasticidad (FLX) y en azul las más expresadas cuando la plasticidad es baja (AD)

DISCUSIÓN

Las modificaciones epigenéticas constituyen uno de los más importantes mecanismos de regulación génica a través del cual la experiencia sensorial es capaz de reorganizar y modificar las conexiones neuronales en el cerebro plástico. En los últimos años, se ha hecho mucho énfasis en el estudio de ciertas modificaciones epigenéticas vinculadas a procesos de plasticidad, como la metilación del ADN, los microARNs e incluso las MPT de histonas. Sin embargo, el reemplazo de las isoformas canónicas de las histonas por sus variantes no canónicas, es una rama muy importante de la epigenética que ha recibido atención muy limitada en el cerebro (Piña and Suau, 1987; Bargaje et al., 2012; Michod et al., 2012; Santoro and Dulac, 2012;) y que nunca, a nuestro entender, ha sido estudiada en relación a procesos de plasticidad en la corteza visual.

En esta tesis, se hizo especial énfasis en el estudio de las histonas, sobre todo en la identificación de las variantes que se expresan en la corteza visual, y su modulación en función del nivel de plasticidad mediante las comparaciones PC vs AD (alta vs baja plasticidad fisiológica) y AD vs FLX (baja vs alta plasticidad restaurada por tratamiento farmacológico con fluoxetina en animales adultos).

PRIMERA PARTE. PUESTA A PUNTO DE UNA ESTRATEGIA METODOLÓGICA ESPECÍFICA PARA EL ESTUDIO DE HISTONAS.

Para el estudio de las variantes de histonas y su modulación, a lo largo de este trabajo se utilizaron protocolos que permitieron su extracción, purificación y análisis. Estos protocolos constituyen aproximaciones estandarizadas para el estudio de las histonas: dado que estas proteínas se encuentran entre las más conservadas de eucariotas, su comportamiento bioquímico es muy similar a través de las especies y organismos tradicionalmente usados como modelo de experimentación.

TÉCNICAS DE EXTRACCIÓN.

Para la realización de este trabajo, en primer lugar surgió la necesidad de obtener muestras de corteza visual enriquecidas en histonas. Las técnicas de enriquecimiento de histonas aquí utilizadas fueron la extracción ácida y la extracción con sales. Estas técnicas presentan algunas diferencias. La extracción ácida se basa en la solubilidad de las histonas en ácidos, que pueden ser HCl o H₂SO₄. La extracción con sales constituye una alternativa interesante a la extracción ácida por varias razones. En primer lugar, se mantiene el pH neutro, lo cual preserva aquellas MPT de las histonas que pueden ser lábiles en presencia de ácidos (Chen et al., 1974). Por lo tanto, si lo que se busca es describir nuevas MPT, posiblemente ésta sea la mejor alternativa a utilizar.

A través de estos protocolos pudimos obtener muestras enriquecidas en histonas, con presencia de múltiple variantes y que conservan las principales MPT. Dado que la extracción ácida resultó menos laboriosa y que obtuvimos más variantes de histonas que en la extracción con sales, seleccionamos esta técnica para los experimentos de purificación y análisis realizados. Sin, embargo, es importante destacar que la puesta a punto de la metodología de extracción con sales nos permitirá en el futuro, el estudio con más detalle de eventuales MPT novedosas.

TÉCNICAS DE SEPARACIÓN E IDENTIFICACIÓN DE VARIANTES DE HISTONAS.

Una vez obtenido un extracto enriquecido en histonas, existen varias metodologías que permiten el estudio de las variantes y sus MPT. Una de las alternativas, es la identificación y cuantificación con anticuerpos sobre geles SDS-PAGE convencionales. Sin embargo, esta aproximación permite solamente el estudio de variantes y MPT específicas, conocidas de antemano. Por otra parte, el número de variantes y MPT es muy grande, por lo cual la utilización de anticuerpos específicos para todas ellas sería demasiado costosa. Por lo tanto, si lo que se busca es un análisis global de variantes y MPT de histonas, esta técnica no constituye la mejor elección.

Otra de las alternativas la constituye la técnica de RP-HPLC (Reverse Phase-High Performance Liquid Chromatography), que separa las moléculas sobre la base de la hidrofobicidad. Este método de alta resolución es ideal para la purificación de histonas. Las histonas presentes en el extracto enriquecido pueden purificarse hasta casi la homogeneidad en una carrera en C8 estándar o columna C18, usando un gradiente de acetonitrilo, obteniéndose una fracción que corresponde a las histonas totales. Si se quiere separar variantes de histonas individuales, las fracciones pueden ser recargadas en la columna y separadas usando un método de RP-HPLC con un gradiente menos profundo. Una vez obtenidas las diferentes fracciones, éstas pueden ser identificadas mediante espectrometría de masa. Esta técnica sí permite una aproximación más global para el estudio de las variantes y MPT (Shechter et al, 2007).

Finalmente, otra de las alternativas es la separación de las variantes y las MPT utilizando geles de poliacrilamida, seguidos de la identificación por espectrometría de masa. La electroforesis convencional SDS-PAGE, permite separar las cinco principales histonas (H1, H2A, H2B, H3 y H4). Sin embargo las formas modificadas de histonas (variantes y MPT) no pueden ser resueltas por este método. Para lograr una buena resolución en la separación de variantes y MPT se utiliza la técnica de electroforesis en dos dimensiones (2D-PAGE), con geles específicamente diseñados para el estudio de histonas AUTxSDS y AUTxAU que permiten respectivamente la separación de variantes de histonas y de histonas con distintas MPT. En la primera dimensión con geles AUT, la presencia de detergentes no iónicos retarda la movilidad electroforética de las variantes homomorfas respecto a las heteromorfas. Los geles de segunda dimensión de SDS separan a las histonas de acuerdo con su masa molecular, y los geles de ácido acético/urea (AU) separan a las histonas en función de su relación carga/masa, permitiendo separar isoformas con distintas MPT. Esta combinación de

métodos que difieren en el principio de separación de las proteínas, permite obtener fracciones de histonas de alta pureza y con gran resolución (ver Introducción). Las variantes y las MPT pueden ser identificadas posteriormente mediante espectrometría de masa. Esta fue la técnica que seleccionamos para la realización de este trabajo, dado que permite una aproximación global al estudio de las histonas.

La técnica de geles bidimensionales de tipo AUTxSDS ha sido utilizada previamente para el estudio de las variantes de histonas. Por ejemplo, en un trabajo donde se caracterizan las variantes de H3 de mamíferos (Hake, 2006) se utiliza esta técnica para su separación y cuantificación en diferentes líneas celulares. Para verificar la identidad de los tres spots correspondientes a las variantes de H3, los autores analizan dichos spots mediante espectrometría de masa LTQ-FT-ICR (nanoflow HPLC-electrospray ionization on a linear quadrupole ion trap-Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance mass spectrometer). En el trabajo de Gong et al., 2002, realizan la técnica de geles AUTxSDS para identificar cambios en la acetilación de las isoformas de H3 y H4, mediante Western blot sobre estos geles. En otro trabajo, Picariello et al., 2006, utilizan esta técnica para el estudio de proteínas básicas del sarcoplasma de células musculares de cerdo. En una primera instancia, utilizan los geles AUTxSDS para la separación con alta resolución de las proteínas, y como forma de identificarlas proceden al análisis de los spots mediante espectrometría de masa MALDI-TOF (Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization–Time of Flight). Estos geles les permiten una resolución mucho mayor que la que se logra mediante geles bidimensionales estándar dado que se trata de proteínas básicas, que no son bien resueltas en dichos geles (Figura 31).

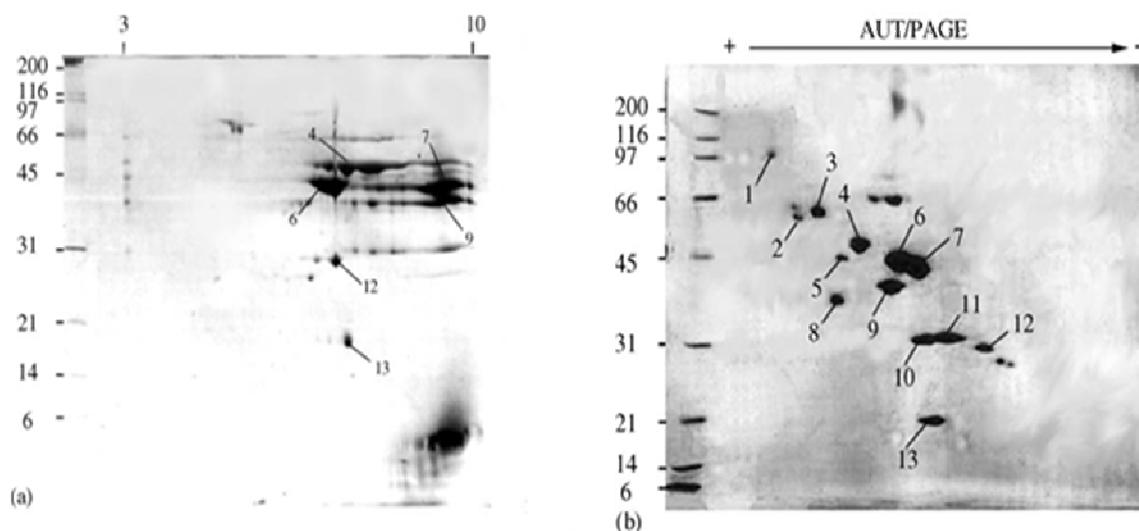


Figura 31. Los geles AUTxSDS permiten una separación de proteínas básicas con mayor resolución que los geles bidimensionales estándar. A la izquierda se muestra un gel bidimensional estándar (two-dimensional Immobilized pH Gradient-Sodium Dodecyl-Sulphate (2D IPG-SDS) gel electrophoresis, rango de pH 3-10). A la derecha se muestra el mismo extracto de proteínas básicas en un gel AUTxSDS (Picariello et al., 2006).

También mediante esta técnica (AUTxSDS seguido de espectrometría de masa MALDI-TOF), Khare et al., 2011 estudiaron la expresión diferencial de las variantes H2A.1 y H2A.2 en hepatocitos normales vs

hepatocitos carcinogénicos; lograron evidenciar un aumento en la variante H2A.1 y una disminución de H2A.2 como resultado del proceso de desdiferenciación característico de células cancerígenas.

La técnica de geles AU se ha utilizado para la separación de proteínas virales que exhiben distintas MPT al ser expresadas en células de diferentes organismos (Kleinow, 2007). Estos geles también fueron utilizados en el trabajo de Su et al., 2007, y les permitió separar las formas con una, dos, tres y cuatro acetilaciones de la histona H4, además de la isoforma no acetilada. La identificación se realizó mediante MALDI-TOF. Esto mismo se hizo para la separación de las isoformas mono a penta acetiladas de la histona H3 en el trabajo de Zhang et al., 2004.

En este trabajo, logramos obtener geles con una buena resolución de spots en los cuales fue posible la separación e identificación de algunas variantes de las histonas, así como de otras proteínas básicas presentes en la muestra.

Como se detalla en la sección 2.1 de Resultados, en los geles AUTxSDS, de un total de 29 spots analizados, fue posible la identificación con éxito de 14 spots (48% del total), mientras que en los geles AUTxAU, se identificaron solamente 5 de 23 (22%). Estos valores son bajos si se comparan a los obtenidos en otros experimentos realizados en nuestro laboratorio utilizando geles 2D convencionales, en los cuales se identifica un promedio de aproximadamente 80%. En estos geles convencionales se cargan 60µg de muestra, constan de una primera dimensión donde las proteínas se separan según su punto isoeléctrico, y una segunda dimensión donde se separan según su peso molecular, y posteriormente son teñidos con Coomassie coloidal. Es posible que el bajo número de spots identificados en el presente trabajo de tesis se debiera a la baja cantidad de muestra que se cargó (45µg en total), por lo cual habría muy poca cantidad de proteína por spot. Además, usamos la tinción con nitrato de plata, que presenta mayor sensibilidad que la tinción de Coomassie coloidal, por lo cual probablemente con esta técnica hayamos logrado ver spots con muy poca cantidad de proteína que no se evidenciaban por la técnica de Coomassie coloidal, donde sólo se veían spots con mayor cantidad de proteína. Por otra parte, pudo haber sucedido que el tipo de metodología utilizado haya interferido de alguna forma en la identificación de los péptidos por espectrometría de masa. El bajo nivel de identificación de spots constituye un aspecto a mejorar en el futuro. Entre las estrategias posibles se encuentra cargar más muestra, cambiar la tinción y eventualmente intentar la identificación utilizando otros espectrómetros de masa como el LTQ en lugar del MALDI-TOF.

En la puesta a punto de las metodologías de geles bidimensionales, se probaron varios tipos de tinciones de los geles: Azul de Coomassie, Coomassie coloidal y nitrato de plata (ver Figura 16). No obstante la tinción con nitrato de plata es considerada una coloración con un rango dinámico lineal limitado y menos adecuada para la cuantificación respecto a la coloración con Coomassie (Weiss et al., 2009), es la que se eligió por dar una mejor relación señal/ruido en nuestros experimentos.

SEGUNDA PARTE. IDENTIFICACIÓN DE LAS VARIANTES DE HISTONAS Y OTRAS PROTEÍNAS PRESENTES EN LA MUESTRA, Y ESTUDIO DE LA MODULACIÓN DE SU EXPRESION EN FUNCIÓN DEL NIVEL DE PLASTICIDAD.

IDENTIFICACIÓN DE VARIANTES DE HISTONAS EN LA CORTEZA VISUAL

Como ha sido mencionado anteriormente, el objetivo principal de este trabajo fue identificar las variantes de histonas que se expresan en la corteza visual de ratón, y comparar los niveles de expresión de dichas variantes entre las condiciones PC (alta plasticidad fisiológica) vs AD (baja plasticidad fisiológica), y entre AD vs FLX (alta plasticidad inducida por fármaco). El número de variantes de histonas es muy elevado y depende, entre otras cosas, de la especie analizada y del tejido considerado. En un trabajo reciente, se ha llevado adelante un estudio por espectrometría de masa sobre extractos de cerebro de ratón adulto, con la finalidad de identificar las variantes y las MPT de histonas (Tweedie-Cullen et al., 2009). En este trabajo fueron descritas 7 variantes de H1 (H1X, H1.0, H1.1, H1.2, H1.3, H1.4, H1.5), 12 variantes de H2A (macroH2A, H2A tipo 1, 1-F, 1-K, 2-A, 2-B, 2-C, 3, H2A.J, H2A.V, H2A.x, H2A.Z), 12 variantes de H2B (tipo 1-A, 1-B, 1-C/E/F/G/I, 1-F/J/L, 1-H, 1-K, 1-M, 1-P, 2-B, 2-E, 3-A, 3-B), 3 variantes de la H3 (H3.1, H3.2, H3.3) y la proteína H3-like CENP-A, y 1 sola forma de histona H4, que es la canónica (Tweedie-Cullen et al., 2009).

Mediante la metodología utilizada, logramos identificar algunas de estas variantes tal como se describe en la bibliografía.

Las variantes identificadas son:

- de H1: H1.0
- de H2A: se identificaron dos spots que corresponden a algunas las siguientes isoformas: H2A tipo 1, 1-A, 1-D, 1-H, 1-K, 1-F, H2A.Z, H2A.V. No se trataría de macroH2A, H2A tipo 2-A, 2-B, 2-C, 3, H2A.x, H2A.J.
- de H2B: se identificó una variante, que podría ser la H2B tipo 1-C/E/F/G/I, 1-D, 1-F/J/L, 1-K, 1-H, 1-P, 2-B, 2-E, 2-F, 3-A, 3-B). No se trataría de las variantes tipo 1-A, 1-B, ni 1-M.
- de H3: según el análisis de Western blot efectuado sobre geles AUTxSDS, existen en estos geles 3 spots que presumiblemente corresponden a distintas isoformas de la histona H3 (ver Figura 22 y 23). Estos 3 spots fueron enviados para su identificación por espectrometría de masa, pero solamente uno logró ser identificado como histona H3, aunque no fue posible identificar de qué isoforma se trata, pudiendo tratarse de la H3.1, H3.2 o H3.3 (ver Tabla 4, spot 9). Un estudio de la bibliografía disponible, revela que efectivamente en los geles AUTxSDS las isoformas de la H3 se presentan como 3 spots alineados a la altura de los 17kDa. Al comparar este patrón de distribución con el obtenido en nuestros geles, consideramos que la isoforma identificada (spot 9) es la variante H3.3 (Figura 32).
- de H4: se identificó un solo spot correspondiente a la forma canónica de H4, lo cual era lo esperado, dado que no se han descrito variantes para esta histona.

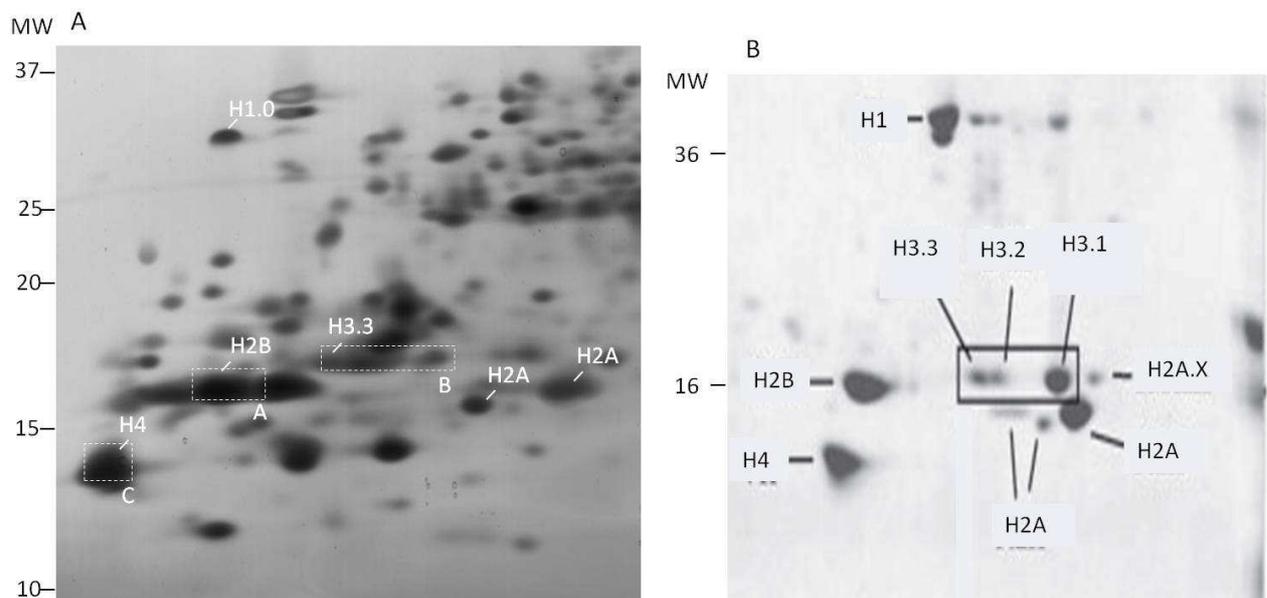


Figura 32. Comparación de los spots identificados en geles AUTxSDS con lo descrito en la bibliografía. En A) se muestra un gel AUTxSDS donde se cargaron 45µg de extracto ácido de corteza visual de ratón adulto normal, teñido con nitrato de plata. Se señala la identidad de los spots identificados por espectrometría de masa que corresponden a histonas. Los recuadros blancos corresponden a las regiones del gel que coinciden con las señales obtenidas por Western blot para las principales isoformas de histonas (A: H3; B: H2B; C: H4, ver Figura 22). B) Imagen de un gel AUTxSDS teñido con azul de Coomassie en el que se cargó un extracto enriquecido en histonas de células de mamífero. Se señalan las principales isoformas de histonas (Hake et al., 2006).

De los spots identificados correspondientes a las histonas H2A, H2B y H3 no se pudo identificar una única variante, sino que se obtuvo una lista de variantes posibles. Esto probablemente se deba a que las histonas son proteínas altamente conservadas, cuyas variantes tienen secuencias muy similares que sólo se diferencian en muy pocos aminoácidos.

La búsqueda de modificaciones postraduccionales utilizando los espectros de masa obtenidos por MALDI-TOF, permitió identificar dos MPT (meK80 y 2meK80) en uno de los spots analizados (spot 9, correspondiente a la histona H3). Este es un aspecto a mejorar en el futuro. Algunas de las estrategias a utilizar son la utilización de la extracción con sales en lugar de la extracción ácida, y mejorar el porcentaje de spot identificados en los geles bidimensionales AUTxAU (ver antes).

MODULACIÓN DE LAS VARIANTES DE HISTONAS IDENTIFICADAS EN FUNCIÓN DEL NIVEL DE PLASTICIDAD.

HISTONA H1.0

En cuanto a la histona H1, fue posible la identificación de la variante H1.0. Encontramos que la expresión de esta histona no varía de forma significativa entre las condiciones PC vs AD. Esto se repitió de forma consistente tanto para los geles AUTxSDS como para los geles AUTxAU. Sin embargo, encontramos un

aumento significativo en su expresión en los adultos tratados con fluoxetina con respecto a los adultos normales (FLX/AD=1,40 ± 0,52).

La histona H1.0 es una variante de la histona H1 presente en las células somáticas de mamífero, que, como se mencionó anteriormente, se expresa en la célula de manera dependiente del desarrollo. En particular esta variante es característica de las células quiescentes y completamente diferenciadas (van Holde, 1988; Happel et al., 2009). En cuanto a su estructura molecular, las histonas H1 presentan un dominio N-terminal corto (13-40 residuos) cuyo rol en la condensación de la cromatina no se conoce, un dominio globular central a través del cual se une a la doble hélice de ADN, y un dominio C-terminal de 100 residuos que interactúa con el ADN que conecta nucleosomas adyacentes y que es imprescindible para la condensación de la cromatina (Allan et al., 1986; Clore et al., 1987; Ramakrishnan et al., 1993; Thomas, 1999; Hansen, 2002; Lu and Hansen, 2004; Hansen et al., 2006; McBryant et al., 2010; Caterino et al., 2011).

El paradigma de que el grupo de las variantes de H1 funcionan como represores globales de la transcripción ha sido desafiado por evidencia que sugiere un rol más específico de las H1 en la regulación de la expresión génica (Shen and Gorovsky, 1996; Panetta et al., 1998; Sera and Wolffe, 1998; Hellauer et al., 2001; Bhan et al., 2008). Estudios en ratones knock out para ciertas variantes de H1 revelaron que cada variante de H1 afecta diferencialmente la expresión génica, y además que las variantes de H1 estarían regulando solamente la expresión de un número reducido de genes (Brown et al., 1996).

En lo que refiere específicamente a la variante H1.0, se sabe que esta variante se encuentra generalmente asociada a regiones de la heterocromatina. En estudios donde se sobreexpresó la variante H1.0 hasta lograr que ésta constituya el 70% de la población total de H1, se observó una alteración en la expresión de 118 genes. De ellos, 62 genes aumentaron su transcripción y 53 genes la disminuyeron. Estos resultados confirman que lo mencionado anteriormente se cumple para la variante H1.0, la cual estaría actuando como un regulador específico de la expresión génica y no global, pudiendo provocar tanto el aumento como la disminución de la transcripción génica (Bhan et al., 2008). La razón por la cual esta variante puede regular diferencialmente la expresión de genes, es que puede inducir a regiones específicas de la cromatina a adoptar conformaciones más laxas o más compactas (Bhan et al., 2008). Experimentos de knock down de H1.0 en células madre embrionarias humanas mostraron un efecto dramático en la diferenciación, causando una demora en el silenciamiento de genes asociados a la pluripotencialidad y defectos en la activación de genes de diferenciación celular (Terme et al., 2011).

Además de regular la expresión génica a través de su interacción con el ADN, la histona H1.0 interactúa con otras proteínas. En un estudio reciente, se encontró que H1.0 es capaz de interactuar con al menos 107 proteínas de las cuales 94 pertenecen al nucléolo; esta interacción ocurre en el 25% a través del dominio C-terminal de la H1.0 mientras que el 75% a través del N-terminal. Esto permite especular que H1.0 sería un regulador clave de la función nucleolar, dado que ha sido demostrado que se une a proteínas

involucradas en el corte y empalme del ARNm, la síntesis y procesamiento de los ARNr y la función ribosomal (Kalashnikova et al., 2013).

Con respecto a esta isoforma, encontramos que el tratamiento crónico con fluoxetina induce un aumento en su expresión en la corteza visual de ratones adultos. Es una posibilidad que la fluoxetina induzca un recambio en las variantes de ciertas histonas que controlan la expresión de determinados genes. El aumento en la expresión de H1.0, podría explicarse por la gran cantidad de genes que esta isoforma está regulando, entre ellos genes vinculados al metabolismo de drogas, a la síntesis proteica, al tráfico de proteínas, a la señalización entre células, al metabolismo de lípidos, carbohidratos, ácidos nucleicos y aminoácidos e incluso genes vinculados al control de la expresión génica como factores de transcripción (Bhan et al., 2008).

HISTONA H2A.

Para los dos spots identificados como histona H2A (spots 12 y 13) en los geles AUTxSDS, encontramos que ambos se expresan menos durante el periodo crítico que en el adulto (PC/AD= 0.69 ± 0.05 y 0.54 ± 0.08). Este resultado es similar al encontrado en los geles AUTxAU (PC/AD= 0.61 ± 0.15). En el adulto tratado con fluoxetina, la expresión de estos spots es mayor con respecto al adulto normal (FLX/AD= 1.52 ± 0.28 y 1.46 ± 0.20). Como se mencionó anteriormente, los péptidos obtenidos en el análisis por MALDI-TOF de estos dos spots no permitieron adjudicar identidad a una única isoforma, por lo que la proteína contenida en cada uno de estos spots podría corresponder a cualquiera de las isoformas señaladas (ver Tabla 4).

Según indican los resultados, estas isoformas aumentarían su expresión a lo largo del desarrollo normal, siendo más expresadas en el adulto que en animales jóvenes. Por otra parte, la fluoxetina provocaría un aumento de su expresión en animales adultos. Es necesario realizar más estudios para determinar de qué variantes se trata.

Dado que el estudio de las variantes de histonas es un campo de la epigenética que no ha recibido demasiada atención, existen muy pocas evidencias que vinculen el recambio de variantes de H2A a los procesos de plasticidad. Recientemente ha sido demostrado que la variante H2A.Z participa en la regulación a nivel molecular de funciones cognitivas relacionadas con el aprendizaje y la memoria. Específicamente, se encontró que H2A.Z se intercambia activamente en respuesta al miedo condicionado en el hipocampo y la corteza, donde media la expresión génica y restringe la formación de la memoria reciente y remota (Zovkic et al., 2014).

HISTONA H2B

En cuanto a la histona H2B, fue posible la identificación de una isoforma pero no se determinó de cuál se trata. Encontramos que la expresión de esta variante disminuye significativamente su expresión en adultos normales con respecto a los animales en periodo crítico (PC/AD= 1.23 ± 0.08), mientras que el

tratamiento con fluoxetina provoca una disminución de su expresión con respecto a adultos no tratados (FLX/AD= 0.76 ± 0.10). Según indican los resultados, esta variante disminuye su expresión a lo largo del desarrollo normal, siendo más expresadas en animales jóvenes que en adultos. Por otra parte, la fluoxetina provocaría una disminución de su expresión en animales adultos.

HISTONA H3

Fue posible la identificación de una variante de H3, que presumiblemente se trata de H3.3. Esta variante presenta un alto nivel de expresión (casi tres veces más) en animales en periodo crítico con respecto al adulto (CP/AD= 2.72 ± 0.30), lo que sugiere que a lo largo de esta parte del desarrollo esta variante es reemplazada por otras. Su expresión no cambia por el tratamiento con fluoxetina en adultos. Como se mencionó anteriormente, se sabe que H3.3 se acumula en algunos tejidos durante el desarrollo en ratones, y que se enriquece en las regiones transcritas activamente del genoma (Ausió, 2006). Nuestros resultados efectivamente muestran que durante el periodo crítico de desarrollo, H3.3 está más expresada y que luego va siendo reemplazada por otras variantes disminuyendo su expresión en el adulto.

HISTONA H4

No encontramos variaciones significativas en su expresión en ninguna de las condiciones experimentales, ni por AUTxSDS ni por AUTxAU. Considerando que existe una única isoforma y que esta histona es obligatoria para la composición de los nucleosomas, no esperábamos una modificación de la expresión. Como se mencionó anteriormente, se ha descrito que esta histona está implicada en la regulación de los niveles de plasticidad pero a través de MPT (Putignano et al., 2007; Silingardi et al., 2010) y no a través de recambio de variantes.

IDENTIFICACIÓN DE OTRAS PROTEÍNAS NO HISTONAS PRESENTES EN LA MUESTRA, Y MODULACIÓN DE SU EXPRESIÓN.

Además de obtener histonas, en nuestro extracto ácido encontramos otras proteínas, de las cuales algunas fueron identificadas por espectrometría de masa. Las proteínas identificadas son: Myelin basic protein, Cofilin-1, Peptidyl-prolyl-cis-trans isomerase A, alpha and beta globin, 40S ribosomal protein S10, 40S ribosomal protein S16, NADH dehydrogenase subunit 4. Mediante un análisis bioinformático utilizando la base de datos UniProt se determinó el punto isoeléctrico teórico (pI) de estas proteínas identificadas. Todas presentaron un valor teórico de punto isoeléctrico mayor que 7, lo cual indica que son proteínas básicas. Esto era lo esperado, considerando que para la preparación de la muestra se realizó un protocolo de extracción ácida, y estas proteínas son solubles en ácidos.

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). 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).

MBP (MYELIN BASIC PROTEIN)

Encontramos que la expresión de esta proteína varía de forma significativa entre las condiciones PC vs AD, siendo mayor en el adulto ($PC/AD = 0.42 \pm 0.18$) lo que sugiere que su expresión aumenta a lo largo del desarrollo. No encontramos cambios en su expresión en los adultos tratados con fluoxetina con respecto a los adultos normales.

La MBP es una proteína importante en el proceso de mielinización de los nervios en el sistema nervioso. La vaina de mielina es una membrana de varias capas, exclusiva del sistema nervioso, que funciona como un aislante para aumentar en gran medida la velocidad de conducción del impulso axonal. MBP mantiene la estructura correcta de la mielina, a través de su interacción con los lípidos de la membrana de mielina. En el sistema nervioso central existen muchas variantes de empalme de MBP, que además se diferencian por sus MPT que incluyen la fosforilación, metilación, desamidación, entre otras. Estas formas se diferencian por la presencia o la ausencia de cortos péptidos (de 10 a 20 residuos) en diversos lugares internos de la secuencia. En general, la forma principal de MBP es una proteína de aproximadamente 18,5 kDa que contiene 170 residuos.

Dado que los procesos de mielinización ocurren en paralelo con el cierre del periodo crítico, era esperable encontrar un aumento en la expresión de MBP a lo largo del desarrollo normal. Como se mencionó en la introducción, la maduración de la mielina está directamente implicada en la determinación de los niveles de plasticidad, dado que en la mielina existen moléculas que actúan como “frenos” para la movilidad y crecimiento neuríticos.

40S RIBOSOMAL PROTEIN S16 Y 40S RIBOSOMAL PROTEIN S10 (RPS16 Y RPS10)

Encontramos que la expresión de estas proteínas varía de forma significativa entre las condiciones PC vs AD, siendo mayor en el periodo crítico que en el adulto ($PC/AD = 2,39 \pm 0,44$ para rpS16 y $PC/AD = 2,12 \pm 0,35$ para rpS10). No encontramos cambios en su expresión en los adultos tratados con fluoxetina con respecto a los adultos normales.

Los ribosomas eucariotas están compuestos de dos subunidades: 40S (subunidad menor) y 60S (subunidad mayor). La subunidad 40S se compone de una sola molécula de ARN (18S), y 33 proteínas; mientras que la subunidad 60S tiene tres moléculas de ARN (5S, 5.8S y 28S) y 46 proteínas. Las proteínas encontradas en esta tesis (rpS16 y rpS10) pertenecen a la subunidad menor del ribosoma. Ambas están implicadas en el proceso de traducción proteica y procesamiento del ARNr (conversión de un ARNr primario a una forma más madura) y su localización es citosólica.

En cuanto a la vinculación de proteínas ribosomales con procesos de plasticidad, se sabe que para la plasticidad sináptica a largo plazo se requieren cambios en la expresión génica y la síntesis de proteínas. La regulación local de la síntesis proteica (por ejemplo, a nivel de axones) mediante el control de la traducción, permite a la sinapsis controlar la fuerza sináptica de forma independiente de la síntesis de ARNm y su transporte desde el soma celular. Recientemente, han sido descritas varias cascadas de señalización que vinculan a neurotransmisores y neurotrofinas con la regulación de la traducción (Klann and Dever, 2004). Por ejemplo, se ha descrito que la activación de receptores de glutamato en la glia de Bergmann induce la fosforilación de la proteína ribosomal rpS6 (componente de la subunidad ribosomal pequeña), que se correlaciona con un aumento en la cantidad de polisomas (Flores-Méndez et al., 2015).

Nuestros resultados muestran una mayor expresión de las proteínas ribosomales rpS16 y rpS10 durante el periodo crítico de plasticidad, lo cual es consistente con la idea de una mayor síntesis proteica cuando la plasticidad es elevada. Sin embargo, también es posible que esta mayor síntesis proteica no se vincule a procesos de plasticidad sino a otros procesos relacionados con el desarrollo.

ALFA Y BETA GLOBINA

Encontramos que la expresión de la alfa globina varía de forma significativa entre las condiciones PC vs AD, siendo significativamente mayor en el adulto (PC/AD= 0.79±0.04). No encontramos cambios en su expresión en los adultos tratados con fluoxetina con respecto a los adultos normales. En cuanto a la beta globina, no encontramos cambios en su expresión entre las condiciones experimentales.

La alfa y beta globinas son subunidades de la hemoglobina A (heterotetrámero compuesto por dos cadenas alfa y dos cadenas beta), expresadas específicamente en glóbulos rojos sanguíneos. La alfa globina se compone de 142 residuos aminoacídicos, y la beta globina de 147. Su función se relaciona con el transporte de oxígeno desde los pulmones hasta los diferentes tejidos periféricos.

La posibilidad de separar las cadenas de globinas mediante geles AUT ya había sido documentada en la bibliografía (Gulbis et al., 1998), por lo tanto era esperable encontrar las cadenas de alfa y beta globina en estos geles, considerando además que se trata de proteínas básicas. Hasta la fecha, variaciones en la expresión de estas proteínas no han sido vinculadas a procesos de plasticidad cerebral.

NADH DESHIDROGENASA SUBUNIDAD 4

Encontramos una expresión significativamente mayor de esta proteína en la corteza visual de ratones adultos con respecto al periodo crítico (PC/AD=0.70±0.09). Por otra parte, se observó un aumento en la expresión de esta enzima por efecto del tratamiento con fluoxetina en ratones adultos (FLX/AD=1.41±0.20), sin embargo, este aumento no resultó significativo.

Esta proteína es una subunidad del complejo NADH deshidrogenasa (llamado también complejo I) de la cadena respiratoria en la membrana mitocondrial. La función principal de este complejo es transferir electrones desde NADH a la cadena respiratoria, siendo su aceptor inmediato la ubiquinona.

Recientemente, ha sido propuesto que los genes mitocondriales están involucrados en la plasticidad cerebral. De hecho, se ha encontrado que ocurre una expresión diferencial de los genes mitocondriales durante el periodo crítico de plasticidad en la corteza visual. Específicamente, Yang et al., 2001 encontraron que hay genes que aumentan su expresión durante el periodo crítico en la corteza visual de gato (definidos “genes de plasticidad”, que incluyen a las subunidades 2 y 4 de la NADH deshidrogenasa), mientras que otros la disminuían (definidos “genes anti-plasticidad”, que incluyen a las subunidades 3 y 5 de la NADH deshidrogenasa). La observación de que algunas subunidades dentro de un mismo complejo sean definidas y expresadas como “genes de plasticidad” mientras que otras como “genes anti-plasticidad”, sugiere que las subunidades individuales podrían tener otras funciones además de su rol en la cadena respiratoria, y que esas funciones estarían contribuyendo a la plasticidad neuronal. Por ejemplo, se observó que en condiciones de alta plasticidad la subunidad 4 aumenta su expresión mientras que la subunidad 5 la disminuye. Dado que estas dos subunidades interactúan para formar un subcomplejo dentro del complejo 1 de la enzima (Sazanov et al., 2000), puede haber un exceso de subunidades 4 en condiciones de elevada plasticidad. Se ha observado que la subunidad 4 funciona como un canal o transportador cuando no se asocia a la subunidad 5 (Hogue et al., 1997). Por lo tanto, se podría especular que cuando una neurona está en estado plástico, el exceso de subunidades 4 podría alterar el transporte y otras propiedades de las membranas mitocondriales. El transporte alterado, a su vez podría afectar a otros procesos importantes para la neuroplasticidad, tales como la homeostasis del calcio (Yang et al., 2001).

PEPTIDIL PROLIL CIS-TRANS ISOMERASA A

Encontramos que la expresión de esta proteína es significativamente mayor durante el PC que en el adulto (PC/AD=1.34±0.09). No se observaron cambios significativos en su nivel de expresión en adultos por el tratamiento con fluoxetina.

Esta proteína, también conocida como ciclofilina A o rotamasa A, es una enzima codificada por el gen PPIA. Se localiza principalmente en el citoplasma de las células, y también puede ser secretada hacia el espacio extracelular. Está presente en el cerebro de mamíferos en mayores concentraciones que en otros tejidos, donde se localiza preferentemente en neuronas tanto a nivel citoplasmático como nuclear (Lad et al., 1991; Marks et al., 1991; Ryffel et al., 1991; Dawson et al., 1994; Godner and Patrick, 1996; Arckens et al., 2003). Esta enzima cataliza la isomerización cis-trans de los enlaces peptídicos de prolina en oligopéptidos y acelera el plegamiento de las proteínas. Además, está involucrada en procesos relacionados a la respuesta inmune. Se sabe que se une al inmunosupresor ciclosporina para formar un complejo que inhibe a la calcineurina, la cual es responsable de activar la transcripción de linfocinas y la liberación de interleucinas. Por lo tanto, el complejo ciclofilina/ciclosporina provoca una reducción en la función de los linfocitos-T.

La ciclofilina A ha sido vinculada con procesos de plasticidad cortical, específicamente con la reorganización anatómica en la corteza visual inducida por lesión en la retina en gato adulto. Se ha observado que durante la remodelación de las conexiones corticales el nivel de expresión de la ciclofilina A disminuye. Estos resultados estarían sugiriendo que la ciclofilina tiene un rol inhibitorio en los procesos de plasticidad inducida por lesión en la corteza visual (Arckens et al., 2003). De lo contrario, el aumento de la ciclofilina A que se encontró en nuestro trabajo indicaría un rol permisivo de esta proteína en los procesos de plasticidad fisiológicos durante el desarrollo posnatal.

COFILINA 1

Encontramos que la expresión de esta proteína es significativamente mayor durante el PC que en el adulto (PC/AD=1.36±0.15). El tratamiento con fluoxetina en animales adultos induce un aumento significativo en su expresión con respecto a adultos no tratados (FLX/AD=1.19±0.09).

La cofilina 1 pertenece a la familia de proteínas de unión a la actina ADF/cofilina que despolimerizan los microfilamentos. Ha sido demostrado que esta proteína es importante para el progreso normal de la mitosis y la citocinesis. También juega un papel importante en la regulación de la morfología celular y la organización del citoesqueleto. Han sido descritos tres genes miembros altamente conservados de esta familia, los cuales presentan gran homología de secuencia (entre 70% y 82%): CFL1 (que codifica para la cofilina -1 ó n-cofilina, la cual no se presenta en músculo), CFL2 (que codifica para la cofilina-2 ó m-cofilina, que se encuentra en músculos), y DSNT (que codifica para la destrina, también conocida como factor despolimerizante de actina, ADF). La ADF se une a los monómeros de actina ó G-actina mientras que la Cofilina se une a filamentos de actina, o F-actina. La cofilina despolimeriza el extremo (-) de los microfilamentos, impidiendo el reensamblado; por ello, crea más extremos (+) en los fragmentos de filamentos. Los monómeros resultantes pueden ser reciclados por la profilina, otra proteína asociada a actina que facilita el cambio de ADP a ATP de los monómeros de actina, lo cual facilita su polimerización. De este modo, la existencia de un acervo de actina G-ATP en el citoplasma en presencia de cofilina incrementa la actividad de polimerización debido al corte de los microfilamentos y a la creación de extremos de polimerización, especialmente en interacción con el complejo Arp2/3, que interviene nucleando nuevas ramas de microfilamentos. Además, cofilina y Arp2/3 están involucrados en la reorganización de microtúbulos y en el tráfico de vesículas (Svitkina and Borisy, 1999).

En un trabajo reciente, se estudió el papel de la cofilina en procesos de plasticidad en la corteza somatosensorial de roedores. En este modelo, la privación sensorial de una vibrisa provoca la retracción de la columna cortical correspondiente, mientras que las columnas adyacentes no privadas se expanden. Al disminuir la expresión de cofilina1 mediante el uso de ARN de interferencia en las neuronas excitatorias de la columna privada sensorialmente, los autores observaron que la retracción de la columna privada no se veía alterada, pero sí se impedía la expansión de la columna adyacente no privada. Los autores encontraron

que durante estos cambios plásticos, la densidad de las espinas dendríticas aumenta de forma dependiente de cofilina1 en las conexiones horizontales entre las columnas privadas y las no privadas. Esto sugiere que cofilina1 regula la plasticidad funcional cortical a través de la remodelación de las espinas dendríticas dentro de los circuitos que conectan las columnas (Tsubota et al., 2015).

En este trabajo encontramos que la cofilina varía su expresión en función del nivel de plasticidad. En particular, encontramos que aumenta en animales con altos niveles de plasticidad (PC y FLX), siendo menor su expresión en animales con bajo nivel de plasticidad (adultos normales). Resultados previos de nuestro laboratorio han mostrado que varias de las proteínas que interaccionan con la cofilina varían su expresión en función del nivel de plasticidad (Ruiz-Perera et al., 2015). En concreto, encontramos que el tratamiento con fluoxetina en el animal adulto modula los niveles de las proteínas Arp2, Cdc42 y profilina. Estas proteínas participan junto a la cofilina en 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). Estos reordenamientos del citoesqueleto forman parte de los cambios estructurales que son esenciales para la plasticidad neuronal a largo plazo, e incluyen formación, modulación y cambios en la dinámica de los contactos sinápticos. 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 la cofilina, Arp2, Cdc42 y profilina.

CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

En este trabajo utilizamos una aproximación desde la proteómica para identificar potenciales candidatos en la regulación de los procesos de plasticidad cortical, utilizando la corteza visual del ratón como modelo experimental. En específico, nos focalizamos sobre el estudio de las histonas, cuya expresión y MPT representan uno de los mecanismos más relevantes en el control de la expresión génica.

La producción de muestras de corteza visual enriquecidas en histonas, la puesta a punto de la metodología de electroforesis bidimensional y la selección de spots en los geles han sido alcanzadas sin presentar dificultades mayores. Por ende, implementamos en el laboratorio una metodología novedosa de electroforesis bidimensional específica que permite una alta resolución en la separación de histonas.

La identificación por espectrometría de masa de los spots seleccionados evidenció en los geles la presencia de algunas de las varias isoformas de histonas, en específico una variante de H1 (H1.0), dos variantes de H2A, una variante de H3 (presumiblemente H3.3) y la isoforma canónica de H4. Planificamos realizar algunas modificaciones a las metodologías utilizadas en este proyecto para aumentar el número de isoformas de histonas identificadas. Por ejemplo, utilizar la RP-HPLC de modo de obtener muestras con una mayor concentración de histonas; cargar en los geles una cantidad mayor de muestra que pueda permitir la identificación de spots menos representados y la utilización de la coloración por Coomassie coloidal, una tinción más adecuada para la cuantificación comparativa entre muestras. Finalmente planificamos la utilización de otros espectrómetros de masa como el LTQ en lugar del MALDI-TOF, que puede permitir una mejor identificación de variantes de histonas. En este estudio también se lograron identificar 7 proteínas no-histonas obtenidas por extracción ácida de la corteza visual de ratón: la Myelin basic proteín, Cofilin-1, Peptidyl-prolil-cis-trans isomerase A, alpha and beta globin, 40S ribosomal protein S10, 40S ribosomal protein S16, y la NADH deshydrogenase.

La comparación del patrón de expresión entre las distintas condiciones de plasticidad se llevó adelante sobre las imágenes de los geles obtenidos utilizando software de análisis de la imagen y de estadística. Los resultados obtenidos indican una clara modulación dinámica de la expresión de las proteínas histonas y no-histonas identificadas en el presente trabajo en función de los niveles de plasticidad. En particular encontramos cambios en la expresión de la variante H1.0, de las dos variantes de H2A, la de H2B y la de H3. En cuanto a la modulación de otras proteínas, todas variaron su expresión en función del nivel de plasticidad excepto la beta globina.

Mientras que algunas de estas proteínas han sido ya vinculadas con procesos de plasticidad neuronal (MBP, cofilin), muy poco se sabe sobre la relación de la mayoría de estas sobre la plasticidad en general y de la corteza visual en específico. Planificamos confirmar la modulación y expresión de estas proteínas con

otras metodologías (western blot, inmunohistoquímica, etc.) para luego seleccionar algunas de éstas y analizar su potencial rol en el control de los procesos de plasticidad con más detalle.

Consideramos que estos resultados constituyen una base inicial en la caracterización de los procesos celulares y moleculares subyacentes a los procesos de plasticidad en la corteza visual del ratón.

BIBLIOGRAFIA

- Alami R, Fan Y, Pack S, et al (2003) **Mammalian linker-histone subtypes differentially affect gene expression in vivo.** *Proc Natl Acad Sci USA* 100:5920–5.
- Allan J, Mitchell T, Harborne N, Bohm L, Crane-Robinson C (1986) **Roles of H1 domains in determining higher order chromatin structure and H1 location.** *J Mol Biol* 187, 591–601.
- Anier K., Malinovskaja K., Aonurm-Helm, A, Zharkovsky A, Kalda A (2010) **DNA methylation regulates cocaine-induced behavioral sensitization in mice.** *Neuropsychopharmacology* 35, 2450e2461.
- Arckens L, Van der Gutch E, Van den Bergh G, Massie A, Leysen I, Vandenbussche E, Eysel UT, Huybrechts R, Vandesande F (2003) **Differential display implicates cyclophilin A in adult cortical plasticity.** *Eur J Neurosci*, 18:61-75.
- Atwal JK, 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.
- Ausió J (2006) **Histone variants-the structure behind the function.** *Brief Funct Genomic Proteomic*, 5(3):228-43.
- Bardin J (2012) **Neurodevelopment: unlocking the brain.** *Nature*, 487, 24-6.
- Bargaje R, Alam MP, Patowary A, Sarkar M, Ali T, Gupta S, Garg M, Singh M, Purkanti R, Scaria V, Sivasubbu S, Brahmachari V, Pillai B (2012) **Proximity of H2A.Z containing nucleosome to the transcription start site influences gene expression levels in the mammalian liver and brain.** *Nucleic Acids Res.* 40:8965–8978.
- Begenisic T, Baroncelli L, Sansevero G, Milanese M, Bonifacino T, Bonanno G, Cioni G, Maffei L, Sale A (2014) **Fluoxetine in adulthood normalizes GABA release and rescues hippocampal synaptic plasticity and spatial memory in a mouse model of Down syndrome.** *Neurobiol Dis.* 63:12-9.
- Ben-Ari Y. et al. (2012) **Refuting the challenges of the developmental shift of polarity of GABA actions: GABA more exciting than ever!** *Front. Cell. Neurosci.* 6, 35.
- Berardi N, Pizzorusso T, Maffei L. (2000) **Critical periods during sensory development.** *Curr. Opin. Neurobiol.* 10, 138–145.
- Berardi N, Pizzorusso T, Ratto GM, Maffei L (2003) **Molecular basis of plasticity in the visual cortex.** *Trends Neurosci.* 26:369-378.
- Bhan S, May W, Warren SL, Sittman DB (2008) **Global gene expression analysis reveals specific and redundant roles for H1 variants, H1c and H1⁰, in gene expression regulation.** *Gene*, 414:10-18
- Brown DT, Alexander BT, Sittman DB, (1996) **Differential effect of H1 variant overexpression on cell cycle progression and gene expression.** *Nucleic Acids Res* 24, 486–493.

- Brownell JE, Allis CD (1996). **Special HATs for special occasions: linking histone acetylation to chromatin assembly and gene activation.** *Curr Opin Genet Dev* 6(2):176–84.
- Bustin M, Catez F, Lim JH (2005) **The dynamics of histone H1 function in chromatin.** *Mol Cell* 17:617–20.
- Cabelli RJ, Hohn A, Shatz CJ (1995). **Inhibition of ocular dominance column formation by infusion of NT-4/5 or BDNF.** *Science* 267:1662–1666
- Cancedda L, Putignano E, Sale A, Viegi A, Berardi N, Maffei L (2004) **Acceleration of visual system development by environmental enrichment.** *J. Neurosci.* 24, 4840–4848.
- Caron F, Thomas JO (1981). **Exchange of histone H1 between segments of chromatin.** *J Mol Biol* 146:513–37.
- Castrén E (2004) **Neurotrophic effects of antidepressant drugs.** *Curr Opin Pharmacol*, 4, 58-64.
- Caterino TL, Fang H, Hayes JJ (2011). **Nucleosome linker DNA contacts and induces specific folding of the intrinsically disordered H1 carboxyl-terminal domain.** *Mol Cell Biol* 31, 2341–2348.
- Chen CC, Smith DL, Bruegger BB, Halpern RM, Smith RA (1974) **Occurrence and distribution of acid-labile histone phosphates in regenerating rat liver.** *Biochemistry* 13, 3785–9.
- Chen JL, Lin WC, Cha JW, So PT, Kubota Y, Nedivi E (2011) **Structural basis for the role of inhibition in facilitating adult brain plasticity.** *Nat Neurosci*, 14, 587-94.
- 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.
- Clore GM, Gronenborn AM, Nilges M, Sukumaran DK, Zarbock J (1987) **The polypeptide fold of the globular domain of histone H5 in solution. A study using nuclear magnetic resonance, distance geometry and restrained molecular dynamics.** *EMBO J* 6, 1833–1842.
- Corriveau RA, Huh GS, Shatz CJ (1998) **Regulation of class I MHC gene expression in the developing and mature CNS by neural activity.** *Neuron*, 21, 505-20.
- Dawson TW, Steiner JP, Lyons WE, Fotuhi M, Blue M, Snyder SH (1994) **The immunophilins, FK506 binding protein and cyclophilin, are discretely localized in the brain: relationship to calcineurin.** *Neuroscience*, 2:569-580.
- Deidda G, Allegra M, Cerri C, Naskar S, Bony G, Zunino G, Bozzi Y, Caleo M, Cancedda L (2015) **Early depolarizing GABA controls critical-period plasticity in the rat visual cortex.** *Nat Neurosci* 1:87-96.
- Deng JV, Rodriguiz RM, Hutchinson AN, Kim IH, Wetsel WC, West AE (2010) **MeCP2 in the nucleus accumbens contributes to neural and behavioral responses to psychostimulants.** *Nat. Neurosci.* 13, 1128e1136.
- Dulawa SC, Holick KA, Gundersen B, Hen R (2004) **Effects of chronic fluoxetine in animal models of anxiety and depression.** *Neuropsychopharmacology*, 29, 1321-30.

- Edbauer D, Neilson JR, Foster KA, Wang CF, Seeburg DP, Batterton MN, Tada T, Dolan BM, Sharp PA, Sheng M (2010) **Regulation of synaptic structure and function by FMRP-associated microRNA miR-125b and miR-132.** *Neuron*, 65:373-384
- Eickbush TH, Godfrey JE, Elia MC, et al (1988) **H2a-specific proteolysis as a unique probe in the analysis of the histone octamer.** *J BiolChem* 263:18972–8.
- Fagiolini M, Hensch TK (2000) **Inhibitory threshold for critical-period activation in primary visual cortex.** *Nature*, 404:183-186.
- Fagiolini M, Fritschy JM, Low K, Mohler H, Rudolph U, Hensch TK (2004) **Specific GABA circuits for visual cortical plasticity.** *Science* 303:1681-1683.
- Fischle W, Wang Y, Allis CD (2003) **Histone and chromatin cross-talk.** *Curr. Opin. Cell Biol.* 15: 172-183
- Flores-Méndez M, Escalante-López M, Martínez-Lozada Z, Hernández-Kelly LC, Najimi M, Sokal E, Ortega A (2015) **Glutamate-dependent translational control through ribosomal protein S6 phosphorylation in cultured Bergmann glial cells.** *Neurochem Res* DOI 10.1007/s11064-015-1544-y
- Francis D, Diorio J, Liu D, Meaney MJ (1999) **Nongenomic transmission across generations of maternal behavior and stress responses in the rat.** *Science* 286:1155-1158.
- Galizia CD and Lledo PM (eds) (2013) **Neurosciences - From Molecule to Behaviour: a University Textbook.** Springer Spektrum
- Gianfranceschi L, Siciliano R, Walls J et al (2003) **Visual cortex is rescued from the effects of dark rearing by overexpression of BDNF.** *Proc Natl Acad Sci USA* 100: 12486–12491.
- Godner RM, Patrick JW (1996) **Neuronal localization of the cyclophilin A protein in the adult rat brain.** *J Comp Neurol*, 372:283-293.
- Graff J, Mansuy I (2008) **Epigenetic codes in cognition and behavior.** *Behav Brain Res* 192:70-78
- Gong M, Ni JH, Jia HT (2002) **Increased exchange rate of histone H1 on chromatin by exogenous myogenin expression.** *Cell Res* 12(5-6):395-400.
- Green G, Do D (2009) **Purification and analysis of variant and modified histones using 2D PAGE.** *Methods Mol Biol* 464:285-302.
- Gulbis B, Kagambega F, Tshilolo L, Vertongen F (1998) **Globin chains analysis: improved resolution by electrophoresis in urea-acetic acid-Triton X-100.** *Ann Clin Biochem*, 35(3):415-7.
- Hajszan T, Maclusky NJ, 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.
- Hake SB, Garcia BA, Duncan EM, Kauer M, Dellaire G, Shabanowitz J, Bazett-Jones DP, Allis CD, Hunt DF (2006) **Expression Patterns and Post-translational Modifications Associated with Mammalian Histone H3 Variants.** *J BiolChem* 271(1)559-568.

- Hammer O and Harper (2001) PAST: PALEONTOLOGICAL STATISTICS SOFTWARE PACKAGE FOR EDUCATION AND DATA ANALYSIS. *Palaeontologia Electronica*, 4, 9.
- Hansen JC (2002) **Conformational dynamics of the chromatin fiber in solution: determinants, mechanisms, and functions.** *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 31, 361–392.
- Hansen JC, Lu X, Ross ED, Woody RW (2006) **Intrinsic protein disorder, amino acid composition, and histone terminal domains.** *J Biol Chem* 281:1853–1856.
- Hansen KF, Sakamoto K, Wayman GA, Impey S, Obrietan K (2010) **Transgenic miR132 alters neuronal spine density and impairs novel object recognition memory.** *PLoS One*, 5(11):e15497
- Happel N, Schulze E, Doenecke D, (2009) **Characterization of human histone H1x.** *Biol. Chem.* 386: 541–551.
- 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 HY, Baisali R, Dennis K, Quinlan EM (2007) **Experience-dependent recovery of vision following chronic deprivation amblyopia.** *Nature* 10(9):1134-1136.
- He HY, Hodos W, Quinlan EM (2006) **Visual Deprivation Reactivates Rapid Ocular Dominance Plasticity in Adult Visual Cortex.** *J Neurosci* 26(11):2951-5.
- He H, Lehming N (2003). **Global effects of histone modifications.** *Brief Funct Genomic Proteomic* 2(3):234–43.
- Hellauer, K., Sirard, E., Turcotte, B (2001) **Decreased expression of specific genes in yeast cells lacking histone H1.** *J. Biol. Chem.* 276, 13587–13592.
- Hensch TK, Fagiolini M, Mataga N, Stryker MP, Baekkeskov S, Kash SF (1998) **Local GABA circuit control of experience-dependent plasticity in developing visual cortex.** *Science* 282:1504-1508.
- Hensch TK (2005) **Critical period plasticity in local cortical circuits.** *Nat Rev Neurosci*, 6:877-888.
- Hogue D L, Ellison M J, Vickers M, Cass CE (1997) **Functional complementation of a membrane transport deficiency in *Saccharomyces cerevisiae* by recombinant ND4 fusion protein.** *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 238(3), 811–816.
- Holmes J, Clarke M (2006) **Amblyopia.** *Lancet* 367:1343-1351.
- Hooks BM, 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 CC (2010) **Actin in dendritic spines: connecting dynamics to function.** *J Cell Biol*, 189, 619-29.
- Huang, Z.J. et al. (1999) **BDNF regulates the maturation of inhibition and the critical period of plasticity in mouse visual cortex.** *Cell* 98, 739–755.

- Huh Gs, Boulanger LM, Du H, Riquelme PA, Brotz TM, Shatz CJ (2000) **Functional requirement for class I MHC in CNS development and plasticity.** *Science*, 290, 2155-9.
- Im HI, Hollander JA, Bali P, Kenny PJ (2010) **MeCP2 controls BDNF expression and cocaine intake through homeostatic interactions with microRNA-212.** *Nat. Neurosci.* 13, 1120e1127.
- Impey S, Davare M, Lesiak A, Fortin D, Ando H, Varlamova O, Obrietan K, Soderling TR, Goodman RH, Wayman GA (2010) **An activity-induced micro RNA controls dendritic spine formation by regulating Rac1-PAK signaling.** *Mol Cell Neurosci*, 1:146-156.
- Jaenisch R, Bird A (2003) **Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals.** *Nat. Genet.* 33 (Suppl.), 245e254.
- Jenuwein T, Allis CD (2001) **Translating the histone code.** *Science* 293: 1074-1080.
- Kalashnikova AA, Winkler DD, McBryant SJ, Henderson RK, Herman JA, DeLuca JG, Luger K, Prenti JE, Hansen JC (2013) **Linker histone H1.0 interacts with an extensive network of proteins found in the nucleolus.** *Nucleic Acids Res*, 41(7):4026-35.
- Kaludov NK, Pabon-Pena L, Seavy M, et al (1997) **A mouse histone H1 variant, H1b, binds preferentially to a regulatory sequence within a mouse H3.2 replication-dependent histone gene.** *J Biol Chem* 272:15120–7.
- Karpova NN, Lindholm J, Pruunsild P, Timmusk T, Castrén E (2008) **Long-lasting behavioural and molecular alterations induced by early postnatal fluoxetine exposure are restored by chronic fluoxetine treatment in adult mice.** *Eur Neuropsychopharmacol.* 19(2):97-108.
- Katagiri H, Fagiolini M, Hensch TK (2007) **Optimization of somatic inhibition at critical period onset in mouse visual cortex.** *Neuron*, 53:805-812.
- Khare SP, Sharma A, Deodhar KK, Gupta S (2011) **Overexpression of histone variant H2A.1 and cellular transformation are related in N-nitrosodiethylamine-induced sequential hepatocarcinogenesis.** *Exp Biol Med* 236: 30–35.
- Khochbin S, Wolffe AP (1994) **Developmentally regulated expression of linker-histone variants in vertebrates.** *Eur J Biochem*, 225(2):501-510.
- Kiorpes L, Kiper D, Keefe L, Cavanaugh J, Movshon J (1998) **Neuronal correlates of amblyopia in the visual cortex of macaque monkeys with experimental strabismus and anisometropia.** *J Neurosci* 18:6411-6424
- Klann E, Dever TE (2004) **Biochemical mechanisms for translational regulation in synaptic plasticity.** *Nat Neurosci*, 5:931-942.
- Kleinow T, Holeiter G, Nischang M, Stein M, Karayavuz M, Wege C, Jeske H (2007). **Post-translational modifications of Abutilon mosaic virus movement protein (BC1) in fission yeast.** *Virus Research* 131: 86–94.
- Klose RJ, Zhang Y (2007). **Regulation of histone methylation by demethylimination and demethylation.** *Nat Rev Mol Cell Biol* 8(4):307–18.

- Konishi A, Shimizu S, Hirota J, et al (2003). **Involvement of histone H1.2 in apoptosis induced by DNA double-strand breaks.** *Cell* 114:673–88.
- Kusch T, Workman JL (2007). **Histone variants and complexes involved in their exchange.** *Subcell Biochem* 41:91-109.
- Lachance PR, Chaudhuri (2004) **Microarray analysis of developmental plasticity in monkey primary visual cortex.** *J Neurochem*, 88, 1455-69.
- Lad RP, Smith MA, Hilt DC (1991) **Molecular cloning and regional distribution of cyclophilin A.** *Mol Brain Res*, 9:239-244.
- LaPlant Q, Vialou V, Covington HE, Dumitriu D, Feng J, Warren B, Maze I, Dietz DM, Watts EL, Iñiguez SD, Koo JW, Mouzon E, Renthal W, Hollis F, Wang H, Noonan MA, Ren YH, Eisch AJ, Bolaños CA, Kabbaj M, Xiao GH, Neve RL, Hurd YL, Oosting RS, Fan GP, Morrison JH, Nestler EJ (2010) **Dnmt3a regulates emotional behavior and spine plasticity in the nucleus accumbens.** *Nat. Neurosci.* 13, 1137e1143.
- Leamey CA, Van Wart A, Sur M (2009) **Intrinsic patterning and experience-dependent mechanisms that generate eye-specific projections and binocular circuits in the visual pathway.** *Curr. Op. Neurobiol.* 19:181-187.
- Lee H, Habas R, Abate-Shen C (2004) **MSX1 cooperates with histone H1b for inhibition of transcription and myogenesis.** *Science* 304:1675–8.
- LeVay S, Wiesel TN, Hubel DH (1980) **The development of ocular dominance columns in normal and visually deprived monkeys.** *J Comp Neurol* 191:1–51.
- Levenson JM, Sweatt JD (2005) **Epigenetic mechanisms in memory formation.** *Nat. Rev. Neurosci* 6:108-118.
- Lin Y, Bloodgood BL, Hauser JL, Lapan AD, Koon AC, Kim TK, Hu LS, Malik AN, Greenberg ME (2008) Activity-dependent regulation of inhibitory synapse development by NPAS4. *Nature* 455(7217):1198-204.
- Loury R, Sassone-Corsi P (2003) **Histone phosphorylation: how to proceed.** *Methods* 31(1):40–8.
- Lu X, Hansen JC (2004) **Identification of specific functional subdomains within the linker histone H10 C-terminal domain.** *J Biol Chem* 279, 8701–8707.
- Luger K, Hansen JC (2005) **Nucleosome and chromatin fiber dynamics.** *Curr Opin Struct Biol* 15:188–96.
- Lyckman A, Horng S, Leamey CA; 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.
- Maffei L, Berardi N, Domenici L, Parisi V, Pizzorusso T (1992) **Nerve grow factor (NGF) prevents the shift in ocular dominance distribution of visual cortical neurons in monocularly deprived rats.** *J Neurosci*, 12(12):4651-62.

- Majdan M, Shatz C J (2006) **Effects of visual experience on activity-dependent gene regulation in cortex.** *Nat Neurosci*, 9, 650-9.
- Malberg JE; Eisch AJ, Nestler EJ, Duman RS (2000) **Chronic antidepressant treatment increases neurogenesis in adult rat hippocampus.** *J Neurosci*, 20, 9104-10.
- Marks WH, Harding MW, Handschumacher R, Marks C, Lorber MI (1991) **The immunocytochemical distribution of cyclophilin in normal mammalian tissues.** *Transplantation*, 52:340-345.
- Mataga N, Nagai N, Hensch TK (2002) **Permissive proteolytic activity for visual cortical plasticity.** *Proc Natl Acad Sci USA*, 99(11):7717-21.
- Maya Vetencourt J, Sale A, Viegi A, Baroncelli L, De Pasquale R, O'Leary O, Castrén E, Maffei L (2008) **The antidepressant Fluoxetine restores plasticity in the adult visual cortex.** *Science*, 320:385-388.
- Maya Vetencourt J, Caleo M, Maffei L (2009) **Frontiers in neural plasticity: can we treat amblyopia in adulthood?** *Opht Int Winter 2009*, 45-50.
- Maya Vetencourt, Tiraboschi E, Spolidoro M, Castrén E, Maffei L (2011) **Serotonin triggers a transient epigenetic mechanism that reinstates adult visual cortex plasticity in rats.** *Eur J Neurosci*, 33:49-57.
- Maya Vetencourt JF, Baroncelli L, Viegi A, Tiraboschi E, Castrén 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 JF, Origlia N (2012) **Visual cortex plasticity: a complex interplay of genetic and environmental influences.** *Neural Plast*, 2012, 631965.
- McBryant SJ, Lu X, Hansen JC (2010) **Multifunctionality of the linker histones: an emerging role for protein-protein interactions.** *Cell Res* 20, 519–528.
- McGee AW, Yang Y, Fischer QS, Daw NW; Strittmatter SM (2005) **Experience-Driven Plasticity of Visual Cortex Limited by Myelin and Nogo Receptor.** *Science*, 309, 2222-2226.
- Mellios N, Sugihara H, Castro J, Banerjee A, Le C, Kumar A, Crawford B, Strathmann J, Tropea D, Levine SS, Edbauer D, Sur M (2011) **miR-132, an experience-dependent microRNA, is essential for visual cortex plasticity.** *Nat Neurosci*, 14(10):1240-2.
- Michod D, Bertesaghi, Khelifi A, Bellodi C, Berliocchi L, Nicotera P, Salomoni P (2012) **Calcium-dependent dephosphorylation of the histone chaperone DAXX regulates H3.3 loading and transcription upon neuronal activation.** *Neuron* 74:122–135.
- Mittelman D (2003) **Amblyopia.** *Pediatr Clin North Am*, 50, 189-96.
- Morishita H, Hensch TK (2008) **Critical period revisited: impact on vision.** *Curr. Op. Neurobiol.* 18:101-107.
- Nathan D, Ingvarsdottir K, Sterner DE, Bylebyl GR, Dokmanovic M, Dorsey LA, et al (2006) **Histone sumoylation is a negative regulator in *Saccharomyces cerevisiae* and shows dynamic interplay with positive-acting histone modifications.** *Gene Dev* 20(8):966–76.
- Nestler EJ (2014) **Epigenetic mechanisms of drug addiction.** *Neuropharmacology*, 76:259-268.

- Nibuya M, Morinobu S, Duman RS (1995). **Regulation of BDNF and trkB mRNA in rat brain by chronic electroconvulsive seizure and antidepressant drug treatments.** *J Neurosci*, 15, 7539-47.
- Olson BJSC and 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.
- Panetta G, Buttinelli M, Flaus A, Richmond TJ, Rhodes D (1998) **Differential nucleosome positioning on *Xenopus* oocyte and somatic 5 S RNA genes determines both TFIID and H1 binding: a mechanism for selective H1 repression.** *J Mol Biol* 282: 683–697.
- Panyim S, Chalkley R (1971) **The molecular weights of vertebrate histones exploiting a modified sodium dodecyl sulfate electrophoretic method.** *J Biol Chem* 246, 7557–7560.
- Parseghian MH, Newcomb RL, Hamkalo BA (2001) **Distribution of somatic H1 subtypes is non-random on active vs. inactive chromatin II: distribution in human adult fibroblasts.** *J Cell Biochem* 83:643–59.
- Peters AH, Schubeler D (2005) **Methylation of histones: playing memory with DNA.** *Curr Opin Cell Biol* 17(2):230–8.
- Peterson CL, Laniel MA (2004) **Histones and histone modifications.** *Curr Biol* 14: R546-R551.
- Picariello G, De Martino A, Mamone G, Ferranti P, Addeo F, Faccia M, SpagnaMusso S, Di Luccia A (2006) **Proteomic study of muscle sarcoplasmic proteins using AUT-PAGE/SDS-PAGE as two-dimensional gel electrophoresis.** *J Chromatogr B*, 833: 101–108.
- Piña B, Suau P (1987) **Changes in histones H2A and H3 variant composition in differentiating and mature rat brain cortical neurons.** *Dev Biol* 123:51-58.
- Pizzorusso T, Medini P, Berardi n, Chierzi S, Fawcett JW, Maffei L (2002) **Reactivation of ocular dominance plasticity in the adult visual cortex.** *Science*, 298, 1248-51.
- Pizzorusso T, Medini P, Landi S, Baldini S, Berardi N, Maffei L (2006) **Structural and functional recovery from early monocular deprivation in adult rats.** *Proc Natl Acad Sci USA*, 103(22):8517-22.
- Prasad SS, Kojic LZ; Mitchell DE, Hachisuka A, Sawada J, Gu Q, Cynader M (2002) **Gene expression patterns during enhanced periods of visual cortex plasticity.** *Neuroscience*, 111, 35-45.
- Prusky GT, Douglas RM (2003) **Developmental plasticity of mouse visual acuity.** *European Journal of Neuroscience*, 17, 167-173.
- Purves D, Augustine GJ, Fitzpatrick D, Hall WC; Lamantia AS, McNamara JO, Williams SM (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* 1:747-759.
- Ramakrishnan V, Finch J, Graziano V, Lee P, Sweet R (1993) **Crystal structure of globular domain of histone H5 and its implications for nucleosome binding.** *Nature*, 362: 219–223.
- Rantamaki T, Hendolin P, Kankaanpaa A, Mijatovic J, Piepponen P, Domenici E, Chao MV, Mannisto PT, Castrén 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.
- Ruiz-Perera L, Muniz M, Vierci G, Bornia N, Baroncelli L, Sale A, Rossi FM (2015) **Fluoxetine increases plasticity and modulates the proteomic profile in the adult mouse visual cortex.** *SciRep*, 5, 12517
- Ryffel B, Woerly G, Greiner B, Haendler B, Mitasch MJ, Foxwell BM (1991) **Distribution of the cyclosporine binding protein cyclophilin in human tissues.** *Immunology*, 72:399-404.
- Sale A, Maya Vetencourt JF, Medini P, Cenni MC, Baroncelli L, De Pasquale R, Maffei L (2007) **Environmental enrichment in adulthood promotes amblyopia recovery through a reduction of intracortical inhibition.** *Nat Neurosci* 10:679-681.
- Sale, A., Berardi, N., and Maffei, L (2009) **Enrich the environment to empower the brain.** *Trends Neurosci*, 32: 233–239.
- Sale A, Berardi N, Spolidoro M, Baroncelli L, Maffei L (2010) **GABAergic inhibition in visual cortical plasticity.** *Front. Cell. Neurosci*, 30(1):361-371.
- Santoro SW, Dulac C (2012) **The activity-dependent histone variant H2BE modulates the life span of olfactory neurons.** *Elife* 1, e00070.
- Sazanov L A, Peak-Chew SY, Fearnley I M, and Walker JE (2000) **Resolution of the membrane domain of bovine complex I into subcomplexes: Implications for the structural organization of the enzyme.** *Biochemistry* 39, 7229–7235.
- Schratt GM, Tuebing F, Nigh EA et al (2006) **A brain specific microRNA regulates dendritic spine development.** *Nature*, 439:283–289
- Sera T, Wolffe AP (1998) **Role of histone H1 as an architectural determinant of chromatin structure and as a specific repressor of transcription on Xenopus oocyte 5S rRNA genes.** *Mol. Cell Biol*, 18:3668–3680.
- Sernagor, E., Chabrol, F., Bony, G. & Cancedda, L (2010) **GABAergic control of neurite outgrowth and remodeling during development and adult neurogenesis: general rules and differences in diverse systems.** *Front Cell Neurosci*, 4: 11.
- Shatz CJ (2009) **MHC class I: an unexpected role in neuronal plasticity.** *Neuron*, 64, 40-5.

- Shatz CJ, Stryker MP (1978) **Ocular dominance in layer IV of the cat's visual cortex and the effects of monocular deprivation.** *J Physiol*, 281, 267-83.
- Shechter D, Dormann HL, Allis CD, Hake SB (2007) **Extraction, purification and analysis of histones.** *Nat Protoc*, 2(6):1445-57
- Shen X, Gorovsky MA (1996) **Linker histone H1 regulates specific gene expression but not global transcription *in vivo*.** *Cell*, 86: 475–483.
- Shiio Y, Eisenman RN (2003) **Histone sumoylation is associated with transcriptional repression.** *Proc Natl Acad Sci USA* 100(23):13225–30.
- Shilatifard A (2006) **Chromatin modifications by methylation and ubiquitination: implications in the regulation of gene expression.** *Annu Rev Biochem* 75:243–69.
- Silingardi D, Scali M, Belluomini G, Pizzorusso T (2010) **Epigenetic treatments of adult rats promotes recovery from visual acuity deficits induced by long-term monocular deprivation.** *Eur J Neurosci*, 31:2185-2192.
- Strahl BD, Allis CD (2000) **The language of covalent histone modifications.** *Nature*, 403: 41-45.
- Su X, Zhang L, Lucas DM, Davis ME, Knapp AR, Green-Church KB, Marcucci G, Parthun MR, Byrd JC, Freitas MA (2007) **Histone H4 Acetylation Dynamics Determined by Stable Isotope Labeling with Amino Acids in Cell Culture and Mass Spectrometry.** *Anal Biochem* 363(1): 22–34.
- Sugiyama S, Di Nardo AA, Aizawa S et al (2008) **Experience-dependent transfer of Otx2 homeoprotein into the visual cortex activates postnatal plasticity.** *Cell* 134:508-520.
- Svitkina TM, Borisy GG (1999) **Arp2/3 complex and actin depolymerizing factor/cofilin in dendritic organization and treadmilling of actin filament array in lamellipodia.** *J Cell Biol*, 145(5):1009-1026.
- Syken J, Grandpre T, Kanold PO, Shatz CJ (2006) **PirB restricts ocular-dominance plasticity in visual cortex.** *Science*, 313, 1795-800.
- Terme JM, Sesé B, Millán-Ariño L, Mayor R, Izpisúa Belmonte JC, Barrero MJ, Jordan A (2011) **HistoneH1 variants are differentially expressed and incorporated into chromatin during differentiation and reprogramming to pluripotency.** *J Biol Chem*, 286(41):35347-57.
- Th'ng JP, Sung R, Ye M, et al. (2005) **H1 family histones in the nucleus. Control of binding and localization by the C-terminal domain.** *J Biol Chem* ;280:27809–14.
- Thomas J (1999) **Histone H1: location and role.** *Curr. Opin. Cell Biol*, 11: 312–317.
- Tiraboschi E, Guirado R, Greco D, Auvinen P, Maya-Vetencourt JF, Maffei L, Castrén E (2013) **Gene expression patterns underlying the reinstatement of plasticity in the adult visual system.** *Neural Plast*, 605079.
- Tognini P, Putignano E, Coatti A, Pizzorusso T (2011) **Experience-dependent expression of miR-132 regulates ocular dominance plasticity.** *Nat Neurosci*, 14(10):1237-9.

- 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: 660–668.
- Tropea D, Van Wart A, Sur M (2009) **Molecular mechanisms of experience-dependent plasticity in visual cortex.** *Phil Trans R Soc B*, 1-12.
- Tsubota T, Okubo-Suzuld R, Ohashi Y, Tamura K, Ogata K, Yaguchi M, Matsuyama M, Inokuchi K, Miyashita Y (2015) **Cofilin 1 controls transcolumar plasticity in dendritic spines in adult barrel cortex.** *PLoS Biol*, 13(2):e1002070.
- Turner BM (2000) **Histone acetylation and an epigenetic code.** *Bioessays* 22: 836-845.
- Tweedie-Cullen RY, Reck JM, Mansuy IM (2009) **Comprehensive Mapping of Post-Translational Modifications on Synaptic, Nuclear, and Histone Proteins in the Adult Mouse Brain.** *J Prot Res* 8:4966–4982
- van Holde K (1988) **Chromatin.** *New York, Springer-Verlag.*
- Vo N, Klein ME, Varlamova C, Keller DM, Yamamoto T, Goodman RH, Impey S (2005) **A cAMP-response element binding protein-induced microRNA regulates neuronal morphogenesis.** *Proc Natl Acad Sci USA*, 102(45):16426-31.
- Wayman GA, Davare M, Ando H, Fortin D, Varlamova O, Cheng HY, Marks D, Obrietan K, Soderling TR, Goodman RH, Impey S (2008) **An activity-regulated microRNA controls dendritic plasticity by down-regulating p250GAP.** *Proc Natl Acad Sci USA*, 105(26):9093-9098.
- Weaver N, Cervoni FA, Champagne, et al (2004) **Epigenetic programming by maternal behavior.** *Nat Neurosci*, 7: 847-854.
- Weiss W, Weiland F, Görg, A (2009). **Protein detection and quantitation technologies for gel-based proteome analysis**, in J. Reinders & A. Sickmann, eds, 'Proteomics', Vol. 564 of *Methods in Molecular Biology*, Humana Press, pp. 59–82.
- Wiesel TN, Hubel DH (1963) **Single-cell responses in striate cortex of kittens deprived of vision in one eye.** *J Neurophysiol*, 26:1003-1017.
- Wiesel TN, Hubel DH (1965) **Comparison of the effects of unilateral and bilateral eye closure on cortical unit responses in kittens.** *J Neurophysiol*, 28:1029-1040.
- Wu C, Hunter DG (2006) **Amblyopia: diagnostic and therapeutic options.** *Am J Ophthalmol*, 141:175-184.
- Yang C, Silver B, Ellis SR, Mower GD (2001) **Bidirectional Regulation of Mitochondrial Gene Expression during Developmental Neuroplasticity of Visual Cortex.** *Biochem Biophys Res Commun*, 287(5):1070-4.
- Yiu G, He Z (2006) **Glial inhibition of CNS axon regeneration.** *Nat Rev Neurosci*, 7:617-627.
- Zhang K, Joseph S, Siino JS, 3, Patrick R, Jones PR, Peter M, Yau PM, Morton Bradbury E (2004) **A mass spectrometric “Western blot” to evaluate the correlations between histone methylation and histone acetylation.** *Proteomics* 4:3765–3775.
- Zovkic IB, Paulukaitis BS, Day JJ, Etikala DM, Sweatt JD (2014) **Histone H2A.Z subunit exchange controls consolidation of recent and remote memory.** *Nature*, 515: 582-586

- Zweidler A (1978) **Resolution of histones by polyacrilamide gel electrophoresis in presence of nonionic detergents.** *Methods Cell Biol*, 17:223-233.