



CONICET



UNC  
Universidad  
Nacional  
de Córdoba



**FCQ**

Facultad de  
Ciencias Químicas

C I Q U I B I C

Universidad Nacional de Córdoba (UNC)

Facultad de Ciencias Químicas- Departamento de Química Biológica "Ranwel Caputto"

Centro de Investigaciones en Química Biológica de Córdoba

(CIQUIBIC, CONICET-UNC)

---

**TESIS DE DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS**

---

**Caracterización de la plasticidad estructural pre-sináptica del circuito hipocampal: fibras musgosas (mossy fibers)-CA3, en un modelo murino de Síndrome de Rett.**

**Biól. María Laura Bertoldi**

**Directora de Tesis: Dra. Alicia L. Degano**

Córdoba, 11 de Diciembre de 2017

---

---

---

Comisión de Tesis: Dra. Alicia L. Degano (Directora)

Dr. German A. Roth

Dra. Andrea Rópolo

Dr. Víctor A. Molina

Tribunal Evaluador: Dr. German A. Roth

Dra. Andrea Rópolo

Dr. Víctor A. Molina

Dra. Diana Jerusalinsky (Evaluadora Externa)

---

*A mis padres, Patricia y Ricardo,  
a mis hermanas, Florencia, Constanza y Luisina,  
a mi compañero de vida, Tomás y a mi bebé Martín,  
por ser mi sostén todos los días y darme las fuerzas, amor y  
confianza que necesito para dar cada paso importante en mi vida.*

---

# AGRADECIMIENTOS

---

En primer lugar quiero agradecer de manera especial y sincera a la Dra. Alicia Degano por aceptarme para realizar esta tesis doctoral bajo su dirección. Su guía, su apoyo y confianza en mi trabajo han sido un aporte invaluable, no solamente en el desarrollo de esta tesis, sino también en mi crecimiento personal. Gracias Alicia por tu orientación, consejos, aliento y cariño, que sin dudas han sido una contribución clave del buen y grato trabajo que hemos realizado juntas a lo largo de todos estos años. Y por último y especialmente, por la maravillosa persona y gran amiga que siempre has sido conmigo, de corazón, muchísimas gracias Ali.

En segundo lugar deseo agradecer por formarme como profesional a la Universidad Nacional de Córdoba, de la que siento mucho orgullo y privilegio de formar parte. Principalmente, agradezco al Departamento de Química Biológica “Ranwel Caputto” de la Facultad de Ciencias Químicas y al CIQUIBIC (CONICET) por abrirme sus puertas para mi formación doctoral, y muy especialmente a todos sus integrantes, siempre dispuestos a brindar su ayuda y colaboración tanto en lo material como en lo intelectual.

A la Dra. Andrea Rópolo y al Dr. Víctor Molina por haber seguido el desarrollo de esta tesis y por los importantes aportes que realizaron a la misma. A la Dra. Diana Jerusalinsky por aceptar evaluar este trabajo y viajar a Córdoba para presenciar su defensa. Especialmente quiero agradecerles a todos ellos por la dedicación y rigurosidad con que analizaron el manuscrito.

Al Dr. Germán Roth por sus valiosos aportes, consejos y colaboración a lo largo de toda la tesis, y por generar en el laboratorio un clima ameno de trabajo donde, además de las tareas diarias, hemos compartido largas y entretenidas charlas de los más variados tópicos.

A las Dras. Gabriele V. Ronnett y Susan Aja del Departamento de Neurociencias, Escuela de Medicina, Johns Hopkins Medical Institute en Baltimore, USA. Gracias por darme la oportunidad de trabajar y aprender en una institución de primer nivel y vivir una experiencia inolvidable y sumamente enriquecedora tanto en lo profesional como en lo personal.

A mis compañeros de laboratorio que ya han emprendido distintos caminos fuera del Departamento, Nico, Mario y Natalí, y a los “adoptados” de laboratorios vecinos, Hernán y Juancito, gracias a todos ellos por su apoyo desinteresado y por el gran cariño y amistad que me brindaron desde el primer momento. A las que aún están, Inés, Caro y Clarita, es un gran placer compartir el día a día con ustedes, gracias enormes por su invaluable aporte a esta tesis y principalmente por las hermosas charlas y juntadas compartidas en las que descubrí personas con grandes valores, siempre dispuestas a escuchar y brindar los mejores consejos, aliento y ayuda. Y un especial agradecimiento a dos grandes amigas que me dio este

doctorado, Luci y Nati, por su amistad y apoyo tan preciados para mí y siempre presentes a pesar de los años.

A toda la gente de los demás laboratorios con quienes no faltó nunca la buena onda y el compañerismo, en especial a Fabi, Juli, Dani, Mari, Álvaro, Ceci, Sabri y Mauge, hermosas personas que tuve la suerte de conocer y con quienes compartí interesantes y muy divertidos momentos.

Un agradecimiento especial a los técnicos del CIQUIBIC por su tan valiosa tarea que sin dudas ha significado un gran aporte al desarrollo de esta tesis. Quiero agradecer principalmente a las chicas del bioterio, Laura, Rosa y Gime, por su trabajo diario en el cuidado de los animales y sobre todo por la hermosa amistad que me han brindado a lo largo de todos estos años, en los que sobraron divertidos encuentros, buenos consejos y oídos dispuestos a escuchar. A Dani Bussolino y a los técnicos de microscopía, Ceci, Carlitos y Pili, por estar constantemente dispuestos a brindar su ayuda y conocimientos, siempre con las mejores intenciones y buena onda.

A mis amigas ya de la vida, Dani, Ana, Jime, Ceci y Chechu, por su apoyo incondicional, en las buenas y en las malas, a pesar de que con algunas de ellas nos separan miles de kilómetros. Su amistad es para mí un tesoro muy preciado y un motor fundamental para llegar hasta aquí y continuar creciendo en todos los aspectos de mi vida.

A mis padres, Patricia y Ricardo, a quienes les debo un eterno agradecimiento y mi retribución total por su incondicional amor manifestado de mil maneras. Agradezco y les dedico esta tesis a ellos, porque siempre creyeron en mí, me brindaron todas las herramientas y valores para que hoy llegue a donde estoy, y estuvieron siempre firmes al pie del cañón apoyándome tanto en los momentos difíciles como así también en cada aventura que decidí emprender a lo largo de mi vida. A mis hermanas, Flor, Conti y Luchi, compañeras incondicionales de quienes me siento muy orgullosa y afortunada de tener. A todos ustedes gracias, infinitas gracias familia querida, los amo muchísimo.

Por último, dedico especialmente esta tesis a mi compañero y mejor amigo, Tomás, por hacer de mí una mejor persona contagiándome su alegría, optimismo, generosidad y su gran bondad. Por nunca dejar de alentarme y creer en mí, fundamentalmente en los momentos en los que yo dejaba de hacerlo. No encuentro palabras para expresar la dicha, felicidad y orgullo que siento por el camino que estamos recorriendo juntos y en el que hoy nos hallamos formando una hermosa familia. Te amo con todo mi corazón y espero poder devolverte al menos una parte de toda la plenitud que le das a mi vida.

---

# ÍNDICE

<b>RESUMEN</b>	<b>- 4 -</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>- 5 -</b>
<b>ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS</b>	<b>- 6 -</b>
<b>INTRODUCCIÓN</b>	<b>- 9 -</b>
<b>SÍNDROME DE RETT</b>	<b>- 10 -</b>
CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS	- 10 -
ETIOLOGÍA	- 11 -
<b>MECP2</b>	<b>- 12 -</b>
GEN MECP2	- 12 -
PROTEÍNA MeCP2	- 13 -
Características de MeCP2	- 14 -
Expresión de MeCP2	- 15 -
Funciones de MeCP2 a nivel molecular	- 15 -
Modificaciones post-traduccionales de MeCP2	- 16 -
MODELOS MURINOS DE MECP2	- 18 -
PAPEL DE MECP2 EN EL DESARROLLO Y MANTENIMIENTO DE LOS CIRCUITOS NEURONALES.	- 21 -
<b>ROL DE MeCP2 EN EVENTOS DE GUIADO AXONAL</b>	<b>- 23 -</b>
<b>HIPOCAMPO</b>	<b>- 24 -</b>
ESTRUCTURA Y FUNCIÓN.	- 24 -
CIRCUITO: FIBRAS MUSGOSAS (MOSSY FIBERS)-CA3. Tracto infrapiramidal (TIP)	- 27 -
PRUNING ESTEREOTIPADO DEL TIP HIPOCAMPAL	- 28 -
Significado funcional del pruning del TIP	- 30 -
Mecanismo molecular del pruning del TIP: Rol clave de SEMAFORINAS	- 31 -
PLASTICIDAD PRE-SINÁPTICA ESTRUCTURAL EN HIPOCAMPO ADULTO	- 33 -
Cambios dinámicos en el tamaño del TIP	- 35 -
Neurogénesis hipocampal adulta	- 36 -
<b>HIPÓTESIS Y OBJETIVOS</b>	<b>- 40 -</b>
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>- 43 -</b>
<b>MATERIALES</b>	<b>- 44 -</b>
REACTIVOS DE BIOLOGÍA MOLECULAR	- 44 -
MODELOS ANIMALES	- 44 -
LABERINTO DE BARNES	- 45 -
ANTICUERPOS.	- 47 -
<b>MÉTODOS</b>	<b>- 48 -</b>
GENOTIPIFICACIÓN DE LOS ANIMALES	- 48 -
INDUCCIÓN DE ACTIVIDAD NEURONAL	- 50 -
ADMINISTRACIÓN DE BrdU	- 51 -
PERFUSIÓN DE LOS ANIMALES	- 52 -

---

PREPARACIÓN DE CRIOSECCIONES _____	- 53 -
INMUNOHISTOQUÍMICA (IHQ) _____	- 53 -
IHQ enzimática (Peroxidasa) utilizando el cromógeno DAB _____	- 53 -
Inmunofluorescencia _____	- 54 -
BrdU- Inmunohistoquímica _____	- 54 -
MEDICIÓN DEL PRUNING O REFINAMIENTO DEL TRACTO INFRAPIDAMIDAL (TIP) _____	- 55 -
MEDICIÓN DE CAMBIOS EN EL VOLUMEN DEL TIP EN RESPUESTA A ACTIVIDAD NEURONAL _____	- 56 -
ANÁLISIS DE PROLIFERACIÓN DE NUEVAS NEURONAS GRANULARES DE GD PRODUCTO DE NEUROGÉNESIS _____	- 57 -
ANÁLISIS DE MADURACIÓN DE NUEVAS NEURONAS GRANULARES DE GD PRODUCTO DE NEUROGÉNESIS _____	- 57 -
PCR EN TIEMPO REAL LUEGO DE TRANSCRIPCIÓN REVERSA (REAL TIME RT-PCR) _____	- 58 -
TEST DE LABERINTO DE BARNES _____	- 60 -
ANÁLISIS ESTADÍSTICO _____	- 61 -
<b>RESULTADOS _____</b>	<b>- 63 -</b>
<b>PARTE I: REFINAMIENTO DE MOSSY FIBERS DURANTE EL DESARROLLO POSNATAL EN HIPOCAMPO DE RATONES MUTANTES PARA MeCP2. _____</b>	<b>- 64 -</b>
RATONES MUTANTES PARA MECP2 PRESENTAN UN RETRASO EN EL PROCESO DE REFINAMIENTO AXONAL (PRUNING ESTEREOTIPADO) DEL TIP. _____	- 64 -
ANIMALES MUTANTES PARA MECP2 MUESTRAN ALTERACIONES DINÁMICAS EN LA EXPRESIÓN DE MOLÉCULAS DE GUIADO _____	- 66 -
CONCLUSIONES _____	- 70 -
<b>PARTE II: CARACTERIZACIÓN DEL ROL DE MeCP2 EN EVENTOS DE PLASTICIDAD ESTRUCTURAL PRE-SINÁPTICA EN HIPOCAMPO ADULTO. _____</b>	<b>- 72 -</b>
LA RESPUESTA DINÁMICA DE MOSSY FIBERS A LA ACTIVIDAD NEURONAL SE ENCUENTRA AFECTADA ANTE MUTACIONES EN MeCP2. _____	- 72 -
LA NEUROGÉNESIS EN GD DE HIPOCAMPO ADULTO NO SE VE AFECTADA ANTE MUTACIONES EN MeCP2. _____	- 77 -
RATONES MUTANTES PARA MECP2 MUESTRAN ALTERACIONES EN LA EXPRESIÓN DE MOLÉCULAS DE GUIADO INDUCIDA POR ACTIVIDAD NEURONAL. _____	- 82 -
LA EXPRESIÓN DE BDNF INDUCIDA POR ACTIVIDAD NEURONAL ES DEFICIENTE EN RATONES MUTANTES PARA MECP2. _____	- 85 -
ALTERACIONES EN LA MADURACIÓN DE NUEVAS NEURONAS GRANULARES PRODUCTO DE NEUROGÉNESIS ADULTA ANTE MUTACIONES EN MeCP2. _____	- 89 -
DEFECTOS EN LA MEMORIA ESPACIAL EVALUADA MEDIANTE EL TEST DE LABERINTO DE BARNES ANTE MUTACIONES EN MeCP2. _____	- 92 -
Aprendizaje _____	- 93 -
Memoria _____	- 94 -
CONCLUSIONES _____	- 97 -



---

<i>DISCUSIÓN</i>	- 98 -
DEFECTOS EN MECP2 ALTERAN EL ESTABLECIMIENTO DE CONEXIONES NEURONALES AFECTANDO PROCESOS QUE INVOLUCRAN A COMPONENTES PRE-SINÁPTICOS.	- 99 -
PLASTICIDAD ESTRUCTURAL PRESINÁPTICA Y SU CORRELACIÓN CON DEFICITS EN MEMORIA ESPACIAL EN UN MODELO MUTANTE DE MECP2.	- 102 -
CONCLUSIONES FINALES	- 109 -
<i>BIBLIOGRAFÍA</i>	- 111 -

---

# RESUMEN

El síndrome de Rett (RTT) es una enfermedad del neurodesarrollo que forma parte del grupo de trastornos del espectro autista (TEA). En 1999 se describió que la principal causa del RTT consiste en mutaciones en la proteína unidora de metil-CpG 2 (MeCP2). Esta proteína es un miembro de la familia de proteínas unidoras de metil-CpG que se unen a promotores de genes y regulan su expresión. Si bien RTT es uno de los pocos TEA del cual se sabe la causa, poco se conoce acerca de los defectos que ocurren durante el neurodesarrollo como consecuencias de mutaciones en MeCP2.

El objetivo general de este trabajo fue definir mecanismos moleculares por los cuales la falta de MeCP2 genera alteraciones en la conectividad neural durante el desarrollo, a fin de entender las bases de la patología neuronal que caracteriza a los TEA. Para ello, utilizamos modelos animales deficientes en MeCP2, paradigmas de actividad *in vivo*, técnicas biológicas y moleculares y estudios comportamentales para caracterizar el efecto inducido por la ausencia de MeCP2 funcional sobre la formación del circuito “mossy fibers-CA3” en hipocampo; identificar qué moléculas claves en la conectividad neural son afectadas en ausencia de MeCP2 y establecer relaciones causales entre las alteraciones estructurales/funcionales en hipocampo y alteraciones cognitivas presentes en ratones mutantes para MeCP2.

Nuestros resultados mostraron que en ausencia de MeCP2 ocurre un retraso en el “pruning” o refinamiento de mossy fibers durante el desarrollo postnatal temprano (días P20-30), que fue acompañado de alteraciones en la expresión de moléculas de guiado axonal de la familia de Semaforinas clase 3 en hipocampo de animales carentes de MeCP2.

Por otra parte, en animales adultos se logró demostrar que la falta de MeCP2 interfiere con procesos de plasticidad estructural dependientes de actividad sináptica en hipocampo, afectando la maduración de neuronas nuevas generadas en adultos y la señalización de BDNF. Asimismo, mostramos que estos defectos de plasticidad observados correlacionan con fallas en un test de aprendizaje espacial (laberinto de Barnes). Estos estudios sientan las bases para establecer un modelo que nos permita evaluar el efecto de la manipulación de vías específicas involucradas en guiado axonal, sinaptogénesis, maduración en un circuito específico y correlacionarlo con cambios en el comportamiento.

Entender los mecanismos que subyacen al compromiso neuronal causado por mutaciones en MeCP2 proporcionará información sobre el mecanismo patogénico de los TEA y mejorará nuestra comprensión acerca del desarrollo del cerebro y de las bases moleculares del comportamiento.

---

---

# ABSTRACT

Methyl Cytosine Binding Protein 2 (MeCP2) is a structural chromosomal protein involved in the regulation of gene expression. Mutations in the gene encoding MeCP2 result in Rett Syndrome, a pervasive neurodevelopmental disorder. RTT is one of few Autism Spectrum Disorders (ASDs) whose cause was identified as a single gene mutation. Remarkably, abnormal levels of Mecp2 have been associated to other neurodevelopmental disorders, as well as neuropsychiatric disorders. Therefore, most of the studies have been oriented to investigate the role of MeCP2 in the nervous system.

The main objective of this work was to define molecular mechanisms by which the lack of Mecp2 generates alterations in neural connectivity during development, in order to understand the bases of the neuronal pathology that characterizes ASD. We used animal models of Mecp2 deficiency, paradigms of *in vivo* activity, biological and molecular techniques as well as behavioral studies in order to study the following specific aims:

1- To characterize the effect induced by the absence of Mecp2 on the formation of the "mossy fibers-CA3" circuit in the hippocampus; 2-To identify which molecules involved in neural connectivity are affected in the absence of Mecp2 and 3- To establish causal relationships between structural / functional alterations in hippocampus and cognitive alterations present in Mecp2 mutant mice.

Our results showed that in the absence of MeCP2 there was a delay in the pruning of mossy fibers during early postnatal development (20-30 days); this defect was accompanied by alterations in the expression of guidance molecules of the Class 3 Semaphorin family in the hippocampus of MeCP2 mutant mice.

On the other hand, in adult animals we showed that the lack of MeCP2 interferes with activity-dependent structural presynaptic plasticity in the hippocampus, affecting the maturation of adult born neurons and BDNF and Sema3F signaling. Likewise, we show that these plasticity defects correlate with a reduced performance in a spatial learning test (Barnes Maze). These studies lay the foundations to establish a model that allows us to evaluate the effect of the manipulation of specific pathways involved in axonal guidance, synaptogenesis or maturation in a specific circuit and correlate it with changes in behavior.

Understanding the mechanisms underlying the neuronal compromise caused by mutations in MeCP2 will provide information on the pathogenic mechanism of autistic spectrum disorders and improve our understanding of brain development and the molecular basis of behavior.

---

---

# ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

---

AK	Ácido AKínico
BDNF	Factor neurotrófico derivado del cerebro
BrdU	5-bromo-2-desoxiuridina
CA	Cornu ammonis
cADN	ADN copia
CPNs	Células precursoras neuronales
CTD	Dominio C-terminal
DAB	3,3'-tetrahidrocloruro de diaminobencidina
DCX	Doblecortina
dNTPs	Desoxirribonucleótidos trifosfato
GABA	Ácido $\gamma$ -aminobutírico
GD	Giro dentado
GFAP	Proteína ácida fibrilar glial
HDACs	Histonas deacetilasas
Hi	Hilus
ICX	Inactivación del cromosoma X
ID	Interdominio
IHQ	Inmunohistoquímica
ip	Intraperitoneal
KO	Knockout
MBD	Dominio de unión a CpG metilados
MECP2	Gen de la proteína de unión a metil- citosina-guanosina
MeCP2	Proteína de unión a metil-citosina- guanosina 2
MF	“Mossy fibers” o fibras musgosas
MPTs	Modificaciones post-traduccionales
MUT	Mutante
NeuN	Proteína nuclear neuronal
Npn-2	Neuropilin-2
NTD	Dominio N-terminal
pb	Pares de bases
PBS	Solución tampón de fosfato salino
PFA	Paraformaldehído
PlxA3	Plexina A3
pTrkB	“Tropomyosin-related kinase B receptor”
RTT	Síndrome de Rett
Sema 3F	Semaforina 3F
SFB	Suero fetal bovino

SGZ	Zona subgranular del giro dentado
SNC	Sistema nervioso central
SVZ	Zona subventricular de los ventrículos laterales
TEA	Trastornos del Espectro Autista
TIP	Tracto infrapiramidal
TRD	Dominio de represión transcripcional
TrkB	Receptor Tirosina Kinasa B
Tuj1	Anticuerpo anti-tubulina $\beta$ -III específico de neuronas
VGlut	Transportador vesicular de Glutamato
WT	Cepa salvaje (wild type)

---

# INTRODUCCIÓN

---

## SÍNDROME DE RETT

El Síndrome de Rett (RTT, OMIM #312750) es una enfermedad dominante ligada al sexo, manifestada como un desorden severo del neurodesarrollo vinculado al cromosoma X. Afecta principalmente a niñas de todas las razas y grupos étnicos, teniendo una incidencia de 1 cada 10000 a 15000 nacimientos. Esta patología fue descrita por primera vez por el Dr. Andreas Rett en 1966, sin embargo recién en 1983 se volvió ampliamente reconocida gracias a los reportes en la literatura inglesa realizado por Bengt Hagberg y colegas, quienes atribuyeron el nombre de Rett a dicha condición (1). RTT constituye una de las causas conocidas más frecuentes de retraso mental grave en el sexo femenino y de manera excepcional en el masculino (2).

### CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS

Las niñas con RTT clásico suelen tener un período relativamente normal de desarrollo durante los primeros 6 meses de vida seguido de retardo variable (incluso estancamiento) y posteriormente una regresión que se caracteriza por una pérdida gradual o repentina de las habilidades adquiridas durante el desarrollo después del primer año de vida que conduce a la aparición de déficits cognitivos y motores profundos (1).

El periodo de regresión particularmente involucra la pérdida de habilidades lingüísticas expresivas y del movimiento intencionado de las manos (uno de los elementos más característicos de la enfermedad), pero puede extenderse a las habilidades motoras gruesas y de socialización (3). Es típico durante este período regresivo cuando algunas niñas pueden cumplir los criterios de diagnóstico para el trastorno del espectro autista (ASD, por del inglés: "autism spectrum disorder"). A pesar del hecho de que el RTT no ha sido clasificado como ASD en la última edición (5ta) del Manual de Diagnóstico y Estadística de Desórdenes Mentales (2013) (*Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders*), un individuo con RTT también puede recibir un diagnóstico de ASD si cumple con los criterios de comportamiento (4,5).

La pérdida de habilidades en el tiempo es variable entre los casos de RTT, sin embargo normalmente se estabiliza entre los 30-36 meses de vida (3). En una gran proporción de individuos puede haber una pérdida adicional de habilidades motoras en la adolescencia tardía o edad adulta temprana, cuando las características parkinsonianas se hacen prominentes (6).

Entre otras de las características distintivas de RTT se destaca un descenso paulatino en el crecimiento del perímetro craneal, lo que conduce a microcefalia en el 80% de los pacientes con Rett. Esta característica puede aparecer precozmente en los tres primeros meses de vida, aunque frecuentemente se observa entre los 6 y 24 meses de edad (2,7).



Durante el periodo de post-regresión, entre el primer y tercer año de vida, en la mayoría de las niñas con RTT aparece el signo de identidad de este síndrome: los movimientos estereotipados de las manos, característicamente de lavado, torcedura (manos juntas), pero también de palmoteo o de aplausos (manos separadas). Las niñas con RTT pueden recuperar parcialmente algunas de las habilidades perdidas durante el periodo de regresión; sin embargo, la pérdida significativa de habilidades verbales y del uso intencionado de las manos sigue siendo un sello distintivo del trastorno (2). Pueden aparecer otras estereotipias y “pseudocrisis” (temblores, caídas bruscas, detención del movimiento, episodios de risa o gritos inmotivados). La marcha suele ser normal al inicio pero se va volviendo apráxica, amplia, errática y no propositiva (2). Aproximadamente un tercio de los pacientes deja de caminar, alrededor del 50% mantienen la marcha independiente y otro 20% camina con algún nivel de asistencia (8).

Convulsiones que evolucionan hacia la epilepsia se desarrollan en el 60-80% de los pacientes con RTT, típicamente entre el final del período de regresión y el comienzo del periodo de post-regresión. A pesar del gran impacto que significan las convulsiones en la calidad de vida de los paciente con RTT, aún hoy es relativamente poco lo que se conoce sobre la eficiencia de drogas antiepilépticas (7).

Alteraciones respiratorias, cardíacas, nutricionales y un retaso general del crecimiento también están presentes y requieren un estrecho seguimiento y fuerte apoyo a lo largo de toda la vida de las pacientes ya que se asocian con las causas de mortalidad más comunes en las pacientes de RTT que alcanzan la edad adulta (9).

También los problemas ortopédicos son comunes, con escoliosis que ocurre en aproximadamente el 85% de las niñas afectadas y que requieren una estabilización quirúrgica en el 13% de los casos. Existe además una alta prevalencia en otros problemas relacionados con la salud ósea y muscular de los pacientes: aumento del riesgo de osteoporosis, fracturas y aumento del tono muscular (incluyendo distonía y contracturas en múltiples articulaciones). El desarrollo de rigidez a lo largo del tiempo, junto con otras características parkinsonianas, complican aún más las últimas etapas de la evolución en RTT (2,6,7).

Estimaciones recientes acerca de la longevidad de las pacientes con RTT clásico indican que la supervivencia hasta la edad de 25 años es del 77,6% y hasta los 37 años del 59,8% (10).

## ETIOLOGÍA

La causa principal de RTT en aproximadamente el 90% de los pacientes son mutaciones en el gen MECP2, situado en la región distal del cromosoma X (Xq28). Dicho gen codifica para una proteína llamada *MeCP2* (*proteína de unión a metil-citosina-*

*guanosina 2 o methyl-CpG-binding protein 2*) la cual se une al ADN y tiene la función principal de regular la expresión génica (10,11).

Hasta el momento, se han identificado más de 250 mutaciones diferentes en MeCP2 en individuos con RTT. Sin embargo, 8 mutaciones puntuales comunes (R106W, R133C, T158M, R168X, R255X, R270X, R294X, R306C) representan aproximadamente el 65% de las mutaciones presentes en estos pacientes, mientras que las deleciones grandes que implican uno o más exones y supresiones 3' representan otro 15-18% de los individuos RTT (12).

Cabe aclarar que no siempre existe una clara correlación entre mutaciones específicas en MECP2 y trastornos individuales o gravedad fenotípica, lo que sugiere que factores genéticos, epigenéticos y/o ambientales interactúan con la mutación en MECP2 para determinar el resultado fenotípico final en términos de tipo y gravedad del trastorno (13).

En la mayoría de los casos registrados, las mutaciones son espontáneas o “de novo”, por lo que RTT se presenta de forma esporádica en el 99% de los casos, y el riesgo de la pareja de tener otra hija afectada es inferior al 1% (8).

## **MEPC2**

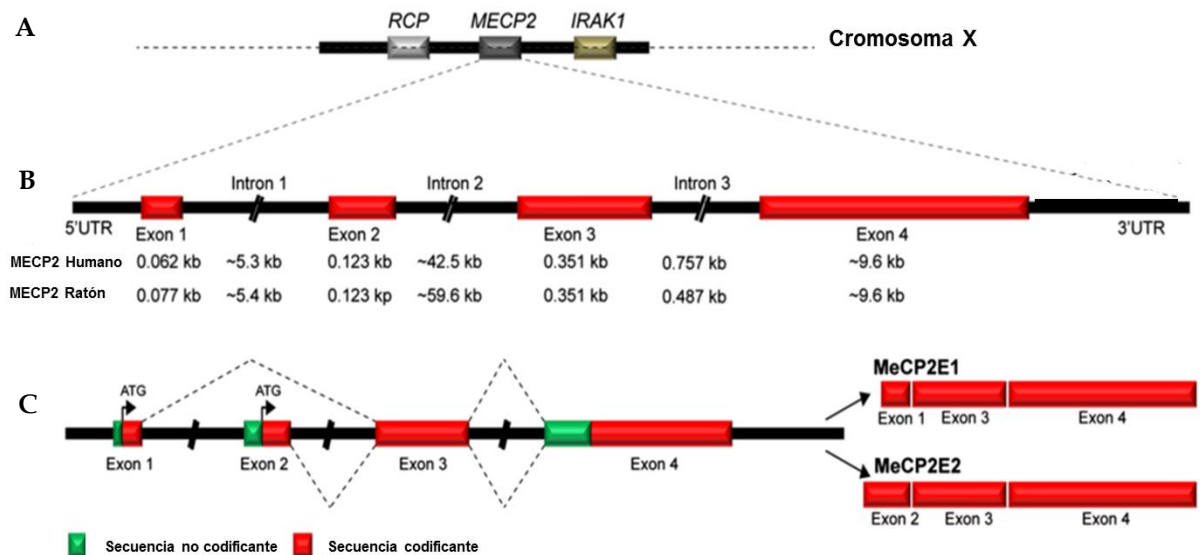
### **GEN MECP2**

En humanos el gen MECP2 se localiza en el brazo largo del cromosoma X (Xq28), se extiende unas 10505 bp y consiste de 4 exones que codifican para dos isoformas de la proteína MeCP2 (MeCP2 e1 y MeCP2 e2) que difieren en sus extremos N-terminales, siendo MeCP2 e1 codificada por los exones 1, 3 y 4 y MeCP2 e2 por el 2, 3 y 4 (10) (Figura 1). A pesar de alguna evidencia acerca de las funciones específicas para cada isoforma, actualmente se considera que ambas son en gran medida funcionalmente equivalentes. Sin embargo, MeCP2 e1 es dominante en el tejido cerebral, correspondiendo al 90% del total de MeCP2 en dicho tejido. Una característica notable respecto de estas dos isoformas es la gran diferencia que presentan en cuanto a su vida media, siendo solo de 4 horas en el caso de la isoforma e1 y de 100 horas para la e2 (1,14).

Por su ubicación en el genoma, en las mujeres y hembras se encuentra sujeto al proceso de inactivación del cromosoma X (ICX) donde uno de los dos cromosomas X es inactivado para lograr patrones de expresión génica similares a los encontrados en varones, quienes tienen solo una copia del cromosoma X. ICX ocurre célula a célula y es predominantemente un proceso azaroso. Sin embargo, pueden ocurrir grados extremos de inclinación hacia la inactivación preferencial del cromosoma X materno o paterno. Por lo tanto, los resultados fenotípicos de las mutaciones en MECP2 en las mujeres son probablemente no sólo basados en el tipo de mutación del gen, sino también en el grado de inactivación entre los alelos mutantes y de tipo salvaje o “wildtype” (wt) (15). Con un solo

cromosoma X, los varones son más severamente afectados por mutaciones en MECP2 que las mujeres, quienes junto con el gen mutante en un cromosoma X llevan una copia normal de MECP2 en el otro (13)

Además de ser la principal causa de RTT, se han asociado cambios en la expresión de MECP2 a otros desórdenes del neurodesarrollo tanto en varones como en mujeres. Entre dichos desórdenes se incluyen: retraso mental ligado al cromosoma X, encefalopatía neonatal severa, síndrome de Angelman y autismo, demostrando que alteraciones en MeCP2 pueden



**Figura 1. Estructura del gen MECP2.** A. MeCP2 se localiza en el cromosoma X (Xq28), flanqueado por los genes RCP e IRAK1. B. Esquema del gen MECP2 que está compuesto de cuatro exones (exón 1-4) y tres intrones (intrón 1-3). Se indican los tamaños de cada región exónica e intrónica en MECP2 humano y de ratón. C. Generación de las dos isoformas de MeCP2: MeCP2E1 y MeCP2E2. El sitio de inicio de la traducción (ATG) para cada isoforma se indica mediante flechas. La isoforma MeCP2E1 está codificada por los exones 1, 3 y 4, mientras que la isoforma MeCP2E2 está codificada por los exones 2, 3 y 4. Secuencia codificante en rojo. Secuencia no codificante en verde. Esquema adaptado de Liyanage, V & Rastegar, M, 2014.

tener amplios efectos en el neurodesarrollo y conducir a un espectro de trastornos (13). Asimismo, la duplicación y triplicación del gen MECP2 también ha sido identificada como la causa genética del recientemente clasificado “Síndrome de duplicación de MECP2” que por lo general afecta a varones (16). La participación de MeCP2 en múltiples trastornos del desarrollo neurológico demuestra que ocupa un papel central en el desarrollo postnatal del cerebro humano. El estudio del papel que desempeña MeCP2 en el desarrollo y la maduración del cerebro es importante para comprender la patogénesis de estos trastornos e identificar objetivos terapéuticos potenciales.

## PROTEÍNA MeCP2

No fue hasta 1999, cuando se descubrió que las mutaciones en el gen MECP2 pueden dar lugar a RTT, que la comunidad científica comenzó a prestar atención a la proteína MeCP2. Una cantidad significativa de investigaciones se han llevado a cabo desde ese

momento, y lo que inicialmente se pensó que iba a ser relativamente simple de indagar, una única proteína represora, se desarrolló en un fascinante regulador de la transcripción génica. Parte de su multiplicidad funcional se debe a la conformación intrínsecamente desordenada de MeCP2, lo que la hace susceptible a la interacción con múltiples proteínas asociadas y a sus diversas modificaciones post-traduccionales, que además modulan la interacción de MeCP2 con la cromatina (14).

### Características de MeCP2

La proteína de unión a metil-CpG 2 (MeCP2) es una proteína nuclear básica, presente en todos los vertebrados, que se identificó inicialmente en virtud de su unión selectiva a secuencias de ADN metiladas en la citosina de dinucleótidos 5'CpG (17). Su estructura está compuesta por 5 dominios principales (Figura 2): 1- dominio N-terminal (**NTD**, N-terminal Domain), 2- el altamente conservado dominio de unión a regiones CpG metiladas (**MBD**, Methyl Binding Domain), 3- un interdominio (**ID**), 4- el dominio de represión transcripcional (**TRD**, TranscrTIPion Repression Domain) y 5- un dominio C-terminal (**CTD**, C-terminal Domain). El MBD es la única región de la proteína que muestra una estructura terciaria bien caracterizada mientras que el resto de los dominios de la proteína son altamente desestructurados (18). Es por esto es que se reconoce a MeCP2 como una "proteína intrínsecamente desordenada" que podría adquirir estructuras secundarias locales sobre la unión a otras macromoléculas (16).

MeCP2 tiene un peso molecular de aproximadamente 53 kDa, sin embargo se suele detectar a 75 kDa por análisis de Western blot probablemente debido a sus modificaciones post-traduccionales (14). Hay varias modificaciones post-traduccionales de MeCP2 conocidas que contribuyen a sus propiedades multifuncionales: fosforilación, acetilación, SUMOilación y ubiquitinación (19).



*Figura 2. Estructura de las isoformas de la proteína MeCP2 humana. Las isoformas humanas MeCP2E1 y MeCP2E2 tienen un tamaño de 498 y 486 aminoácidos respectivamente, mientras que en ratón MeCP2E1 y MeCP2E2 presentan 501 y 484 aminoácidos respectivamente. NTD: dominio N-terminal, MBD: dominio de unión a regiones CpG, ID: interdominio, TRD: dominio de represión transcripcional y CTD: dominio C-terminal. Esquema adaptado de Liyanage, V & Rastegar, M, 2014.*

## **Expresión de MeCP2**

MeCP2 se expresa ampliamente en muchos órganos, sin embargo los mayores niveles de expresión se detectan en cerebro principalmente, seguido de pulmones y bazo (20). Los niveles de MeCP2 en el cerebro son bajos durante las etapas embrionarias y aumentan sostenidamente durante los primeros días después del nacimiento, un período postnatal de intensa formación y maduración de sinapsis (20). La expresión específica de MeCP2 en cerebro es ampliamente estudiada debido a que la mayoría de los fenotipos de RTT son neurológicos. En modelos murinos se observó que la supresión específica de la expresión de MeCP2 en cerebro da lugar a fenotipos de RTT similares a los causados por la deficiencia generalizada de MeCP2, en todos los tejidos del animal (21). Sin embargo, los síntomas no neuronales de RTT como escoliosis, anomalías respiratorias, problemas cardíacos, dificultad en la alimentación y movimientos de las extremidades indican la importancia de la expresión de MeCP2 fuera del sistema nervioso central (18).

Dentro del cerebro también parece haber una diferencia en cuanto a la distribución y niveles de expresión de MeCP2. Análisis de extractos celulares aislados de diferentes regiones cerebrales indican que los mayores niveles de expresión de MeCP2 se localizan en corteza y cerebelo. Así mismo, en cuanto a la expresión celular de MeCP2 dentro de cerebro, se detectó que la misma es altamente predominante en neuronas, estando también presente, aunque en menores niveles, en astrocitos, oligodendrocitos y microglía (18).

La expresión de MeCP2 en los núcleos neuronales es tan alta como los niveles de las proteínas histonas (22). Por esta misma razón, se cree que los fenotipos de RTT son mayormente de origen neuronal (17,21). La expresión de niveles adecuados de MeCP2 en neuronas parece ser indispensable para el desarrollo normal de las funciones neurales (17,22).

## **Funciones de MeCP2 a nivel molecular**

A nivel molecular, funcionalmente hablando, los dominios más importantes de la proteína son el MBD, que se une selectivamente a los sitios CpG metilados del ADN y el TRD que se une a cofactores, recluta histonas deacetilasas (HDACs), y conduce finalmente a la regulación transcripcional (10). MeCP2 es capaz de participar en múltiples interacciones proteína-proteína (23,24) y parece entrar en una asociación estable con sus cofactores sólo cuando está unido al ADN. Por lo tanto, MeCP2 parece actuar como un factor multifuncional que sostiene las interacciones con socios específicos en función de la arquitectura de sus secuencias blanco del ADN (25).

Con respecto a los restantes dominios de MeCP2, analizando la base de datos de mutaciones en esta proteína, se ha encontrado que casi el 25% de residuos de los CTD e ID están asociados con mutaciones sin sentido patogénicas, lo cual remarca su relevancia para

las funciones de MeCP2 (24). Con respecto al ID, el mismo ha sido involucrado con varias interacciones proteína-proteína y con diversos eventos de fosforilación. Hasta el momento, el CTD se ha encontrado asociado exclusivamente con Sdccag1, un mediador de la exportación nuclear; sin embargo, este dominio que es crucial para la unión de MeCP2 a la cromatina, está sujeto a diversas modificaciones post-traduccionales (16,24).

Estudios publicados previamente al conocimiento de la vinculación de MeCP2 con RTT, caracterizaron la interacción de MeCP2 con HDACs, enzimas que eliminan los grupos acetilo de las histonas, incrementando su carga positiva y por tanto la afinidad de estas por el ADN, lo que conduce a un aumento en la condensación de la estructura del ADN, impidiendo la transcripción génica. Este hallazgo junto con el conocimiento de la interacción de MeCP2 con 5-metilcitosina en regiones de genes transcripcionalmente reprimidos reforzaron la idea de un rol represivo en la transcripción inicialmente asociado a esta proteína (14). Sin embargo, con el tiempo se observó que MeCP2 es capaz de unirse también a 5-hidroxi-metil citosinas en regiones de elongación de genes transcripcionalmente activos (14). A su vez, se ha determinado además que MeCP2, a través de su TRD, es capaz de reclutar cofactores tanto represores, por ejemplo Sin3a, c-Ski, y N-CoR (26,27), como activadores, siendo CREB1 un conocido ejemplo de activador transcripcional que se asocia con MeCP2 (19). Se han propuesto además nuevos modelos funcionales para MeCP2 en los que dicha proteína actúa como un modulador transcripcional capaz de regular incrementos y disminuciones en la expresión de genes transcripcionalmente activos mediante regulación a larga distancia de la estructura de la cromatina, desde sitios de metilación distales, fuera de los promotores génicos (13). Un papel en la regulación del empalme o “splicing” alternativo del mRNA y en la modulación de la síntesis de proteínas también han sido propuestos para MeCP2 (16).

En conclusión, MeCP2 es una proteína multifuncional, principal pero no exclusivamente, involucrada en la regulación de la expresión génica. Tanto la estructura de MeCP2, como las diferentes modificaciones post-traduccionales que puede portar podrían justificar esta versatilidad funcional, posiblemente mediante la capacidad de esta molécula de interactuar con una diversa variedad de proteínas asociadas (16).

### **Modificaciones post-traduccionales de MeCP2**

En cuanto a las modificaciones post-traduccionales (MPTs) de MeCP2, su estudio y comprensión han comenzado a tener gran relevancia ya que a medida que avanzaron las investigaciones en dicho terreno fue tomando cada vez más fuerza la propuesta de que MeCP2 está involucrada en la regulación génica de una manera dependiente de actividad neuronal, cambiando su unión a co-reguladores y mecanismos de acción, a través de sus MPTs y que la desregulación de esos procesos podrían ser importantes en la patología de

RTT (16). El interés en las MPTs de MeCP2 comenzó en 2003 con dos estudios independientes que demostraron la fosforilación de dicha proteína, sin dudas hasta el momento la MPT de MeCP2 mejor caracterizada. En tales trabajos observaron que la actividad neuronal dispara, de una manera calcio dependiente, la fosforilación de MeCP2 lo cual conllevaría a su liberación del promotor III de BDNF, facilitando de esta forma su transcripción (28,29). BDNF es un factor neurotrófico cuya expresión es dependiente de actividad, ampliamente expresado en el cerebro, que tiene efectos a largo plazo sobre la supervivencia, el desarrollo y la plasticidad sináptica. Modula la fuerza de las conexiones sinápticas existentes y actúa en la formación de nuevos contactos sinápticos (30).

Uno de los residuos involucrados en este efecto fue identificado posteriormente como la serina 421 (S421) que se encuentra ubicado en el CTD de MeCP2. Mediante la expresión de una proteína MeCP2 mutante (S421A) que no puede ser fosforilada en ese sitio, en cultivos primarios de neuronas se demostró que la fosforilación en dicho sitio afecta al crecimiento dendrítico. Además, *in vivo* se observó un patrón defectuoso de dendritas distales apicales en el cerebro de una línea de ratón “knock-in” que porta la misma mutación (Mecp2 S421A) (31). A su vez, se detectó un cambio en el equilibrio de excitación-inhibición a favor de la inhibición en rodajas corticales de cerebros de ratones Mecp2 S421A, enfatizándose la relevancia de la fosforilación de este sitio, por el hecho de que un desplazamiento similar en este equilibrio ya se había descrito en ratones knock-out para MeCP2 (16).

Actualmente hay más de 25 sitios de fosforilación en MeCP2 determinados experimentalmente, los cuales se distribuyen por todos los dominios de la proteína. Sin embargo, aún no se conoce la importancia funcional de la mayoría de estos sitios, siendo hasta ahora el sitio S421 el más estudiado, seguido por los sitios S80 y T308 de los que también se han identificado ciertas funciones. En cuanto al sitio S80 se determinó que es el sitio de fosforilación más conservado de MeCP2. A diferencia del sitio S421, S80 aparece como el residuo más abundantemente fosforilado en condiciones de reposo, mientras que la actividad neuronal induce su desfosforilación (31). Funcionalmente, la fosforilación de S80 (ubicado en el MBD) no afecta a la localización subcelular global de MeCP2, pero sí parece aumentar su afinidad por la cromatina, aunque la información disponible hasta el momento sugiere que la fosforilación de S80 no tiene ningún impacto sobre la transcripción génica. El rol de la fosforilación en el sitio T308, ubicado en el CTD, ha despertado gran interés debido a su cercanía al residuo R306, cuando se considera que la mutación R306C/H es una de las 4 mutaciones de cambio de sentido más frecuentes en pacientes con RTT. Esta mutación patogénica interrumpe la capacidad de MeCP2 de interactuar con el complejo co-represor NCoR (32). De manera similar, se demostró que la fosforilación T308 suprime la interacción de MeCP2 con el corepresor, reduciendo la represión transcripcional mediada por MeCP2.

Utilizando ratones knock-in fosfo-defectuosos para este sitio (Mecp2<sup>T308A/Y</sup>) se demostró que esta molécula de MeCP2 mutante mantiene su distribución global sobre la cromatina, pero que la inducción dependiente de actividad de los genes blanco de MeCP2 es deficiente. Es importante destacar que los cerebros de estos ratones pesan significativamente menos, los animales presentan defectos motrices y tienen un menor umbral para desarrollar convulsiones en comparación con ratones WT. Dado que todos estos síntomas recapitulan la manifestación de varios modelos de animales deficientes en MeCP2, este es un trabajo que resalta no sólo la relevancia de la fosforilación de MeCP2 sino también su papel como silenciador transcripcional a través de su interacción con el complejo corepresor NCoR/HDAC (32).

Resumiendo entonces, la mayoría de los datos sugieren que MeCP2 es una proteína multifuncional que "transitoriamente" desempeña su/s función/es dependiendo de su fosforilación diferencial. En consecuencia, aunque la fosforilación de S421 permanece hasta el momento como la MPT mejor caracterizada y la pT308 como la más relevante en términos funcionales, se han mapeado otros sitios de fosforilación, y su modificación está a menudo regulada espacialmente por estímulos específicos. Aun no hay estudios disponibles sobre estas MPTs y su regulación durante el desarrollo del cerebro; además, dado que recientemente se ha demostrado que MeCP2 se expresa en células gliales (astrocitos y microglia), que también juegan un papel importante en los trastornos relacionados con MeCP2, futuros estudios también deben investigar la fosforilación de MeCP2 en estas células (16).

## MODELOS MURINOS DE MECP2

Es difícil comprender cómo la disfunción de esta proteína, que participa en la regulación transcripcional de cientos de genes (regulador transcripcional global), conduce principalmente a fenotipos neurológicos bien definidos. Para investigar esta pregunta y entender los mecanismos patogénicos de la enfermedad, los modelos animales han sido de gran utilidad. Después de identificar las mutaciones del gen MECP2 como factores etiológicos claros en aproximadamente el 90% de los casos de RTT clásico, se han utilizado estrategias de "gene targeting" para generar varias líneas de ratones portadores de mutaciones endógenas en MeCP2. Estos ratones mutantes se consideran actualmente buenos modelos de RTT por su elevada validez de constructo, es decir, la medida en que un modelo reproduce la etiología y fisiopatología de un trastorno. Además, aunque la caracterización conductual de estos ratones mutantes está por el momento lejos de ser completa, existen vastas indicaciones de que los ratones mutantes para MeCP2 recapitulan muchos de los síntomas de RTT (33).



Los primeros modelos de ratón RTT se describieron en un mismo número de la revista *Nature Genetics* (2001) y provinieron de dos laboratorios diferentes (34,35). Guy y col. (2001) generaron ratones “null o knockout” (KO) de MeCP2 que carecían de los exones 3 y 4, por delección de los mismos durante el desarrollo embrionario temprano a través del sistema Cre-loxP, bloqueando así la expresión de MeCP2 en todo el organismo (MeCP2Bird). El trabajo de Chen y col. (2001) comparó un KO completo generado por la delección direccionada del exón 3 (MeCP2Jae), un KO condicional que portaba un transgen Nestin-Cre bloqueando la expresión embrionaria de MeCP2 selectivamente en el cerebro (KO en SNC), y un KO condicional generado por la introducción de un transgen CamK-Cre93 bloqueando la expresión de MeCP2 en las neuronas post-mitóticas del prosencéfalo (KO en prosencéfalo). Las diferencias fenotípicas entre las tres diferentes líneas fueron sorprendentemente limitadas, lo que sugiere que la mayoría de los rasgos se producen debido a la pérdida de la función del gen MECP2 en el cerebro (33,34).

Posteriormente, otro modelo de ratón RTT fue descrito por el grupo de Zoghbi. Estos animales portan una mutación que genera una forma truncada de MeCP2 (MeCP2-308), situación comúnmente encontrada en pacientes con RTT clásico (20). En este modelo se insertó un codón de terminación aguas abajo del codón 308, que mantiene la expresión de las regiones MBD, TRD y NTD, pero suprime el extremo C-terminal de la proteína. Dicha mutación mantiene una función residual de la proteína, semejando lo que ocurre en el caso en pacientes de RTT que presentan características más leves de la enfermedad (12).

Gracias al sistema de recombinación Cre/loxP se han generado varios modelos de ratones KO condicionales o mutantes para MeCP2 en poblaciones neuronales y gliales específicas (12), entre los que se destacan: ratones deficientes en Mecp2 en las neuronas excitatorias del prosencéfalo (36), en neuronas GABAérgicas (37), en poblaciones específicas de neuronas hipotalámicas (38) y en microglia (39), entre otros. Estos modelos reproducen algunos de los síntomas de RTT y permitirán aumentar el conocimiento del rol de MeCP2 en distintas células y tejidos, pero aún no han sido estudiados extensivamente.

Curiosamente, la sobreexpresión de MeCP2 también produce una sintomatología similar a RTT en diferentes líneas transgénicas (40). Esta observación subraya la importancia de una expresión del gen MeCP2 regulada con precisión. En particular, en estos modelos se ha observado que diferentes niveles de expresión del gen MeCP2 se correlacionan con la gravedad del fenotipo de tipo RTT; cuanto mayor sea la expresión del gen MeCP2, más temprano se producirán los síntomas y menor será la sobrevivencia. A pesar de la gran variabilidad en la progresión de los síntomas, todas las diferentes líneas transgénicas muestran el característico cierre o “clamping” de las patas traseras (lo que se asocia con las estereotipias de las manos distintivas en las pacientes con RTT), la cifosis, la agresividad y, en cierta medida, una muerte prematura. Además, la línea transgénica que expresa dos veces

los niveles de MeCP2 (MeCP2-Tg1) en comparación a los WT, también muestra convulsiones, alteraciones del electroencefalograma, disminución de los comportamientos ansiosos e hipoactividad, así como un mejor aprendizaje de las habilidades motoras, aprendizaje del hipocampo y plasticidad sináptica (33).

Se pueden identificar diferentes fases de desarrollo en los modelos de ratón RTT descritos hasta ahora, así como en los pacientes con RTT, todos ellos muestran una fase temprana de desarrollo en la que no se pueden detectar déficits evidentes (es decir, visibles mediante exámenes gruesos) y luego del comienzo de los síntomas experimentan un empeoramiento progresivo hasta la muerte prematura. De todos los modelos murinos de RTT mencionados, los modelos MeCP2Bird y MeCP2-308 fueron los utilizados en el presente trabajo de tesis, motivo por el cual a continuación ambos se describirán con mayor detalle.

Los ratones del **modelo MeCP2Bird** (35) son KO condicionales donde machos y hembras aparentan un desarrollo normal hasta la quinta semana posnatal; posteriormente ambos sexos desarrollaron anomalías graves (con un curso de tiempo sexualmente dimórfico) consistentes en temblores, una marcha rígida y descoordinada y movimientos espontáneos reducidos. La mayoría de los animales desarrollaron después el “clamping” de las patas traseras y la respiración irregular, mientras que el desgaste desigual de los dientes y el desalineamiento de las mandíbulas también son frecuentes. En los machos hemicigotas de este modelo (MeCP2<sup>-/Y</sup>), la progresión variable de los síntomas se produce entre la 4<sup>a</sup> y la 7<sup>a</sup> semana posnatal, lo que conduce a una rápida pérdida de peso y muerte (alrededor de la 9<sup>a</sup>-10<sup>a</sup> semana posnatal), además poseen un tamaño cerebral reducido y sus neuronas también son más pequeñas. En contraste, las hembras heterocigotas inicialmente no muestran síntomas, cuidan sus crías y arman nidos normales; recién a partir de los 6 meses de edad muestran problemas de movilidad y el “clamping” de las patas traseras.

Los ratones del **modelo MeCP2-308** con una mutación que genera una proteína truncada recapitulan de forma similar muchas características de RTT (20), presentan un peso corporal dentro del rango normal y son fértiles. Los ratones machos mutantes (hemicigotas MeCP2<sup>308/Y</sup>) no muestran anomalías aparentes hasta alrededor de las 6 semanas de edad, cuando los temblores son detectables al suspender a los animales por la cola, mientras que los mismos se vuelven evidentes a simple vista a los 4 meses de edad. Después de los 5 meses de edad, el 40% de los animales desarrolla cifosis y ya los 8 meses de edad, la piel de los ratones mutantes es notablemente más grasa y descuidada que la de los WT. Se observan también espasmos mioclónicos espontáneos, convulsiones, ataxia y anomalías respiratorias en varios ratones mutantes (41). La mayoría de los ratones machos MeCP2<sup>308/Y</sup> sobreviven durante al menos 1 año de edad, mientras que las hembras heterocigotas muestran signos más leves y variables a partir del primer año de vida.

La producción de varios modelos de ratones, que llevan diferentes alteraciones de MeCP2 y que copian fenotípicamente muchas características de la enfermedad humana, ha proporcionado la prueba genética formal de la implicación de MeCP2 en RTT (33). Es importante destacar que los modelos animales para mutaciones en MeCP2 también han permitido demostrar que el rescate fenotípico es posible al menos en ratones, lo que sugiere que las condiciones relacionadas con MECP2 podrían ser reversibles (42). Estos estudios han incrementado drásticamente la investigación de las funciones de MeCP2 y han proporcionado una gran cantidad de evidencia que demuestra que las funciones de MeCP2 son necesarias para la formación y el mantenimiento de sinapsis a lo largo de la vida. Por lo tanto, los mecanismos patogénicos de RTT parecen convergir a nivel sináptico, interrumpiendo la transmisión sináptica y la plasticidad (16).

### **PAPEL DE MECP2 EN EL DESARROLLO Y MANTENIMIENTO DE LOS CIRCUITOS NEURONALES.**

El reconocimiento de que mutaciones en MeCP2 causan RTT, reveló la importancia de este factor transcripcional para la función neuronal. MeCP2 se expresa principalmente en neuronas maduras y funciona como un factor de transcripción dependiente de la metilación del ADN y actuaría sobre genes específicos implicados en el desarrollo neuronal (17,43).

RTT afecta el desarrollo del cerebro durante las fases más dinámicas de crecimiento y establecimiento de la conectividad. La patología se caracteriza por una disminución del tamaño cerebral con aumento de la densidad celular. No se han observado malformaciones, anomalías en mielina, acumulación de metabolitos o signos de neurodegeneración (44,45). El aspecto más notorio observado en la examinación de cerebros post-mortem, es la reducción en las ramificaciones dendríticas y en el tamaño neuronal (46). Se han encontrado cambios neuroquímicos en receptores dopaminérgicos, colinérgicos, y aminoácidos excitatorios (47). Asimismo, se ha observado reducción de la expresión de MAP-2 (proteína 2 asociada a microtúbulos) en corteza, en las ramificaciones dendríticas y en el número de espinas dendríticas en neuronas piramidales lo que sugiere un exceso de refinamiento sináptico.

A nivel histológico, dos trabajos de Belichenko y col. (36,48) han demostrado que la mayoría de los parámetros analizados se encuentran alterados en las dendritas de ratones mutantes para MeCP2 de ambos sexos. Entre los defectos más destacados se encuentran alteraciones morfológicas en dendritas, densidad de espinas alterada (generalmente reducida), al igual que su morfología, ya que presentan morfología de espinas inmaduras, con una cabeza más pequeña y cuello más largo. Defectos similares fueron observados post mortem en neuronas de hipocampo de pacientes con RTT (49). Asimismo, neuronas generadas *in vitro* a partir de células madre pluripotentes inducidas (iPSC) derivadas de fibroblastos de pacientes con RTT mostraron una menor densidad de espinas dendríticas que

las neuronas control (50). Estos hallazgos han llevado a la hipótesis de que los déficits neurológicos de los pacientes de RTT surgen debido a fallas en el desarrollo del circuito neuronal, en el desarrollo sináptico y/o en el mantenimiento de los mismos.

Si bien RTT es considerado un desorden del neurodesarrollo, trabajos más recientes han revelado que MeCP2 también resulta fundamental para el mantenimiento de redes neuronales maduras y la anatomía cerebral global durante las últimas etapas del desarrollo del cerebro postnatal y en el cerebro adulto (51,52). En modelos animales, se ha observado que cuando se elimina MECP2 en diferentes etapas posnatales, principalmente en etapas adultas (a partir de 15 semanas de edad) no sólo se recapitulan los fenotipos de RTT, sino que los mismos se desarrollan en forma acelerada, en solo cuestión de días, seguidos por letalidad. Se ha observado que dentro de ese tiempo abreviado de días, el cerebro adquiere anomalías anatómicas, celulares y moleculares dramáticas, típicas del RTT clásico. Estos hallazgos revelan una nueva etapa del desarrollo postnatal que coincide con la maduración plena del cerebro, donde su estructura/función es extremadamente sensible a los niveles de MeCP2 y la pérdida de esta molécula conduce a un colapso precipitado de las redes neuronales e incompatibilidad con la vida.

Numerosos estudios en modelos animales de RTT indican que MeCP2 contribuye a la formación y al mantenimiento de la conectividad neuronal; la falta de MeCP2 afecta la morfología axonal y dendrítica (48,49), eventos de guiado axonal (53), regula la formación y función de sinapsis y la plasticidad sináptica (54). Un creciente cuerpo de evidencia indica que, tanto la neurotransmisión excitatoria como la inhibitoria se ven afectadas en ausencia de MeCP2 (37,55,56). Sin embargo, no están claros los mecanismos por los que la disfunción de MeCP2 altera estos eventos y conduce a defectos del neurodesarrollo. Además, si bien está claro que los defectos neuronales son la base de las alteraciones de comportamiento, es importante mencionar que varios grupos han demostrado que la pérdida de MeCP2 en glía influyen negativamente a las neuronas, de una manera parácrina (57,58). Estos datos demuestran la complejidad de la función de MeCP2 en el mantenimiento de las conexiones neurales.

Asimismo, se ha demostrado que MeCP2 regularía la expresión génica inducida por actividad sináptica (28,29). Ha sido establecido in vitro, que la actividad neuronal aumenta la fosforilación de MeCP2, lo que lleva a la liberación de la represión de genes como del BDNF, aumentando la expresión del mismo. Hay sólidas evidencias de que MeCP2 también mediaría respuestas dependientes de actividad in vivo (31). Además, se ha sugerido que MeCP2 podría actuar como un activador transcripcional en conjunto con CREB. Estos factores pueden controlar las respuestas dependientes de actividad, y en última instancia, afectar la plasticidad sináptica. Por lo tanto, es posible que los efectos de la falta de MeCP2 sean debido a la pérdida de activación de la transcripción además de la represión (19).

Nuestros datos previos indican que la falta de MeCP2 se hace más evidente en procesos dependientes de actividad. Por ello, propusimos utilizar modelos animales de RTT y un paradigma de actividad epileptogénica in vivo a fin de investigar los mecanismos celulares y moleculares involucrados.

En conclusión, una gran cantidad de evidencias corroboran la importancia funcional de MeCP2 en el establecimiento y mantenimiento de la conectividad neural, la plasticidad sináptica y la homeostasis, proporcionando así una justificación a los déficits de aprendizaje y memoria que se observan constitutivamente en los pacientes de RTT y en modelos animales de esta enfermedad.

## **ROL DE MeCP2 EN EVENTOS DE GUIADO AXONAL**

La complejidad y precisión de las redes neuronales se establecen mediante una serie de decisiones de orientación tomadas durante el desarrollo de los circuitos. En el intento de estudiar la formación de este patrón selectivo de conexiones se han definido cuatro o cinco eventos secuenciales del desarrollo neuronal (59). Inicialmente cada neurona emite proyecciones o neuritas entre las que se diferencia un axón, el cual se va a extender en dirección hacia un blanco o diana (crecimiento axonal). Los conos de crecimiento axonal son dirigidos por moléculas guía para seguir vías específicas, girar en un punto particular, e identificar células sinápticas diana apropiadas (guiado axonal). Al alcanzar el objetivo apropiado, el cono de crecimiento se diferencia en una terminal presináptica y comienza la formación de sinapsis. Una vez formadas, las conexiones sinápticas se regulan dinámicamente por actividad neuronal, competencia con otras sinapsis y factores intrínsecos. Si se han realizado conexiones inadecuadas, o si las conexiones ya no son necesarias, entonces se produce la retracción de las ramificaciones axonales ("pruning" o refinamiento axonal). Aunque estos acontecimientos ocurren durante el desarrollo, esta plasticidad continúa a lo largo de la vida del organismo y subyace a los mecanismos de aprendizaje y memoria (59-62). Las moléculas de guiado pueden presentar efectos atractivos o repulsivos, y son detectadas por receptores de superficie celular presentes en los conos de crecimiento (61,63).

Degano y col. (53), utilizando ratones KO del modelo MeCP2<sup>Jae</sup> y el sistema olfatorio como modelo del neurodesarrollo, revelaron un papel adicional para MeCP2 en el establecimiento de circuitos neuronales mediante el control de eventos de orientación o guiado axonal (trayectoria, refinamiento y blanco axonal). Por ejemplo, la trayectoria axonal se interrumpe en el sistema olfatorio accesorio de ratones *Mecp2*-KO, específicamente, el nervio vomeronasal se encuentra desfasciculado y muestra trayectorias anormales hacia su región blanco. Defectos similares fueron observados en biopsias de tejido olfatorio de

pacientes con RTT, donde los haces axonales de las neuronas sensoriales olfativas presentan una marcada desfasciculación (64). Alteraciones en la orientación axonal ante defectos en MeCP2 también fueron observadas en otras estructuras cerebrales; en hipocampo de ratones MeCP2-KO se detectaron proyecciones de neuronas inmaduras anormalmente orientadas en edades posnatales tempranas (65), mientras que también se han registrado marcados defectos en la trayectoria y orientación de axones de neuronas corticales (48).

Con respecto al pruning axonal en el sistema olfatorio dicho proceso tiene lugar entre los días postnatales 10-20, por el cual son removidos axones ectópicos o que han crecido más allá de su blanco. Los axones de las neuronas sensoriales olfativas se extienden hacia el bulbo olfatorio principal, siendo su blanco la capa glomerular del mismo. Sin embargo, durante las primeras semanas postnatales del desarrollo, puede encontrarse un número significativo de estos axones sobrepasando dicha capa. Ese excesivo crecimiento axonal es normalmente refinado entre los días P10-P20, donde se alcanza el patrón adulto de inervación glomerular. Degano y col., observaron defectos de este proceso en ratones MeCP2-KO, los cuales mostraron un porcentaje mayor de glomérulos con axones sobrecrecidos en comparación con los hallados en sus respectivos compañeros de camada WT al momento en que el refinamiento de dichos axones se lleva a cabo. Estos defectos axonales en los animales MeCP2-KO se correlacionaron con cambios en la expresión de moléculas de guiado de la familia de Semaforinas clase 3 (53). Estas observaciones sugieren que MeCP2 regularía la formación de un patrón espacio-temporal adecuado de conexiones durante el desarrollo de circuitos neuronales.

Considerando estos antecedentes, en la presente tesis se propuso estudiar cómo MeCP2 modula eventos de guiado axonal que participan en el establecimiento y mantenimiento de la conectividad neural en hipocampo, estructura cerebral involucrada en varias manifestaciones de RTT, como el desarrollo de convulsiones y de déficits cognitivos.

## **HIPOCAMPO**

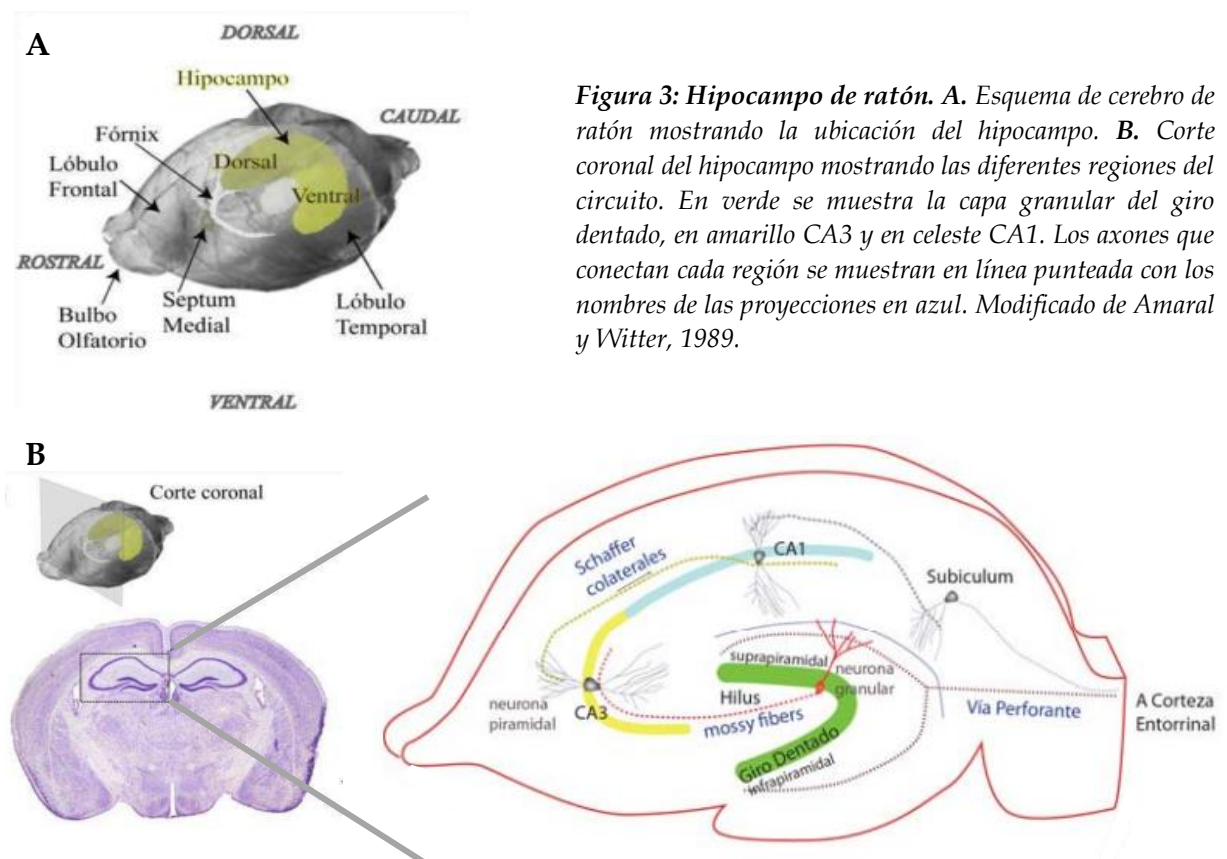
### **ESTRUCTURA Y FUNCIÓN.**

El hipocampo (llamado así por Julius Caesar Aranzi en 1587 por su parecido al caballito de mar) se encuentra en el lóbulo temporal del cerebro (por debajo de la corteza) y forma parte del sistema límbico. La formación hipocampal comprende cuatro estructuras corticales; el giro dentado (GD), el hipocampo propiamente dicho que se divide en las subregiones cornu ammonis (CA) 1, 2 y 3, el complejo subicular que incluye al subículo, parasubículo y presubículo y por último la corteza entorrinal que en roedores se divide en lateral y medial. En roedores, la forma tridimensional de dicha estructura es relativamente

compleja, ya que su eje longitudinal se dobla formando una “C” y se extiende desde el septum (dorso-rostral) al lóbulo temporal (ventro-caudal) del cerebro, denominándose eje “septo-temporal” (Figura 3A). Para facilitar entonces la lectura de la tesis hablaremos del eje longitudinal del hipocampo como “dorso-ventral” para poder utilizarlo en toda la escala de mamíferos y llamaremos “hipocampo” al conjunto del GD y el hipocampo propiamente dicho (66).

Las neuronas principales son glutamatérgicas y comprenden las granulares en el GD y las piramidales localizadas en CA1, CA2 y CA3, constituyendo estas últimas aproximadamente el 90% de todas las neuronas de las regiones CA de la formación hipocámpal, todas ellas dispuestas en una única capa de somas densamente agrupados formando el estrato piramidal.

La organización funcional básica en el hipocampo es el denominado circuito trisináptico (Figura 3B), llamado así porque el hipocampo es considerado como una estructura que contiene tres sinapsis excitatorias en serie. En la primera, el input neocortical hacia el GD proviene de las capas superficiales de la corteza entorrinal y está constituido por la vía perforante. Esta conexión, como todas las conexiones entre células principales del circuito hipocámpal, es excitatoria y unidireccional, es decir, el GD no devuelve proyecciones a la corteza entorrinal. Las células granulares del GD, se conectan con las células piramidales de CA3 a través de sus axones que conforman las fibras musgosas o “mossy fibers” (MF). Los axones de CA3 a su vez constituyen las fibras colaterales de Schaffer e inervan CA1. CA1 proyecta al subiculum y éste hacia las capas profundas de la corteza entorrinal, en donde se



**Figura 3: Hipocampo de ratón.** A. Esquema de cerebro de ratón mostrando la ubicación del hipocampo. B. Corte coronal del hipocampo mostrando las diferentes regiones del circuito. En verde se muestra la capa granular del giro dentado, en amarillo CA3 y en celeste CA1. Los axones que conectan cada región se muestran en línea punteada con los nombres de las proyecciones en azul. Modificado de Amaral y Witter, 1989.

cierra el circuito trisináptico hipocampal. Sin embargo, este circuito intrínseco cerrado puede ampliarse considerando otros tipos de conexiones sinápticas adicionales, que incluyen: 1) sinapsis entre neuronas principales e interneuronas inhibitorias; 2) sinapsis asociativas de las células principales; y 3) entradas modulatorias extrínsecas del hipocampo. Las interneuronas, que se encuentran en todas las regiones del hipocampo, a menudo tienen axones que se arborizan ampliamente, lo que da capacidad a estas interneuronas de inhibir simultáneamente un gran número de células granulares y piramidales jugando, por tanto, un posible papel muy importante en la sincronización y generación de salidas rítmicas (66).

Además, las proyecciones aferentes y eferentes del hipocampo también se encuentran organizadas en el eje longitudinal. La principal aferencia, la corteza entorrinal, inerva con su banda más dorso-lateral al hipocampo más dorsal y la banda más ventro-medial a la región más ventral del hipocampo. Estas bandas presentan diferente conectividad: mientras que la región que proyecta al hipocampo dorsal recibe proyecciones de la neocorteza, la región que proyecta al hipocampo ventral recibe aferentes de núcleos subcorticales, como la amígdala (67,68). Más aún, hay conexiones directas entre el hipocampo ventral y la corteza prefrontal, la amígdala, el hipotálamo y otros núcleos subcorticales, ausentes en la región más dorsal del hipocampo (69-71), lo cual contribuye a la marcada diferencia anatómica y funcional que caracteriza al eje longitudinal del hipocampo.

De acuerdo con la segregación estructural mencionada previamente, el hipocampo se diferencia funcionalmente en su eje longitudinal, siendo la región dorsal la más involucrada en el procesamiento espacial y la región ventral en los procesos de ansiedad y control inhibitorio del comportamiento (72,73). Por ejemplo, lesiones específicas en la región dorsal y no en la ventral en las ratas determinan deficiencias en el aprendizaje espacial del test de navegación de Morris (74).

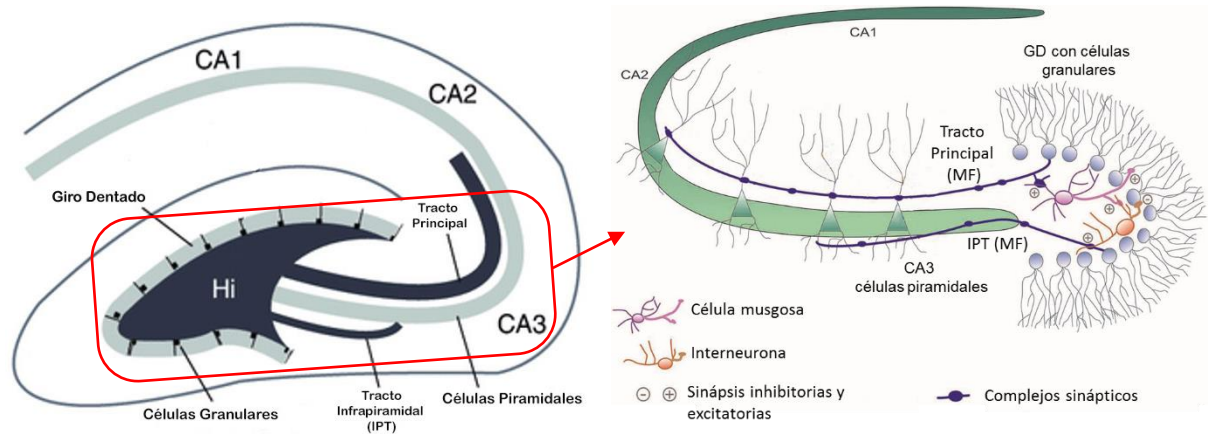
El rol del hipocampo en la memoria espacial se encuentra hoy totalmente aceptado. Además se ha demostrado que en humanos el hipocampo es crítico para la capacidad de poder trazar un mapa físico mentalmente lo que facilita la formación de memoria episódica de los eventos que ocurrieron en cada lugar (75,76). Se ha evidenciado también un rol del hipocampo en el procesamiento de memorias recientes (77) y también se ha postulado que dicha estructura podría ser un organizador de representaciones temporales (78) que luego serían almacenadas a largo plazo en otros centros corticales, probablemente aquellos con los que el hipocampo se interrelacionó durante la consolidación de dichas memorias (79).



## **CIRCUITO: FIBRAS MUSGOSAS (MOSSY FIBERS)-CA3. Tracto infrapiramidal (TIP)**

Dentro del circuito trisináptico del hipocampo nuestra atención se centra en la conexión formada por los axones (mossy fibers) de las células granulares del GD, con las neuronas piramidales de la región CA3. Cada célula granular del GD posee una sola ramificación axonal que se extiende a lo largo de CA3, dentro del estrato lúcido. Los axones de las células granulares se denominan fibras musgosas o “mossy fibers” (MF) porque poseen expansiones amplias e irregulares que les dan una apariencia irregular. Las expansiones de las MF forman sinapsis muy complejas sobre las espinas grandes y multirramificadas de las células piramidales de CA3 (66).

Inmediatamente después de abandonar el GD, las MF se colateralizan dentro del hilo o hilus haciendo conexiones tanto con interneuronas inhibitorias como con células musgosas excitatorias (neuronas del hilus de naturaleza glutamatérgica, llamadas así porque sus dendritas proximales están densamente cubiertas con grandes espinas de morfología irregular) (80). Más allá de la región hilar, las MF se extienden a lo largo de CA3 en haces discretos y hacen contactos con las células piramidales e interneuronas en esa región (Figura 4). La mayoría de estas MF se extienden a lo largo de CA3 conformando un haz de axones conocido como tracto principal hipocampal, que se encuentra en el estrato lucidum, por encima de la capa celular piramidal y adyacente a las dendritas apicales de las células piramidales CA3. Mientras que otras MF se extienden conformando un segundo manojo de axones: el **tracto infrapiramidal** (TIP o IPT del inglés: “infrapyramidal tract”), a través del estrato oriens, justo debajo de la capa de células piramidales y adyacente a las dendritas basales de las células piramidales CA3 (81,82).



**Figura 4. Circuito mossy fibers-CA3 hipocampal.** Las mossy fibers (MF) consisten en los axones de las células granulares del giro dentado (GD) que se proyectan a través del tracto principal en el estrato lúcido o a través del tracto infrapiramidal (TIP) localizado principalmente en el estrato oriens. En CA3 y el hilus (Hi) las MF forman tres tipos de sinapsis: con las células piramidales de CA3 a través de los complejos sinápticos, con interneuronas locales inhibitorias (que en CA3 son responsables de inhibir a las células piramidales) y con las células musgosas excitatorias que a su vez retropropagan la excitación a las células granulares del GD. Adaptado de Wiera & Mozrzymas 2015.

Los axones del TIP ascienden a través de la capa de células piramidales en CA3 proximal y unen las MF en el tracto principal (80). Aunque en la edad adulta los axones del TIP se extienden una distancia muy corta antes de ascender, dichas fibras tienen una trayectoria muy diversa durante el desarrollo postnatal temprano. Inicialmente en el desarrollo, existe una sobre-extensión de las MF del TIP a lo largo de la extensión de CA3 y luego estos axones son removidos entre los días postnatales P20 y P30 (63), a partir de lo cual el TIP alcanza finalmente su longitud adulta, quedando sus axones confinados en gran parte al hilus. Este proceso de remoción selectiva de ramas neuronales aberrantes o ectópicas en el TIP se conoce como **poda (pruning) del TIP** y tiene lugar durante el desarrollo postnatal temprano del sistema nervioso para asegurar la apropiada formación del circuito funcional (63,82).

Considerando que existe un cúmulo de evidencia que correlaciona alteraciones del refinamiento del TIP con el desempeño de roedores en tareas de aprendizaje espacial (lo que se detallará más adelante) y por otro lado los defectos de refinamiento axonal encontrados por Degano y col., (53) en el sistema olfatorio de ratones deficientes en MeCP2, en la presente tesis nos centramos en estudiar el “pruning” estereotipado del TIP en modelos animales de RTT.

## PRUNING ESTEREOTIPADO DEL TIP HIPOCAMPAL

La conectividad precisa es un componente esencial para el correcto funcionamiento del sistema nervioso. El desarrollo neuronal temprano incluye el crecimiento exuberante de los axones y la formación de conexiones con múltiples blancos, algunas de las cuales son

inapropiadas. Estas proyecciones se refinan más tarde mediante el pruning para establecer la conectividad que se mantiene en la edad adulta (82).

En los vertebrados las neuronas generalmente hacen conexiones con múltiples células diana. En el cerebro de los mamíferos, por ejemplo, cada neurona contacta, en promedio, con más de cien socios sinápticos, a menudo en muchas áreas diferentes. El patrón de conexiones es reproducible de animal a animal y se establece durante el desarrollo embrionario a través de varios eventos progresivos y regresivos (59,83). Muchas de las proyecciones son, sin embargo, transitorias y más tarde refinadas de manera estereotipada, dejando a cada neurona sólo con un subconjunto de conexiones en las regiones diana a las que proyectó inicialmente. Dentro de cada región, la formación adicional de ramificaciones (arborización terminal) y la retracción van dando forma al patrón final de los contactos sinápticos. Al mismo tiempo, la muerte natural de neuronas elimina muchas de estas ramificaciones, estableciendo el número final de cada población neuronal (63).

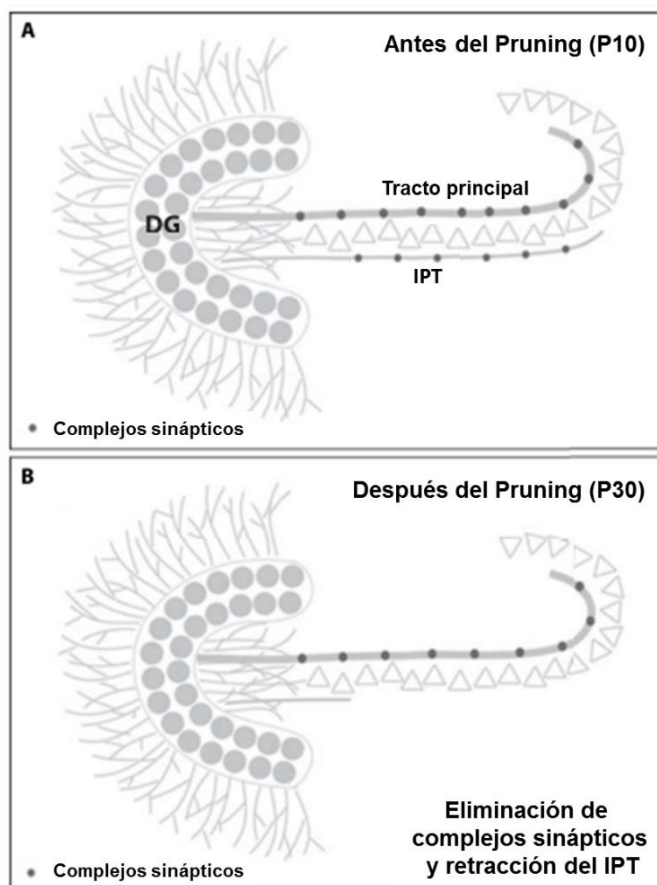
En el sistema nervioso central y periférico de vertebrados e invertebrados se han estudiado varios ejemplos de refinamiento axonal, entre los que se incluyen refinamiento de conexiones nerviosas en *Drosophila* (84), el desarrollo de la unión neuro-muscular en vertebrados y en mamíferos las proyecciones de la capa 5 de la corteza visual a la médula espinal y el remodelado de las proyecciones axonales de la vía retino-colicular (85,86).

En base a hallazgos histológicos se han definido dos clases de procesos de refinamiento estereotipado de proyecciones neuronales innecesarias, ectópicas o aberrantes (82):

- Pruning por procesos degenerativos: donde se produce una eliminación colateral axónica por fragmentación axonal. Se inicia con una desorganización de los componentes del citoesqueleto seguido por el "blebbing" de la membrana plasmática (formación de burbujas o ampollas llamadas "blebs"), fragmentación del axón y luego la fagocitosis de los fragmentos formados. Esta clase de refinamiento se observa en *Drosophila* y también en mamíferos en la capa 5 de la corteza visual y en proyecciones axonales de la vía retino-colicular.
- Pruning por procesos de retracción: donde los axones se retraen sin dejar fragmentos de membrana, produciéndose cambios en su elongación por modificaciones del citoesqueleto. Se ha propuesto que este mecanismo de retracción incluiría el reciclaje de componentes en las regiones distales del axón a través de un transporte retrógrado. Un ejemplo particularmente interesante de refinamiento estereotipado mediado por retracción es el del TIP del hipocampo, el cual se describirá a continuación.

Como se mencionó anteriormente, a partir del GD el TIP se extiende paralelamente al tracto principal hipocampal, estando conformados ambos tractos por los axones (MF) de las neuronas granulares que conforman el GD. Inicialmente durante el desarrollo postnatal temprano, al día P10 se observa claramente que existe una sobre-extensión de las MF del TIP a lo largo de la extensión de CA3 (Figura 5); luego entre los días P20 y P30 esos axones son retraídos, encontrándose ya a P30 el TIP más corto y cercano a su longitud definitiva adulta, la cual se alcanza completamente al día P45 (63).

Las MF en el tracto principal se caracterizan por tener grandes botones en serie que forman complejos sinápticos con las espinas dendríticas de las células piramidales de CA3. Estos complejos se disponen a lo largo de las MF espaciados de manera relativamente uniforme y, en promedio, una MF madura forma unos 14 complejos sinápticos con las células piramidales de CA3, los cuales alcanzan la madurez alrededor del día P21. Similares complejos se forman entre las MF del TIP y las dendritas basales de las células piramidales en CA3 previamente al refinamiento del TIP, por lo que, entonces entre los días P20 y P30 la eliminación de dichos complejos sinápticos en el TIP precede a la retracción del axón (82).



**Figura 5. Mecanismo celular del pruning estereotipado del TIP.** A. Al principio del desarrollo postnatal (P10) los axones del tracto principal forman complejos sinápticos con las dendritas apicales de las células piramidales de CA3, al mismo tiempo los axones sobrecrecidos del TIP también forman complejos sinápticos con las dendritas basales de dichas células piramidales. B. Más adelante en el desarrollo (P30), los complejos sinápticos en el tracto principal han madurado y se mantienen, pero los del TIP se han eliminado y posterior a ello las MF que conforman este tracto se han retraído de manera distal a proximal por el proceso de pruning estereotipado. DG: giro dentado; círculos grises: células granulares; triángulos: células piramidales. Adaptado de Faulkner et al., 2007.

### Significado funcional del pruning del TIP

Como se mencionó anteriormente los eventos de pruning axonal facilitan la eliminación de axones ectópicos o mal guiados y desempeñan papeles clave en la formación de circuitos neuronales (87). Estos axones exuberantes a menudo forman conexiones

sinápticas, por lo que la eliminación de sinapsis suele preceder a la retracción axonal (81,82). Alteraciones en los eventos de pruning (principalmente de sinapsis) durante el desarrollo neural y la maduración de los circuitos han sido propuestos de estar relacionados con enfermedades mentales y disfunciones cerebrales tales como esquizofrenia, autismo y otros desórdenes clínicos vinculados a la plasticidad cerebral (88-90).

En relación al TIP, existe evidencia de que su longitud se correlaciona con el desempeño en tareas de aprendizaje espacial en roedores (91). En un estudio de varias cepas de ratones con diferencias heredables en la longitud del TIP, el aumento en el largo de dicho tracto se asoció con menos errores en una tarea de laberinto radial (92) y también con un mejor desempeño en el laberinto de agua (93). Además de estas diferencias genéticas inherentes en la longitud IPB, se han inducido cambios en el largo de este tracto en animales con sobreexposición a ciertas hormonas, por ejemplo se observó que el hipertiroidismo en ratones inducido por inyecciones diarias de tiroxina a partir del día postnatal P0 a P11 dio como resultado un área aumentada en el TIP (94). Además, los animales hipertiroides en este estudio tuvieron menos errores en una tarea de laberinto radial que los controles, lo que coincide con el rendimiento de ratones con un TIP largo, mencionado anteriormente. Estos resultados también han sido observados en ratas, en las que existe un efecto dependiente de la dosis de tiroxina sobre la longitud del TIP (95). Estos estudios ayudan a entender la importancia funcional del pruning estereotipado del TIP, por lo que estudiar el mismo no sólo es relevante como modelo de refinamiento axonal del SNC, sino también por su posible influencia en eventos de aprendizaje y memoria.

### **Mecanismo molecular del pruning del TIP: Rol clave de SEMAFORINAS**

La caracterización de fenotipos aberrantes del TIP en varios modelos de ratones KO ha dado una idea de las moléculas que están involucradas en el proceso de pruning estereotipado de dicho tracto. La interacción ligando-receptor que hasta ahora ha emergido como la más crítica para el desarrollo normal del TIP es la Semaforina 3F (Sema3F) que actúa a través de un complejo receptor conformado por Neuropilin-2 (Npn-2) y Plexina-A3 (PLXA3) (63). Las semaforinas son una familia de moléculas secretadas o transmembrana que tienen un dominio amino-terminal denominado "sema", compuesto por unos 500 aminoácidos, que es clave para la señalización debido a su conservación (96). Estas moléculas han sido clasificadas según sus dominios adicionales en ocho clases (97):

- La clase I y II se encuentran en invertebrados.
- De las clases III a la VII se encuentran en vertebrados: de la clase IV a la VI son transmembranas, III y VII son secretadas.
- La clase VIII está codificada por virus.

Las semaforinas secretadas actúan principalmente de forma inhibitoria sobre el axón, operando como señales quimio-repulsivas durante el guiado axonal. Sin embargo, a nivel general, el papel de esta familia de moléculas altamente conservada se ha ampliado para incluir múltiples fenómenos del desarrollo tales como la orientación atractiva del axón, la fasciculación axonal y la migración neuronal (98).

Sema3F pertenece a la clase mejor caracterizada de semaforinas, la clase 3, que son secretadas. Esta clase de semas actúan a través de un complejo receptor formado por neuropilinas, que constituyen el componente del complejo al que se une el ligando, y plexinas, que forman el componente de señalización. Las neuropilinas son proteínas transmembrana con una gran región extracelular que consta de cinco dominios y una cola citoplasmática corta sin dominios de señalización conocidos (99). Las plexinas son proteínas transmembrana con un dominio sema extracelular y un dominio citoplásmico de aprox. 600 aminoácidos (100). Curiosamente, aunque la mayoría de las semaforinas de clase 3 no se unen directamente a las plexinas, la afinidad de unión a las neuropilinas aumenta cuando éstas se encuentran en un complejo con plexinas (101).

Los patrones de expresión de estas moléculas indican un posible papel en el desarrollo del hipocampo, incluyendo el pruning del TIP. En ratones, el ARNm de Sema3F se expresa a lo largo del hipocampo desde el día embrionario 15 (E15) hasta P0 (102), luego su expresión baja drásticamente, no encontrándose expresión de ARNm detectable al día P10 y P15, sin embargo, a P20 la expresión se reanuda en las células de CA3 y CA1 y es aún mayor al día P26, mientras transcurre el pruning estereotipado del TIP (63). El ARNm de Npn-2 también se expresa en todo el hipocampo de E15 a P0, encontrándose fuertemente expresado en el GD a P0 (102). Posnatalmente, se observó que se expresa robustamente en la capa molecular interna del GD a P10 y edades adultas; también se detecta Npn-2 en dendritas de neuronas de CA1 y CA3 y en los axones y terminales del tracto principal y del TIP a P10, pero su expresión disminuye en la edad adulta (103). El ARNm de PLXA3 se expresa en muchas regiones del hipocampo en desarrollo (a P1), incluyendo las células granulares de GD, células piramidales maduras y el estrato oriens (104). Cuando el pruning del TIP ocurre, a P25 la expresión de PLXA3 se limita al tercio interno del DG (63).

En síntesis, los receptores de semaforina están presentes principalmente en las células granulares del GD, mientras que Sema 3F se encuentra especialmente en la trayectoria del TIP, presentando una baja expresión en el desarrollo postnatal temprano, y aumentando marcadamente al momento de la retracción del TIP. Este patrón de expresión es consistente con un papel en el pruning estereotipado del TIP.

Se ha demostrado que estas moléculas ejercen efectos de guía y pruning tanto in vitro como in vivo. Ratones mutantes para Npn-2 (99), PLXA3 (63,104,105), y Sema3F (106) han sido generados y caracterizados. Cada uno de estos mutantes tiene un fenotipo hipocampal

idéntico, con un TIP largo que se extiende hacia la curvatura de CA3. En cada uno de estos mutantes no se observaron defectos en la densidad celular o migración celular en el GD, por lo que la longitud del TIP no se debe a cambios en el número de células granulares. En estos animales mutantes el TIP no se retrae y el adulto conserva las proyecciones en todo el campo de CA3 como lo hace en la etapa postnatal más temprana. En los mutantes PLXA3, los complejos sinápticos que normalmente se eliminan durante el pruning continúan madurando y alcanzan una forma muy similar a la de los complejos sinápticos de los axones maduros del tracto principal, mientras que en los animales WT los complejos sinápticos formados antes del pruning se eliminan previamente al inicio de dicho proceso (105). Estos modelos KO de Sema3F y sus receptores no han sido caracterizados en tests comportamentales, por lo que aún se desconocen las consecuencias de las fallas en el pruning estereotipado del TIP.

Hasta el momento hay poco conocimiento acerca de los efectos aguas abajo de la vía de señalización de las semaforinas y cómo realmente inducen el proceso de pruning. Hay evidencias de que la vía de señalización de estas moléculas desencadena la reestructuración del citoesqueleto de actina (87), sin embargo aún se necesita más trabajo para alcanzar la completa comprensión de esta vía

Es importante mencionar que Degano y col. (2009) encontraron defectos en el pruning axonal en el sistema olfatorio de ratones MeCP2-KO, los cuales estuvieron acompañados de alteraciones dinámicas espacio/temporales en la expresión de semaforinas clase 3 (53).

Considerando estos antecedentes, en la presente tesis nos propusimos evaluar el proceso de refinamiento axonal en el TIP y los jugadores moleculares involucrados en el mismo en modelos animales deficientes en MeCP2.

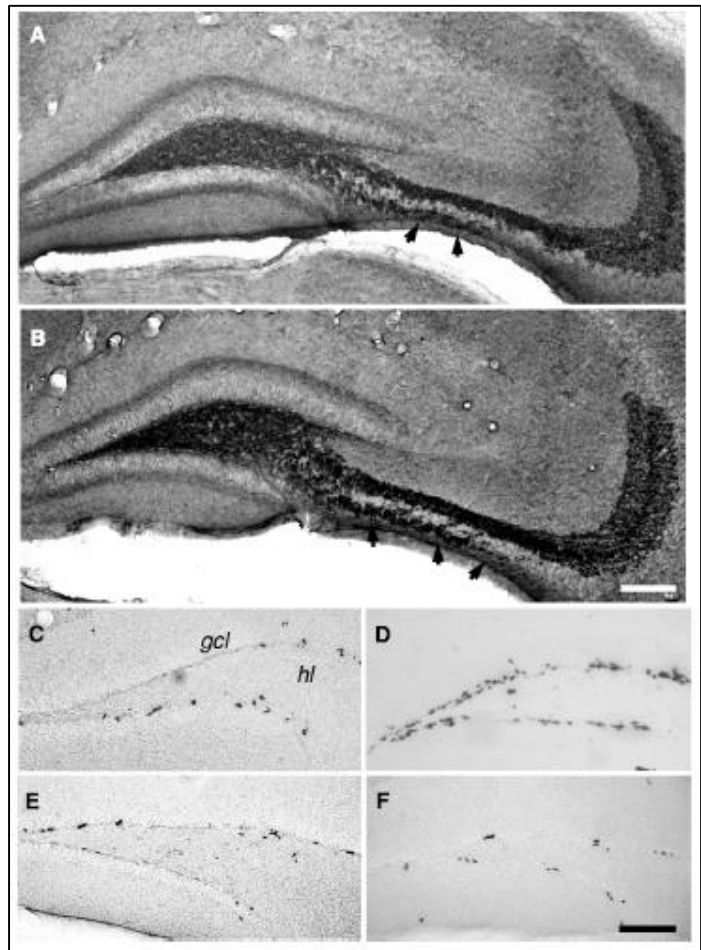
## **PLASTICIDAD PRE-SINÁPTICA ESTRUCTURAL EN HIPOCAMPO ADULTO**

Además de la plasticidad masiva al nivel de las sinapsis, se ha encontrado en el hipocampo de ratones y ratas adultos dos sistemas con una plasticidad estructural macroscópica muy fuerte: la neurogénesis adulta, es decir, la generación permanente de nuevas células granulares del GD y cambios dinámicos en el tamaño del TIP, que conecta el GD con el área CA3.

Ambas formas de plasticidad estructural del hipocampo adulto se correlacionan con el rendimiento mejorado en tareas de aprendizaje dependientes del hipocampo, además de encontrarse estrechamente relacionadas entre sí (107). Se ha observado que tanto la formación de nuevas neuronas del GD por neurogénesis adulta, como la anatomía del TIP son reguladas dinámicamente en respuesta a estímulos extrínsecos, más específicamente a estímulos neurogénicos como la exposición a un ambiente enriquecido o la inducción de actividad epileptogénica. En relación a esto último, se determinó en modelos animales que

ambos paradigmas de actividad favorecen tanto la neurogénesis adulta en GD (108-110), como el incremento en el tamaño del TIP (107), (Figura 6).

**Figura 6. La actividad epileptogénica incrementa el volumen del TIP y la neurogénesis en el GD de hipocampo adulto de ratón** (imágenes tomadas del trabajo de Römer y col., 2011). A los 15 días posteriores a inducir el status epileptico mediante la administración de ácido kaínico, los ratones (B) mostraron un incremento en el TIP en comparación a los animales controles (A), como puede verse señalado con flechas (tinción con sinaptoporina, marcador de las MF). A los 7 días posteriores al status epileptico se visualizó también un fuerte incremento en el número de células BrdU+ (marcador de células en división) en los ratones inducidos con kaínico (D) en comparación a los controles (C). Se registró luego que dicha proliferación celular retornó a sus condiciones basales dentro de la segunda semana post inducción, no registrándose diferencias significativas a los 15 (E) y 28 (F) días de inducido el status epileptico con respecto a los controles tratados con vehículo. Escala (A-F): 100µm. glc: capa celular granular del GD. hl: hilus.



Por otra parte, también se ha observado que estos dos eventos de plasticidad pre-sináptica estructural muestran signos de co-regulación a pesar de tener un control genético en gran medida independiente. La evidencia sugiere que el tamaño del TIP sería dinámicamente influenciado por incrementos en la neurogénesis observada luego de un estímulo neurogénico. En el trabajo de Römer y col. (107), se determinó que la administración de un agente convulsivante, como es el ácido kaínico (AK), aumentó unas seis veces la proliferación celular de nuevas neuronas granulares del GD a los 7 días posteriores a la inducción de actividad epileptogénica. En esta ventana temporal temprana luego de la actividad originada no se detectaron cambios en las proyecciones axonales que conforman el TIP, presumiblemente, según los autores, porque en ese momento las nuevas neuronas originadas aún no han extendido sus axones. Sin embargo, encontraron un fuerte aumento en el volumen del TIP a los 15 días después de la inyección de AK, mientras que en otras áreas como el hilus y el tracto principal no se encontraron diferencias entre animales control y los inducidos a actividad.

El aumento de las MF en el estrato oriens del área CA3 después de la actividad epileptica ha sido informado también por trabajos anteriores (111,112), lo cual apoya la



propuesta de Römer de que los axones de las neuronas neonatas contribuyen a los cambios dinámicos en el TIP luego de la neurogénesis inducida por la administración de AK. Este trabajo muestra entonces que la distribución de las MF en animales adultos puede ser regulada dinámicamente con estímulos que influyen en el número de nuevas neuronas, como el ambiente enriquecido o la actividad convulsiva. Sin embargo, los autores también observaron que si bien esas nuevas neuronas contribuyen con sus axones principalmente hacia el TIP, no lo hacen de manera exclusiva, aportando también nuevos axones al tracto principal, por lo tanto el vínculo entre ambos eventos de plasticidad estructural no sería una relación causal exclusiva (107).

Durante un período de aproximadamente 2-4 semanas después de la división de las células precursoras en el GD adulto, las neuronas recién nacidas muestran una excitabilidad aumentada en comparación con las células granulares maduras (113,114). Se ha especulado que este período inmaduro pero altamente excitable puede ser la fase durante la cual las nuevas neuronas contribuyen a la función del hipocampo (114,115). Esta etapa coincidiría con la fase de maduración inmediatamente posterior al contacto sináptico en CA3 (116). Desde esta perspectiva, una asociación y co-regulación de la plasticidad de las MF y la neurogénesis adulta vuelve a parecer razonable.

En resumen, de acuerdo con las evidencias mencionadas, se ha demostrado que el tamaño del TIP está asociado con los niveles de neurogénesis adulta después de estímulos neurogénicos, sugiriendo que las neuronas recién nacidas en el GD adulto contribuyen principalmente a la morfología del TIP.

### **Cambios dinámicos en el tamaño del TIP**

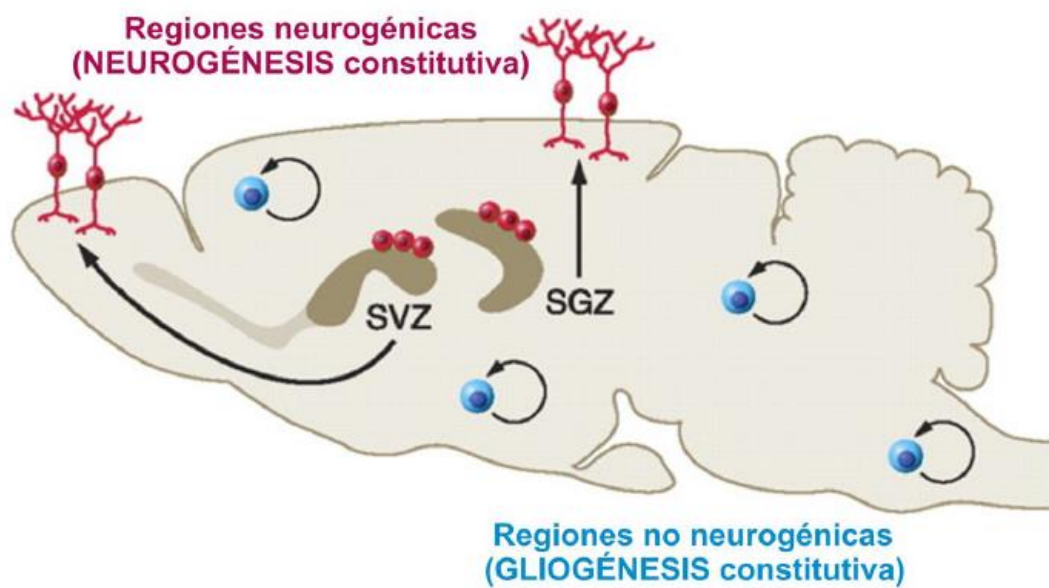
Con respecto al TIP, su considerable plasticidad fue notada tempranamente (117,118), al igual que la correlación positiva entre su tamaño y el rendimiento de los animales en una gran variedad de test conductuales de memoria espacial, existiendo abundante evidencia al respecto (91,117,119-124). Sin embargo, el mecanismo fisiológico por el cual un TIP relativamente más grande se correlaciona positivamente con la función del hipocampo sigue siendo desconocido. Una posible explicación puede ser que el tracto principal forma contactos con las dendritas apicales de las células piramidales en CA3, mientras que el TIP forma principalmente sinapsis con las dendritas basales (125), resultando en inputs que difieren en sus propiedades electrofisiológicas y contenido de información. Las excrescencias espinosas (el componente postsináptico en la sinapsis de las MF) están más cerca del cuerpo celular piramidal en las dendritas basales que en las dendritas apicales (126) y la mayor proximidad de las sinapsis de las MF que conforman el TIP sobre las dendritas basales, proporcionaría una mayor influencia en el potencial de membrana somático (127). Por lo

tanto, las variaciones de la distribución de las MF que conforman el TIP pueden influir en la forma en que las células granulares impulsan a las células piramidales en CA3.

### **Neurogénesis hipocampal adulta**

La neurogénesis adulta consiste en el proceso de generación de nuevas neuronas en el cerebro adulto, una vez ha cesado el desarrollo. Este proceso comprende desde las señales que inducen la división de la célula precursora hasta su diferenciación y establecimiento definitivo como nueva neurona funcional en la red neuronal y sináptica preexistente (128).

Las zonas del cerebro capaces de producir nuevas neuronas se conocen como regiones neurogénicas. En el cerebro adulto de mamíferos, se han identificado dos regiones claramente definidas por la presencia de células madre o precursores neuronales: la zona subventricular de los ventrículos laterales (SVZ, del inglés "subventricular zone") y la zona subgranular (SGZ, del inglés "subgranular zone") del GD de hipocampo (129-131), (Figura 7). En ambas regiones se generan nuevas neuronas durante toda la vida del animal, aunque la tasa de producción puede cambiar con la edad según la especie. Los precursores neuronales situados en la SVZ migran a lo largo de la corriente migratoria rostral, hasta alcanzar el bulbo olfatorio, donde se diferencian y maduran a interneuronas; mientras que, las situadas en la SGZ dan lugar a células granulares del GD, donde se conectarán sinápticamente con las vías aferentes procedentes de la corteza entorrinal y enviarán sus axones con información eferente a las neuronas piramidales de CA3.



**Figura 7. Regiones neurogénicas y no neurogénicas.** La generación de nuevas neuronas está restringida en el cerebro adulto de ratón a dos regiones: el hipocampo (SGZ, zona subgranular de giro dentado) y los ventrículos laterales (SVZ, zona subventricular de los ventrículos laterales) (neurogénesis constitutiva en rojo). Son varias las regiones no neurogénicas de las cuales se han hallado evidencias de su potencial neurogénico bajo un determinado estímulo o circunstancia, aunque en condiciones fisiológicas producen únicamente células gliales (gliogénesis constitutiva en azul). Modificado de Martino y col., 2010 (220).

En cuanto al proceso de neurogénesis hipocampal adulta, se ha demostrado fehacientemente que las nuevas neuronas son capaces de procesar información de la misma manera que las neuronas granulares preexistentes en el hipocampo adulto (132). El GD, donde tiene lugar dicho proceso, posee una organización en capas. Así, los precursores neuronales se localizan en la zona subgranular (SGZ) que queda delimitada por la capa de somas de las células granulares y el hilus (133).

La tasa de neurogénesis hipocampal es regulada por estímulos fisiológicos; por ejemplo, la actividad física voluntaria, el ambiente enriquecido, algunos paradigmas de aprendizaje y condiciones patológicas como la epilepsia y la isquemia aumentan el número de neuronas nuevas (134–136). Por el contrario, situaciones de estrés, depresión y envejecimiento disminuyen la tasa de generación de nuevas células neuronales (137,138).

Las células de GD recién nacidas tienen poca semejanza con sus homólogos maduros y deben someterse a un largo proceso de maduración morfológica y fisiológica. En ciertos aspectos, la maduración de las neuronas neonatales en el hipocampo adulto sigue mecanismos similares al desarrollo del cerebro fetal. Así, durante el proceso de neurogénesis hipocampal adulta tienen lugar los siguientes eventos (139) (Figura 8):

### 1. Proliferación

Las células madres o precursores neuronales de la SGZ proliferan generando células progenitoras neurales (128). En roedores, la duración del ciclo mitótico de los precursores es de 12 a 24 horas, lo que lleva a la producción de aproximadamente entre 8.000 y 10.000 nuevas neuronas por día (140,141). Dado que el GD consiste de aproximadamente un millón de células granulares (35% del total del hipocampo), este fenómeno es capaz de generar un poco menos de 1% del total de células granulares cada día. Sin embargo, se ha estimado que en condiciones normales la tasa de muerte de las nuevas células generadas es alrededor del 50% durante sus primeros días, disminuyendo con la edad de la nueva neurona (142).

Estas células progenitoras neuronales en desarrollo reciben las primeras entradas sinápticas GABAérgicas, siendo particularmente sensibles a dicha estimulación (143,144). Del mismo modo, las células precursoras responden a estos estímulos mediante el aumento de la proliferación celular (145).

### 2. Diferenciación

Las células progenitoras neuronales sobrevivientes se diferencian principalmente en células granulares glutamatérgicas (80-85%), que viven durante meses en el GD (hasta 11 meses testeados), integrándose en los circuitos (142). Sin embargo también algunos progenitores neuronales se diferencian en interneuronas GABAérgicas, mientras que una menor proporción lo hacen en astrocitos, oligodendrocitos o microglía (146).

### 3. Migración

Las nuevas neuronas hipocampales no migran grandes distancias, sino que se producen en la SGZ y tienen su destino a pocas micras de distancia en la capa granular, en el propio GD, donde maduran y se integran a circuitos ya existentes.

### 4. Contacto dendrítico y axonal.

En roedores, a los 10-14 días de edad, las nuevas neuronas generadas extienden sus dendritas dentro de la capa molecular del GD y envían su axón, es decir las MF, hacia CA3, donde posteriormente contactan con neuronas piramidales (147). En particular, estas células son activadas tónicamente por el GABA (148).

### 5. Integración sináptica.

Durante la tercera semana después del nacimiento, las nuevas células de GD comienzan a formar conexiones aferentes y eferentes con la red neuronal local. Alrededor del día 16, comienzan a aparecer espinas en las dendritas de estas células, formando sinapsis con las fibras axonales aferentes procedentes de la corteza entorrinal (149). La mayoría de los filopodios de las nuevas células de GD hacen blanco con botones axonales que ya han establecido sinapsis con espinas existentes en otras células de GD formando múltiples botones sinápticos, lo que sugiere que la integración en la red de las nuevas células de GD está influenciada por la actividad sináptica local (150). De manera similar, los botones de las

MF de estas nuevas células forman inicialmente sinapsis con dendritas de neuronas piramidales de CA3 en una región cercana a excrecencias espinosas existentes o directamente con excrecencias existentes que ya contienen un botón (149,150). Esto indicaría que la formación de sinapsis eferentes de las nuevas neuronas de GD también puede verse afectada por las sinapsis existentes. Por lo tanto, el desarrollo de las conexiones aferentes y eferentes de las células recién generadas parece implicar la orientación de socios sinápticos preexistentes, lo que sugiere un papel para la actividad del circuito en la integración de las nuevas células granulares producto de la neurogénesis adulta.

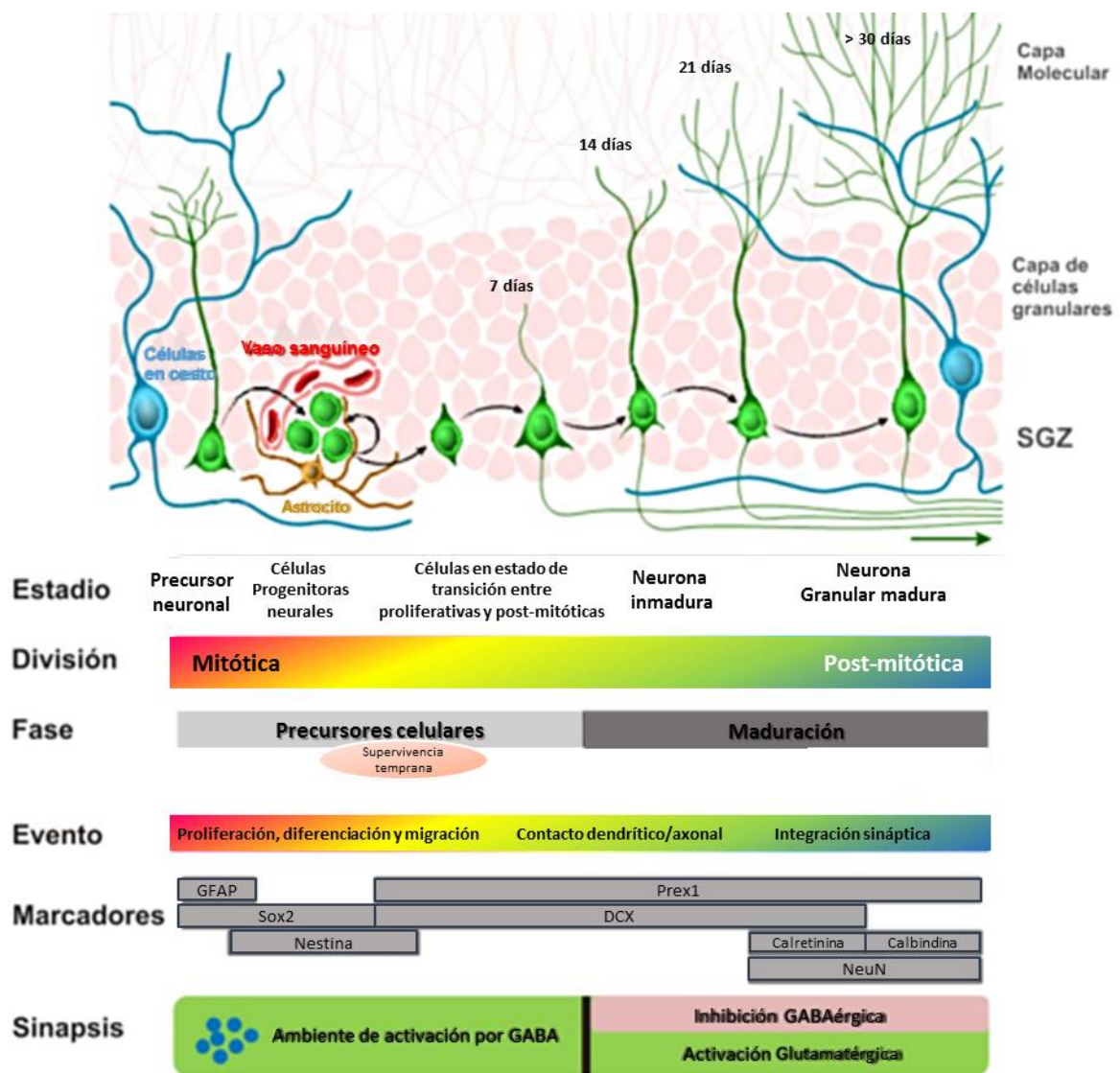


Figura 8. Esquema temporal del desarrollo de nuevas neuronas granulares adultas en el GD de ratón. Secuencia propuesta de tipos celulares en la neurogénesis del hipocampo adulto. Cinco estadios de desarrollo neuronal pueden identificarse según morfología, capacidad proliferativa, expresión de marcadores y conectividad sináptica. Modificado de Encinas y col., 2011 y Aimone y col., 2014 (221,222).

---

# HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

---

RTT es uno de los pocos trastornos del espectro autista de origen monogénico que se traduce en retraso mental, disfunción motora, convulsiones, y características de autismo. En 1999 se describió que la principal causa de RTT consiste en mutaciones en la proteína unidora de metil-CpG 2 (MeCP2). Esta proteína es un miembro de la familia de proteínas unidoras de metil-CpG en el ADN que se unen a promotores de genes y regulan su expresión. Alteraciones en esta proteína se han encontrado en pacientes con desórdenes de aprendizaje y neuropatologías asociadas, lo cual sugiere que esta proteína juega un papel importante en el desarrollo y mantenimiento de los circuitos neuronales. La comprensión de los mecanismos patológicos que llevan a este síndrome sería de gran importancia para conocer las bases de estos trastornos y para impulsar el desarrollo de terapias. A pesar de que se ha establecido una relación de causalidad para RTT, poco se sabe acerca de los mecanismos moleculares por los cuales mutaciones en MeCP2 causan defectos del neurodesarrollo y el complejo curso clínico de RTT.

Es importante mencionar que, al analizar la bibliografía existente referente al papel que cumple MeCP2 en el neurodesarrollo, observamos que la gran mayoría de los estudios realizados se concentraron en el efecto causado por mutaciones en MeCP2 sobre los componentes postsinápticos de las conexiones neuronales, es decir arborizaciones dendríticas, morfología y densidad de espinas dendríticas. Esto se debe posiblemente a que la evidencia temprana de los estudios post mortem en pacientes con RTT apoyó la hipótesis de que dicha enfermedad es un trastorno del refinamiento dendrítico y plasticidad sináptica. Por lo tanto, la mayoría de los esfuerzos han abordado el papel de MeCP2 en el desarrollo y la función dendrítica, encontrándose prácticamente inexplorada la importancia funcional que tiene MeCP2 sobre los componentes presinápticos (crecimiento de axones, refinamiento y guiado axonal, etc.), igualmente importantes en la conectividad neural. Es por esto que en la presente Tesis la atención se centró en describir como se encuentran afectados estos elementos presinápticos ante alteraciones en MeCP2, tanto durante el neurodesarrollo como en el mantenimiento y respuesta a estímulos.

Nuestra **hipótesis general de trabajo** establece que MeCP2 cumple un papel crítico en los procesos de guiado, refinamiento y plasticidad axonal dependiente de actividad neural. La falta de MeCP2 normal durante el neurodesarrollo, alteraría la expresión de moléculas involucradas en el crecimiento, guiado y refinamiento de axones, generando defectos a largo plazo en la estructura y la función presináptica. Estos defectos constituirían la base neurobiológica de algunas de las alteraciones de comportamiento presentes en estos desórdenes.

El **objetivo general** del presente proyecto es definir mecanismos celulares y moleculares por los cuales mutaciones en MeCP2 generan defectos presinápticos y afectan la conectividad del circuito MF-CA3 de hipocampo.

**Objetivo 1: Identificar los defectos inducidos por mutaciones en MeCP2 sobre la formación del circuito hipocampal durante el neurodesarrollo.**

**1A.** Determinar el papel de MeCP2 en la formación y maduración del circuito MF -CA3 del hipocampo. Para ello se analizará el crecimiento axonal y trayectoria hacia el blanco en modelos animales mutantes para MeCP2.

**1B.** Examinar los niveles de expresión de moléculas involucradas en el establecimiento de la conectividad neural: semaforinas clase 3 y neurotrofinas, durante el neurodesarrollo postnatal del hipocampo de dichos animales.

**Objetivo 2: Definir mecanismos por los cuales mutaciones en MeCP2 interfieren con procesos de plasticidad estructural pre-sináptica dependiente de actividad en hipocampo adulto.**

**2A.** Analizar cómo la exposición de animales mutantes a actividad epileptogénica afecta la plasticidad del circuito MF-CA3, incluyendo: eventos de neurogénesis adulta, maduración neuronal y cambios dinámicos en el TIP.

**2B.** Examinar cómo la actividad sináptica afecta la expresión de genes implicados en la conectividad, en particular miembros de la familia de semaforinas clase 3 y BDNF en animales mutantes para MeCP2.

**Objetivo 3: Evaluar la correlación entre las alteraciones estructurales presentes en hipocampo y alteraciones cognitivas en ratones mutantes para MeCP2.**

**3A.** Evaluar el desempeño (aprendizaje y memoria espacial) de animales WT y mutantes en un test de memoria espacial (Laberinto de Barnes).



---

# MATERIALES Y MÉTODOS

---

## MATERIALES

### REACTIVOS DE BIOLOGÍA MOLECULAR

GoTaq ADN polimerasa, desoxirribonucleótidos trifosfato (dNTPs), Buffer de reacción para GoTaq 5X, Inhibidor de ARNasa recombinante (RNasin), Enzima transcriptasa reversa M-MLV, Marcador de peso molecular para ADN 100 pb, buffer de carga 6X para ADN y Agarosa se obtuvieron de Promega (Madison, WI, USA). Reactivo DAB (3,3'-tetrahidrocloruro de diaminobencidina), Bromuro de Etidio, Ácido kaínico (AK), fueron adquiridos de la empresa Sigma-Aldrich (Saint Louis, MO, USA) y 5-bromo-2-desoxiuridina (BrdU) de Roche (Mannheim, Germany). TRIzol, ADNasa I y Mezcla para PCR en tiempo real (SYBR Green) se adquirieron en Invitrogen (Life Technologies, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). El resto de los reactivos utilizados fueron de calidad analítica, de la mayor pureza disponible.

### MODELOS ANIMALES

Para la realización de esta tesis se utilizaron ratones mutantes para MeCP2 del **modelo MeCP2-308**. Estos animales portan un codón prematuro de terminación en el aminoácido 308, generando una proteína MeCP2 trunca que carece de la región C-terminal (20). En dicho modelo, los signos característicos (dificultades respiratorias, temblores, “clasping” de patas traseras) comienzan alrededor de la sexta semana de vida y los animales sobreviven hasta el año de edad.

Este modelo animal (B6.129S-Mecp2<sup><tm1Hzo>/J</sup>, Stock 005439) fue obtenido de The Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME, USA) y los animales se alojaron en el Bioterio del Departamento de Química Biológica- CIQUIBIC de la Facultad de Ciencias Químicas. Los animales fueron mantenidos en una sala con aire filtrado y condiciones controladas de luz/oscuridad (12hs/12hs) y temperatura (22°C ± 2), con provisión de agua y alimento estériles ad libitum (alimento balanceado “Cooperación” irradiado). La colonia se mantuvo en un background C57BL/6J, para lo cual hembras heterocigotas portadoras de la mutación en MeCP2 fueron apareadas con machos WT de la cepa C57BL/6J (obtenidos del INIMEC, Córdoba, Argentina). Las crías fueron genotipificadas y en todos los experimentos desarrollados en esta tesis se trabajó con animales WT y mutantes (MUT) de la misma camada y sólo con ratones machos a fin de evitar las variaciones generadas por el proceso de inactivación aleatoria del cromosoma X, (**machos MUT: hemicigotas MeCP2<sup>308/Y</sup>**). Dado que el gen MECP se encuentra en el cromosoma X, las hembras presentan un espectro de manifestaciones y de porcentajes de expresión de los alelos WT y mutante en los distintos tejidos, lo que dificulta la interpretación de los resultados. Por eso, en la mayoría de los casos se utilizan los ratones machos WT y MUT

Parte de los experimentos del segundo bloque experimental de la presente Tesis, fueron asimismo realizados utilizando el modelo animal de ratones KO para MeCP2 (**modelo MeCP2Bird**), durante la pasantía de investigación de cuatro meses que realicé en Johns Hopkins Medical Institute de Baltimore, USA. El modelo KO fue obtenido de The Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME, USA), cepa B6.129P2(C)-Mecp2<sup>tm1.1Bird</sup>/J, Stock 003890 y fueron mantenidos y generados de manera similar a lo explicado para el modelo mutante. Los ratones del modelo MeCP2Bird (**machos hemicigotas: MeCP2<sup>+/Y</sup>**) son KO condicionales que portan una deleción en los exones 3 y 4 del gen MECP2 que se produce al comienzo del desarrollo embrionario, causando la ausencia total de la proteína MeCP2 en el animal. Alrededor de 5 semanas de edad, los ratones machos KO muestran hipoactividad, “clasping” de las patas traseras, temblor, reducción del peso corporal y cerebral y mueren alrededor de las 10-12 semanas de edad (35).

## LABERINTO DE BARNES

Se utilizó el test de Barnes para evaluar si existían déficits cognitivos en el aprendizaje y la memoria espacial de ratones MUT para MeCP2 (MeCP2<sup>308/Y</sup>) en comparación con el grupo WT (compañeros de camada). Para tal fin se construyó un laberinto de Barnes para ratón el cual consistió en una plataforma circular construida a partir de una losa de PVC blanco con un diámetro de 92 cm. Veinte orificios con un diámetro de 5 cm se hicieron en el perímetro (separados entre sí por 7,5 cm y a 2 cm de distancia desde el borde de la plataforma). Por debajo de uno de los orificios de la plataforma (orificio blanco) se colocó una caja de escape negra de 20 cm de largo, por 9 cm de alto y 9 cm de ancho, con una rampa en su interior (Figura 9A y B).

La plataforma circular se ubicó a una altura de 1 m desde el suelo y por sobre la misma, a 1 m de distancia, se alumbró con dos focos de luz blanca de 150 W cada uno. Señales visuales constituidas por paneles con formas simples coloreadas (cuadrados, triángulos, estrellas) fueron montadas alrededor de la habitación donde se realizó el test (Figura 9C). La totalidad de las sesiones fueron grabadas usando una cámara de 12 megapíxeles colocada por encima de la plataforma (Figura 9D).



**Figura 9. Laberinto de Barnes.** *A y B.* Laberinto de Barnes para ratón conformado por una plataforma circular de 92 cm de diámetro con 20 orificios de 5 cm de diámetro ubicados en la periferia de la misma. La caja de escape negra se ubica por debajo de uno de los orificios (blanco) de la plataforma. *C.* Señales visuales coloridas (estrella rosa y triángulo azul) colocadas a los lados del orificio blanco. *D.* Imagen de grabación de una sesión de entrenamiento de un ratón durante el test de Barnes.

**ANTICUERPOS.***Tabla 1. Anticuerpos primarios empleados en la presente tesis doctoral.*

<b>ANTICUERPOS PRIMARIOS</b>					
<b>Proteína que reconoce</b>	<b>Abreviatura</b>	<b>Hecho en:</b>	<b>Dilución IHQ</b>	<b>Fabricante</b>	<b>Número de catálogo</b>
Calbindina D-28k	<b>Cb</b>	Cabra	1/500	Chemicon (Billerica, MA, USA)	AB1778
3,3'-tetrahidrocloruro de diaminobencidina	<b>BrdU</b>	Ratón	1/1000	Roche (Basilea, Suiza)	11170376001
Beta tubulina clase III	<b>Tuj1</b>	Ratón	1/1000	Covance (Princeton, New Jersey, USA)	MMS-435P
Proteína ácida fibrilar glial	<b>GFAP</b>	Conejo	1/250	Sigma-Aldrich Co. LLC (St. Louis, MO, USA)	G9269
Proteína nuclear neuronal	<b>NeuN</b>	Pollo	1/1000	LSBio (Seattle, Washington, USA)	C149132
Doblecortina	<b>DCX</b>	Cabra	1/200	Santa Cruz Biotechnology (Dallas, Texas, USA)	sc-8066
Tropomyosin-related kinase B receptor	<b>P-TrkB</b>	Conejo	1/250	Millipore (Billerica, MA, USA)	ABN1381
Sinaptoporina	<b>Synpr</b>	Conejo	1/1000	Synaptic Systems (Goettingen, Germany)	102 002
Transportador vesicular de glutamato	<b>Vglut</b>	Conejo	1/1000	Chemicon (Billerica, MA, USA)	AB5905

## MÉTODOS

### GENOTIPIFICACIÓN DE LOS ANIMALES

A los 14 días de edad todas las crías de las cruzas realizadas entre madres heterocigotas de los modelos MeCP2-308 y MeCP2Bird con machos WT de la cepa C57BL/6J fueron genotipificadas para la posterior utilización de los machos en los diversos experimentos relacionados a los objetivos de la presente tesis y de las hembras heterocigotas como stock para futuras cruzas y mantención de la colonia.

#### I. Aislamiento de ADN genómico

Para la obtención de ADN genómico se partió de una muestra de la punta de la cola de cada ratón (aproximadamente 1-2 mm) y se colocó en un tubo Eppendorf identificado para cada animal. Luego para la degradación del tejido se agregó a cada tubo 500  $\mu$ l de NaOH 0,05 M y se incubó a 90°C en baño de María por aproximadamente 30-45 min o hasta que el tejido quede disgregado. A continuación se neutralizó la solución agregando a cada tubo 50  $\mu$ l de Tris-HCl 1 M pH 8,0 y se procedió a la centrifugación de las muestras durante 5 min a 14000 g para descartar los restos del homogenato y pasar el sobrenadante conteniendo el ADN a un nuevo tubo, quedando así lista la muestra para utilizarla en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés). El ADN genómico en suspensión fue almacenado a -20°C hasta ser analizado.

#### II. Reacción en cadena de la ADN polimerasa

A cada tubo de PCR se le agregaron 2  $\mu$ l de la muestra de ADN genómico, 0,6  $\mu$ l de cada solución madre de 20  $\mu$ M de primer (las secuencias de los iniciadores se obtuvieron a partir del sitio web de The Jackson Laboratories que comercializa los animales, ver Tabla 2) y 3,5  $\mu$ l de la mezcla de PCR constituida por los siguientes reactivos: 1,2  $\mu$ l de Buffer libre de Mg 10X, 1,2  $\mu$ l de MgCl<sub>2</sub> 25 mM, 0,1  $\mu$ l de Tag Polimerasa (5 U/ $\mu$ l) y 1  $\mu$ l de dNTP 2,5 mM (siguiendo las especificaciones del fabricante). Luego se llevó toda la mezcla a un volumen final de 12  $\mu$ l con agua milliQ estéril.

Las reacciones de PCR se realizaron en el termociclador Mastercycler gradient (Eppendorf, Hamburgo, Alemania), utilizando el siguiente esquema estándar de ciclos de temperatura:

- 1- Denaturalización inicial del ADN a 94°C por 3 minutos.
- 2- Denaturalización del ADN a 94°C por 30 segundos.
- 3- Unión de los primers al ADN molde a 62°C por 30 segundos.
- 4- Polimerización y extensión de los fragmentos a amplificar por la polimerasa a 72°C por 1 minuto.
- 5- Repetición de la curva de temperaturas desde el paso 2 al 4 durante 35 ciclos.

6- Finalmente al programa se da término con una extensión de la polimerasa de 2 minutos a 72°C, para asegurar la completa polimerización de los productos amplificados.

**Tabla 2.** Secuencia de los primer empleados para la PCR en la genotipificación de los animales.

<b>Secuencias de los INICIADORES o PRIMERS para PCR</b>		
<b>Primers o cebadores para MeCP2-308</b>		
ARN mensajero	Secuencias 5'→3'	Tamaño del amplicón
MeCP2 T1F	AACGGGGTAGAAAGCCTG	WT= 396 nt
MeCP2 T1BR	ATGCTCCAGACTGCCTG	MUT= 318 nt
MeCP2 T1AR	TGATGGGGTCCTCAGAGC	HET=396/318
<b>Primers para MeCP2Bird</b>		
ARN mensajero	Secuencias 5'→3'	Tamaño del amplicón
MeCP2 WT f	CCACCCTCCAGTTTGGTTTA	WT= 400 nt
MeCP2 WT r	GACCCCTGGGACTGAAGTT	KO= 450 nt
MeCP2 KO r	CCATGCGATAAGCTTGATGA	HET=400/450

### III. Electroforesis de ADN en geles de agarosa.

Los productos de la PCR se corrieron en una electroforesis en gel de agarosa al 2 %. La preparación de cada gel de agarosa se realizó pesando 1 g de agarosa para preparar 50 ml de gel, disolviendo la misma en 50 ml de solución buffer TAE 1X (10 mM Tris-HCl pH 8,0, 1 mM EDTA pH 8,0), esta mezcla se fundió en un horno hasta lograr una completa disolución de la agarosa, evitando la ebullición de la mezcla. Se dejó enfriar la mezcla a temperatura ambiente y se le agregó 2,5 µl de bromuro de etidio a partir de una solución stock de 10 mg/ml. Posteriormente se vació la mezcla en el molde de acrílico de la cámara electroforética (Bio Rad, California, USA) y se colocó el respectivo peine (de acuerdo a la cantidad de muestras a sembrar) para formar los pocillos en el gel a polimerizar.

La separación por tamaño molecular de los fragmentos de ADN se realizó sometiendo el gel y las muestras de ADN (mezcladas con 2 µl de buffer de siembra) a una migración electroforética de corriente a voltaje constante (100 mV) con el mismo buffer TAE 1X de preparación del gel. El tamaño de los fragmentos separados se estimó comparando las bandas obtenidas con un marcador de peso molecular (100 pb ADN ladder), los cuales se cargaron en el gel junto a las muestras y controles. Se identificaron los fragmentos de ADN luego de la electroforesis, visualizándolos por emisión de luz UV resultante de la incorporación del bromuro de etidio a la doble hebra de ADN. Todos los resultados obtenidos a partir de electroforesis en geles de agarosa fueron registrados utilizando el transluminador UV (Ultraviolet Transilluminator BioImaging Systems) acoplado a un sistema de documentación fotográfica (Gel Doc-it, Imaging System).

Para el caso de los ratones MeCP2-308 los resultados posibles de la genotipificación pueden ser los siguientes patrones de bandas en la corrida electroforética:

- ✓ Una banda de 396 pares de bases (pb) para ratones WT.
- ✓ Una banda de 318 pb para ratones MUT.
- ✓ Dos bandas (una de 396 pb y otra de 318 pb) para ratones hembras heterocigotas.

Patrones de bandas en la corrida electroforética de muestras de ratones MeCP2Bird:

- ✓ Una banda de 450 pb para ratones KO
- ✓ Una banda de 400 pb para ratones WT
- ✓ Dos bandas (una de 450 pb y otra de 400 pb) para ratones hembras heterocigotas.

## INDUCCIÓN DE ACTIVIDAD NEURONAL

A fin de evaluar eventos de plasticidad estructural pre-sináptica de hipocampo ante defectos en MeCP2, ratones de ambos modelos mutantes para dicha proteína fueron sometidos a un paradigma de actividad en vivo. Dos formas bien establecidas de inducir actividad neuronal son la inducción de actividad epileptogénica, por ejemplo mediante la administración de AK, o exponer el animal a un ambiente enriquecido en donde se colocan distintos elementos novedosos en la caja donde se hospeda el ratón (ruedas para correr, tubos, rampas, etc) (107,151). En nuestro caso, considerando principalmente las limitaciones del bioterio utilizado, en cuanto a disponibilidad de espacio y tiempo de uso experimental necesarios para monitorear cada animal por separado, el paradigma de actividad en vivo elegido fue la inducción de actividad epileptogénica mediante la administración de AK, un agente convulsivante. La actividad epileptogénica en la formación hipocampal aumenta fuertemente el número de nuevas neuronas del GD (107,110,152,153). Por lo tanto, se utilizó AK para la inducción de convulsiones en nuestros modelos de ratones (mantenidos en la cepa C57BL/6) para potenciar fuertemente la neurogénesis sin llevar a la muerte celular masiva ni a un brote de MF supragranulares o una reorganización estructural del hipocampo, debido a la relativamente alta resistencia de esta cepa a insultos excitotóxicos (107,154).

Ratones machos adultos WT y MUT de 9 semanas de edad (P63) del modelo MeCP2-308, y ratones WT y KO de 6 semanas (P42) del modelo MeCP2Bird fueron administrados con una sola inyección intraperitoneal (ip) de AK (dosis: 20 mg de ácido AK/kg de peso) a partir de una solución madre de 5 mg/ml preparada en solución tampón de fosfato salino estéril (PBS) 0,01 M. A su vez, dentro de cada modelo animal se establecieron grupos controles conformados por ratones MUT/KO y sus respectivos compañeros de camada WT a los cuales se les administró una inyección ip de PBS estéril en un volumen equivalente a los inyectados con AK. De este modo, dentro de cada modelo mutante para MeCP2 quedaron establecidos 4 grupos experimentales: MUT (o KO) AK, MUT (o KO) control, WT AK y WT



control. La diferencia con respecto a la edad en la que se administró el tratamiento con AK en animales de los dos modelos (MUT y KO), se debió fundamentalmente a que la supervivencia de los KO es mucho menor que la de los ratones MUT.

La edad de tratamiento con AK en ratones del modelo MeCP2-308 fue determinada luego de realizar pruebas piloto a distintas edades. A las 6 semanas, los ratones MUT resultaron ser resistentes a AK, no se evidenciaron convulsiones ni tampoco un aumento en la expresión de genes inducidos por actividad sináptica (BDNF o Arc medidos por real time PCR en hipocampo). Por otra parte, los animales MUT de 12 semanas de edad ya mostraban síntomas como temblores marcados y resultaron ser muy sensibles al tratamiento con AK (datos no mostrados). En base a estas observaciones y con el objeto de inducir una estimulación controlada, decidimos utilizar ratones de 9 semanas de edad para el tratamiento con AK en el modelo MeCP2-308. En el caso del modelo MeCP2Bird, se utilizó una edad ya reportada en la literatura (155).

En los animales inyectados con AK se registró la respuesta epileptogénica, la cual se hace evidente luego de aproximadamente 20 minutos de administrada la dosis del agente convulsivante. Desde el momento de la inyección con AK hasta finalizado el efecto del mismo, los animales fueron alojados individualmente en cajas separadas. La severidad de la respuesta epileptogénica fue graduada de acuerdo a la siguiente escala: 0- similar al control; 1- echado con aumento del ritmo respiratorio; 2- en estado de “congelación” y con contracciones erráticas del cuerpo; 3- cola recta y tiesa con o sin sacudidas; 4- las patas delanteras comienzan a temblar; 5- cola recta y tiesa junto con temblor de patas delanteras (una vez); 6- continuamente (más de dos veces) muestra cola recta y tiesa junto con temblor de pata delanteras; 7- convulsiones tónico clónicas completas, saltos; 8- muerte (adaptado de McLeod 2013) (155).

## ADMINISTRACIÓN DE BrdU

Para el análisis de las nuevas neuronas granulares de GD, producto de la neurogénesis inducida por actividad neuronal, los ratones WT y MUT del modelo MeCP2-308 fueron sometidos a actividad epileptogénica y sus controles fueron inyectados (ip) con 3,3'-tetrahidrocloruro de diaminobencidina (BrdU), en dosis de 50 mg por Kg de peso, a fin de marcar las células progenitoras neurales del GD adulto. BrdU es un análogo sintético de la timidina, que se incorpora al ADN en la fase S del ciclo celular, y que permite la posterior identificación de las células en división y su progenie. Dicho compuesto se inyectó a partir de una solución madre de 10 mg/ml preparada en solución tampón PBS 0,01 M, con NaOH 1M, la cual fue sometida a sonicación.

Para el estudio de la proliferación de nuevas células granulares de DG inducida por la administración de AK, se marcaron diferentes cohortes de progenitores celulares en un

solo día. Para ello se aplicaron 3 dosis de BrdU (separadas por 6 hs) en el 6<sup>to</sup> día posterior a la inducción con AK, ya que alrededor de la primer semana luego de la inducción de actividad neuronal es el momento donde se detecta la mayor actividad proliferativa en el GD (107). Se eligió separar una dosis de otra por 6 hs debido que este tiempo mínimo descrTIPO para la duración del ciclo celular de las células progenitoras neurales del GD de ratones adultos (156). Los animales se perfundieron a los 2 días posteriores a la administración de BrdU.

Para el estudio de la maduración de nuevas células granulares de DG formadas a partir de la neurogénesis inducida por la administración de AK, se marcaron diferentes cohortes de progenitores celulares durante 3 días: 5<sup>to</sup>, 6<sup>to</sup> y 7<sup>mo</sup> días posteriores a la administración de AK (ventana temporal de mayor actividad proliferativa), inyectando 2 dosis por día, separadas por 7 hs. Los animales se perfundieron a las 4 semanas desde la última dosis de BrdU administrada, tiempo suficiente para que las nuevas células progenitoras neurales del GD alcancen una morfología característica de las células granulares maduras (157).

## PERFUSIÓN DE LOS ANIMALES

Los animales fueron anestesiados con una mezcla 2:1 de ketamina 50mg/ml y clorhidrato de xilazina 2% (300 µl cada 100 g de peso corporal). Con el fin de fijar el tejido cerebral se realizó una perfusión utilizando una bomba peristáltica P-3 (código 19-0626-01, Pharmacia, Estocolmo, Suecia), con mangueras de goma de 2 mm de diámetro interno y agujas de puntas romas de 21 G utilizadas para punzar el ventrículo cardíaco izquierdo. Primeramente se lavó la sangre con PBS filtrado 0,01 M a 4 °C, a 120 ml/h durante 15 min. A continuación se perfundió el tejido con paraformaldehído (PFA) 4 % en PBS 0,01M a 4 °C y a 120 ml/h por 20 min. El cerebro fue extraído de la cavidad craneal e incubado en PFA 4% por 24 h. Para su crioprotección, los tejidos cerebrales fueron pasados a soluciones de sacarosa de concentración creciente (15 % y 30% en PBS 0,01M) hasta que decantaran al fondo del recipiente. Finalmente, fueron embebidos en medio de montaje Cryoplast® (Biopack, Buenos Aires, Argentina) y conservados a -80 °C hasta ser cortados en un crióstato.

La perfusión de los distintos grupos experimentales de animales se realizó a diferentes edades post natales de acuerdo al experimento realizado.

- En la primer parte de esta Tesis, focalizada en el neurodesarrollo, donde se trabajó con el modelo MeCP2-308, 4 animales MUT y 4 WT (respectivos compañeros de camada) fueron perfundidos a las siguientes edades postnatales, de acuerdo a estudios previos (63): P14, previo al desarrollo del “pruning” del TIP; P30, durante el desarrollo del mismo y a P49 y P84, posterior a la finalización de dicho proceso.

- En la segunda parte de la Tesis, donde se trabajó con ratones tratados con AK (P63 de edad en modelo MeCP2-308 y P42 en modelo MeCP2Bird), las perfusiones se realizaron en distintos tiempos posterior a la inducción (107):
  - ✓ 8 días post inducción con AK, para el análisis de la proliferación celular de nuevas células granulares de GD producto de la neurogénesis inducida por actividad neuronal (ver más abajo).
  - ✓ 2 semanas post inducción con AK, para el análisis de cambios dinámicos en el volumen del TIP como respuesta plástica a la actividad neuronal (ver más abajo).
  - ✓ 5 semanas post inducción con AK, para el análisis de la maduración celular de las nuevas células granulares de GD producto de la neurogénesis inducida por actividad neuronal (ver más abajo).

## PREPARACIÓN DE CRIOSECCIONES

Secciones coronales de 20  $\mu\text{m}$  de espesor fueron cortadas con crióstato y adheridas a portaobjetos de vidrio previamente silanizados. Para cada cerebro se utilizaron 12 portaobjetos numerados, en cada uno se agruparon 6 secciones seriadas de cerebro, comenzando a tomar en el portaobjeto N°1 la primera sección a la altura del comienzo del hipocampo cuando se comenzaron a visualizar (mediante el uso de lupa) el GD y la región CA3 bien diferenciados. Cada una de las 11 secciones subsiguientes fueron adheridas a sendos portaobjetos numerados. La sección 13 se incorporó al portaobjeto N°1, luego cada una de las 11 secciones siguientes se adhirieron a los portaobjetos numerados y así sucesivamente hasta completar las seis secciones por vidrio. De este modo en el mismo portaobjeto quedó representado un fragmento de la región dorsal del hipocampo que abarca 240  $\mu\text{m}$  de largo del eje rostro-caudal (o septo-temporal) del mismo. Una vez listos los cortes se almacenaron a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  hasta su uso.

## INMUNOHISTOQUÍMICA (IHQ)

### IHQ enzimática (Peroxidasa) utilizando el cromógeno DAB

Esta técnica se utilizó para la marcación de las MF hipocampales a fin de medir luego los procesos de pruning y cambios dinámicos en el volumen del TIP. Para ello, los criocortes fueron secados durante toda la noche a  $37^{\circ}\text{C}$  y posteriormente se lavaron 2 veces con PBS 0,1M por 10 min. Luego se bloqueó la actividad peroxidasa endógena incubando los tejidos con 0,5% de peróxido de hidrógeno (30%) en PBS durante 20 min seguido de 3 lavados con PBS de 10 min cada uno. A continuación se permeabilizaron los tejidos durante 20 min a temperatura ambiente con Tritón X-100 0,2% en PBS, y se bloquearon con suero fetal bovino

(SFB) 4% (preparado en la solución de permeabilización) por 1 h a temperatura ambiente. Posteriormente se agregaron los anticuerpos primarios (Calbindina o Sinaptoporina) preparados en solución de bloqueo (ver diluciones en Tabla 1) y se incubaron toda la noche a 4°C (todo el procedimiento debe realizarse en cámara húmeda). Al día siguiente se lavaron los cortes con PBS 3 veces por 10 min cada una, se marcaron con el anticuerpo secundario ligado a biotina (preparado en PBS) durante 1 h a temperatura ambiente y se lavaron nuevamente dos veces en PBS por 10 min. A continuación los cortes se incubaron por 30 min con un complejo constituido por avidina conjugada con la enzima peroxidasa preparado en PBS en una dilución de 1/200 y luego los cortes se lavaron 3 veces en PBS por 10 min cada vez. Por último se revelaron los tejidos con la solución cromógena DAB (Vectastain, Vector Laboratories), conformada por 3-3´diaminobencina y peróxido de hidrógeno en buffer. Se detuvo la reacción mediante el lavado con agua milli Q y se montaron con Mowiol.

La peroxidasa reacciona con su sustrato específico, el peróxido de hidrógeno, formando un complejo que interacciona con el cromóforo DAB, quedando este último en estado oxidado y dando como resultado la formación de polímeros insolubles de una coloración marrón oscuro, lo que hace posible realizar preparaciones histológicas permanentes .

Los tejidos fueron observados y fotografiados con objetivos 10X de un microscopio Axioplan (Carl Zeiss) equipado con una cámara Olympus XM10. La imágenes obtenidas se analizaron con el programa FIJI/ImageJ (NIH).

### **Inmunofluorescencia**

Los criocortes fueron secados durante toda la noche a 37°C y se lavaron en PBS 3 veces por 10 min cada una. Luego los tejidos se permeabilizaron durante 20 min a temperatura ambiente con Tritón X-100 al 0,2% en PBS, y se bloquearon con SFB 4% (en PBS-Tritón X-100 al 0,2%) por 1 h a temperatura ambiente. A continuación se agregaron los anticuerpos primarios (preparados en solución de bloqueo, ver diluciones en Tabla 1) y se incubaron toda la noche a 4°C (todo el procedimiento debe realizarse en cámara húmeda). Al día siguiente se lavaron los cortes con PBS 3 veces por 10 min cada una y se marcaron con los anticuerpos secundarios durante 1 h a temperatura ambiente. Finalmente, se incubó con una solución de DAPI por 5 min a temperatura ambiente, se realizaron 3 lavados de 10 min y se montó utilizando Mowiol. Los tejidos fueron observados y fotografiados utilizando microscopios confocales Olympus Fluoview 1000 y 1200, objetivos 20X, 40X y 60X (de inmersión) y se analizaron con el programa FIJI/ImageJ (NIH).

### **BrdU- Inmunohistoquímica**

Con el fin de analizar las nuevas células granulares de GD producto de neurogénesis adulta (que incorporaron BrdU), se partió de criosecciones de cerebros de animales

inyectados con BrdU en distintas dosis y tiempos antes de su perfusión. La técnica IHQ utilizada para marcar las células BrdU positivas fueron similares a las descrtIPas en los dos apartados anteriores (con cromógeno DAB e inmunofluorescencia), con la diferencia de que en lugar de realizar el paso de permeabilización de los tejidos con Tritón X-100 0,2%, se realiza un paso clave en la técnica que es la desnaturalización con ácido clorhídrico (HCl) 1M, 0,1% Tritón por 30 minutos a 37 °C, colocando los tejidos en cámara húmeda y ésta a su vez en un baño de agua a la temperatura mencionada. Debido a que el anticuerpo monoclonal anti-BrdU está dirigido contra el BrdU que se incorpora a una sola hebra del ADN, es necesario desnaturalizar el ADN del tejido y es así que el procedimiento estándar para desnaturalizar el ADN implica la hidrólisis parcial del tejido con tratamiento con HCl (158). Seguidamente a la desnaturalización se procede con la neutralización de los tejidos incubando los mismos con borato de sodio 0,1 M, pH 8,5 durante 15 min a temperatura ambiente, seguido de dos lavados en PBS de 10 min cada uno. A partir de este punto se continuó con los pasos previamente descrtIPos de acuerdo a la técnica inmunohistoquímica realizada.

En los experimentos donde se realizaron inmunoflorescencias con doble o triple marcación de BrdU y otros marcadores neuronales, la incubación de los tejidos con los anticuerpos primarios y sus secundarios se realizó secuencialmente, comenzando en todos los casos con la incubación de los cortes con el anticuerpo anti-BrdU.

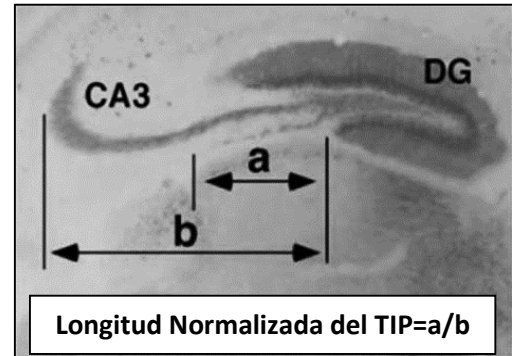
## **MEDICIÓN DEL PRUNING O REFINAMIENTO DEL TRACTO INFRAPIDAMIDAL (TIP)**

Las secciones coronales seriadas de 1 portaobjeto por animal fueron teñidas mediante la técnica IHQ con Peroxidasa y el cromógeno DAB arriba descrita, utilizando el anticuerpo contra calbindina (ver Tabla 1) un marcador neuronal que permite visualizar las células granulares maduras del GD y sus proyecciones axonales que conforman las MF (63). Las secciones fueron fotografiadas con un microscopio Axioplan (Carl Zeiss) equipado con una cámara Olympus XM10, utilizando un objetivo con magnificación 10X con el fin de fotografiar la totalidad de las MF por sección de hipocampo.

Se fotografiaron muestras de 4 ratones MUT y 4 ratones WT (respectivos compañeros de camada), de edades postnatales P14, P30, P49 y P84. El pruning del TIP se cuantificó siguiendo el protocolo de Bagri y col. (2003) (63). Se midió la relación entre la longitud del TIP con respecto a la longitud del tracto principal (longitud normalizada del TIP), (Figura 10). Utilizando el programa FIJI/ImageJ (NIH), se midió el largo del TIP (“a” en Figura 10) desde la punta inferior de la capa celular granular del GD, mientras que el largo del tracto principal (“b” en Figura 10) se midió desde la punta inferior del GD hasta el extremo de la curvatura de la región CA3. La longitud normalizada del TIP se calculó como:  $a/b$ , esta

relación ayuda a compensar el cambio de forma del hipocampo a través de su extensión septo-temporal (63), de modo que la desviación estándar en las longitudes del TIP normalizadas obtenidas de diferentes secciones para un animal dado fue inferior al 8% del valor medio (datos no mostrados). El uso de una relación también compensa los cambios en el tamaño del hipocampo durante el desarrollo.

**Figura 10.** *Cuantificación del pruning del TIP, utilizando la relación de la longitud del TIP con respecto a la longitud del tracto principal a la región CA3 ("longitud normalizada del TIP"). La longitud de TIP se midió desde la punta de la hoja inferior de la capa de células granulares del GD ("a"). La longitud del tracto principal se midió desde punta inferior del GD hasta el extremo de la curvatura de la región CA3 ("b"). La longitud normalizada del TIP se tomó como:  $a/b$ .*



Una vez calculadas todas las longitudes normalizadas del TIP, se calculó el promedio de las mismas para cada animal.

Por último se procedió a calcular el porcentaje de refinamiento del TIP de las muestras de ratones de edades P30, P49 y P84, calculando el acortamiento del tracto en cada animal de dichas edades con respecto al largo del TIP de las muestras P14 considerando como el 100%, ya que a esa edad el TIP aún se encuentra sin refinar.

## MEDICIÓN DE CAMBIOS EN EL VOLUMEN DEL TIP EN RESPUESTA A ACTIVIDAD NEURONAL

Las secciones coronales de 1 portaobjeto por animal fueron teñidas mediante la técnica IHQ con peroxidasa y el cromógeno DAB arriba descrito, utilizando el anticuerpo contra la proteína vesicular presináptica: sinaptoporina, que permite visualizar la totalidad de las proyecciones que conforman las MF (107). Las secciones fueron fotografiadas con microscopio Axioplan (Carl Zeiss) equipado con una cámara Olympus XM10, utilizando un objetivo con magnificación 10X con el fin de fotografiar la totalidad de las MF por sección de hipocampo.

Se fotografiaron muestras de ratones MUT y KO y sus respectivos compañeros de camada WT, inyectados con AK y controles (n= 4-6 por cada grupo experimental), los cuales fueron perfundidos dos semanas luego de la inducción de actividad, de acuerdo al trabajo de Römer y col. (2011). Estos autores describieron en ratones C57BL/6 que durante esa ventana temporal, el TIP sufre el mayor cambio en su volumen en respuesta a la actividad epileptogénica inducida por AK (107).

Siguiendo el protocolo de Römer y col. (2011), una vez obtenidas las fotografías de todas las muestras se procedió a medir el área del TIP en cada sección, utilizando para ello la herramienta de medición de área del programa FIJI/Image J (NIH). Luego, se obtuvo el

volumen del TIP por portaobjeto analizado multiplicando la suma de las áreas medidas por la inversa de la fracción de muestreo (12) y por 20 (el grosor de la sección en micrómetros) (107).

### **ANÁLISIS DE PROLIFERACIÓN DE NUEVAS NEURONAS GRANULARES DE GD PRODUCTO DE NEUROGÉNESIS**

Las secciones coronales de 1 portaobjeto por animal fueron teñidas mediante la técnica IHQ con Peroxidasa y el cromógeno DAB arriba descrita, utilizando el anticuerpo anti-BrdU, que permite visualizar las células en división de GD y su progenie. Las secciones fueron analizadas y fotografiadas con microscopio Axioplan (Carl Zeiss) equipado con una cámara Olympus XM10, utilizando objetivos con magnificación 20X y 40X con el fin de fotografiar la totalidad del GD por sección de hipocampo y poder contabilizar el número de células BrdU positivas.

Se analizaron muestras de ratones adultos MUT y sus respectivos compañeros de camada WT, inyectados con AK y controles (N=3 por cada grupo experimental), los cuales fueron inyectados con BrdU en 3 dosis el 6<sup>to</sup> día posterior a la inducción de actividad con AK y perfundidos al 8<sup>vo</sup> día post AK.

Siguiendo el protocolo de Römer y col. (2011), en todas las muestras analizadas se contabilizaron las células BrdU-positivas a lo largo de la extensión rostro-caudal de la capa de células granulares de GD, visualizadas en todos los planos focales utilizando el objetivo de 40X. Los números resultantes se multiplicaron entonces por 12 para obtener el número estimado de células totales por capa de células granulares de DG (107).

### **ANÁLISIS DE MADURACIÓN DE NUEVAS NEURONAS GRANULARES DE GD PRODUCTO DE NEUROGÉNESIS**

En este experimento se analizaron muestras de ratones MUT y sus respectivos compañeros de camada WT, inyectados con AK (N= 4-5 por cada grupo experimental), los cuales fueron inyectados con BrdU los días 5<sup>to</sup>, 6<sup>to</sup> y 7<sup>mo</sup> posteriores a la administración de AK y perfundidos 4 semanas luego de la administración de la última dosis de BrdU.

Las secciones coronales de 1 portaobjeto por animal fueron teñidas mediante la técnica de inmunofluorescencia arriba descrita, realizando una triple marcación con anti-BrdU, que permite visualizar las nuevas células de GD y anticuerpos de los marcadores neuronales: doblecortina (DCX) y proteína nuclear neuronal (NeuN) que permiten identificar neuronas inmaduras y maduras respectivamente (ver diluciones en Tabla 1). Las imágenes de inmunofluorescencias triples (BrdU, DCX y NeuN) se adquirieron utilizando dos microscopios confocales Olympus Fluoview 1000 y 1200, empleando un objetivo de 60X (de inmersión). En los análisis se incluyeron sólo las células BrdU-positivas localizadas en la

capa de células granulares de GD. La colocalización de marcadores se analizó a través de todo el eje vertical Z de cada célula BrdU-positiva (cubriendo el soma celular entero) en planos ópticos únicos de espesor 0.7  $\mu\text{m}$ .

A lo largo de todas las secciones se contabilizó el total de las células BrdU-positivas y se analizó su colocalización con los marcadores neuronales a fin de calcular el porcentaje de nuevas neuronas maduras e inmaduras para cada muestra de animal analizada.

## **PCR EN TIEMPO REAL LUEGO DE TRANSCRIPCIÓN REVERSA (REAL TIME RT-PCR)**

Esta técnica se llevó a cabo a diferentes edades postnatales de los animales de acuerdo al experimento desarrollado:

- En la primer parte de esta Tesis (focalizada en el neurodesarrollo postnatal): a las edades P30 y P49 de los ratones en desarrollo del modelo MeCP2-308, utilizando en cada grupo experimental un mínimo de 4 animales MUT y 4 WT (compañeros de camada).
- En la segunda parte de la Tesis: a las 6 hs y a las dos semanas posteriores a la inducción de actividad con AK en ratones de P63 (modelo MeCP2-308) y de P42 (MeCP2Bird), utilizando en cada grupo experimental un mínimo de 4 animales MUT (o KO según el modelo animal) y 4 WT (compañeros de camada).

### I. Purificación del ARN

Los animales fueron sacrificados rápidamente por decapitación y los cerebros fueron removidos. Se disecó el hipocampo y se lo congeló instantáneamente en nitrógeno líquido. Las muestras se guardaron a  $-80^{\circ}\text{C}$ .

Los tejidos (25-30 mg) se pulverizaron en un mortero con aire líquido, se resuspendieron en 1 ml de TRIzol y se incubaron a temperatura ambiente por 5 min. El ARN se extrajo mediante el agregado de 0,2 ml de cloroformo de alta calidad y centrifugación a 13800g a  $4^{\circ}\text{C}$  por 15 min. 0,4 ml de la fase superior acuosa fueron incubados toda la noche a  $-20^{\circ}\text{C}$  con 1 ml de isopropanol de alta calidad, para permitir la precipitación del ARN. Este precipitado fue lavado dos veces con etanol 70% en frío y luego resuspendido en agua estéril libre de ARNasas. Posteriormente se cuantificó el contenido de ARN mediante la medición de la absorbancia a 260 nm (se utilizó la relación  $\text{Abs}_{260\text{nm}}/\text{Abs}_{280\text{nm}}$  como medida de pureza).

### II. Transcripción reversa (RT)

Se incubó 1  $\mu\text{g}$  de ARN a temperatura ambiente con la enzima ADNasa 1 (siguiendo las instrucciones del fabricante) para eliminar la posible contaminación de ADN genómico. Para sintetizar el ADN copia (cADN, por sus siglas en inglés), el producto del paso anterior se incubó con oligonucleótidos hexaméricos al azar, deoxinucleótidos y la enzima



transcriptasa reversa M-MLV, en presencia de un inhibidor de ARNasas, en un volumen final de 25  $\mu$ l (siguiendo las especificaciones del fabricante). La transcripción reversa se realizó en el termociclador Mastercycler gradient (Eppendorf, Hamburgo, Alemania) en un solo ciclo compuesto de: 6 min de 25°C, 60 min a 37°C, 18 min a 70°C y 10 min a 4°C.

El cADN generado se llevó a un volumen final de 175  $\mu$ l con agua milliQ estéril y se conservó a -20°C hasta su utilización.

### III. PCR en tiempo real

En cada tubo para PCR se mezclaron 6  $\mu$ l de cADN, 0,375  $\mu$ l de cada solución madre de 10  $\mu$ M de primer (quedando a una concentración final de 250 nM) (ver Tabla 3), 7,5  $\mu$ l de SYBR green PCR master mix y se llevó a un volumen final de 15  $\mu$ l con agua milliQ estéril. Se prepararon duplicados para cada muestra. La PCR en tiempo real se realizó en el termociclador Rotor-Gene Q (Qiagen, Venlo, Limburgo, Países Bajos) respetando el siguiente protocolo:

- ✓ Desnaturalización inicial: 10 min. a 95°C.
- ✓ Amplificación (45 ciclos): desnaturalización 15 seg. a 95°C, hibridización 30 seg. a 60°C y extensión 30 seg. a 70°C.
- ✓ Para corroborar la presencia de un solo producto se realizó siempre una curva de desnaturalización del ADN cubriendo el rango de 50 a 95°C.

La semi-cuantificación se llevó a cabo mediante el método de  $\Delta\Delta$ CT. Primeramente se calculó la diferencia entre el valor de CT del gen de interés y el valor de CT de un gen de expresión constitutiva (en nuestro caso, GAPDH). Luego, se calculó la diferencia entre el  $\Delta$ CT obtenido para cada muestra y el de una población control (en nuestro caso, el  $\Delta$ CT promedio del grupo WT control). El resultado del experimento se expresó como 2 elevado al  $-\Delta\Delta$ CT (expresión relativa), que para el grupo de referencia (WT control) es alrededor de 1. A fin de evidenciar mejor el efecto del AK en los animales MUT/KO, también se calculó la expresión de cada gen tomando como referencia el grupo MUT/KO control; esos datos se presentan como anexo a cada figura.

**Tabla 3.** Secuencias de los primers empleados en los experimentos de RT-PCR en tiempo real.

SECUENCIAS de los INICIADORES o PRIMERS para PCR			
ARN mensajer	Secuencias 5'→3'		Tamaño del amplicón
	Directo	Reverso	
Arc	TACCGTTAGCCCCTATGCCATC	TGATATTGCTGAGCCTCAACTG	100 pb
Sema 3F	GGCAAGGATGGCAATGGAGAGT	TTGATGAGGGCTGAGGCTGTGTC	110 pb
Sema 3A	TGAAAACGGTCGTGGGAAGAGC	GGATGAGATGGGCACTGATGAAT	190 pb
PlxA3	TGAGGAGGTGACTGAAAGTGAGG	AGGACATACACGACTGGAGGGC	212 pb
Npn-2	AAGCCAGCCAGGAAAGCAAAC	AGTTCTCCAGTGGGACATCAGTG	195 pb
BDNF	TGGCTGACACTTTTGAGCAC	AAGTGTACAAGTCCGCGTCC	130 pb

Finalmente, cabe destacar que tanto la concentración empleada de cADN como de los primers, el protocolo de PCR y el umbral para la determinación del  $C_T$  se establecieron experimentalmente mediante curvas de calibración ( $CT$  vs  $\log$  [Dilución<sub>cADN</sub>]). Las condiciones experimentales seleccionadas presentaron una eficiencia de PCR de  $100\pm 10\%$  para todos los primers.

## TEST DE LABERINTO DE BARNES

El Laberinto de Barnes está diseñado para evaluar el aprendizaje espacial y la memoria. Su utilidad es similar a la de los laberintos de brazo radial y Morris pero sin restricciones en la dieta y el estrés físico es menor. Dentro del laberinto, los animales están motivados para escapar de la plataforma iluminada y abierta hacia una cámara oscura, pequeña y empotrada (caja de escape) (159).

En este experimento se trabajó con animales adultos MUT (N= 14) y WT (N=12) del modelo MeCP-308. Para desarrollar el test de Laberinto de Barnes se tomó como referencia el protocolo de O'Leary & Brown, 2013 (159). El test en su conjunto está compuesto por 4 etapas divididas en 4 días:

- ✓ Día 1. Habitación. Consiste en hacer que el animal se familiarice con el ambiente donde se desarrolla el test, con la plataforma y la caja de escape. En un primer momento se introduce gentilmente al animal dentro de la caja de escape a través del orificio de la plataforma que conduce a la misma (orificio "blanco") y se lo deja allí por 2 min. Luego se lo coloca en el centro de la plataforma por 30 seg tapado con un frasco grande de vidrio transparente. Una vez pasado ese tiempo se guía al animal con el frasco hacia el orificio blanco y se coloca el frasco sobre el mismo por 3 min o hasta que el animal entre a la caja de escape. Si pasados los 3 min el animal no entró a la caja de escape se lo guía con el mismo frasco para que lo haga. Una vez dentro de la

caja de escape se deja al animal allí por 1 min y luego se lo retorna a su caja habitual.

- ✓ Día 2. Entrenamientos. Cada animal es sometido a 3 entrenamientos de 4 min cada uno, separados entre sí por un descanso de media hora. Cada entrenamiento comienza con las luces que alumbran la plataforma apagadas y colocando al animal en el centro de la plataforma cubierto por un recipiente no transparente. Al comenzar a contar los 4 min se encienden las luces y se quita el recipiente que cubre al animal, dejando que recorra libremente toda la plataforma. Cuando el animal entra a la caja de escape (ubicada en el mismo orificio de la plataforma en todos los entrenamientos) inmediatamente se apagan las luces y se lo deja allí por 1 min. En el caso de que transcurridos los 4 min el animal no haya ingresado a la caja, se lo guía hacia ella y una vez dentro de la caja se apagan las luces y se lo deja allí por 1 min. En cada entrenamiento se registró: el porcentaje de tiempo que el animal pasa en cada cuadrante de la plataforma, el primer cuadrante al que se dirige el animal al quedar descubierto, el número de exploraciones totales de los orificios de la plataforma (considerando exploración cuando el animal asoma su cabeza por uno de los orificios de la plataforma), el número de exploraciones en cada cuadrante, el número de exploraciones correctas en el orificio blanco y latencia de entrada a la caja de escape.
- ✓ Día 3. Descanso
- ✓ Día 4. Test de memoria. En este caso cada animal es sometido a una sola exposición en la plataforma que dura 2 min y en la cual se extrae la caja de escape. Al igual que en los entrenamientos, el test comienza con las luces apagadas y colocando al animal en el centro de la plataforma cubierto por un recipiente oscuro. Al comenzar a contar los 2 min se encienden las luces y se quita el recipiente que cubre al animal, dejando que recorra libremente toda la plataforma. Nuevamente aquí se registran los mismos parámetros que en los entrenamientos a excepción de la latencia de entrada a la caja de escape.

## ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El análisis de los datos experimentales se desarrolló usando el programa Prism 6 (GraphPad Software). Los resultados se expresan como promedio  $\pm$  SEM. En aquellos experimentos donde solo hay una variable entre los grupos (por ejemplo, genotipo) se aplicó el test t de Mann-Whitney al haber dos grupos experimentales. Para los experimentos donde había más de dos variables entre los grupos (por ejemplo, diferentes tratamientos de

inducción de actividad neuronal para ambos genotipos) se aplicó ANOVA de dos vías. En caso de encontrar diferencias significativas, se realizó un análisis posterior comparando todas las condiciones para cada variable (empleando la prueba de Tukey). En todos los casos se consideró un  $p \leq 0,05$  como una diferencia entre grupos estadísticamente significativa.

---

# RESULTADOS

---

## **PARTE I: REFINAMIENTO DE MOSSY FIBERS DURANTE EL DESARROLLO POSNATAL EN HIPOCAMPO DE RATONES MUTANTES PARA MeCP2.**

### **RATONES MUTANTES PARA MECP2 PRESENTAN UN RETRASO EN EL PROCESO DE REFINAMIENTO AXONAL (PRUNING ESTEREOTIPADO) DEL TIP.**

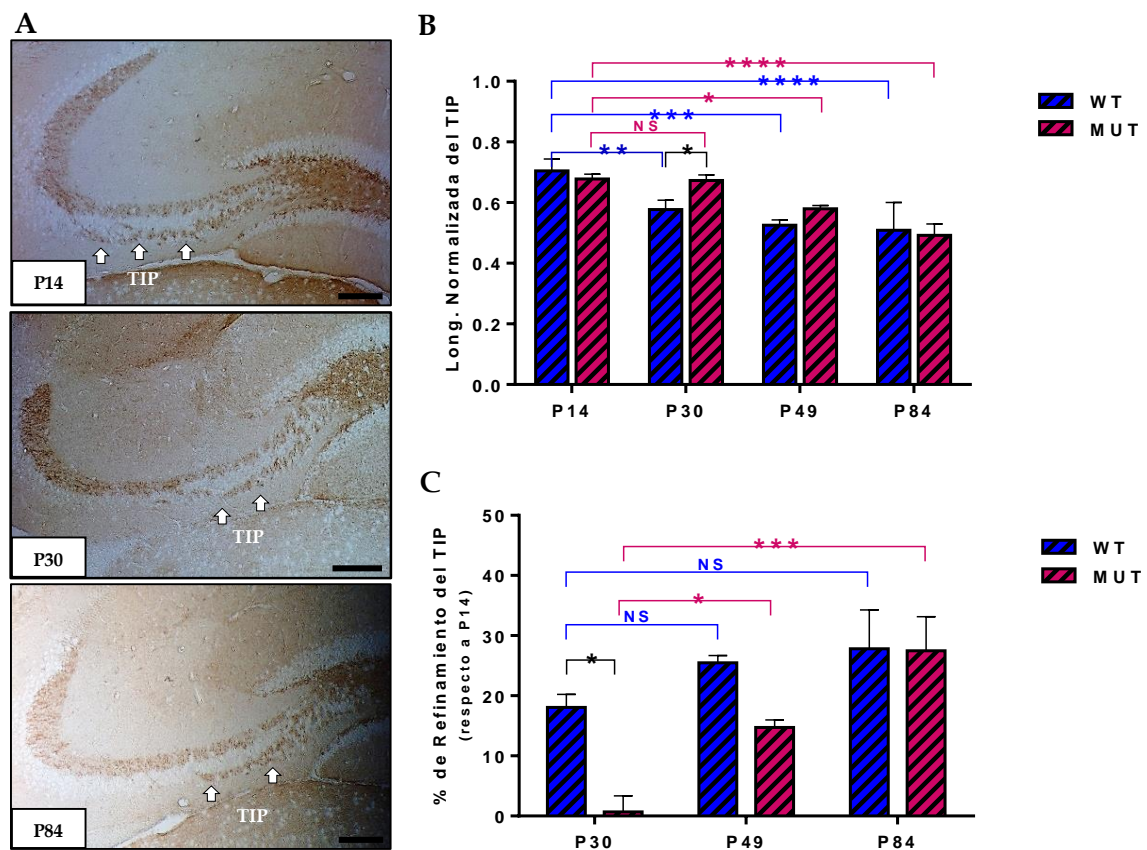
En estudios previos, utilizando el sistema olfatorio como modelo de neurodesarrollo, se observó que la deficiencia de MeCP2 altera eventos de guiado (orientación), refinamiento y blanco axonal durante el desarrollo posnatal temprano, comprometiendo el normal establecimiento de conexiones neurales y la función sináptica a largo plazo (53,160). Considerando estos antecedentes, nos propusimos evaluar si en ausencia de MeCP2 también se observan fallas en eventos de guiado involucrados en la formación y maduración de circuitos neurales en otras regiones del SNC. En particular, nos focalizamos en regiones específicas del hipocampo, un área de gran relevancia en las manifestaciones clínicas de RTT (45).

Está ampliamente aceptado que los efectos de la falta de MeCP2 tienen mayores consecuencias durante el desarrollo posnatal (45), por lo que nos centramos en un proceso de refinamiento axonal que sufren las MF, llamado pruning estereotipado del TIP, durante la etapa posnatal. Este refinamiento estereotipado consiste en remoción selectiva de ramas neuronales aberrantes o ectópicas en el TIP que tiene lugar durante el desarrollo postnatal temprano del sistema nervioso (63). Dicho proceso ocurre en una ventana temporal acotada durante el desarrollo postnatal temprano descrito para los modelos murinos entre los días P20 y P30 y estaría regulado por acción de Sema 3F y sus receptores (63,82,87,106,161), moléculas cuya expresión se ve alterada en ausencia de MeCP2 (53). Sobre estas bases nos focalizamos en estudiar el proceso de pruning estereotipado del TIP durante el desarrollo posnatal temprano en animales WT y MUT para MeCP2.

Para este fin, utilizamos un modelo animal que porta una versión trunca de la proteína MeCP2 (MeCP2-308). Ratones WT y MUT fueron sacrificados a distintas edades posnatales (P14, P30, P49 y P84) y el cerebro de los mismos fue procesado para IHQ. Se realizaron cortes coronales seriales que fueron teñidos con un anticuerpo anti-Calbindina para identificar los axones de las células granulares de GD que forman el TIP (Figura 11A). Utilizando el programa FIJI/ImageJ (NIH), se midió la relación entre la longitud del TIP con respecto a la longitud del tracto principal (longitud normalizada del TIP, Figura 10).

Como se observa en la Figura 11B, se detectaron diferencias significativas en el refinamiento del TIP entre los ratones WT y MUT, al momento donde dicho proceso se debería desarrollar normalmente (P30), encontrándose en los animales MUT un TIP significativamente más largo que en los WT [ $F_{(3, 24)}=4,145$ ;  $p=0.0168$ ]. En el caso de los ratones

WT, entre los días P14 y P30 se observó una disminución significativa en la longitud normalizada del TIP, lo que coincide con la ventana temporal descrita para el desarrollo del pruning estereotipado del TIP en modelos murinos. No se encontraron diferencias significativas entre las longitudes del TIP medidas a edades posteriores (P49 y P84) con respecto a P30; esto indica que en animales WT alrededor del día P30 el largo del TIP alcanza valores cercanos a los que se presentan en el estado adulto. En contraste, los ratones MUT no mostraron cambios en el largo del TIP durante el periodo en el cual este refinamiento debería producirse (entre P14 y P30), observándose recién una disminución significativa en la longitud del tracto al día P49. Esto indicaría que los ratones mutantes para MeCP2 muestran un retraso en el refinamiento de las MF que conforman el TIP. Dado que tanto a P49 como a P84 no se registraron diferencias significativas en la longitud del TIP respecto a sus contrapartes WT (P49 y P84), se puede concluir que la falla de refinamiento observado en los animales MUT no se mantiene en el tiempo.



**Figura 11. Cuantificación del pruning del TIP durante el desarrollo.** A. Tinción con Calbindina de cortes coronales de hipocampo dorsal en animales WT para MeCP2 de distintas edades. A P14, previo al pruning del TIP, puede observarse que dicho tracto se encuentra largo; mientras que el mismo ya se observa acortado a P30 y P84, etapas del desarrollo posteriores al pruning (TIP señalado con flecha blancas). Escala: 300  $\mu$ m. B. Longitud normalizada del TIP medida en animales WT y MUT de edades P14, P30, P49 y P84. Puede observarse que en el caso de los WT entre los días P14 y P30, momento en el que ocurre el pruning estereotipado del TIP, hay una reducción significativa en el largo de dicho tracto, mientras que en los ratones MUT entre esas mismas edades no se registraron cambios en la longitud del TIP, sino recién a partir de la edad P49 C. Porcentaje de refinamiento del TIP con respecto a la longitud de dicho tracto a la edad P14, previo al pruning. (n=4 ratones por grupo, ANOVA, seguido por Tukey HSD test, \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ; \*\*\*\*  $p < 0,0001$ ).

Estos mismos resultados pueden observarse con mayor claridad al graficar el porcentaje de refinamiento del TIP a las edades P30, P49 y P84 en comparación con el largo promedio del TIP a la edad P14 (previo al pruning). Como puede observarse en la Figura 11C al comparar entre genotipos el porcentaje de pruning del TIP a la edad P30, hay una clara y significativa diferencia entre los animales WT y MUT [ $F_{(2,18)}=3,819$ ;  $p=0,0415$ ], alcanzando los primeros un refinamiento axonal promedio cercano al 20% ( $18,09\pm 4,3\%$ ) con respecto a la longitud normalizada promedio del TIP a P14; mientras que en el caso de los MUT al día P30 no se registró un acortamiento significativo de dicho tracto (porcentaje de refinamiento promedio:  $0,7\pm 2,7\%$ ). Recién a la edad P49 se registró en los ratones MUT un refinamiento promedio del  $14,49\pm 1,5\%$ , acercándose al valor alcanzado por los WT a P30 (diferencia no significativa entre WT y MUT a P49,  $p=0,1942$ ) y hacia la edad P84 el proceso en los MUT se normaliza, alcanzándose porcentajes de refinamiento similares en ambos grupos de animales (WT:  $27,8\pm 7\%$  y MUT:  $27,47\pm 5,6\%$ ).

Nuestros resultados indican que en etapas posnatales tempranas, la ausencia de MeCP2 afecta el refinamiento de MF en el hipocampo. El pruning estereotipado del TIP es uno de los ejemplos de refinamiento axonal mejor estudiado en vertebrados, y con respecto a los jugadores moleculares que regulan dicho proceso, estudios de otros autores señalan como principales candidatos al ligando Semaforina 3F (Sema 3F) y sus receptores Neuropilin-2 (Npn-2) y Plexin A3 (PlxA3) (61,63,82,87,106). Por lo tanto se prosiguió a evaluar si la expresión de Sema 3F y/o sus receptores asociados se ven afectadas ante mutaciones en MeCP2, lo que podría explicar los defectos en el refinamiento axonal aquí descriptos.

## **ANIMALES MUTANTES PARA MECP2 MUESTRAN ALTERACIONES DINÁMICAS EN LA EXPRESIÓN DE MOLÉCULAS DE GUIADO**

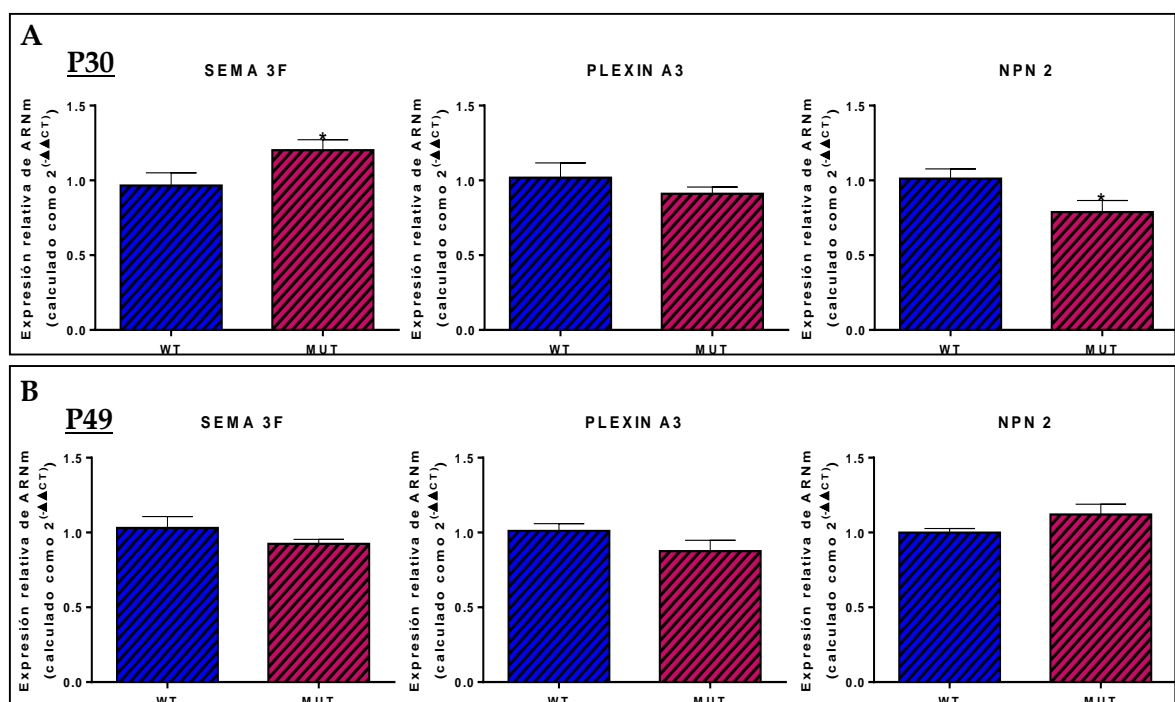
Como se ha descripto anteriormente la interacción ligando-receptor que ha emergido como la más crítica para el desarrollo normal del TIP es Sema 3F actuando a través de su complejo receptor conformado por Npn-2 y PlxA3, cuya activación dispara una cascada de señalización intracelular que converge sobre el citoesqueleto del axón, provocando el colapso del mismo (63,162). Por esto, primeramente se evaluó en hipocampo completo la expresión de estas moléculas reconocidas como fundamentales para el desarrollo del “pruning” estereotipado del TIP. A tal fin se disecó el hipocampo de ratones WT y MUT en las edades donde se encontraron los defectos en la maduración axonal (P30 y P49) y se determinaron los niveles de expresión de ARNm de los componentes de la vía de señalización de Sema 3F mediante RT-PCR en tiempo real.

Como puede observarse en la Figura 12A a P30, momento en el que se observó el retraso en el refinamiento del TIP, tanto el ligando Sema 3F como uno de los componentes



de su complejo receptor (Npn-2) se encuentran ligeramente desregulados en el tejido hipocampal de los animales MUT para MeCP2, encontrándose (respecto a los WT): niveles incrementados de ARNm de Sema 3F y una menor expresión del receptor Npn-2. Sin embargo, dichos cambios en la expresión resultaron ser dinámicos a lo largo del desarrollo, ya que se observaron valores similares a los WT para el día P49 (Figura 12B), momento en el cual se registró el acortamiento del TIP en los MUT.

Considerando el hecho de que dichos cambios no fueron tan marcados, se contempló la posibilidad de que la desregulación en la expresión molecular de alguna manera se esté compensando entre las distintas áreas del hipocampo. Por esto y asimismo con el fin de determinar las zonas del hipocampo en las cuales se producen los cambios en la expresión molecular, se decidió analizar por separado la expresión de los componentes de la vía de Sema 3F en el GD, donde se encuentran los cuerpos celulares de las neuronas granulares que proyectan sus axones hacia la región CA3, formando las MF (TIP) y por otro lado en el “resto del hipocampo” que comprende a la región blanco de las mismas (CA3), entre otras regiones hipocampales.



**Figura 12.** Niveles de ARNm de Semaforina 3F (Sema 3F), Neuropilin-2 (Npn-2) y Plexina A3 (PlexinA3) en hipocampo de ratones WT y MUT por RT-PCR en tiempo real. **A.** Expresión relativa a P30. **B.** Expresión relativa a P49. Como puede observarse, a P30 (A), momento del desarrollo donde se detecta la falta de pruning en el TIP de los ratones MUT, tanto la expresión del ligando Sema 3F como del receptor Npn-2 se encuentran desreguladas en los ratones MUT (barras rosa oscuro) en comparación con los WT (barras azules). Los tejidos hipocampales fueron obtenidos de 5 a 8 animales por grupo en las distintas edades y el cADN fue preparado individualmente para cada ratón. Los resultados están representados como la relación entre la cantidad relativa del gen de interés y GAPDH. Los resultados de los animales WT fueron normalizados a 1. Las reacciones de PCR en tiempo real fueron corridas separadamente en duplicados para cada ratón. Análisis de datos con Mann-Whitney t test con 95% de intervalos de confianza. \*p<0,05.

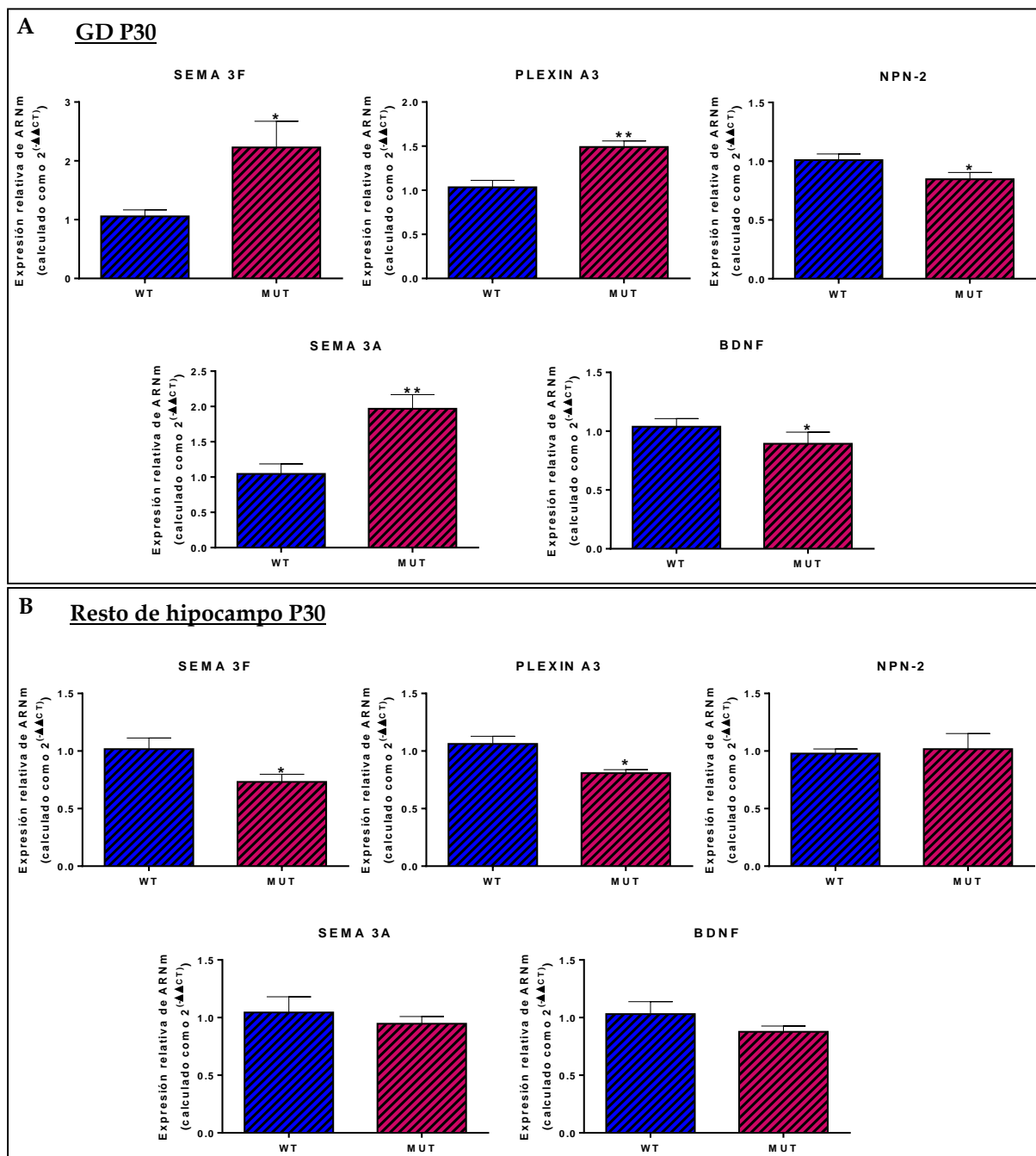
A tal fin, a partir del hipocampo de cada animal, se disecó el GD quedando separadas las muestras de esta región por un lado y las del “resto del hipocampo” por el otro. A partir

de dichas muestras se determinaron los niveles de expresión de ARNm de los genes deseados a través de RT-PCR en tiempo real. Si bien la mejor forma de poder ver el patrón de expresión de una determinada molécula sería mediante IHQ, hasta el momento no se han desarrollado buenos anticuerpos para Semas que nos permitan obtener resultados confiables.

Partiendo de muestras separadas de GD y “resto de hipocampo” por animal, se determinó en ambas partes del hipocampo la expresión de las mismas moléculas de la vía de Sema 3F medidas anteriormente. En este caso las muestras fueron tomadas de animales de edad P30, momento donde se observó la falta de refinamiento en el TIP y alteraciones en la expresión de Sema 3F y Npn-2 en los animales MUT. Adicionalmente, a fin de extender el análisis a otras moléculas involucradas en el desarrollo de este circuito, se evaluó la expresión de Semaforina 3A (Sema 3A), ligando de la familia de las Semas clase III, que también tiene la capacidad de inducir repulsión en axones de células granulares (MF) del GD *in vitro* (63) y del factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) que es un mediador crítico en la supervivencia, diferenciación y plasticidad neuronal (163).

Como puede observarse en la Figura 13, la desregulación de los componentes de la vía de Sema 3F se hace más evidente en los animales MUT cuando se evalúan por separado los niveles de expresión molecular en GD y en el resto del hipocampo.

La expresión de dichas moléculas se encuentra alterada de manera diferente en ambas regiones hipocámpales evaluadas, indicando que la desregulación en la expresión de las moléculas de guía es específica de cada región hipocámpal. En este sentido, se ha descrito en ratones WT, que los niveles de ARNm de Sema 3F (químico-repelente de axones hipocámpales) son bajos en hipocampo al momento del nacimiento y permanecen así hasta el día P20; posteriormente su expresión incrementa gradualmente en células de la región CA3 (blanco de los axones del TIP) y CA1, y se torna significativamente mayor en CA3 hacia el día P26, cuando los axones del TIP son refinados (63,82). Nuestros resultados en ratones MUT mostraron que en el “resto del hipocampo” (Fig. 13B, área donde se encuentran las regiones CA3 y CA1, entre otras) los niveles de expresión de Sema 3F se encontraron significativamente disminuidos con respecto a los WT al momento del pruning (P30). Sin embargo, este ligando y también Sema3A, se mostraron sobre expresados en el GD de los animales MUT con respecto a los WT a la misma edad (Figura 13A).



**Figura 13.** Niveles de ARNm de Sema 3F, Npn-2, PlexinA3, Sema 3A y BDNF determinados en ratones WT y MUT por RT-PCR en tiempo real. **A.** Cuantificación en GD a P30. Como puede observarse a nivel de GD, donde se encuentran las células granulares cuyos axones son proyectados hacia CA3 formando en su camino las “mossy fibers”, se registró una desregulación en la expresión de las moléculas de la vía de Sema 3F, en Sema 3A y BDNF en los ratones MUT (barras rosa oscuro) en comparación a los WT (barras azules). **B.** Cuantificación en resto de hipocampo a P30. En esta región del hipocampo donde encuentra, entre otras, el área CA3, zona blanco para las “mossy fibers”, también se detectaron diferencias en la expresión de Sema 3F y Plexin A3 en los ratones MUT (barras rosa oscuro) en comparación a los WT (barras azules). Los cambios en la expresión de estas moléculas fueron opuestos a los registrados en GD. Los tejidos hipocámpales fueron obtenidos de 4 a 5 animales por grupo en las distintas edades y el cADN fue preparado individualmente para cada ratón. Los resultados están representados como la relación entre la cantidad relativa del gen de interés y GAPDH. Los resultados de los animales WT fueron normalizados a 1. Las reacciones de PCR en tiempo real fueron corridas separadamente en duplicados para cada ratón. Análisis de datos con Mann-Whitney test t con 95% de intervalos de confianza. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ .

Con respecto a los receptores de Sema 3F, estudios de hibridación *in situ* han mostrado que Npn-2 se encuentra principal y robustamente expresado en las neuronas granulares de GD a partir de la edad P10 (103). PlxnA3 se encuentra expresado en varias regiones del hipocampo en desarrollo a P1, incluyendo células granulares del GD, células piramidales maduras y en el stratum oriens (103), pero en el momento donde ocurre el pruning (P30), la expresión de PlxnA3 aparece confinada a las capas celulares internas del GD (63). Como se muestra en la Figura 13A en ratones MUT a P30, los niveles de Npn-2 se observaron significativamente disminuidos en GD, donde se encuentran las células granulares que proyectan sus axones formando el TIP. Asimismo, los niveles de expresión del receptor PlxnA3 también se encontraron desregulados en comparación con los WT, en ambas regiones del hipocampo (Figura 13).

Se ha reportado que MeCP2 participa directamente en la regulación transcripcional de la expresión de BDNF dependiente de actividad, pero aún no está claro que co-represores o co-activadores intervienen y si esta regulación también ocurre durante el neurodesarrollo (19). Nuestros resultados mostraron que la expresión de BDNF fue menor en el GD de animales mutantes a P30 (Figura 13A).

Se ha establecido que en condiciones normales durante desarrollo postnatal existe un gradiente local restringido en la expresión de Sema 3F que actúa a través de su complejo receptor, integrado por PlexA3 y NpN-2, conduciendo el refinamiento del TIP hacia el hilus del GD (63,105). Alteraciones en la regulación espacial y temporal de la expresión de estas moléculas, como las aquí descritas en los ratones mutantes para MeCP2, podría explicar las fallas encontradas en el refinamiento del TIP en estos animales.

## CONCLUSIONES

Analizando los resultados de esta primera parte, orientada a determinar el rol de MeCP2 en el neurodesarrollo del circuito hipocampal: MF-CA3, se observa claramente un retraso en el proceso de pruning estereotipado del TIP ante fallas en MeCP2. Este refinamiento no ocurre durante la ventana temporal en la cual debería producirse sino recién varias semanas después en el desarrollo postnatal de los animales mutantes para MeCP2. La falta de refinamiento en el momento correspondiente del desarrollo, fue acompañada de una desregulación en la expresión de moléculas caracterizadas como claves para este proceso de refinamiento de las MF, como así también de moléculas importantes para la guía y crecimiento axonal (BDNF). Sin embargo, tales defectos no se mantuvieron a lo largo del desarrollo, ya que a partir del día P49 el refinamiento del TIP en los MUT comienza a emparejarse al registrado en los WT, determinándose al día P84 un largo final del TIP equiparable entre ambos genotipos. De manera similar, no se observaron diferencias en los niveles de expresión de Sema 3F y sus receptores en el tejido hipocampal entre los ratones

WT y MUT al día P49 (Figura 12B).

Estos resultados indican que en etapas posnatales tempranas, la ausencia de MeCP2 afecta el refinamiento de MF en el hipocampo. Este retraso podría deberse a fallas en la regulación transcripcional de moléculas de guiado causadas por la falta de MeCP2 (53) y como consecuencia podría afectar el establecimiento de la conectividad con otros componentes del circuito con los que contactan las MF (neuronas CA3, interneuronas), generando defectos de función a largo plazo. En este sentido, existe una creciente evidencia que indica que además de su rol en el desarrollo posnatal temprano, MeCP2 es necesaria en niveles adecuados para el mantenimiento de los circuitos neurales durante toda la etapa adulta (51,52). Por tal razón, nos propusimos estudiar eventos de plasticidad dependiente de actividad del TTP en animales adultos mutantes para MeCP2.

## **PARTE II: CARACTERIZACIÓN DEL ROL DE MeCP2 EN EVENTOS DE PLASTICIDAD ESTRUCTURAL PRE-SINÁPTICA EN HIPOCAMPO ADULTO.**

### **LA RESPUESTA DINÁMICA DE MOSSY FIBERS A LA ACTIVIDAD NEURONAL SE ENCUENTRA AFECTADA ANTE MUTACIONES EN MeCP2.**

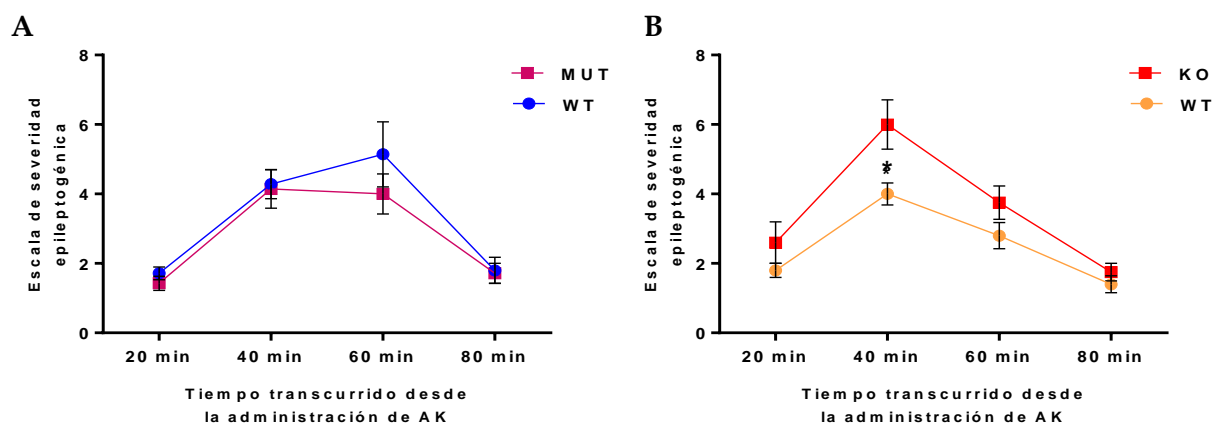
Los eventos de plasticidad estructural pre-sináptica dependiente de actividad en el hipocampo adulto pueden estudiarse mediante dos procesos principales: 1) la neurogénesis en el GD adulto y 2) cambios en el tamaño del TIP (107). Considerando que encontramos fallas en el refinamiento del TIP durante el neurodesarrollo, resultó de interés evaluar la respuesta dinámica en el tamaño del TIP a la actividad neuronal en animales que portan defectos en MeCP2. Para esto, ratones adultos mutantes para MeCP2 fueron sometidos a un paradigma de actividad neuronal a fin de evaluar luego la respuesta en el volumen del TIP. Considerando lo reportado en varios trabajos previos en relación a que tanto el número de nuevas neuronas de GD, producto de neurogénesis, como el tamaño del tracto TIP conformado por las MF se ven incrementados en respuesta a la inducción de actividad epileptogénica (107,110,152,153), el paradigma de actividad neuronal utilizado en esta tesis fue la administración de AK, un agente convulsivante.

Durante una pasantía de investigación en el Department of Neuroscience, Johns Hopkins Medical Institution en Baltimore (USA), se utilizó asimismo un modelo animal que carece completamente de MeCP2 (modelo MeCP2Bird) además de los mutantes ya mencionados (modelo MeCP2-308).

En cada modelo, tanto ratones MUT y KO como sus respectivos compañeros de camada WT fueron inyectados ip con AK o con PBS 0,1M estéril (controles), quedando establecidos dentro de cada genotipo 4 grupos experimentales: WT control; WT+AK; MUT (o KO) control y MUT (o KO)+AK. En el caso de los ratones del modelo MeCP2Bird, la administración de AK se realizó a la edad P42, a diferencia del modelo MeCP2-308 donde la administración de AK fue a la edad de P63. Esta diferencia en el momento de administración del AK se debió fundamentalmente a que la supervivencia de los ratones KO es mucho menor que la de los MUT y a que la sensibilidad a AK varía con la edad del animal (ver métodos).

En todos los grupos inyectados con AK de ambos modelos animales para MeCP2 se evaluó la severidad de la respuesta epileptogénica utilizando la escala descrita en la metodología. En la Figura 14 se graficó para cada genotipo el nivel medio de severidad en la respuesta al AK a lo largo del tiempo posterior a la administración del mismo. En el caso de los ratones del modelo MeCP2-308 (Figura 14A) los MUT respondieron al AK de manera similar a los WT, siendo de  $5 \pm 1,29$  el nivel máximo de severidad alcanzado en promedio por

los MUT, mientras que para los WT fue de  $6 \pm 1,83$ . En el caso de los ratones del modelo MeCP2Bird (Figura 14B), puede observarse que los KO respondieron con mayor severidad que los WT a la acción del AK, alcanzando los primeros un nivel promedio de  $6 \pm 0,707$  entre los valores máximos registrados, mientras que en los WT el nivel máximo de severidad alcanzado fue un promedio de  $4 \pm 0,316$ . La respuesta al AK observada en el modelo MeCP2Bird coincide con lo registrado por otros autores, que si bien utilizaron un modelo diferente de ratón KO para MeCP2, también observaron que estos animales expuestos a AK presentaban un nivel de convulsiones mayor que sus contrapartes WT (164).



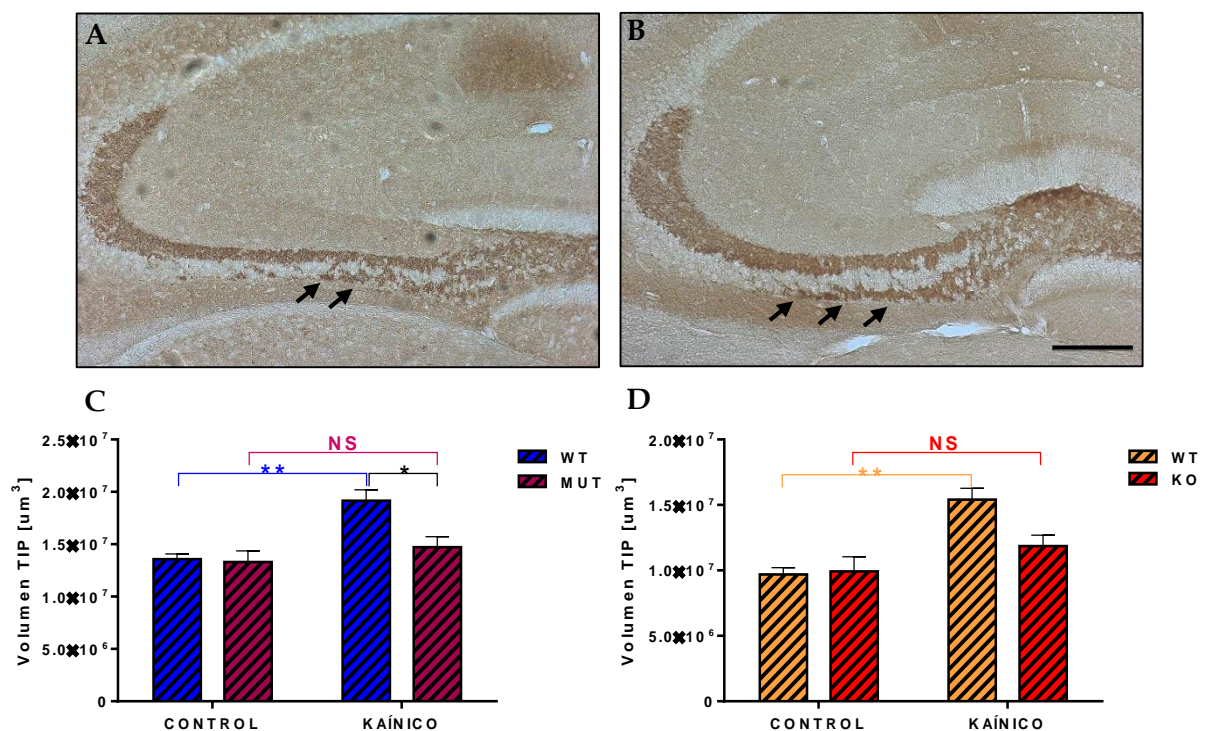
**Figura 14. Severidad de la respuesta epileptogénica en ambos modelos animales mutantes para MeCP2 administrados con AK.** **A.** Severidad de la respuesta epileptogénica a lo largo del tiempo posterior a la administración de AK en ratones del modelo mutante MeCP2-308. Como puede observarse en el gráfico no se registraron diferencias en la respuesta al AK entre los ratones WT y MUT, respondiendo ambos genotipos de manera similar en cuanto a la severidad y comienzo de la respuesta epileptogénica al AK administrado ( $n=5$  ratones por grupo experimental, ANOVA de dos vías  $p=0,7023$ , seguido por Tukey HSD test). **B.** Severidad de la respuesta epileptogénica a lo largo del tiempo posterior a la administración de AK en ratones del modelo null MeCp2Bird. En cuanto al nivel máximo de severidad en la respuesta epileptogénica alcanzado por cada genotipo, se registró que en el caso de los ratones KO fue significativamente mayor que en los WT, demostrando la mayor vulnerabilidad de los KO para MeCP2 a la acción del AK ( $n=4-5$  ratones por grupo experimental, ANOVA de dos vías, seguido por Tukey HSD test  $*p < 0,05$ )

Dos semanas luego de la inyección con AK, los animales fueron sacrificados y perfundidos para realizar los análisis morfométricos, ya que otros autores han descrito que en ese momento se detecta un aumento en el tamaño del TIP en respuesta a la actividad generada (107). Como se describió previamente, se prepararon criosecciones coronales seriadas del hipocampo dorsal y se las sometió a IHQ usando un anticuerpo anti-Sinaptoporina, proteína presináptica vesicular que marca específicamente las MF. El volumen del TIP se obtuvo sumando las áreas medidas en todas las secciones de un mismo portaobjeto y multiplicando luego el resultado por la inversa de la fracción de muestreo (12) y por 20, que es el grosor de la sección en micrómetros (107).

Como puede observarse en la Figura 15, dos semanas luego de la inducción de actividad epileptogénica con AK se registró un aumento en el tamaño del TIP en los ratones WT inyectados con AK en comparación con sus controles inyectados con PBS 0,1M estéril (Figura 15A y B). Cuando se determinó el tamaño del TIP en cada genotipo dentro de cada



modelo animal para MeCP2, se observaron diferencias significativas entre ratones WT y mutantes para MeCP2 en cuanto al cambio de tamaño en el TIP en respuesta al tratamiento con AK [modelo MeCP2-308:  $F_{(1, 17)}=4,858$ ;  $p=0,0416$ ], [modelo MeCP2Bird:  $F_{(1,12)}=4,858$ ;  $p=0,0478$ ]. El aumento en el tamaño del TIP en respuesta a la actividad epileptogénica se presentó sólo en los ratones WT de cada modelo (Figuras 15C y D), no detectándose cambios significativos en el tamaño del TIP entre ratones MUT control y MUT+AK del modelo MeCP2-308 (Figura 15C) ni entre los KO control y KO+AK del modelo MeCP2Bird (Figura 15D).



**Figura 15. Medición del volumen del TIP en animales adultos sometidos a actividad epileptogénica y controles.** Dos semanas después de la inducción de actividad neuronal con AK, los ratones WT mostraron un aumento en el tamaño del TIP (B), en comparación con los WT controles (A). En ambas figuras el TIP se encuentra señalado con flechas negras, IHQ para Sinaptoporina. Escala en A y B: 200  $\mu\text{m}$ . C. Evaluación cuantitativa de cambios en el TIP para los ratones de la cepa mutante MeCP2<sup>308/Y</sup>. Se registró un aumento significativo en el volumen del TIP en los ratones WT inyectados con AK con respecto a sus controles, pero no en el caso de los MUT, que no mostraron cambios significativos en el tamaño del TIP entre los tratados con AK y los controles. D. Evaluación cuantitativa de cambios en el volumen del TIP para los ratones MeCP2<sup>Y</sup>. Nuevamente se observa un aumento significativo del TIP en los WT tratados con AK, mientras que en los ratones KO no hubo diferencias entre los inyectados con AK y sus controles ( $n=4$  ratones por grupo experimental, ANOVA de dos vías seguido por Tukey HSD test, \*  $p<0,05$ ; \*\*  $p<0,01$ ).

Para evaluar si la falta de crecimiento del TIP en respuesta a actividad epileptogénica en los animales MUT y KO se debe en realidad a una falta de activación neural en respuesta a AK, se evaluó en todos los grupos experimentales la expresión de genes inducidos por actividad sináptica (Arc y BDNF). Para esto, en nuevos grupos de ratones de ambos modelos animales se procedió a la administración de AK y 6hs después se extrajo el hipocampo tanto de ratones MUT y KO controles e inducidos con AK, como de sus correspondientes

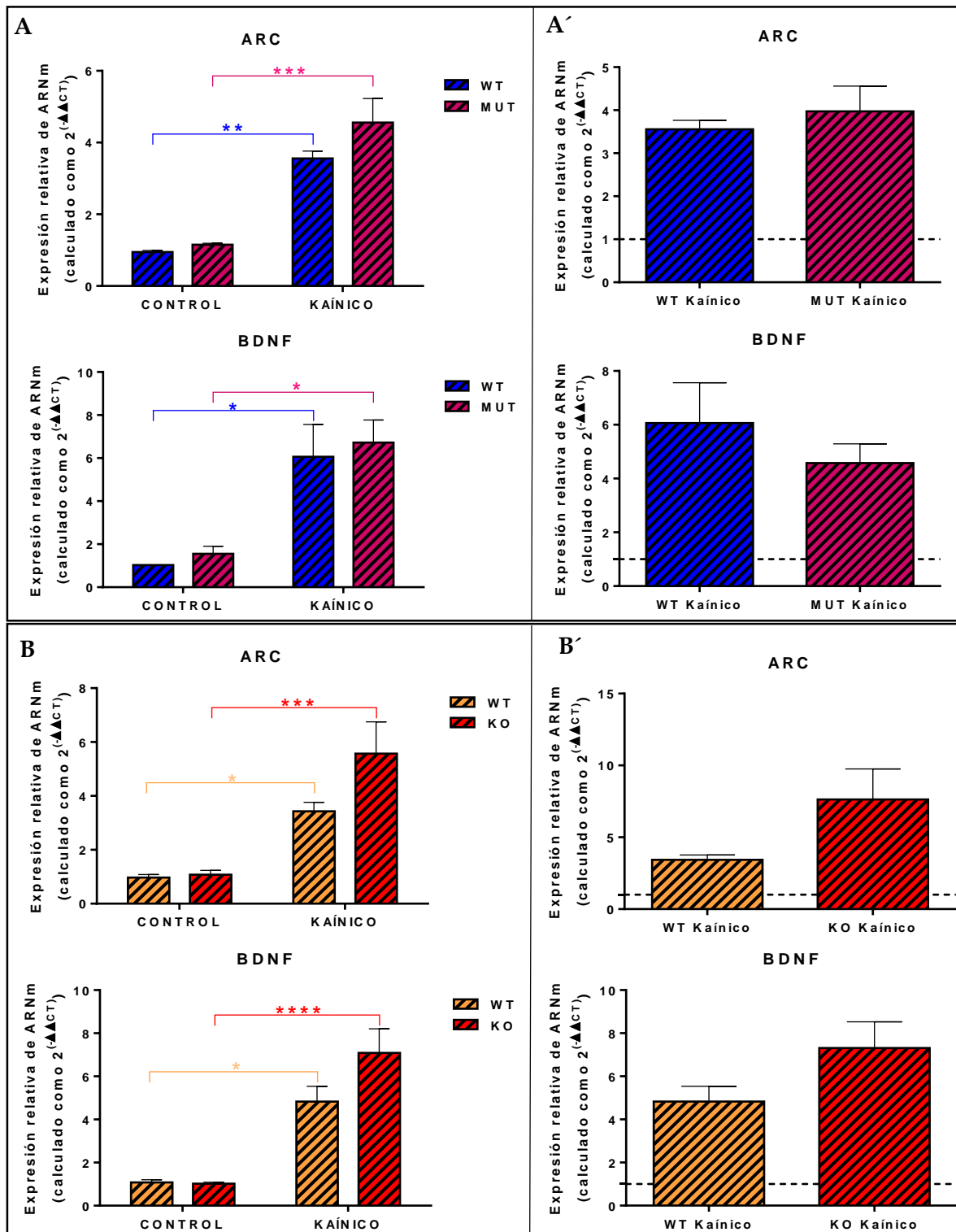


compañeros de camada WT. Los niveles de expresión de ARNm de los genes de expresión temprana inducida por actividad: Arc y BDNF fueron cuantificados por RT-PCR en tiempo real.

Como puede observarse en la Figura 16, efectivamente tanto los ratones MUT del modelo animal MeCP2-308 (Figura 16A y A') como los KO del modelo MeCP2Bird (Figura 16B) presentaron un aumento significativo en la expresión del ARNm de Arc y BDNF a las 6 hs luego de la administración de AK, en relación con sus correspondientes controles (inyectados con PBS). De igual manera respondieron los ratones WT de cada modelo, mostrando un incremento en los niveles de expresión de los genes evaluados en respuesta a AK. Por lo tanto, dentro de cada modelo, no se registraron diferencias significativas entre los animales mutantes para MeCP2 y los WT en cuanto a los niveles de expresión de Arc [MeCP2-308:  $F_{(1,12)}=1,228$ ;  $p=0,2895$ . MeCP2Bird:  $F_{(1,13)}=3,008$ ;  $p=0,1065$ ] y BDNF [MeCP2-308:  $F_{(1,10)}=0,0034$ ;  $p=0,9521$ . MeCP2Bird:  $F_{(1,14)}=2,71$ ;  $p=0,1220$ ] en respuesta al tratamiento con AK.

En el modelo MeCP2Bird (Fig. 16B y B'), los KO tratados con AK muestran un aumento levemente mayor en la expresión de Arc y BDNF en comparación a los WT+AK (no significativo,  $p_{Arc}=0,0872$ ;  $p_{BDNF}=0,1568$ ); esto podría atribuirse a que presentaron convulsiones más graves que sus contrapartes WT.

Este resultado indica que tanto en los animales MUT como KO para MeCP2, se logró inducir un aumento de actividad neuronal en respuesta a la administración del AK, de magnitud similar a la inducida en animales WT. Así, junto con la actividad epileptogénica registrada para cada animal, se confirmaría que efectivamente se generaron niveles similares de actividad neuronal en los dos modelos de ratones mutantes para MeCP2 administrados con AK, a pesar de que luego no se registró en ellos un aumento en el tamaño del TIP.



**Figura 16. Niveles de ARNm de Arc y BDNF determinados por RT-PCR en tiempo real en ratones WT y MUT del modelo MeCP2-308 (A) y en ratones WT y KO del modelo MeCP2Bird (B). Seis horas posteriores a la inducción de actividad neuronal con AK se observó un incremento significativo en los niveles de expresión de los genes de activación temprana Arc y BDNF calculado en referencia al grupo WT Control (no estimulado), tanto en el modelo MUT (A), como en el KO (B) y en sus respectivos compañeros de camada WT (A y B). Los resultados de los animales WT control fueron normalizados a 1. A fin de evidenciar mejor el efecto de AK en cada genotipo, también se calcularon los niveles de expresión inducidos con AK en referencia a los niveles basales WT, MUT o KO respectivamente (A' y B'). La línea de puntos marcada en el eje Y (Y=1) representa los valores controles para cada genotipo. No se registraron diferencias en la expresión de los genes mencionados en respuesta a AK entre los ratones WT, MUT y KO para MeCP2. El cADN fue preparado individualmente para cada ratón. Los resultados están representados como la relación entre la cantidad relativa del gen de interés y GAPDH. Las reacciones de RT-PCR en tiempo real fueron corridas separadamente en duplicados para cada ratón. n= 4 ratones en el caso de los grupos WT y MUT controles. n=5 ratones en los grupos experimentales WT y MUT con AK. Análisis de datos. A y B: ANOVA de dos vías, seguido por Tukey HSD test. A' y B': Mann-Whitney t test con 95% de intervalos de confianza, \* p<0,05; \*\* p<0,01; \*\*\* p<0,001.**

## LA NEUROGÉNESIS EN GD DE HIPOCAMPO ADULTO NO SE VE AFECTADA ANTE MUTACIONES EN MeCP2.

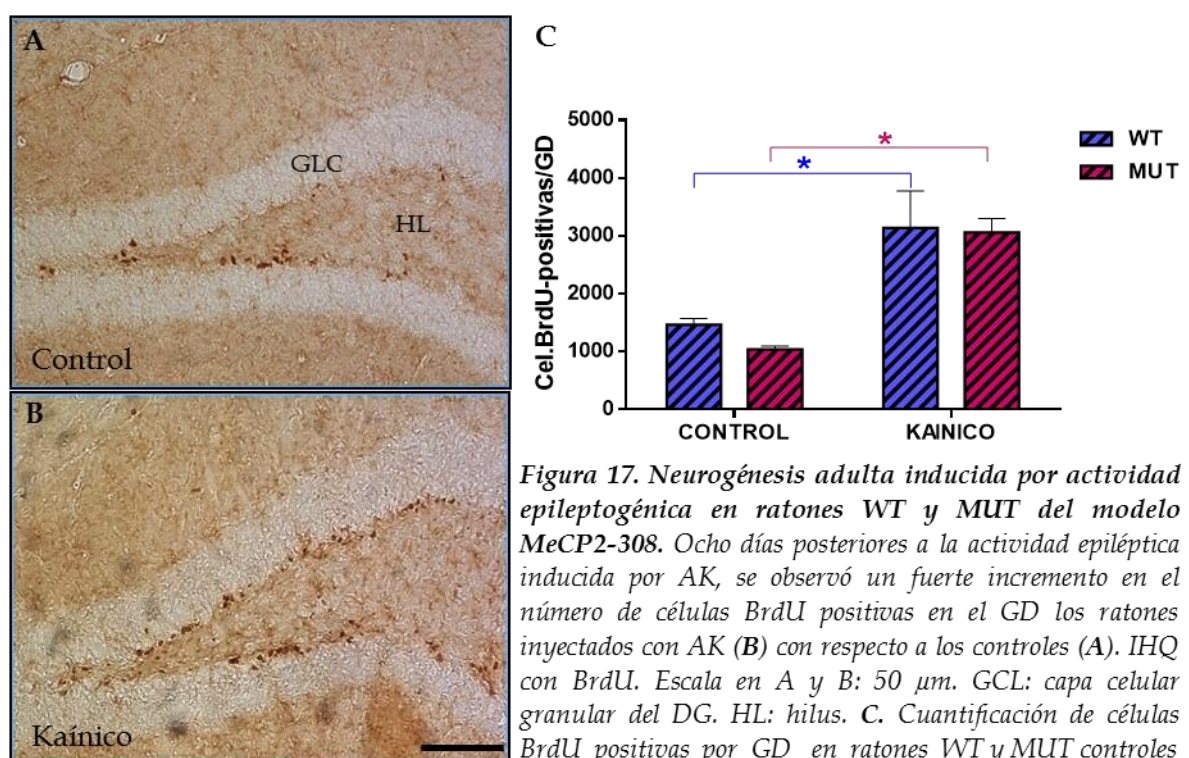
Recientemente ha sido reportado en modelos murinos (cepas C57BL/6J y DBA/2J) que los dos eventos de plasticidad estructural en el GD del hipocampo adulto, a saber: los cambios en el tamaño del TIP y la generación de nuevas neuronas, muestran signos de co-regulación a pesar de tener un control genético ampliamente independiente (165). Se ha observado que los axones de las nuevas neuronas producto de neurogénesis adulta en GD contribuyen mayoritariamente a la plasticidad del tracto TIP, aunque no de manera exclusiva, ya que también aportan sus axones en menor medida al tracto principal. Por lo tanto, se ha sugerido que el tamaño del TIP es dinámicamente influenciado por un aumento en la neurogénesis (107). Asimismo, se ha reportado que existe un aumento significativo en el número de nuevas células granulares en el GD tras actividad epileptogénica inducida por agentes convulsivantes (107,110,152,153,166), lo cual apoya la idea de que la neurogénesis adulta podría estar relacionada con el tamaño del TIP. Considerando estos antecedentes, se decidió evaluar la neurogénesis adulta en GD en respuesta a la actividad neuronal inducida mediante la administración de AK en ratones mutantes para MeCP2.

Al igual que en los experimentos anteriores, ratones machos adultos MUT (modelo MeCP2-308) de P63 días de edad (9 semanas) y sus respectivos compañeros de camada WT, recibieron una sola inyección ip de AK, mientras que los grupos control MUT y control WT fueron inyectados con PBS estéril. Cabe aclarar aquí que los experimentos para evaluar la neurogénesis hipocampal adulta fueron realizados al regreso de la pasantía de investigación en el exterior, motivo por el cual solo se utilizaron para estos estudios ratones del modelo MeCP2-308 con el cual contamos en nuestro laboratorio.

A fin de detectar las nuevas células granulares de DG formadas a partir de la neurogénesis inducida por la administración de AK, se marcaron diferentes cohortes de progenitores celulares en un solo día. Para ello se aplicaron 3 dosis de BrdU (separadas por 6 hs) en el 6<sup>to</sup> día posterior a la inducción con AK, ya que alrededor de la primer semana luego de la inducción de actividad neuronal se detecta la mayor actividad proliferativa en el GD (107). Los animales se perfundieron 2 días luego de la administración de BrdU (8 días posteriores a la administración de AK). Una vez obtenidas las criosecciones, se marcaron las células en división y su progenie por IHQ utilizando el anticuerpo anti-BrdU. Bajo microscopio se contabilizaron las células BrdU-positivas a lo largo de la extensión rostro-caudal de la capa de células granulares de GD, visualizadas en todos los planos focales. Los números resultantes se multiplicaron entonces por 12 para obtener el número estimado de células totales por capa de células granulares de DG (107).

Como puede observarse en la Figura 17, a los 8 días luego de la inducción de actividad neuronal con AK se aprecia un fuerte incremento en el número de células BrdU positivas en

el GD de los ratones inyectados con AK (Figura 17B), en comparación a los controles (Figura 17A). Al contabilizar el número de células BrdU positivas totales por GD para cada grupo experimental (Figura 17C), no se registraron diferencias significativas en la respuesta neurogénica al AK entre los dos genotipos para MeCP2 [ $F_{(1, 8)}=0,2665$ ;  $p=0,6197$ ], observándose tanto en los ratones WT como en los MUT inyectados con AK un incremento significativo en el número de células en división, en comparación con sus respectivos controles. A su vez, no se encontraron diferencias entre ambos genotipos tanto en los números basales de células BrdU positivas por GD (WT control:  $1464\pm103$ ; MUT control:  $1034\pm61$ ) ( $p=8169$ ), como en los animales expuestos a actividad epileptogénica (WT AK:  $3134\pm641$ ; MUT AK:  $3062\pm238$ ) ( $p=0,9988$ ).

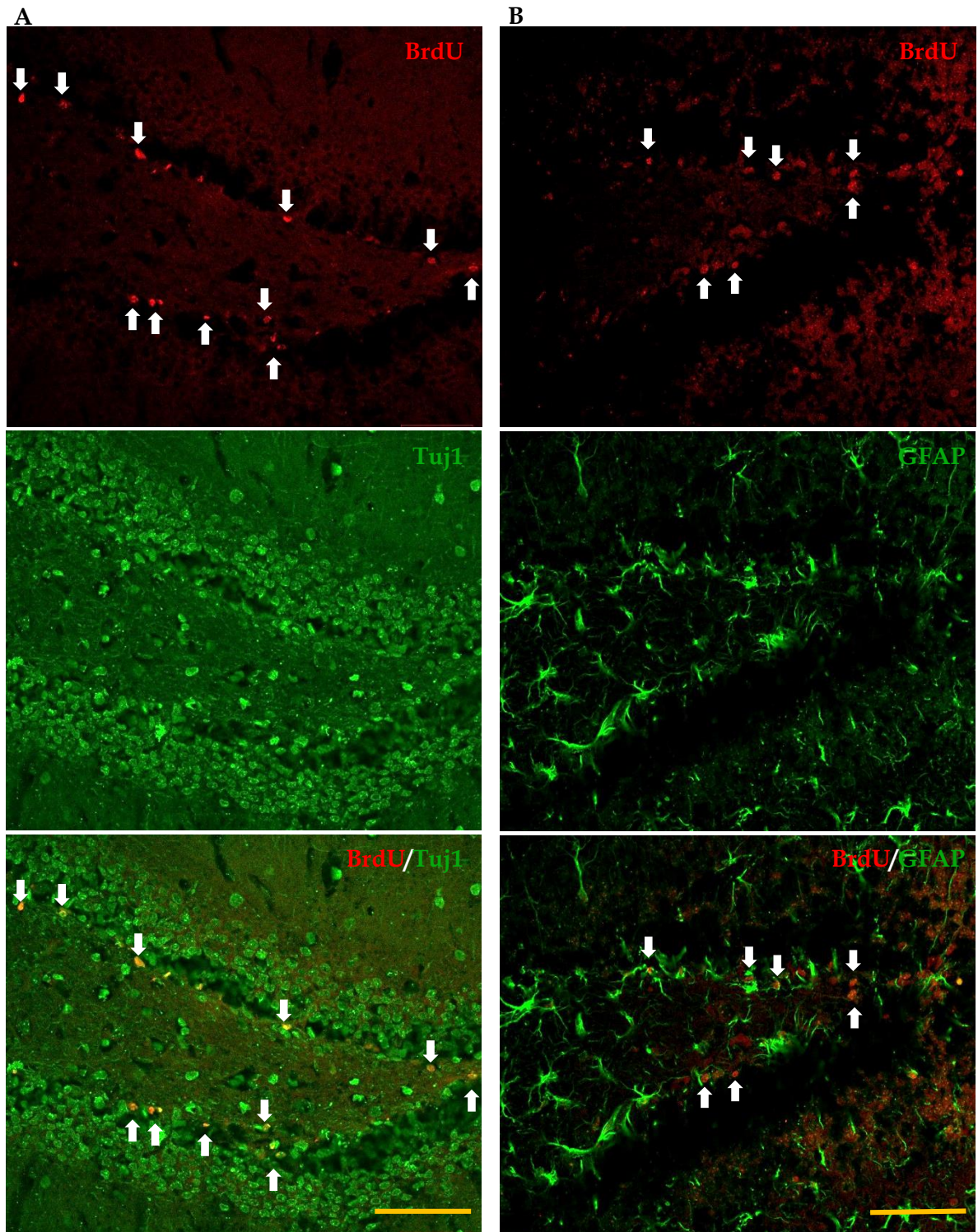


**Figura 17. Neurogénesis adulta inducida por actividad epileptogénica en ratones WT y MUT del modelo MeCP2-308.** Ocho días posteriores a la actividad epileptogénica inducida por AK, se observó un fuerte incremento en el número de células BrdU positivas en el GD los ratones inyectados con AK (B) con respecto a los controles (A). IHQ con BrdU. Escala en A y B: 50  $\mu$ m. GCL: capa celular granular del DG. HL: hilus. C. Cuantificación de células BrdU positivas por GD en ratones WT y MUT controles e inyectados con AK. Un solo episodio epileptogénico conduce a un aumento en el número de células BrdU positivas durante la primera semana después de la actividad inducida con AK tanto en los ratones WT como en los MUT administrados con AK en comparación a los controles.  $n= 3$  ratones por grupo experimental. Análisis de datos: ANOVA de dos vías seguido por Tukey HSD test, \*  $p<0,05$ .

Cabe aclarar que se ha demostrado, en ratones de la cepa C57BL/6J, que el 80-90 % de la progenie celular de las células precursoras neurales en GD, adquiere un fenotipo neuronal (células granulares) entre el 1ro y 7mo día después del marcado de los progenitores con una única inyección con BrdU (151,167,168). Por lo que casi la totalidad de las células BrdU positivas contabilizadas corresponderían a nuevas neuronas granulares de GD y no a células gliales. Para comprobar esto, se tomaron criosecciones de los ratones utilizados en el experimento anterior y por IHQ se realizaron doble marcaciones donde se combinó el marcador de células en división (BrdU) con un marcador neuronal o con un marcador de células astrogliales, a fin de definir el tipo celular al que corresponden las mismas. Para esto

se utilizaron el marcador neuronal Tubulina  $\beta$ -III (Tuj1), presente en neuronas inmaduras de pocos días de desarrollo y la proteína ácida fibrilar glial (GFAP), que permite visualizar células astrogiales. En todas las muestras analizadas se observó que casi la totalidad de las células BrdU positivas colocalizaron con el marcador neuronal Tuj1, no encontrándose prácticamente en ninguno de los casos una colocalización de dichas células con el marcador de astrocitos, GFAP. En la Figura 18 se puede observar un ejemplo de este resultado, el cual se repitió en todas las muestras analizadas, donde se encuentran señaladas con flechas blancas las células producto de neurogénesis adulta (BrdU positivas) y se muestra la presencia o ausencia de colocalización con los marcadores neuronal (Tuj1) y astrogial (GFAP), respectivamente.

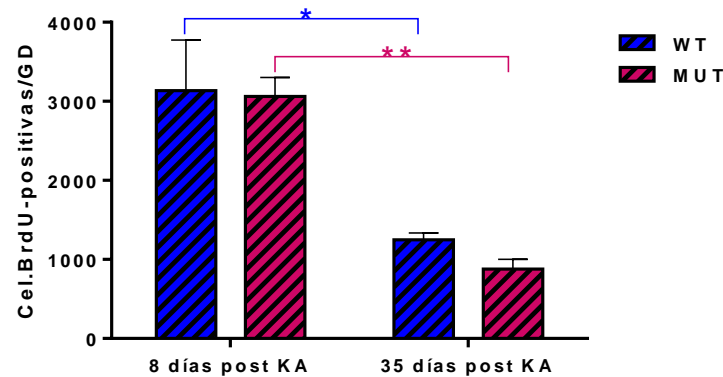




**Figura 18.** Marcación por IHQ de células BrdU positivas junto con marcadores neuronales y astrogliales en muestras de ratones perfundidos a los 8 días posteriores a la administración de KA. **A.** Doble marcación con BrdU (en rojo) de nuevas células de GD producto de neurogénesis (señaladas con flechas blancas) y con Tuj1 (en verde) de neuronas granulares de GD. **B.** Doble marcación con BrdU (en rojo) de nuevas células de GD producto de neurogénesis (señaladas con flechas blancas) y con GFAP (en verde) de células astrogliales presentes en hipocampo. Escala: 50 $\mu$ m.

Este resultado sugiere que la neurogénesis adulta en GD no se vería afectada ante mutaciones en MeCP2, al encontrarse una respuesta proliferativa similar en los ratones MUT y WT. Por lo tanto, la falta de crecimiento en el tamaño del TIP en respuesta a la actividad neuronal observada en los ratones MUT para MeCP2 no sería consecuencia de una menor producción de nuevas células granulares en DG que contribuyen a conformar el TIP.

Sin embargo, es posible que la sobrevivencia de estas neuronas nuevas se vea afectada en ausencia de MeCP2. A tal fin, se evaluó en forma general tanto para ratones WT como MUT la proporción de nuevas células de GD (BrdU+), producto de la neurogénesis inducida con AK, que sobrevivieron luego de 5 semanas de la inducción de actividad neuronal. En la Figura 19 se encuentra graficado para ratones WT y MUT administrados con AK el número de células BrdU+ por GD contabilizadas a los 8 días posteriores a la inducción de actividad epileptogénica (momento de mayor proliferación celular en GD) y a los 35 días posteriores a la administración de AK, cuando las nuevas células del GD ya han alcanzado el fenotipo de neuronas maduras. Como puede observarse, no se registraron diferencias significativas entre los genotipos en cuanto a la disminución en el número de células BrdU+ entre los dos momentos posteriores a la inducción de la actividad epileptogénica [ $F_{(1,9)}=0,2091$ ;  $p=0,6583$ ], habiendo alcanzado los ratones WT una disminución del 60,18%, y en los MUT del 71,3%. Tanto a los 8 ( $p=0,9987$ ) como a los 35 ( $p=0,8383$ ) días post AK no se registraron diferencias significativas en el número de células BrdU+/GD entre ambos genotipos. Esto sugeriría, que la sobrevivencia de las nuevas neuronas de GD no se encontraría afectada por fallas en MeCP2, por lo que la falta de respuesta en el tamaño del TIP, registrada a las 2 semanas luego de la administración de AK, no se debería a una mayor muerte de las nuevas células de GD en los MUT, sino que más bien podría estar relacionada con alteraciones de factores neurotróficos (BDNF) o de guiado axonal, que es lo que se evaluó a continuación.



**Figura 19. Cuantificación de células BrdU positivas por GD en ratones WT y MUT para MeCP2 inyectados con AK.** Un solo episodio epileptogénico conduce a una disminución similar en el número de células BrdU+ entre los días 8 y 35 posteriores a la actividad inducida con AK en los ratones WT y MUT.  $n=3$  ratones por grupo experimental. Análisis de datos: ANOVA de dos vías seguido por Tukey HSD test, \*  $p<0,05$ ; \*\*  $p<0,01$ .

## RATONES MUTANTES PARA MECP2 MUESTRAN ALTERACIONES EN LA EXPRESIÓN DE MOLÉCULAS DE GUIADO INDUCIDA POR ACTIVIDAD NEURONAL.

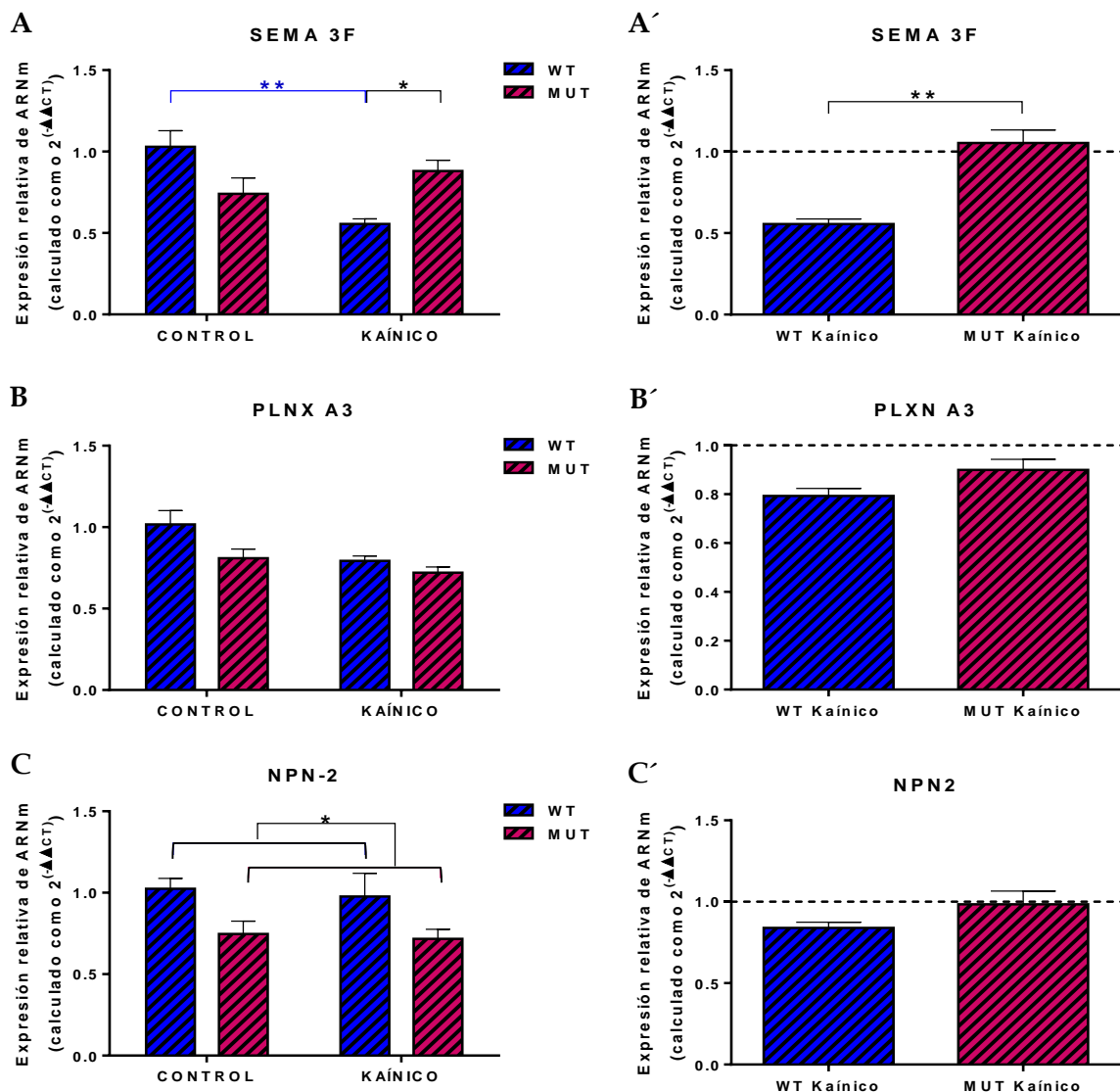
En la primera parte de esta tesis, en el neurodesarrollo postnatal temprano se detectó un retraso en el refinamiento del TIP en animales mutantes para MeCP2, el cual fue acompañado por alteraciones en la expresión de Sema 3F y su complejo receptor (PlexnA3-Npn-2), principales elementos moleculares que regulan dicho proceso. Considerando estos resultados y la falla en la respuesta plástica del TIP a actividad epileptogénica en ratones adultos mutantes para MeCP2, resultó de primer interés analizar la expresión de elementos de la vía de Sema 3F. Esta molécula de guiado axonal está involucrada en el crecimiento, guía y blanco axonal de las MF hipocampales (63,106,169), actuando como inhibidor del crecimiento axonal al combinarse con su complejo receptor presente en los axones e induciendo el colapso de los mismos (170).

Partiendo de nuevos grupos de ratones MUT y KO de P63 y P42 días de edad respectivamente, y sus correspondientes compañeros de camada WT, se formaron grupos de animales inyectados con AK y grupos controles (inyectados con PBS estéril). Pasadas dos semanas luego de la inducción de actividad epileptogénica con AK (momento donde se registró la falta de respuesta en el TIP en los ratones mutantes para MeCP2) se procedió a diseccionar el hipocampo de los animales de los diferentes grupos experimentales. Los niveles de expresión de ARNm tanto de los genes de Sema 3F como de sus dos receptores (PlexnA3 y Npn-2) se cuantificaron por RT-PCR en tiempo real.

En la Figura 20 se encuentran graficados los niveles de expresión de ARNm de los genes evaluados para los animales MUT del modelo MeCP2-308 y los correspondientes WT. Para el caso del ligando Sema 3F (Figura 20A) se detectaron diferencias significativas en la expresión de dicha molécula entre los ratones WT y MUT [ $F_{(1,15)}=4,7$ ;  $p<0,05$ ], observándose, por un lado, una disminución significativa en los niveles de expresión de Sema 3F en los ratones WT inyectados con AK en comparación con los WT controles, mientras que en el caso de los ratones MUT no se registraron cambios estadísticamente significativos entre controles y los tratados con AK. Asimismo, los ratones WT AK presentaron niveles significativamente menores de Sema 3F en comparación con los MUT AK (Figura 20A'). En el caso de los niveles de expresión de ARNm de PlexnA3 (Figura 20B y B') no se registraron diferencias significativas entre ambos genotipos del modelo, como tampoco dentro de cada genotipo, entre los controles y los tratados con AK [ $F_{(1,14)}=1,327$ ;  $p=0,2687$ ]. Mientras que para el caso del otro componente del complejo receptor de Sema 3F: Npn-2 (Figura 20C y C'), si bien dentro de cada genotipo no se registraron cambios en la expresión de esta molécula en respuesta al tratamiento con AK, si se observaron cambios en los niveles basales de la misma



entre los ratones WT y MUT, encontrándose en estos últimos significativamente disminuida la expresión de Npn-2 [ $F_{(1,14)}=8,072$ ;  $p<0,05$ ].

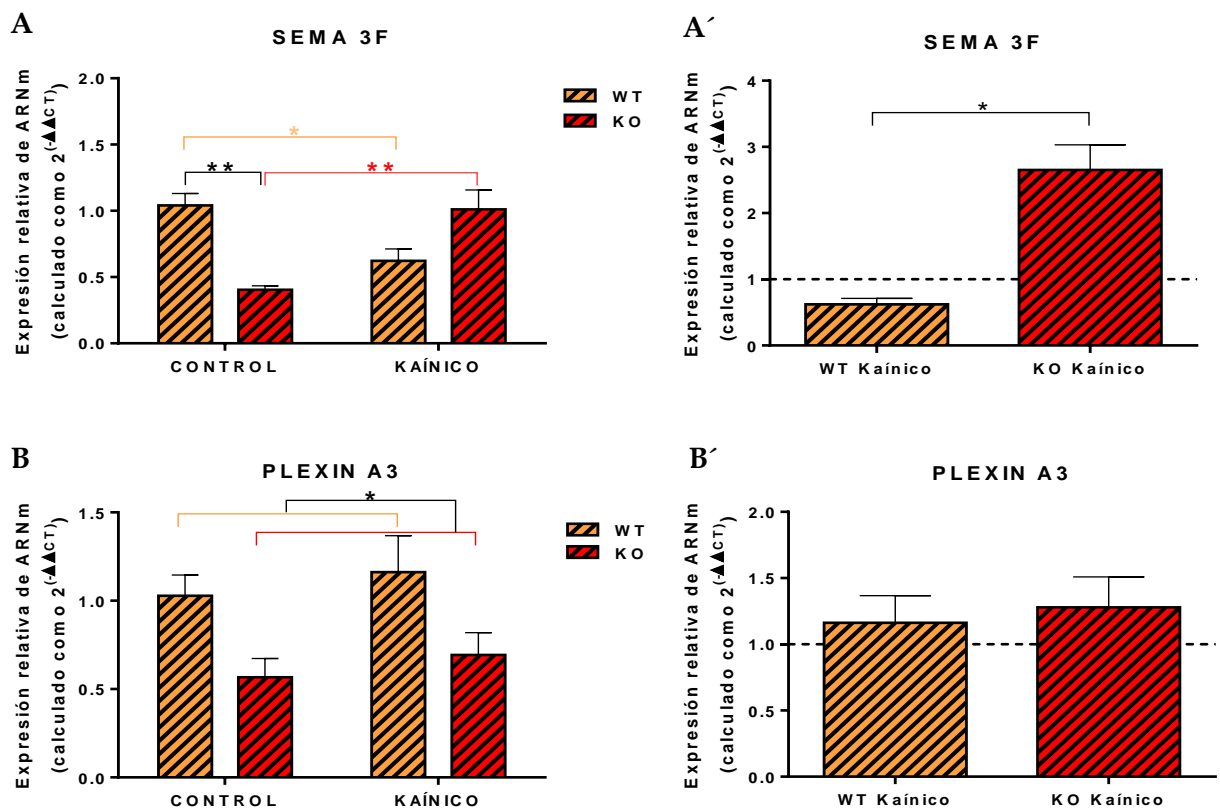


**Figura 20.** Niveles de ARNm de elementos de la vía de Sema 3F determinados por RT-PCR en tiempo real en ratones WT y MUT del modelo MeCP2-308. **A.** Niveles de ARNm de Sema 3F. A las dos semanas posteriores a la inducción de actividad neuronal con AK se observó una significativa disminución en los ratones WT tratados con AK en relación con los WT controles, mientras que no se registraron cambios significativos entre los ratones MUT controles e inyectados con el agente convulsivante. **B y C.** Niveles de ARNm de PlxnA3 y Npn-2 respectivamente. No se detectaron diferencias significativas en la respuesta de ambos genotipos para los niveles de expresión de PlxnA3 y Npn-2. El cADN fue preparado individualmente para cada ratón. Los resultados están representados como la relación entre la cantidad relativa del gen de interés y GAPDH. Los resultados de los animales WT control fueron normalizados a 1. **A' - C'.** A fin de evidenciar mejor el efecto del AK en cada genotipo, también se calcularon los niveles de expresión inducidos con AK en referencia a los niveles controles WT y MUT. La línea de puntos marcada en el eje Y ( $Y=1$ ) representa los valores controles para cada genotipo. Las reacciones de PCR en tiempo real fueron corridas separadamente en duplicados para cada ratón.  $n=4$  ratones en el caso del grupo experimental WT control.  $n=5$  ratones por grupo experimental en WT-AK y MUT control y con AK. Análisis de datos. A-C: ANOVA de dos vías, seguido por Tukey HSD test. A' - C': Mann-Whitney  $t$  test con 95% de intervalos de confianza, \*

En la Figura 21 se encuentran graficados los niveles de expresión de ARNm de los genes evaluados para los animales KO y WT del modelo MeCP2Bird. Con respecto al ligando Sema 3F (Figura 21A), se encontró una marcada diferencia en la expresión de dicha molécula

entre los ratones WT y KO [ $F_{(1,14)}=25,31$   $p<0,001$ ], registrándose en ratones WT una disminución significativa en los niveles de Sema 3F en los inyectados con AK comparados con los controles (resultado similar al observado en los ratones WT correspondientes a los ensayos de modelo MUT MeCP2-308). En cambio, en el caso de los KO el resultado fue opuesta, ya que se encontraron bajos niveles en los ratones KO controles y un aumento significativo en los KO inyectados con AK (Figura 21A').

En cuanto a la expresión de PlxnA3 (Figura 21B y B'), se observó que si bien dentro de cada genotipo no hubo cambios en su expresión en respuesta al tratamiento con AK, si se registraron cambios en los niveles basales de PlxnA3 entre los ratones WT y KO, encontrándose en estos últimos significativamente disminuida su expresión [ $F_{(1, 16)}=7,28$ ;  $p<0,05$ ].



**Figura 21. Niveles de ARNm de elementos de la vía de Sema 3F determinados por RT-PCR en tiempo real en ratones WT y KO del modelo MeCP2Bird.** **A.** Niveles de ARNm de Sema 3F. A las dos semanas posteriores a la inducción de actividad neuronal con AK se observó una significativa disminución en los ratones WT tratados con AK en relación con los WT controles, mientras que se registró una respuesta inversa entre los ratones KO inyectados con AK y controles, siendo los niveles basales de Sema 3F en los controles KO significativamente menores que en los WT controles. **B.** Niveles de ARNm de PlxnA3. Se observaron cambios en los niveles de la misma entre WT y KO (independientemente del tratamiento o no con AK), encontrándose en estos últimos significativamente disminuida la expresión de PlxnA3. El cADN fue preparado individualmente para cada ratón. Los resultados están representados como la relación entre la cantidad relativa del gen de interés y GAPDH. Los resultados de los animales WT control fueron normalizados a 1. **A' - B'.** A fin de evidenciar mejor el efecto de AK en cada genotipo, también se calcularon los niveles de expresión inducidos con AK en referencia a los niveles controles WT y MUT. La línea de puntos marcada en el eje Y (Y=1) representa los valores controles para cada genotipo. Las reacciones de PCR en tiempo real fueron corridas separadamente en duplicados para cada ratón. n= 4 ratones en grupos WT control y con AK. n=5 ratones en grupos MUT control y con AK. Análisis de datos. A- B: ANOVA de dos vías, seguido por Tukey HSD test. A' - B': Mann-Whitney t test con 95% de intervalos de confianza, \*  $p<0,05$ ; \*\*  $p<0,01$ .

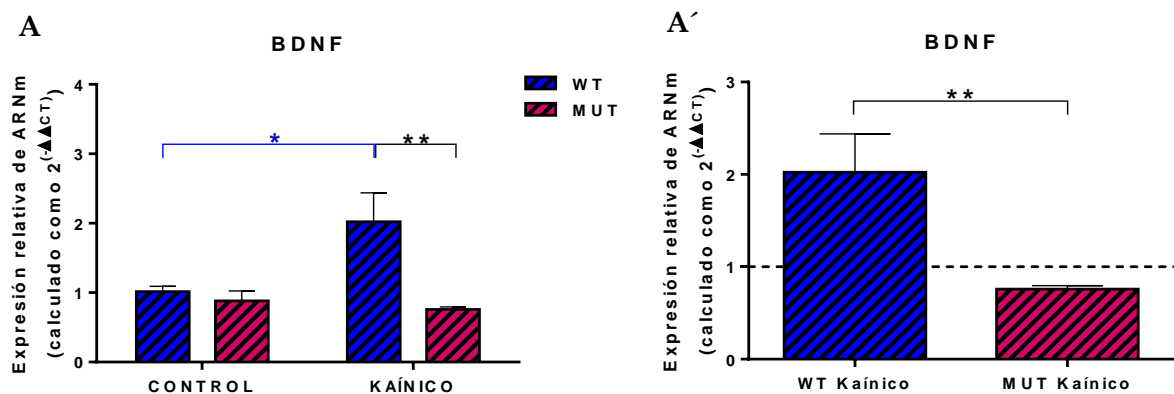
Resumiendo los resultados descriptos hasta ahora en esta segunda parte, en animales WT se registró un aumento en el tamaño del TIP en respuesta a la actividad neuronal inducida con AK. Esta respuesta estuvo ausente en ambos modelos mutantes para MeCP2, a pesar que se detectó un aumento en la expresión temprana de genes inducidos por actividad. La falta de crecimiento del TIP en ratones mutantes estuvo acompañada de una desregulación en los niveles de expresión tanto de Sema 3F, que ejerce un importante efecto quimio-repulsivo sobre axones hipocampales, como de los componentes de su complejo receptor. En este sentido, la respuesta de los ratones WT inyectados con AK coincide con resultados de otros autores (169,170), quienes observaron en ratones expuestos a actividad epileptogénica (con AK o con pilocarpina), una disminución en los niveles de Sema 3F entre la primer y segunda semana posteriores a la inducción de actividad, en las áreas CA3, CA1 y GD. Con respecto a esta disminución de los niveles de Sema 3F en las regiones CA3 y GD se describió que la misma coincide con la formación de nuevas sinapsis en el circuito MF-CA3 (170,171). Así, la reducción en la expresión de Sema 3F inducida por AK en animales WT (baja quimio-repulsión), promovería un medio permisivo para el crecimiento de las MF, contribuyendo al cambio dinámico en el tamaño del TIP registrado a las dos semanas posteriores a la inducción de actividad con AK en estos animales (63). Dado que los ratones MUT y KO para MeCP2 no disminuyeron los niveles de Sema3F en respuesta a AK (Figs. 20A y 21A), es posible sugerir que en estos animales existiría un ambiente inhibitor del crecimiento axonal que podría explicar en parte, la falta de aumento en el volumen del TIP.

## **LA EXPRESIÓN DE BDNF INDUCIDA POR ACTIVIDAD NEURONAL ES DEFICIENTE EN RATONES MUTANTES PARA MECP2.**

Los niveles de neurotrofinas en el hipocampo, son regulados dinámicamente por actividad neuronal y la modificación de esos niveles puede alterar el crecimiento y la distribución de las MF. BDNF se expresa normalmente en la mayoría de las neuronas hipocampales, incluyendo las células granulares (172,173). Este factor promueve el crecimiento y orientación de los axones de las células granulares in vitro, amplía la inervación de MF en CA3 y regula la plasticidad sináptica de MF (174-176). Asimismo, se ha demostrado que MeCP2 es fosforilada en respuesta a actividad sináptica y regula la expresión de genes, en particular la producción de BDNF (28,29,31). Si bien hemos observado que tanto en animales WT como MUT, los niveles de BDNF aumentan de manera similar a las 6hs de la inyección con AK, decidimos determinar los niveles del mismo luego de 2 semanas del tratamiento, a fin de evaluar si la expresión de BDNF se correlaciona con el aumento de volumen del TIP.

Como muestra la Figura 22, se registró una diferencia significativa en la respuesta de ambos genotipos WT y MUT en cuanto a los niveles de expresión de BDNF [ $F_{(1,13)}=10,61$ ;

$p < 0,01$ ]. Los animales WT mostraron un aumento moderado pero significativo en la expresión, dos semanas luego de la inyección con AK. En contraste, en los ratones MUT la expresión de BDNF se mantuvo invariable entre el grupo control y el tratado con AK; los niveles de BDNF de animales MUT AK fueron marcadamente inferiores a los registrados en los WT tratados con AK.



**Figura 22. Niveles de ARNm de BDNF determinados por RT-PCR en tiempo real en ratones WT y MUT del modelo MeCP2-308.** A Luego de dos semanas de la inducción de actividad se observó un significativo aumento en los ratones WT tratados con AK en relación con los WT controles, mientras que no se registraron cambios significativos entre los ratones MUT controles e inyectados con AK. A'. A fin de evidenciar mejor el efecto de AK en cada genotipo, también se calcularon los niveles de expresión inducidos con AK en referencia a los niveles controles WT y MUT. La línea de puntos marcada en el eje Y ( $Y=1$ ) representa los valores controles para cada genotipo.  $n= 4-5$  ratones por grupo experimental. Análisis de datos. A: ANOVA de dos vías, seguido por Tukey HSD test. A': Mann-Whitney t test con 95% de intervalos de confianza, \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ .

Dado que los efectos de este factor neurotrófico están mediados por la interacción y activación de su receptor específico: “tropomyosin-related kinase B receptor” (TrkB), se procedió a confirmar este resultado evaluando en tejidos de animales MUT y WT, controles y AK, la cantidad de células que presentan el receptor TrkB fosforilado, como un indicador de la acción de BDNF in vivo (177). Para esto se utilizaron criosecciones de muestras de cerebro de los grupos experimentales mencionados, perfundidos luego de dos semanas del tratamiento con AK, momento en el que los animales WT mostraron un aumento en los niveles de expresión de BDNF y en el tamaño del TIP en respuesta a AK. Mediante IHQ, las secciones fueron teñidas con el anticuerpo anti-pTrkB. Bajo microscopio se contabilizaron entonces las células pTrkB-positivas, visualizadas en todos los planos focales, a lo largo de la extensión rostro-caudal de la capa de células granulares de GD, cuyos axones conforman el TIP.

Al analizar las muestras, se determinó efectivamente que el área donde se concentraba el mayor número de células pTrkB-positivas correspondía a las neuronas granulares del DG (Figura 23A y B). Al contabilizar las células pTrkB-positivas (Figura 23C) en todas las muestras analizadas, encontramos una marcada diferencia entre los ratones WT y los MUT a las dos semanas luego de la administración de AK [ $F_{(1, 8)} = 11,58$ ;  $p < 0,01$ ].

Mientras que entre los ratones MUT controles versus AK no se detectaron diferencias significativas en el número de células pTrkB positivas (MUT control= 476±50; MUT inducidos= 642±24), en los WT AK se observó un significativo aumento de estas células en comparación sus controles (WT control= 584±90; WT inducidos= 928±46), siendo también los valores de los WT AK significativamente mayores a los de los MUT AK.

Este resultado obtenido en los ratones del modelo mutante MeCP2-308 junto con los resultados en los niveles de expresión de BDNF medidos por real time RT-PCR indicarían que en animales WT el crecimiento del TIP, evaluado a las 2 semanas luego de la inducción de actividad con AK, estaría acompañado por un incremento en la expresión de este importante factor neurotrófico. En ratones mutantes para MeCP2, la falta de aumento en el tamaño del TIP va acompañada de una respuesta deficiente en la expresión de BDNF a las dos semanas de someter a los animales a actividad epileptogénica.

Estos resultados indican que si bien los eventos de señalización involucrados en la respuesta temprana a actividad sináptica parecen no estar afectados en ausencia de MeCP2, la respuesta de factores tróficos a largo plazo resultaría deficiente para impulsar el crecimiento de MF inducido en respuesta a actividad epileptogénica.



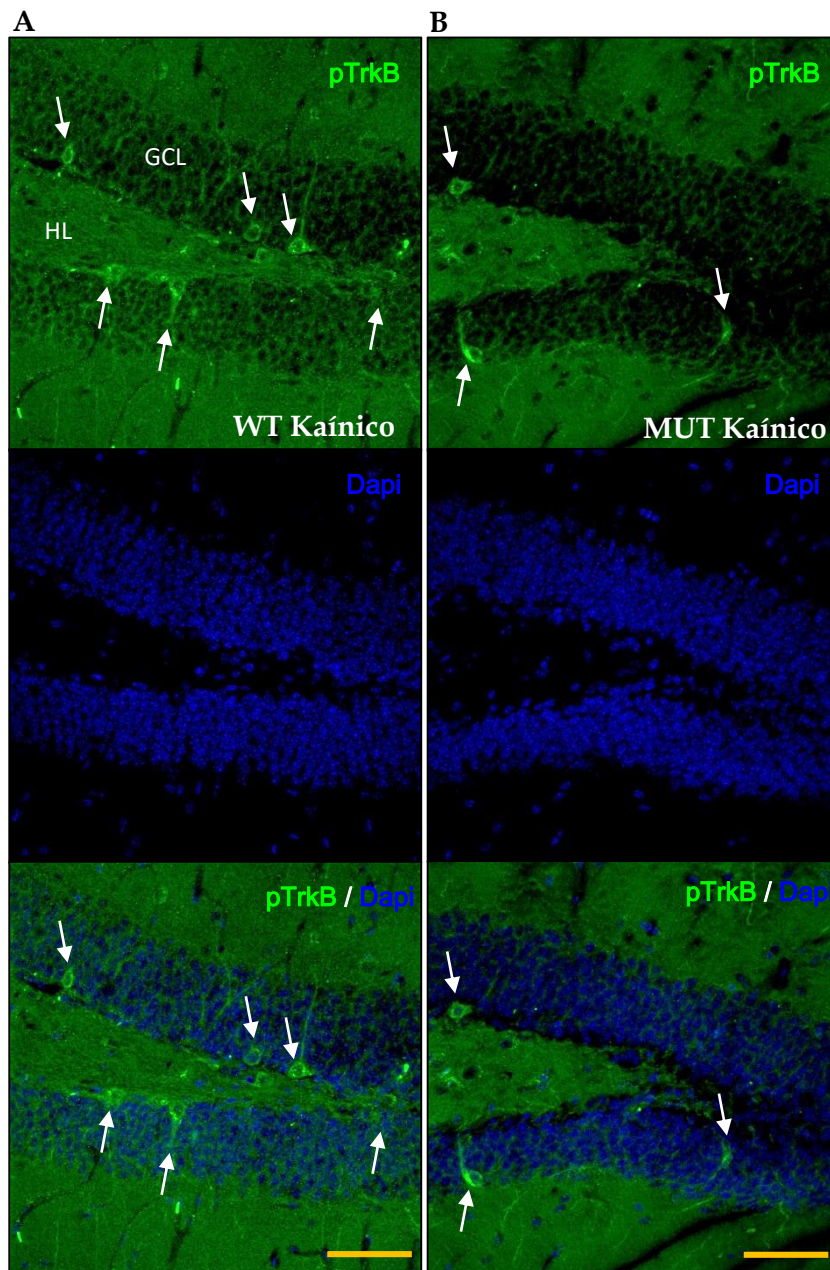
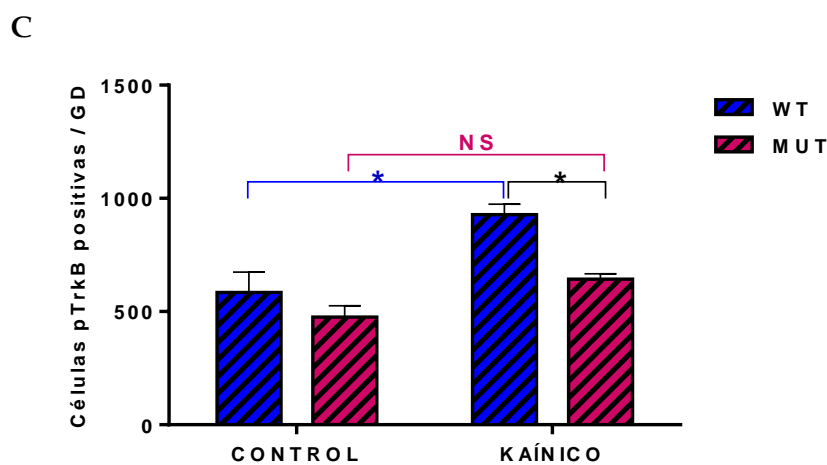


Figura 23. IHQ y conteo de células pTrkB positivas a las dos semanas post inducción de actividad neuronal con AK. A los quince días posteriores a la actividad epileptogénica inducida por AK, un mayor número de células pTrkB positivas (señaladas con flechas blancas) se observó en el GD los ratones WT inyectados con AK (A) en comparación a los MUT (B) también inducidos. IHQ con pTrkB en verde y Dapi en azul. Escala en A y B: 50  $\mu$ m. GCL: capa celular granular del DG. HL: hilus. C. Cuantificación de células pTrkB positivas por GD en ratones WT y MUT controles e inyectados con AK. Un solo episodio epileptogénico conduce a un aumento en el número de células pTrkB positivas durante la segunda semana después de la actividad inducida con AK en los ratones WT administrados con AK en comparación a los WT controles, no registrándose la misma respuesta en los ratones MUT administrados con AK. n= 3 ratones por grupo experimental. Análisis de datos: ANOVA de dos vías seguido por Tukey HSD test, \* p<0,05.

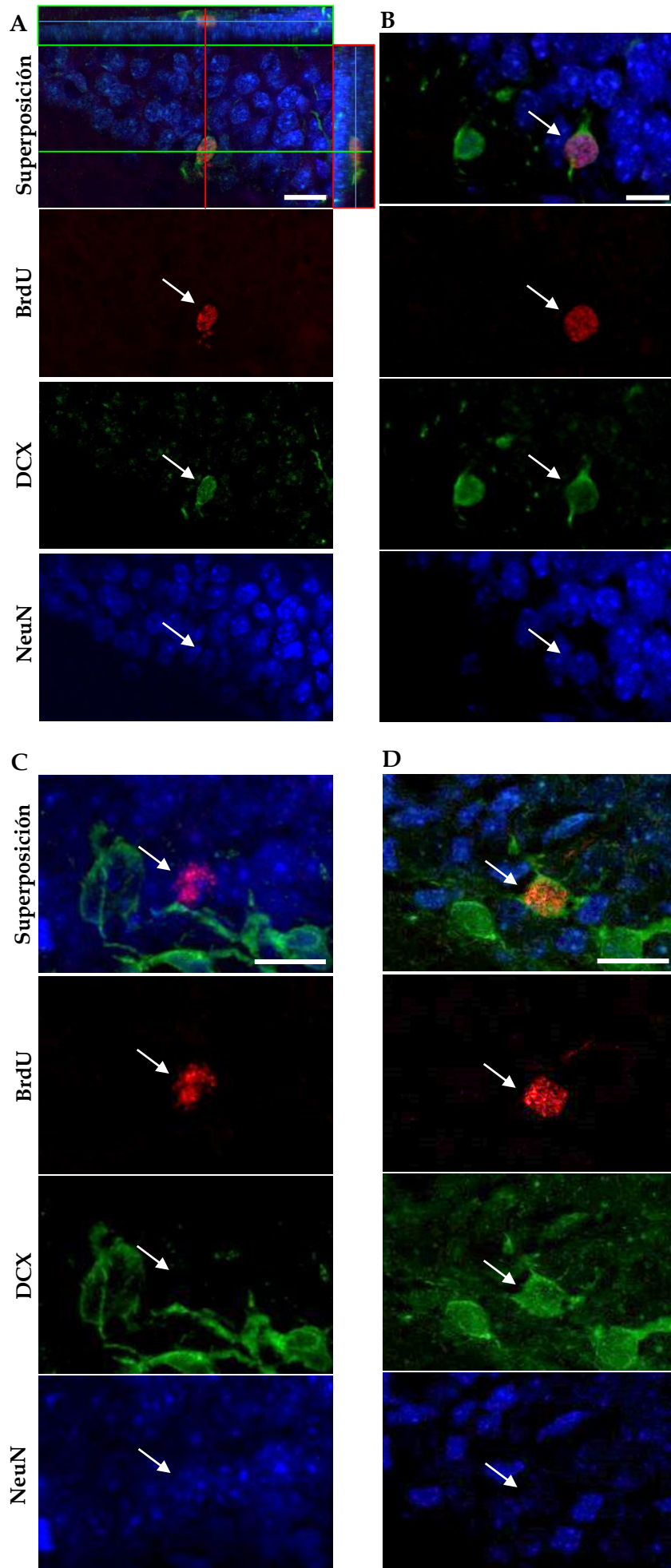


## ALTERACIONES EN LA MADURACIÓN DE NUEVAS NEURONAS GRANULARES PRODUCTO DE NEUROGÉNESIS ADULTA ANTE MUTACIONES EN MeCP2.

Trabajos previos en el sistema olfatorio y en hipocampo han demostrado que en ausencia de MeCP2 ocurren defectos en la maduración neuronal durante el desarrollo posnatal temprano, los cuales (aparentemente) se compensan más tarde en el desarrollo (65,178). Dado que en hipocampo las células de GD sufren neurogénesis adulta, nos preguntamos si las neuronas nuevas del organismo adulto recapitulan los defectos manifestados en el desarrollo posnatal temprano en ratones MUT. Para ello, evaluamos el porcentaje de maduración de células granulares originadas en el adulto, tomando ventaja del incremento en la neurogénesis adulta inducida por actividad epileptogénica.

Se partió de nuevos grupos de ratones WT y MUT de P63 días de edad expuestos a actividad epileptogénica mediante la administración de una sola inyección ip de AK. Debido a que el número de células BrDU positivas es muy bajo en los individuos controles (inyectados con PBS), para estos experimentos utilizamos sólo los grupos de animales inyectados con AK. Para el estudio de la maduración de las nuevas células granulares de GD se marcaron diferentes cohortes de progenitores celulares en tres días seguidos. Así, el 5to, 6to y 7mo días posteriores a la administración de AK (ventana temporal de mayor actividad proliferativa), se administraron 2 dosis de BrdU por día a cada animal, separadas por 7hs. Los animales se perfundieron a las 4 semanas desde la última dosis de BrdU (5 semanas desde la administración de AK), tiempo suficiente para que las nuevas células progenitoras neurales del GD alcancen una morfología característica de célula granular madura (148). La edad de los ratones al momento de la perfusión fue de P84 días (12 semanas).

Una vez obtenidas las criosecciones, por IHQ se realizaron triples inmunofluorescencias para marcadores neuronales. Los marcadores que se utilizaron fueron: anticuerpo **anti-BrdU** para marcar células en división, anticuerpo **anti-Doblecortina (DCX)** como marcador de neuronas inmaduras y el **factor de transcripción nuclear NeuN**, proteína neuronal constitutiva específica de neuronas postmitóticas. Bajo microscopio se analizaron y contabilizaron las células BrdU-positivas a lo largo de la extensión rostro-caudal de la capa de células granulares de GD, visualizadas en todos los planos focales. La colocación de los marcadores se analizó a través de todo el eje vertical Z de cada célula BrdU-positiva (cubriendo el soma celular entero). Contabilizadas y analizadas todas las células BrdU positivas por muestra de animal se procedió a calcular el porcentaje de nuevas neuronas producto de neurogénesis que alcanzaron la madurez (BrdU+NeuN<sup>+</sup>), el de las que todavía se encuentran en un grado intermedio de maduración (BrdU+DCX+NeuN<sup>+</sup>) y el de las inmaduras (BrdU+DCX<sup>+</sup>), a las 4 semanas desde la marcación de la última cohorte de progenitores celulares.

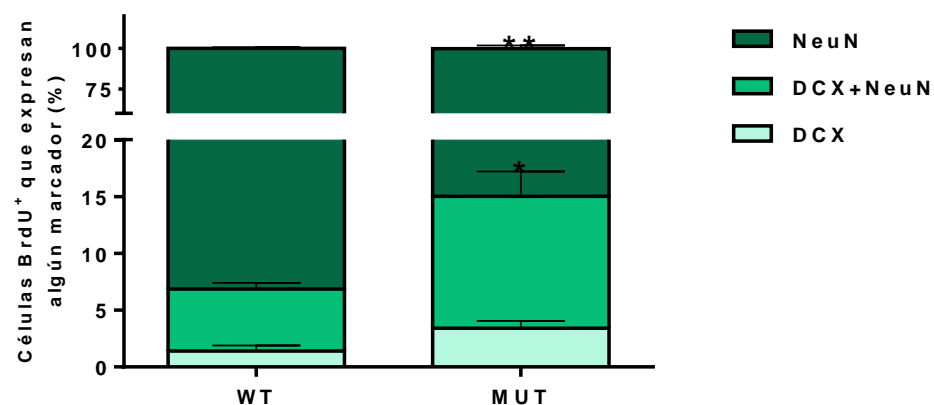


**Figura 24. Simple y doble marcación de las células BrdU positivas con los marcadores neuronales NeuN y DCX. A y B. Ejemplos de neuronas en estado intermedio de maduración que colocalizan con NeuN y DCX ("doble"). En A se muestra además la proyección ortogonal del eje Z sobre los ejes X (línea verde) e Y (línea roja). C. Ejemplo de una neurona madura que solo expresa NeuN. D. Ejemplo de una neurona inmadura que solo expresa DCX. Los paneles en vertical son planos ópticos únicos mostrando los 3 canales de fluorescencia por separado y su superposición en el panel superior. Escalas en A: 25  $\mu\text{m}$  y en B-D: 15  $\mu\text{m}$ .**



En la Figura 24 pueden observarse ejemplos de simple y doble marcación de las células BrdU positivas con los marcadores neuronales NeuN y DCX, que indican el estado de madurez de dichas células.

Al determinarse los porcentajes de células BrdU positivas maduras, en estado intermedio de maduración e inmaduras (Figura 25), 5 semanas luego de la inducción de actividad con AK, se encontraron diferencias significativas entre los animales WT y MUT para MeCP2 [ $F_{2, 21} = 13,73$ ;  $p < 0,001$ ]. En el caso de los ratones MUT se encontró que el porcentaje de nuevas células de GD que alcanzaron la madurez fue significativamente menor que en el caso de los ratones WT ( $MUT_{NeuN}: 86,39 \pm 1,494\%$ ;  $WT_{NeuN}: 93,13 \pm 0,762\%$ ). Sin embargo, mostraron una mayor proporción de células en estado intermedio de madurez e inmaduras ( $MUT_{DCX+NeuN}: 9,76 \pm 1,521\%$ ;  $MUT_{DCX}: 3,85 \pm 0,617\%$ ;  $WT_{DCX+NeuN}: 5,46 \pm 0,537\%$ ;  $WT_{DCX}: 1,41 \pm 0,481\%$ ).



**Figura 25. Porcentajes de células BrdU positivas en distintos estados de maduración en ratones WT y MUT inducidos a actividad neuronal con AK.** A las 5 semanas posteriores a la administración de AK en los ratones WT el porcentaje de las nuevas células granulares que alcanzaron la madurez fue de más del 90%, mientras que dicho porcentaje fue significativamente menor en los ratones MUT, presentando éstos a la vez mayores valores de nuevas células granulares en estados de inmadurez. Cada barra representa para cada genotipo de MeCP2 el porcentaje promedio  $\pm$  el error estándar (SEM) de células BrdU positivas colocalizando con el/ los correspondientes marcadores, normalizado al número total de células BrdU positivas en cada ratón. Cada barra está subdividida para indicar el porcentaje promedio de células BrdU positivas colocalizando con cada una de las combinaciones posibles de marcadores neuronales que indican los distintos estados de madurez de dichas células.  $n = 4-5$  ratones por grupo experimental. Análisis de datos: ANOVA de dos vías seguido por Sidak's test, \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ .

Así, los ratones MUT presentan un retraso en la maduración de neuronas nacidas en el hipocampo adulto; las células en estado intermedio de maduración se acumulan, a expensas de un menor número de células maduras. Estos resultados muestran que los ratones que portan una proteína MeCP2 mutada (MUT) presentan defectos en la maduración de neuronas nuevas en el adulto, de manera similar a lo observado durante el desarrollo temprano (65,178). El aumento en la neurogénesis adulta inducida por actividad neuronal, nos permitió evidenciar que este defecto se recapitula en el animal adulto. El retraso en la maduración de células granulares de GD adulto sugiere que, si bien en respuesta a actividad

sináptica se genera un número similar de neuronas nuevas en ausencia de MeCP2, éstas no se integrarían normalmente al circuito. Este defecto podría tener implicancias importantes en procesos de aprendizaje dependientes de hipocampo.

### **DEFECTOS EN LA MEMORIA ESPACIAL EVALUADA MEDIANTE EL TEST DE LABERINTO DE BARNES ANTE MUTACIONES EN MeCP2.**

Dados los defectos encontrados en los elementos que conforman el circuito de las MF-CA3 en la región dorsal del eje hipocampal de ratones mutantes para MeCP2 y considerando además que la misma se encuentra principalmente involucrada en el procesamiento de la memoria espacial, se decidió evaluar el aprendizaje y memoria espacial de los ratones del modelo mutante para MeCP2 a través de su desempeño y capacidad de navegación en el laberinto de Barnes. Se estima que la mejora en el rendimiento para ubicar una caja de escape a estímulos aversivos, a lo largo de sucesivas sesiones de entrenamiento, permite valorar procesos de aprendizaje y memoria espacial en roedores (179).

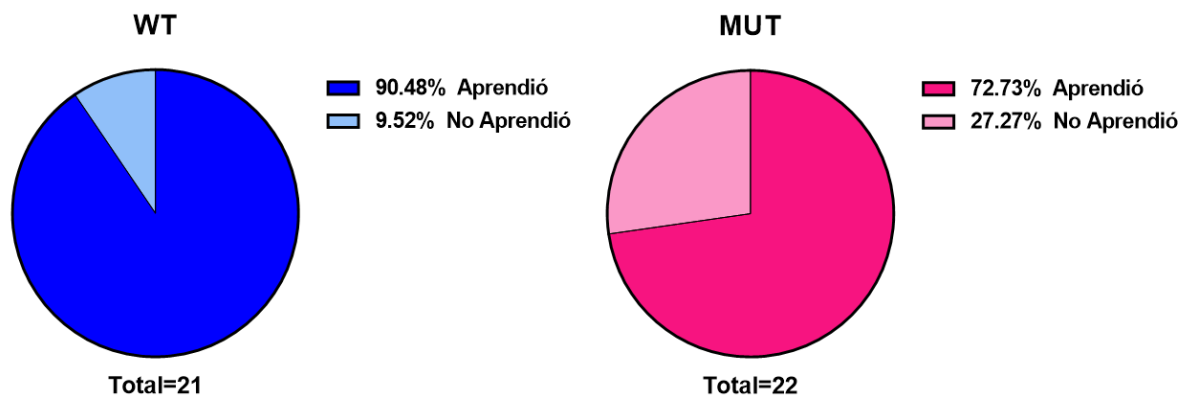
Considerado menos estresante que los laberintos de agua (Morris), el laberinto de Barnes consiste en un diseño relativamente simple de una plataforma circular con varios orificios igualmente espaciados alrededor del borde perimetral. Todos menos uno de los agujeros son de fondo falso o terminación ciega, mientras que uno conduce a una jaula de escape. Los estímulos ligeramente aversivos (por ejemplo, luces brillantes) proporcionan la motivación para localizar la jaula de escape, la cual se encuentra asimismo flanqueada por señales visuales (179).

Partiendo de nuevos grupos de ratones adultos de P84 días de edad (12 semanas) MUT y sus compañeros de camada WT, los cuales a los P63 días de edad (9 semanas) fueron sometidos a actividad epileptogénica con AK o formaron parte del grupo control inyectado con PBS estéril, se evaluó el aprendizaje espacial y memoria de acuerdo a su desempeño en el test del laberinto de Barnes. Este consiste en 4 etapas divididas en 4 días: día 1- habituación; día 2- tres entrenamientos de 4 min cada uno, separados entre sí por 30 min de descanso; día 3- descanso y día 4- test de memoria que consiste en una sola exposición en la plataforma que dura 2 min y en la cual se extrae la caja de escape. En cada entrenamiento al igual que en el test del 4to día se registró: el tiempo que el animal pasa en cada cuadrante de la plataforma, el primer cuadrante al que se dirige el animal al quedar descubierto, el número de exploraciones totales en los orificios de la plataforma, el número de exploraciones en los orificios de cada cuadrante, el número de exploraciones correctas en el orificio blanco y, en el caso de los entrenamientos, la latencia de entrada a la caja de escape.

## Aprendizaje

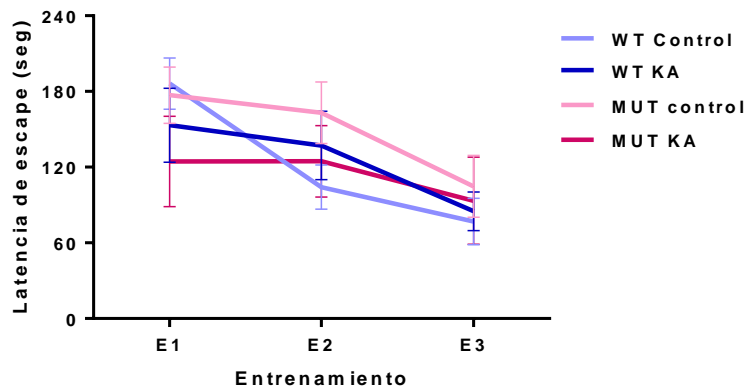
La adquisición o el aprendizaje de la ubicación de la caja de escape se evaluó determinando la latencia de escape a lo largo de los sucesivos entrenamientos, es decir el tiempo que transcurre hasta que el animal encuentra y entra a la jaula de escape. De este modo la adquisición se refleja en las menores latencias de escape a lo largo de los entrenamientos.

En primer lugar se evaluó el aprendizaje de los animales en los distintos grupos experimentales, registrando el tiempo que le tomó a cada animal entrar en la caja de escape en cada uno de los tres entrenamientos a los que fueron sometidos. Interesantemente, lo primero que se observó fue que dentro de cada genotipo, independientemente de si se trataba de animales controles o tratados con AK, el porcentaje de animales que no aprendieron fue casi un 20% mayor en los ratones MUT con respecto a los WT (Figura 26), considerándose como no aprendedores a aquellos animales que no entraron en la caja de escape en ninguno de los tres entrenamientos que involucra el test de Barnes.



**Figura 26. Porcentaje de animales aprendedores y no aprendedores WT y MUT para MeCP2.** En el caso de los ratones WT solamente 2 animales (1 WT control y 1 WT con AK) de un total de 21 no aprendieron a localizar ni entrar en la caja de escape, mientras que en los MUT fueron 6 (3 MUT controles y 3 MUT con AK) los casos de animales no aprendedores sobre un total de 22.

Sin embargo, al evaluar ahora la latencia de escape entre los animales que sí lograron localizar y entrar a la caja de escape dentro de los 4 min que dura cada entrenamiento, no se hallaron diferencias significativas en el aprendizaje o adquisición entre los distintos grupos experimentales de ratones del modelo MeCP2-308 [ $F_{(6, 117)}=0,744$ ;  $p=0,6150$ ] (Figura 27), encontrándose a lo largo de los sucesivos entrenamientos los tiempos de latencia de escape promedios igualmente disminuidos en los cuatro grupos experimentales. Esto indicaría que, independientemente de si los animales han sido previamente expuestos o no a un aumento en la actividad neuronal, el aprendizaje a lo largo de los sucesivos entrenamientos no se vería afectado en los individuos de este modelo mutante para MeCP2.



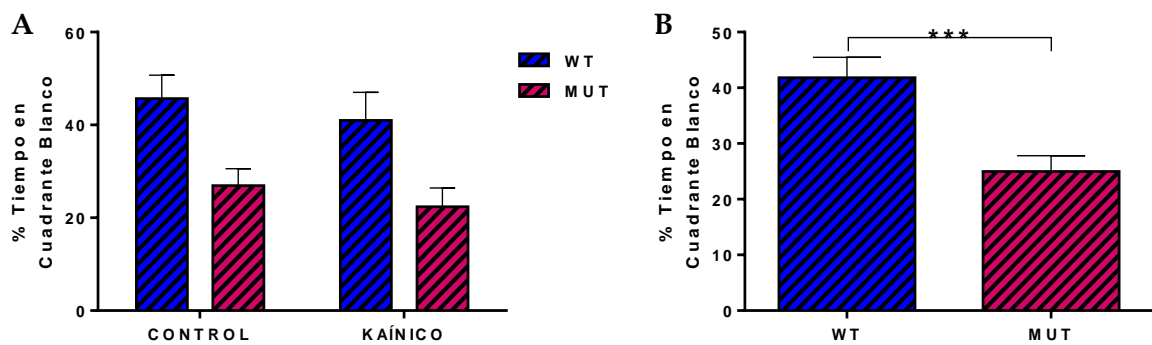
**Figura 27. Latencia de escape en ratones WT y MUT para MeCP2, controles y administrados con AK.**

En los cuatro grupos experimentales se registró una disminución en el tiempo de latencia de escape (medido en segundos) a lo largo de los sucesivos entrenamientos, no registrándose en los mismos diferencias entre los genotipos ni entre animales controles y los tratados con AK cinco semanas anteriores al desarrollo del test de Barnes.  $n= 9-14$  ratones por grupo experimental. Análisis de datos: ANOVA de dos vías seguido por Tukey HSD test.

## Memoria

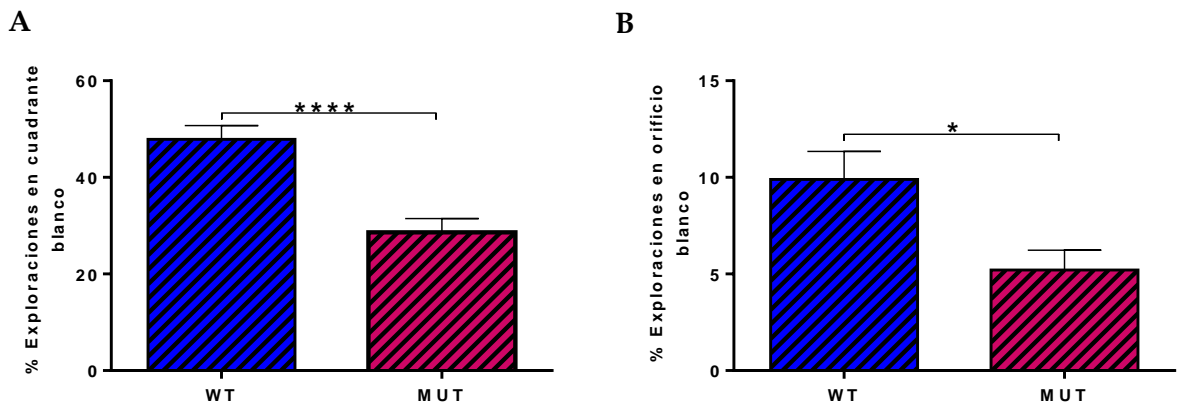
48 hs después de la fase de adquisición o aprendizaje se realiza una prueba final de retención o memoria, que consiste en una sola exposición de 2 min en la plataforma, pero se extrae la caja de escape. Ésta es una prueba de preferencia espacial en la que si el animal ha aprendido, pasará más tiempo en el cuadrante blanco, es decir, donde previamente estaba situada la caja de escape. De esta manera, la memoria o retención se refleja en el mayor porcentaje de tiempo en el cuadrante de escape durante la prueba final (179,180).

Los datos obtenidos en la prueba final con respecto al tiempo que los animales pasaron en el cuadrante blanco en relación a los 2 min totales de exposición en la plataforma, arrojaron una diferencia significativa entre los genotipos, independientemente del tratamiento o no con AK [ $F_{(1,36)} = 14,81$ ;  $p < 0,001$ ], (Figura 28A). Así, mientras que los ratones WT controles y con AK pasaron más del 40% del tiempo en el cuadrante donde se encontraba la caja de escape (WT control:  $45,65 \pm 5,05\%$ ; WT con AK:  $40,96 \pm 6,08\%$ ), en el caso de los MUT solo estuvieron un promedio de 24% del tiempo total del test en el cuadrante blanco (MUT control:  $26,91 \pm 3,65\%$ ; MUT con AK:  $22,34 \pm 4,07\%$ ). En la Figura 28B pueden observarse directamente los porcentajes de tiempo pasado en el cuadrante blanco para cada genotipo de MeCP2, agrupando ahora dentro de cada uno de ellos a los animales controles junto con los inyectados con AK (WT:  $41,80 \pm 3,69\%$ ; MUT:  $24,97 \pm 2,85\%$ ). Estos resultados indicarían que los ratones MUT reflejan una falla en la fase de retención o memoria de lo aprendido durante la fase de adquisición.



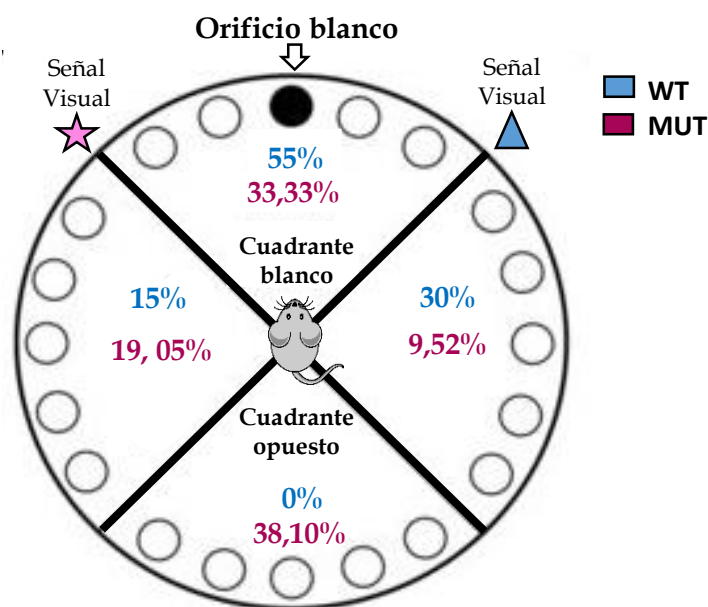
**Figura 28. Porcentaje de tiempo pasado en el cuadrante blanco durante el test final de memoria. A.** Porcentaje de tiempo en cuadrante blanco para los cuatro grupos experimentales: WT control y con AK y MUT control y con AK. El análisis estadístico arroja una diferencia significativa por genotipo, independientemente del tratamiento, siendo el % de tiempo pasado en el cuadrante blanco significativamente mayor en los ratones WT con respecto a los MUT.  $n=8-13$  ratones por grupo experimental. Análisis de datos: ANOVA de dos vías seguido por Tukey test. **B.** Porcentaje de tiempo en cuadrante blanco para los dos genotipos de MeCP2, dentro de los cuales se incluyen juntos los animales controles y tratados con AK.  $n=18-20$  ratones por grupo experimental. Análisis de datos. A: ANOVA de dos vías seguido por Tukey HSD test. B: Mann-Whitney  $t$  test con 95% de intervalos de confianza.  $***p<0,001$

Los resultados anteriores se complementaron con los obtenidos al cuantificar el porcentaje de exploraciones realizadas por los animales en los orificios del cuadrante blanco con respecto al total de las mismas en los orificios de la plataforma durante los 2 min del test final de memoria, e incluso también al cuantificar el porcentaje de exploraciones en el orificio de escape ("blanco") con respecto a las exploraciones totales. Nuevamente aquí, los análisis estadísticos arrojaron diferencias significativas por genotipo, independientemente del tratamiento o no con AK (resultados no mostrados), razón por la cual se muestran directamente los resultados para el total de los animales WT y MUT. Con respecto al porcentaje de exploraciones en el cuadrante blanco (Figura 29A), se observó una marcada diferencia entre los genotipos WT y MUT para MeCP2 [ $F_{(1,38)}=22,7$ ;  $p<0,0001$ ]; mientras que en los ratones WT las exploraciones en el cuadrante blanco representaron el  $47,88\pm 2,82\%$  del total de las mismas realizadas en toda la plataforma, en los MUT dicho porcentaje fue de sólo el  $28,62\pm 2,84\%$ . Por otra parte, al calcular el número de exploraciones realizadas en el orificio de escape en relación al total de las mismas en todos los orificios de la plataforma (Figura 29B), nuevamente para el caso de los ratones WT el porcentaje de aciertos en el orificio de escape fue significativamente mayor que en los MUT (WT:  $9,89\pm 1,45\%$ ; MUT:  $5,20\pm 1,023\%$ ) [ $F_{(1,38)}=6,098$ ;  $p=0,0181$ ].



**Figura 29.** Porcentajes de exploraciones en el cuadrante y orificio blancos en relación a las exploraciones totales durante el test final de memoria. **A.** Porcentaje de exploraciones en los orificios del cuadrante blanco realizado por los ratones WT y MUT para MeCP2 con respecto al total de las mismas en todos los huecos de la plataforma del laberinto de Barnes. **B.** Porcentaje de exploraciones en el orificio blanco en relación al total de las mismas realizadas durante el test de memoria por los animales WT y MUT. Tanto el % de exploraciones en el cuadrante blanco (A) como el de exploraciones en el orificio blanco (B) fueron significativamente mayores en los ratones WT al compararlos con los MUT.  $n=18-20$  ratones por grupo experimental. Análisis de datos: Mann-Whitney  $t$  test con 95% de intervalos de confianza.  $*p<0,05$ ;  $****p<0,0001$ .

Otro dato curioso resultó al observar cual fue la primer zona o cuadrante de exploración al que los ratones se dirigieron al quedar descubiertos en el medio de la plataforma, al inicio del test de memoria. La mayoría de los ratones WT (55%) se dirigieron en primer lugar al cuadrante blanco y en ninguno de los casos se adentraron en el cuadrante opuesto a éste. Mientras que en los ratones MUT el mayor porcentaje (38,1%) se dirigió en primer lugar al cuadrante opuesto al blanco (Figura 30).



**Figura 30.** Primer cuadrante o zona de exploración durante la fase de prueba de memoria o retención. En el esquema se encuentran representados los 4 cuadrantes del laberinto de Barnes (blanco, opuesto, izquierdo y derecho), las señales visuales que flanquean el orificio blanco donde se encontraba la caja de escape durante los entrenamientos, y los porcentajes de animales que se dirigieron en primer lugar a cada uno de los cuadrantes. En azul los porcentajes de los ratones WT y en rosa oscuro los de los MUT.

Estos resultados indican que ratones de 12 semanas del modelo MeCP2-308, no mostrarían defectos en el proceso de aprendizaje espacial medido con el laberinto de Barnes, sin embargo se evidenció una falla marcada en la retención de la información adquirida evaluada por el mismo test.

## CONCLUSIONES

En esta segunda parte propusimos evaluar cómo la falta de MeCP2 afecta respuestas dependientes de actividad en el circuito hipocampal MF-CA3. Para ello utilizamos un paradigma para inducir actividad epileptogénica por administración de AK *in vivo* en dos modelos animales deficientes en MeCP2. Nuestros resultados mostraron que la falta de MeCP2 interfiere con procesos de plasticidad estructural presináptica. Tanto ratones carentes de MeCP2 (modelo null MeCP2Bird) como ratones que expresan una versión trunca de MeCP2 (modelo MeCP2-308), fallaron en incrementar el volumen del tracto TIP en respuesta a la actividad epileptogénica. Si bien se detectaron algunas diferencias en la magnitud de la respuesta epileptogénica en los modelos de ratones deficientes en MeCP2 (KO y MUT), la expresión temprana de genes (Arc y BDNF) inducidos *in vivo* por dicha actividad fue similar a los WT. Esto sugiere que la falta de crecimiento del tracto TIP no se debería a un defecto en la activación neuronal temprana en el hipocampo de ratones deficientes en MeCP2. Asimismo, cuando se determinó el grado de neurogénesis inducido por AK, tanto ratones WT como MUT mostraron niveles similares, en el pico de proliferación (7 días post AK). Sin embargo, 2 semanas luego de administrar AK, al momento en que los WT muestran un aumento en el TIP, los animales MUT presentaron diferencias significativas en la expresión de Sema3F y de BDNF, que fueron compatibles con la generación de un ambiente inhibitor del crecimiento axonal, y podría explicar en parte, la falta de aumento en el volumen del TIP. Finalmente, encontramos que estos defectos en respuestas dependientes de actividad fueron acompañados por un déficit en la maduración de neuronas granulares nacidas en el hipocampo adulto, lo cual además se correlacionó con fallas en un test de memoria espacial (laberinto de Barnes).

Con estos estudios se sientan las bases para establecer un modelo que nos permita evaluar el efecto de la manipulación de vías específicas involucradas en guiado axonal, sinaptogénesis, maduración en un circuito específico y correlacionarlo con cambios en el desempeño en test de memoria espacial.

---

# DISCUSIÓN

---



## **DEFECTOS EN MECP2 ALTERAN EL ESTABLECIMIENTO DE CONEXIONES NEURONALES AFECTANDO PROCESOS QUE INVOLUCRAN A COMPONENTES PRE-SINÁPTICOS.**

Mutaciones en el gen de la proteína de unión a metil-CpG 2 (MECP2) son la causa más frecuente de los casos clásicos de RTT. Sin embargo, dichas mutaciones o incluso la expresión alterada de este gen también están asociadas con un espectro de desórdenes del desarrollo neurológico, con una superposición fenotípica sustancial, tales como trastornos del espectro autista, encefalopatías neonatales severas, entre otros (13). En conjunto, la relación de MeCP2 con estos desórdenes del neurodesarrollo pone de relieve la importancia de comprender los mecanismos moleculares por los que MeCP2 afecta el desarrollo cerebral, las condiciones mentales y el funcionamiento cerebral. En relación a esto último, la bibliografía existente coincide en que dichos desórdenes afectan principalmente la *conectividad neural*. En el caso particular de RTT, la evidencia temprana de estudios post mortem en pacientes apoyó la hipótesis de que dicha enfermedad es un trastorno del refinamiento dendrítico y la plasticidad sináptica (181). Por lo que a partir de allí los esfuerzos se direccionaron a comprender el rol de MeCP2 en el desarrollo y función dendríticos, lo que se ha traducido en un universo de estudios descriptivos de los defectos encontrados en componentes postsinápticos de distintas regiones del SNC de modelos animales (13,48,182). Por lo tanto, es claramente evidente que el campo de la investigación se ha centrado en el estudio de alteraciones de los componentes post-sinápticos que integran los circuitos neuronales, como punto fundamental de la conectividad. Sin embargo, no resulta necesario aclarar que en el establecimiento de la conectividad neuronal los componentes pre-sinápticos poseen tanta importancia como los post-sinápticos, fundamentalmente por que participan en la mayoría de los eventos involucrados en la formación y refinamiento de los circuitos (183).

A fin de estudiar el establecimiento de la conectividad neural, se han definido una serie de eventos secuenciales involucrados en el desarrollo de los circuitos neurales (59): el crecimiento axonal de la neurona en desarrollo; el proceso de guiado axonal, a cargo de moléculas guía específicas que direccionan los conos de crecimiento axonales hacia células diana apropiadas; la formación de conexiones sinápticas, que se regulan dinámicamente por actividad neuronal, competencia con otras sinapsis y factores intrínsecos; y el proceso de pruning axonal, que consiste en el proceso de remoción selectiva de proyecciones neuronales aberrantes o ectópicas y sus conexiones sinápticas (82). Estos procesos que tienen como protagonistas a los componentes pre-sinápticos, afectan directamente la sinaptogénesis y el establecimiento de la conectividad neural, por lo que también resulta relevante evaluar cómo los mismos pueden verse afectados ante alteraciones en MeCP2.

En trabajos previos (Degano y col., 2009), utilizando el sistema olfatorio como un modelo del neurodesarrollo, identificamos una función novedosa para MeCP2 en procesos de guiado axonal durante el establecimiento de los circuitos neuronales (incluyendo trayectoria axonal, refinamiento y “targeting” axonal) (53). Considerando estos antecedentes, nos propusimos evaluar el rol de MeCP2 en la formación y maduración de los circuitos neuronales desde la perspectiva de los componentes pre-sinápticos en el hipocampo, estructura de mayor relevancia en la patogénesis de RTT (45).

Nuestros resultados indican que en etapas posnatales tempranas (P30), animales mutantes para MeCP2 presentan un retraso en el proceso de pruning estereotipado del TIP hipocampal, conformado por las proyecciones axonales de las células granulares del GD (MF) que proyectan hacia las células piramidales de la región CA3. Conjuntamente con el retraso en el pruning estereotipado del TIP, en hipocampo de ratones mutantes para MeCP2 se registraron alteraciones en la expresión de moléculas de guiado axonal, más específicamente de Sema3F y los componentes de su complejo receptor (PlexA3 y Npn-2), moléculas identificadas como claves para este proceso de refinamiento de las MF(63,99,104), como así también de otra molécula importante para el guiado y crecimiento axonal como es BDNF.

Se ha establecido que en condiciones normales durante el desarrollo postnatal, existe un gradiente local restringido en la expresión de Sema 3F que actúa a través de su complejo receptor, integrado por PlexA3 y NpN-2, conduciendo el refinamiento del TIP hacia el hilus del GD (63,105). Alteraciones en la regulación espacial y temporal de la expresión de estas moléculas, como las aquí descritas en los ratones mutantes para MeCP2, podría explicar las fallas encontradas en el refinamiento del TIP en estos animales. Es posible sugerir entonces, que fallas en la regulación transcripcional de moléculas de guiado podría explicar el defecto en el refinamiento de las MF ante alteraciones en MeCP2.

Estos resultados son comparables a los descriptos en el sistema olfatorio, con la diferencia a remarcar de que el defecto encontrado en el refinamiento del TIP se observó en un modelo animal que porta una proteína MeCP2 trunca que carece del carboxilo terminal (modelo MeCP2-308), y los estudios en el sistema olfatorio se realizaron en un modelo de ratones KO, carentes completamente de MeCP2 (modelo MeCP2-Jae). Es interesante recalcar entonces, que en dos modelos animales de RTT y en dos regiones diferentes del SNC (hipocampo y bulbo olfatorio), se observan defectos de “targeting” y de refinamiento axonal durante la formación de los circuitos, lo cual sugiere un rol para MeCP2 en dicho proceso.

Un punto a remarcar aquí es que, los cambios en los niveles de expresión de las moléculas evaluadas resultaron mayormente marcados en el GD que en el “resto de hipocampo”, lo cual sugiere que las variaciones de expresión génica presentes en las regiones incluidas en estas últimas muestras podrían verse enmascaradas. Por esta razón, a fin de

confirmar los cambios observados, se planea realizar ensayos de hibridización *in situ*, con sondas específicas de Semas y sus receptores, debido a que no existen al presente anticuerpos adecuados para estudios de IHQ.

Se ha demostrado una clara correlación entre el tamaño del TIP y el desempeño en tareas de aprendizaje espacial en roedores (91,93,94,118). Por lo que el pruning estereotipado de este tracto, que consiste en la remoción de poblaciones de conexiones axonales-anatómicas ectópicas durante una ventana temporal particular del desarrollo, constituiría un mecanismo adicional y de gran relevancia en el desarrollo de la conectividad y funcionalidad de este circuito (63,82,87,161). Considerando los resultados obtenidos, el retraso registrado en este proceso de pruning podría deberse en gran parte a una desregulación transcripcional de moléculas de guiado axonal causada por la falta de MeCP2, lo que tendría consecuencias en el establecimiento de la conectividad de las MF con los demás componentes del circuito, neuronas piramidales de CA3 y principalmente interneuronas (184), generando defectos de función a largo plazo. Las MF conectan a células granulares glutamatérgicas de GD con las neuronas piramidales glutamatérgicas de CA3 y con interneuronas GABAérgicas. Así, mientras que por un lado las células del GD activan a las neuronas piramidales de CA3, por el otro también activan a las interneuronas GABAérgicas las cuales, a su vez, inhiben la actividad de las neuronas de CA3. Por lo tanto, a través de estos dos tipos diferentes de sinapsis, las neuronas de DG pueden aumentar o disminuir la actividad de las células piramidales en CA3 (184,185). Este delicado equilibrio de actividad entre estos dos tipos de conexiones de las neuronas granulares es de gran importancia para el correcto funcionamiento del hipocampo, siendo particularmente crítico para la capacidad de aprender y recordar. Tal es así que mutaciones que afectan puntualmente esas conexiones han sido asociadas con autismo y otros trastornos neurológicos (186).

Otro evento clave que se produce conjuntamente con el proceso de pruning del TIP es la remoción de los complejos sinápticos que conforman las MF con las neuronas piramidales de CA3 a lo largo del tracto. Estos eventos de pruning sináptico constituyen uno de los mecanismos básicos que conforman la plasticidad durante el desarrollo, es decir la capacidad del cerebro para aprender, recordar y olvidar, así como su capacidad para reorganizarse y recuperarse de una lesión. Es por esto, que defectos en este proceso de remoción selectiva de sinapsis durante el desarrollo neural y la maduración de los circuitos se encuentran asociados a un amplio grupo de trastornos neurológicos pediátricos tales como esquizofrenia, autismo y otros desórdenes clínicos vinculados a la plasticidad cerebral (88-90). No resulta ilógico pensar por lo tanto que estos eventos de pruning sinápticos también se vean afectados al encontrarse alterado el refinamiento estereotipado del TIP.

En relación al pruning sináptico, también ha sido reportado que las conexiones excesivas se refinan a través de la actividad de las sinapsis excitatorias locales que utilizan

glutamato como neurotransmisor (187). Así, la actividad de las sinapsis glutamatérgicas contribuye a la pérdida de muchas sinapsis y la preservación de aquellas que disparan conjunta y repetidamente (188). Teniendo esto en cuenta, realizamos inmunotinciones de terminales glutamatérgicas, utilizando como marcador el transportador vesicular de Glutamato (VGLUT1) en muestras de hipocampo WT y MUT para MeCP2 de edad P30. En experimentos preliminares, observamos menor marcación para VGLUT1 en el TIP de los ratones MUT en comparación a los WT. Esta observación unida a la expresión diferencial de moléculas de guiado sugiere que el refinamiento sináptico podría también verse afectado en este modelo animal. Sería importante en este punto analizar el número de sinapsis presentes en el estrato oriens hipocampal, por donde se extiende el TIP, a fin de evaluar las consecuencias sinápticas de la falta de pruning observada en ratones deficientes en MeCP2.

Esta primera parte de nuestro trabajo revela un papel novedoso para MeCP2 en el desarrollo de la conectividad del hipocampo. Además de su reconocida influencia en el desarrollo dendrítico, proponemos que MeCP2 interviene en procesos de “*pruning axonal*” y en el establecimiento de circuitos neuronales a través de la regulación de la expresión de moléculas de guiado axonal. Al reducirse a uno entre todos los candidatos de la familia de semaforinas, así como el momento del desarrollo afectado, un camino interesante a seguir es el estudio de los mecanismos moleculares por los cuales MeCP2 regula la expresión de genes candidatos de esta vía, por ejemplo mediante estudios de inmunoprecipitación de cromatina (ChIP) para evaluar si MeCP2 se une a los promotores de estos genes candidatos e identificar qué co-represores o co-activadores se reclutan. Teniendo en cuenta el papel crucial que desempeñan estas moléculas en el desarrollo de circuitos neuronales, nuestros resultados tienen implicancias importantes para comprender el mecanismo patogénico que subyace a RTT y al autismo, y apoyan las hipótesis existentes de que los TEA son trastornos de la conectividad neural (189).

## **PLASTICIDAD ESTRUCTURAL PRESINÁPTICA Y SU CORRELACIÓN CON DEFICITS EN MEMORIA ESPACIAL EN UN MODELO MUTANTE DE MECP2.**

Aunque la expresión de MeCP2 es importante en el desarrollo postnatal temprano del cerebro, su función persiste más allá de este período extendiéndose al mantenimiento neuronal durante toda la vida. Así, la reactivación de MeCP2 endógena a niveles normales en ratones *Mecp2*-KO sintomáticos, revierte algunos de los signos asociados a RTT y extiende la sobrevivencia (42). Más aún, la inactivación de MeCP2 en ratones maduros (>4 meses de edad) produce rápidamente características de RTT y la muerte (51,190). Por otra parte, la función de MeCP2 es sensible a actividad sináptica y se la ha implicado en la regulación de la *plasticidad estructural post-sináptica*, en particular en el crecimiento dendrítico y maduración

de espinas dendríticas (31). En esta segunda parte propusimos evaluar cómo la falta de MeCP2 afecta respuestas dependientes de actividad y eventos de *plasticidad estructural presináptica*, en el circuito hipocampal “mossy fibers”-CA3.

En hipocampo de ratas y ratones adultos se han descrito dos eventos centrales de plasticidad estructural presináptica: la neurogénesis adulta y cambios dinámicos en el tamaño del TIP, formado por los axones de células granulares de GD. Se ha observado que tanto la formación de nuevas neuronas del GD por neurogénesis adulta, como la anatomía del TIP son reguladas dinámicamente en respuesta a estímulos neurogénicos, como la exposición a un ambiente enriquecido o la inducción de actividad epileptogénica (107-110). En el presente estudio, decidimos inducir actividad epileptogénica por administración de AK *in vivo* a fin de aplicar estímulos similares en los diferentes grupos de ratones. Si bien el paradigma de enriquecimiento ambiental se asemeja más a un estímulo fisiológico, es muy difícil asegurar que cada animal recibe estimulación similar (por ej. si muestran defectos motrices o de motivación para correr en la rueda o para inspeccionar objetos novedosos); además, insume mayor espacio de alojamiento del que disponemos. Los modelos animales WT y MeCP2 MUT/KO que utilizamos poseen una base genética C57BL6, que posee una relativamente alta resistencia a insultos excitotóxicos, por lo que se ha reportado que en respuesta a AK desarrollan convulsiones y se potencia la neurogénesis sin llevar a una muerte neuronal masiva (107,154).

Para estos experimentos se trabajó con dos modelos animales: ratones MeCP2Bird (KO) que carecen de MeCP2 y el modelo MeCP2-308 (MUT) que porta una versión trunca de MeCP2. A las mismas dosis de AK, se observaron algunas diferencias en la actividad epileptogénica alcanzada por los animales de cada modelo. Los ratones MeCP2 KO inyectados a las 6 semanas de vida (ver Métodos), mostraron mayor sensibilidad a AK que sus contrapartes WT (Figura 14), lo cual fue reportado por otros autores en un modelo similar, carente de MeCP2 (164). Cuando se midió la expresión de genes inducidos por actividad sináptica luego de 6hs del estímulo, ratones de ambos genotipos (WT y KO) respondieron aumentando los niveles de expresión de BDNF y Arc en respuesta a AK (Figura 16). Sin embargo, sólo los ratones WT de este modelo mostraron un aumento significativo en el tamaño del TIP a las 2 semanas luego de la inyección con AK (Figura 15), a pesar que los animales MeCP2 KO manifestaron niveles más altos de actividad epileptogénica. Dado que tuvimos acceso limitado a este modelo, no pudimos continuar la caracterización del mismo, pero este resultado es muy importante para confirmar la falta de aumento del TIP en ausencia de la proteína MeCP2.

La mayoría de los estudios de la presente tesis se realizaron en el modelo MeCP2-308 (MUT), a nuestro criterio más adecuado porque semejan mejor las condiciones de la patología humana; presentan la proteína mutada, el desarrollo de signos clínicos es más

progresivo y poseen una sobrevida de aproximadamente 1 año, lo cual permite realizar experimentos a edades más avanzadas y los resultados no se verían enmascarados por condiciones fisiológicas próximas a la muerte, como ocurre con la generalidad de los estudios realizados en RTT utilizando los modelos KO (sobrevida de alrededor de 8-11 semanas). La caracterización original del modelo reveló que los animales MeCP2 MUT desarrollan temblores corporales a partir de los 2 meses y algunos presentan convulsiones espontáneas partir de los 5 meses de vida (20). Sin embargo, no había reportes acerca de la inducción de actividad epileptogénica en este modelo. A fin de estandarizar el método, en el presente trabajo realizamos experimentos de inyección de AK en ratones WT y MUT de 6, 9 y 12 semanas de edad. Los animales MUT de 12 semanas de edad resultaron muy sensibles a las dosis de AK que eran efectivas en ratones WT, por lo que no continuamos con esos experimentos (datos no mostrados). Interesantemente, los animales MUT de 6 semanas inyectados con AK no desarrollaron convulsiones ni mostraron un aumento de la expresión de genes inducidos por actividad neuronal (BDNF y Arc), luego de 6 hs de la inyección, a diferencia de lo observado en sus compañeros de camada WT (datos no mostrados). Finalmente, ratones WT y MUT de 9 semanas inyectados con AK, mostraron un nivel similar de actividad epileptogénica y de aumento en la expresión de BDNF y Arc luego de 6 hs (Figuras 14 y 16).

Así, en el proceso de estandarización de las condiciones para inducir un estímulo neurogénico de magnitud semejante en ratones WT y MeCP2 MUT, encontramos marcadas diferencias en la susceptibilidad a AK de acuerdo a la edad en los animales MUT. Estas observaciones y el hecho que RTT es un desorden del neurodesarrollo hacen importante establecer en qué etapa del mismo se trabaja. A los fines de la presente tesis, decidimos utilizar animales WT y MeCP2 MUT de 9 semanas, que en respuesta a la dosis administrada de AK, desarrollaron un único episodio de convulsiones, que se resolvió dentro de las 2 hs (Figura 14). Más estudios serán necesarios para entender si la falta de respuesta a AK en ratones MUT jóvenes se debe a una expresión diferencial de receptores kainato, por ejemplo una expresión deficiente de la subunidad GluR6 puede generar ausencia de convulsiones (191); también es posible que la falta de respuesta sea independiente del agente convulsivante y se base en una maduración diferencial de la conectividad sináptica en los circuitos excitatorios/inhibitorios en este modelo (192).

La inyección de AK en ratones de 9 semanas del modelo MeCP2-308, reveló que los ratones MUT también fallaron en incrementar el volumen del tracto TIP, en respuesta a la actividad epileptogénica (Figura 15), a pesar que estos animales mostraron un aumento de actividad neuronal en respuesta a la administración del AK, de magnitud similar a la inducida en animales WT (Figura 14). Esto sugiere que la falta de crecimiento del tracto TIP no se debería a un defecto en la activación neuronal temprana en el hipocampo de ratones

deficientes en MeCP2.

Otros autores han sugerido que el tamaño del TIP es dinámicamente influenciado por un aumento en la neurogénesis (107). Se ha reportado que existe un aumento significativo en el número de nuevas células granulares en el GD tras actividad epileptogénica inducida por agentes convulsivantes (107,110,152,153,166), lo cual apoya la idea de que la neurogénesis adulta podría estar relacionada con el tamaño del TIP. Considerando estos antecedentes, se decidió evaluar la neurogénesis adulta en GD en respuesta a la administración de AK en ratones mutantes para MeCP2. Nuestros resultados mostraron que dicho proceso no se ve afectado en nuestro modelo (Figura 17), lo cual concuerda con trabajos previos que demostraron que MeCP2 no sería crítica para la neurogénesis (65). La falta de crecimiento del TIP en respuesta a la actividad neuronal observada en los ratones MeCP2 MUT no sería consecuencia de una menor producción de nuevas células granulares en GD. Sin embargo, es posible que la sobrevivencia de estas neuronas nuevas se vea afectada en ausencia de MeCP2. En este sentido, nosotros observamos que la proporción de nuevas células de GD (BrdU+) que sobrevivieron luego de 5 semanas de la inducción de actividad neuronal fue similar en ratones WT y MUT (Figura 19), por lo que la sobrevivencia de las nuevas neuronas de GD no se encontraría afectada por fallas en MeCP2. Es importante mencionar que hasta el momento todos los estudios realizados en diferentes modelos animales deficientes en MeCP2 coinciden en que no existen indicios de neurodegeneración o muerte en los mismos. Sin embargo, estudios más detallados en nuestro modelo experimental, utilizando la técnica de TUNEL en combinación con Fluoro Jade, serán necesarios para confirmar esta hipótesis.

Es importante recalcar que, si bien la neurogénesis no se vió afectada en ausencia de MeCP2, las nuevas neuronas de GD presentaron déficits en su capacidad de transicionar a etapas de desarrollo maduras posteriores (Figura 25). Estos resultados muestran que los ratones que portan una proteína MeCP2 mutada (MUT) presentan defectos en la maduración de neuronas nuevas en el adulto, de manera similar a lo observado durante el desarrollo temprano y en otros modelos de RTT (65,178). El aumento en la neurogénesis adulta inducida por actividad neuronal, nos permitió evidenciar que este defecto se recapitula en el animal adulto. El retraso en la maduración de células granulares de GD adulto sugiere que, si bien en respuesta a actividad sináptica se genera un número similar de neuronas nuevas en ausencia de MeCP2, éstas no se integrarían normalmente al circuito. Este defecto podría tener implicancias importantes en procesos de aprendizaje dependientes de hipocampo, como el tests de memoria espacial.

En cuanto a la plasticidad del tracto TIP, se ha propuesto que la misma es el resultado del aumento coordinado de factores tróficos y de la disminución de moléculas quimiorepelenes (183). Los niveles de neurotrofinas en el hipocampo, son regulados dinámicamente por actividad neuronal y la modificación de esos niveles puede alterar el

crecimiento y la distribución de las MF. Numerosos estudios han implicado a BDNF como un potente modulador en muchos aspectos del desarrollo neuronal (193), así como en la transmisión sináptica y plasticidad (194–197). BDNF se expresa normalmente en la mayoría de las neuronas hipocampales; promueve el crecimiento y orientación de los axones de las células granulares *in vitro* y regula la plasticidad sináptica de MF (174–176). Además, se ha demostrado que MeCP2 es fosforilada en respuesta a actividad sináptica y regula la expresión de genes, en particular la producción de BDNF (28,29,31). Nuestros resultados muestran que tanto en animales WT como MeCP2 MUT, los niveles de BDNF aumentan de manera similar en respuesta a AK, a las 6 hs post inyección. Sin embargo, cuando determinamos la expresión de BDNF a las 2 semanas post AK, los animales WT aún presentan un leve aumento en la expresión del mismo, pero no así los ratones MUT (Figura 22). Estos resultados se confirmaron al evaluar el número de células granulares de GD que presentan el receptor TrkB fosforilado, como un indicador indirecto de la acción de BDNF endógeno (Figura 23C). Así, el crecimiento del TIP detectado en animales WT 2 semanas luego de la inducción de actividad con AK, estaría acompañado por un incremento en la expresión de BDNF. En ratones MeCP2 MUT, la falta de crecimiento del tracto se correlacionó con una respuesta deficiente en la expresión de BDNF. Estos resultados indican que si bien los eventos de señalización involucrados en la respuesta temprana a actividad sináptica parecen no estar afectados en ausencia de MeCP2, la respuesta de este factor trófico a largo plazo resultaría deficiente para impulsar el crecimiento de MF inducido por actividad epileptogénica.

Dada la importancia de esta neurotrofina y considerando que MeCP2 se une a uno de los promotores de este gen y regula su expresión, muchos estudios han propuesto un rol crítico de BDNF en la patogénesis de RTT. En modelos animales deficientes en MeCP2 se ha descrito una reducción en los niveles de BDNF, que coincide con la aparición de signos clínicos. Durante las primeras semanas postnatales los niveles de BDNF en la mayoría de las regiones cerebrales de ratones MeCP2 KO son comparables a los de los compañeros de camada WT; hacia las 7 semanas cuando los ratones machos MeCP2 KO son sintomáticos (y con una expectativa de vida de 1 a 3 semanas más), los niveles de BDNF son más bajos en todo el cerebro (198–201). En contraste, en el presente trabajo, mostramos que en el modelo animal MeCP2-308, los ratones MUT en condiciones basales no muestran diferencias en los niveles de RNAm para BDNF en hipocampo a las 9 y 11 semanas de edad (Figuras 16 y 22). Esta observación ha sido también reportada por otros autores, en animales MeCP2-308 MUT de mayor edad y sintomáticos (202). Además, observamos que ambos grupos WT y MUT respondieron con un aumento similar en la expresión de BDNF a las 6 hs post AK (Figura 16), aunque esta respuesta no se mantuvo en el tiempo en los animales MUT (Figura 22).



Estos resultados sugieren que son necesarios más estudios para elucidar el posible rol de BDNF en ausencia de MeCP2 y en RTT (203).

Como mencionáramos antes, el proceso de plasticidad estructural que muestran las MF en respuesta a actividad sináptica, involucra la participación de factores de crecimiento y moléculas de guiado axonal (183). Así, se hipotetiza que incrementos en un factor trófico serían balanceados con una reducción en moléculas quimiorrepelentes. De hecho, un cúmulo de evidencia sugiere que las semaforinas son determinantes críticos del crecimiento y targeting axonal durante el desarrollo del sistema nervioso (204). Ratones deficientes en Sema 3F, Npn-2 o en PlexnA3 mostraron una hipertrofia robusta del tracto TIP (63,99,104). Además, se ha demostrado que una reducción en la expresión de semaforina 3A es necesaria para que ocurran los rearrreglos que sufren MF en los modelos de epilepsia inducidos por AK (170). Barnes y col. reportaron que tales reducciones dramáticas en la expresión de un quimiorrepelente son temporalmente y regionalmente consistentes con incrementos en el volumen de MF en CA3 después de convulsiones inducidas por AK o pilocarpina (205,206).

Considerando estos resultados y la falla en la respuesta plástica del TIP a actividad epileptogénica en ratones mutantes para MeCP2, resultó de primer interés analizar la expresión de elementos de la vía de Sema 3F. Esta molécula de guiado axonal está involucrada en el crecimiento, guía y blanco axonal de las MF hipocampales (63,106,169), actuando como inhibidor del crecimiento axonal al combinarse con su complejo receptor presente en los axones e induciendo el colapso de los mismos (170). En línea con lo expuesto, 2 semanas luego de administrar AK, al momento en que los WT muestran un aumento en el TIP, los animales MUT presentaron diferencias significativas en la expresión de Sema3F (Figura 20) y de BDNF (Figura 22), que fueron compatibles con la generación de un ambiente inhibidor del crecimiento axonal, y podría explicar en parte, la falta de aumento en el volumen del TIP en ausencia de MeCP2.

Los eventos de plasticidad estructural presináptica aquí estudiados se han correlacionado con mejoras en el desempeño en tests de aprendizaje dependientes del hipocampo (107). Con respecto al TIP, su considerable plasticidad fue notada tempranamente (117,118), al igual que la correlación positiva entre su tamaño y el rendimiento de los animales en una gran variedad de test conductuales de memoria espacial, existiendo abundante evidencia al respecto (91,117,119-124). Por ello, decidimos evaluar el aprendizaje y la memoria espacial de los ratones del modelo mutante para MeCP2 a través de su desempeño y capacidad de navegación en el laberinto de Barnes; se estima que la mejora en el rendimiento para ubicar una caja de escape a estímulos aversivos, a lo largo de sucesivas sesiones de entrenamiento, permite valorar procesos aprendizaje y memoria espacial en roedores (179).

Estudios previos mostraron que ratones MeCP2 MUT (>20 semanas de edad) muestran déficits de aprendizaje y memoria en 3 paradigmas de comportamiento dependientes de hipocampo (laberinto de agua Morris, test de condicionamiento contextual del miedo y memoria social a largo plazo) (202,207). Nuestros resultados indican que ratones MUT de 12 semanas del modelo MeCP2, no evidenciaron defectos en el proceso de aprendizaje espacial medido con el laberinto de Barnes; sin embargo, manifestaron una falla marcada en la retención de la información adquirida evaluada por el mismo test (Figuras 28, 29 y 30).

Aunque no se ha demostrado que la memoria per se esté alterada en pacientes, anormalidades cognitivas están presentes en individuos con mutaciones en MeCP2, apoyando el concepto que los resultados obtenidos con el modelo animal MeCP2-308 representarían un correlato de retraso mental en RTT (202). Con estos estudios proponemos sentar las bases para establecer un modelo que nos permita evaluar el efecto de la manipulación de vías específicas involucradas en guiado axonal, sinaptogénesis, maduración en un circuito específico y correlacionarlo con cambios en la memoria espacial.

En este estudio no analizamos los componentes dendríticos de las células granulares de GD. Sin embargo, en contraste con estudios histopatológicos en pacientes con RTT (208,209), los cerebros de ratones MeCP2-308 MUT sintomáticos, no mostraron una disminución de arborizaciones dendríticas en corteza frontal y tampoco reducción en la densidad de sinapsis o espinas dendríticas en el área CA1 de hipocampo (207). Sin embargo, estudios electrofisiológicos sugieren que existe una disfunción sináptica que precede a los síntomas clínicos, manifestada como un aumento de transmisión sináptica y disminución de LTD en las sinapsis colaterales de Schaffer en este modelo animal (202).

Alteraciones del refinamiento sináptico y axonal han sido implicados en la etiología de la enfermedades neurológicas (88-90,210). No existen muchos tipos de sinapsis en el cerebro donde el pruning se pueda medir fácilmente, por ello proponemos que las MF proporcionan un buen modelo y nos permiten hacer predicciones sobre los déficits de pruning sináptico en otras partes del cerebro. Asimismo, las MF muestran plasticidad fisiológica que está implicada en el procesamiento de la información en el hipocampo (211). El aprendizaje espacial y el enriquecimiento ambiental resultan en un aumento en el número, tamaño y complejidad de las MF (183,212-214). Además, las MF presentan una dramática reorganización luego de la inducción de convulsiones (215,216). Si bien las vías moleculares que subyacen a la remodelación dependiente de actividad de las MF aún se deben determinar, neurotrofinas como NGF y BDNF podrían jugar un papel en la remodelación de MF en el cerebro normal, ya que sus niveles se ven aumentados con la actividad epileptogénica (217). Moléculas de guiado axonal incluyendo semaforinas, plexinas y

neuropilinas, también pueden ayudar a reconfigurar MF después de cambios en los niveles de actividad (63,99,218,219).

En base a la presente tesis, proponemos que existen defectos axonales y alteraciones en la señalización de neurotrofinas y moléculas de guiado que estarían implicados en los defectos neurológicos presentes en un modelo animal de Síndrome de RTT. Asimismo, mostramos que en este modelo animal, hay una correlación entre los eventos de plasticidad estructural de MF y la respuesta de memoria espacial. Esto representa una herramienta poderosa para la investigación, ya que los cambios en un circuito neural relativamente simple ahora pueden ser conectados a cambios en la memoria espacial definida a partir de un test conductual en un modelo animal. Nuestros futuros estudios plantean comenzar a manipular algunos de estos componentes moleculares en el contexto de la falta de MeCP2, para obtener una mejor comprensión de los factores que controlan la remodelación dependiente de actividad sináptica en el cerebro normal y en desórdenes de la conectividad como el síndrome de RTT.

## **CONCLUSIONES FINALES**

Ante defectos en MeCP2...

- ✓ Además de las alteraciones dendríticas, en esta tesis se demostró que los axones sufren defectos que pueden afectar la conectividad durante el neurodesarrollo y en respuesta a actividad sináptica, alterando la plasticidad de los circuitos.
- ✓ Se observó que en la neurogénesis hipocampal adulta se recapitulan defectos de maduración neuronal previamente descritos en el neurodesarrollo postnatal temprano. Estas alteraciones tendrían implicancias en el déficit de plasticidad sináptica observado en el animal adulto.
- ✓ Se estableció un posible modelo estructura-función que correlaciona eventos de plasticidad estructural de MF con el desempeño en test de memoria espacial, el cual permitiría testear el efecto de la manipulación de distintos candidatos moleculares. De acuerdo a nuestros resultados, las moléculas que podrían modular estos eventos son: BDNF, Semas Clase 3 y receptores.

---

## PUBLICACIONES CIENTÍFICAS Y PRESENTACIONES A CONGRESOS

- ✓ **Bertoldi ML**, Zalosnik MI, Roth GA and Degano AL. *Stereotyped pruning of mossy fibers and semaforin 3F signaling is altered in Mecp2 mutant mice*. En redacción.
- ✓ **Bertoldi ML**, Zalosnik MI, Fabio C, Aja S, Ronnett G, Roth GA and Degano AL. *Altered activity-dependent mossy fibers plasticity correlates with spatial memory deficits in a mouse model of Rett Syndrome*. En redacción.
- ✓ 2016. Póster: **Bertoldi Ma. Laura**; Zalosnik Ma. Inés; Fabio M. Carolina; Roth Germán and Degano Alicia. **“Deficits of hippocampal structural plasticity in a mouse model of MeCP2 deficiency”**. LII Reunión de la Sociedad Argentina de Investigación Bioquímica y Biología Molecular (SAIB). Argentina. Córdoba Capital. 7 al 10 de noviembre de 2016.
- ✓ 2015. Póster: **María Laura Bertoldi**; María Inés Zalosnik adn Alicia Degano. **“Contribution of MeCP2 and synaptic activity to hippocampal structural plasticity”**. XXX Congreso Anual de la Sociedad Argentina de Investigación en Neurociencias. Sociedad Argentina de Investigación en Neurociencias (SAN). Argentina. Mar del Plata, Buenos Aires. 27 de Septiembre al 1 de Octubre.
- ✓ 2013. Póster: María Inés Zalosnik, **María Laura Bertoldi** and Alicia Degano. **“Immune responses in a model of autism spectrum disorder (ASD)”**. XXVIII Congreso Anual de la Sociedad Argentina de Investigación en Neurociencia (SAN). Huerta Grande, Córdoba. 30 de Septiembre al 4 de Octubre.
- ✓ 2012. Póster: **María Laura Bertoldi** and Alicia Degano. **“Defective pruning of hippocampal projections in mouse models of Mecp2 dysfunction”**. XXVII Congreso Anual de la Sociedad Argentina de Investigación en Neurociencia (SAN). Huerta Grande, Córdoba. 1-5 Octubre.
- ✓ 2011. Póster: **Bertoldi M.** and Degano A. **“Class 3 Semaphorins in a mouse model of Autism Spectrum Disorder”**. XXVI Congreso Anual de la Sociedad Argentina de Investigación en Neurociencia (SAN). Huerta Grande, Córdoba. 18-22 Octubre.
- ✓ Pasantía en el exterior en laboratorio de investigación: Department of Neuroscience, School of Medicine, Johns Hopkins Medical Institute, Baltimore, Maryland, USA.  
**Investigadores Responsables:** Dras. Gabriele V. Ronnett y Susan Aja.  
**Periodo:** 1 de Octubre de 2014 al 27 de Enero de 2015.  
**Descripción de las actividades realizadas:** desarrollo de técnicas de biología molecular, inmunohistoquímica, obtención y procesamiento de imágenes de microscopía para el estudio del efecto de mutaciones en MeCP2 sobre procesos de plasticidad estructural pre-sináptica en las “mossy fibers” del circuito hipocampal a partir de modelos murinos knockout y mutante para MeCP2.

---

# BIBLIOGRAFÍA

1. Leonard H, Cobb S, Downs J. Clinical and biological progress over 50 years in Rett syndrome. *Nat Rev Neurol*. 2017;13(1):37–51.
  2. Campos-Castello J, Fernandez-Mayoralas DM, Muñoz-Jareño N, Antonio- Arce V. Síndrome de Rett: 50 años de historia de un trastorno aun no bien conocido. *Medicine*. 2007;67:531–42.
  3. Neul JL, Lane JB, Lee H, Geerts S, Barrish JO, Annese F, et al. Developmental delay in Rett syndrome : data from the natural history study. *J Neurodev Disord*. 2014;6(1):1–9.
  4. Katz DM, Bird A, Coenraads M, Gray SJ, Menon DU, Philpot BD, et al. Rett Syndrome : Crossing the Threshold to Clinical Translation. *Trends Neurosci*. 2016;39(2):100–13.
  5. Young DJ, Bebbington A, Anderson A, Klerk N De, Kaufmann WE, Leonard H. The diagnosis of autism in a female: could it be Rett syndrome? *Eur J Pediatr*. 2008;167(6):661–9.
  6. Humphreys P, Barrowman N. The Incidence and Evolution of Parkinsonian Rigidity in Rett Syndrome : A Pilot Study. *Can J Neurol Sci*. 2016;43(4):567–73.
  7. Kaufmann WE, Stallworth JL, Everman DB, Skinner SA. Neurobiologically-based treatments in Rett syndrome : opportunities and challenges. *Expert Opin Orphan Drugs*. 2016;4(10):1043–55.
  8. Pozzo-Miller L, Pati S, Percy AK, Percy AK. Rett Syndrome : Reaching for Clinical Trials. *Neurotherapeutics*. 2015;12(3):631–40.
  9. Tarquinio DC, Hou W, Neul JL, Kaufmann WE, Glaze DG, Motil KJ, Skinner SA, Lee HS PA. The changing face of survival in Rett syndrome and MECP2- related disorders. *Pediatr Neurol*. 2015;53(5):402–11.
  10. Ehrhart F, Coort SLM, Cirillo E, Smeets E, Evelo CT, Curfs LM. Rett syndrome - biological pathways leading from MECP2 to disorder phenotypes. *Orphanet J Rare Dis*. 2016;11(1):158–71.
  11. Amir RE, Van den Veyver I. B, Wan M, Tran CQ, Francke U, Zoghbi HY. Rett syndrome is caused by mutations in X-linked MECP2, encoding methyl-CpG-binding protein 2. *Nat Genet*. 1999;23(2):185–8.
  12. Calfa G, Percy AK, Pozzo-Miller L. Experimental models of Rett syndrome based on Mecp2 dysfunction. *Exp Biol Med (Maywood)*. 2011;236(1):3–19.
  13. Gonzales ML, LaSalle JM. The role of MeCP2 in brain development and neurodevelopmental disorders. *Curr Psychiatry Rep*. 2010;12(2):127–34.
  14. Ausió J. MeCP2 and the enigmatic organization of brain chromatin. Implications for depression and cocaine addiction. *Clin Epigenetics*. 2016;8(1):58–70.
  15. Young J, Zoghbi H. X-chromosome inactivation patterns are unbalanced and affect the phenotypic outcome in a mouse model of rett syndrome. *Am J Hum Genet*. 2004;74(3):511–20.
  16. Bellini E, Pavesi G, Barbiero I, Bergo A, Chandola C, Nawaz MS, et al. MeCP2 post-translational modifications : a mechanism to control its involvement in synaptic plasticity and homeostasis ? *Front Cell Neurosci*. 2014;8(236):1–15.
-

17. Guy J, Cheval H, Selfridge J, Bird A. The Role of MeCP2 in the Brain. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2011;27(1):631–52.
18. Liyanage VRB, Rastegar M. Rett syndrome and MeCP2. *Neuromol Med.* 2014;16(2):231–64.
19. Chahrour M, Jung SY, Shaw C, Zhou X, Wong STC, Zoghbi HY. MeCP2 , a key contributor to neurological disease , activates and represses transcription. *Science.* 2008;320(5880):1224–9.
20. Shahbazian MD, Young JI, Yuva-Paylor LA, Spencer CM, Antalffy BA, Noebels JL, et al. Mice with truncated MeCP2 recapitulate many Rett syndrome features and display hyperacetylation of histone H3. *Neuron.* 2002;35(2):243–54.
21. Chen RZ, Akbarian S, Tudor M, Jaenisch R. Deficiency of methyl-CpG binding protein-2 in CNS neurons results in a Rett-like phenotype in mice. *Nat Genet.* 2001;27(3):327–31.
22. Skene PJ, Illingworth RS, Webb S, Kerr AR, James KD, Turner DJ, Andrews R BA. Neuronal MeCP2 is expressed at near histone-octamer levels and globally alters the chromatin state. *Mol Cell.* 2010;37(4):457–68.
23. Ausio J, Martínez de Paz A, Esteller M. MeCP2 : the long trip from a chromatin protein to neurological disorders. *Trends Mol Med.* 2014;20(9):487–98.
24. Bedogni F, Rossi RL, Galli F, Gigli CC, Gandaglia A, Kilstrup-nielsen C, et al. Rett syndrome and the urge of novel approaches to study MeCP2 functions and mechanisms of action. *Neurosci Biobehav Rev.* 2014;46:187–201.
25. Klose RJ, Bird AP. MeCP2 Behaves as an Elongated Monomer That Does Not Stably Associate with the Sin3a Chromatin Remodeling Complex \*. *J Biol Chem.* 2004;279(45):46490–6.
26. Nan X, Ng H, Johnson CA, Laherty CD, Turner BM, Eisenman RN, et al. Transcriptional repression by the methyl-CpG-binding protein MeCP2 involves a histone deacetylase complex. *Nature.* 1998;393(6683):386–9.
27. Kokura K, Kaul SC, Wadhwa R, Nomura T, Khan M, Shinagawa T, et al. The Ski Protein Family Is Required for MeCP2-mediated Transcriptional Repression. *J Biol Chem.* 2001;276(36):34115–21.
28. Martinowich K, Hattori D, Wu H, Fouse S, He F, Hu Y, et al. DNA Methylation – Related Chromatin Remodeling in Activity- Dependent Bdnf Gene Regulation. *Science.* 2003;302(5646):890–3.
29. Chen WG, Chang Q, Lin Y, Meissner A, West AE, Griffith EC, et al. Derepression of BDNF Transcription Involves Calcium-Dependent Phosphorylation of MeCP2. *Science.* 2003;302(5646):885–90.
30. Rousseaud A, Delépine C, Nectoux J, Billuart P, Bienvenu T. Differential Expression and Regulation of Brain-Derived Neurotrophic Factor (BDNF) mRNA Isoforms in Brain Cells from Mecp2308/y Mouse Model. *J Mol Neurosci.* 2015;56(4):758–67.
31. Zhou Z, Hong EJ, Cohen S, Zhao W, Henry H, Schmidt L, et al. Brain-Specific Phosphorylation of MeCP2 Regulates Activity- Dependent Bdnf Transcription, Dendritic Growth, and Spine Maturation. *Neuron.* 2006;52(2):255–69.
32. Lyst MJ, Ekiert R, Ebert DH, Merusi C, Nowak J, Guy J, et al. Rett syndrome mutations abolish the interaction of MeCP2 with the NCoR / SMRT co-repressor. *Nat Neurosci.* 2013;16(7):898–902.
33. Ricceri L, Filippis B De, Laviola G. Mouse models of Rett syndrome : from behavioural

- phenotyping to preclinical evaluation of new therapeutic approaches. *Behav Pharmacol.* 2007;19((5-6)):501-17.
34. Chen RZ, Akbarian S, Tudor M, Jaenisch R. Deficiency of methyl-CpG binding protein-2 in CNS neurons results in a Rett-like phenotype in mice. *Nat Genet.* 2001;27(3):327-31.
  35. Guy J, Hendrich B, Holmes M, Martin JE, Bird A. A mouse *Mecp2* -null mutation causes neurological symptoms that mimic Rett syndrome. *Nat Genet.* 2001;27(3):322-6.
  36. Belichenko NP, Belichenko P V, Mobley WC. Evidence for both neuronal cell autonomous and nonautonomous effects of methyl-CpG-binding protein 2 in the cerebral cortex of female mice with *Mecp2* mutation. *Neurobiol Dis.* 2009;34(1):71-7.
  37. Chao H, Chen H, Samaco RC, Xue M, Chahrour M, Yoo J, et al. GABAergic dysfunction mediates autism-like stereotypies and Rett syndrome phenotypes. *Nature.* 2010;468(7321):263-9.
  38. Fyffe SL, Neul JL, Samaco RC, Chao H, Ben- S, Moretti P, et al. Deletion of *Mecp2* in *Sim1* -expressing neurons reveals a critical role for MeCP2 in feeding behavior , aggression , and the response to stress. *Neuron.* 2008;59(6):947-58.
  39. Schafer DP, Heller CT, Gunner G, Heller M, Gordon C, Hammond T, et al. Microglia contribute to circuit defects in *Mecp2* null mice independent of microglia-specific loss of *Mecp2* expression. *Elife.* 2016;5:e15224.
  40. Collins AL, Levenson JM, Vilaythong AP, Richman R, Armstrong DL, Noebels JL, et al. Mild overexpression of MeCP2 causes a progressive neurological disorder in mice. *Hum Mol Genet.* 2004;13(21):2679-89.
  41. Moretti P, Bouwknecht JA, Teague R, Paylor R, Zoghbi HY. Abnormalities of social interactions and home-cage behavior in a mouse model of Rett syndrome. *Hum Mol Genet.* 2005;14(2):205-20.
  42. Guy J, Gan J, Selfridge J, Cobb S, Bird A. Reversal of Neurological Defects in a Mouse Model of Rett Syndrome. *Science.* 2007;315(5815):1143-7.
  43. Kishi N, Macklis JD. MECP2 is progressively expressed in post-migratory neurons and is involved in neuronal maturation rather than cell fate decisions. *Mol Cell Neurosci.* 2004;27(3):306-21.
  44. Armstrong D. Rett syndrome neuropathology review 2000. *Brain Dev.* 2001;23:S72-6.
  45. Chahrour M, Zoghbi HY. The Story of Rett Syndrome : From Clinic to Neurobiology. *Neuron.* 2007;56(3):422-37.
  46. Samaco RC, Neul JL. Complexities of Rett syndrome and MeCP2. *J Neurosci.* 2011;31(22):7951-9.
  47. Johnston M, Hohmann C, Blue M. Neurobiology of Rett syndrome. *Neuropediatrics.* 1995;26(2):119-22.
  48. Belichenko P V, Wright EE, Belichenko NP, Maslah E, Li HHUA, Mobley WC, et al. Widespread Changes in Dendritic and Axonal Morphology in *Mecp2* -Mutant Mouse Models of Rett Syndrome : Evidence for Disruption of Neuronal Networks. *J Comp Neurol.* 2009;514(3):240-58.
  49. Chapleau CA, Calfa GD, Lane MC, Albertson AJ, Larimore JL, Kudo S, et al. Dendritic spine pathologies in hippocampal pyramidal neurons from Rett syndrome brain and after expression of Rett-associated MECP2 mutations. *Neurobiol Dis.* 2010;35(2):219-33.

50. Muotri AR, Marchetto MCN, Coufal NG, Oefner R, Nakashima K, Gage FH. L1 retrotransposition in neurons is modulated by MeCP2 Alysson. *Nature*. 2010;468(7322):443–6.
51. Nguyen MV, Du F, Felice CA, Shan X, Nigam A, Mandel G, Robinson JK BN. MeCP2 is critical for maintaining mature neuronal networks and global brain anatomy during late stages of postnatal brain development and in the mature adult brain. *J Neurosci*. 2012;32(29):10021–34.
52. Du F, Vu M, Nguyen C, Karten A, Felice CA, Mandel G, et al. Acute and crucial requirement for MeCP2 function upon transition from early to late adult stages of brain maturation. *Hum Mol Genet*. 2016;25(9):1690–702.
53. Degano AL, Pasterkamp RJ, Ronnett G V. MeCP2 deficiency disrupts axonal guidance, fasciculation, and targeting by altering Semaphorin 3F function. *Mol Cell Neurosci*. 2009;42(3):243–54.
54. Asaka Y, Jugloff DGM, Zhang L, Eubanks JH, Fitzsimonds RM. Hippocampal synaptic plasticity is impaired in the Mecp2-null mouse model of Rett syndrome. *Neurobiol Dis*. 2006;21(1):217–27.
55. Chao H, Zoghbi H, Rosenmund C. MeCP2 controls excitatory synaptic strength by regulating glutamatergic synapse number. *Neuron*. 2007;56(1):58–65.
56. Calfa G, Hablitz JJ, Pozzo-miller L. Network hyperexcitability in hippocampal slices from Mecp2 mutant mice revealed by voltage-sensitive dye imaging. *J Neurophysiol*. 2011;105(4):1768–84.
57. Derecki NC, Cronk JC, Lu Z, Xu E, Abbott SBG, Guyenet PG, et al. Wild type microglia arrest pathology in a mouse model of Rett syndrome. *Nature*. 2012;484(7392):105–9.
58. Liroy DT, Garg SK, Monaghan CE, Raber J, Foust K, Kaspar B, et al. A role for glia in the progression of Rett syndrome. *Nature*. 2011;475(7357):497–500.
59. Tessier-Lavigne M, Goodman C. The molecular biology of axon guidance. *Science*. 1996;274(5290):1123–33.
60. Stoeckli E. Where does axon guidance lead us? *F1000Res*. 2017;6:1–8.
61. Chilton JK. Molecular mechanisms of axon guidance. *Dev Biol*. 2006;292(1):13–24.
62. Wen Z, Zheng JQ. Directional guidance of nerve growth cones. *Curr Opin Neurobiol*. 2006;16(1):52–8.
63. Bagri A, Cheng HJ, Yaron A, Pleasure SJ, Tessier-Lavigne M. Stereotyped pruning of long hippocampal axon branches triggered by retraction inducers of the semaphorin family. *Cell*. 2003;113(3):285–99.
64. Ronnett G V, Leopold D, Cai X, Hoffbuhr KC, Moses L, Hoffman EP, et al. Olfactory Biopsies Demonstrate a Defect in Neuronal Development in Rett ' s Syndrome. *Ann Neurol*. 2003;54(2):206–18.
65. Smrt RD, Eaves-Egenes J, Barkho BZ, Santistevan NJ, Zhao C, Aimone JB, et al. Mecp2 deficiency leads to delayed maturation and altered gene expression in hippocampal neurons. *Neurobiol Dis*. 2007;27(1):77–89.
66. Amaral D, Witter M. The three-dimensional organization of the hippocampal formation: a review of anatomical data. *Neuroscience*. 1995;31(3):571–91.
67. Dolorfo CL, Amaral DG. Entorhinal Cortex of the Rat : Topographic Organization of the Cells of Origin of the Perforant Path Projection to the Dentate Gyrus. *J Comp Neurol*. 1998;398(1):25–48.



68. Dolorfo CL, Amaral DG. Entorhinal Cortex of the Rat : Organization of Intrinsic Connections. *J Comp Neurol*. 1998;398(1):49-82.
69. Cenquizca LA, Swanson LW. An Analysis of Direct Hippocampal Cortical Field CA1 Axonal Projections to Diencephalon in the Rat. *J Comp Neurol* . 2006;497(1):101-14.
70. Pitkänen A, Pikkarainen M, Nurminen N, A. Y. Reciprocal Connections between the Amygdala and the Hippocampal Formation , Perirhinal Cortex , and Postrhinal Cortex in Rat. *Ann N Y Acad Sci*. 2000;911:369-91.
71. Kishi T, Tsumori T, Yokota S, Yasui Y. Topographical Projection from the Hippocampal Formation to the Amygdala : A Combined Anterograde and Retrograde Tracing Study in the Rat. *J Comp Neurol*. 2006;496(3):349-68.
72. Bannerman DM, Rawlins JNP, Mchugh SB, Deacon RMJ, Yee BK, Bast T, et al. Regional dissociations within the hippocampus – memory and anxiety. *Neurosci Biobehav Rev*. 2004;28(3):273-83.
73. Bast T, Feldon J. Hippocampal modulation of sensorimotor processes. *Prog Neurobiol*. 2003;70(4):319-45.
74. Moser M, Moser E, Forrest E, Andersen P, Morris R. Spatial learning with a minislab in the dorsal hippocampus. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995;92(21):9697-701.
75. Heckers S, Zalesak M, Weiss AP, Ditman T, Titone D. Hippocampal Activation During Transitive Inference in Humans. *Hippocampus*. 2004;14(2):153-62.
76. Lehn H, Steffenach H, Strien NM Van, Veltman DJ, Witter MP, Håberg AK. A Specific Role of the Human Hippocampus in Recall of Temporal Sequences. *J Neurosci*. 2009;29(11):3475-84.
77. Scoville Beecher W, Milner B. Loss of Recent Memory After Bilateral Hippocampal Lesions. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci*. 2000;12(1):103-13.
78. Eichenbaum H, Dudchenko P, Wood E, Shapiro M, Tanila H. The Hippocampus , Memory , and Place Cells : Is It Spatial Memory or a Memory Space ? *Neuron*. 1999;23(2):209-26.
79. Alvarez P, Squire LR. Memory consolidation and the medial temporal lobe : A simple network model. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994;91(15):7041-5.
80. Claiborne HJ, Amaral DG, Cowan WNIWM. A Light and Electron Microscopic Analysis of the Mossy Fibers of the Rat Dentate Gyrus. *J Comp Neurol*. 1986;246(4):435-58.
81. Wiera G, Mozrzymas JW. Extracellular proteolysis in structural and functional plasticity of mossy fiber synapses in hippocampus. *Front Cell Neurosci*. 2015;9(427):1-21.
82. Faulkner RL, Low LK, Cheng HJ. Axon pruning in the developing vertebrate hippocampus. *Dev Neurosci*. 2007;29(1-2):6-13.
83. Albright TD, Jessell TM, Kandel ER, Posner MI, Hughes H, Diego S, et al. Neural Science : A Century of Progress and the Mysteries that Remain. *Neuron*. 2000;25:1-55.
84. Yu F, Schuldiner O. Axon and Dendrite Pruning in Drosophila. *Curr Opin Neurobiol*. 2014;27:192-8.
85. Luo L, O'Leary DDM. Axon Retraction and Degeneration in Development and Disease. *Annu Rev Neurosci*. 2005;28:127-56.
86. Kantor DB, Kolodkin AL. Curbing the Excesses of Youth: Molecular Insights into Axonal Pruning. *Neuron*. 2003;38(6):849-52.

87. Riccomagno MM, Hurtado A, Wang H, Macopson JGJ, Griner EM, Betz A, et al. The RacGAP beta-Chimaerin Selectively Mediates Stereotyped Hippocampal Axonal Pruning. *Cell*. 2012;149(7):1594–606.
88. Lewis D, Levitt P. Schizophrenia as a disorder of neurodevelopment. *Annu Rev Neurosci*. 2002;25:409–32.
89. Pardo CA, Eberhart CG. The Neurobiology of Autism. *Brain Pathol*. 2007;17(4):434–47.
90. Johnston M V. Clinical disorders of brain plasticity. *Brain Dev*. 2004;26(2):73–80.
91. Crusio WE, Schwegler H. Learning spatial orientation tasks in the radial-maze and structural variation in the hippocampus in inbred mice. *Behav Brain Funct*. 2005;1(1):3.
92. Crusio WE, Schwegler H, Hans-peter L. Radial-maze performance and structural variation of the hippocampus in mice: a correlation with mossy fibre distribution. *Brain Res*. 1987;425(1):182–5.
93. Schöpke R, Wolfer DP, Lipp HP, Leisinger-Trigona MC. Swimming navigation and structural variations of the infrapyramidal mossy fibers in the hippocampus of the mouse. *Hippocampus*. 1991;1(3):315–28.
94. Schwegler H, Crusio W, Lipp H, Brust I, Mueller G. Early postnatal hyperthyroidism alters hippocampal and improves radial-maze learning in adult mice circuitry. *J Neurosci*. 1991;11(7):2102–6.
95. Lauder J, Mugnaini E. Early hyperthyroidism alters the distribution of mossy fibres in the rat hippocampus. *Nature*. 1977;268(5618):335–7.
96. Artigiani S, Comoglio PM, Tamagnone L. Plexins , Semaphorins , and Scatter Factor Receptors : A Common Root for Cell Guidance Signals? *IUBMB Life*. 1999;48(5):477–82.
97. Raper JA. Semaphorins and their receptors in vertebrates and invertebrates. *Curr Opin Neurobiol*. 2000;10(1):88–94.
98. He Z, Wang KC, Koprivica V, Ming G, Song H. Knowing How to Navigate : Mechanisms of Semaphorin Signaling in the Nervous System. *Sci STKE*. 2002;119:1–11.
99. Chen H, Bagri A, Zupicich JA, Zou Y, Stoeckli E, Pleasure SJ, et al. Neuropilin-2 Regulates the Development of Select Cranial and Sensory Nerves and Hippocampal Mossy Fiber Projections. *Neuron*. 2000;25(1):43–56.
100. Tamagnone L, Artigiani S, Chen H, He Z, Ming G, Song H, et al. Plexins Are a Large Family of Receptors for Transmembrane , Secreted , and GPI-Anchored Semaphorins in Vertebrates. *Cell*. 1999;99(1):71–80.
101. Takahashi T, Fournier A, Nakamura F, Wang L, Murakami Y, Kalb RG, et al. Plexin-Neuropilin-1 Complexes Form Functional Semaphorin-3A Receptors. *Cell*. 1999;99(1):59–69.
102. Chédotal A, Del Rio JA, Ruiz M, He Z, Borrell V, Castro F De, et al. Semaphorins III and IV repel hippocampal axons via two distinct receptors. *Development*. 1998;125(21):4313–23.
103. Sahay A, Kim C, Jehuda P, Cho E, Huganir R, Ginty DD, et al. Secreted Semaphorins Modulate Synaptic Transmission in the Adult Hippocampus. *J Neurosci*. 2005;25(14):3613–20.
104. Cheng HJ, Bagri A, Yaron A, Stein E, Pleasure SJ, Tessier-Lavigne M. Plexin-A3 mediates semaphorin signaling and regulates the development of hippocampal axonal

- projections. *Neuron*. 2001;32(2):249–63.
105. Liu X-BL, Lawrence K, Jones EG, Cheng H-J. Stereotyped Axon Pruning via Plexin Signaling Is Associated with Synaptic Complex Elimination in the Hippocampus. *J Neurosci*. 2005;25(40):9124–34.
  106. Sahay A, Molliver ME, Ginty DD, Kolodkin AL. Semaphorin 3F is critical for development of limbic system circuitry and is required in neurons for selective CNS axon guidance events. *J Neurosci*. 2003;23(17):6671–80.
  107. Römer B, Krebs J, Overall RW, Fabel K, Babu H, Overstreet-Wadiche L, et al. Adult hippocampal neurogenesis and plasticity in the infrapyramidal bundle of the mossy fiber projection: I. Co-regulation by activity. *Front Neurosci*. 2011;5(107):1–8.
  108. Bengzon J, Kokaia Z, Elmér E, Nanobashvili A, Kokaia M, Lindvall O. Apoptosis and proliferation of dentate gyrus neurons after single and intermittent limbic seizures. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997;94(19):10432–7.
  109. Parent J. Adult neurogenesis in the intact and epileptic dentate gyrus. *Prog Brain Res*. 2007;163:529–40.
  110. Gray WP, Sundstrom LE. Kainic acid increases the proliferation of granule cell progenitors in the dentate gyrus of the adult rat. *Brain Res*. 1998;790(1–2):52–9.
  111. Represa A, Le Gall La Salle G, Ben-Ari Y. Hippocampal plasticity in the kindling model of epilepsy in rats. *Neurosci Lett*. 1989;99(3):345–50.
  112. Represa A, Ben-Ari Y. Kindling is associated with the formation of novel mossy fibre synapses in the CA3 region. *Exp Brain Res*. 1992;92(1):69–78.
  113. Ge S, Yang C, Hsu K, Ming G, Song H. A critical period for enhanced synaptic plasticity in newly generated neurons of the adult brain. *Neuron*. 2007;54(4):559–66.
  114. Schmidt-Hieber C, Jonas P, Bischofberger J. Enhanced synaptic plasticity in newly generated granule cells of the adult hippocampus. *Nature*. 2004;429(6988):184– | 87.
  115. Aimone J, Wiles J, Gage F. Potential role for adult neurogenesis in the encoding of time in new memories. *Nat Neurosci*. 2006;9(6):723–7.
  116. Toni N, Laplagne DA, Zhao C, Lombardi G, Charles E, Gage FH, et al. Neurons born in the adult dentate gyrus form functional synapses with target cells. *Nat Neurosci*. 2008;11(8):901–7.
  117. Schwegler H, Lipp H, Van der Loos H, Buselmaier W. Individual hippocampal mossy fiber distribution in mice correlates with two-way avoidance performance. *Science*. 1981;214(4522):817–9.
  118. Crusio W, Schwegler H, van Abeelen J. Behavioral responses to novelty and structural variation of the hippocampus in mice. I. Quantitative-genetic analysis of behavior in the open-field. *Behav Brain Res*. 1989;32(1):75–80.
  119. Schwegler H, Crusio W, Brust I. Hippocampal mossy fibers and radial-maze learning in the mouse: a correlation with spatial working memory but not with non-spatial reference memory. *Neuroscience*. 1990;34(2):293–8.
  120. Lipp H, Schwegler H, Driscoll P. Postnatal Modification of Hippocampal Circuitry Alters Avoidance Learning in Adult Rats. *Science* (80- ). 1984;225(4657):80–2.
  121. Rouillet P, Lassalle JM. Genetic variation , hippocampal mossy fibres distribution , novelty reactions and spatial representation in mice. *Behav Brain Res*. 1990;41(1):61–9.
  122. Schöpke R, Wolfer D, Lipp H, Leisinger-Trigona M. Swimming navigation and

- structural variations of the infrapyramidal mossy fibers in the hippocampus of the mouse. *Hippocampus*. 1991;1(3):315-28.
123. Bernasconi-Guastalla S, Wolfer D, Lipp H. Hippocampal mossy fibers and swimming navigation in mice: correlations with size and left-right asymmetries. *Hippocampus*. 1994;4(1):53-63.
124. Laghmouch A, Bertholet J, Crusio W. Hippocampal morphology and open-field behavior in *Mus musculus domesticus* and *Mus spretus* inbred mice. *Behav Genet*. 1997;27(1):67-73.
125. Blackstad TW, Brink K, Hem J, Jeune B. Distribution of Hippocampal Mossy Fibers in the Rat . An Experimental Study with Silver Impregnation Methods. *J Comp Neurol*. 1970;138(4):433-49.
126. Gonzales RB, DeLeon Galvan CJ, Rangel YM, Claiborne BJ. Distribution of Thorny Excrescences on CA3 Pyramidal Neurons in the Rat Hippocampus. *J Comp Neurol*. 2001;340(3):357-68.
127. Carnevale NT, Tsai KY, Claiborne BJ, Brown TH. Comparative Electrotonic Analysis of Three Classes of Rat Hippocampal Neurons. *J Neurophysiol*. 1997;78(2):703-20.
128. Kempermann G. Adult Neurogenesis: An Evolutionary Perspective. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2015;8(2):a018986.
129. Ming G, Song H. Adult neurogenesis in the mammalian brain: significant answers and significant questions. *Neuron*. 2011;70(4):687-702.
130. Gage F, Temple S. Neural stem cells: generating and regenerating the brain. *Neuron*. 2013;80(3):588-601.
131. Alvarez-Buylla A, Lim D. For the long run: maintaining germinal niches in the adult brain. *Neuron*. 2004;41(5):683-6.
132. van Praag H, Schinder A., Christie B., Toni N, Palmer T., Gage FH. Functional neurogenesis in the adult hippocampus. *Nature*. 2002;415:1030-4.
133. Förster E, Zhao S, Frotscher M. Laminating the hippocampus. *Nat Rev Neurosci*. 2006;7(4):259-67.
134. van Praag H, Kempermann G, Gage F. Running increases cell proliferation and neurogenesis in the adult mouse dentate gyrus. *Nat Neurosci*. 1999;2(3):266-70.
135. Parent J, Lowenstein D. Seizure-induced neurogenesis: are more new neurons good for an adult brain? *Prog Brain Res*. 2002;135:121-31.
136. Kokaia Z, Lindvall O. Neurogenesis after ischaemic brain insults. *Curr Opin Neurobiol*. 2003;13(1):127-32.
137. Duman R. Depression: a case of neuronal life and death? *Biol Psychiatry*. 2004;56(3):140-5.
138. Morgenstern N, Lombardi G, Schinder A. Newborn granule cells in the ageing dentate gyrus. *J Physiol*. 2008;586(16):3751-7.
139. von Bohlen Und Halbach O. Immunohistological markers for staging neurogenesis in adult hippocampus. *Cell Tissue Res*. 2007;329(3):409-20.
140. Cameron H, McKay R. Adult neurogenesis produces a large pool of new granule cells in the dentate gyrus. *J Comp Neurol*. 2001;435(4):406-17.
141. McDonald H, Wojtowicz J. Dynamics of neurogenesis in the dentate gyrus of adult rats. *Neurosci Lett*. 2005;385(1):70-5.

142. Dayer AG, Ford AA, Cleaver KM, Yassaee M, Cameron HA. Short-Term and Long-Term Survival of New Neurons in the Rat Dentate Gyrus. *J Comp Neurol.* 2003;460(4):563-72.
143. Tozuka Y, Fukuda S, Namba T, Seki T, Hisatsune T. GABAergic excitation promotes neuronal differentiation in adult hippocampal progenitor cells. *Neuron.* 2005;47(6):803-15.
144. Wang L, Kempermann G, Kettenmann H. A subpopulation of precursor cells in the mouse dentate gyrus receives synaptic GABAergic input. *Mol Cell Neurosci.* 2005;29(2):181-9.
145. Hüttmann K, Sadgrove M, Wallraff A, Hinterkeuser S, Kirchhoff F, Steinhäuser C, et al. Seizures preferentially stimulate proliferation of radial glia-like astrocytes in the adult dentate gyrus: functional and immunocytochemical analysis. *Eur J Neurosci.* 2003;18(10):2769-78.
146. Steiner B, Klempin F, Wang L, Kott M, Kettenmann H, Kempermann G. Type-2 cells as link between glial and neuronal lineage in adult hippocampal neurogenesis. *Glia.* 2006;54(8):805-14.
147. Zhao C, Teng EM, Summers Jr RG, Ming G-L, Gage FH. Distinct Morphological Stages of Dentate Granule Neuron Maturation in the Adult Mouse Hippocampus. *J Neurosci.* 2006;26(1):3-11.
148. Espósito MS, Piatti VC, Laplagne DA, Morgenstern NA, Ferrari CC, Pitossi FJ, et al. Neuronal differentiation in the adult hippocampus recapitulates embryonic development. *J Neurosci.* 2005;25(44):10074-86.
149. Toni N, Laplagne D, Zhao C, Lombardi G, Ribak C, Gage F, et al. Neurons born in the adult dentate gyrus form functional synapses with target cells. *Nat Neurosci.* 2008;11(8):901-7.
150. Piatti V, Davies-Sala M, Espósito M, Mongiat L, Trincherro M, Schinder A. The Timing for Neuronal Maturation in the Adult Hippocampus Is Modulated by Local Network Activity. *J Neurosci.* 2011;31(21):7715-28.
151. Brandt MD, Jessberger S, Steiner B, Kronenberg G, Reuter K, Bick-Sander A, et al. Transient calretinin expression defines early postmitotic step of neuronal differentiation in adult hippocampal neurogenesis of mice. *Mol Cell Neurosci.* 2003;24(3):603-13.
152. Parent JM, Yu TW, Leibowitz RT, Geschwind DH, Sloviter RS, Lowenstein DH. Dentate granule cell neurogenesis is increased by seizures and contributes to aberrant network reorganization in the adult rat hippocampus. *J Neurosci.* 1997;17(10):3727-38.
153. Scott BW, Wang S, Burnham WM, De Boni U, Wojtowicz JM. Kindling-induced neurogenesis in the dentate gyrus of the rat. *Neurosci Lett.* 1998;248(2):73-6.
154. Schauwecker PE, Steward O. Genetic determinants of susceptibility to excitotoxic cell death: implications for gene targeting approaches. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997;94(8):4103-8.
155. McLeod F, Ganley R, Williams L, Selfridge J, Bird A, Cobb S. Reduced seizure threshold and altered network oscillatory properties in a mouse model of Rett syndrome. *Neuroscience.* 2013;12(231):195-205.
156. Burns KA, Kuan CY. Low of bromo- and iododeoxyuridine produce near-saturation labeling of adult proliferative populations in the dentate gyrus. *Eur J Neurosci.* 2005;21(3):803-7.

157. van Praag H, Schinder AF, Christie BR, Toni N, Palmer TD, Gage FH. Functional neurogenesis in the adult hippocampus. *Nature*. 2002;415(6875):1030-4.
158. Taupin P. BrdU immunohistochemistry for studying adult neurogenesis: Paradigms, pitfalls, limitations, and validation. *Brain Res Rev*. 2007;53(1):198-214.
159. O'Leary TP, Brown RE. Optimization of apparatus design and behavioral measures for the assessment of visuo-spatial learning and memory of mice on the Barnes maze. *Learn Mem*. 2013;20(2):85-96.
160. Degano A, Park M, Penati J, Li Q, Ronnett G. MeCP2 is required for activity-dependent refinement of olfactory circuits. *Mol Cell Neurosci*. 2014;59:63-75.
161. Choe Y, Pleasure SJ. The GAP between Axon Pruning and Repulsion. *Dev Cell*. 2012;23(1):3-4.
162. Zhou Y, Gunput RF, Pasterkamp RJ. Semaphorin signaling: progress made and promises ahead. *Trends Biochem Sci*. 2008;33(4):161-70.
163. Chao M. Neurotrophins and their receptors: a convergence point for many signalling pathways. *Nat Rev Neurosci*. 2003;4(4):299-309.
164. McLeod F, Ganley R, Williams L, Selfridge J, Bird A, Cobb SR. Reduced seizure threshold and altered network oscillatory properties in a mouse model of Rett syndrome. *Neuroscience*. 2013;231:195-205.
165. Krebs J, Römer B, Overall RW, Fabel K, Babu H, Brandt MD, et al. Adult hippocampal neurogenesis and plasticity in the infrapyramidal bundle of the mossy fiber projection: II. Genetic covariation and identification of Nos1 as linking candidate gene. *Front Neurosci*. 2011;5(SEP):1-9.
166. Parent J, Lowenstein D. Seizure-induced neurogenesis: Are more new neurons good for an adult brain? *Prog Brain Res*. 2002;135:121-31.
167. Kempermann G, Gast D, Kronenberg G, Yamaguchi M, Gage F. Early determination and long-term persistence of adult-generated new neurons in the hippocampus of mice. *Development*. 2003;130(2):391-9.
168. Brown JP, Couillard-Després S, Cooper-Kuhn CM, Winkler J, Aigner L, Kuhn HG. Transient Expression of Doublecortin during Adult Neurogenesis. *J Comp Neurol*. 2003;467(1):1-10.
169. Cai X, Long L, Yang L, Chen Z, Ni G, Qin J, et al. Association between mossy fiber sprouting and expression of semaphorin-3f protein in dentate gyrus of hippocampus in lithium-pilocarpine-induced status epilepticus mouse model. *Neurol Res*. 2016;6412:1-6.
170. Barnes G, Puranam RS, Luo Y, McNamara JO. Temporal specific patterns of semaphorin gene expression in rat brain after kainic acid-induced status epilepticus. *Hippocampus*. 2003;13(1):1-20.
171. Okazaki MM, Evenson DA, Victor Nadler J. Hippocampal mossy fiber sprouting and synapse formation after status epilepticus in rats: Visualization after retrograde transport of biocytin. *J Comp Neurol*. 1995;352(4):515-34.
172. Dieni S, Matsumoto T, Dekkers M, Rauskolb S, Ionescu MS, Deogracias R, et al. BDNF and its pro-peptide are stored in presynaptic dense core vesicles in brain neurons. *J Cell Biol*. 2012;196(6):775-88.
173. Isgor C, Pare C, McDole B, Coombs P, Guthrie K. Expansion of the dentate mossy fiber-CA3 projection in the BDNF-enriched mouse hippocampus. *Neuroscience*. 2015;288:10-23.

174. Gómez-Palacio-Schjetnan, A Escobar M. In vivo BDNF modulation of adult functional and morphological synaptic plasticity at hippocampal mossy fibers. *Neurosci Lett*. 2008;445(1):62-7.
175. Schjetnan A, Escobar M. In vivo BDNF modulation of hippocampal mossy fiber plasticity induced by high frequency stimulation. *Hippocampus*. 2012;22(1):1-8.
176. Tamura M, Tamura N, Ikeda T, Koyama R, Ikegaya Y, Matsuki N, et al. Influence of brain-derived neurotrophic factor on pathfinding of dentate granule cell axons , the hippocampal mossy fibers. *Mol Brain*. 2009;2:1-9.
177. Spencer-Segal JL, Waters EM, Bath KG, Chao M V., McEwen BS, Milner TA. Distribution of TrkB receptor in the mouse hippocampal formation depends on sex and estrous cycle stage. *J Neurosci*. 2011;31(18):6780-90.
178. Palmer A, Qayumi J, Ronnett G. MeCP2 mutation causes distinguishable phases of acute and chronic defects in synaptogenesis and maintenance, respectively. *Mol Cell Neurosci*. 2008;37(4):794-807.
179. Rosenfeld CS, Ferguson SA. Barnes Maze Testing Strategies with Small and Large Rodent Models. *J Vis Exp*. 2014;(84):1-15.
180. Vicens P, Redolat R, Del Carmen Carrasco M. Aprendizaje espacial y laberinto de agua: Metodología y aplicaciones. *Psicothema*. 2003;15(4):539-44.
181. Johnston M V, Jeon O, Pevsner J, Blue ME, Naidu S. Neurobiology of Rett syndrome : a genetic disorder of synapse development. *Brain Dev*. 2001;23:206-13.
182. Zoghbi H. Postnatal neurodevelopmental disorders: meeting at the synapse? *Science* (80- ). 2003;302(5646):826-30.
183. Rekart J, Holahan M, Routtenberg A. Presynaptic Structural Plasticity and Long-Lasting Memory: Focus on Learning-Induced Redistribution of Hippocampal Mossy Fibers. In: *Neural Plasticity and Memory: From Genes to Brain Imaging* Boca Raton (FL): CRC Press/Taylor & Francis. 2007.
184. Frotscher M. Mossy fiber synapses on glutamate decarboxylase-immunoreactive neurons: evidence for feed-forward inhibition in the CA3 region of the hippocampus. *Exp Brain Res*. 1989;75(2):441-5.
185. Acsády L, Kamondim A, Sík A, Freund T, Buzsáki G. GABAergic Cells Are the Major Postsynaptic Targets of Mossy Fibers in the Rat Hippocampus. *J Neurosci*. 1998;18(9):3386-403.
186. Martin EA, Muralidhar S, Wang Z, Cordero Cervantes D, Basu R, Taylor MR, et al. The intellectual disability gene Kirrel3 regulates target-specific mossy fiber synapse development in the hippocampus. *Elife*. 2015;4:1-15.
187. McDonald J, Johnston M. Physiological and pathophysiological roles of excitatory amino acids during central nervous system development. *Brain Res Brain Res Rev*. 1990;15(1):41-70.
188. Penn A, Shatz C. Brain waves and brain wiring: the role of endogenous and sensory-driven neural activity in development. *Pediatr Res*. 1999;45(4):447-58.
189. Geschwind D, Levitt P. Autism spectrum disorders: developmental disconnection syndromes. *Curr Opin Neurobiol*. 2007;17(1):103-11.
190. McGraw CM, Samaco RC, Zoghbi HY. Adult neural function requires MeCP2. *Science* (80- ). 2012;333(6039):2011-3.
191. Mulle C, Sailer A, Pérez-Otaño I, Dickinson-Anson H, Castillo P, Bureau I, et al. Altered synaptic physiology and reduced susceptibility to kainate-induced seizures in

- GluR6-deficient mice. *Nature*. 1998;392(6676):601-5.
192. McCord MC, Lorenzana A, Bloom CS, Chancer ZO, Schauwecker PE. Effect of age on kainate-induced seizure severity and cell death. *Neuroscience*. 2008;154(3):1143-53.
193. Huang E, Reichardt L. Neurotrophins: roles in neuronal development and function. *Annu Rev Neurosci*. 2001;24:677-736.
194. Cowansage K, LeDoux J, Monfils M. Brain-derived neurotrophic factor: a dynamic gatekeeper of neural plasticity. *Curr Mol Pharmacol*. 2010;3(1):12-29.
195. Lu B. Pro-region of neurotrophins: role in synaptic modulation. *Neuron*. 2003;39(5):735-8.
196. Poo M. Neurotrophins as synaptic modulators. *Nat Rev Neurosci*. 2001;2(1):24-32.
197. Tyler W, Perrett S, Pozzo-Miller L. The role of neurotrophins in neurotransmitter release. *Neuroscientist*. 2002;8(6):524-31.
198. Chang Q, Khare G, Dani V, Nelson S, Jaenisch R. The disease progression of *Mecp2* mutant mice is affected by the level of BDNF expression. *Neuron*. 2006;49(3):341-8.
199. Wang H, Chan S, Ogier M, Hellard D, Wang Q, Smith C, et al. Dysregulation of brain-derived neurotrophic factor expression and neurosecretory function in *Mecp2* null mice. *J Neurosci*. 2006;26(42):10911-5.
200. Li W, Calfa G, Larimore J, Pozzo-Miller L. Activity-dependent BDNF release and TRPC signaling is impaired in hippocampal neurons of *Mecp2* mutant mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012;109(42):17087-92.
201. Lonetti G, Angelucci A, Morando L, Boggio E, Giustetto M, Pizzorusso T. Early environmental enrichment moderates the behavioral and synaptic phenotype of *MeCP2* null mice. *Biol Psychiatry*. 2010;67(7):657-65.
202. Moretti P. Learning and Memory and Synaptic Plasticity Are Impaired in a Mouse Model of Rett Syndrome. *J Neurosci*. 2006;26(1):319-27.
203. Li W, Pozzo-miller L. BDNF deregulation in Rett syndrome. *Neuropharmacology*. 2014;76:737-46.
204. Pasterkamp R. Getting neural circuits into shape with semaphorins. *Nat Rev Neurosci*. 2012;13(9):605-18.
205. Tashiro A, Dunaevsky A, Blazeski R, Mason C, Yuste R. Bidirectional regulation of hippocampal mossy fiber filopodial motility by kainate receptors: a two-step model of synaptogenesis. *Neuron*. 2003;38(5):773-84.
206. De Paola V, Arber S, Caroni P. AMPA receptors regulate dynamic equilibrium of presynaptic terminals in mature hippocampal networks. *Nat Neurosci*. 2003;6(5):491-500.
207. De Filippis B, Ricceri L, Laviola G. Early postnatal behavioral changes in the *Mecp2*-308 truncation mouse model of Rett syndrome. *Genes Brain Behav*. 2010;9(2):213-23.
208. Belichenko P, Hagberg B, Dahlström A. Morphological study of neocortical areas in Rett syndrome. *Acta Neuropathol*. 1997;93(1):50-60.
209. Armstrong D, Dunn J, Antalffy B, Trivedi R. Selective dendritic alterations in the cortex of Rett syndrome. *J Neuropathol Exp Neurol*. 1995;54(2):195-201.
210. Vanderhaeghen P, Cheng H. Guidance molecules in axon pruning and cell death. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2010;2(6):a001859.
211. Nicoll R, Schmitz D. Synaptic plasticity at hippocampal mossy fibre synapses. *Nat Rev*



- Neurosci. 2005;6(11):863-76.
212. Galimberti I, Gogolla N, Alberi S, Santos A, Muller D, Caroni P. Long-term rearrangements of hippocampal mossy fiber terminal connectivity in the adult regulated by experience. *Neuron*. 2006;50(5):749-63.
  213. Ramírez-Amaya V, Balderas I, Sandoval J, Escobar M, Bermúdez-Rattoni F. Spatial long-term memory is related to mossy fiber synaptogenesis. *J Neurosci*. 2001;21(18):7340-8.
  214. Ruediger S, Vittori C, Bednarek E, Genoud C, Strata P, Sacchetti B, et al. Learning-related feedforward inhibitory connectivity growth required for memory precision. *Nature*. 2011;473(7348):514-8.
  215. Cavazos J, Golarai G, Sutula T. Mossy fiber synaptic reorganization induced by kindling: time course of development, progression, and permanence. *J Neurosci*. 1991;11(9):2795-803.
  216. Danzer S, He X, Loepke A, McNamara J. Structural plasticity of dentate granule cell mossy fibers during the development of limbic epilepsy. *Hippocampus*. 2010;20(1):113-24.
  217. Ballarín M, Ernfors P, Lindfors N, Persson H. Hippocampal damage and kainic acid injection induce a rapid increase in mRNA for BDNF and NGF in the rat brain. *Exp Neurol*. 1991;114(1):35-43.
  218. Holtmaat A, Gorter J, De Wit J, Tolner E, Spijker S, Giger R, et al. Transient downregulation of Sema3A mRNA in a rat model for temporal lobe epilepsy. A novel molecular event potentially contributing to mossy fiber sprouting. *Exp Neurol*. 2003;182(1):142-50.
  219. Tawarayama H, Yoshida Y, Suto F, Mitchell K, Fujisawa H. Roles of semaphorin-6B and plexin-A2 in lamina-restricted projection of hippocampal mossy fibers. *J Neurosci*. 2010;30(20):7049-60.
  220. Martino G, Pluchino S, Bonfanti L, Schwartz M. Brain Regeneration in Physiology and Pathology: The Immune Signature Driving Therapeutic Plasticity of Neural Stem Cells. *Physiol Rev*. 2011;91:1281-304.