



**Escuela de Medicina
Centro de Investigaciones Biomédicas**

**“EVALUACION DE CONDUCTAS
ASOCIADAS A TRASTORNO OBSESIVO
COMPULSIVO EN MODELOS ANIMALES
A TRAVES DE CAMBIOS EN LA
EXPRESION DE EAAT3 EN NEURONAS
GABAERGICAS Y PIRAMIDALES”**

**Tesis para optar al grado de Magíster en Ciencias Médicas,
mención en Biología Celular y Molecular**

CLAUDIA ANDREA DELGADO ACEVEDO

Director de Tesis: Dr. Pablo Moya Vera

FECHA: Diciembre 2017



Escuela de Medicina
Programa de Magíster en Ciencias Médicas
Mención Biología Celular y Molecular

**“Evaluación de conductas asociadas a trastorno
obsesivo compulsivo en modelos animales a través de
cambios en la expresión de EAAT3 en neuronas
GABAérgicas y piramidales”**

Claudia Andrea Delgado Acevedo

Este trabajo fue elaborado bajo la supervisión del Director de Tesis Dr. Pablo Moya Vera en el laboratorio de Neurogenética de la Universidad de Valparaíso, aprobado por los miembros de la Comisión.

Dr. Pablo Moya
Director de Tesis

Dr. Andrea Calixto
Comisión Evaluación Tesis

Dr. Pablo Muñoz
Comisión Evaluación Tesis

Dr. Miguel Reyes
Comisión Evaluación Tesis

**Valparaíso, Chile
2017**

INDICE

INDICE.....	3
RESUMEN	5
INTRODUCCION	6
Trastorno Obsesivo-Compulsivo.....	6
Modelo neuroanatómico.....	7
Disfunción glutamatérgica en TOC	9
Glutamato en el Sistema Nervioso Central.	11
Transportadores de aminoácidos excitatorios (EAATs)	13
EAATs en TOC.....	15
EAAT3.....	16
Modelos animales de TOC	18
Sistema <i>Cre/loxP</i>	24
Medición de conductas relevantes al TOC en roedores	25
HIPOTESIS	27
OBJETIVOS.....	27
Objetivo general:	27
Objetivos específicos:	27
MATERIALES Y METODOS	28
Animales	28
Generación de líneas de ratones con sobreexpresión de EAAT3 (EAAT3 ^{glo}), con expresión en subtipo neuronal específico (neuronas GABAérgicas y piramidales). 28	
Grupos experimentales	31
Genotipificación de ratones mediante la técnica de PCR convencional.....	31
Extracción de ADN genómico	31
PCR convencional	32
Electroforesis en gel.....	33
Estudios Conductuales	35
Prueba de exploración de campo abierto	35
Prueba de laberinto elevado en cruz.....	36

Prueba de enterrado de bolitas.....	36
Prueba de acicalamiento basal	37
Análisis estadístico.....	37
RESULTADOS	39
Genotipificación de ratones con sobreexpresión condicional en neuronas GABAérgicas (EAAT3 ^{glo} /GAD)	39
Genotipificación de ratones con sobreexpresión condicional en neuronas piramidales (EAAT3 ^{glo} /CKII)	41
Evaluación del fenotipo conductual tipo ansioso en ratones EAAT3 ^{glo} /GAD mediante la prueba de exploración de campo abierto	42
Evaluación del fenotipo conductual tipo ansioso en ratones EAAT3 ^{glo} /CKII mediante la prueba de exploración de campo abierto	44
Evaluación del fenotipo conductual tipo ansioso en ratones EAAT3 ^{glo} /GAD mediante la prueba de laberinto elevado en cruz.....	46
Evaluación del fenotipo conductual tipo ansioso en ratones EAAT3 ^{glo} /CKII mediante la prueba de laberinto elevado en cruz.	48
Evaluación del fenotipo conductual tipo compulsivo en ratones EAAT3 ^{glo} /GAD mediante la prueba de enterrado de bolitas	50
Evaluación del fenotipo conductual tipo compulsivo en ratones EAAT3 ^{glo} /CKII mediante la prueba de enterrado de bolitas	51
Evaluación del fenotipo conductual tipo compulsivo en ratones machos EAAT3 ^{glo} /GAD mediante la prueba de acicalamiento basal.....	52
Evaluación del fenotipo conductual tipo compulsivo en ratones machos EAAT3 ^{glo} /CKII mediante la prueba de acicalamiento basal	53
DISCUSION	54
Verificación de la presencia de transgenes (EAAT3 ^{glo} y Cre) por genotipificación vía PCR convencional	54
Efecto de la sobreexpresión condicionada de EAAT3 sobre conductas tipo ansiosas	55
Efecto de la sobreexpresión condicionada de EAAT3 sobre conductas tipo compulsivas.....	56
BIBLIOGRAFIA	58
ANEXOS	63

RESUMEN

El trastorno obsesivo compulsivo (TOC) es un desorden neuropsiquiátrico crónico, caracterizado por obsesiones y compulsiones. Los factores precisos que causan TOC son desconocidos, sin embargo se han comprobado alteraciones del circuito cerebral cortico-estriado-tálamo-cortical (CSTC). La naturaleza precisa del defecto (incluyendo información sobre el sistema de neurotransmisores afectados) no ha sido aún bien dilucidada.

Múltiples evidencias sugieren alteraciones en el sistema glutamatérgico, las cuales contribuirían a la patofisiología del desorden. Los genes involucrados en la neurotransmisión glutamatérgica son buenos candidatos para estudios de asociación en TOC, principalmente el gen SLC1A1 que codifica para el transportador neuronal de glutamato EAAT3. Resultados obtenidos de tales estudios, son los únicos que han logrado ser replicados y han alcanzado significancia estadística.

Antecedentes recientes han señalado que ratones KO para EAAT3 no muestran conductas tipo ansioso-compulsivas. Lo que no es de extrañar, debido a que la mayoría de la evidencia genética sugiere una asociación de TOC con aumento en la expresión de SLC1A1/EAAT3. Dado lo anterior, es que surge la interrogante sobre cómo variaciones en la expresión de SLC1A1/EAAT3 median el desarrollo de conductas asociadas a TOC.

El objetivo general de este proyecto fue estudiar el rol de EAAT3 en TOC, a través de la evaluación de alteraciones conductuales producidas por la sobreexpresión condicional de EAAT3 en modelos animales.

Mediante el uso de una batería de paradigmas conductuales, se evaluaron conductas tipo ansioso-compulsivas en un grupo de ratones con sobreexpresión en neuronas GABAérgicas (EAAT3^{glo}/GAD) y en otro grupo con sobreexpresión en neuronas piramidales (EAAT3^{glo}/CKII). Los resultados mostraron que a nivel basal los ratones EAAT3^{glo}/CKII presentan fenotipo ansioso-compulsivo comparado con el grupo control. A diferencia de los ratones (EAAT3^{glo}/GAD), en los que observan diferencias muy sutiles respecto al grupo control.

INTRODUCCION

Trastorno Obsesivo-Compulsivo

El trastorno obsesivo compulsivo (TOC) es un desorden neuropsiquiátrico crónico, severo y de alta prevalencia. Afecta alrededor del 1.5 al 3 % de la población y es uno de los principales trastornos psiquiátricos que causan discapacidad a nivel mundial [1].

Como su nombre lo indica, los principales síntomas del TOC corresponden a obsesiones y compulsiones. Las obsesiones son pensamientos, impulsos o imágenes recurrentes y persistentes que se caracterizan por ser intrusivos e indeseados, mientras que las compulsiones son conductas repetitivas o actos mentales que los pacientes realizan de acuerdo a reglas que deben ser aplicadas de manera rígida [2].

Una función adaptativa adecuada requiere la habilidad de regular e inhibir pensamientos, preocupaciones, sentimientos y conductas inadecuadas. Las personas con TOC son incapaces de controlar tales pensamientos y en consecuencia experimentan obsesiones acompañadas de ansiedad. Para neutralizar la ansiedad generada, los individuos caen en comportamientos compulsivos [3], como conductas repetitivas (lavado de manos, ordenar, chequear) o actos mentales (rezar, contar, repetir palabras en silencio). Generalmente estas conductas y actos no están conectados de una manera realista con las obsesiones que los generan o son claramente excesivos.

En pacientes con TOC las obsesiones y compulsiones deben consumir tiempo (al menos 1 hora diaria), causando problemas a nivel social, ocupacional o dificultades para llevar a cabo las actividades de cada día, lo que está asociado a una reducción de la calidad de vida. Este criterio permite distinguir este desorden, de pensamientos que producen ansiedad o conductas repetitivas que la mayoría de las personas experimentan en algún momento de sus vidas.

En Estados Unidos la edad de inicio de los síntomas es a los 19.5 años, reportándose en un 25% de los casos a los 14. Los hombres presentan la enfermedad antes que las mujeres, cerca de los 10 años, sin embargo, en ambos sexos puede iniciarse en etapas más precoces durante la infancia [2].

La aparición de los síntomas generalmente es gradual, no obstante, se han reportado casos de aparición aguda.

Si el TOC no es tratado, el curso de esta enfermedad se vuelve crónico, llegando a presentar pensamientos suicidas en la mitad de los individuos afectados e intentos de

suicidio en un 25% de ellos. La comorbilidad con otras enfermedades, como depresión, aumentan el riesgo.

La terapia convencional de TOC incluye terapia cognitiva conductual y el uso de inhibidores selectivos de la recaptación de serotonina (ISRSs), como fluoxetina, fluvoxamina, sertralina o paroxetina, fármacos utilizados como tratamiento de primera línea. Un 40 a 50% de los pacientes no responde al tratamiento y aún en un mayor porcentaje se observan síntomas residuales [2].

Modelo neuroanatómico

Los factores precisos que causan TOC son desconocidos. Sin embargo, décadas de investigación han señalado que el circuito cerebral cortico-estriado-tálamo-cortical (CSTC) es una vía crítica involucrada en las obsesiones y está íntimamente relacionado con las conductas repetitivas o compulsiones [4].

Estudios de imágenes de estructuras cerebrales han arrojado resultados heterogéneos, sin embargo en todos se ha observado alteraciones de volumen y/o simetría en corteza prefrontal, ganglios basales y tálamo (principales componentes del circuito CSTC) en pacientes con TOC. Las técnicas de neuroimágenes funcionales han llevado a un mejor entendimiento de la neurobiología del TOC, proporcionando evidencia sólida que la fisiopatología de este desorden involucra un funcionamiento anormal de este circuito. Aunque no todos los resultados de estudios de imágenes de funcionalidad cerebral concuerdan, la gran mayoría han mostrado un aumento en la actividad de corteza orbitofrontal, corteza anterior cingulada, núcleo caudado y tálamo en pacientes no tratados, así como en familiares de pacientes con TOC comparado con controles. Se ha observado además que la actividad en estas áreas se ve acentuada frente a la provocación de los síntomas y es atenuada luego del tratamiento con ISRSs [5].

Tradicionalmente se ha considerado como uno de los roles centrales de los ganglios basales, pertenecientes al circuito CSTC, el control de los movimientos voluntarios, específicamente la selección de las conductas que se quieren llevar a cabo y la exclusión de las que no [4]. Sin embargo, estudios posteriores han demostrado que las conexiones corticoestriatales no tienen un rol puramente motor o sensorimotor, sino que además participan en la expresión de conductas dirigidas hacia un objetivo y en los procesos que llevan a ejecutar un movimiento en los que se ven involucrados elementos emocionales, motivacionales y cognitivos [6].

La anatomía y neuroquímica de las vías del circuito CSTC han sido bien establecidas durante la segunda mitad del siglo 20. La organización general de este circuito consiste en numerosas proyecciones paralelas desde sectores específicos de la corteza

prefrontal hacia el estriado, y luego a través de las vías directa e indirecta hacia el tálamo. Finalmente desde el tálamo salen proyecciones hacia las áreas de la corteza prefrontal, lugar donde el circuito comenzó [3].

Clásicamente, las vías directa e indirecta se describen de la siguiente forma: neuronas piramidales de la corteza cerebral envían proyecciones hacia el interior del estriado formando sinapsis glutamatérgicas con las neuronas espinosas medianas (MSNs por sus siglas en inglés). Sucesivamente, éstas últimas se conectan con otros componentes del ganglio basal, el globo pálido intermedio (GPi) y la substantia nigra pars reticulata (SNr), a través de las vías directa e indirecta, las cuales tienen funciones opuestas relacionadas a la activación e inhibición de los movimientos y conductas, respectivamente. Las MSNs se dividen en dos tipos de acuerdo al lugar de proyección y al receptor de dopamina que expresan. En la vía directa, las MSNs contienen el receptor de dopamina subtipo D1 (D1-R) y proyectan directamente hacia el GPi/SNr. Por otro lado, en la vía indirecta, las MSNs expresan mayormente el receptor de dopamina subtipo D2 (D2-R) y envían proyecciones hacia el segmento externo del globo pálido (GPe), desde el cual salen proyecciones GABAérgicas hacia el núcleo subtalámico (NS). Este último núcleo envía proyecciones glutamatérgicas al GPi/SNr, donde se retoma el trayecto común de ambas vías hacia tálamo y corteza. El complejo GPi/SNr, la principal estación de salida de los ganglios basales, consiste en neuronas GABAérgicas con una alta tasa de descargas tónicas. La activación de las MSNs de la vía directa inhibe la actividad tónica de este complejo, induciendo una pausa de los disparos, lo que resulta en la desinhibición del tálamo y en el envío de señales excitatorias a la corteza frontal, lo que a su vez favorece la iniciación de movimientos y de conductas que se quieren llevar a cabo. Por otra parte, la activación de las MSNs de la vía indirecta, provocan la inhibición del GPe, lo que es seguido por la desinhibición del NS y la excitación del complejo GPi/SNr, el que envía señales inhibitorias al tálamo y por consiguiente no salen señales excitatorias a la corteza, lo que impide la iniciación y ejecución de movimientos. Las MSNs reciben además entradas dopaminérgicas provenientes de proyecciones nigroestriatales, las que ejercen efectos diferentes sobre las MSNs D1- y MSNs D2-R, facilitando la vía directa e inhibiendo la vía indirecta, respectivamente.

Sobre la base de los estudios de neuroimágenes se ha propuesto que un desbalance entre ambas vías, con predominio de la vía directa, causado por la hiperactividad de los circuitos orbitofrontales-subcorticales, promueve el desarrollo de las conductas asociadas a TOC [5, 7, 8].

Disfunción glutamatérgica en TOC

Pese a las numerosas evidencias que implican una disfunción del circuito CSTC en TOC (lugar donde el neurotransmisor excitatorio dominante es glutamato), la naturaleza precisa del defecto, incluyendo información sobre el sistema de neurotransmisores primariamente afectado, no ha sido bien dilucidada. La mayoría de las hipótesis que han tratado de explicar las causas de TOC se han enfocado en el sistema serotoninérgico, sobre la base de los beneficios del uso de ISRSs en el tratamiento contra los síntomas de esta enfermedad. Sin embargo, sólo el 50 a 60 % de los pacientes responden a este tratamiento, lo que sugiere que otro sistema de neurotransmisores podría estar involucrado.

Múltiples evidencias relacionan una desregulación de la neurotransmisión de glutamato con TOC, incluyendo estudios neuroquímicos, de neuroimágenes, farmacológicos, de genética humana y de modelos animales con alteraciones en componentes de maquinaria glutamatérgica.

Alteraciones en la concentración de glutamato en fluido cerebroespinal (FCE) fueron reportadas por Chakrabarty et al. en 2005. Este grupo de investigadores encontró un aumento significativo en los niveles de glutamato de pacientes con TOC no medicados comparados con individuos controles. Unos años más tarde este mismo grupo replicó y extendió los resultados, observando un aumento de la concentración de glutamato y glicina (co-agonista del receptor de glutamato NMDA) en pacientes no tratados *versus* controles. Estos estudios fueron complementados mediante el uso de espectroscopía por resonancia magnética (RM), técnica que a pesar de ser menos sensible, permite medir la concentración de glutamato en regiones específicas del cerebro [9]. En el 2000, Rossenberg et al. midieron en un grupo de 11 individuos jóvenes (entre 8 y 19 años) con TOC, la concentración de glutamina y glutamato antes y después de ser tratados con ISRSs (paroxetina). Lo que ellos observaron en los pacientes antes del tratamiento, fue un aumento significativo en la concentración de ambos aminoácidos específicamente en núcleo caudado. Por el contrario, luego del tratamiento con paroxetina, se observó que los niveles de glutamato y glutamina disminuyeron a niveles similares a los del grupo control [10].

Las evidencias provenientes de los estudios en FCE y los de RM, llevó a probar numerosos agentes moduladores de la transmisión de este neurotransmisor como elementos complementarios en el tratamiento de pacientes refractarios a ISRSs.

El riluzol es un fármaco utilizado para el tratamiento de Esclerosis Lateral Amiotrófica y fue el primer modulador de glutamato estudiado en individuos refractarios. Su efecto modulador es a través de la inhibición de la liberación de glutamato desde neuronas

pre sinápticas y la estimulación de su captura por parte de los astrocitos. En varios ensayos abiertos, realizados tanto en adultos como en niños, se reportó que al menos la mitad de los pacientes tratados con ISRSs y adicionalmente con riluzol, mostraron una disminución significativa de los síntomas de TOC [8,11].

Además se ha estudiado el efecto de un derivado del aminoácido cisteína, N-Acetil cisteína (NAC). Este derivado aminoacídico modula la concentración de glutamato a través de la estimulación del intercambiador cistina/glutamato presente en glía, el que produce un aumento de los niveles de glutamato en el extracelular, lo que a su vez desencadena la estimulación de mecanismos de retroalimentación negativos que moderan la liberación de glutamato desde las neuronas presinápticas [8]. El efecto de NAC como tratamiento adyuvante del ISRS fluvoxamina resultó en una mejora significativa de los síntomas de TOC [12].

Se ha estudiado adicionalmente el efecto de fármacos que actúan a nivel de los receptores de glutamato. La memantina, utilizada en el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer, es un antagonista no competitivo de los receptores NMDA. Su afinidad por este tipo de receptores de glutamato es baja, lo que conduce a menores niveles de activación más que a un bloqueo completo. En algunos estudios se ha reportado efectos positivos del uso adicional de memantina en pacientes (niños y adultos) refractarios al tratamiento con ISRSs [11]. Por otro lado, Egashira et al., evaluaron el efecto de memantina y amantadina (antagonista del receptor NMDA) sobre conductas tipo compulsivas (test de enterrado de canicas) en ratones. Ambos antagonistas de NMDA inhibieron este tipo de conducta sin afectar la actividad locomotora de los animales [13].

Toda esta evidencia llevó a considerar a los genes involucrados en la neurotransmisión glutamatérgica como buenos candidatos para estudios de asociación genética en TOC. En el 2004 se reportó una asociación positiva entre una variante del gen GRIN2B, que codifica para la subunidad 2B del receptor de glutamato NMDA. En 2006, Arnold et al. Y Dickel et al., publicaron dos trabajos independientes que sugirieron que variantes del gen SLC1A1 (*solute carrier family 1, member 1*), que codifica para el transportador neuronal de glutamato EAAT3, estarían asociadas con TOC. También se ha estudiado la asociación de los genes GRIK2 y GRIK3, que codifican para un tipo de receptores ionotrópicos de glutamato (receptores de Kainato) y polimorfismos de los genes que codifican para las proteínas SAPAP/DLGAP, las cuales son proteínas de andamiaje postsinápticas que cumplen un papel clave en la organización espacial de los receptores de glutamato. Ninguna de estas asociaciones genéticas aún está probada,

sin embargo, las evidencias más confiables de tal asociación provienen de los estudios que involucran el gen SLC1A1 con TOC [8].

En algunos modelos animales en los que se ha alterado componentes de la sinapsis glutamatérgica, se ha observado el desarrollo de conductas similares a las exhibidas por pacientes humanos que sufren TOC. Tal es el caso del ratón mutante para SAPAP3. SAPAP3, es una proteína de andamiaje (de la familia SAPAP/DLGA) localizada en la densidad postsináptica de sinapsis excitatorias, altamente expresada en el circuito CSTC, particularmente en estriado. Ratones deficientes (*Knockout*, KO) para esta proteína presentan defectos en la transmisión glutamatérgica de sinapsis cortico-estriatales, además de conductas tipo ansiosas y tipo compulsivas, las cuales fueron revertidas mediante la administración crónica de fluoxetina o la reintroducción específica de SAPAP3 dentro de estriado mediante la inyección de vectores virales [14]. Otro modelo animal ampliamente estudiado, es el ratón KO para SLITRK5. SLITRK5 corresponde a una proteína estructural transmembrana que se encuentra altamente expresada en la densidad postsináptica del circuito CSTC, cuyas funciones conocidas son la regulación del crecimiento de neuritas y la sobrevivencia neuronal. La pérdida de esta proteína produjo acalamiento excesivo (compulsividad) y ansiedad en ratones, conductas que fueron revertidas, al igual que en el caso del ratón SAPAP3 KO, mediante el uso de ISRSs. Se observaron además, alteraciones significativas en la expresión de receptores ionotrópicos glutamatérgicos y disrupción de la transmisión glutamatérgica en el cortico-estriado [15].

Glutamato en el Sistema Nervioso Central.

El glutamato es el principal neurotransmisor excitatorio del sistema nervioso central de los mamíferos y el aminoácido más abundante en el cerebro [16]. Este último contiene grandes cantidades de glutamato (5-15 mmol por kilo de peso), pero sólo una pequeña fracción se encuentra presente en el extracelular, hallándose las mayores cantidades dentro de las terminales nerviosas. El glutamato es constantemente liberado hacia el espacio extracelular a través de diferentes mecanismos [17]. Uno de éstos es el mecanismo vesicular o exocitosis, en los cuales el glutamato sintetizado en el citoplasma es empaquetado dentro de vesículas por los transportadores vesiculares de glutamato (VGLUTs). Cuando se genera un potencial de acción, las vesículas presentes en las terminales sinápticas se fusionan con la membrana plasmática, liberando su contenido hacia el exterior [9]. Otros mecanismos son los no vesiculares, en los que el glutamato es liberado mediante canales iónicos, acción reversa de las proteínas de membrana transportadoras de glutamato y el intercambiador cistina-glutamato Xc^-

[16]. El glutamato liberado es rápidamente difundido a través del espacio sináptico, donde se une a receptores pre y postsinápticos. Los receptores de glutamato son de dos tipos: ionotrópicos y metabotrópicos. Los receptores ionotrópicos, subtipos NMDA, AMPA y Kainato, son canales iónicos regulados por ligando que al unir glutamato permiten el paso de cationes (ingreso de Na^+ y salida de K^+) a través de la membrana, generando cambios eléctricos y de este modo respuestas postsinápticas excitatorias. Los receptores NMDA y ciertos tipos de receptores AMPA tienen efectos adicionales y más duraderos sobre las neuronas postsinápticas, ya que permiten la entrada de Ca^{+2} además de Na^+ . El cambio en la concentración de Ca^{+2} puede, al actuar como segundo mensajero, activar las cascadas de señalización intracelular, gatillando cambios sinápticos, procesos neurotróficos, daño celular o incluso la muerte neuronal [9, 11]. Los receptores metabotrópicos o mGluRs, son receptores asociados a proteína G. Cuando se encuentran localizados postsinápticamente, regulan la sensibilidad de las neuronas a la estimulación con glutamato a través de la modulación de forma indirecta de la actividad de los receptores NMDA y AMPA. Por otro lado, cuando se encuentran en las neuronas presinápticas regulan la liberación de glutamato, actuando como mecanismo de retroalimentación negativa [18]. Muchos de los receptores de glutamato postsinápticos están insertos en una matriz de proteínas estructurales, conocida como densidad postsináptica, la cual controla la posición relativa de éstos, además del tráfico de los neurotransmisores [9].

La mayoría de las neuronas e incluso las células gliales presentan receptores de glutamato en sus membranas. El control de la activación de estos receptores se logra mediante la remoción del glutamato liberado al espacio sináptico. Debido a que no existen enzimas extracelulares que degraden el glutamato, la recaptura de este neurotransmisor es catalizada por una familia de proteínas transportadoras, denominadas transportadores de aminoácidos excitadores o EAATs (por sus siglas en inglés) [16], los que juegan un importante rol en la mantención de la concentración de glutamato extracelular [19]. El glutamato recapturado puede tener como destino procesos metabólicos (síntesis de proteínas, metabolismo energético, fijación de amonio) o ser reutilizado como neurotransmisor. En los astrocitos, el glutamato incorporado es convertido a glutamina por la enzima glutamina sintetasa (GLUL). La glutamina luego es liberada al extracelular a través de transportadores de glutamina, tomada por las neuronas y ahí reconvertida en glutamato por una glutaminasa mitocondrial. Este tráfico de glutamina y glutamato entre los astrocitos y las neuronas ha sido propuesto como uno de los mayores mecanismos de reciclaje de glutamato, proceso conocido como ciclo glutamato-glutamina [16, 17]. El glutamato además

puede ingresar a las neuronas inhibitoras GABAérgicas, donde es convertido a GABA por la enzima ácido glutámico descarboxilasa (GAD) [9]. Otro mecanismo que media la regulación de glutamato, es el antiporter cistina/glutamato, designado como Xc⁻, presente principalmente en la glía. Este transportador de membrana intercambia cistina desde el medio extracelular por glutamato intracelular, aumentando la concentración del neurotransmisor en el espacio sináptico, lo que desencadena un mecanismo de retroalimentación negativo. Por otro lado, la cistina que ingresa a las células gliales es reducida a cisteína, la que es utilizada en la síntesis de glutatión, uno de los principales antioxidantes del cerebro. Debido a que el glutamato es el mayor mediador de señales excitatorias y que en altas concentraciones es tóxico, es que debe ser finamente regulado y debe estar presente en las concentraciones, en el tiempo y en el lugar adecuado [16]. Además de ser liberado al espacio sináptico, el glutamato es difundido fuera de éste donde se une a distintas poblaciones de receptores, ejerciendo otros efectos sobre las neuronas. Mientras la activación de los receptores NMDA postsinápticos participa en la transmisión sináptica, plasticidad y efectos tróficos sobre las neuronas [9], la hiperestimulación de los receptores NMDA perisinápticos y el consecuente aumento en la entrada de Ca⁺², llevan a daño y muerte neuronal, proceso denominado excitotoxicidad [11].

Transportadores de aminoácidos excitatorios (EAATs)

Existen cinco subtipos de EAATs, los que pertenecen a la familia de transportadores *SLC1* (*solute carrier family*). Los cinco subtipos descritos son producto de los genes *SLC1A3*, *SLC1A2*, *SLC1A1*, *SLC1A6* y *SLC1A7*, los que codifican en humanos las proteínas EAAT1, 2, 3, 4 y 5, respectivamente. En roedores EAAT1, EAAT2 y EAAT3 son denominados GLT-1, GLAST y EAAC1, mientras que EAAT4 y 5 son llamados de igual manera en ambas especies.

La clonación de estos transportadores en los años 90 permitió comenzar a entender aspectos importantes de su estructura y función. Sin embargo, la determinación de la estructura cristalina del transportador de aspartato del procarionte *Pyrococcus horikoshii* (Glt_{ph}), que es el homólogo del transportador de glutamato presente en eucariontes, ha permitido dilucidar con mayor detalle la estructura general de los transportadores. La secuencia aminoacídica de Glt_{ph} comparte 37% de identidad con EAAT2. Este porcentaje es relativamente alto considerando la distancia evolutiva entre ambos organismos, y que el porcentaje de identidad que comparten los cinco subtipos de EAATs alcanza sólo del 45 al 55 %. Por lo anterior, se ha propuesto a Glt_{ph} como un buen modelo de la estructura de los EAATs. La cristalización de Glt_{ph} junto con estudios

de transferencia de energía por resonancia de fluorescencia (FRET por sus siglas en inglés) de EAAT3 concluyeron, independientemente, que los transportadores están formados por homómeros compuestos por tres subunidades independientes, las cuales componen una estructura con forma de *bowl*. Cada subunidad está formada por dominios transmembrana α hélice (TM 1-8) con extremos amino y carboxilo terminales intracelulares y dos *hairpin loops* (HP1 y HP2). Se ha descrito que TM1, 2, 4 y 5 actúan como dominios de andamiaje, mientras que TM3, 6, 8, HP1 y HP2 lo hacen como dominios de transporte [20, 21].

Los cinco tipos de EAATs transportan con igual eficacia L- y D- aspartato, además de L- glutamato. Mediante estudios relacionados con la estequiometría del transporte, se determinó que el paso de una molécula de glutamato está acoplado al cotransporte de tres iones de Na^+ y un H^+ , seguido del contra transporte de un K^+ . Este flujo de iones da la fuerza energética para el paso de este neurotransmisor en contra de su gradiente electroquímica. Adicional al flujo de estos iones, la unión de glutamato y Na^+ a los EAATs activa una conductancia no acoplada de Cl^- a través del transportador, cuya dirección es independiente a la del flujo del neurotransmisor [17]. Si bien, el paso de Cl^- no tiene influencia sobre el transporte de iones acoplados a glutamato (Na^+ , H^+ y K^+), si lo puede hacer sobre el potencial de membrana. El paso de Na^+ e H^+ resulta en la transferencia neta de dos cargas positivas hacia el interior de la membrana, lo que la despolariza y disminuye la fuerza disponible para el transporte de glutamato. El paso de Cl^- hacia el interior de la neurona limita el grado de despolarización, lo que mantiene el transporte de glutamato en niveles óptimos [19].

La recaptura de glutamato sigue un modelo de translocación en el cual el transportador adquiere dos conformaciones, una exterior y otra interior. En la conformación exterior, el glutamato y los iones cotransportados se unen al sitio de unión expuesto hacia el espacio extracelular, luego HP2 se reposiciona y cierra el sitio de unión hacia el exterior. Posteriormente, el transportador se organiza en la conformación interior donde HP1 se abre y deja accesible hacia el intracelular los sitios de unión, translocándose el glutamato y los iones hacia el interior de la célula. Finalmente se une el ion K^+ , HP1 se cierra y el transportador se reorienta en la conformación exterior. HP2 se abre y el K^+ es liberado, completando el ciclo [20]. La interconversión entre las formas externa e interna permite la acumulación de glutamato en contra de su gradiente de concentración.

Los patrones de expresión y localización de los cinco tipos de EAATs difieren en cuanto a las regiones cerebrales y los tipos celulares en los que se presentan. EAAT1 y EAAT2 se expresan principalmente en astrocitos, mientras que EAAT3, 4 y 5 lo hacen en

neuronas [21]. EAAT1 es el mayor transportador de glutamato de cerebelo, oído interno, retina y órganos circunventriculares, mientras que EAAT2 es el más abundante en todas aquellas regiones en las que EAAT1 no lo es. EAAT2 es expresado no sólo en astrocitos, sino que además en terminales presinápticas de neuronas hipocampales. Además, EAAT2 es el responsable del 90 a 95 % del *clearance* de glutamato, lo que se condice con constituir el 1% del total de proteínas del cerebro [20]. EAAT3 presenta una expresión menor que la de los transportadores presentes en la glía, así como una distribución más homogénea dentro del cerebro [22]. Por otro lado, la expresión de EAAT4 y EAAT5 es altamente localizada, encontrándose EAAT4 expresado principalmente en las células de Purkinje de cerebelo y EAAT5 en retina.

Fuera del sistema nervioso central, también se pueden encontrar ciertos niveles de expresión de EAATs. Por ejemplo, EAAT1 es expresado en corazón, placenta, osteocitos y glándula mamaria; EAAT2 en placenta y glándula mamaria; EAAT3 en corazón, intestino, placenta y riñón. En este último, la expresión de EAAT3 ha sido bien caracterizada, ya que juega un importante rol en la reabsorción de los ácidos dicarboxílicos.

Debido al rol fundamental que juegan los transportadores de glutamato en la regulación de las sinapsis glutamatérgicas, no es de sorprender que enfermedades neurológicas (como epilepsia, esquizofrenia o TOC, sólo por mencionar algunas), estén asociadas a alteraciones en su función. En la mayoría de los casos estas alteraciones llevan a un aumento en los niveles de glutamato en el extracelular, lo que se puede producir debido a varios mecanismos, como reducción en el suministro de energía hacia el cerebro y pérdida de la homeostasis de las gradientes iónicas, alteraciones en los niveles de expresión o la producción de variantes aberrantes que generan transportadores no funcionales [19].

EAATs en TOC

Más de 60 genes han sido reportados como candidatos para estudios genéticos de asociación en TOC, entre los que se cuentan genes del sistema serotoninérgico, dopaminérgico y glutamatérgico. Resultados obtenidos de tales investigaciones han sido variados; algunos sugieren que existe asociación y otros han fallado en la replicación de los resultados. Sin embargo, los genes involucrados en la neurotransmisión glutamatérgica, y principalmente el gen *SLC1A1*, que codifica para el transportador de neuronal de glutamato EAAT3, son los únicos que han logrado ser replicados y han alcanzado significancia estadística a nivel de meta-análisis [23].

En un estudio de ligamiento a nivel de genoma completo realizado el año 2002 por Hanna et al., en el que participaron 56 individuos provenientes de 7 familias con dos o más individuos diagnosticados con TOC, se sugirió que la región del genoma 9p24 contribuiría a la aparición de TOC. Sorprendentemente, de los genes conocidos dentro de esta región, *SLC1A1* es el único que se ha demostrado se expresa en cerebro. Estos resultados fueron replicados más tarde por el grupo de Willour et al., y unos años después se reportó la asociación de polimorfismos de nucleótidos simples (SNPs) dentro de la región 3' del gen *SLC1A1* con TOC [24].

EAAT3

El transportador neuronal de glutamato EAAT3 se expresa mayoritariamente en neuronas glutamatérgicas y GABAérgicas de las regiones implicadas en TOC, las que incluyen corteza cerebral, ganglios basales y tálamo, además de otras regiones como hipocampo, cerebelo y bulbo olfatorio.

Se ubica en las terminales nerviosas postsinápticas donde se observa una localización perisináptica [25]. Análisis inmunohistoquímicos confirmaron la presencia de cantidades significativas del transportador en citoplasma, por lo que se sugiere que sobre el 70-80% tiene una ubicación intracelular y sólo alrededor de un 20% se encuentra presente en la membrana. Esto contrasta con lo que ocurre en riñón, donde EAAT3 se encuentra principalmente en la superficie celular, y con lo que ocurre con los transportadores de la glía y EAAT4, los cuales también tienen una ubicación superficial. Como se mencionó anteriormente, el *clearance* de glutamato es mediado principalmente por los transportadores presentes en la glía; sin embargo, se ha demostrado que los transportadores neuronales contribuyen de manera eficiente en este proceso. Un estudio donde se redujo la expresión de EAAT3 demostró que este transportador es responsable del 20% de la recaptura de glutamato en estriado y del 40% en hipocampo [39]. Al menos en corteza cerebral e hipocampo muchas sinapsis no están rodeadas por procesos astrocíticos, por lo que la recaptura neuronal de glutamato mediada por EAAT3 es mayor, en oposición con lo que ocurre en otras regiones del cerebro, como por ejemplo en cerebelo [55]. Lo anterior sumado al hecho que EAAT3 se encuentra principalmente cerca de los procesos dendríticos, sugieren que la recaptura de glutamato mediada por este transportador tiene mayores efectos sobre la concentración local más que sobre la concentración global del neurotransmisor. Por lo tanto, cambios en la recaptura de glutamato mediada por EAAT3 tendrían efectos fisiológicos importantes a nivel sináptico mediante la

modulación de receptores, más que sobre los niveles globales de glutamato extracelular.

Se ha demostrado en neuronas corticales e hipocámpales de rata, que la disminución de la actividad de EAAT3 produce cambios en el tráfico de receptores AMPA. Se ha observado que un aumento en las concentraciones locales de glutamato, producido por el bloqueo de EAAT3, activa las subunidades NR2B de los receptores NMDA perisinápticos [56], lo cual lleva a la reducción de las subunidades GluR1 y GluR2 de los receptores AMPA [57].

Por otro lado, cuando es expresado en neuronas GABAérgicas, EAAT3 tiene un importante rol en la regulación de las sinapsis inhibitorias. Este transportador neuronal provee de glutamato a la neurona, el que es precursor de la síntesis de GABA. La inhibición de la recaptura de glutamato en neuronas GABAérgicas disminuye la liberación de GABA y la generación de las subsecuentes corrientes inhibitorias, lo que influye en la excitabilidad neuronal [20, 22]. Lo anterior se observó en ratas tratadas con cadenas de ARN antisentido para EAAT3, lo que resultó en una severa disminución, de un 50% aproximadamente, de la síntesis de GABA y en un aumento en la excitabilidad hipocámpal [26].

EAAT3 también tiene participación en la protección de las neuronas contra el daño oxidativo, debido a su alta afinidad por cisteína, el cual es uno de los precursores para la síntesis de glutatión, uno de los principales agentes antioxidantes presentes en las células. Con el propósito de corroborar la contribución de EAAT3 en la síntesis de glutatión, se realizaron estudios en cultivos de neuronas corticales, donde se observó que la inhibición farmacológica de la recaptura de glutamato en presencia de cisteína en el medio de cultivo, limita la síntesis de este antioxidante [20]. Como se mencionó anteriormente, el intercambiador cistina glutamato Xc^- , uno de los principales responsables de la síntesis de glutatión, se encuentra presente principalmente en la glía y no se ha descrito su presencia en neuronas. En ratones KO para este intercambiador no se observaron cambios en el contenido de glutatión a nivel cerebral, lo que sugiere que su síntesis estaría controlada, en parte, por EAAT3 [22]. En otros estudios realizados en líneas celulares, la disminución de los niveles de Xc^- estuvo acompañada de una sobre regulación de EAAT3, la que podría estar actuando como mecanismo compensatorio para la recaptación de cisteína y la subsecuente síntesis de glutatión en neuronas [20].

Modelos animales de TOC

Los modelos animales se han convertido en una herramienta extremadamente útil para entender numerosas enfermedades. Sin embargo, modelar una enfermedad en animales involucra grandes desafíos. La dificultad en desarrollar estos modelos radica en varios aspectos. Primero, es difícil que los animales puedan reflejar por completo toda la sintomatología de la patología que están modelando. A esto se suman problemas en los criterios de diagnóstico y variaciones entre pacientes aun cuando ambos padecen de la misma enfermedad, y también que los animales exhiban diferentes grados del desorden siendo este no equivalente a la patología presentada en humanos [27]. Lo anterior adquiere mayor relevancia en el modelamiento de enfermedades complejas como las neuropsiquiátricas, debido principalmente a la naturaleza subjetiva de los síntomas, a la falta de biomarcadores y test diagnósticos objetivos, y al conocimiento limitado que se tiene hasta el momento de aspectos relevantes de la neurobiología y genética de muchas de estas enfermedades. Sin perjuicio de lo anterior, se pueden desarrollar modelos animales adecuados para ciertos síntomas o dominios de alguna patología, existiendo así numerosos modelos para diferentes desordenes neuropsiquiátricos, los cuales han sido generados a través de diversos medios, como crianza selectiva, ingeniería genética, lesiones cerebrales específicas y manipulaciones ambientales, por mencionar algunos [28].

En el desarrollo de modelos animales, es crítico definir criterios de evaluación para determinar si son lo suficientemente buenos para garantizar su uso en futuras investigaciones. De acuerdo al criterio propuesto por Wilmer, un modelo animal requiere tres tipos de validación: validación de apariencia, validación predictiva y validación de constructo [59].

La validación de apariencia indica que el modelo debe recapitular características anatómicas, bioquímicas, neuropatológicas o (síntomas) conductuales de la enfermedad presente en humanos. Desafortunadamente, es poco probable que un mismo modelo animal presente todas estas características [27, 28]. En el caso de los modelos murinos de TOC, este criterio usualmente se basa en la aparición de conductas que asemejan las compulsiones observadas en humanos, esto considerando que TOC es definido como un desorden conductual. La conducta que más se observa en roedores, y que soporta la validez de apariencia, es el acicalamiento excesivo, la cual se caracteriza por seguir patrones estereotipados, incluso en animales silvestres. Otra manera de establecer esta validación en un modelo animal, es a través de la determinación de marcadores que reflejan aquellos previamente identificados en poblaciones humanas. En TOC estos marcadores pueden ser el aumento de tamaño y

de la concentración de glutamato en el núcleo caudado, hiperactividad del circuito cortico estriado o niveles aumentados de glutamato en el fluido cerebroespinal [29].

El criterio de validación predictiva (también llamado farmacológico), señala que el modelo animal muestra los mismos efectos a los fármacos usadas para el tratamiento o inducción) de una enfermedad [27]. En los modelos animales de TOC, ante la administración de I(S)RSs (utilizados como tratamiento de primera línea), se espera observar remisión de las conductas compulsivas o protección contra ellas. Adicionalmente, la respuesta a I(S)RSs en pacientes con TOC requiere de varias semanas de administración, lo que también ocurre en roedores, que responden a dosis crónicas y no a agudas. El uso de medicamentos alternativos, como ciertos antipsicóticos, utilizados en pacientes refractarios a ISRSs, también deberían mejorar las conductas compulsivas en estos modelos. Desde una perspectiva opuesta, se espera que los ansiolíticos o antidepresivos que no son eficaces en pacientes que sufren TOC, como benzodiazepinas o inhibidores de la recaptura de adrenalina (ISRN), tampoco lo sean en estos modelos [29].

Según la validación de constructo o etiológica, el modelo debe basarse en los mismos mecanismos que generan la enfermedad en humanos. En el caso de los trastornos neuropsiquiátricos, la situación ideal en la que se alcanzaría este tipo de validación sería recreando en el animal los procesos etiológicos descritos en humanos y de ese modo replicar en el modelo las características neurales y conductuales de la enfermedad. Una manera relativamente sencilla de lograr lo anterior es alterando la expresión de proteínas que se conozcan como parte de la etiología o insertando variantes génicas que aumenten la vulnerabilidad a la enfermedad [28]. A la fecha, sin embargo, la etiología del TOC es desconocida, por lo que esta validación es compleja de alcanzar.

Numerosos modelos animales de TOC han sido propuestos hasta la fecha, la mayoría basados en la observación de conductas repetitivas de tipo compulsivas. Existen algunos modelos en que estas conductas se presentan de manera espontánea y otros (casi la totalidad de los modelos) en que son generadas por inducción farmacológica, manipulación genética o más recientemente técnicas optogenéticas.

Un modelo animal que espontáneamente presenta conductas repetitivas o estereotipadas en su ambiente natural es el ratón ciervo (*Peromyscus maniculatus*). Este modelo fue descrito en 1999 por Powell et al., quienes demostraron que estos animales basalmente mostraban comportamientos repetitivos de correr, saltar y voltear [30]. Si bien la relación de estas conductas repetitivas y TOC no está del todo clara, estudios posteriores mostraron que un aumento en la concentración de

glutamato en estriado había precedido las conductas repetitivas. Lo anterior daría soporte a la hipótesis de que los síntomas de TOC son causados por disfunciones del sistema glutamatérgico [31].

Por otro lado, existen numerosos reportes que señalan que en pacientes con TOC se encuentran alterados los sistemas serotoninérgicos y dopaminérgicos, por lo que no es de extrañar que la generación de modelos animales de TOC mediante inducción farmacológica se haya centrado en estos sistemas. Una de las primeras drogas en la que se estudió su relación con TOC fue *8-hidroxi-2-(di-n-propilamino) tetralina* (8-OH-DPAT), un agonista de los receptores de serotonina 5-HT_{1A}. La administración aguda de 8-OH-DPAT en ratas resultó en conductas perseverantes [32], las cuales fueron revertidas mediante la administración crónica de fluoxetina [33]. Algo parecido se observó en otro modelo, en que el tratamiento con RU24969, agonista del receptor de serotonina 5-HT_{1B}, generó conductas repetitivas en ratones, las cuales también se revertieron luego del tratamiento crónico con fluoxetina [34]. Otro modelo animal de TOC se basó en la administración crónica de quinpirol, un agonista de los receptores de dopamina D₂/D₃. Ratas tratadas por 5 o más semanas con quinpirol desarrollaron conductas compulsivas [35], las cuales fueron parcialmente atenuadas por clomipramida, un antidepresivo tricíclico utilizado como tratamiento de primera línea en TOC [36].

La contribución de factores genéticos en la etiopatología de TOC ha sido corroborada por numerosos estudios, sin embargo, los modelos genéticos de TOC más estudiados hasta la fecha han surgido fortuitamente [1]. Uno de ellos es el ratón KO para SAPAP3. Como se mencionó anteriormente, SAPAP3 es una proteína altamente expresada en estriado, que forma parte de un complejo proteico de andamiaje que regula el tráfico y destinación de receptores y moléculas de señalización en las membranas postsinápticas excitatorias. Ratones KO para SAPAP3, desarrollaron a partir de los 4 a 6 meses de edad lesiones en cabeza, cuello y hocico, las cuales se observaron en el 100% de los ratones KO, no así en los heterocigotos ni *wild type* (WT) [14]. Se corroboró que estas lesiones fueron causadas por un aumento de las conductas de auto acicalamiento, fenotipo que se asemeja a las conductas compulsivas presentadas en humanos, y no por defectos cutáneos periféricos. Junto con el desarrollo de conductas de tipo compulsivas, los ratones SAPAP3 KO mostraron mayores niveles de ansiedad. Ambos tipos de conductas fueron revertidos por la administración subcrónica de fluoxetina, así como por el rescate de SAPAP3 mediante la inyección de vectores lentivirales que expresaban proteína fluorescente verde (GFP por sus siglas en inglés) fusionada con SAPAP3. Por otro lado, en los ratones SAPAP3 KO se observaron

alteraciones en la transmisión glutamatérgica corticoestriatal. Por una parte, se observó una disminución de los potenciales de acción postsinápticos mediados por receptores de AMPA, mientras que por otra los potenciales de acción dependientes de receptores de NMDA se encontraron elevados, así como también los niveles de estos últimos receptores en la densidad postsináptica [14]. Si bien, este modelo presenta conductas asociadas a TOC (validación de apariencia) y responde a los mismos fármacos utilizados en el tratamiento de TOC (validación predictiva), no existen datos concretos de asociación genética entre Sapap3 y esta patología. En un estudio de Zuchner et al., se identificaron algunas variantes codificantes (cambio aminoacídico) en el gen ortólogo de Sapap3, *DLGAP3*, en pacientes con TOC y tricotilomanía (desorden del espectro obsesivo compulsivo); sin embargo estas no fueron significativamente asociadas en un estudio de asociación casos-control, por lo que el grado en que estas variaciones contribuirían en la etiopatología de TOC son aún poco claros [37].

Otro modelo animal de TOC encontrado de manera fortuita, es el ratón *Slitrk5* KO. *Slitrk5* es una proteína transmembrana que se expresa ampliamente en el sistema nervioso central, incluyendo corteza y estriado. Su ubicación es exclusivamente neuronal y la mayoría de los tipos neuronales expresan *Slitrk5* [15]. Si bien la función exacta de *Slitrk5* en el sistema nervioso central se encuentra bajo investigación, esta proteína está implicada en la sobrevivencia neuronal, crecimiento de los procesos neuronales y formación de sinapsis [38]. Hasta los 3 meses de edad, los ratones KO para *Slitrk5* no mostraron ninguna anomalía; sin embargo a partir de esa edad comenzaron a desarrollar conductas tipo compulsivas y ansiosas similares a las observadas en los ratones *SAPAP3* KO. La penetrancia de este fenotipo fue aumentando con la edad, y se presentó tanto en los animales KO como heterocigotos. Al igual que en el modelo anterior, la administración crónica de fluoxetina redujo el acicalamiento en los ratones KO a niveles similares al grupo control WT.

Por otro lado, los ratones *Slitrk5* KO presentaron mayor expresión de FosB, un gen de expresión rápida indicador de actividad neuronal, exclusivamente en corteza orbitofrontal, lo que concuerda con los hallazgos encontrados en humanos con TOC. Además, se observó en estos animales un menor volumen del estriado y una disminución significativa de la complejidad dendrítica de las neuronas espinales medianas de esta área. Adicionalmente, se midió la expresión de receptores de glutamato en estriado, encontrándose una disminución de la expresión de las subunidades del NR2A y NR2B (subunidades del receptor NMDA), además de GluR1 y GluR2 (subunidades de AMPA).

Estudios genéticos no han implicado directamente a *Slitrk5* con el desarrollo de conductas tipo obsesivas compulsivas. Otro miembro de la familia de genes *SLITRK*, particularmente *SLITRK1*, ha sido vinculado con el síndrome de Tourette, desorden que presenta manifestaciones clínicas tipo obsesivas compulsivas. Sin embargo, esta asociación no ha logrado ser consistentemente replicada [15].

Los resultados obtenidos de los modelos *SAPAP3* KO y *Slitrk5* KO, sugieren que la disrupción de estas proteínas, ambas parte de la densidad postsináptica, alteran el tráfico e inserción normal de receptores de glutamato en las sinapsis del estriado y por lo tanto afectan la comunicación cortico estriatal.

Los primeros modelos animales con alteración en la expresión de EAAT3 fueron reportados hace 20 años. En 1997 Peghini et al. generaron mediante recombinación homóloga en células madres embrionarias, ratones KO para EAAT3 (*Slc1a1^{-/-}*) en los que se evaluaron aspectos de la funcionalidad del transportador en riñón y sistema nervioso central (SNC). Los ratones homocigotos para la disrupción de este transportador fueron viables y no se observó en ellos alteraciones en el desarrollo ni en la fertilidad. Lo que si se observó, fue aminoaciduria y disminución de casi un 50% de la actividad locomotora comparado con controles WT. Se descartó que esto último fuera causado por alteraciones neurológicas como paresia o ataxia. Además, los ratones se sometieron a pruebas para evaluar coordinación motora, aprendizaje y memoria, no observándose diferencias entre los grupos KO y WT, lo que sugirió que la falta de funcionalidad de EAAT3 no tiene efectos cognitivos ni de coordinación. Este grupo también evaluó muerte celular en cortes de cerebro, donde no se evidenciaron signos de neurodegeneración, por lo sugirieron que la falta de EAAT3 por sí sola, no sería suficiente para generar cambios de este tipo [29]. Este último resultado concuerda con los publicados un año antes por Rothstein, los cuales mostraron que la pérdida de EAAT3 no produce degeneración neuronal [39].

Pese a que los resultados de Peghini et al., indicaron que no existían alteraciones de aprendizaje y memoria en los ratones KO para EAAT3, estudios realizados casi dos décadas más tarde con ratones descendientes de la línea original creada en 1997, encontraron en estos animales deficiencias de aprendizaje y memoria [40].

Ratones descendientes del modelo KO para EAAT3 de Peghini et al., también han sido utilizados para estudiar el rol del transportador en la recaptura de cisteína, la cual como se mencionó anteriormente, es el sustrato limitante de la síntesis de glutatión. Los ratones EAAT3 KO mostraron niveles disminuidos de glutatión neuronal, específicamente en neuronas hipocámpales, además de aumento de la concentración de especies oxidantes y mayor susceptibilidad a daño oxidativo. Estos cambios fueron

revertidos al tratar a los animales con un precursor de cisteína (N-acetilcisteína). Por otro lado, en ratones de 11 meses se observó menor grosor de la corteza cerebral y mayor tamaño de los ventrículos junto con aumento de la agresividad y disminución de la conducta de acicalamiento. Estos resultados sugirieron el rol preponderante que tiene EAAT3 en la recaptura neuronal de cisteína y por consiguiente en el metabolismo de glutatión [41].

Antecedentes sobre alteraciones conductuales relacionadas con TOC en ratones EAAT3 KO han sido escasos. Recientemente, se publicó un estudio donde se evaluó conductas basales de tipo ansioso y tipo compulsivas en un nuevo modelo KO para EAAT3, además de la respuesta a la inducción de conductas tipo compulsivas (auto-acicalamiento) mediante la administración de anfetamina y un antagonista del receptor de dopamina D1 (SKF-38393). Este estudio mostró que, comparados a controles WT, los ratones EAAT3 KO no presentan cambios basales en conductas asociadas a TOC, pero sí una disminución de la respuesta en locomoción y compulsividad inducida por anfetamina [42].

En un estudio recientemente publicado por nuestro laboratorio, se evaluó el impacto de la reducción en la expresión de EAAT3 *in vivo*. Para esto, se utilizaron ratones machos EAAT3 KO heterocigotos y WT provenientes de las mismas camadas, los cuales fueron sometidos a una batería de paradigmas conductuales de ansiedad, compulsividad y actividad locomotora. Además se midieron los niveles de glutamato, GABA, dopamina y serotonina en corteza, estriado y tálamo. Comparado con el grupo control, los ratones EAAT3 KO heterocigotos no mostraron conductas asociadas a TOC, ni cambios en la actividad locomotora. Tampoco se observaron diferencias en la concentración de neurotransmisores. Estos resultados sugieren que menores niveles de expresión de EAAT3 no tienen impacto sobre el contenido de neurotransmisores en el circuito corticoestriatal ni en la generación de conductas tipo obsesivas compulsivas [43].

Pese a que los hallazgos genéticos que han logrado mayor replicación involucran al gen *SLC1A1* en TOC, los modelos animales generados hasta la fecha, basados en la pérdida o reducción de la expresión de EAAT3, no han mostrado cambios conductuales evidentes asociados a la enfermedad [44]. Lo anterior no es de extrañar, debido a que la mayoría de la evidencia genética sugiere una asociación de TOC con aumento en la expresión de *SLC1A1*/EAAT3 [45].

Por otro lado, los modelos animales disponibles actualmente corresponden a ratones EAAT3 KO generados mediante tecnología KO convencional. Esta tecnología tiene un uso limitado para el estudio de genes *in vivo*. En animales adultos son comunes cambios compensatorios [46], que en muchos casos no pueden modelar variaciones

sutiles en la expresión génica que están implicadas en enfermedades complejas, como es el caso de TOC [47].

Actualmente es posible sortear estos inconvenientes mediante el uso de nuevas tecnologías que han surgido con el propósito de definir con mayor precisión los circuitos y tipos neuronales involucrados en TOC. Tal es el caso del sistema Cre/loxP, que permite la expresión condicional de genes, ya sea en tejidos específicos o en momentos determinados.

Sistema Cre/loxP

La manipulación específica de ciertos genes se ha hecho posible gracias a la expresión condicional en modelos animales. Esta técnica ha resultado ser una buena estrategia que permite inactivar o aumentar la expresión de genes de interés en determinados tejidos, tipos celulares o en etapas específicas del desarrollo.

La inactivación se logra mediante la expresión de sitios específicos de DNA recombinasa (Cre) derivadas de un bacteriófago P-1, junto con la introducción de dos secuencias específicas que son el blanco de reconocimiento de esta recombinasa. Los sitios de reconocimiento se denominan sitios *loxP*, los cuales están compuestos por dos secuencias repetidas idénticas de 13 pares de bases (pb) cada una, separadas por una región de 8 pb. Estos sitios son introducidos dentro del genoma mediante recombinación homóloga, quedando insertos a ambos lados de uno o más exones del gen que se quiere inactivar.

Para generar animales con expresión condicional, son necesarias dos líneas de ratones. La primera debe llevar los segmentos *loxP* flanqueando los segmentos del gen de interés y la segunda que exprese las recombinasas Cre (línea *driver*), ya sea constitutivamente o inducidos bajo el control de promotores para tipos celulares o tejidos específicos. Los animales provenientes de la cruce de ambas líneas, portaran el sitio de expresión de la Cre recombinasa y los sitios *loxP*, lo que resulta en la eliminación por parte de la Cre del segmento flanqueado por estos últimos [46].

Cuando se utiliza esta técnica para aumentar la expresión condicional de un gen, una alternativa es incorporar dentro del genoma un constructo que contenga un promotor fuerte, una secuencia de parada flanqueada por sitios *loxP* y ADN exógeno del gen que se quiere sobreexpresar. Al igual que en el caso anterior, se necesitan dos líneas de ratones. Una que contenga el constructo y otra que exprese la Cre recombinasa. Al cruzar ambas líneas la Cre recombinasa reconocerá los sitios *loxP* y se eliminará la secuencia de parada, dando paso a la transcripción del segmento adicional del gen de interés [53].

Medición de conductas relevantes al TOC en roedores

Para estudiar las conductas tipo TOC en modelos animales, se han desarrollado paradigmas conductuales específicos con el fin de evaluar factores como compulsividad, además de la evaluación de parámetros de ansiedad. Si bien en varios modelos desarrollados hasta la fecha se observan tales conductas, no es posible simular en roedores las obsesiones, ni tampoco los rituales mentales compulsivos que experimentan los individuos que padecen de TOC.

Muchos de los paradigmas conductuales para medir ansiedad en roedores tienen una base etológica. Estas pruebas se basan en el conflicto generado entre la tendencia innata de los roedores a explorar nuevos espacios y la de evadir espacios abiertos o iluminados, áreas en que los animales se sienten más vulnerables. Dentro de las pruebas de ansiedad, las más utilizados son los test de campo abierto y laberinto elevado con forma de cruz o con forma de cero, en los cuales los patrones de exploración son evaluados mediante la cuantificación del tiempo que los animales pasan en las áreas ansiogénicas o abiertas *versus* el tiempo en las áreas protegidas. Los animales con fenotipo ansioso gastan más tiempo en las áreas protegidas o seguras comparado con los controles [48, 49 y 50].

Por otro lado, las conductas tipo compulsivas suelen ser evaluadas en los animales a través de comportamientos repetitivos. Uno de los ejemplos más claros es la evaluación de conductas de auto-acicalamiento, que es una conducta innata consistente en movimientos estereotipados repetidos y que está implicada en la mantención de la higiene, termorregulación y comunicación social, entre otros.

Se ha visto que mutaciones genéticas afectan esta conducta en roedores. Tal es el caso de los ratones SAPAP3 KO y SLITRK5 KO mencionados anteriormente, que muestran un fenotipo compulsivo, evidenciado por un aumento de los eventos de auto-acicalamiento y del tiempo invertido en ello. Algunos de estos modelos pueden ser de utilidad para recrear síntomas relacionados con TOC, como por ejemplo el lavado compulsivo de manos [51]. Del mismo modo, se ha sugerido el enterrado de canicas en roedores como una conducta tipo compulsiva. Las conductas de enterrar y cavar forman parte del repertorio conductual normal de roedores silvestres y de laboratorio [52], siendo consideradas como actividades de tipo investigativa, las que bajo ciertas circunstancias pueden tornarse persistentes. El enterrado de canicas puede ser además considerado un modelo de acumulación (*Hoarding*, Síndrome de Diógenes), una conducta compulsiva encontrada en pacientes con TOC [27].

Ante la falta de evidencia clara sobre la presencia de fenotipos relevantes para el TOC en los modelos animales EAAT3 KO descritos hasta la fecha, sumada a la evidencia

genética que indica que variantes genéticas asociadas al TOC conllevan a un aumento en la expresión de SLC1A1/EAAT3, sustentan de manera muy interesante el estudiar el efecto de la sobreexpresión EAAT3, y poder elucidar su contribución en tipos específicos de neuronas, tales como excitatorias e inhibitorias.

HIPOTESIS

Un aumento en la expresión de EAAT3 en neuronas GABAérgicas y piramidales genera alteraciones conductuales asociadas a TOC.

OBJETIVOS

Objetivo general:

Evaluar el rol de EAAT3 en TOC, a través de la evaluación de alteraciones conductuales producidas por el aumento en la expresión de este transportador neuronal en dos subtipos neuronales específicos (GABAérgico y glutamatérgico) en modelos animales.

Objetivos específicos:

1. Obtener ratones con sobreexpresión condicional de EAAT3 en interneuronas GABAérgicas, mediante la cruce de una línea con sobreexpresión con una segunda línea *driver* (EAAT3^{glo} x GAD65-Cre). Verificar presencia de transgenes (EAAT3^{glo} y Cre) por genotipificación vía PCR convencional.
2. Evaluar posibles cambios conductuales en animales obtenidos de la cruce EAAT3^{glo} x GAD65-Cre (EAAT3^{glo}/GAD) a través de una batería de paradigmas conductuales relacionados con ansiedad y compulsividad.
3. Obtener ratones con sobreexpresión condicional de EAAT3 en neuronas piramidales/principales, mediante la cruce de una línea con sobreexpresión con una segunda línea *driver* (EAAT3^{glo} x CaMKII α -Cre). Verificar presencia de transgenes (EAAT3^{glo} y Cre) por genotipificación vía PCR convencional.
4. Evaluar posibles cambios conductuales en animales obtenidos de la cruce EAAT3^{glo} x CaMKII α -Cre (EAAT3^{glo}/CMKII) través de una batería de paradigmas conductuales relacionados con ansiedad y compulsividad.

MATERIALES Y METODOS

Animales

Se utilizaron ratones machos y hembras de las líneas EAAT3^{glo}/GAD y EAAT3^{glo}/CMKII transgénicos de entre 3 y 6 meses de edad, de un peso aproximado de 25 a 30 gramos. Todos los animales fueron provenientes y mantenidos en el bioterio del *Núcleo Milenio Biología de Enfermedades Neuropsiquiátricas* (NuMIND), ubicado en la Facultad de Ciencias de la Universidad de Valparaíso.

Los animales fueron alojados en una sala con temperatura (21 ± 2 °C) y humedad (40-70%) controlada, bajo ciclo de luz/oscuridad 12:12 horas (7AM: 7PM), con dieta estándar para la especie (LabDiet RMH 3000) y agua *ad libitum*.

Desde el nacimiento de los animales hasta el término de la batería de paradigmas conductuales, se evaluó el aspecto físico (estado del pelaje, condición corporal), actividad física y consumo de alimento y agua, no evidenciándose ningún síntoma que indicara alteraciones del desarrollo o enfermedad.

Todos los protocolos experimentales fueron aprobados por el Comité de Bioética y de Bioseguridad de la Universidad de Valparaíso, bajo el Proyecto Fondecyt Regular N° 114-1272 del Dr. Pablo R. Moya.

Generación de líneas de ratones con sobreexpresión de EAAT3 (EAAT3^{glo}), con expresión en subtipo neuronal específico (neuronas GABAérgicas y piramidales).

El tutor responsable de esta tesis, Dr. Pablo Moya, creó una línea de sobreexpresión condicional de EAAT3, utilizando el sistema Cre/LoxP.

La creación de la línea condicional para sobreexpresión, se realizó mediante el uso del vector pCLE-EAAT3 (Figura 1 panel A).

Este vector contiene un promotor fuerte de fusión CMV/ β actina, seguido por una secuencia de proteína fluorescente verde (EGFP por sus siglas en inglés), la que actúa como secuencia de parada. Ésta última se encuentra flanqueada por regiones *loxP* y es seguida "río abajo" por un constructo que contiene el ADN complementario de *Eaat3* de ratón.

Este vector fue caracterizado extensivamente *in vitro* (Figura 1 panel B y C), y luego usado para generar el ratón EAAT3^{glo} (Figura 1 panel D)

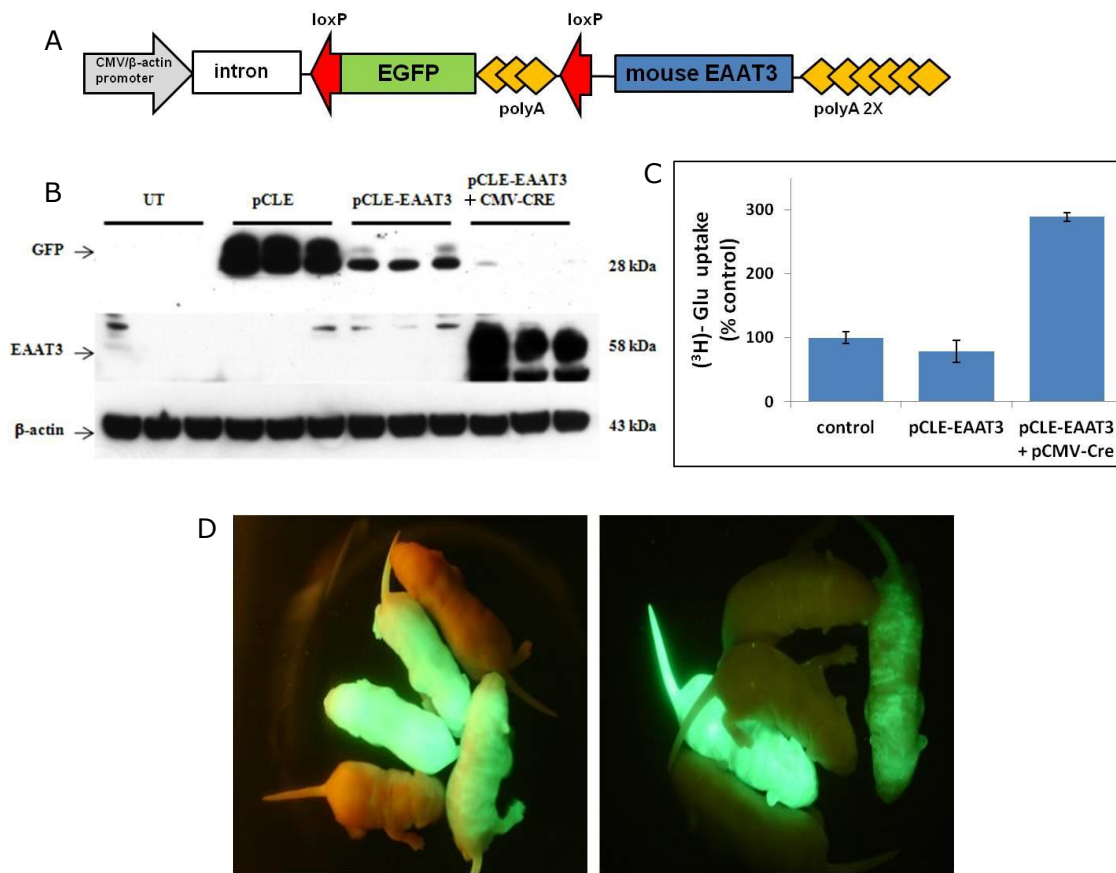


Figura 1. Caracterización del vector pCLE-EAAT3. A) Esquema del constructo pCLE-EAAT3. B) Immunotransferencia representativa para la expresión de GFP, EAAT3 y β -actina a partir de células N2A transfectadas con pCLE, pCLE-EAAT3 y pCMV-Cre durante 24 horas. C) Recaptura de glutamato de células HEK293 transfectadas con el vector con y sin Cre. D) Visualización bajo luz UV de ratones EAAT3^{glo}.

Para la obtención de animales con sobreexpresión condicional en tipos neuronales específicos se realizaron cruces entre las líneas *driver Knockin* (GAD65-Cre, CaMKII-Cre) y la línea portadora del vector (EAAT3^{glo}).

Específicamente para la generación de ratones con sobreexpresión condicional de EAAT3 en interneuronas GABAérgicas, se utilizaron como reproductores animales de la línea GAD65-Cre. La línea GAD65-Cre coexpresa Cre recombinasa junto con la isoforma GAD65 de la ácido glutámico descarboxilasa, mediado por el promotor Gad2 y un sitio de unión interno de ribosoma o IRES por sus siglas en inglés [54]. Por otro lado, para la generación de ratones con sobreexpresión condicional de EAAT3 en neuronas piramidales/principales se usó la línea CaMKII-Cre, en la cual la expresión de la cre recombinasa es mediada por el promotor de la Ca²⁺/Calmodulina Proteína quinasa II.

En ambos casos, ante la presencia de Cre-recombinasa se elimina la secuencia de parada y se activa la sobreexpresión condicional de EAAT3 (Figura 2).

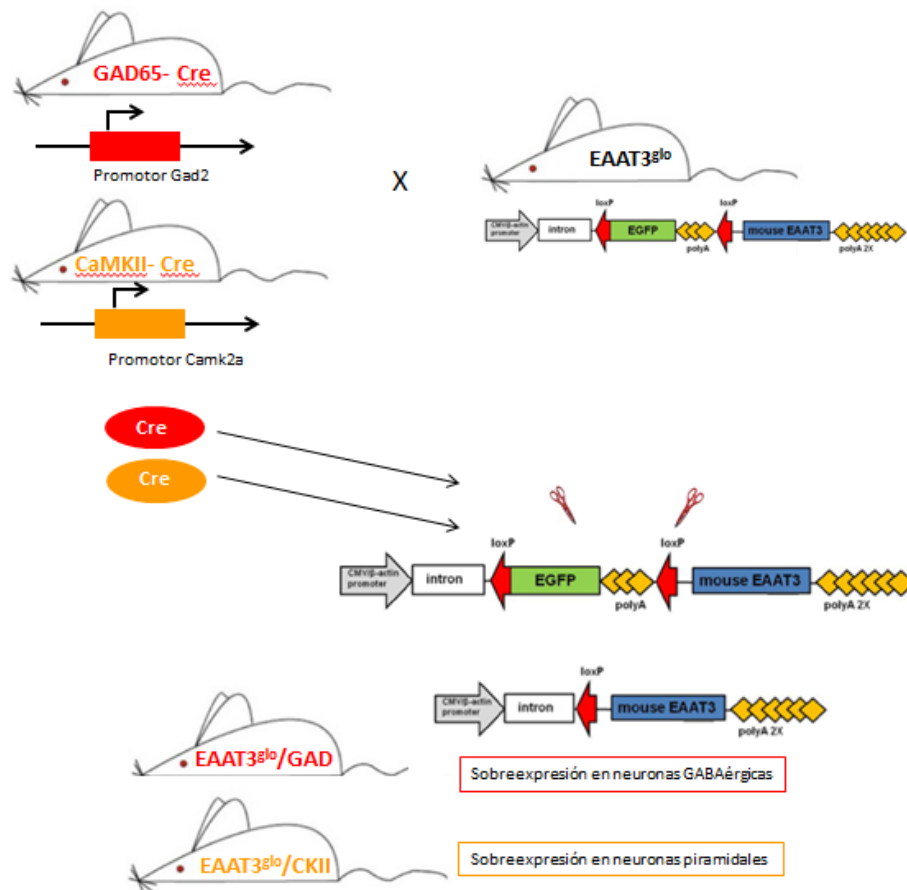


Figura 2. Esquema de cruza para obtener ratones con sobreexpresión condicional en subtipos neuronales específicos.

Grupos experimentales

Dos grupos experimentales fueron estudiados por cada línea de ratones. Los grupos de estudio estuvieron constituidos por los animales con sobreexpresión condicional, los que presentaron el transgén Cre (GAD65 Cre o CaMKII α -Cre) más el transgén de sobreexpresión (EAAT3^{glo}). Y los grupos controles, los que sólo presentaron el transgén EAAT3^{glo} (Figura 3).



Figura 3. Grupos experimentales en los cuales se evaluaron conductas tipo ansiosas y tipo compulsivas.

Cabe señalar que animales de la línea GAD65Cre y CaMKII α -Cre, provienen de líneas comerciales, las cuales no presentan anomalías físicas ni conductuales (<http://jaxmice.jax.org/strain/010802.html>, <https://www.jax.org/strain/005359>), por lo que la presencia de este transgen no afecta a los animales provenientes de las cruces de ambas líneas driver con la línea de sobreexpresión.

Genotipificación de ratones mediante la técnica de PCR convencional.

Extracción de ADN genómico

Se extrajo ADN genómico a partir de trozos de 0,5 cm de longitud de la cola de cada una de las camadas obtenidas de las cruces mencionadas. Las muestras de cola fueron depositadas en tubos Eppendorf de 1,5 ml y se suplementaron con 400 μ L de buffer de lisis (0,1M de buffer tris, 0,2 M de NaCl, 5 mM EDTA Y 0,4% SDS) y proteinasa K (Sigma Aldrich Inc., St. Louis, Missouri, EE.UU) 0,2 mg/mL. Luego se incubaron a 55°C por 2-3 horas o hasta la disgregación completa del tejido. El tejido disgregado se centrifugó a velocidad máxima (13000 rpm) por 3 minutos a temperatura ambiente y se recuperó el sobrenadante en un nuevo tubo. Al sobrenadante se le agregaron 500 μ L de isopropanol puro (Sigma Aldrich Inc., St. Louis, Missouri, EE.UU). Luego se

centrifugó nuevamente las muestras a velocidad máxima (13000 rpm) por 3 minutos a temperatura ambiente. El sobrenadante se descartó y sobre el pellet formado se agregó 1 mL de etanol al 70% (etanol de grado biología molecular, laboratorio Merck) y se agitó mediante un vórtex, volviendo a centrifugar a 13000 rpm por 3 minutos. A continuación se descartó el sobrenadante y se dejó secando el tubo Eppendorf con el pellet en su interior a temperatura ambiente por alrededor de 10 – 15 minutos. Una vez seco el pellet, se le agregó a cada tubo 100 µL de agua bidestilada estéril precalentada a 55°C y se incubaron los tubos a 37°C por unos 10 minutos o hasta que el pellet de ADN se resuspendiera completamente mientras se agitaba en el vórtex esporádicamente. Finalmente se cuantificó el ADN en un espectrofotómetro (nanodrop) obteniéndose la razón de purezas (razón de absorbancia 260 nm/280 nm y 260/230) que van desde 1,7 a 1,9 y de 2,0 a 2,2 respectivamente. Una vez obtenido el ADN genómico de cada animal, se realizó PCR convencional.

PCR convencional

Se utilizaron partidores específicos para la determinación del transgen EAAT3^{glo}, Cre bajo el promotor GAD-65 (GAD65-Cre) y Cre bajo el promotor CaMKIIa (CaMKIIa-Cre).

Partidores EAAT3^{glo}:

CagGFP, para identificar presencia o ausencia del transgen Eaat3

CAGpromF - 5' CTC TAG AGC CTC TGC TAA CC 3' -

EGFP150 Rev - 5' GGT GCA GAT GAA CTT CAG GG 3' -

MAOB, como control interno

MAOB-F - 5' CTA CAA AGC AGA TTG CCA CGC 3' -

MAOB-R- 5' TAC CTG ACA TCA ACT GGT CCC 3' -

Partidores CaMKIIa-Cre:

Cre2-For - 5' GCA TAC CTG GAA AAT GCT TCT GT 3' -

Cre2-Rev - 5' GGC CCA AAT GTT GCT GGA TAG TT 3' -

Partidores GAD65-Cre:

GAD2-For - 5' CTT CTT CCG CAT GGT CAT CT 3' -

GAD2-mutF - 5' AAA GCA ATA GCA TCA CAA ATT TCA 3' -

GAD2-R - 5' CAC CCC ACT GGT TTT GAT TT 3' -

En tubos de reacción individuales se cargaron 2µL de ADN + 8 µL del juego de partidores correspondiente para cada caso (en una concentración final de 0,4 µM) + 10 µL del master mix SapphireAmp.

Para la determinación de los genotipos de los ratones EAAT3^{glo}/CMKII, se utilizaron en una misma reacción ambos pares de partidores para EAAT3^{glo} más lo de CaMKIIα-Cre. Las condiciones de la reacción fueron: 95°C por 10:00 min, [94°C0:30, 62°C 0:30, 72°C0:30] x 30 ciclos, 72°C 10:00, 4°C. Para la genotipificación de los ratones EAAT3^{glo}/GAD se hicieron dos reacciones por separado, una utilizando los partidores para EAAT3^{glo} y otra con los partidores de GAD65-Cre. Las condiciones del PCR para GAD65-Cre fueron: 95°C por 10:00 min, [94°C0:30, 57°C 0:30, 72°C0:30] x 30 ciclos, 72°C 10:00, 4°C

Electroforesis en gel

Una vez terminados los PCR, se cargaron las muestras en un gel de agarosa al 2%. Los geles se prepararon con buffer TBE (Winkler, Ltda.) y agarosa de grado analítico (LAFKEN, Fermelo Biotec) (1 g de agarosa/50 ml de buffer). Por cada 50 ml de solución se agregó 2,5 ul de tinción fluorescente para ácidos nucleicos GelStar (Lonza Rockland, Inc). El gel se sumergió en una cámara electroforética (modelo B2, clase II, owl separation systems, Inc., USA) y se cargó cada muestra en un bolsillo determinado del gel. Una vez cargadas las muestras, se realizó la electroforesis a 120 V durante aproximadamente 1 hora. Por último, el gel fue extraído de la cámara electroforética para su visualización en un transiluminador (modelo ENDURO GDS, Labnet 20international, Inc, USA) a partir del cual se tomaron las fotos del gel para el posterior análisis de los genotipos.

En los ratones EAAT3^{glo} se observaron dos bandas, la primera de 346 pb correspondiente al amplicón generado por los partidores CAGpromF y EGFP150 Rev, y la segunda de 292 pb (control interno) producto de los partidores MAOB-F y MAOB-R. Para la determinación del genotipo de los ratones EAAT3^{glo}/GAD, se realizaron dos geles, uno con el producto de PCR de los partidores EAAT3^{glo} y otro con el de GAD65-Cre. En los ratones con sobreexpresión condicional en neuronas GABAérgicas (EAAT3^{glo}/GAD) se observaron tres bandas, dos producto de la reacción de EAAT3^{glo} y la tercera correspondiente a la banda de GAD65-Cre de aproximadamente 400 pb (Figura 4).

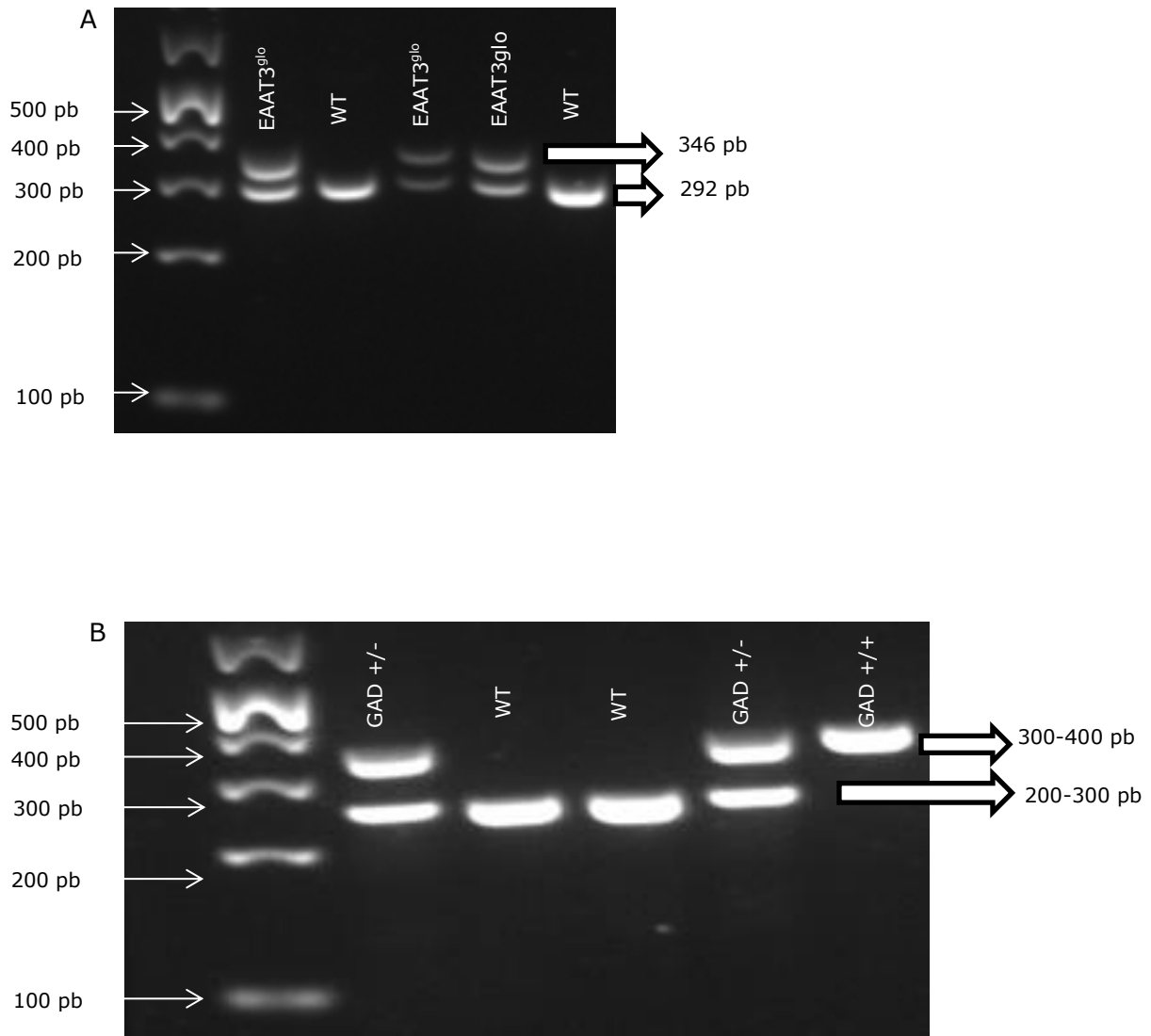


Figura 4. Electroforesis en gel de agarosa al 2% con fragmentos de ADN genómico amplificados mediante PCR convencional. A) Gel con los productos obtenidos a partir de los partidores CagGFP y MAOB. B) Gel con los productos obtenidos a partir de los partidores GAD65.

Los ratones con sobreexpresión condicional en neuronas piramidales (EAAT3^{glo}/CMKII) presentaron tres bandas, las dos producto de PCR de los partidores EAAT3^{glo}, más una tercera correspondiente a la banda de CaMKII α -Cre de 164 pb, generada por los partidores Cre2-For y Cre2-Rev (Figura 5).

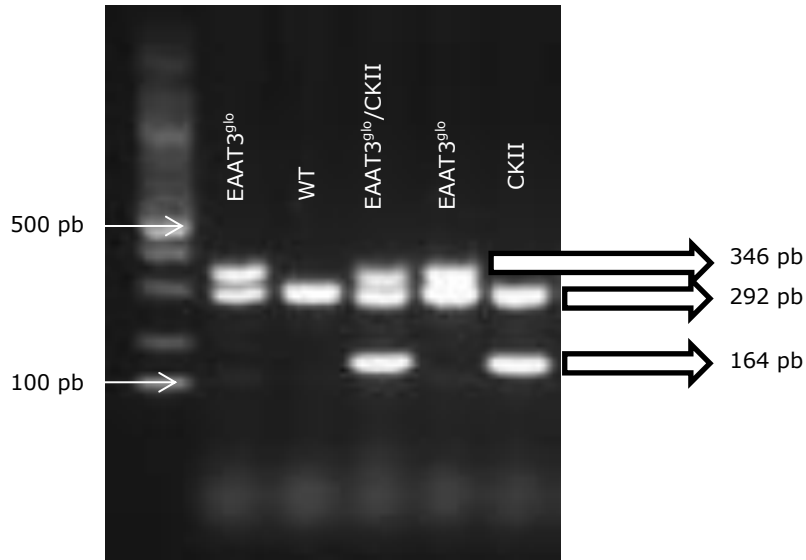


Figura 5. Electroforesis en gel de agarosa al 2% con fragmentos de ADN genómico amplificados a partir de los partidores EAAT3^{glo} y CaMKII α -Cre mediante PCR convencional.

Estudios Conductuales

Todos los experimentos conductuales fueron llevados a cabo en una sala de conducta acondicionada para tal efecto, con temperatura (21 ± 2 °C) y humedad (40-70%) controlada, amortiguación de sonido e iluminación regulada (luz roja ambiental). Las pruebas conductuales fueron realizadas durante la fase clara, entre las 9:00 AM y 6:00 PM. Luego de cada experimento conductual, todos los objetos que estuvieron en contacto con los animales fueron limpiados con etanol al 5% y secados con toalla de papel.

Machos y hembras fueron testeados en diferentes momentos. Un mismo individuo fue sometido a más de una prueba, dejando pasar al menos un día entre una prueba y otra.

Se sugiere que los factores que influyen las conductas tipo ansiosas son la aislamiento social que resulta de la separación física del animal cuando es removido de la caja en la que es mantenido y el estrés generado por el ambiente novedoso [50].

Prueba de exploración de campo abierto

Esta prueba permite evaluar simultáneamente actividad locomotora y conductas tipo ansiosas.

Los ratones fueron trasladados en sus cajas de mantención hacia la sala de conducta. Allí se mantuvieron por al menos 30 minutos (periodo de aclimatación) con luz ambiental roja, antes de ser sometidos a esta prueba.

La prueba se realizó en una caja de plástico (polimetilmetacrilato) blanco, de 40 cm x 40 cm y con paredes de 35 cm de altura. Se definió un área central y una periférica, mediante la división virtual de la arena en 8 cuadrantes iguales. Se consideraron los 4 centrales (20 cm x 20 cm) como el área central.

Luego del periodo de aclimatación, cada animal fue sacado de su caja y puesto individualmente en el área central de la arena, dejándolo explorar libremente durante 5 minutos. No se utilizó ningún estímulo aversivo adicional (por ejemplo exposición de los animales a luz brillante).

El tiempo y la frecuencia (veces en que cada animal visitó el área) en el área central y periferia fueron grabados y analizados mediante el sistema de seguimiento por video Noldus Ethovision (Noldus Information Technology, Leesburg, VA, USA).

Prueba de laberinto elevado en cruz

Los ratones fueron trasladados en sus cajas de mantención hacia la sala de conducta, donde permanecieron en sus cajas por al menos 30 minutos (periodo de aclimatación) con luz ambiental roja, antes de ser sometidos a esta prueba.

El laberinto elevado en cruz que se utilizó, fue una estructura de plástico (polimetilmetacrilato) blanco en forma de cruz, ubicada a 46 cm del suelo. Compuesto por dos brazos abiertos (30 cm x 5 cm), dos brazos cerrados (30 cm x 5 cm) y un área central (5cm x 5cm). Los brazos cerrados, se encontraban rodeados en todos sus bordes (excepto en que limitaba con el área central) por paredes de plástico transparente de 5 cm de altura.

Luego del periodo de aclimatación, cada animal fue sacado de su caja y puesto individualmente en el área central del laberinto mirando hacia uno de los brazos abiertos, dejándolo explorar libremente durante 5 minutos. No se utilizó ningún estímulo aversivo adicional (por ejemplo exposición de los animales a luz brillante).

Tiempo de permanencia y frecuencia en los brazos cerrados y abiertos fueron grabados y analizados por el sistema de seguimiento por video Noldus Ethovision (Noldus Information Technology, Leesburg, VA, USA).

Prueba de enterrado de bolitas

Los animales fueron llevados a la sala de conducta y colocados individualmente en cajas plásticas transparentes (18 x 32 x 14 cm). El piso de cada caja estaba cubierto con 5 cm de material de cama limpio (sustrato de ¼ pulgada fabricado a partir de coronta de choclo). En la superficie de este material se colocaron 15 bolitas de vidrio oscuras (1,5 cm de diámetro), las cuales fueron distribuidas en 3 filas de 5 canicas cada una.

Los ratones fueron trasladados desde sus cajas de mantención a las cajas con las canicas y permanecieron allí por 30 min. Cada caja se tapó para impedir posibles escapes.

Pasados los 30 minutos, los animales fueron devueltos a sus cajas de mantención y se procedió a contar el número de bolitas enterradas. Se consideraron como enterradas las bolitas que estaban al menos 2/3 cubiertas por material de cama [52].

No se utilizó ningún estímulo aversivo adicional (por ejemplo exposición de los animales a luz brillante).

Prueba de acicalamiento basal

Los ratones fueron trasladados en sus cajas de mantención hacia la sala de conducta, donde permanecieron en sus cajas por al menos 30 minutos (periodo de aclimatación) con luz ambiental roja, antes de ser sometidos a esta prueba.

La prueba se realizó en una caja de plástico (polimetilmetacrilato) transparente, de 40 cm x 40 cm y con paredes de 35 cm de altura.

Pasado el periodo de aclimatación, los animales fueron puestos individualmente en el centro de la caja, la cual se encontraba iluminada directamente por una luz blanca brillante (400-500 lux). Se dejó explorar libremente a cada ratón durante 5 minutos.

Se analizaron las conductas de acicalamiento (lamido de patas, cola y genitales, lavado de cabeza y hocico). Se midió frecuencia, duración y tiempo de latencia entre episodios. Cuando estos últimos fueron distanciados por más de 5 segundos, se consideraron como independientes.

Cada prueba fue grabada con una cámara digital (Genius® Webcam FaceCam 1000X HD) y analizada manualmente.

Durante cada prueba, los animales que permanecieron en sus cajas fueron ubicados fuera del alcance de la luz blanca brillante, para impedir que esta actuara como estímulo aversivo adicional.

Análisis estadístico

Los resultados fueron expresados como valor promedio \pm error estándar medio (SEM).

Los datos obtenidos de los grupos de estudio y control para los paradigmas conductuales fueron sometidos al test de *Shapiro-wilk* para determinar normalidad.

Los datos que cumplieron con este criterio fueron analizados mediante análisis de varianza de una vía (ANOVA) (comparaciones entre genotipos y género (4 grupos)) y test de *t de Student* (comparación entre genotipos (2 grupos)) no paramétrico no-pareado. Los que no cumplieron con el criterio de normalidad se analizaron mediante los test no paramétricos de Kruskal-Wallis (4 grupos) y *Mann-Whitney* (2 grupos).

Se estableció un valor de $P \leq 0,05$ como diferencia estadísticamente significativa. Todos los análisis estadísticos fueron realizados con el programa GraphPad Prism v6.0 (GraphPad Software, San Diego, CA).

RESULTADOS

Genotipificación de ratones con sobreexpresión condicional en neuronas GABAérgicas (EAAT3^{glo}/GAD)

La figura 6 corresponde a dos geles de agarosa al 2% en el que se observan las bandas correspondientes a los genotipos de ratones hijos de la cruce de la línea EAAT3^{glo} con la línea *driver* GAD65-Cre.

En el gel de más arriba se utilizaron los grupos de partidores CagGFP (para detectar el vector pCLE-EAAT3) y MAOB (control interno). En el gel de más abajo se observan los amplicones generados por los partidores GAD65-Cre, utilizados para la detección del segmento que codifica para la Cre recombinasa mediada por el promotor Gad2.

En el carril 1 de ambos geles se cargó el marcador de peso molecular (escalera de 100 pares de bases). En el primer gel, los ratones que heredaron el vector (ratones EAAT3^{glo}) mostraron dos bandas. La primera de 346 pb, corresponde al amplicón generado por los partidores CagGFP y la segunda corresponde al amplicón de MAOB de 292pb. Los ratones que no heredaron el vector (ratones WT) presentaron sólo la banda de 292 bp. En el segundo gel los ratones que heredaron el segmento de expresión para la Cre recombinasa (ratones GAD) muestran una banda entre 300 y 400 pb correspondiente a la Cre, o dos bandas (la segunda entre 200 y 300 pb) en el caso que sean heterocigotos (ratones GAD^{+/-}).

Los ratones con sobreexpresión condicional en neuronas GABAérgicas (EAAT3^{glo}/GAD) presentaron ambas bandas en el gel de más arriba y una o dos bandas en el gel de más abajo. Los animales control (EAAT3^{glo}), presentaron ambas bandas en el primer gel y no presentan la banda correspondiente a la Cre (entre 300 y 400 pb) en el segundo gel.

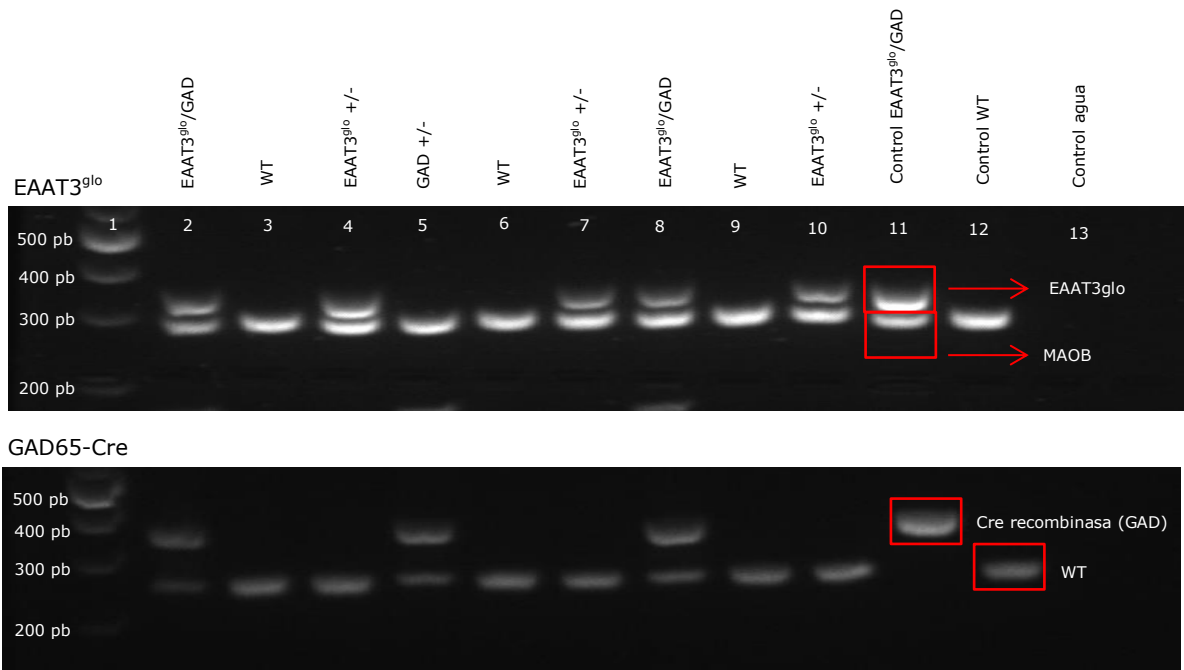


Figura 6: Geles de agarosa con los genotipos de los animales con sobreexpresión condicional en neuronas GABAérgicas y animales control. Carril 1: marcador de peso molecular. Carriles 2 y 8: ratones con sobreexpresión condicional en neuronas GABAérgicas (EAAT3^{glo}/GAD). Carriles 4, 7 y 10: ratones control (EAAT3^{glo}). Carril 5: ratón heterocigoto para la expresión de Cre recombinasa. Carriles 3, 6 y 9: ratones WT. Carriles 11 y 12: controles internos positivos. Carril 13: control negativo.

Genotipificación de ratones con sobreexpresión condicional en neuronas piramidales (EAAT3^{glo}/CKII)

La figura 7 corresponde a un gel de agarosa al 2% en el que se observan las bandas correspondientes al genotipo de ratones hijos de la cruce de la línea EAAT3^{glo} con la línea *driver* CaMKII α -Cre.

En el primer carril se cargó el marcador de peso molecular (escalera de 100 pares de bases). Desde el carril 2 al 8 se encuentran las bandas de los animales genotipificados. En el carril 9, 10 y 11 se observan los controles positivos provenientes de ratones EAAT3^{glo}, CaMKII α -Cre y WT. El último carril se cargó con agua como control negativo. Los ratones con sobreexpresión condicional (EAAT3^{glo}/CKII) fueron heterocigotos para ambos transgenes, por lo que se observaron tres bandas, una correspondiente al amplicón de los partidores que detectan la región GFP del vector pCLE-EAAT3 (346 pb), el segundo de MAOB (292 pb) y el tercero de la Cre recombinasa (164 pb). En los ratones que no presentan sobreexpresión condicional sólo se observan las bandas de 346 y 292 pb.

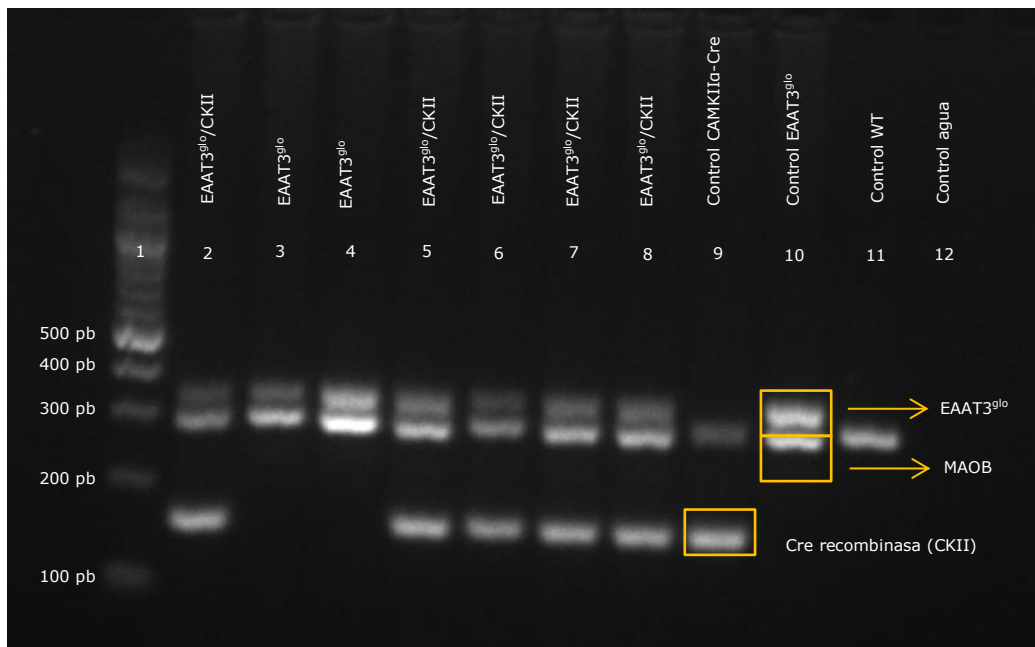


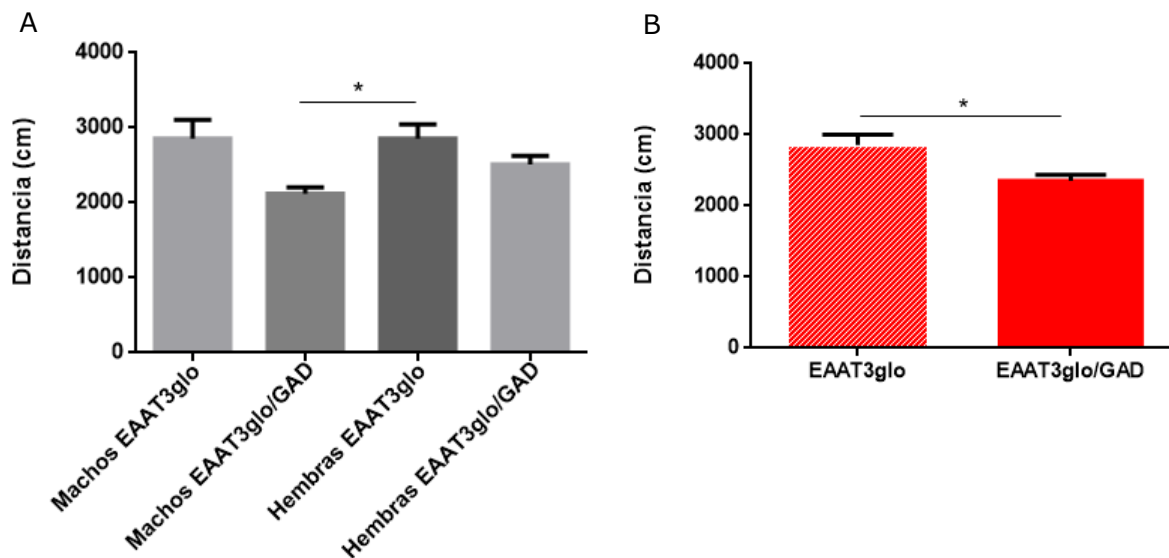
Figura 7: Gel de agarosa con los genotipos de los animales con sobreexpresión condicional en neuronas piramidales y animales control. Carril1: marcador de peso molecular. Carriles 2, 5, 6, 7 y 8: ratones con sobreexpresión condicional en neuronas piramidales (EAAT3^{glo}/CKII). Carriles 3 y 4: ratones control (EAAT3^{glo}). Carriles 9, 10, 11: controles internos positivos. Carril 12: control negativo.

Evaluación del fenotipo conductual tipo ansioso en ratones EAAT3^{glo}/GAD mediante la prueba de exploración de campo abierto

Mediante la prueba de exploración de campo abierto se evaluó actividad locomotora basal y conductas tipo ansiosas.

La actividad locomotora basal, expresada como distancia recorrida en centímetros, arrojó diferencias significativas entre hembras control y machos sobreexpresión. Las hembras control EAAT3^{glo} presentaron mayor actividad locomotora (2856±188,3 cm) comparado con los machos con sobreexpresión EAAT3^{glo}/GAD (2120±87,7 cm) (Figura 8 panel A).

Respecto al tiempo y frecuencia de exploración en el centro, no se observaron diferencias en el fenotipo conductual entre genotipos ni género. No hubo diferencias significativas en el tiempo que pasaron los animales en el área central de la arena, EAAT3^{glo} (27,4 ± 3 segundos) y EAAT3^{glo}/GAD (32,12 ± 2,5 segundos), ni tampoco en la frecuencia con la que los ratones visitaron esta área, EAAT3^{glo} (28,8 ± 2,4 veces) y EAAT3^{glo}/GAD (27,8 ± 1,8 segundos).



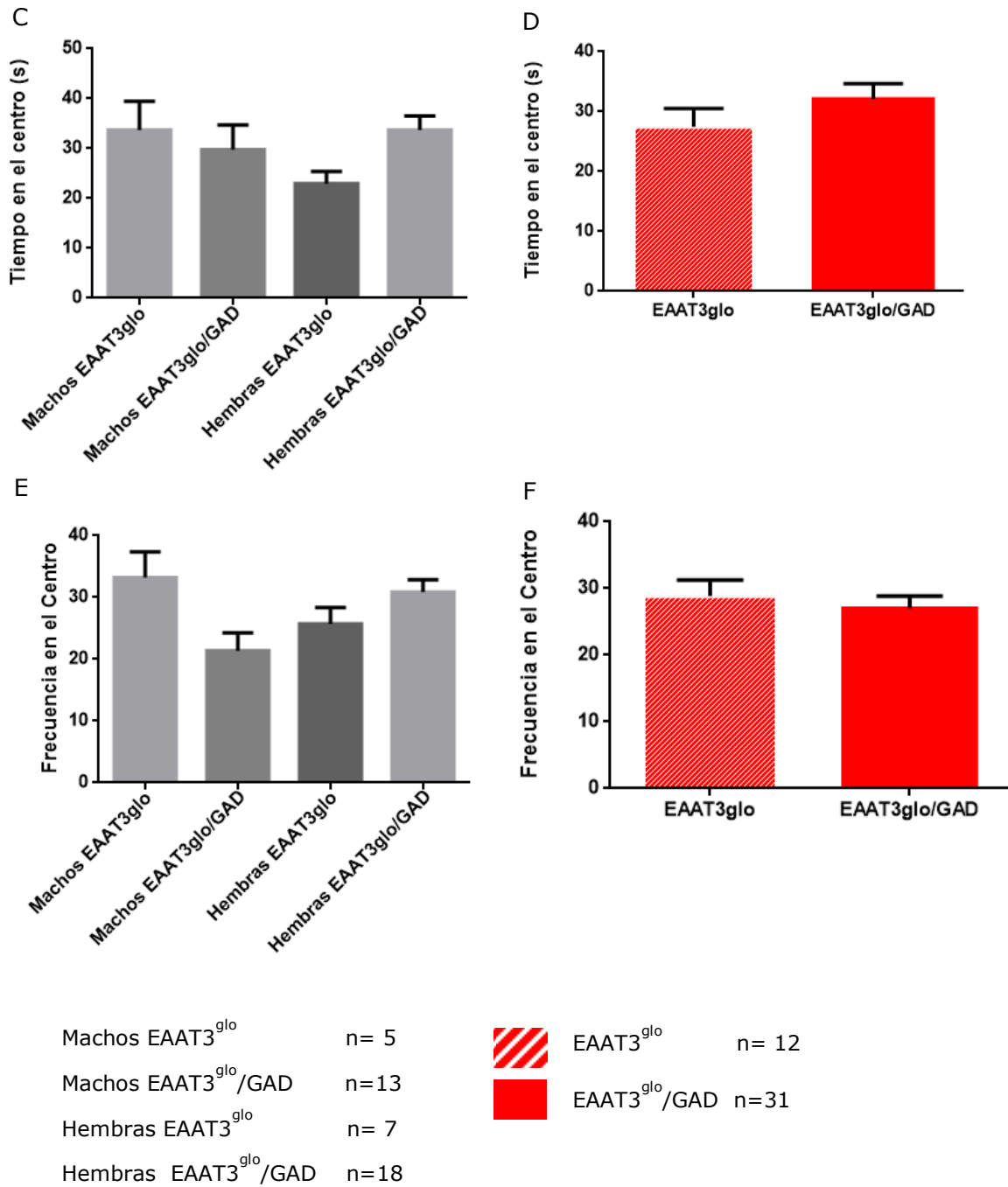


Figura 8: No se observan diferencias significativas en las conductas tipo ansiosas entre ratones con sobreexpresión condicional de EAAT3 en neuronas GABAérgicas y grupo control. A) Centímetros recorridos por machos con sobreexpresión y controles, y hembras con sobreexpresión y controles; B) Centímetros recorridos por grupo con sobreexpresión y controles; * $p_v \leq 0,05$. C) y D) Tiempo en el centro. E) y F) Número de entradas al área central. Datos expresados como promedio \pm SEM.

Evaluación del fenotipo conductual tipo ansioso en ratones EAAT3^{glo}/CKII mediante la prueba de exploración de campo abierto

Se evaluó actividad locomotora basal y conductas tipo ansiosas.

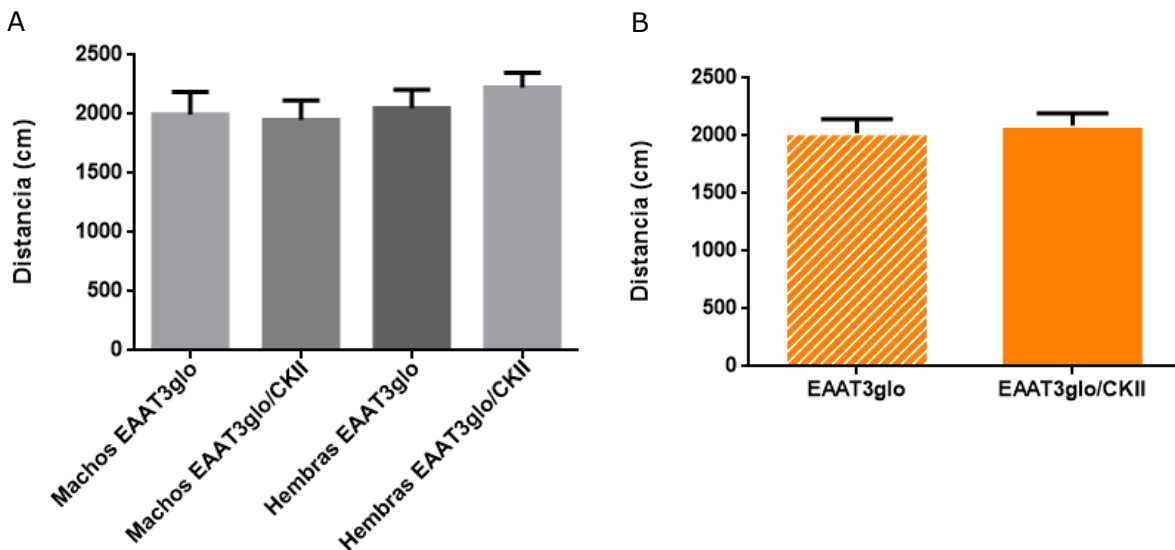
La actividad locomotora basal (Figura 9 paneles A y B), expresada como distancia recorrida en centímetros, no arrojó diferencias significativas entre genotipos, ni género ($p_v = 0,68$).

Los animales con sobreexpresión condicional en neuronas piramidales presentaron fenotipo ansioso.

Se observaron diferencias significativas en el fenotipo conductual entre genotipos y género (Figura 9 paneles C, D, E y F). El tiempo de permanencia en el área central fue mayor en machos control ($43,9 \pm 2,5$ segundos) y en hembras control ($43,5 \pm 2,2$ segundos) comparados con los machos con sobreexpresión ($22,1 \pm 3,8$ segundos).

Al agrupar los datos y comparar los ratones EAAT3^{glo} con los EAAT3^{glo}/CKII, se observó un aumento significativamente mayor en el grupo control comparado con el de sobreexpresión (EAAT3^{glo} $43,7 \pm 6,3$ segundos vs EAAT3^{glo}/CKII $24,8 \pm 11,8$ segundos).

Los ratones del grupo control visitaron significativamente más veces el área central de la arena (EAAT3^{glo} $28,1 \pm 1,9$ veces vs EAAT3^{glo}/CKII $19,3 \pm 1,8$ veces).



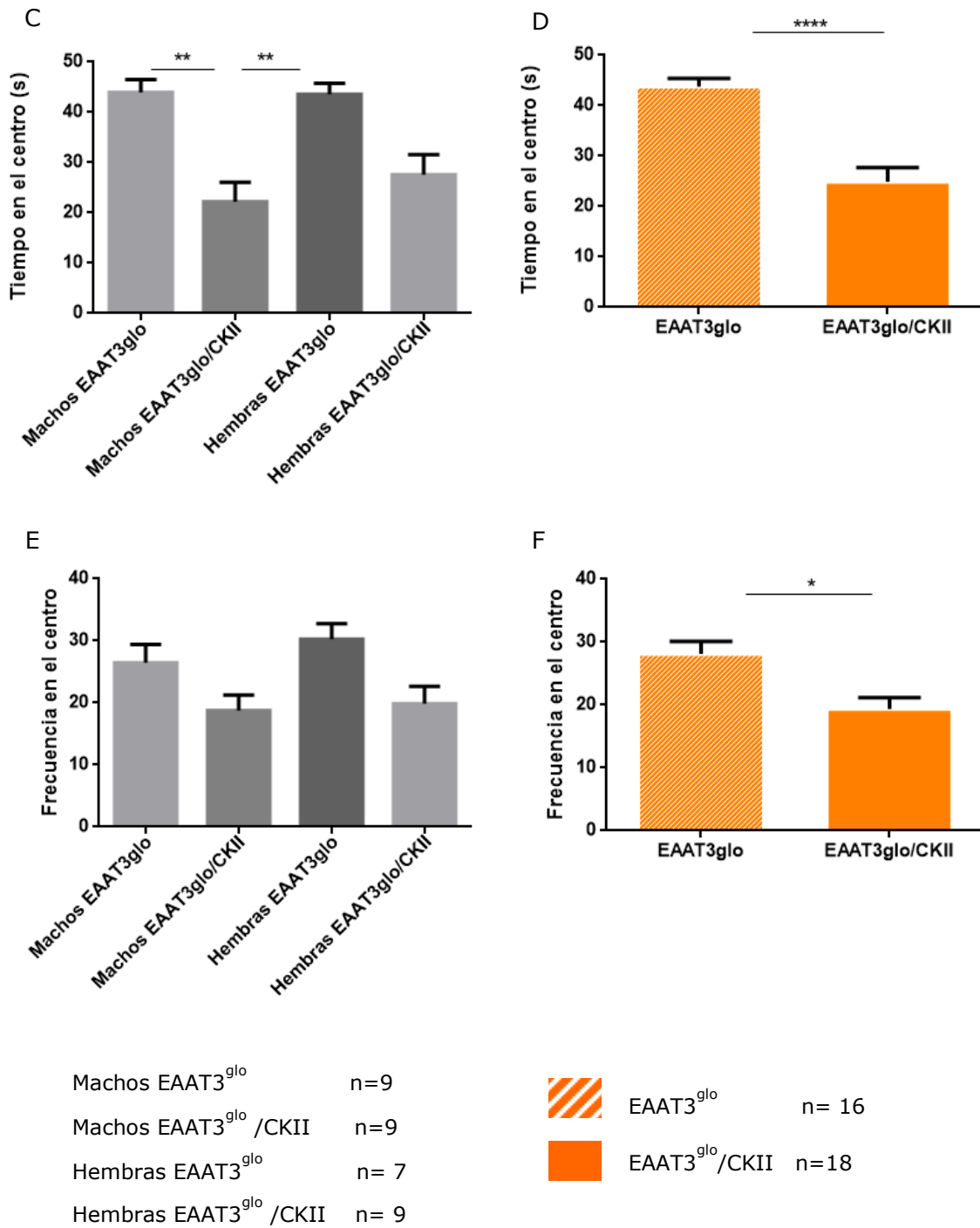
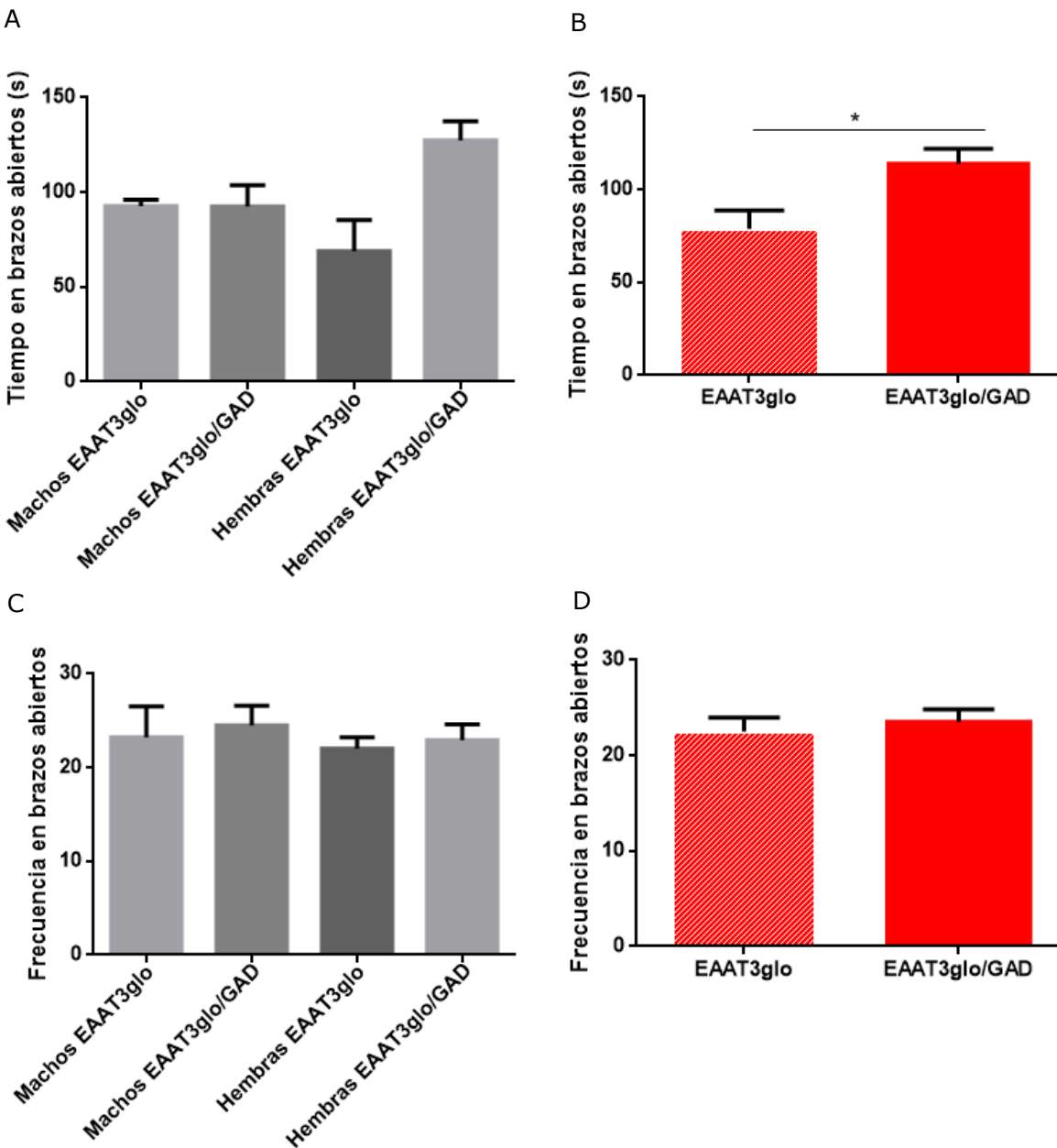


Figura 9: Diferencias significativas en las conductas de tipo ansioso entre ratones con sobreexpresión condicional de EAAT3 en neuronas piramidales y grupo control. A y B) Centímetros recorridos C) y D) Tiempo en el centro; * $p \leq 0,0001$. E) y F) Número de entradas al área central; * $p \leq 0,05$. Datos expresados como promedio \pm SEM.**

Evaluación del fenotipo conductual tipo ansioso en ratones EAAT3^{glo}/GAD mediante la prueba de laberinto elevado en cruz

Se observó diferencias significativas en el tiempo de permanencia en los brazos abiertos entre el grupo control y el con sobreexpresión (EAAT3^{glo} 78,7 ±10 segundos vs EAAT3^{glo}/GAD 113,8 ±8,1 segundos), dado principalmente por un aumento en el tiempo en los brazos abiertos de las hembras con sobreexpresión (127,3 ± 10,2 segundos). No hubo diferencias entre genotipos ni género en la frecuencia de visitas a los brazos abiertos (machos EAAT3^{glo} 23,2 ± 3,3; machos EAAT3^{glo}/GAD 24,5 ± 2,1; hembras EAAT3^{glo} 22 ±1,2; hembras EAAT3^{glo}/GAD 22,9 ± 1,6 veces).





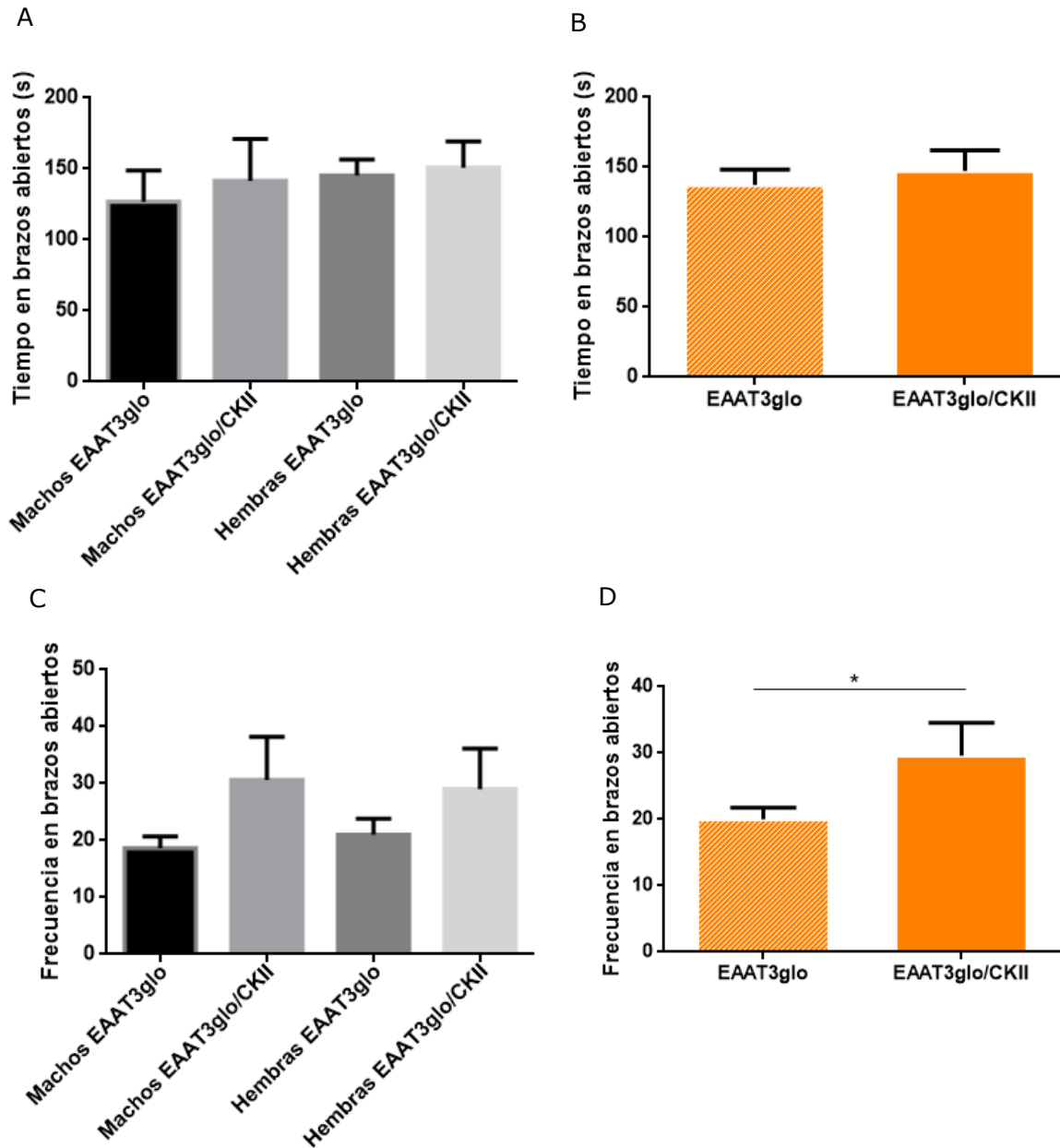
Machos EAAT3 ^{glo}	n= 5		EAAT3 ^{glo}	n= 12
Machos EAAT3 ^{glo} /GAD	n=12		EAAT3 ^{glo} /GAD	n= 31
Hembras EAAT3 ^{glo}	n= 7			
Hembras EAAT3 ^{glo} /GAD	n=19			

Figura 10: Diferencias significativas en las conductas de tipo ansioso entre ratones con sobreexpresión condicional de EAAT3 en neuronas GABAérgicas y grupo control. A y B) Tiempo en brazos abiertos * $p \leq 0,05$. C) y D) Frecuencia brazos abiertos. Datos expresados como promedio \pm SEM.

Evaluación del fenotipo conductual tipo ansioso en ratones EAAT3^{glo}/CKII mediante la prueba de laberinto elevado en cruz.

No se observaron diferencias significativas en el tiempo de permanencia en los brazos abiertos entre el grupo control y con sobreexpresión (EAAT3^{glo} 137,3 ± 10,9 segundos vs EAAT3^{glo}/CKII 147,3 ± 14,8 segundos).

Entre los grupos control y sobreexpresión hubo diferencias significativas en la frecuencia de visitas a los brazos abiertos (EAAT3^{glo} 20 ± 1,7 vs EAAT3^{glo}/CKII 29,1 ± 4,9 veces).





Machos EAAT3 ^{glo}	n=3		EAAT3 ^{glo}	n= 7
Machos EAAT3 ^{glo} /CKII	n=3		EAAT3 ^{glo} /CKII	n=8
Hembras EAAT3 ^{glo}	n= 4			
Hembras EAAT3 ^{glo} /CKII	n= 5			

Figura 11: Diferencias significativas en las conductas de tipo ansioso entre ratones con sobreexpresión condicional de EAAT3 en neuronas piramidales y grupo control. A y B) Tiempo en brazos abiertos. C) y D) Frecuencia brazos abiertos * $p_v \leq 0,05$. Datos expresados como promedio \pm SEM.

Evaluación del fenotipo conductual tipo compulsivo en ratones EAAT3^{glo}/GAD mediante la prueba de enterrado de bolitas

Se midió el porcentaje de bolitas enterradas luego de 30 minutos de exponer a los animales a estos objetos en un ambiente nuevo.

No se observaron diferencias significativas entre genotipos y ni género (Figura 11 panel A). Al agrupar los datos por genotipo, no se presentaron diferencias significativas entre los ratones control y con sobreexpresión (EAAT3^{glo} 61,1 ± 5 vs EAAT3^{glo}/GAD 59,1 ± 3,3 % de bolitas enterradas) (Figura 12 panel B).

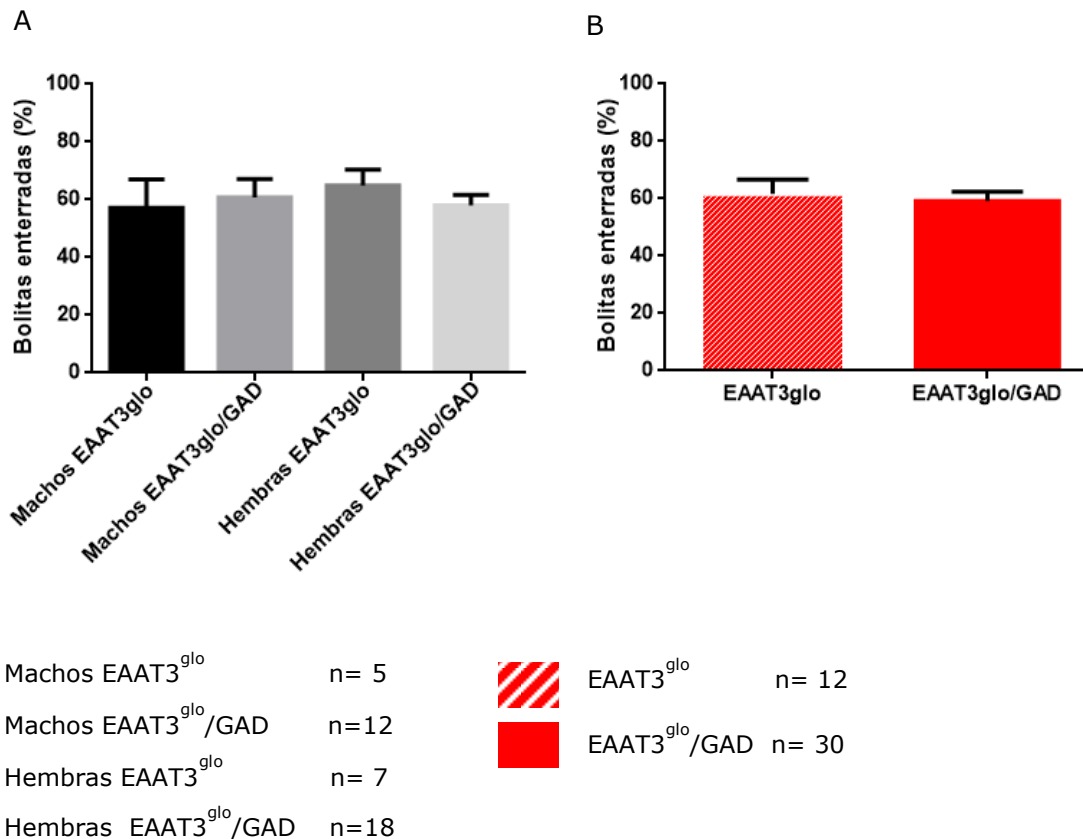


Figura 12: No se observan diferencias significativas en las conductas tipo compulsivas entre ratones con sobreexpresión condicional de EAAT3 en neuronas GABAérgicas y grupo control. A) Porcentaje de bolitas enterradas por machos con sobreexpresión y controles, y hembras con sobreexpresión y controles; B) Porcentaje de bolitas enterradas por grupo con sobreexpresión y control.

Evaluación del fenotipo conductual tipo compulsivo en ratones EAAT3^{glo}/CKII mediante la prueba de enterrado de bolitas

Machos y hembras con sobreexpresión condicional en neuronas piramidales enterraron mayor porcentaje de bolitas comparado con los grupos control (machos EAAT3^{glo} 46,5 ± 6,6 vs machos EAAT3^{glo}/CKII 81,7 ± 3,2; hembras EAAT3^{glo} 49,7 ± 11,2 vs hembras EAAT3^{glo}/CKII 63,4 ± 7,9 % de bolitas enterradas) (Figura 13 panel A). Al agrupar los datos por genotipo se mantiene la diferencia significativa entre genotipos (EAAT3^{glo} 48 ± 6,1 vs 73,7 ± 4,4 % de bolitas enterradas) (Figura 13 panel B).

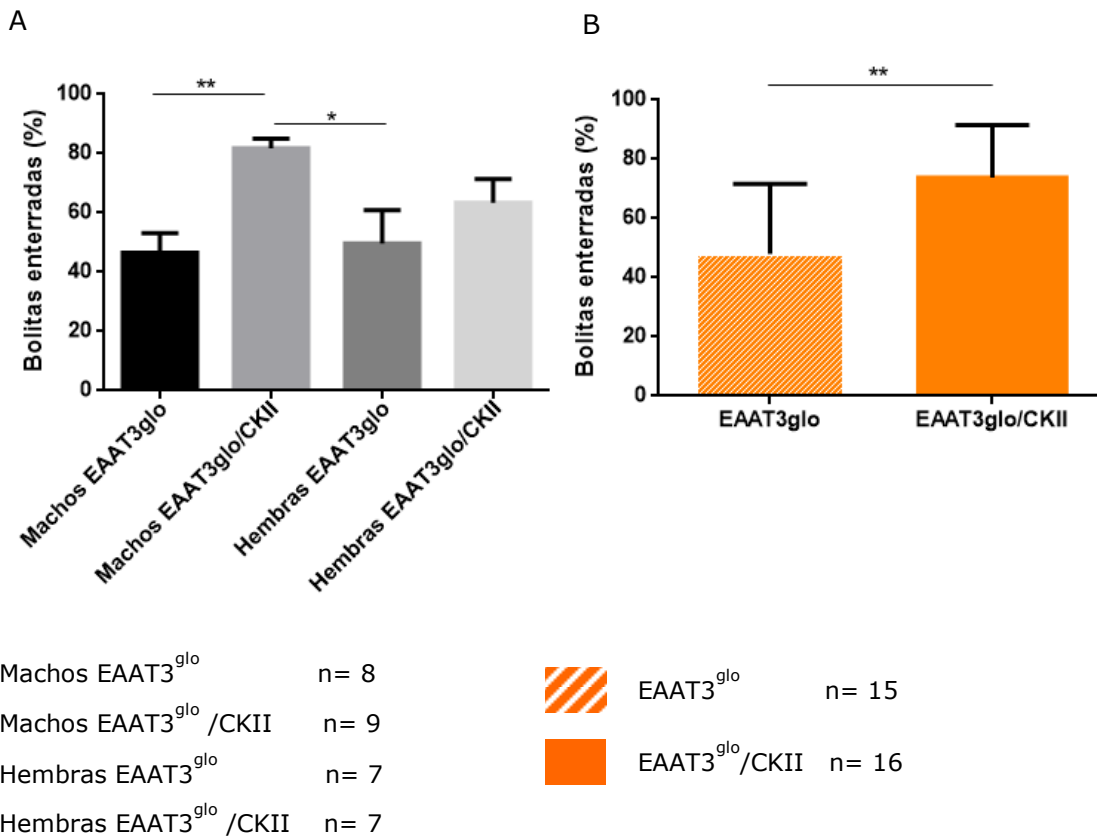


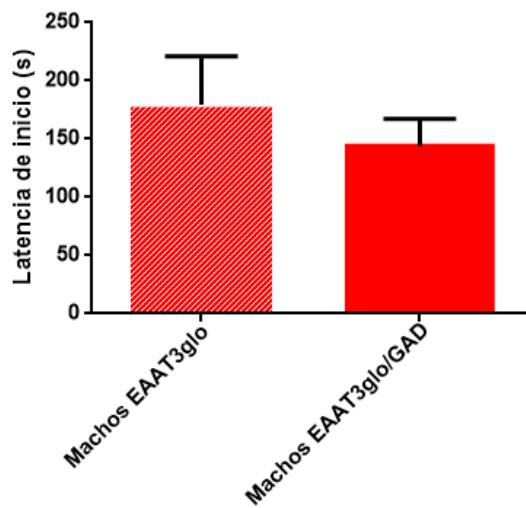
Figura 13: Ratones con sobreexpresión condicional de EAAT3 en neuronas piramidales presentan fenotipo compulsivo. A) Porcentaje de bolitas enterradas por machos con sobreexpresión y controles, y hembras con sobreexpresión y controles; * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,001$. B) Porcentaje de bolitas enterradas por grupo con sobreexpresión y control; ** $p \leq 0,001$.

Evaluación del fenotipo conductual tipo compulsivo en ratones machos EAAT3^{glo}/GAD mediante la prueba de acicalamiento basal

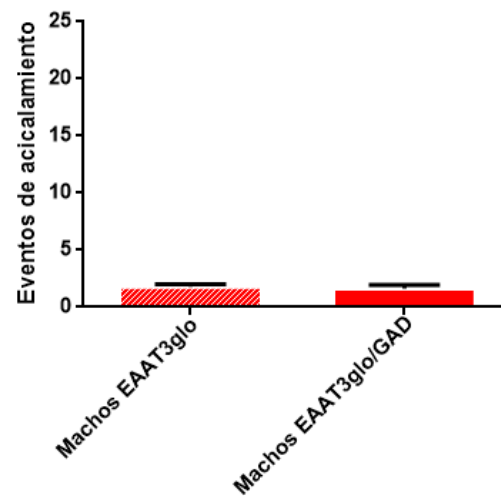
No se observaron diferencias significativas entre ratones machos control y con sobreexpresión en ninguna de las mediciones.

En la figura 14 panel A se observa una leve tendencia hacia la baja en el tiempo en que los ratones con sobreexpresión comienzan a acicalarse (EAAT3^{glo} 179,4 ± 41,7 vs EAAT3^{glo}/GAD 144,4 ± 23,1 segundos). Los eventos de acicalamiento fueron muy similares entre ambos genotipos (EAAT3^{glo} 1,8 ± 0,2 vs EAAT3^{glo}/GAD 1,6 ± 0,3) (Figura 14 panel B), sin embargo en los machos con sobreexpresión la duración de cada evento de acicalamiento fue mayor (EAAT3^{glo} 5,5 ± 1,5 vs EAAT3^{glo}/GAD 9,8 ± 2 segundos) (Figura 14 panel C).

A



B



C

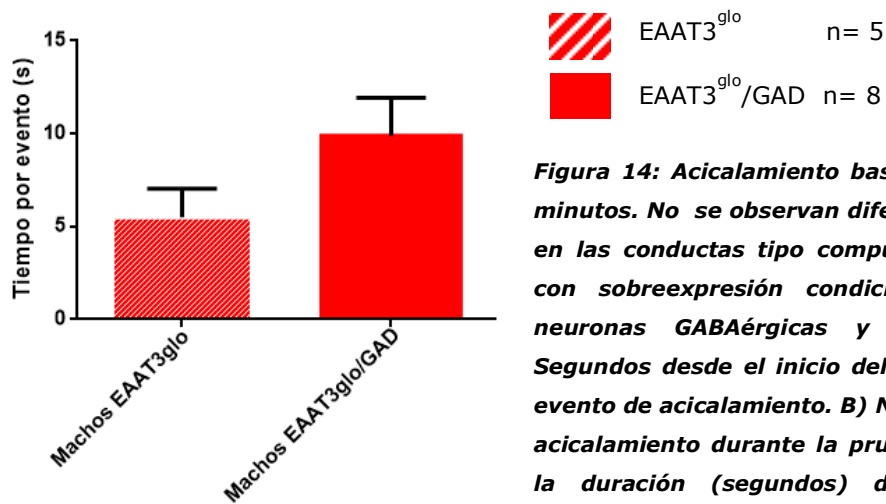


Figura 14: Acicalamiento basal medido durante 5 minutos. No se observan diferencias significativas en las conductas tipo compulsivas entre ratones con sobreexpresión condicional de EAAT3 en neuronas GABAérgicas y grupo control. A) Segundos desde el inicio del test hasta el primer evento de acicalamiento. B) Número de eventos de acicalamiento durante la prueba. C) Promedio de la duración (segundos) de cada evento de acicalamiento.

Evaluación del fenotipo conductual tipo compulsivo en ratones machos EAAT3^{glo}/CKII mediante la prueba de acicalamiento basal

No hubo diferencias significativas entre los machos control y sobreexpresión. El tiempo de inicio de los eventos de acicalamiento fue similar en ambos grupos (EAAT3^{glo} 189,6 ± 30,9 vs EAAT3^{glo}/CKII 165 ± 43,3 segundos). Si bien no se observaron diferencias significativas en el número de eventos de acicalamiento y la duración promedio de cada evento, si se observa una tendencia de conductas compulsivas en los machos con sobreexpresión. Los eventos de acicalamiento fueron mayores en el grupo con sobreexpresión (EAAT3^{glo} 1,6 ± 0,6 vs EAAT3^{glo}/CKII 12,7 ± 10,5) (Figura 15 panel B) y en los machos con sobreexpresión la duración de cada evento de acicalamiento también fue mayor (EAAT3^{glo} 5,5 ± 1,5 vs EAAT3^{glo}/GAD 9,8 ± 2 segundos) (Figura 15 panel C).

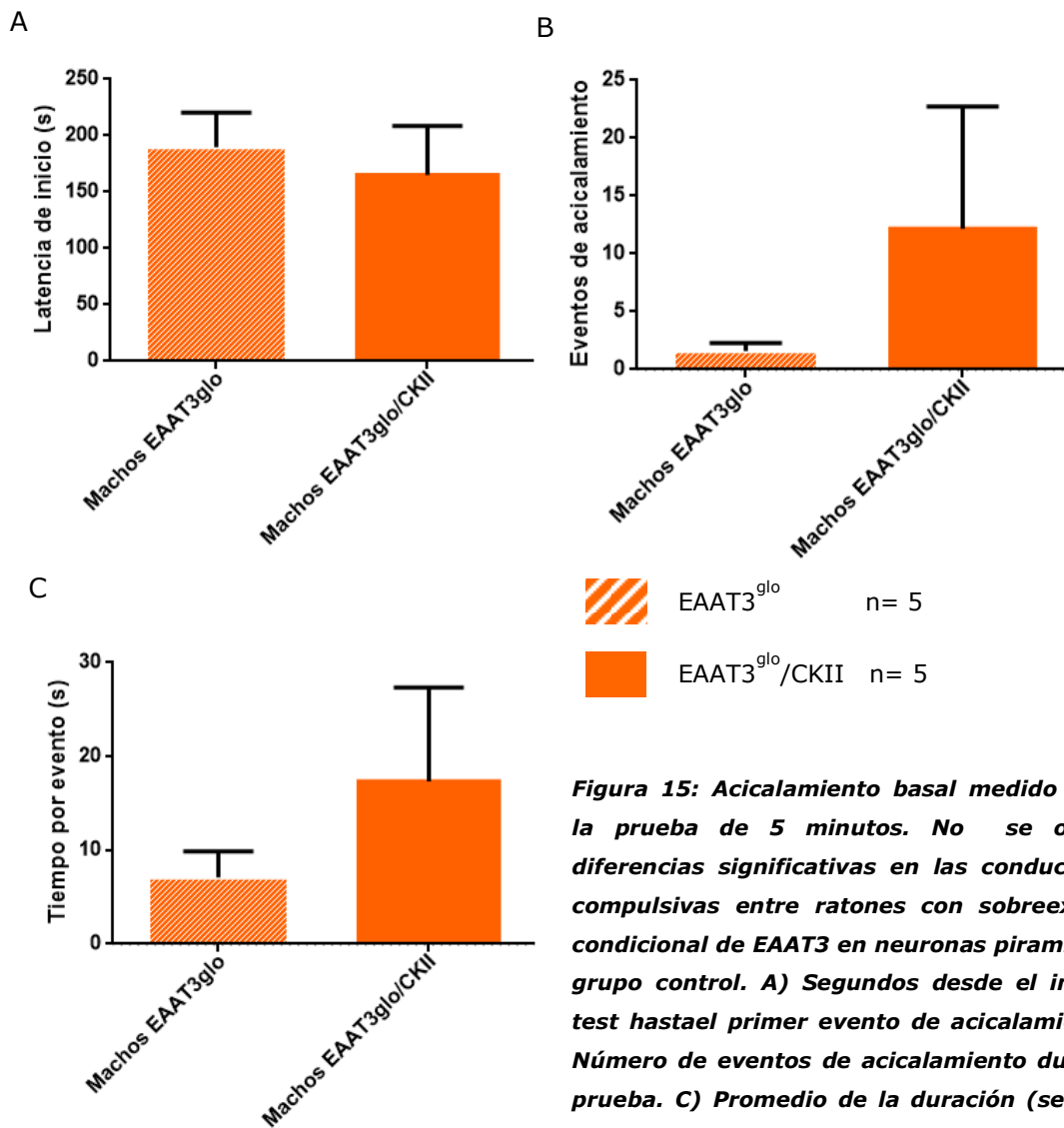


Figura 15: Acicalamiento basal medido durante la prueba de 5 minutos. No se observan diferencias significativas en las conductas tipo compulsivas entre ratones con sobreexpresión condicional de EAAT3 en neuronas piramidales y grupo control. A) Segundos desde el inicio del test hasta el primer evento de acicalamiento. B) Número de eventos de acicalamiento durante la prueba. C) Promedio de la duración (segundos) de cada evento de acicalamiento.

DISCUSION

Los factores y mecanismos específicos que contribuyen en la etiología del TOC aún no han sido bien establecidos. Sin embargo, numerosos estudios familiares, en gemelos y análisis de segregación han evidenciado la existencia de un componente genético. Dentro de los genes que han surgido como candidatos para estudios de asociación en TOC, los involucrados en la neurotransmisión glutamatérgica, específicamente el gen *SLC1A1* que codifica para el transportador neuronal de glutamato EAAT3, ha sido el más fuertemente asociado a esta enfermedad [24]. EAAT3 es prominentemente expresado en neuronas GABAérgicas y glutamatérgicas del circuito CSTC, circuito implicado en la fisiopatología del TOC [25]. EAAT3 juega múltiples roles en la regulación de la función sináptica, específicamente en el *clearance* y *spillover* de glutamato en las sinapsis excitatorias [20, 22].

Por otro lado, existe gran cantidad de evidencia sobre alteraciones en el sistema glutamatérgico en pacientes y modelos animales de TOC [9].

Se han desarrollado ratones EAAT3 KO, con el objeto de investigar el rol específico de este transportador [29]. Antecedentes sobre alteraciones conductuales en este modelo han sido escasas, a excepción de dos estudios recientes que describe que estos animales no muestran fenotipo ansioso ni compulsivo [42, 43]. Por lo anterior, sumado a que la evidencia genética sugiere una asociación de TOC con aumento en la expresión de SLC1A1/EAAT3 [45], es que en esta tesis se propuso la hipótesis que la sobreexpresión de EAAT3 en dos tipos neuronales específicos genera cambios conductuales asociados a TOC.

Los resultados obtenidos en esta tesis muestran la influencia de la sobreexpresión de EAAT3 sobre la conducta tipo ansiosa y compulsiva, medida a través de los paradigmas conductuales de exploración de campo abierto, laberinto elevado en cruz, entierro de bolitas y acicalamiento en ratones con sobreexpresión condicional de EAAT3 en neuronas GABAérgicas y piramidales.

Verificación de la presencia de transgenes (EAAT3^{glo} y Cre) por genotipificación vía PCR convencional

Los ratones con sobreexpresión condicional se obtuvieron mediante la cruce de la línea portadora del vector que contiene ADN complementario de EAAT3 de ratón y las líneas *driver* que expresan Cre recombinasa mediada por promotores específicos para cada tipo neuronal.

Para determinar los genotipos de los ratones se realizó un PCR convencional utilizando ADN genómico extraído a partir de cola. Los partidores utilizados van dirigidos a la

secuencia correspondiente a la expresión de Cre recombinasa (GAD65-Cre y CaMKII α -Cre, en ratones con sobreexpresión condicional en neuronas GABAérgicas y ratones con sobreexpresión condicional en neuronas glutamatérgicas, respectivamente), al inserto para la sobreexpresión del EAAT3 que abarcan desde el promotor CAG a la secuencia de GFP, y al gen MAOB utilizado como control de la extracción de ADN. En las figuras 6 y 7 se observan las bandas de los amplicones generados por cada juego de partidores. Esto permitió detectar la presencia o ausencia de los diferentes insertos para determinar el genotipo de los animales que fueron utilizados en este estudio. En los animales con sobreexpresión se esperaba ver mayor expresión de ARNm de SLC1A1, así como mayores niveles de EAAT3 en cerebro anterior, especialmente dentro de las áreas del circuito CSTC. Resultados obtenidos de cerebro de ratones EAAT3^{glo}/CKII mediante qPCR y western blot (WB), en el laboratorio del Dr. Pablo Moya por Marisol Cisternas, muestran un aumento significativo en la expresión relativa de ARNm de *Slc1a1* en corteza, estriado y tálamo, así como una tendencia a la alza en la concentración de EAAT3 en las tres regiones recién mencionadas (Anexo 2, Figuras 16 y 17). Adicionalmente se evaluó la presencia de EAAT3 en cerebro mediante inmunohistoquímica. Los resultados obtenidos por la tesista de Magister Isabel Gómez en el laboratorio del Dr. Moya, concuerdan con los resultados de qPCR y WB, ya que se observa una tendencia al alza de EAAT3 en corteza y tálamo, y un aumento significativo en estriado (Anexo 3, Figura 18).

Efecto de la sobreexpresión condicionada de EAAT3 sobre conductas tipo ansiosas

Las conductas tipo ansiosas se evaluaron mediante las pruebas de exploración de campo abierto y laberinto elevado en cruz, en ambos grupos de ratones con sobreexpresión y sus respectivos grupos controles. En los ratones EAAT3^{glo}/GAD no se observaron diferencias significativas comparado con los controles, sin embargo los animales EAAT3^{glo}/CKII permanecieron menos tiempo y visitaron menos veces el área central de la arena comparado con el grupo control, sin presentar cambios en la actividad locomotora. Lo anterior es indicativo que los ratones con sobreexpresión de EAAT3 en neuronas glutamatérgicas presentan conductas de tipo ansiosas. En cuanto a los resultados obtenidos en la prueba de laberinto elevado en cruz, no se puede aseverar que los grupos con sobreexpresión presentan fenotipo ansioso o no, ya que por un lado los ratones EAAT3^{glo}/GAD presentan un aumento significativo en el tiempo en los brazos abiertos, no se observan diferencias en la frecuencia de visitas al brazo abierto comparados con el grupo control. Por otro lado los ratones EAAT3^{glo}/CKII y su

grupo control muestran valores similares en el tiempo de permanencia en los brazos abiertos, pero un aumento significativo en la frecuencia en estos brazos del laberinto.

Efecto de la sobreexpresión condicionada de EAAT3 sobre conductas tipo compulsivas

En la prueba de enterrado de bolitas se midió el porcentaje de bolitas enterradas. Conductas compulsivas se relacionan con un mayor número de bolitas enterradas. En los ratones EAAT3^{glo}/GAD no se observaron diferencias significativas comparado con los controles, sin embargo en los ratones EAAT3^{glo}/CKII se observa un aumento significativo del porcentaje de bolitas enterradas, por lo que es posible establecer que los ratones con sobreexpresión presentan fenotipo compulsivo. Esta conducta repetitiva de enterrar las bolitas podría semejar a la conducta de chequeo compulsivo que presentan los pacientes con TOC.

Mediante la prueba de acicalamiento se analizó el tiempo que le tomó a los animales comenzar a acicalarse (latencia), las veces en que se acicalaron (eventos) y el tiempo acicalándose (tiempo por evento). Menores tiempos de latencia, junto con un mayor número de eventos y más tiempo promedio por evento es indicativo de conductas tipo compulsivas. En los resultados obtenidos en esta prueba se observa en ambos grupos con sobreexpresión (EAAT3^{glo}/GAD y EAAT3^{glo}/CKII) menor tiempo de latencia y mayor tiempo promedio por evento, sin embargo, en ninguno de los casos las diferencias alcanzan significancia estadística. En cuanto al número de eventos de acicalamiento, si bien no hay diferencias significativas entre EAAT3^{glo}/GAD y EAAT3^{glo}/CKII con sus respectivos grupos controles, los ratones con sobreexpresión en neuronas piramidales muestran en promedio más eventos que los ratones con sobreexpresión en neuronas GABAérgicas, siendo los valores de ambos grupos controles similares entre sí. Lo anterior hace pensar que la sobreexpresión de EAAT3 en neuronas GABAérgicas y piramidales no tiene efecto sobre la estimulación de este tipo de conducta. Resultados obtenidos por el Dr. Pablo Moya, arrojan que ratones EAAT3^{glo}/CKII tampoco muestran cambios respecto a los controles en las conductas basales de auto-acicalamiento en pruebas de 20 minutos de duración, pero si lo hacen al inducir esta conducta mediante la aspersión de agua directamente sobre los animales (datos no publicados). Por otro lado, estudios realizados en el modelo SAPAP3 KO, estos ratones muestran conductas de acicalamiento excesivas, lo que fue observado por las lesiones que los animales se provocaron en la piel y por el registro de la actividad de los ratones por 4 horas [14].

Por lo anterior, podemos concluir que 5 minutos de prueba no es suficiente para observar cambios en los patrones de esta conducta y que sería aconsejable medir acicalamiento inducido en pruebas de mayor duración.

Similar a lo que ocurre en los ratones SAPAP3 KO, los que exhiben alteraciones de la razón de expresión de las subunidades NR2A/NR2B (dada por un aumento de NR2B) de los receptores de NMDA de sinapsis cortico estriatales [14], resultados recientes en colaboración con el laboratorio del Dr. Andrés Chávez demuestran que los ratones EAAT3^{glo}/CaMKII muestran una mayor proporción de la subunidad NR2B (datos no publicados), lo que podría sugerir un efecto compensatorio a la probable disminución del *spillover* de glutamato.

A partir de los resultados obtenidos en esta tesis (principalmente de las pruebas de exploración de campo abierto y enterrado de bolitas), se sugiere que EAAT3 juega un rol en la generación de conductas tipo ansioso- compulsivas, principalmente cuando se encuentra sobreexpresado en neuronas glutamatérgicas de cerebro anterior de ratón.

El fenotipo ansioso compulsivo que muestran los ratones con sobreexpresión en este tipo neuronas (EAAT3^{glo}/CKII) rememora las conductas ansiosas y repetitivas de los individuos que padecen de TOC.

Resultados complementarios en nuestro laboratorio muestran que los ratones EAAT3^{glo}/CKII revierten el fenotipo ansioso y compulsivo luego de la administración crónica de clomipramida y fluoxetina, fármacos utilizados como tratamiento de elección en TOC (Anexo 1, Figura15 panel B).

Todo lo anterior daría validez de constructo, apariencia y predictiva al modelo de sobreexpresión de EAAT3 en neuronas glutamatérgicas, constituyéndose como un buen modelo animal para el estudio de TOC.

BIBLIOGRAFIA

1. Ahmari SE. Using Mice to Model Obsessive Compulsive Disorder: From Genes to Circuits. *Neuroscience*. 2016;321:121-137.
2. American Psychiatric Association: Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, Fifth Edition. Arlington, VA, American Psychiatric Association, 2013.
3. Milad MR, Rauch SL. Obsessive Compulsive Disorder: Beyond Segregated Cortico-striatal Pathways. *Trends in cognitive sciences*. 2012;16(1):43-51.
4. Ting JT, Feng G. Neurobiology of obsessive-compulsive disorder: insights into neural circuitry dysfunction through mouse genetics. *Current Opinion in Neurobiology*. 2011;21(6):842-848.
5. Saxena S, Bota RG, Brody AL. Brain-behavior relationships in obsessive-compulsive disorder. *Seminars in Clinical Neuropsychiatry* . 2001;6(2):82-101.
6. Haber SN. Corticostriatal circuitry. *Dialogues in Clinical Neuroscience*. 2016;18(1):7-21.
7. Lanciego JL, Luquin N, Obeso JA. Functional Neuroanatomy of the Basal Ganglia. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*. 2012;2(12):a009621.
8. Ting JT, Feng G. Glutamatergic Synaptic Dysfunction and Obsessive-Compulsive Disorder. *Current Chemical Genomics*. 2008;2:62-75.
9. Pittenger C, Bloch MH, Williams K. Glutamate Abnormalities in Obsessive Compulsive Disorder: Neurobiology, Pathophysiology, and Treatment. *Pharmacology & therapeutics*. 2011;132(3):314-332.
10. Rosenberg DR, MacMaster FP, Keshavan MS, Fitzgerald KD, Stewart CM, Moore GJ. Decrease in caudate glutamatergic concentrations in pediatric obsessive-compulsive disorder patients taking paroxetine. *Journal of the American Academy of Child and Adolescent Psychiatry*. 2000;39:1096-1103.
11. Pittenger C. Glutamatergic agents for OCD and related disorders. *Current treatment options in psychiatry*. 2015;2(3):271-283.
12. Lafleur DL, Pittenger C, Kelmendi B, Gardner T, Wasyluk S, Malison RT, Sanacora G, Krystal JH, Coric V. N-acetylcysteine augmentation in serotonin reuptake inhibitor refractory obsessive-compulsive disorder. *Psychopharmacology (Berl)*. 2006;184:254-256.
13. Egashira N, Okuno R, Harada S, Matsushita M, Mishima K, Iwasaki K, Nishimura R, Oishi R, Fujiwara M. Effects of glutamate-related drugs on marble-burying behavior in mice: implications for obsessive-compulsive disorder. *European Journal of Pharmacology*. 2008;586:164-170.

14. Welch JM, Lu J, Rodriguiz RM, et al. Cortico-striatal synaptic defects and OCD-like behaviors in SAPAP3 mutant mice. *Nature*. 2007;448(7156):894-900.
15. Shmelkov SV, Hormigo A, Jing D, et al. Slitrk5 deficiency impairs corticostriatal circuitry and leads to obsessive-compulsive-like behaviors in mice. *Nature medicine*. 2010;16(5):598-602.
16. Zhou Y, Danbolt NC. Glutamate as a neurotransmitter in the healthy brain. *Journal of Neural Transmission*. 2014;121(8):799-817.
17. Danbolt NC. Glutamate uptake. *Progress in Neurobiology*. 2001;65(1):1-105.
18. Rousseaux CG. A Review of Glutamate Receptors I: Current Understanding of their Biology. *Journal of Toxicologic Pathology*. 2008; 21: 25–51.
19. Robert J. Vandenberg RJ, Ryan RM. Mechanisms of Glutamate Transport. *Physiological Reviews*. 2013; 93: 1621-1657.
20. Bjørn-Yoshimoto W, Underhill SM. The Importance of the Excitatory Amino Acid Transporter 3 (EAAT3). *Neurochemistry international*. 2016;98:4-18.
21. Tzingounis AV, Wadiche JI. Glutamate transporters: confining runaway excitation by shaping synaptic transmission. *Nature Reviews Neuroscience*. 2007;8(12):935-47.
22. Nieoullon A, Canolle B, Masméjean F, Guillet B, Pisano P, Lortet S. The neuronal excitatory amino acid transporter EAAC1/EAAT3: does it represent a major actor at the brain excitatory synapse?. *Journal of Neurochemistry*. 2006; 98: 1007–1018.
23. Wang L, Simpson HB, Dulawa SC. Assessing the validity of current mouse genetic models of obsessive-compulsive disorder. *Behavioural pharmacology*. 2009;20(2):119-133.
24. Stewart SE, Mayerfeld C, Arnold PD, Crane JR, O'Dushlaine C, Fagerness JA, Yu D, Scharf JM, Chan E, Kassam F, Moya PR, Wendland JR, Delorme R, Richter MA, Kennedy JL, Veenstra-VanderWeele J, Samuels J, Greenberg BD, McCracken JT, Knowles JA, Fyer AJ, Rauch SL, Riddle MA, Grados MA, Bienvenu OJ, Cullen B, Wang Y, Shugart YY, Piacentini J, Rasmussen S, Nestadt G, Murphy DL, Jenike MA, Cook EH, Pauls DL, Hanna GL, Mathews CA. Meta-Analysis of Association Between Obsessive-Compulsive Disorder and the 3' Region of Neuronal Glutamate Transporter Gene *SLC1A1*. *American Journal of Medical Genetics Part B*. 2013; 162B:367–379.

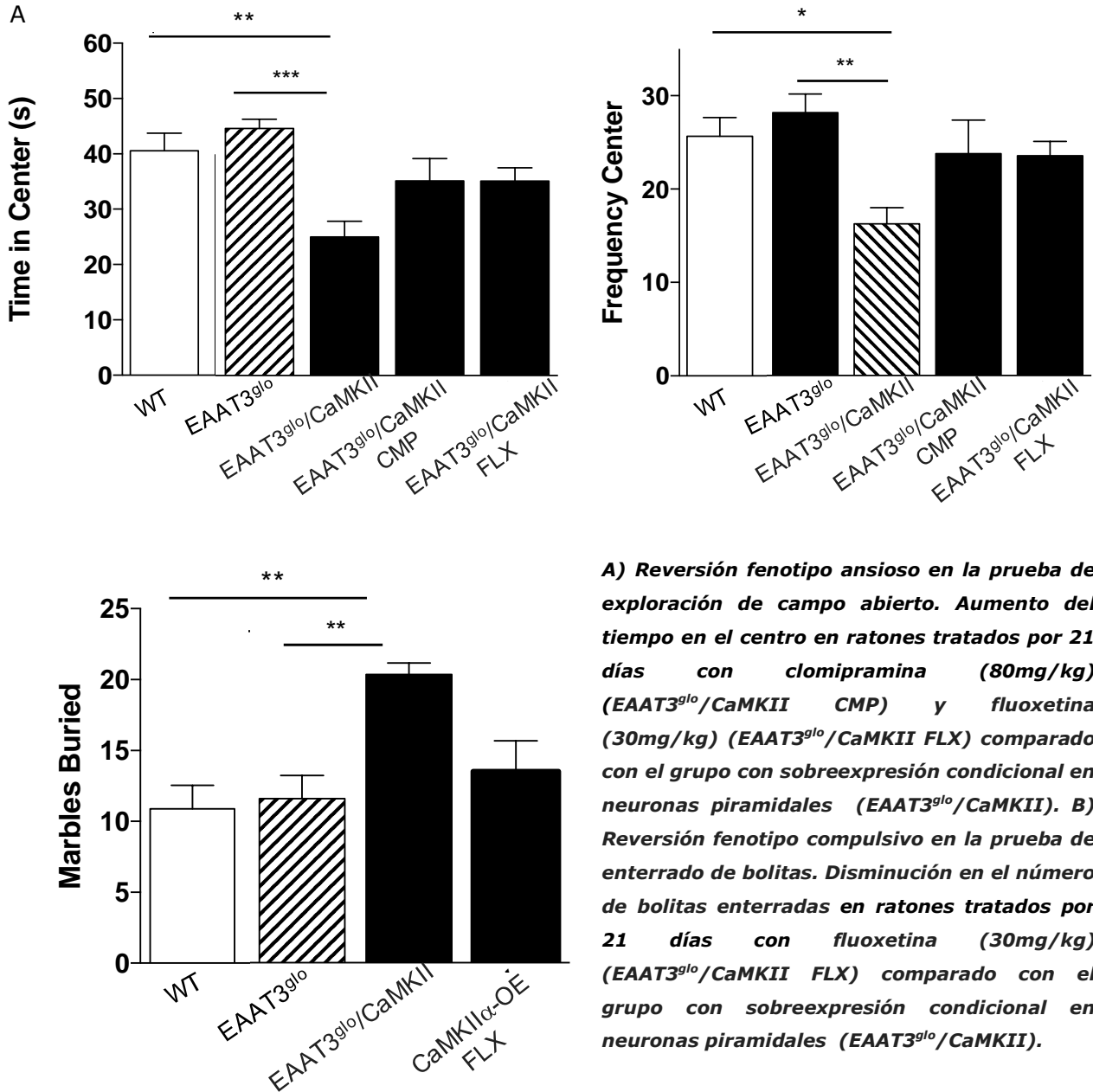
25. Kanai Y, Hediger MA. The glutamate/neutral amino acid transporter family SLC1: molecular, physiological and pharmacological aspects. *Pflugers Archiv*. 2004; 447:469-479.
26. Sepkuty JP, Cohen AS, Eccles C, et al. A Neuronal Glutamate Transporter Contributes to Neurotransmitter GABA Synthesis and Epilepsy. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*. 2002;22(15):6372-6379.
27. Korff S, Harvey BH. Animal models of obsessive-compulsive disorder: rationale to understanding psychobiology and pharmacology. *Psychiatric Clinics of North America*. 2006;29(2):371-90.
28. Nestler EJ, Hyman SE. Animal Models of Neuropsychiatric Disorders. *Nature neuroscience*. 2010;13(10):1161-1169.
29. Peghini P, Janzen J, Stoffel W (1997) Glutamate transporter EAAC-1-deficient mice develop dicarboxylic aminoaciduria and behavioral abnormalities but no neurodegeneration. *EMBO Journal* 1997; 16:3822-3832.
30. Powell SB, Newman HA, Pendergast JF, Presti MH. A rodent model of spontaneous stereotypy: initial characterization of developmental, environmental, and neurobiological factors. *Physiology & Behavior* 1999;66:355-63.
31. Presti MF, Lewis MH. Striatal opioid peptide content in an animal model of spontaneous stereotypic behavior. *Behavioral Brain Reserach* 2005;157:363-8.
32. Dek EC, van den Hout MA, Engelhard IM, Giele CL, Cath DC. Perseveration causes automatization of checking behavior in obsessive-compulsive disorder. *Behavior Research and Therapy* 2015; 71:1-9
33. Fernandez-Guasti A, Ulloa RE, Nicolini H (2003) Age differences in the sensitivity to clomipramine in an animal model of obsessive-compulsive disorder. *Psychopharmacology* 166:195-201
34. Shanahan NA, Velez LP, Masten VL, Dulawa SC. Essential role for orbitofrontal serotonin 1B receptors in obsessive-compulsive disorder-like behavior and serotonin reuptake inhibitor response in mice. *Biological Psychiatry* 2011; 70:1039-1048.
35. Szechtman H, Sulis W, Eilam D. Quinpirole induces compulsive checking behavior in rats: a potential animal model of obsessive-compulsive disorder (OCD). *Behavioral Neuroscience* 1998; 112:1475-1485
36. Winter C, Mundt A, Jalali R, Joel D, Harnack D, Morgenstern R, Juckel G, Kupsch A. High frequency stimulation and temporary inactivation of the subthalamic

- nucleus reduce quinpirole-induced compulsive checking behavior in rats. *Experimental Neurology* 2008; 210:217–228.
37. Zuchner S, Wendland JR, Ashley-Koch AE, Collins AL, Tran-Viet KN, Quinn K, Timpano KC, Cuccaro ML, Pericak-Vance MA, Steffens DC, Krishnan KR, Feng G, Murphy DL. Multiple rare SAPAP3 missense variants in trichotillomania and OCD. *Molecular Psychiatry* 2009;14:6–9
 38. Proenca CC, Gao KP, Shmelkov SV, Rafii S, Lee FS. Slitrks as emerging candidate genes involved in neuropsychiatric disorders. *Trends in Neuroscience* 2011;34:143–153.
 39. Rothstein JD, Dykes-Hoberg M, Pardo CA, Bristol LA, Jin L, Kuncl RW, Kanai Y, Hediger MA, Wang Y, Schielke JP, Welty DF. Knockout of glutamate transporters reveals a major role for astroglial transport in excitotoxicity and clearance of glutamate. *Neuron* 1996;16(3):675-86.
 40. Wang Z, Park S-H, Zhao H, Peng S, Zuo Z. A critical role of glutamate transporter type 3 in the learning and memory of mice. *Neurobiology of learning and memory*. 2014;114:70-80.
 41. Aoyama K, Suh SW, Hamby AM, Liu J, Chan WY, Chen Y, Swanson RA. Neuronal glutathione deficiency and age-dependent neurodegeneration in the EAAC1 deficient mouse. *Nature Neuroscience* 2006; 9:119-126.
 42. Zike ID, Chohan MO, Kopelman JM, et al. OCD candidate gene SLC1A1/EAAT3 impacts basal ganglia-mediated activity and stereotypic behavior. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2017;114(22):5719-5724.
 43. González LF, Henríquez-Belmar F, Delgado-Acevedo C, Cisternas-Olmedo M, Arriagada G, Sotomayor-Zárate R, Murphy DL, Moya PR. Neurochemical and behavioral characterization of neuronal glutamate transporter EAAT3 heterozygous mice. *Biological Research*. 2017; 50: 29.
 44. Zike I, Xu T, Hong N, Veenstra-VanderWeele J. Rodent models of obsessive compulsive disorder: Evaluating validity to interpret emerging neurobiology. *Neuroscience* 2016; 345:256-273
 45. Wendland JR, Moya PR, Timpano KR, Anavitarte AP, Kruse MR, Wheaton MG, Ren-Patterson RF, Murphy DL. A haplotype containing quantitative trait loci for SLC1A1 gene expression and its association with obsessive-compulsive disorder. *Archives of General Psychiatry* 2009; 66:408-416.

46. Kuhn R, Schwenk F. Conditional knockout mice. *Methods in Molecular Biology* 2003; 209:159-185.
47. Wu K, Hanna GL, Rosenberg DR, Arnold PD. The role of glutamate signaling in the pathogenesis and treatment of obsessive-compulsive disorder. *Pharmacology Biochemistry Behavior* 2012; 100:726-735.
48. Monteiro P, Feng G. Learning from Animal Models of Obsessive-Compulsive Disorder. *Biological psychiatry*. 2016;79(1):7-16.
49. Grados M, Prazak M, Saif A, Halls A. A review of animal models of obsessive-compulsive disorder: a focus on developmental, immune, endocrine and behavioral models. *Expert Opinion on Drug Discovery*. 2016;11(1):27-43
50. Calhoun GG, Tay KM. Resolving the neural circuits of anxiety. *Nature Neuroscience* 2015; 18:1394–1404 (2015)
51. Kalueff AV, Stewart AM, Song C, Berridge KC, Graybiel AM, Fentress JC. Neurobiology of rodent self-grooming and its value for translational neuroscience. *Nature reviews Neuroscience*. 2016;17(1):45-59.
52. Deacon RM. Digging and marble burying in mice: simple methods for *in vivo* identification of biological impacts. *Nature Protocols*. 2006; 1:122–124
53. Hall BE, Zheng C, Swaim WD, Cho A, Nagineni CN, Eckhaus MA, Flanders KC, Ambudkar IS, Baum BJ, Kulkarni AB. Conditional overexpression of TGF-beta1 disrupts mouse salivary gland development and function. *Laboratory Investigation*. 2010; 90:543-555
54. Taniguchi H, He M, Wu P, et al. A Resource of Cre Driver Lines for Genetic Targeting of GABAergic Neurons in Cerebral Cortex. *Neuron*. 2011;71(6):995-1013
55. Bergles D, Diamond J, Jahr C. Clearance of glutamate inside the synapse and beyond. *Current Opinion in Neurobiology*, 1999; 9: 293–298
56. Scimemi A, Tian H, Diamond JS. Neuronal Transporters Regulate Glutamate Clearance, NMDA Receptor Activation, and Synaptic Plasticity in the Hippocampus. *The Journal of Neuroscience* 2009; 29:14581-14595
57. Jarzylo L, Man H. Parasynaptic NMDA receptor signaling couples neuronal glutamate transporter function to AMPA receptor synaptic distribution and stability. *The Journal of neuroscience*. 2012; 32:2552-2563)

ANEXOS

Anexo 1: Reversión fenotipo ansioso-compulsivo en ratones EAAT3^{glo}/CKII. **Figura 16:**



Anexo 2: Sobreexpresión de EAAT3 en neuronas de cerebro anterior de ratones EAAT3^{glo}/CKII.

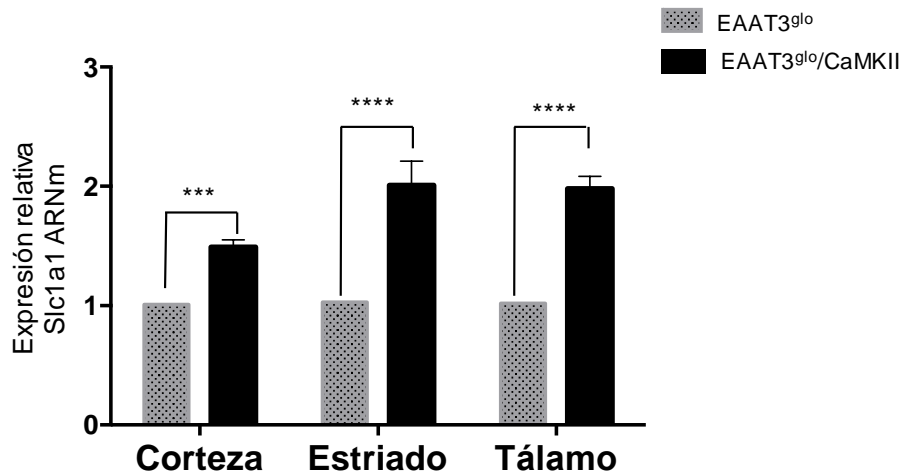


Figura17: Análisis de ARNm del gen *Slc1a1* en ratones EAAT3^{glo}/CaMKII en comparación con el control EAAT3^{glo} en corteza, estriado y tálamo, con el método de Livak utilizando como housekeeping *Hprt1*. Análisis realizado en el laboratorio del Dr. Pablo Moya por Marisol Cisternas. El análisis estadístico se realizó utilizando el test two-way ANOVA con un intervalo de confianza del 95% con un n=6 para cada grupo. Se observa una diferencia significativa entre el grupo control y de sobreexpresión indicando un incremento en la expresión de ARNm en el grupo de sobreexpresión en neuronas piramidales.

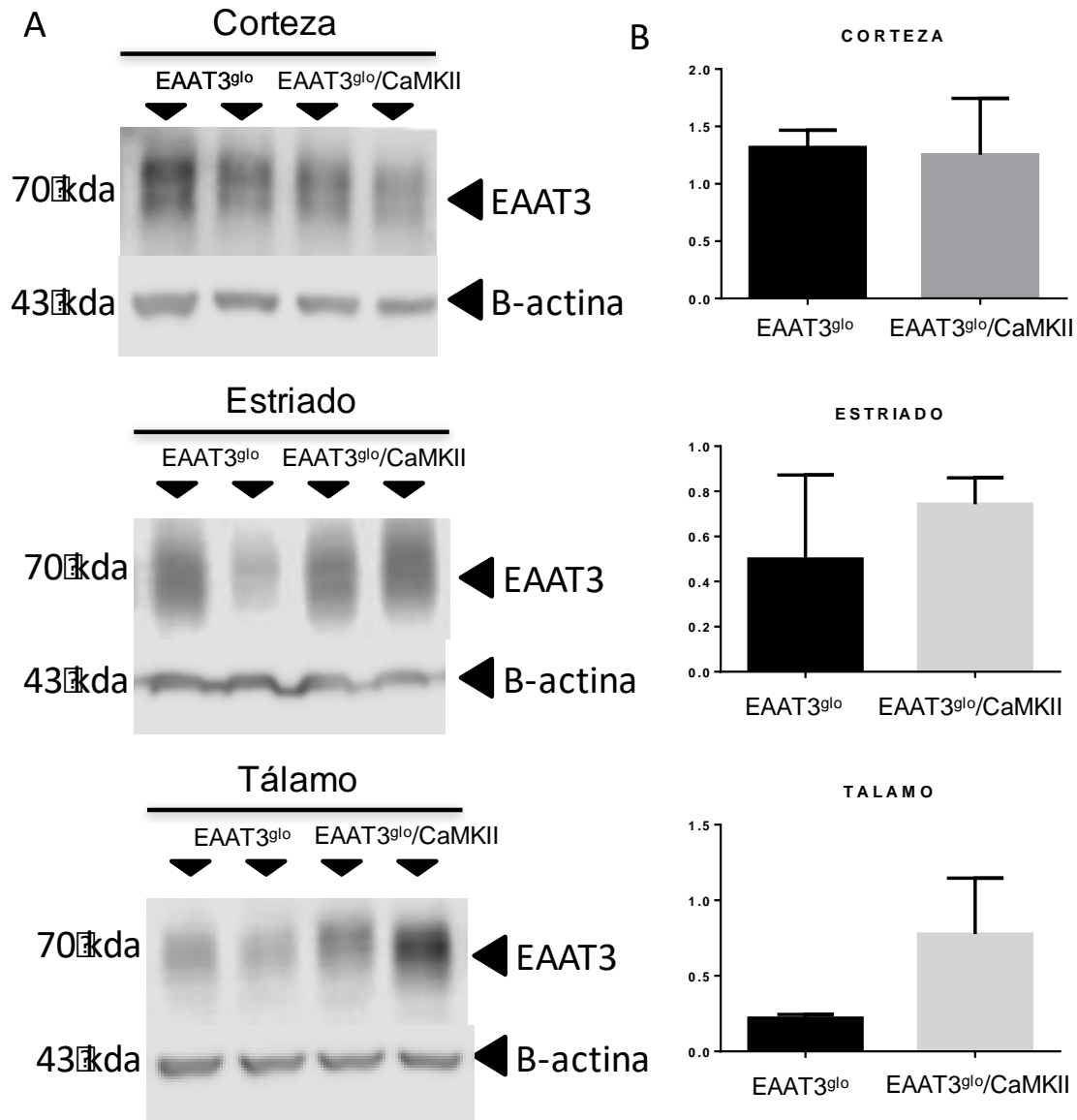


Figura 18: Western blot de EAAT3 en corteza estriado y tálamo de ratones EAAT3^{glo} (n=2) y EAAT3^{glo}/CaMKII (n=4), realizado en el laboratorio del Dr. Pablo Moya por Marisol Cisternas. Se utilizó como control de carga β-actina para normalizar los datos. A) Imagen representativa de membranas de nitrocelulosas con un n=2 de cada grupo por tejido, se observa una banda de 70kDa para EAAT3 utilizando un anticuerpo monoclonal (AB124802, ABCAM) y para β-actina de 43kDa utilizando un anticuerpo policlonal (AB8227, ABCAM). B Cuantificación de los datos obtenidos utilizando análisis estadístico t-student con un intervalo de confianza del 95%. Se analizó un n=2 para el grupo EAAT3^{glo} y un n=4 para el grupo EAAT3^{glo}/CaMKII. No se observan diferencias significativas entre corteza (P= 0,87), estriado (P= 0,2562) y talamo (P= 0,1150).

Anexo 3: Resultados inmunohistoquímica EAAT3^{glo}/CKII

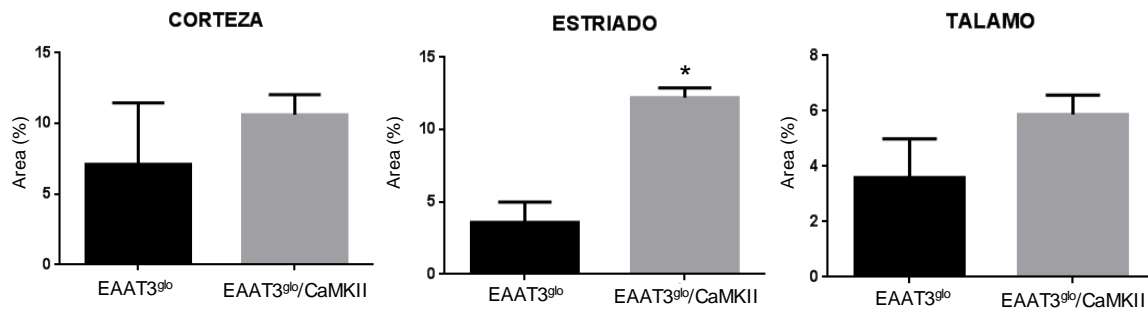
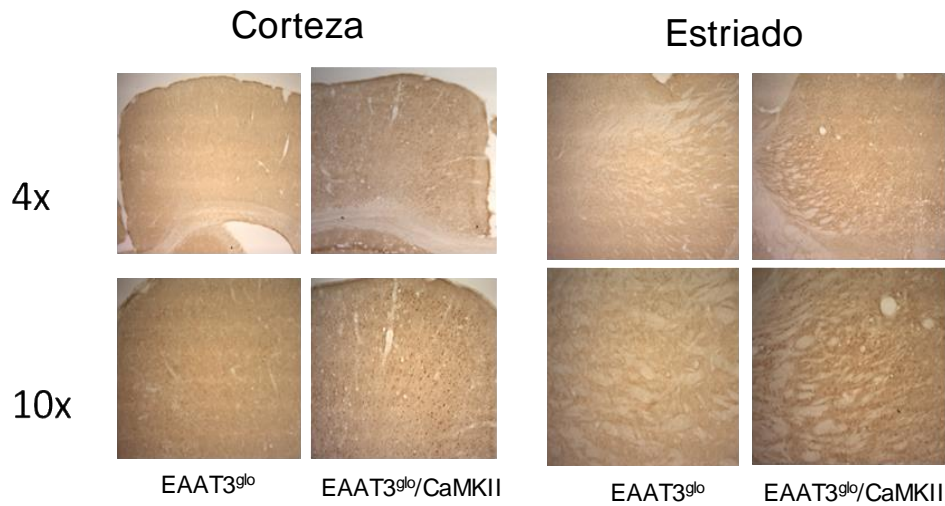


Figura 19: Cuantificación de EAAT3 en tejidos de cerebro de ratones mediante inmunohistoquímica realizados en el laboratorio del Dr. Pablo Moya por Isabel Gómez. No se observa diferencia significativa entre el grupo control EAAT3^{glo} y el grupo de sobreexpresión de EAAT3 EAAT3^{glo}/CaMKII corteza ($3,496 \pm 2,634$ $P=0,2551$) y talamo ($2,280 \pm 0,9026$ $P = 0,0649$). Sin embargo, se observa diferencia significativa (*) en estriado ($8,627 \pm 0,89874$ $P=0,0007$).

