



**FACULTAD DE CIENCIAS
PROGRAMA DE MAGÍSTER EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
MENCIÓN NEUROCIENCIA**

**“EVALUACIÓN DE LOS NIVELES DE DOPAMINA EN EL NÚCLEO ACCUMBENS EN
RATONES CON SOBREENPRESIÓN DE EAAT₃ EN CONDICIONES DE ESTRÉS CRÓNICO
IMPREDECIBLE LEVE”**

**Tesis para optar al grado de
Magíster en Ciencias Biológicas Mención Neurociencia**

**Por
VISSENTE TAPIA CUEVAS
Diciembre, 2023**

**Director(a) de Tesis:
PABLO MOYA VERA
Instituto de Fisiología**

**Co-Director(a) de Tesis:
RAMÓN SOTOMAYOR-ZÁRATE
Instituto de Fisiología**

AGRADECIMIENTOS

Con inmenso cariño y agradecimiento a María Eugenia, mi abuela, por la paciencia y el cuidado.
Y a Natalia quien en ese tiempo sostuvo mi salud mental en los días más difíciles.

Agradezco a todas las personas que hicieron posible esta tesis:
Nicolas Ardiles, Victoria Velásquez, Pablo Moya, y Ramon Sotomayor.

EPÍGRAFE

*¿Qué es la tristeza? Es cuando estoy separado de una **potencia** de la que, con razón o sin ella, me creía capaz.
«¡Ah, podría haber hecho eso!» –pero las circunstancias, o bien no me estaba permitido, o bien, etc. Así, pues,
eso es la tristeza; habría que decir: toda tristeza es el efecto de un poder sobre mí.
-Gilles Deleuze, El Abecedario de Deleuze.*

*El regocijo es una alegría que, en cuanto referida al cuerpo, consiste en que todas las partes del cuerpo sean
igualmente afectadas, esto es, en que **la potencia de actuar del cuerpo resulta aumentada** o favorecida de tal
modo que todas sus partes conservan la misma relación de reposo y movimiento entre sí; y de este modo, el
regocijo es siempre bueno, y no puede tener exceso.
-Baruj Spinoza, Ética.*

*Les dice “en la primera proposición estaba obligado a hacer como si la potencia fuera una cantidad fija, pero de
hecho la potencia no existe más que como relación entre cantidades”. Y es por eso que la potencia es una
cantidad extraña. La **potencia** en sí misma no es una cantidad, es el pasaje de una cantidad a otra.
-Gilles Deleuze, En medio de Espinoza.*

FINANCIAMIENTO

Esta tesis ha sido financiada por los proyectos FONDECYT 123-1012 del Dr. Pablo R. Moya y 120-0474 del Dr. Ramón Sotomayor-Zárate. Además, el programa de Magíster en Ciencias Biológicas mención Neurociencias otorgó la beca de asistencia a congresos para el año 2022.

PRESENTACIONES A CONGRESOS

- 2022 XLIII Congreso Anual de la Sociedad de Farmacología de Chile**
Evaluation of dopamine levels in the nucleus accumbens in mice with overexpression of EAAT3 under mild unpredictable chronic stress condition.
Tapia, V.T.; Velásquez, V.B.; Ardiles, N.; Sotomayor-Zárate, R.; Moya, P.R.
5 al 9 de diciembre, Punta Arenas, Región de Magallanes y Antártica Chilena, Chile.
Presentación Póster
- 2023 I Workshop «Topics in NeuroChemistry: From Molecules to Neurons»**
Evaluation of dopamine levels in the nucleus accumbens in mice with overexpression of EAAT3 under mild unpredictable chronic stress condition.
Tapia, V.T.; Velásquez, V.B.; Ardiles, N.; Sotomayor-Zárate, R.; Moya, P.R.
26 de mayo, Santiago, Región Metropolitana, Chile.
Presentación Póster
- 2023 Coloquio Tecnologías de la imagen Científica. Taxonomías, metodologías y resultados**
Evaluación de los niveles de dopamina en el núcleo accumbens en ratones con sobreexpresión de EAAT3 en condiciones de estrés crónico leve impredecible.
Tapia, V.T.; Velásquez, V.B.; Ardiles, N.; Sotomayor-Zárate, R.; Moya, P.R.
Coloquio realizado el 10 y 20 de octubre, Valparaíso, Región de Valparaíso, Chile.
Presentación oral
- 2023 XLIV Congreso Anual de la Sociedad de Farmacología de Chile**
Study of UFR2709, a nAChR antagonist with promising anti-addiction properties
Hödar-Salazar, M; Velásquez, V.; **Tapia, V.T;** Sotomayor-Zárate, R.; Ancatén-González, C; Chávez, A.E; Iturriaga-Vásquez, P.
Congreso que se realizó del 4 al 7 de diciembre, Antofagasta, Región de Antofagasta, Chile.
Participación en calidad de colaborador

ÍNDICE

1. RESUMEN	6
2. ABSTRACT	7
3. INTRODUCCIÓN	8
3.1 Trastorno Depresivo Mayor	8
3.2 El impacto del estrés en la transmisión dopaminérgica	8
3.3 Transmisión glutamatérgica	10
3.4 Modelos animales EAAT3	11
3.5 Resumen de antecedentes	11
4. HIPÓTESIS Y/O PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN	12
5. OBJETIVOS	12
5.1 OBJETIVO GENERAL	12
5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	12
6. DISEÑO EXPERIMENTAL	13
7. MATERIAL Y MÉTODOS	13
7.1 ANIMALES	13
7.1.1 Línea de Ratón con sobreexpresión condicional de EAAT3	13
7.2 Protocolo de Estrés Crónico Leve Impredecible	15
7.3 Comportamiento	16
7.3.1 Ganancia de peso y estado de pelaje	16
7.3.2 Prueba de campo abierto	17
7.3.3 Test de tres cámaras con enfoque social	17
7.3.4 Prueba de preferencia de sacarosa	17
7.4 Neuroquímica	18
7.4.1 Realización de rebanadas	18
7.4.2 Voltametría Cíclica de Barrido Rápido	18
8. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	20
9. RESULTADOS	21
9.1 Medidas Biológicas de los efectos de UCMS	21
9.2 Comportamiento similar a la depresión	21
9.3 Liberación y recaptación de DA evocada por un solo pulso	23
9.4 Liberación de DA evocada por múltiples pulsos	24
10. DISCUSIÓN	27
10.1 Medidas Biológicas	27

10.2	Test de comportamiento	27
10.3	Liberación de DA y Recaptura	28
10.4	Liberación de DA ante múltiples pulsos	30
11.	CONCLUSIONES	32
12.	BIBLIOGRAFÍA	33

1. RESUMEN

La fisiopatología de la depresión se ha asociado con la desregulación del sistema glutamatérgico y sus mecanismos de recaptación en las regiones del cerebro que median comportamientos cognitivo-emocionales. El transportador neuronal de aminoácidos excitatorios 3 (EAAT3) juega un papel en la recaptura de glutamato, y su actividad podría ofrecer protección contra el aumento extracelular de glutamato debido al estrés crónico. Nuestro laboratorio desarrolló un modelo de ratón que sobreexpresa EAAT3 bajo el promotor CaMKII α (EAAT3^{glo}/CaMKII). Datos de nuestro laboratorio sin publicar, indican que este ratón no desarrolla comportamientos similares a la depresión después de un protocolo de estrés crónico impredecible leve (UCMS, siglas en inglés). Dado el papel del circuito de dopamina (DA), que involucra al Área del Tegmento Ventral (VTA)-Núcleo Accumbens (NAc), en la sintomatología depresiva, este estudio evaluó la liberación de DA en el NAc Shell utilizando voltametría cíclica de barrido rápido ex vivo en ratones EAAT3^{glo}/CaMKII y su control (EAAT3^{glo}) expuestos o no a la UCMS. Mostramos que, en comparación con sus respectivos grupos no estresados, los ratones EAAT3^{glo} sometidos a UCMS exhibieron un aumento en DA evocada por un solo pulso, y una disminución en la liberación de DA evocada por estimulación de 5 pulsos con frecuencias variables (5, 10 y 20 Hz), ambos a una intensidad constante (400 μ A), mientras que la liberación de DA evocada eléctricamente en ratones con sobreexpresión EAAT3^{glo}/CaMKII se mantuvo sin cambios por estimulación de un pulso y múltiples pulsos. Estos hallazgos sugieren que el comportamiento similar a la depresión en el grupo EAAT3^{glo} sometido a UCMS podría estar relacionado a alteraciones en la transmisión de DA en el NAc Shell. Mientras que la resiliencia comportamental del ratón EAAT3^{glo}/CaMKII podría estar relacionada con la ausencia de cambios en la liberación de DA en el NAc Shell.

PALABRAS CLAVES

Estrés Crónico; Depresión; Dopamina; EAAT3; Voltametría; Relación Fásico/Tónico.

2. ABSTRACT

The pathophysiology of depression has been associated with dysregulation of the glutamatergic system and its reuptake mechanisms in brain regions that mediate cognitive-emotional behaviors. The neuronal excitatory amino acid transporter 3 (EAAT3) plays a role in glutamate reuptake and its function could confer protection against the extracellular increase in glutamate due to chronic stress. Our laboratory developed a mouse model that overexpresses EAAT3 under the CaMKII α promoter (EAAT3^{glo}/CaMKII). Unpublished data from our laboratory indicate that this mouse does not display depression-like behaviors after an unpredictable chronic mild stress (UCMS) protocol. Given the role of the DA circuit, which involves the Ventral Tegmental Area (VTA)-Nucleus Accumbens (NAc), in depressive symptomatology, this study seeks to assess DA release in the NAc Shell using ex vivo fast scanning cyclic voltammetry, in EAAT3^{glo}/CaMKII mice and their control (EAAT3^{glo}) exposed or not to UCMS. We show that, compared with their respective unstressed groups, EAAT3glo mice subjected to UCMS exhibited an increase in single-pulse-evoked DA, and a decrease in 5-pulse stimulation-evoked DA release with varying frequencies (5, 10 and 20 hz), both at a constant intensity (400 μ A), whereas electrically evoked DA release in EAAT3glo/CaMKII-overexpressing mice remained unchanged by single-pulse and multiple-pulse stimulation. These findings suggest that the depression-like behavior in the EAAT3glo group subjected to UCMS may be related to alterations in DA transmission in the NAc Shell. Whereas the behavioral resilience of the EAAT3glo/CaMKII mouse might be related to the absence of changes in DA release in the NAc Shell.

KEYWORDS

Chronic stress; Depression; Dopamine; EAAT3; Voltammetry; Phasic/Tonic Ratio.

3. INTRODUCCIÓN

3.1 Trastorno Depresivo Mayor

El Trastorno de Depresión Mayor (TDM) es un trastorno común que afecta a más de 300 millones de personas en el mundo (OMS, 2017). En Chile, la Encuesta Nacional de Salud indica una prevalencia de 6,2% a nivel nacional (MINSAL, 2018). La Organización Mundial de la Salud proyectó que el TDM ocupará el primer lugar de causa de carga de enfermedad en 2030 (Malhi & Mann, 2018).

La Anhedonia es un síntoma central en el Trastorno de Depresión Mayor (TDM), definido como la pérdida del interés o placer ante estímulos previamente gratificantes (DSM-5; American Psychiatric Association, 2013). Numerosos estudios han relacionado el TDM con alteraciones en el procesamiento de recompensas, por ejemplo: Déficit en la “Anticipación de Recompensa” en la tarea de “Retraso de incentivo monetario”, como también en la tarea de “Retraso de incentivo social” (p. ej: Stringaris et al., 2015; Ubl et al, 2015; Hägele et al. 2015; Takamura et al. 2017; Spreckelmeyer et al., 2009). Alteraciones en el “Esfuerzo”, las personas con TDM muestran una menor motivación en comparación con personas no deprimidas, en tareas que requieren esfuerzo para obtener recompensas (Bi et al., 2022; Sherdell et al., 2012; Horne et al., 2021). Incluso se han visto alteraciones en el “Aprendizaje de recompensas e integración de retroalimentación”, dado que los pacientes con TDM tampoco logran desarrollar un sesgo de respuesta hacia los estímulos recompensados (p.ej: Henriques et al., 1994; Pizzagalli et al., 2008; Pizzagalli et al., 2005).

Hasta el día de hoy la neurobiología del TDM no se comprende completamente. Sin embargo, obtener recompensas requiere “Anticipar la recompensa”, “Esfuerzo” y “Aprendizaje de recompensas”, distinta literatura preclínica en modelos animales indica un rol crítico de la Dopamina (DA) en la modulación de dichas conductas (Phillips & Ahn, 2022; Treadway & Zald; Husain & Roiser, 2018; Schultz, 1998; Montague et al., 1996). En cuanto a la literatura clínica, numerosos hallazgos de neuroimagen involucran alteraciones en circuitos de recompensa en la actividad del estriado ventral/ Núcleo Accumbens (NAc) en el TDM (Phillips et al., 2015). Y se ha correlacionado positivamente la actividad neural en el estriado ventral con la actividad del Área del Tegmento Ventral (VTA, siglas en inglés) y Sustancia Nigra (Schott et al., 2008), esto sugiere una alteración en circuitos dopaminérgicos en TDM. Por otro lado, se ha indicado niveles reducidos de Ácido Homovanílico medidos en Líquido cefalorraquídeo (Mitani et al., 2006) y en sangre (Lambert et al., 2000). La administración de un inhibidor de la tirosina hidroxilasa aumentó los síntomas depresivos en sujetos en remisión (Miller et al., 1996; Bremner et al., 2003; Hasler et al., 2008). Algunos estudios sugieren una disminución en la densidad del transportador de DA DAT estriatal (Shiapone et al., 2006; Meyer et al., 2001) y en la expresión del receptor de DA D₂ (Shah et al., 1997; Peciña et al., 2017).

3.2 El Impacto del estrés en la transmisión dopaminérgica

Cuando un estímulo estresante amenaza la homeostasis de un organismo, se inician respuestas adaptativas que destinan los suministros desarrollados en tiempos de calma para incrementar el poder en el ataque y defensa o la huida (Cannon, 1915). Sin embargo, cuando la respuesta adaptativa es sostenida en el tiempo debido al estrés crónico, se obtiene un desgaste del cuerpo y cerebro que predispone al individuo a sufrir enfermedades (McEwen, 2005). En la misma línea, distinta literatura ha establecido que el estrés es un factor de riesgo para la aparición del TDM (Hammen, 2005; Kendler et al., 1999; Caspi et al., 2003). Del mismo modo, el estrés crónico conduce a comportamientos similares a la depresión en roedores y se han desarrollado diversos modelos animales basados en la aplicación de estresores (Planchez et al., 2019). Ellos han permitido comprender cambios moleculares, sinápticos y neuroarquitectónicos del TDM, complementando estudios clínicos de neuroimagen (Sanacora et al., 2022).

El eje Hipotálamo - Pituitario - Adrenal (HPA) es un mediador importante del impacto del estrés. El organismo genera una respuesta primaria a través de la activación del Núcleo Paraventricular Hipotalámico (PVN, siglas en inglés), resultando en la liberación del Factor Liberador de Corticotropina (CRF por sus siglas en inglés) hacia la circulación portal hipofisaria, actuando sobre las células de la pituitaria anterior, induciendo la secreción de la Hormona Adrenocorticotrófica (ACTH por sus siglas en inglés) al torrente sanguíneo; en la corteza suprarrenal, la ACTH estimula la síntesis y secreción de Glucocorticoides al sistema sanguíneo (Herman et al., 2016). Es importante destacar que el CRF y sus receptores CRF-R1 y CRF-R2 se presentan amplia y densamente en distintas regiones del cerebro, una de ellas es el NAC (particularmente en Shell Lateral), en las terminales DAérgicas e interneuronas colinérgicas (Lemos et al., 2012).

El NAC está compuesto en un 90-95% por neuronas espinosas medianas (MSN, siglas en inglés) y recibe una densa inervación de aferencias DAérgicas provenientes del VTA (Klawonn & Malenka, 2018). El VTA es una estructura evolutivamente conservada en vertebrados superiores (Holly, & Miczek, 2016). Está formada por neuronas DAérgicas (TH positivas, alrededor del 60-65%), GABAérgicas (35%), y Glutamatérgicas (2-3%) (Baik, 2020). Además, las neuronas DAérgicas se activan en un modo tónico de baja frecuencia (0,2 - 10 Hz), como resultado de las corrientes de marcapasos autónoma de las células DA, mientras que el disparo fásico (> 10 Hz) es resultado de entradas excitatorias, generando actividad neuronal sincronizada en respuesta ante estímulos ambientales destacados (Liu et al., 2021). Además, estas neuronas expresan el transportador vesicular de monoaminas 2 (VMAT₂), DAT y el autorreceptor D₂R (Morales & Margolis, 2017).

Existe evidencia sólida que respalda la modulación del estrés en la actividad de DA, por ejemplo, se ha evidenciado que la activación de receptores de glucocorticoides genera una potenciación de la sinapsis excitatoria en neuronas DAérgicas del VTA, aumentando la relación AMPA/NMDA (Daftary et al., 2009; Saal et al., 2003). Por otro lado, se ha visto que el CRF aumenta la transmisión excitatoria mediada por N-Metil-D-Aspartato (NMDA) sobre neuronas DAérgicas del VTA, involucrando CRF-R2, PLC y PKC (Ungless et al., 2003). Además, CRF aumenta la activación de las neuronas DAérgicas del VTA mejorando las corrientes de entradas por hiperpolarización (*I_h*) a través de la señalización PLC-PKC al activar CRF-R1

(Wanat et al., 2008). En la misma línea, el CRF aumenta las Corrientes Postsinápticas Inhibitorias (IPSC, siglas en inglés) mediadas por GIRK sobre las neuronas de VTA-DA, pero el estrés crónico atenúa este efecto (Beckstead et al., 2009). También se ha visto que el CRF aumenta la acetilcolina extracelular en el NAc y modula la liberación de DA, a través de receptores nicotínicos y muscarínicos (Lemos et al., 2019; Chen et al., 2012). Finalmente, también se ha evidenciado que el CRF genera un aumento de la liberación de DA en humanos (Payer et al., 2017).

Durante un estrés agudo, las terminales DAérgicas que proyectan al NAc Shell lateral se inhiben, y al retirar el estímulo aversivo, estas terminales se excitan por sobre los niveles basales, coincidiendo con datos de aumento en concentraciones extracelulares de DA en esta área, al finalizar el estrés (Lowes & Harris, 2022). En cuanto al Estrés Crónico Leve Impredecible (UCMS, siglas en inglés), un tipo de estrés crónico que induce anhedonia (Willner, 2005), 4 semanas de estrés crónico leve no afecta el nivel de DA basal en el NAc shell medido por microdiálisis, pero sí disminuye su liberación en respuesta a una recompensa altamente palatable (Di Chiara et al., 1999). Por otro lado, una duración de 3 semanas UCMS aumenta la liberación de DA en el NAc medida por Voltametría cíclica de barrido rápido in vivo, pero sin resultados significativos en la medición ex vivo (Stamford et al., 1991). Otro estudio demostró que 7 semanas de UCMS aumenta la DA en contenido tisular del NAc medido por HPLC (Willner et al., 1991).

Respecto a la actividad de las neuronas DAérgicas, acercamientos electrofisiológicos han replicado que al menos 4 semanas de UCMS disminuyen la frecuencia de disparos tónicos y fásico en las neuronas de DA VTA (Zhong et al., 2018; Chang & Grace, 2014; Moreines et al., 2017; Rincón-Cortés y Grace 2017). Específicamente en ratones, la disminución de actividad en ráfaga se produce en el VTA Lateral, neuronas que se proyectan al NAc Shell Lateral (Zhong et al., 2018), el cual, se ha involucrado con un rol clave en la recompensa (Lammel et al., 2011). Por otro lado, los fenotipos similares a la depresión inducidos por UCMS son revertidos por la estimulación fásica optogenética del sistema DAérgico mesolímbico (Tye et al., 2013).

3.3 Transmisión glutamatérgica

El Glutamato es el principal neurotransmisor excitatorio del sistema nervioso central. Una sinapsis típica de glutamato se compone por tres tipos de células distintas: un astrocito, una neurona presináptica y una neurona postsináptica (Zárate et al., 2010). Después de la liberación del glutamato, este se une a receptores ionotrópicos (NMDA, kainato y AMPA) y receptores metabotrópicos (mGluR 1-8) (Crupi et al. 2019). El glutamato es removido de la sinapsis a través de transportadores de aminoácidos excitatorios (EAAT, siglas en inglés), que se encuentran en tanto en células gliales (EAAT1-2), como en neuronas (EAAT3-5) (O'Shea, 2002). Los EAATs ejercen un rol importante en la regulación fina en la transmisión del glutamato, previniendo los efectos excitotóxicos, es decir, daño o pérdida neuronal por el ingreso excesivo de iones de Ca^{2+} causado por la sobre estimulación de receptores ionotrópicos (Bianchi et al., 2014).

La corteza prefrontal y el hipocampo tienen un rol clave en la resiliencia/vulnerabilidad al estrés crónico, dado que ejercen un rol inhibitorio del PVN (Ulrich-Lai & Herman, 2009). Datos preclínicos indican que el **estrés agudo** eleva las concentraciones extracelulares de glutamato en las áreas del hipocampo y corteza

prefrontal (Bagley & Moghaddam, 1997; Lowy et al., 1993; Moghaddam, 1993; Venero & Borrell, 1999). Mientras que el **estrés crónico** conduce a cambios desadaptativos disminuyendo la recaptación de glutamato de la hendidura sináptica en las neuronas de la corteza prefrontal e hipocampo (Olivenza et al., 2000; de Vasconcellos-Bittencourt et al., 2011) y en un incremento de la activación de receptores de NMDA, resultando en excitotoxicidad y retracción dendrítica (Murrrough et al., 2017). Estos cambios estructurales podrían estar relacionados con las reducciones volumétricas y funcionales en corteza prefrontal e hipocampo reportadas en humanos y en modelos animales de TDM (Drevets et al., 1997; Rajkowska et al., 1999; Sheline et al., 1999; Musazzi et al., 2011; Duman & Aghajanian, 2012; Duman et al., 2016).

3.4 Modelo animal EAAT3:

Como se mencionó anteriormente, los EAAT regulan finamente las concentraciones extracelulares de glutamato. Nuestro laboratorio ha desarrollado un ratón transgénico que sobreexpresa el transportador EAAT3. Este transportador se encuentra post-sinápticamente en las sinapsis glutamatérgicas (He et al., 2000; Waxman et al., 2007), peri-sinápticamente, es decir, a los costados de la hendidura sináptica de dendritas y cuerpos celulares de neuronas glutamatérgicas, GABAérgicas y Dopaminérgicas (Bianchi, et al., 2014; Berman et al., 2010). El EAAT3 desempeña un rol clave al limitar el desbordamiento de glutamato y regular la activación de receptores de glutamato extra-sinápticos (Scimemi et al., 2009; Delgado-Acevedo et al., 2019).

Resultados no publicados de nuestro laboratorio indican que el modelo de ratón con sobreexpresión de EAAT3 bajo el promotor de CaMKII (EAAT3^{glo}/CaMKII) presenta resiliencia al UCMS en pruebas de comportamientos similares a la depresión y ansiedad (Ardiles, 2021). Además, el ratón EAAT3^{glo}/CaMKII presenta cambios en el sistema dopaminérgico, específicamente, una reducción en la liberación de DA tónica, y una mayor liberación de DA inducida por anfetamina en el cuerpo estriado, determinadas por microdiálisis (Escobar et al. 2021). Por otro lado, este mismo estudio encontró mayores niveles del receptor D₂ en el cuerpo estriado (Escobar et al., 2021). Estas mediciones permiten esclarecer la funcionalidad de la DA dependiente de la sustancia negra pars compacta, pero se requieren más estudios para esclarecer el papel que juega el sistema DA mesolímbico en los ratones que sobreexpresan EAAT3 y que son resilientes al UCMS.

3.5 Resumen de antecedentes

Datos previos de nuestro laboratorio indican que 1) los ratones EAAT3^{glo}/CaMKII sometidos a estrés crónico no presentan déficits en la preferencia social y sacarosa, conductas estrechamente relacionadas con mecanismo hedónicos dependientes del circuito dopaminérgico VTA-NAc. 2) los ratones EAAT3^{glo}/CaMKII presentan cambios en transmisión dopaminérgica en el circuito nigro-estriatal, pero se desconoce si existen cambios en VTA-NAc.

Esto nos lleva a la pregunta de investigación: ¿La resiliencia del ratón EAAT3/CaMKII ante el estrés crónico se debe a cambios en la transmisión de DA en el NAc?

4. HIPÓTESIS Y/O PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

La sobreexpresión de EAAT3 bajo el promotor CaMKII en ratones no disminuye la liberación de DA en el NAc en condiciones controles y de estrés crónico.

5. OBJETIVOS

5.1 OBJETIVO GENERAL

Evaluar la liberación de DA en el NAc Shell Lateral en el modelo de ratón EAAT3^{glo}/ CaMKII en condiciones controles y de estrés crónico.

5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Determinar las consecuencias del UCMS a través de mediciones biológicas en ratones EAAT3^{glo} y EAAT3^{glo}/CaMKII
2. Medir las consecuencias del UCMS en el comportamiento similar a la depresión en ratones EAAT3^{glo} y EAAT3^{glo}/CaMKII
3. Caracterizar los efectos del UCMS en la liberación de DA en el NAc en ratones EAAT3^{glo} y EAAT3^{glo}/CaMKII.
4. Comparar los efectos del UCMS en la liberación de DA en el NAc en ratones EAAT3^{glo} y EAAT3^{glo}/CaMKII.

6. DISEÑO EXPERIMENTAL

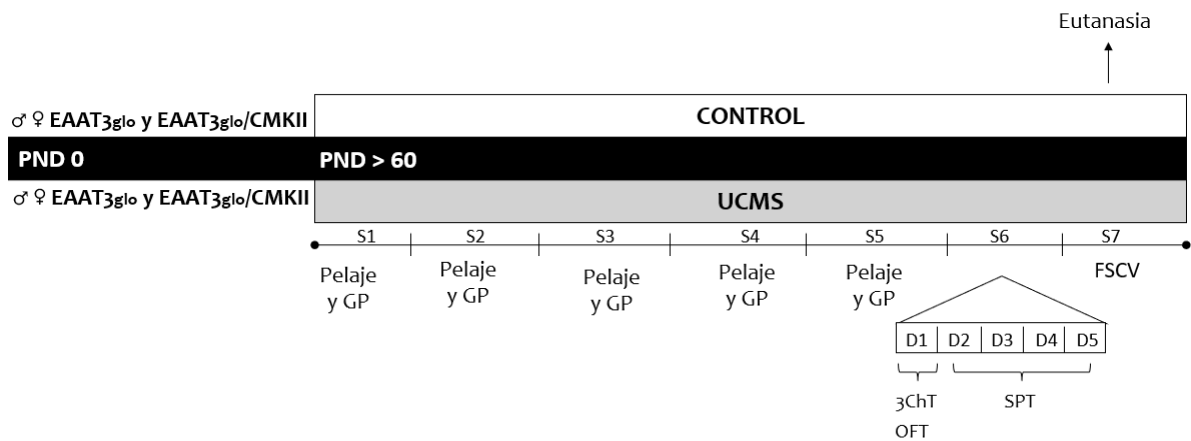


Figura 1. Descripción esquemática del diseño experimental. Machos y hembras adultos (mayor a 60 días post natal) pertenecientes a ambos genotipos, es decir, sobreexpresión de EAAT3 (EAAT3^{glo}/CaMKII) y sin sobreexpresión (EAAT3^{glo}) fueron asignados a la condición de grupo control o grupo de Estrés Crónico Leve Impredecible (Unpredictable Chronic Mild Stress, UCMS por sus siglas en inglés) durante 7 semanas. A ambos grupos se les midió durante 5 semanas su estado de pelaje y su ganancia de peso (GP) dos veces por semana, y durante la sexta semana se realizaron las pruebas de comportamiento. El día 1 de la sexta semana se realizó el “Test de 3 cámaras con Enfoque Social” (3 chambert social interaction test, 3ChT por sus siglas en inglés) y el “Test de Campo Abierto” (Open Field Test, OFT por sus siglas en inglés). En el día 2 se comenzó con el “Test de Sacarosa” (Sucrose Preference Test, SPT por sus siglas en inglés). Durante la séptima semana se realizó la eutanasia y ese mismo día se midió la liberación de DA a través de Voltametría Cíclica de Escaneo Rápido (Fast Scan Cyclic Voltammetry, FSCV por sus siglas en inglés).

7. MATERIAL Y MÉTODOS

7.1 ANIMALES

Se utilizaron 22 ratones transgénicos que sobreexpresan el transportador EAAT3 bajo el promotor CaMKII α (EAAT3^{glo}/CaMKII) y 22 ratones que sin sobreexpresión (EAAT3^{glo}, no Cre) con la cepa de fondo C57BL/6J. 11 ratones EAAT3^{glo}/CaMKII fueron asignados al grupo UCMS y 11 EAAT3^{glo}/CaMKII se mantuvieron sin estrés. 11 ratones EAAT3^{glo} fueron asignados al grupo UCMS y 11 EAAT3^{glo} se mantuvieron sin estrés. En todos los grupos se utilizaron machos y hembras con una edad mayor a 60 días postnatal. Se mantuvieron en condiciones estándar de laboratorio alimentación y agua *ad libitum*, ciclos luz/oscuridad de 12 horas, temperatura (21 \pm 2°C) y humedad al 60%. Los ratones sometidos al protocolo de estrés fueron mantenidos en aislamiento (1 por jaula), en cambio los ratones que no fueron sometidos a estrés se alojaron de 3 a 4 por caja. Todos los procedimientos fueron realizados con la aprobación del comité de Bioética de la Universidad de Valparaíso, con acta de evaluación CBC46/2022.

7.1.1 Línea de Ratón con sobreexpresión condicional de EAAT3

Pablo Moya, el director de esta tesis, generó una línea de ratones transgénicos con sobreexpresión condicional de EAAT3 mediante el sistema Cre/LoxP, utilizando un vector pCLE-EAAT3 (Fig. 1A) generado a través de la subclonación de ADN complementario de EAAT3 de ratón en el vector pCLE, como describen Delgado-Acevedo et al., (2019).

Los ratones con sobreexpresión de EAAT3 se obtienen al cruzar ratones EAAT3^{glo} con ratones CaMKII α -Cre. Esta cruce promueve la recombinación Cre/LoxP bajo el control del promotor del gen de la proteína quinasa II dependiente de alfa-calcio/calmodulina (CaMKII α) (Tsien et al., 1996). De este modo, en presencia de Cre recombinasa la secuencia de EGFP y la secuencia de parada es eliminada y el gen EAAT3 queda bajo el control del promotor promotor CMV/ β -actina constitutivo, permitiendo su sobreexpresión condicional (Fig. 1B). A partir de la misma cruce se obtienen animales controles EAAT3^{glo}, compañeros de camada que no expresan la CaMKII-cre,

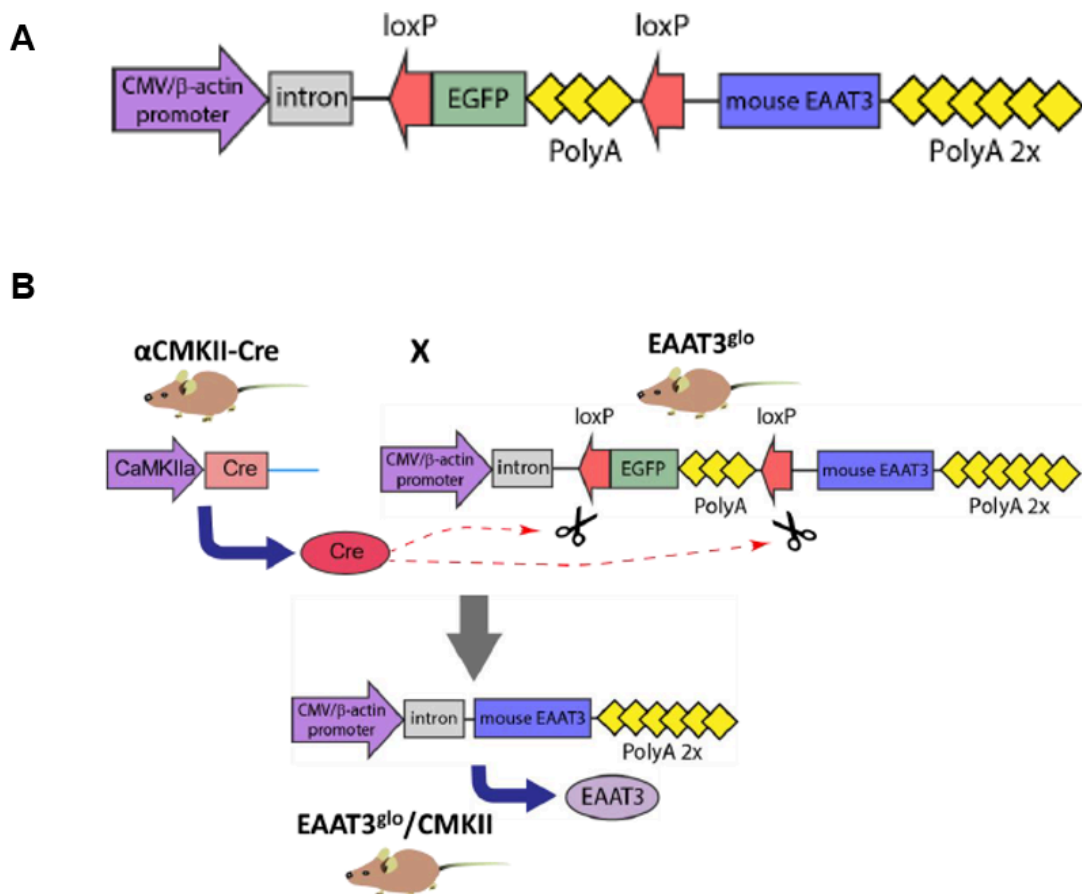


Figura 2: (A) Vector pCLE-EAAT3: Los elementos principales de este vector incluyen un promotor CMV/ β -actina constitutivo, seguido de una secuencia de proteína fluorescente verde realizada (EGFP, por sus siglas en inglés), que contiene una cola poliA 3' como secuencia de parada. EGFP está flanqueado por regiones LoxP y una construcción de ADNc de EAAT3 de ratón se encuentra aguas abajo. (B) Esquema

representativo de la obtención de ratones con sobreexpresión de EAAT3 a través de cruza. Imagen modificada de Ardiles (2021).

7.2 Protocolo de Estrés Crónico Leve Impredecible:

Los ratones fueron expuestos a un protocolo de Estrés Crónico Leves e Impredecible (UCMS por sus siglas en inglés), protocolo adaptado en nuestro laboratorio por Ardiles (2021) y basado en Nollet et al. (2013). El protocolo consiste en someter de 2 a 3 estresores leves por día, cubriendo el horario AM y PM de acuerdo con un calendario semialeatorio (ver Tabla 1), durante 5 semanas. Posteriormente, durante la sexta semana se mantienen con 1 estresor diario mientras se realizaron test conductuales. Durante la sexta semana se evitó utilizar estresores que alteren el ciclo luz/oscuridad, para evitar alteraciones en la posterior medición de DA (Jameson et al., 2023)

Tabla 1: Calendario semialeatorio de UCMS

	Lunes	Martes	Miércoles	Jueves	Viernes	Sábado	Domingo
Semana 1	Peso+Pelaje Luz + sin viruta por la noche	Restricción (1hAM) + viruta CF-1 (5h, PM)	Restricción (1hPM)+ Sin viruta (por la noche)	Peso+Pelaje Oscuridad (5h AM) + Inclinación de caja (3h, PM)	Sacudida (1h AM) +Luz por la noche	Restricción (1h, AM) + Viruta mojada por la noche.	Agua (2h, PM) Luz (por la noche)
Semana 2	Peso+Pelaje Inclinación de caja (4h, AM) + Agua (2h, PM)	Inclinación de caja (2.5h, PM) + Luz (por la noche)	Restricción (1h, AM) Viruta mojada (por la noche)	Peso+Pelaje Oscuridad (5h AM) Luz estroboscópica (por la noche)	Inclinación de caja (2.5h, AM) Oscuridad (6h PM) Luz (por la noche)	No viruta (5h, AM) Luz estroboscópica (por la noche)	Oscuridad (5h AM) Inclinación de Caja (4h PM)
Semana 3	Peso+Pelaje Restricción (1h AM) Sacudida (1h PM)	Oscuridad (5h AM) Agua (2h PM)	Sin Viruta (5h AM) Luz estroboscópica (por la noche)	Peso+Pelaje Restricción (1h AM) Luz (por la noche)	Inclinación de caja (2.5h, PM) Agua (2h PM)	Restricción (1h, AM) Sacudida (1h, PM)	Sin Viruta (5h, AM) Luz estroboscópica (por la noche)
Semana 4	Peso+Pelaje Sacudida (1h AM) Luz (por la noche)	Inclinación de caja (2.5h, PM) Sin viruta (4h, PM)	Sin Viruta (5h, AM) Agua (2h, PM)	Peso+Pelaje Restricción (1h, PM) Luz (por la noche)	Inclinación de caja (3h, PM) Luz estroboscópica (por la noche)	Oscuridad (5h, AM) Luz (por la noche)	Viruta CF-1 (5h, PM) Luz estroboscópica (por la noche)
Semana 5	Peso+Pelaje Oscuridad (5h, AM) Agua (2h, PM)	Restricción (1h, AM) Viruta mojada (por la noche)	Sin viruta (5h, AM) Luz estroboscópica (por la noche)	Peso+Pelaje Inclinación de Caja (2.5h, PM) Luz (por la noche)	Inclinación de caja (2.5h, AM) Oscuridad (6h, PM) Luz (por la noche)	Sacudida (1h, AM) Luz (por la noche)	Inclinación de Caja (4h, AM) Agua (2h, PM)
Semana 6	Peso+Pelaje Viruta mojada (1h, Por la noche)	Restricción (1h, Por la noche)	Sin viruta (1, AM)	Peso+Pelaje Luz estroboscópica (1h, AM)	(Test de sacarosa)	(Test de sacarosa)	(Restricción, 1h)

Los estresores consisten en 9 estresores (Ver tabla 2): 1) Sin viruta: se retira la viruta de la jaula. 2) Baño: La viruta de la caja es removida y reemplazada por 125 ml de agua. 3) Viruta mojada: Se humedece la ropa de cama vertiendo aproximadamente 80 ml de agua en la jaula. 4) Restricción: Los ratones fueron puestos en una caja o tubo de plástico manufacturado por nuestro laboratorio para restringir su movimiento, el cual, tiene unas medidas aproximadas de (6,5 cm x 4 cm). 5) Inclinación de jaulas: Las jaulas fueron inclinadas en un ángulo de 45°. 6) Luz estroboscópica: Las jaulas fueron puestas en una sala oscura y expuestos a luz estroboscópica. 7) Cambios en los ciclos de luz/ oscuridad: Las jaulas fueron alojadas en una habitación distinta para alterar los ciclos normales de luz/oscuridad. 8) Viruta CF-1: se reemplaza la viruta de la caja por la viruta de un ratón CF-1. 9) Sacudida: un grupo de 5 ratones son restringidos de movimiento y puestos en un vibrador orbital a 150 rpm. Además, los ratones que forman parte del protocolo de estrés permanecieron

constantemente en aislamiento social y alojados sin el enriquecimiento ambiental rutinario (conos y material de cama).

Tabla 2: Estresores Leves

Estresor	Descripción
Sin viruta	Se retira la viruta de la jaula.
Baño:	La viruta de la caja es removida y reemplazada por 125 ml de agua.
Viruta mojada:	Se humedece la ropa de cama vertiendo 100 ml de agua o a una cantidad ajustada a las dimensiones de la caja.
Restricción	Los ratones serán puestos en una caja o tubo de plástico manufacturado por nuestro laboratorio para restringir su movimiento el cual tiene unas medidas aproximadas de (6,5 cm x 4 cm).
Inclinación de cajas	Las cajas serán puestas inclinadas en un ángulo de 45°.
Luz estroboscópica	Las jaulas serán puestas en una sala oscura y expuestas a luz estroboscópica.
Cambios en los ciclos de luz/oscuridad	Las jaulas serán alojadas en una habitación distinta para alterar los ciclos normales de luz/oscuridad.
Viruta CF-1	Reemplazar la viruta de la caja por la viruta de un ratón CF-1.
Sacudida:	Un grupo de 5 ratones serán ingresados un contenedor de plástico y metidos en una maquina vibrador orbital a 150 rpm.

7.3 Comportamiento

Para la medición de los test de comportamiento los animales se trasladaron en sus respectivas jaulas a la sala de conducta y fueron aclimatados por al menos 1 hora. Los test se realizaron de 10:00 a 16:00 hrs (durante el ciclo de luz). El estado del pelaje y peso fueron realizados en la sala de procedimientos.

7.3.1 Ganancia de peso y estado de pelaje:

Se evaluó la ganancia de peso (GP) y el estado del pelaje el día antes de comenzar los protocolos, y posteriormente los lunes y jueves de manera rutinaria durante todo el procedimiento. La evaluación del pelaje consistió en la evaluación del estado de siete partes corporales: cabeza, cuello, espalda, abdomen, cola, patas traseras y patas delanteras. Hay 3 posibles puntajes de evaluación: cuando el pelaje esta liso y brillante se asigna “0” puntos; cuando el pelo esta despeinado y puntiagudo es “0,5” puntos; el puntaje “1” es cuando el pelaje está en mal estado con ligeros pelones en la zona. El puntaje máximo obtenible es 7 puntos. La escala será de 0 a 7, un continuum que va de buen a mal estado.

7.3.2 Prueba de campo abierto:

Los ratones se introdujeron en el centro de la caja de campo abierto (40 cm de largo, 40 cm ancho y 35 cm en profundidad). Se grabó durante 5 min y se calculó el tiempo de permanencia en el borde y en el centro con el software Noldus Ethovision Video Tracking System (Version 7.0; Noldus, Wageningen, Netherlands). Entre cada prueba se limpió la caja con etanol al 70%, para eliminar rastros olfativos. La caja fue iluminada al centro de la caja a aproximadamente 45 lux. Antes de la prueba los animales se aclimatan a la sala de conducta por 1 hora.

7.3.3 Test de tres cámaras con enfoque social:

La caja de acercamiento social es una caja rectangular con tres cámaras internas una central y dos laterales, que miden 20 cm de largo, 40,5 de ancho y 22 de alto cada una. Cada cámara está separada por un plexiglás transparente con aberturas que permiten el acceso a las otras cámaras. La prueba consistió en 3 fases basadas en el protocolo descrito por Yang et al. (2011). La fase I, consta de habituar a los ratones a la cámara central, para ello se cierran las dos puertas de la cámara y el ratón se coloca en la cámara central por 10 minutos (no es necesario grabar esta fase). Fase II, consiste en habituar a los ratones a las 3 cámaras, para esto ambas puertas se abren. Esta fase dura 10 minutos, la grabación permite descartar que los ratones tengan preferencia por una cámara lateral. Fase III, tiene por finalidad probar la sociabilidad de los ratones. Para ello, hay que confinar al ratón en la cámara central con las puertas cerradas. Introducir en una cámara lateral el ratón novedoso encerrado en un portalápiz invertido con rejilla metálica blanca y se posiciono encima un frasco blanco de 20 gramos y en la otra cámara lateral el objeto novedoso, el cual es, otro portalápiz con un frasco blanco de 20 gramos encima. Se abren las puertas de la cámara central rápidamente y se graba esta fase. Se ilumina con luz roja de aproximadamente 10 lux. Los objetos fueron limpiados entre pruebas con alcohol al 70%. Antes de la prueba los animales se aclimataron a la sala de conducta por 1 hora.

Para calcular “la razón de interacción” se utilizará la siguiente ecuación:

$$\text{Ratio de interacción} = \frac{(\text{tiempo olfateando ratón nuevo})}{(\text{tiempo olfateando ratón nuevo} + \text{tiempo olfateando objeto nuevo})} \times 100$$

7.3.4 Prueba de preferencia de sacarosa:

Esta prueba consta de dos fases: fase 1 habituación y fase 2 prueba de preferencia. Primeramente, los ratones son removidos de su jaula habitual y puestos aisladamente en una jaula distinta con comida, agua y viruta habitual. En la fase 1, se colocan botellas para beber, ambas con agua por 2 días, la posición de las botellas es intercambiada el segundo día, y se mide la cantidad de agua tomada para descartar preferencias de lugar o bebedero. En la fase 2, se presentan dos botellas, una de ellas con agua y la otra con sacarosa al 1% por 2 días. La posición de las botellas fue intercambiada durante el segundo día, para descartar

preferencia de lugar. El volumen consumido fue medido por día. Para calcular la cantidad de agua y sacarosa consumida se utilizó la siguiente ecuación:

$$\text{Preferencia a la sacarosa (\%)} = \frac{\text{Volumen de sacarosa}}{(\text{Volumen de agua} + \text{Volumen de sacarosa})} \times 100$$

7.4 Neuroquímica

Para la medición de dopamina se utilizó Voltamperometría cíclica de barrido rápido (FSCV) para caracterizar la liberación y captación de DA presináptica, así como la capacidad de la terminal de responder a patrones de estimulación fásica en el NAc Shell Lateral.

7.4.1 Realización de rebanadas

Los ratones fueron decapitados bajo anestesia con isoflurano. El cerebro fue extraído rápidamente y se obtuvieron rebanadas coronales de NAc de 300 μm utilizando un Microtomo Vibratorio (modelo vibroslice VSL; World Precision Instruments, Sarasota, FL, EE. UU.). Los cortes se realizaron en Líquido Cefalorraquídeo Artificial (aCSF) a una temperatura de 1-4 $^{\circ}\text{C}$, cuya composición fue: NaCl 126,0 mM, NaHCO₃ 25,0 mM, glucosa 11,0 mM, KCl 2,5 mM, CaCl₂ 2,4 mM, MgCl₂ 1,2 mM, NaH₂PO₄ 1,2 mM y ácido L-ascórbico 0,4 mM. El aCSF fue burbujeado con gas carbógeno (95% O₂; 5% CO₂; pH 7,4; Linde Gas Chile SA). Las rebanadas fueron incubadas en aCSF por 45 minutos a temperatura ambiente (20-24 $^{\circ}\text{C}$) antes de comenzar los registros.

7.4.2 Voltametría Cíclica de Barrido Rápido

Transcurrido el tiempo de incubación, una rebanada fue transferida a la cámara de registro y perfundida con aCSF carbogenado y a una temperatura de 32 $^{\circ}\text{C}$. Se realizó registro de DA con un electrodo de fibra de carbono, la fibra de carbono se recortó manualmente bajo microscopio obteniendo un largo aproximado de 150 μm . Este electrodo de trabajo escanea aplicando un barrido de onda triangular de -0,4 a +1,2 a -0,4 V/s versus Ag/AgCl a una velocidad de 400 V/s cada 100 ms usando un voltamperímetro/amperímetro (modelo Chem-Clamp Potenciostat, Dagan Corporation, Minneapolis, MN, EE. UU.) esta técnica permite detectar un cambio en la corriente cuando la DA se oxida a +0,6 V en la rampa de voltaje y luego se reduce cuando el voltaje vuelve a -0,4 V. Además, se utilizó un electrodo de referencia Ag/AgCl (modelo EP2; World Precision Instruments, Sarasota, FL, EE. UU.) posicionado a un costado de la cámara de registro y sumergido en el buffer durante la realización de registros. Se estimuló con un electrodo bipolar concéntrico (modelo 30200; FHC, Bowdoin, ME, EE. UU.) con los siguientes parámetros: monofásico, 4 ms y 400 μA (aislador de estímulo actual NL800A; Digitimer, Ltd., Hertfordshire, Reino Unido).

En base a la literatura antes expuesta el estrés crónico afecta de manera diferencial la actividad y liberación tónica y fásica de las neuronas que proyectan al NAc (Di Chiara et al., 1999; Zhong et al., 2018; Tye et al., 2013). Para evaluar la dinámica de liberación de DA, se posicionaron los electrodos en el NAc Shell Lateral (Figura 3) se estimuló con un solo pulso de 400 μA cada 5 min en busca de un basal estable (6 colecciones con un peak dentro del 10% de variabilidad). La estimulación de un solo pulso modela liberación Tónica

(Ferris et al., 2013). Luego para modelar la liberación Fásica se aplicaron trenes de 5 pulsos de 400 μ A a distintas frecuencias 5, 10, 20, 40 y 100 Hz. Al final de cada experimento los electrodos de trabajo se calibraron utilizando aCSF que contenía 3 μ M de DA.

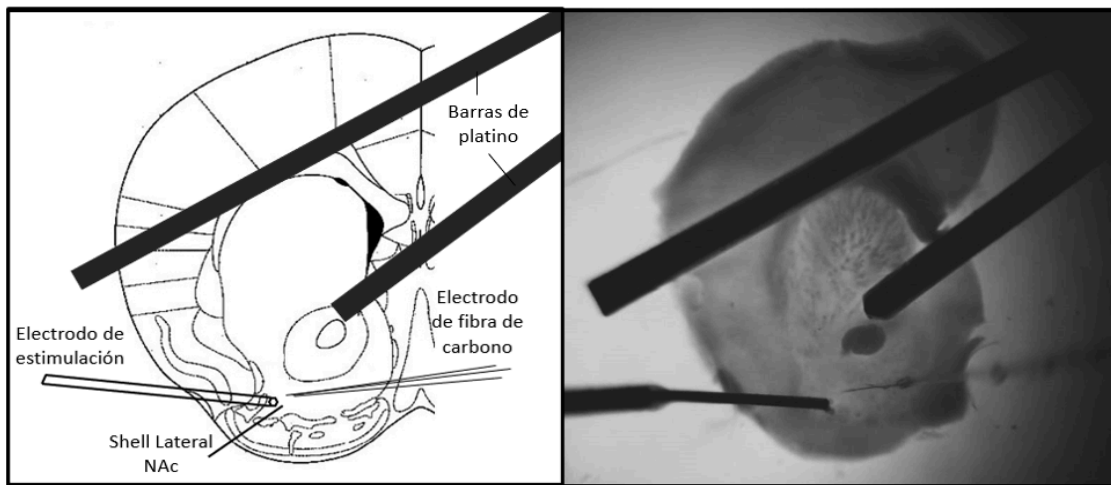


Figura 3. Izquierda: Diagrama representativo de una rebanada coronal. La mitad inferior señala la ubicación del Shell Lateral del NAc. Las líneas negras con punta hexagonal indica la posición del “Electrodo de estimulación” y las líneas negras con punta triangular señala el “Electrodo de Fibra de Carbono” en el Shell Lateral. Las barras con color de relleno negro son pesos de material platino que usualmente se utilizan para inmovilizar y prevenir que la rebanada flote. Imagen Modificada de Paxinos & Franklin (2004). **Derecha:** Fotografía registro de una rebanada de ratón del presente estudio, la cual, presenta todos los elementos mencionados en el diagrama de la izquierda.

Una vez obtenido un basal estable, se aplicó un protocolo de estimulación que constaba de trenes de 5 pulsos a frecuencias de 5, 10, 20, 40 y 100 Hz. Para la recopilación de datos, se utilizaron dos tarjetas de adquisición de National Instruments (NI-DAQ; PCI-6711 y PCI-6052e; National Instruments, Austin, TX, EE. UU.) para interconectar el potencióstato y el estimulador con el software Demon Voltammetry and Analysis (Wake Forest Health Sciences, Winston-Salem, Carolina del Norte, EE. UU.) Terminado el registro se procedió a calibrar el electrodo de fibra de carbono con ACSF que contenía 3 μ M DA.

8. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El análisis estadístico se realizó con GraphPad Prism v9.0.2 (GraphPad Software, San Diego, CA, Estados Unidos). Los datos son expresados como promedios \pm Error Estándar de la Media (EER, o SEM por sus siglas en inglés), y $p < 0,05$ se consideró estadísticamente significativo en todas las pruebas.

Todos los datos se analizaron utilizando la prueba de Shapiro-Wilk para determinar si se ajustaban a la distribución normal. Se utilizó ANOVA de dos vías de medidas repetidas para los datos de medidas biológicas. Se utilizó ANOVA de dos vías para los datos de comportamiento y también, para los datos obtenidos por Voltametría Cíclica de Barrido Rápido. Para el análisis *post hoc* se utilizó la prueba de Tukey en los datos de comportamiento, la prueba de Fisher para la comparación de múltiples grupos en los datos obtenidos por Voltametría Cíclica de Barrido Rápido. Finalmente, en la relación Fásico/Tónico se utilizó Test-T no pareado.

9. RESULTADOS

9.1 Medidas Biológicas de los efectos de UCMS

Respecto al estado del pelaje el UCMS aumentó el puntaje en ambos genotipos (Two-Way Repeated Measures ANOVA, $F(3,38) = 33.05$, $p < 0.00001$). Siendo significativo desde la semana 1 tanto para el grupo $EAAT3^{gl0}$ (post hoc Tukey test: $EAAT3^{gl0} - CTRL$ vs $EAAT3^{gl0} - UCMS$, $t = 25.90$, $p < 0.00001$) como también para $EAAT3^{gl0}/CaMKII$ (post hoc Fisher test: $EAAT3^{gl0}/CaMKII$ vs $EAAT3^{gl0}/CaMKII - UCMS$, $t = 14.85$, $p < 0.00001$). Sin diferencias significativas entre grupos controles (post hoc Fisher test: $EAAT3^{gl0} - CTRL$ vs $EAAT3^{gl0}/CaMKII - CTRL$, $t = 1.75$, $p = 0.6048$). Finalmente, los grupos sometidos a estrés presentan diferencias (post hoc Fisher test: $EAAT3^{gl0} - UCMS$ vs $EAAT3^{gl0}/CaMKII - UCMS$, $t = 9.48$, $p < 0.0001$).

El protocolo UCMS produjo una reducción de la ganancia de peso (Two-Way Repeated Measures ANOVA, $F(3, 38) = 24.89$, $p < 0.0001$). Este efecto fue significativo desde la semana 1 tanto para el grupo $EAAT3^{gl0}$ (post hoc Tukey test: $EAAT3^{gl0} - CTRL$ vs $EAAT3^{gl0} - UCMS$, $t = 18.97$, $p < 0.0001$) como también para $EAAT3^{gl0}/CaMKII$ (post hoc Fisher test: $EAAT3^{gl0}/CaMKII$ vs $EAAT3^{gl0}/CaMKII - UCMS$, $t = 11.32$, $p < 0.00001$). Sin diferencias significativas entre grupos controles (post hoc Fisher test: $EAAT3^{gl0} - CTRL$ vs $EAAT3^{gl0}/CaMKII - CTRL$, $t = 0.77$, $p = 0.9472$). Finalmente, los grupos sometidos a estrés presentan diferencias (post hoc Fisher test: $EAAT3^{gl0} - UCMS$ vs $EAAT3^{gl0}/CaMKII - UCMS$, $t = 7.02$, $p < 0.0001$).

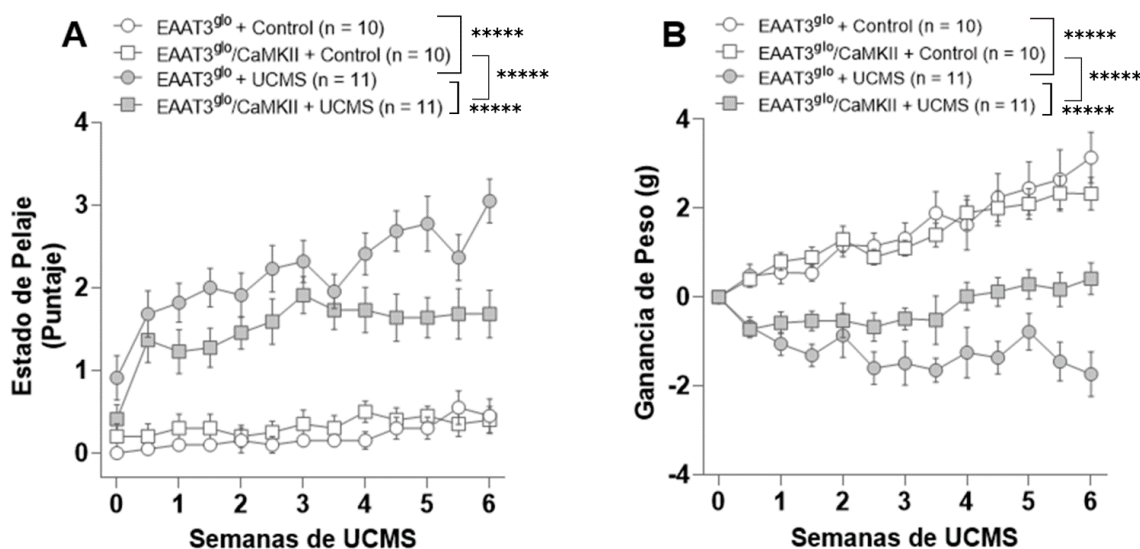


Figura 4: Efectos de 6 semanas de UCMS en medidas biológicas en ratones con sobreexpresión de EAAT3. **(A)** Estado de pelaje **(B)** Ganancia de peso. Control: $EAAT3^{gl0}$ n = 10 y $EAAT3^{gl0}/CaMKII$ n = 10, y UCMS: $EAAT3^{gl0}$ n = 11 and $EAAT3^{gl0}/CaMKII$ n = 11. Todos los datos reflejan la media \pm SEM y el análisis estadístico utilizado fue ANOVA de dos vías de medidas repetidas (***** $p < 0.00001$).

9.2 Comportamiento similar a la depresión.

Se realizaron pruebas de comportamiento para medir el comportamiento hedónico y la sociabilidad de los distintos grupos.

La prueba de preferencia a la sacarosa mide el comportamiento hedónico. No se encontraron diferencias por el Genotipo (Two-Way ANOVA, $F(1, 38) = 3,611$, $P = 0,0650$), pero si por la Condición (Two-Way ANOVA, $F(1, 38) = 16,29$, $P = 0,0003$) y presenta una interacción entre Condición y Genotipo (Two-Way ANOVA, $F(1, 38) = 8,698$, $P = 0,0054$). El UCMS disminuyó la preferencia a la sacarosa en los ratones EAAT3^{glo} comparados con los grupos: EAAT3^{glo} no estresados (post hoc Test de Tukey: EAAT3^{glo}: Ctrl vs. EAAT3^{glo}: UCMS, $p < 0,0001$); EAAT3^{glo}/CaMKII no estresados (post hoc Test de Tukey: EAAT3^{glo}/CaMKII: Ctrl vs. EAAT3^{glo}: UCMS, $p = 0,0009$) y EAAT3^{glo}/CaMKII estresados (post hoc Test de Tukey: EAAT3^{glo}: UCMS vs. EAAT3^{glo}/CaMKII: UCMS, $p = 0,0061$). Por otro lado, los ratones EAAT3^{glo}/CaMKII sometidos a UCMS no muestran cambios en la preferencia a la sacarosa comparados con EAAT3^{glo}/CaMKII no estresados (post hoc Test de Tukey: EAAT3^{glo}/CaMKII: Ctrl vs. EAAT3^{glo}/CaMKII: UCMS, $p = 0,8680$).

Se midió sociabilidad a través de la prueba de sociabilidad de tres cámaras. El comportamiento social se midió con la Razón de Interacción, no se encontraron diferencias por la Condición (Two-Way ANOVA, $F(1, 38) = 1,890$, $P = 0,1773$), pero si por el Genotipo (Two-Way ANOVA, $F(1, 38) = 6,852$, $P = 0,0126$) y presenta una interacción entre Genotipo y Condición ((Two-Way ANOVA, $F(1, 38) = 1,890$, $P = 0,1773$). El UCMS disminuyó la interacción social en los ratones EAAT3^{glo} comparados con los grupos: EAAT3^{glo} no estresados (post hoc Test de Tukey: EAAT3^{glo}: Ctrl vs. EAAT3^{glo}: UCMS, $p = 0,0308$); EAAT3^{glo}/CaMKII no estresados (post hoc Test de Tukey: EAAT3^{glo}/CaMKII: Ctrl vs. EAAT3^{glo}: UCMS, $p = 0,0308$) y EAAT3^{glo}/CaMKII estresados (post hoc Test de Tukey: EAAT3^{glo}: UCMS vs. EAAT3^{glo}/CaMKII: UCMS, $p = 0,0023$). Por otro lado, los ratones EAAT3^{glo}/CaMKII sometidos a UCMS no muestran déficits sociales comparados con EAAT3^{glo}/CaMKII no estresados (post hoc Test de Tukey: EAAT3^{glo}/CaMKII: Ctrl vs. EAAT3^{glo}/CaMKII: UCMS, $p = 0,7802$).

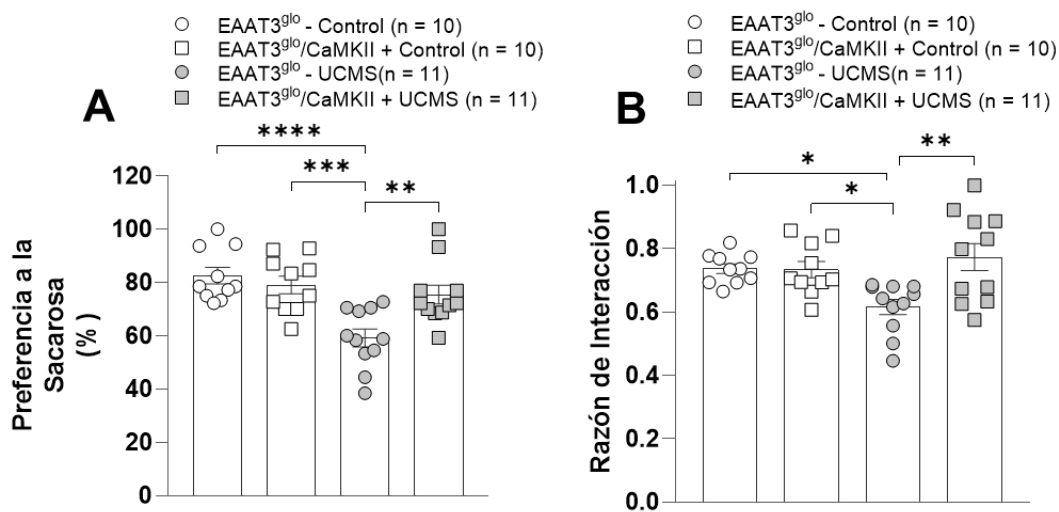


Figura 5: Efectos de la expresión condicional de EAAT3 bajo el promotor CaMKII sobre la conducta similar a la depresión en condiciones basales y sometidas a UCMS. (A) Sin cambios en la preferencia a la sacarosa.

(B) sin disminución en la interacción social. Todos los datos reflejan la media \pm SEM y el análisis estadístico utilizado fue ANOVA de dos vías con test para múltiples comparaciones (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0.001$ y **** $p < 0.0001$).

9.3 Liberación y recaptación de DA evocada por un solo pulso

Se utilizó FSCV, una técnica electroquímica que permite medir la liberación de DA en una resolución menor a los subsegundos. Esta técnica se utilizó *ex vivo* en el NAc Shell lateral para evaluar los efectos del UCMS y el Genotipo en la concentración liberada y recaptura de DA ante 1 solo pulso.

Se encontraron diferencias entre la condición CTRL y UCMS en la concentración de DA evocada por un solo pulso (Fig 6A) (ANOVA de dos vías; Condición: [F (1, 27) = 4,915; $p = 0,0352$]; Genotipo: [F (1, 27) = 0.1450, $P=0.7063$]; Interacción: [F (1, 27) = 2.417; $P=0.1316$]). Los ratones EAAT3^{gló} sometidos a UCMS presentan una mayor liberación de DA ante un solo pulso comparados con EAAT3^{gló} sin estrés (*post hoc* Test de Fisher: EAAT3^{gló}: Ctrl vs. EAAT3^{gló}: UCMS, $p = 0.0117$). Por otro lado, encontramos que UCMS no genera un aumento en la liberación de DA en los ratones EAAT3^{gló}/CaMKII (*post hoc* Test de Fisher: EAAT3^{gló}/CaMKII: Ctrl vs. EAAT3^{gló}/CaMKII: UCMS, $p = 0.6477$). Y en condiciones basales no se observan diferencias en la liberación entre genotipo (*post hoc* Test de Fisher: EAAT3^{gló}: Ctrl vs. EAAT3^{gló}/CaMKII: Ctrl, $p = 0.2019$).

Por otro lado, para comprobar si los cambios vistos en la DA liberada ante un solo pulso se relacionaban con cambios en la recaptura a través del transportador de dopamina (DAT), medimos la tasa máxima de recaptación de DA (V_{max}), la cual, no reveló diferencias debido a la condición CTRL o UCMS (Fig. 6B), como tampoco diferencias entre genotipos (ANOVA de dos vías; Condición: [F (1, 27) = 1.353, $p = 0.2549$]; Genotipo: [F (1, 27) = 3.572, $P=0.0695$]; Interacción: [F (1, 27) = 0.1861; $P=0.6696$]).

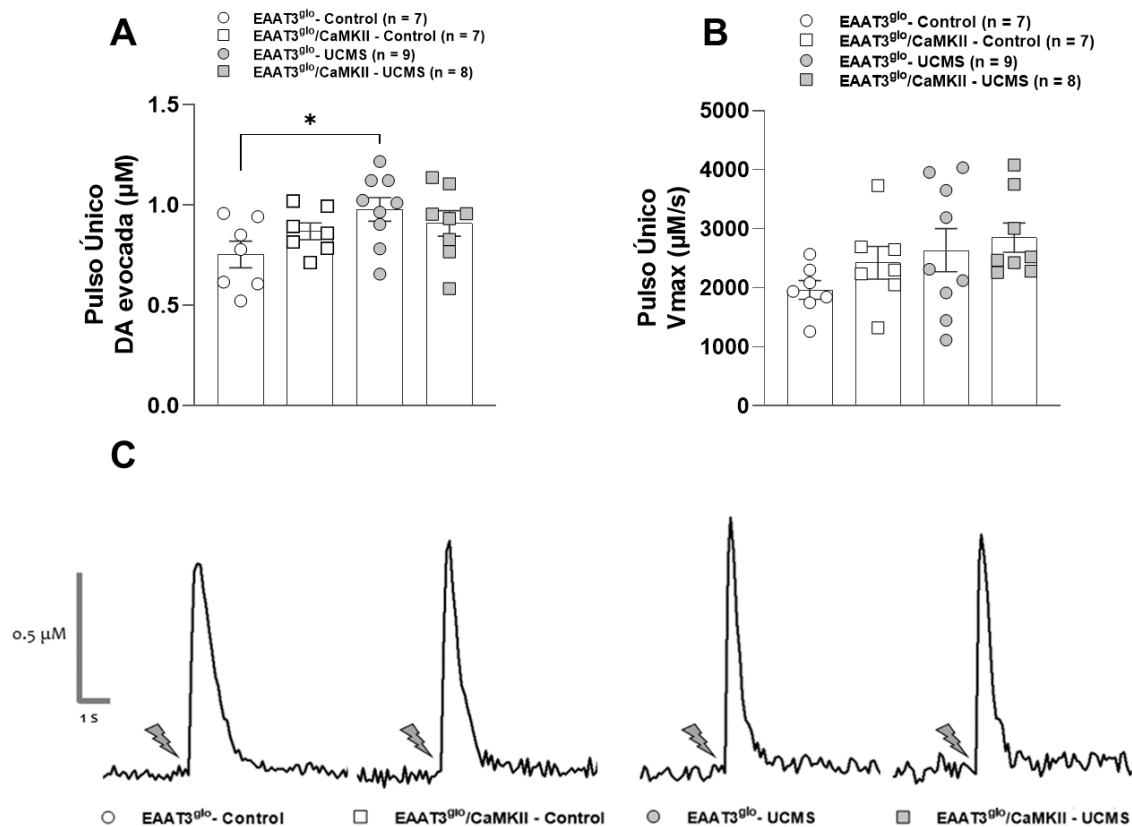


Figura 6: Diferencias en la recaptación y liberación de DA en ratones EAAT3^{glo}/CaMKII y EAAT3^{glo}/CaMKII sometidos a UCMS. **(A)** Los ratones EAAT3^{glo}/CaMKII sometidos a UCMS no presentan un aumento en la liberación de DA evocada por un solo pulso, mientras que los ratones EAAT3^{glo} sometidos a UCMS si presentan un aumento en la DA evocada a 1 pulso respecto a su grupo control. **(B)** Tasa máxima de Recaptación de DA (Vmax). **(C)** Comparación visual de los trazos de línea promediados que muestran la liberación de DA (altura del peak) y la Vmax (pendiente descendente) que representa la corriente media ± SEM en el área sombreada con un diagrama de pseudocolor representativo para cada grupo. Todos los datos reflejan la media ± SEM y el análisis estadístico utilizado fue ANOVA de dos vías con test para múltiples comparaciones (*p < 0,05).

9.4 Liberación de DA evocada por múltiples pulsos

Nuestros datos indican que la condición de presencia o ausencia de UCMS tuvo efectos en el porcentaje de liberación de DA evocada por 5 pulsos a distintas frecuencias (Fig 7. A-C) (ANOVA de dos vías; Condición: [F (3, 160) = 7,422, P=0,0001]; Frecuencias: [F (4, 160) = 42,45, P<0,0001]; Interacción: [F (12, 160) = 0,3555; P=0,9765]). Los ratones EAAT3^{glo} sometidos a UCMS presentan una menor porcentaje de liberación de DA ante la estimulación de 5 pulsos a frecuencias de 5, 10 y 20 Hz, comparados con ratones EAAT3^{glo} sin estrés (Fig. 7A) (post hoc Test de Fisher: EAAT3^{glo}: Ctrl vs. EAAT3^{glo}: UCMS; 5hz, p = 0,0458; 10 Hz, p = 0,0064; 20hz, p = 0,0117). Mientras que el ratón EAAT3^{glo}/CaMKII no presenta diferencias en el porcentaje de liberación DA en comparación con su control no estresado (Fig.7B) (post hoc Test de Fisher: EAAT3^{glo}/CaMKII: Ctrl vs.

EAAT3^{glo}/CaMKII: UCMS; 5 Hz, p = 0,7479; 10 Hz, p = 0,1661; 20 Hz, p = 0,5773). Tampoco hay diferencias en condiciones basales sin estrés entre los ratones EAAT3^{glo} vs. EAAT3^{glo}/CaMKII (Fig 7.C) (post hoc Test de Fisher: EAAT3^{glo} vs. EAAT3^{glo}/CaMKII; 5hz, p = 0,6137; 10hz, p = 0,2498; 20hz, p = 0,1787).

Este efecto también se refleja en el cálculo de la relación Fásico/Tónico, que compara la liberación de DA ante 5 pulsos a 20 hz con la liberación de DA provocada ante un solo pulso. El UCMS redujo la relación Fásico/Tónico en el grupo EAAT3 (Fig. 7D, Test-T= 2,424, df= 16, P= 0,0276). Mientras que el EAAT3^{glo}/CAMKII tiene su relación Fásico/Tónico sin cambios significativos después del UCMS (Fig. 7E, Test-T= 0,489, df= 16, P= 0.6315).

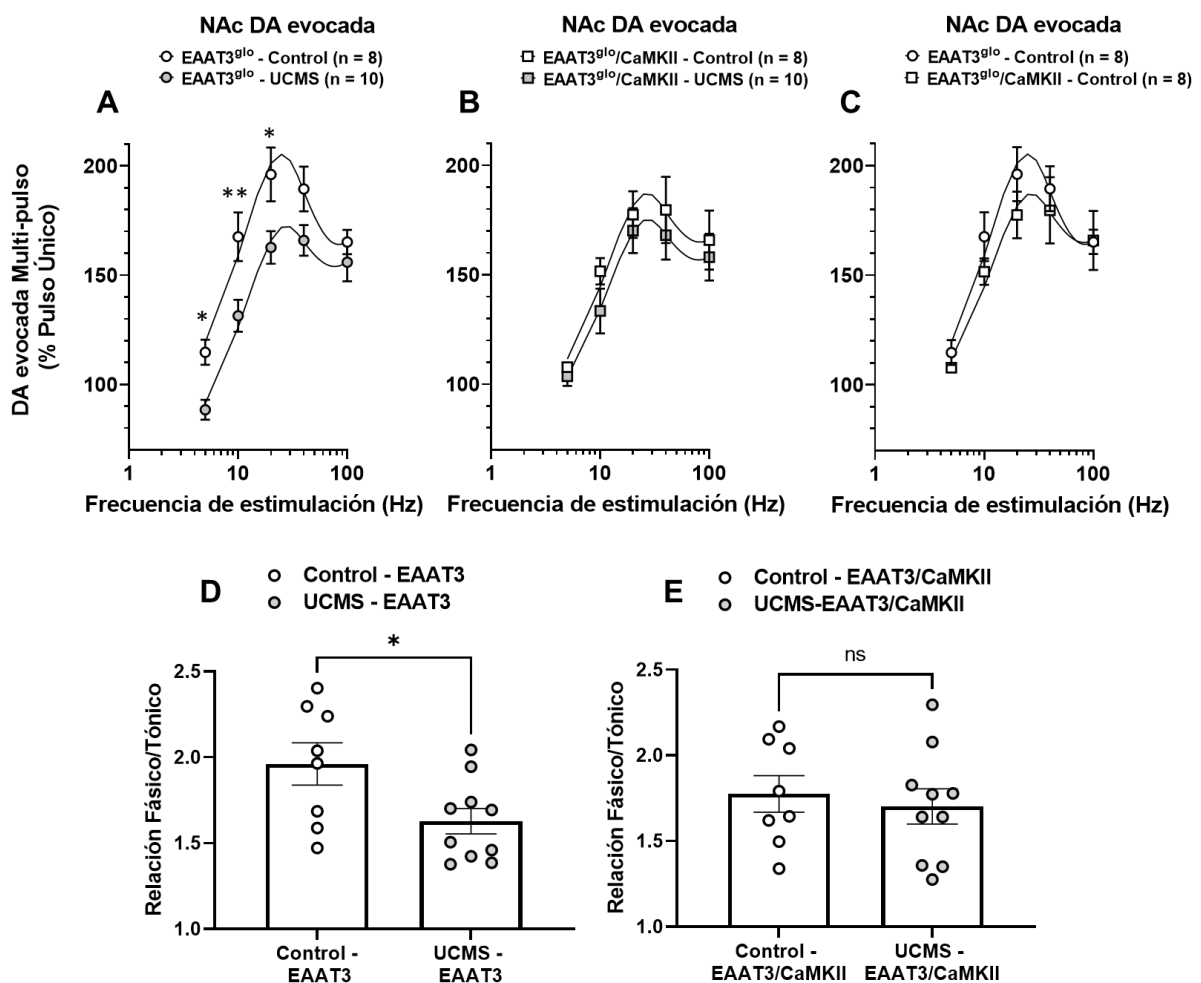


Figura 7: DA evocada por estimulación de 5 pulsos a frecuencias de 5, 10, 20, 40 y 100 Hz en rebanadas coronales de Shell Lateral del NAc. **(A-C)** Porcentaje de cambio de la DA liberada por un protocolo de múltiples pulsos en relación con la DA liberada ante 1 solo pulso. **(A)** Los ratones EAAT3^{glo} sometidos a UCMS presentan un menor porcentaje de liberación de DA ante la estimulación de 5 pulsos a frecuencias de 5, 10 y 20 Hz, comparados con ratones EAAT3^{glo} sin estrés. **(B)** El ratón EAAT3^{glo}/CaMKII no presenta diferencias en el porcentaje de liberación DA en comparación con su control no estresado. **(C)** Los ratones EAAT3^{glo}/CaMKII no presentan diferencias en el porcentaje de liberación DA en comparación con su control no estresado. **(D)** Relación Fásico/Tónico en EAAT3. **(E)** Relación Fásico/Tónico en EAAT3/CaMKII.

EAAT3^{glo} vs. EAAT3^{glo}/CaMKII no presentan diferencias en el porcentaje de liberación. **(D)** La relación Fásico/Tónico fue significativamente menor en los ratones EAAT3^{glo} sometidos a UCMS. **(E)** No hay diferencias significativas en la relación Fásico/Tónico en los ratones EAAT3^{glo}/CaMKII sometidos a UCMS. ANOVA de dos vías con múltiples comparaciones (Fig. 7 A-C) y Test-T no pareado (Fig. 7 D-E) (*p < 0,05; **p < 0,01). El gráfico de barras muestra la media ± SEM.

10. DISCUSIÓN

En este estudio se utilizó un protocolo de UCMS, en el cual, luego de 5 semanas de estrés ambos grupos EAAT3^{glo}/CaMKII y EAAT3^{glo} tuvieron déficit en el aumento de peso y deterioro del pelaje, con una atenuación del deterioro en el grupo EAAT3^{glo}/CaMKII. Además, el grupo EAAT3^{glo}/CaMKII sometido a UCMS no presenta comportamiento similar a la depresión y alteraciones en la dopamina evocada en el NAc, mientras que el ratón EAAT3^{glo} sometido a estrés si presenta estas alteraciones.

10.1 Medidas Biológicas

El deterioro del estado del pelaje observado en ambos grupos EAAT3^{glo} y EAAT3^{glo}/CaMKII durante la aplicación del protocolo de UCMS (Fig. 4A) puede estar relacionado con alteraciones en el acicalamiento. Se ha demostrado en roedores que el estrés agudo modula el patrón y la frecuencia del acicalamiento (Kalueff & Tuohimaa, 2004) y se ha evidenciado que ratones sometidos a UCMS disminuyen la duración y frecuencia de acicalamiento ante una prueba de splash (Nollet, 2021). Esta medida puede ser interpretada como una disminución del autocuidado y arreglo personal (Willner, 2005).

Por otro lado, ambos grupos EAAT3^{glo} y EAAT3^{glo}/CaMKII sometidos a UCMS presentan una disminución en la ganancia de peso en relación con sus controles sin estrés (Fig. 4B). La disminución de la ganancia de peso en el ratón C57Bl/j desafiados a UCMS está bien documentada (Nollet, 2021). El mecanismo preciso por el cual el UCMS afecta la ganancia de peso no se comprende bien. En otros paradigmas de estrés se ha demostrado que el estrés crónico por restricción disminuye la ingesta diaria de alimentos durante los primeros días de la aplicación del protocolo de estrés (Jeong et al, 2013), en los días posteriores, se cree que el bajo peso se mantiene debido al aumento del gasto energético y temperatura corporal (Bhatnagar et al., 2006).

Finalmente, aunque ambos grupos sometidos a estrés presentaron deterioro en el estado de pelaje y disminución de ganancia de peso comparados con sus controles sin estrés (Fig. 4 A-B), en ambas medidas se encontraron diferencias significativas entre los grupos estresados EAAT3^{glo} y EAAT3^{glo}/CaMKII, indicando un menor deterioro en estas medidas en el grupo EAAT3^{glo}/CaMKII, diferencia que podría indicar que la sobreexpresión EAAT3^{glo} condujo a una atenuación de los efectos del estrés.

10.2 Test de comportamiento

Los ratones EAAT3^{glo} (controles) sometidos a UCMS mostraron un déficit a la recompensa natural, específicamente, preferencia por la sacarosa (Fig. 5A). Este resultado es esperable dado que una amplia literatura respalda que el UCMS produce efectos anhedónicos (Nollet, 2021; Willner, 2005).

En principio, la disminución en la preferencia a la sacarosa podría reflejar una anhedonia de consumación. Treadway & Zald (2011) proponen dos tipos de Anhedonia, la Anhedonia de Consumación y la Anhedonia Motivacional. Categorización que se corresponde respectivamente con “Placer” (o “liking”) y “Deseo” (o “wanting”) propuesto en la literatura preclínica, los cuales, son disociables y tienen sustratos neurológicos diferentes (Berridge and Robinson, 1998, 2003). El “Placer” esta mediado en gran parte por opioides endógenos en regiones como el Núcleo Accumbens (NAc) y palio ventral (Smith, & Berridge, 2007); por

otro lado, los circuitos dopaminérgicos mesocorticolímbico parecen ser necesarios para el “Deseo”, siendo la proyección más estudiada el VTA hacia el NAc (Parte del estriado ventral) (Treadway & Zald, 2011). Dado que personas con TDM en la prueba de sabor dulce no han mostrado una diferencia en el impacto hedónico comparado con los controles (Berlin et al., 1998), diversos autores sospechan que la anhedonia motivacional es la que esta alterada en el TDM (Treadway & Zald, 2011; Pizzagalli, 2014).

El “liking” y el “wanting” funcionan en conjunto en el comportamiento normal ante una recompensa. Los ratones con deficiencia de DA (Pérdida de enzimas sintéticas de DA) sin estrés mantienen su preferencia a la sacarosa, sin embargo, su ingesta total de sacarosa y el número de lamido es menor comparado con sus controles (Cannon & Palmiter, 2003). Se ha demostrado que ratas acostumbradas a soluciones con sacarosa al 4%, son expuestas a una nueva concentración de sacarosa al 32%, experimentan un aumento en la concentración extracelular de DA en el NAc correlacionado con un mayor número de lamidas, que las ratas controles mantenidas a concentraciones de sacarosa al 32% (Phillips & Ahn, 2022). También se ha demostrado un aumento en la actividad de las neuronas DAérgicas del Shell lateral ante el consumo de agua con sacarosa, codificando Valor motivacional (de Jong et al., 2019). Incluso se ha visto que en ratones sometidos a UCMS (de 8 a 12 semanas) la reducción de preferencia a la sacarosa se restauró ante la estimulación fásica de neuronas DAérgicas en el VTA aumentando el comportamiento de lamido, mientras que la inhibición de las neuronas DAérgicas del VTA en animales control sin estrés redujo la preferencia por sacarosa (Tye et al., 2013). Estos datos han demostrado un vínculo entre el circuito DAérgico y el esfuerzo realizado en el número de lamidas en soluciones con sacarosa, esto podría sugerir que el UCMS produce anhedonia motivacional hacia la preferencia a la sacarosa encontrada en el grupo EAAT3^{glo}.

Respecto al test de tres cámaras con enfoque social, se encontró que el grupo control EAAT3^{glo} sometido a UCMS presenta un déficit en la sociabilidad (Fig. 5B). En la misma línea, se ha visto que el UCMS provoca déficits sociales en ratas (D'Aquila et al., 1994). Respecto a su correlato neurobiológico, se ha demostrado una relación entre la actividad del VTA-NAc y la interacción social, además su control optogenético modula el comportamiento social (Gunaydin et al., 2014). Por otro lado, se ha visto que las neuronas del Shell Lateral del NAc están involucradas en la codificación de la proximidad social (Espinosa et al., 2022).

Finalmente, la sobre expresión de EAAT3 protegió al ratón EAAT3^{glo}/CaMKII de los efectos negativos del UCMS como la anhedonia motivacional en el test de preferencia a la sacarosa, y de los déficits en sociabilidad en el test de tres cámaras con enfoque social (Fig. 5A-B).

10.3 Liberación de DA y Recaptura

Demostramos que los ratones EAAT3^{glo} sometidos a UCMS presentan un aumento en la liberación de DA evocada a un solo pulso (Fig. 6A). Una posible explicación podría involucrar una potenciación de la sinapsis excitatoria debido al aumento de la función/número de AMPA en las neuronas DAérgicas del VTA, generada por la activación de receptores de glucocorticoides (Daftary et al., 2009; Saal et al., 2003). También se ha visto que el CRF aumenta acetilcolina y aumenta la liberación de DA ante estresores agudos, a través de

receptores nicotínicos y muscarínicos (Lemos et al., 2019; Chen et al., 2012). Se sabe que el UCMS eleva persistentemente los niveles de glucocorticoides y produce un aumento en la densidad de neuronas que contienen CRF en las neuronas del PVN y amígdala (Malta et al., 2021; Wang et al., 2010).

Otra posible explicación respecto al aumento en la liberación de DA a un solo pulso en el grupo EAAT3^{gló} sometidos a UCMS, podría ser un aumento en la síntesis de DA. En consonancia con esto, se ha informado que el UCMS de 7 semanas aumenta la DA en contenido tisular del NAc medido por HPLC (Willner et al., 1991). En el mismo sentido, una duración de 3 semanas estrés crónico leve aumenta la liberación de DA en el NAc medida por Voltametría cíclica de barrido rápido *in vivo*, aquella tendencia se mantiene en la medición *ex vivo*, pero sin ser significativa (Stamford et al., 1991). Esto puede ser contradictorio con la evidencia de la disminución del metabolito de DA en pacientes con TDM, lo cual, sugiere una disminución de DA (Mitani et al. 2006). Distintos autores sugieren que el estrés produce efectos bifásicos, aumentando el contenido de DA durante las primeras semanas de estrés y disminuyendo frente a estresores crónicos de varias semanas (Douma & de Kloet, 2020; Baik, 2020). Se ha reportado que el estrés crónico por inmovilización de 16 semanas produce neurodegeneración en neuronas DAérgicas en el VTA (Douma & de Kloet, 2020). Esto podría sugerir que una duración similar a 16 semanas de UCMS podría resultar en hallazgos similares y significativos respecto a la pérdida de neuronas DAérgicas, y por tanto en menor contenido de DA y su metabolito. A pesar de la extensa evidencia disponible hay resultados contradictorios (Revisar: Hill et al., 2012; Douma & de Kloet, 2020; Baik, 2020; Stanton et al., 2019), que no permiten sostener decisivamente que los resultados en la liberación a un solo pulso se deban a un cambio en el contenido de DA en el NAc.

Los ratones EAAT3^{gló}/CaMKII desafiados a UCMS no presentaron un aumento de liberación de DA ante un solo pulso (Fig. 6A). Una posible explicación es que la sobreexpresión de EAAT3 resulta en una protección ante el estrés crónico en la corteza prefrontal e hipocampo, regiones que regulan la actividad del PVN y liberación de CRF, impidiendo la elevación persistente de niveles de glucocorticoides y aumento en la densidad de neuronas que contienen CRF en las neuronas del PVN y amígdala. Otra posible explicación es que la resiliencia se deba a la sobreexpresión de EAAT3 local en las neuronas dopaminérgicas, en las cuales se ha descrito que está expresado este transportador (Underhill et al., 2014), y que su mayor actividad en estas neuronas tenga un rol “protector” en el impacto del estrés mediado por el control glutamatérgico. Se requieren experimentos futuros para distinguir si la resiliencia al estrés crónico se debe a la sobreexpresión de EAAT3 sobre las neuronas DAérgicas del VTA que proyectan al NAc o se debe a la sobreexpresión sobre regiones externas como el hipocampo y corteza prefrontal.

En la técnica FSCV *ex vivo* se considera que las estimulaciones de un solo pulso modelan activación tónica de las neuronas DAérgicas (Ferris et al., 2013). Apresuradamente se podría inferir que el ratón control estresado presenta una liberación tónica o basal elevada *in vivo*. Pero es relevante resaltar que la liberación tónica *in vivo* es independiente de estimulación y proviene de la actividad aleatoria de neuronas individuales, mientras que esta técnica *ex vivo* produce liberación sincronizada de poblaciones de terminales DAérgicas por la estimulación eléctrica (Ferris et al., 2013). Además, la técnica de acercamiento

de estudio *ex vivo* utilizada nos limita a la hora de estudiar las aferencias de las neuronas DAérgicas a nivel de VTA. Existe diversa evidencia que ha reportado que las neuronas DAérgicas disminuyen la frecuencia de disparo tónico después de desafiar a los roedores a un protocolo de UCMS (Zhong et al., 2018; Tye et al., 2013). En la misma línea, se ha evidenciado en ratas que la hiperactividad de la Corteza Prefrontal Infra Límbica impulsa la actividad de la Amígdala Basolateral activando el Pálido Ventral (VP) resultando en la inhibición de las neuronas DAérgicas del VTA, y de manera paralela, la corteza prefrontal infra límbica inhibe el núcleo reuniens del tálamo, lo cual, resulta en la disminución de la actividad del Subiculum ventral del Hipocampo, disminuyendo el tono GABAérgico del NAc sobre el Pálido Ventral (Belujon & Grace, 2017).

Respecto al V_{max} se demostró que no hay diferencias entre los grupos (Fig. 6B). Esto es consistente con datos previos que indican no hay diferencias en la cantidad de DAT entre ratones EAAT3^{glo} y EAAT3^{glo}/CaMKII (Escobar et al., 2021). Por otro lado, han demostrado diferencias en la expresión de DAT por UCMS en ratas (Sedaghat et al., 2019). Esta discrepancia podría explicarse en las diferencias de especie, dado que en este trabajo se utilizaron ratones.

10.4 Liberación de DA ante múltiples pulsos

Como se expuso anteriormente el estrés crónico afecta de manera diferencial la actividad y liberación tónica y fásica de las neuronas que proyectan al NAc (Di Chiara et al., 1999; Zhong et al., 2018; Tye et al., 2013). Para evaluar la dinámica de liberación de DA se realizó un protocolo de múltiples pulsos que consiste en la aplicación de trenes de 5 pulsos de 400 μ A a distintas frecuencias 5, 10, 20, 40 y 100 Hz.

Demostramos que el porcentaje de liberación obtenida por múltiples pulsos en el grupo EAAT3^{glo} tuvo una disminución significativa comparado con su grupo sin estresar (Fig. 7A). Los Canales de nucleótidos cíclicos activados por hiperpolarización (HCN, siglas en inglés) son canales que permean iones, con mayor selectividad a K⁺, sobre Na⁺, se activan por hiperpolarización del voltaje de membrana -70 mV o menor, conduciendo una corriente *I_h* de entrada en neuronas, favoreciendo la excitación y manteniendo el potencial de membrana cerca del umbral del potencial de acción (Combe & Gasparini, 2021; Chang et al., 2019). Se ha demostrado que neuronas DAérgicas del VTA lateral que se proyectan al shell lateral presentan una gran corriente *I_h* (Lammel et al., 2011) y estudios han implicado la presencia de HCN en terminales presinápticas (Huang & Trussell, 2011), esto podría sugerir la presencia de este canal en las terminales DAérgicas presentes en el NAc shell de la rebanada coronal. En la misma línea, la aplicación del protocolo de UCMS produce una disminución de *I_h* en las neuronas de DA del VTA lateral (Zhong et al., 2018). Ya que estas corrientes *I_h* están fuertemente relacionadas con la actividad de marcapasos y su menor presencia aumenta el retraso en el rebote despolarizante luego de la hiperpolarización bajo condiciones de Current-Clamp (Neuhoff et al., 2002). La disminución de las corrientes *I_h* producto de UCMS podrían explicar la disminución de DA liberada ante la estimulación de pulsos múltiples a distintas frecuencias en el grupo EAAT3^{glo}, dado que después de un potencial de acción las neuronas suelen entrar en un estado hiperpolarizado, los pulsos posteriores al primer pulso reclutan, de este modo, menos neuronas DAérgicas resultando en una menor sinergia de liberación máxima de DA. Se ha visto que la activación de CRF-R1 mejora la *I_h*, a través de PKC en las neuronas DAérgicas del VTA (Wanat et al., 2008). Por otro lado, los

glucocorticoides regulan negativamente el ARNm de CRF-1 en la hipófisis (Iredale & Duman, 1997). Asumiendo un mecanismo similar, la disminución de CRF-R1 en las neuronas DAérgicas del VTA lateral podría explicar la disminución de la *Ih*. En suma, la eliminación de HCN2 mediada por shRNA en el VTA imita el comportamiento similar a la depresión en ratones sin estrés, mientras que la sobreexpresión de HCN2 protege de los comportamientos inducidos por UCMS (Zhong et al., 2018).

El shell lateral del NAc está involucrado fuertemente en la recompensa, dado que se ha demostrado que forma parte de un circuito de retroalimentación desinhibitoria sobre el VTA, a través de la inhibición de neuronas GABA (Yang et al. 2018). Se ha registrado que el Shell lateral aumenta la actividad de las neuronas DAérgicas ante estímulos recompensantes como el consumo de agua con sacarosa, mientras que una inhibición ante estímulos aversivos como el shock eléctrico en los pies (de Jong et al., 2019). Dado que la actividad fásica codifica eventos recompensantes, se postula que estas neuronas codifican Valor Motivacional (Bromberg-Martin et al., 2010). En adición, la estimulación optogenética de la entrada excitatoria de neuronas DAérgicas que se proyectan al Shell Lateral provoca preferencia de lugar condicionada (Lammel et al., 2012).

Aquí, informamos que la relación Fásico/Tónico está disminuida en los ratones EAAT3 sometidos a UCMS (Fig. 7D). Esto podría ser comprendido desde la teoría de la Señal-Ruido, desde la cual se puede inferir que una línea base elevada logra un menor valor de cambio (o diferencia temporal) hacia la DA fásica liberada por un estímulo recompensante, resultando en una señal de DA fásica menos destacada en relación con el ruido de fondo (Wanat et al., 2009). Probablemente esto generaría una dificultad en la comunicación y etiquetado del Valor Motivacional hacia las neuronas postsinápticas y estructuras cerebrales relacionadas.

Respecto al grupo EAAT3^{glo}/CMKII este no presenta diferencias en la dinámica de liberación de DA (Fig. 7B) y, por tanto, no presenta diferencias en la relación Fásico/Tónico (Fig. 7E). Como se detalló anteriormente, la sobreexpresión del transportador EAAT3 ejerce un rol protector ante el estrés crónico.

Finalmente, no se encontraron diferencias en la liberación de DA evocada ante un solo pulso (Fig. 6 A), como tampoco ante múltiples pulsos (Fig. 7C) entre los grupos controles EAAT3^{glo} y EAAT3^{glo}/CaMKII. Esto parece contradictorio dado que mediciones anteriores indican una diferencia en la liberación basal y ante la administración de amfetamina entre EAAT3^{glo} y EAAT3^{glo}/CaMKII (Escobar et al., 2021). Una posible explicación es que las alteraciones vistas en la liberación de DA en el estriado dorsal no se replican en el NAc, dado que son estructuras con características distintas que reciben inputs DAérgicos distintos, el NAc recibe principalmente inputs DAérgicos del VTA, mientras que el estriado dorsal recibe principalmente inputs de la sustancia nigra. Otra explicación es que la alteración en la liberación de DA vista por Escobar et al. (2021) se deba a un control ejercido por inputs excitatorios e inhibitorios sobre los cuerpos celulares del VTA, y en la preparación de rebanadas coronales de NAc estas aferencias quedan eliminadas.

11. CONCLUSIONES

Nuestra hipótesis de trabajo refería a que el ratón que sobreexpresa EAAT3 bajo el promotor CaMKII no presenta una disminución en la liberación de DA en el NAc en la condición de estrés crónico leve impredecible. Los resultados en este trabajo contribuyen a sostener aquella hipótesis, dado que los ratones EAAT3^{glo}/CaMKII sometidos a UCMS efectivamente no presentaron una disminución en la liberación de DA ante la estimulación fásica en NAc Shell Lateral. Por otro lado, los animales control sometidos a UCMS presentaron una disminución en la liberación fásica, sin embargo y sorprendentemente, presentaron un aumento en la liberación de DA ante la estimulación de pulso único. Además, hemos corroborado que el ratón con sobreexpresión desafiado a UCMS no presenta comportamientos depresivos ni deterioro de la sociabilidad. Mientras que el grupo EAAT3^{glo} desafiados a UCMS presentan deterioro en el comportamiento similar a la depresión y sociabilidad.

Este estudio ha permitido responder a la pregunta: ¿La resiliencia del ratón EAAT3/CaMKII ante el estrés crónico se debe a cambios en la transmisión de DA en el NAc? Decantando por una falta de cambios en la liberación de DA.

12. BIBLIOGRAFÍA

- Ardiles, N. (2021) ROLE OF GLUTAMATE TRANSPORTERS AND GLUTAMATERGIC SYSTEM IN CORTICAL AND LIMBIC BRAIN AREAS IN AN ANIMAL MODEL OF DEPRESSION [Tesis de doctorado no publicada]. Universidad de Valparaíso.
- Beckstead, M. J., Gantz, S. C., Ford, C. P., Stenzel-Poore, M. P., Phillips, P. E., Mark, G. P., & Williams, J. T. (2009). CRF enhancement of GIRK channel-mediated transmission in dopamine neurons. *Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology*, 34(8), 1926–1935. <https://doi.org/10.1038/npp.2009.25>
- Berman, A. E., Chan, W. Y., Brennan, A. M., Reyes, R. C., Adler, B. L., Suh, S. W., Kauppinen, T. M., Edling, Y., & Swanson, R. A. (2011). N-acetylcysteine prevents loss of dopaminergic neurons in the EAAC1-/- mouse. *Annals of neurology*, 69(3), 509–520. <https://doi.org/10.1002/ana.22162>
- Belujon, P., & Grace, A. A. (2017). Dopamine System Dysregulation in Major Depressive Disorders. *The international journal of neuropsychopharmacology*, 20(12), 1036–1046. <https://doi.org/10.1093/ijnp/pyx056>
- Berlin, I., Givry-Steiner, L., Lecrubier, Y., & Puech, A. J. (1998). Measures of anhedonia and hedonic responses to sucrose in depressive and schizophrenic patients in comparison with healthy subjects. *European psychiatry : the journal of the Association of European Psychiatrists*, 13(6), 303–309. [https://doi.org/10.1016/S0924-9338\(98\)80048-5](https://doi.org/10.1016/S0924-9338(98)80048-5)
- Berridge, K. C., & Robinson, T. E. (1998). What is the role of dopamine in reward: hedonic impact, reward learning, or incentive salience?. *Brain research. Brain research reviews*, 28(3), 309–369. [https://doi.org/10.1016/s0165-0173\(98\)00019-8](https://doi.org/10.1016/s0165-0173(98)00019-8)
- Bhatnagar, S., Vining, C., Iyer, V., & Kinni, V. (2006). Changes in hypothalamic-pituitary-adrenal function, body temperature, body weight and food intake with repeated social stress exposure in rats. *Journal of neuroendocrinology*, 18(1), 13–24. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2826.2005.01375.x>
- Bi, R., Dong, W., Zheng, Z., Li, S., & Zhang, D. (2022). Altered motivation of effortful decision-making for self and others in subthreshold depression. *Depression and anxiety*, 39(8-9), 633–645. <https://doi.org/10.1002/da.23267>
- Bianchi, M. G., Bardelli, D., Chiu, M., & Bussolati, O. (2014). Changes in the expression of the glutamate transporter EAAT3/EAAC1 in health and disease. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*, 71(11), 2001–2015. <https://doi.org/10.1007/s00018-013-1484-0>
- Bremner, J. D., Vythilingam, M., Ng, C. K., Vermetten, E., Nazeer, A., Oren, D. A., Berman, R. M., & Charney, D. S. (2003). Regional brain metabolic correlates of alpha-methylparatyrosine-induced depressive symptoms: implications for the neural circuitry of depression. *JAMA*, 289(23), 3125–3134. <https://doi.org/10.1001/jama.289.23.3125>
- Bromberg-Martin, E. S., Matsumoto, M., & Hikosaka, O. (2010). Dopamine in motivational control: rewarding, aversive, and alerting. *Neuron*, 68(5), 815–834. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2010.11.022>

- Cannon, W. B. (1915). Bodily changes in pain, hunger, fear, and rage. D. Appleton and company.
- Cannon, C. M., & Palmiter, R. D. (2003). Reward without dopamine. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 23(34), 10827–10831. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.23-34-10827.2003>
- Caspi, A., Sugden, K., Moffitt, T. E., Taylor, A., Craig, I. W., Harrington, H., McClay, J., Mill, J., Martin, J., Braithwaite, A., & Poulton, R. (2003). Influence of life stress on depression: moderation by a polymorphism in the 5-HTT gene. *Science (New York, N.Y.)*, 301(5631), 386–389. <https://doi.org/10.1126/science.1083968>
- Chang, C. H., & Grace, A. A. (2014). Amygdala-ventral pallidum pathway decreases dopamine activity after chronic mild stress in rats. *Biological psychiatry*, 76(3), 223–230. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2013.09.020>
- Chang, X., Wang, J., Jiang, H., Shi, L., & Xie, J. (2019). Hyperpolarization-Activated Cyclic Nucleotide-Gated Channels: An Emerging Role in Neurodegenerative Diseases. *Frontiers in molecular neuroscience*, 12, 141. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2019.00141>
- Chen, Y. W., Rada, P. V., Bützler, B. P., Leibowitz, S. F., & Hoebel, B. G. (2012). Corticotropin-releasing factor in the nucleus accumbens shell induces swim depression, anxiety, and anhedonia along with changes in local dopamine/acetylcholine balance. *Neuroscience*, 206, 155–166. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2011.12.009>
- Combe, C. L., & Gasparini, S. (2021). Ih from synapses to networks: HCN channel functions and modulation in neurons. *Progress in biophysics and molecular biology*, 166, 119–132. <https://doi.org/10.1016/j.pbiomolbio.2021.06.002>
- Crupi, R., Impellizzeri, D., & Cuzzocrea, S. (2019). Role of Metabotropic Glutamate Receptors in Neurological Disorders. *Frontiers in molecular neuroscience*, 12, 20. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2019.00020>
- D'Aquila, P. S., Brain, P., & Willner, P. (1994). Effects of chronic mild stress on performance in behavioural tests relevant to anxiety and depression. *Physiology & behavior*, 56(5), 861–867. [https://doi.org/10.1016/0031-9384\(94\)90316-6](https://doi.org/10.1016/0031-9384(94)90316-6)
- Daftary, S. S., Panksepp, J., Dong, Y., & Saal, D. B. (2009). Stress-induced, glucocorticoid-dependent strengthening of glutamatergic synaptic transmission in midbrain dopamine neurons. *Neuroscience letters*, 452(3), 273–276. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2009.01.070>
- de Jong, J. W., Afjei, S. A., Pollak Dorocic, I., Peck, J. R., Liu, C., Kim, C. K., Tian, L., Deisseroth, K., & Lammel, S. (2019). A Neural Circuit Mechanism for Encoding Aversive Stimuli in the Mesolimbic Dopamine System. *Neuron*, 101(1), 133–151.e7. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2018.11.005>
- Delgado-Acevedo, C., Estay, S. F., Radke, A. K., Sengupta, A., Escobar, A. P., Henríquez-Belmar, F., Reyes, C. A., Haro-Acuña, V., Utreras, E., Sotomayor-Zárate, R., Cho, A., Wendland, J. R., Kulkarni, A. B., Holmes, A., Murphy, D. L., Chávez, A. E., & Moya, P. R. (2019). Behavioral and synaptic alterations relevant to obsessive-compulsive disorder in mice with increased EAAT3 expression. *Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology*, 44(6), 1163–1173. <https://doi.org/10.1038/s41386-018-0302-7>

- Di Chiara, G., Loddo, P., & Tanda, G. (1999). Reciprocal changes in prefrontal and limbic dopamine responsiveness to aversive and rewarding stimuli after chronic mild stress: implications for the psychobiology of depression. *Biological psychiatry*, 46(12), 1624–1633. [https://doi.org/10.1016/S0006-3223\(99\)00236-X](https://doi.org/10.1016/S0006-3223(99)00236-X)
- Duman, R. S., & Aghajanian, G. K. (2012). Synaptic dysfunction in depression: potential therapeutic targets. *Science (New York, N.Y.)*, 338(6103), 68–72. <https://doi.org/10.1126/science.1222939>
- Duman, R. S., Aghajanian, G. K., Sanacora, G., & Krystal, J. H. (2016). Synaptic plasticity and depression: new insights from stress and rapid-acting antidepressants. *Nature medicine*, 22(3), 238–249. <https://doi.org/10.1038/nm.4050>
- Douma, E. H., & de Kloet, E. R. (2020). Stress-induced plasticity and functioning of ventral tegmental dopamine neurons. *Neuroscience and biobehavioral reviews*, 108, 48–77. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2019.10.015>
- Drevets, W. C., Price, J. L., Simpson, J. R., Jr, Todd, R. D., Reich, T., Vannier, M., & Raichle, M. E. (1997). Subgenual prefrontal cortex abnormalities in mood disorders. *Nature*, 386(6627), 824–827. <https://doi.org/10.1038/386824a0>
- Escobar, A. P., Martínez-Pinto, J., Silva-Olivares, F., Sotomayor-Zárate, R., & Moya, P. R. (2021). Altered Grooming Syntax and Amphetamine-Induced Dopamine Release in EAAT3 Overexpressing Mice. *Frontiers in cellular neuroscience*, 15, 661478. <https://doi.org/10.3389/fncel.2021.661478>
- Espinosa, P., Girard, B., Lucchini, M., Campanelli, F., Tiriticco, V. & Bellone, C. (2022) Insular cortex to ventral striatum synapses encode valence of social interaction. *bioRxiv* 2022.11.08.515650; doi: <https://doi.org/10.1101/2022.11.08.515650>
- Ferris, M. J., Calipari, E. S., Yorgason, J. T., & Jones, S. R. (2013). Examining the complex regulation and drug-induced plasticity of dopamine release and uptake using voltammetry in brain slices. *ACS chemical neuroscience*, 4(5), 693–703. <https://doi.org/10.1021/cn400026v>
- Gunaydin, L. A., Grosenick, L., Finkelstein, J. C., Kauvar, I. V., Fenno, L. E., Adhikari, A., Lammel, S., Mirzabekov, J. J., Airan, R. D., Zalocusky, K. A., Tye, K. M., Anikeeva, P., Malenka, R. C., & Deisseroth, K. (2014). Natural neural projection dynamics underlying social behavior. *Cell*, 157(7), 1535–1551. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.05.017>
- Jameson, A. N., Siemann, J. K., Melchior, J., Calipari, E. S., McMahon, D. G., & Grueter, B. A. (2023). Photoperiod Impacts Nucleus Accumbens Dopamine Dynamics. *eNeuro*, 10(2), ENEURO.0361-22.2023. <https://doi.org/10.1523/ENEURO.0361-22.2023>
- Hägele, C., Schlagenhaut, F., Rapp, M., Sterzer, P., Beck, A., Bermpohl, F., Stoy, M., Ströhle, A., Wittchen, H. U., Dolan, R. J., & Heinz, A. (2015). Dimensional psychiatry: reward dysfunction and depressive mood across psychiatric disorders. *Psychopharmacology*, 232(2), 331–341. <https://doi.org/10.1007/s00213-014-3662-7>
- Hasler, G., Fromm, S., Carlson, P. J., Luckenbaugh, D. A., Waldeck, T., Geraci, M., Roiser, J. P., Neumeister, A., Meyers, N., Charney, D. S., & Drevets, W. C. (2008). Neural response to catecholamine

- depletion in unmedicated subjects with major depressive disorder in remission and healthy subjects. *Archives of general psychiatry*, 65(5), 521–531. <https://doi.org/10.1001/archpsyc.65.5.521>
- Hammen C. (2005). Stress and depression. *Annual review of clinical psychology*, 1, 293–319. <https://doi.org/10.1146/annurev.clinpsy.1.102803.143938>
- He, Y., Janssen, W. G., Rothstein, J. D., & Morrison, J. H. (2000). Differential synaptic localization of the glutamate transporter EAAC1 and glutamate receptor subunit GluR2 in the rat hippocampus. *The Journal of comparative neurology*, 418(3), 255–269.
- Henriques, J. B., Glowacki, J. M., & Davidson, R. J. (1994). Reward fails to alter response bias in depression. *Journal of abnormal psychology*, 103(3), 460–466. <https://doi.org/10.1037//0021-843X.103.3.460>
- Herman, J. P., McKlveen, J. M., Ghosal, S., Kopp, B., Wulsin, A., Makinson, R., Scheimann, J., & Myers, B. (2016). Regulation of the Hypothalamic-Pituitary-Adrenocortical Stress Response. *Comprehensive Physiology*, 6(2), 603–621. <https://doi.org/10.1002/cphy.c150015>
- Hill, M. N., Helleman, K. G., Verma, P., Gorzalka, B. B., & Weinberg, J. (2012). Neurobiology of chronic mild stress: parallels to major depression. *Neuroscience and biobehavioral reviews*, 36(9), 2085–2117. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2012.07.001>
- Holly, E. N., & Miczek, K. A. (2016). Ventral tegmental area dopamine revisited: effects of acute and repeated stress. *Psychopharmacology*, 233(2), 163–186. <https://doi.org/10.1007/s00213-015-4151-3>
- Horne, S. J., Topp, T. E., & Quigley, L. (2021). Depression and the willingness to expend cognitive and physical effort for rewards: A systematic review. *Clinical psychology review*, 88, 102065. <https://doi.org/10.1016/j.cpr.2021.102065>
- Huang, H., & Trussell, L. O. (2011). KCNQ5 channels control resting properties and release probability of a synapse. *Nature neuroscience*, 14(7), 840–847. <https://doi.org/10.1038/nn.2830>
- Husain, M., & Roiser, J. P. (2018). Neuroscience of apathy and anhedonia: a transdiagnostic approach. *Nature reviews. Neuroscience*, 19(8), 470–484. <https://doi.org/10.1038/s41583-018-0029-9>
- Iredale, P. A., & Duman, R. S. (1997). Glucocorticoid regulation of corticotropin-releasing factor1 receptor expression in pituitary-derived AtT-20 cells. *Molecular pharmacology*, 51(5), 794–799. <https://doi.org/10.1124/mol.51.5.794>
- Jeong, J. Y., Lee, D. H., & Kang, S. S. (2013). Effects of chronic restraint stress on body weight, food intake, and hypothalamic gene expressions in mice. *Endocrinology and metabolism (Seoul, Korea)*, 28(4), 288–296. <https://doi.org/10.3803/EnM.2013.28.4.288>
- Kalueff, A. V., & Tuohimaa, P. (2004). Contrasting grooming phenotypes in C57Bl/6 and 129S1/SvImJ mice. *Brain research*, 1028(1), 75–82. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2004.09.001>
- Kendler, K. S., Karkowski, L. M., & Prescott, C. A. (1999). Causal relationship between stressful life events and the onset of major depression. *The American journal of psychiatry*, 156(6), 837–841. <https://doi.org/10.1176/ajp.156.6.837>

- Klawonn, A. M., & Malenka, R. C. (2018). Nucleus Accumbens Modulation in Reward and Aversion. *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology*, 83, 119–129. <https://doi.org/10.1101/sqb.2018.83.037457>
- Lambert, G., Johansson, M., Agren, H., & Friberg, P. (2000). Reduced brain norepinephrine and dopamine release in treatment-refractory depressive illness: evidence in support of the catecholamine hypothesis of mood disorders. *Archives of general psychiatry*, 57(8), 787–793. <https://doi.org/10.1001/archpsyc.57.8.787>
- Lammel, S., Ion, D. I., Roeper, J., & Malenka, R. C. (2011). Projection-specific modulation of dopamine neuron synapses by aversive and rewarding stimuli. *Neuron*, 70(5), 855–862. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2011.03.025>
- Lammel, S., Lim, B. K., Ran, C., Huang, K. W., Betley, M. J., Tye, K. M., Deisseroth, K., & Malenka, R. C. (2012). Input-specific control of reward and aversion in the ventral tegmental area. *Nature*, 491(7423), 212–217. <https://doi.org/10.1038/nature11527>
- Lemos, J. C., Wanat, M. J., Smith, J. S., Reyes, B. A., Hollon, N. G., Van Bockstaele, E. J., Chavkin, C., & Phillips, P. E. (2012). Severe stress switches CRF action in the nucleus accumbens from appetitive to aversive. *Nature*, 490(7420), 402–406. <https://doi.org/10.1038/nature11436>
- Lemos, J. C., Shin, J. H., & Alvarez, V. A. (2019). Striatal Cholinergic Interneurons Are a Novel Target of Corticotropin Releasing Factor. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 39(29), 5647–5661. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0479-19.2019>
- Liu, C., Goel, P., & Kaeser, P. S. (2021). Spatial and temporal scales of dopamine transmission. *Nature reviews. Neuroscience*, 22(6), 345–358. <https://doi.org/10.1038/s41583-021-00455-7>
- Lowes, D. C., & Harris, A. Z. (2022). Stressed and wired: The effects of stress on the VTA circuits underlying motivated behavior. *Current opinion in endocrine and metabolic research*, 26, 100388. <https://doi.org/10.1016/j.coemr.2022.100388>
- Malhi, G. S., & Mann, J. J. (2018). Depression. *Lancet (London, England)*, 392(10161), 2299–2312. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(18\)31948-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(18)31948-2)
- Malta, M. B., Martins, J., Novaes, L. S., Dos Santos, N. B., Sita, L., Camarini, R., Scavone, C., Bittencourt, J., & Munhoz, C. D. (2021). Norepinephrine and Glucocorticoids Modulate Chronic Unpredictable Stress-Induced Increase in the Type 2 CRF and Glucocorticoid Receptors in Brain Structures Related to the HPA Axis Activation. *Molecular neurobiology*, 58(10), 4871–4885. <https://doi.org/10.1007/s12035-021-02470-2>
- McEwen B. S. (2005). Stressed or stressed out: what is the difference?. *Journal of psychiatry & neuroscience : JPN*, 30(5), 315–318.
- Miller, H. L., Delgado, P. L., Salomon, R. M., Berman, R., Krystal, J. H., Heninger, G. R., & Charney, D. S. (1996). Clinical and biochemical effects of catecholamine depletion on antidepressant-induced remission of depression. *Archives of general psychiatry*, 53(2), 117–128. <https://doi.org/10.1001/archpsyc.1996.01830020031005>

- Mitani, H., Shirayama, Y., Yamada, T., & Kawahara, R. (2006). Plasma levels of homovanillic acid, 5-hydroxyindoleacetic acid and cortisol, and serotonin turnover in depressed patients. *Progress in neuro-psychopharmacology & biological psychiatry*, 30(3), 531–534. <https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2005.11.021>
- Meyer, J. H., Krüger, S., Wilson, A. A., Christensen, B. K., Goulding, V. S., Schaffer, A., Minifie, C., Houle, S., Hussey, D., & Kennedy, S. H. (2001). Lower dopamine transporter binding potential in striatum during depression. *Neuroreport*, 12(18), 4121–4125. <https://doi.org/10.1097/00001756-200112210-00052>
- Moreines, J. L., Owrutsky, Z. L., & Grace, A. A. (2017). Involvement of Infralimbic Prefrontal Cortex but not Lateral Habenula in Dopamine Attenuation After Chronic Mild Stress. *Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology*, 42(4), 904–913. <https://doi.org/10.1038/npp.2016.249>
- Murrough, J. W., Abdallah, C. G., & Mathew, S. J. (2017). Targeting glutamate signalling in depression: progress and prospects. *Nature reviews. Drug discovery*, 16(7), 472–486. <https://doi.org/10.1038/nrd.2017.16>
- Musazzi, L., Racagni, G., & Popoli, M. (2011). Stress, glucocorticoids and glutamate release: effects of antidepressant drugs. *Neurochemistry international*, 59(2), 138–149. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2011.05.002>
- Neuhoff, H., Neu, A., Liss, B., & Roeper, J. (2002). I(h) channels contribute to the different functional properties of identified dopaminergic subpopulations in the midbrain. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 22(4), 1290–1302. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.22-04-01290.2002>
- Nollet, M., Le Guisquet, A. M., & Belzung, C. (2013). Models of depression: unpredictable chronic mild stress in mice. *Current protocols in pharmacology*, Chapter 5, . <https://doi.org/10.1002/0471141755.ph0565s61>
- Nollet M. (2021). Models of Depression: Unpredictable Chronic Mild Stress in Mice. *Current protocols*, 1(8), e208. <https://doi.org/10.1002/cpz1.208>
- O'Shea R. D. (2002). Roles and regulation of glutamate transporters in the central nervous system. *Clinical and experimental pharmacology & physiology*, 29(11), 1018–1023. <https://doi.org/10.1046/j.1440-1681.2002.03770.x>
- Paxinos, G., & Franklin, K. (2004). *The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates*. Compact second edition.
- Payer, D., Williams, B., Mansouri, E., Stevanovski, S., Nakajima, S., Le Foll, B., Kish, S., Houle, S., Mizrahi, R., George, S. R., George, T. P., & Boileau, I. (2017). Corticotropin-releasing hormone and dopamine release in healthy individuals. *Psychoneuroendocrinology*, 76, 192–196. <https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2016.11.034>
- Peciña, M., Sikora, M., Avery, E. T., Heffernan, J., Peciña, S., Mickey, B. J., & Zubieta, J. K. (2017). Striatal dopamine D2/3 receptor-mediated neurotransmission in major depression: Implications for anhedonia, anxiety and treatment response. *European neuropsychopharmacology : the journal of the European College of Neuropsychopharmacology*, 27(10), 977–986. <https://doi.org.uchile.idm.oclc.org/10.1016/j.euroneuro.2017.08.427>

- Phillips, M. L., Chase, H. W., Sheline, Y. I., Etkin, A., Almeida, J. R., Deckersbach, T., & Trivedi, M. H. (2015). Identifying predictors, moderators, and mediators of antidepressant response in major depressive disorder: neuroimaging approaches. *The American journal of psychiatry*, 172(2), 124–138. <https://doi.org/10.1176/appi.ajp.2014.14010076>
- Phillips, A. G., & Ahn, S. (2022). Anticipation: An Essential Feature of Anhedonia. *Current topics in behavioral neurosciences*, 58, 305–323. https://doi.org/10.1007/7854_2022_317
- Pizzagalli, D. A., Jahn, A. L., & O'Shea, J. P. (2005). Toward an objective characterization of an anhedonic phenotype: a signal-detection approach. *Biological psychiatry*, 57(4), 319–327. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2004.11.026>
- Pizzagalli, D. A., Iosifescu, D., Hallett, L. A., Ratner, K. G., & Fava, M. (2008). Reduced hedonic capacity in major depressive disorder: evidence from a probabilistic reward task. *Journal of psychiatric research*, 43(1), 76–87. <https://doi.org/10.1016/j.jpsychires.2008.03.001>
- Pizzagalli, D. A. (2014). Depression, stress, and anhedonia: toward a synthesis and integrated model. *Annual review of clinical psychology*, 10, 393–423. <https://doi.org/10.1146/annurev-clinpsy-050212-185606>
- Planchez, B., Surget, A., & Belzung, C. (2019). Animal models of major depression: drawbacks and challenges. *Journal of neural transmission (Vienna, Austria : 1996)*, 126(11), 1383–1408. <https://doi.org/10.1007/s00702-019-02084-y>
- Rajkowska, G., Miguel-Hidalgo, J. J., Wei, J., Dilley, G., Pittman, S. D., Meltzer, H. Y., Overholser, J. C., Roth, B. L., & Stockmeier, C. A. (1999). Morphometric evidence for neuronal and glial prefrontal cell pathology in major depression. *Biological psychiatry*, 45(9), 1085–1098. [https://doi.org/10.1016/s0006-3223\(99\)00041-4](https://doi.org/10.1016/s0006-3223(99)00041-4)
- Sanacora, G., Yan, Z., & Popoli, M. (2022). The stressed synapse 2.0: pathophysiological mechanisms in stress-related neuropsychiatric disorders. *Nature reviews. Neuroscience*, 23(2), 86–103. <https://doi.org/10.1038/s41583-021-00540-x>
- Schott, B. H., Minuzzi, L., Krebs, R. M., Elmenhorst, D., Lang, M., Winz, O. H., Seidenbecher, C. I., Coenen, H. H., Heinze, H. J., Zilles, K., Düzel, E., & Bauer, A. (2008). Mesolimbic functional magnetic resonance imaging activations during reward anticipation correlate with reward-related ventral striatal dopamine release. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 28(52), 14311–14319. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2058-08.2008>
- Scimemi, A., Tian, H., & Diamond, J. S. (2009). Neuronal transporters regulate glutamate clearance, NMDA receptor activation, and synaptic plasticity in the hippocampus. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 29(46), 14581–14595. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4845-09.2009>
- Sedaghat, K., Yousefian, Z., Vafaei, A. A., Rashidy-Pour, A., Parsaei, H., Khaleghian, A., & Choobdar, S. (2019). Mesolimbic dopamine system and its modulation by vitamin D in a chronic mild stress model of depression in the rat. *Behavioural brain research*, 356, 156–169. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2018.08.020>
- Sherdell, L., Waugh, C. E., & Gotlib, I. H. (2012). Anticipatory pleasure predicts motivation for reward in major depression. *Journal of abnormal psychology*, 121(1), 51–60. <https://doi.org/10.1037/a0024945>

- Shah, P. J., Ogilvie, A. D., Goodwin, G. M., & Ebmeier, K. P. (1997). Clinical and psychometric correlates of dopamine D2 binding in depression. *Psychological medicine*, 27(6), 1247–1256. <https://doi.org/10.1017/s0033291797005382>
- Sheline, Y. I., Sanghavi, M., Mintun, M. A., & Gado, M. H. (1999). Depression duration but not age predicts hippocampal volume loss in medically healthy women with recurrent major depression. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 19(12), 5034–5043. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.19-12-05034.1999>
- Smith, K. S., & Berridge, K. C. (2007). Opioid limbic circuit for reward: interaction between hedonic hotspots of nucleus accumbens and ventral pallidum. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 27(7), 1594–1605. <https://doi-org.uchile.idm.oclc.org/10.1523/JNEUROSCI.4205-06.2007>
- Spreckelmeyer, K. N., Krach, S., Kohls, G., Rademacher, L., Irmak, A., Konrad, K., Kircher, T., & Gründer, G. (2009). Anticipation of monetary and social reward differently activates mesolimbic brain structures in men and women. *Social cognitive and affective neuroscience*, 4(2), 158–165. <https://doi-org.uchile.idm.oclc.org/10.1093/scan/nsn051>
- Stanton, C. H., Holmes, A. J., Chang, S. W. C., & Joormann, J. (2019). From Stress to Anhedonia: Molecular Processes through Functional Circuits. *Trends in neurosciences*, 42(1), 23–42. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2018.09.008>
- Stringaris, A., Vidal-Ribas Belil, P., Artiges, E., Lemaitre, H., Gollier-Briant, F., Wolke, S., Vulser, H., Miranda, R., Penttilä, J., Struve, M., Fadai, T., Kappel, V., Grimmer, Y., Goodman, R., Poustka, L., Conrod, P., Cattrell, A., Banaschewski, T., Bokde, A. L., Bromberg, U., ... IMAGEN Consortium (2015). The Brain's Response to Reward Anticipation and Depression in Adolescence: Dimensionality, Specificity, and Longitudinal Predictions in a Community-Based Sample. *The American journal of psychiatry*, 172(12), 1215–1223. <https://doi.org/10.1176/appi.ajp.2015.14101298>
- Takamura, M., Okamoto, Y., Okada, G., Toki, S., Yamamoto, T., Ichikawa, N., Mori, A., Minagawa, H., Takaishi, Y., Fujii, Y., Kaichi, Y., Akiyama, Y., Awai, K., & Yamawaki, S. (2017). Patients with major depressive disorder exhibit reduced reward size coding in the striatum. *Progress in neuro-psychopharmacology & biological psychiatry*, 79(Pt B), 317–323. <https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2017.07.006>
- Tsien, J. Z., Chen, D. F., Gerber, D., Tom, C., Mercer, E. H., Anderson, D. J., Mayford, M., Kandel, E. R., & Tonegawa, S. (1996). Subregion- and cell type-restricted gene knockout in mouse brain. *Cell*, 87(7), 1317–1326. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)81826-7](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)81826-7)
- Treadway, M. T., & Zald, D. H. (2011). Reconsidering anhedonia in Depression: lessons from translational neuroscience. *Neuroscience and biobehavioral reviews*, 35(3), 537–555. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2010.06.006>
- Tye, K. M., Mirzabekov, J. J., Warden, M. R., Ferenczi, E. A., Tsai, H. C., Finkelstein, J., Kim, S. Y., Adhikari, A., Thompson, K. R., Andalman, A. S., Gunaydin, L. A., Witten, I. B., & Deisseroth, K. (2013). Dopamine neurons modulate neural encoding and expression of depression-related behaviour. *Nature*, 493(7433), 537–541. <https://doi.org/10.1038/nature11740>

- Ubl, B., Kuehner, C., Kirsch, P., Ruttorf, M., Diener, C., & Flor, H. (2015). Altered neural reward and loss processing and prediction error signalling in depression. *Social cognitive and affective neuroscience*, 10(8), 1102–1112. <https://doi.org/10.1093/scan/nsu158>
- Ulrich-Lai, Y. M., & Herman, J. P. (2009). Neural regulation of endocrine and autonomic stress responses. *Nature reviews. Neuroscience*, 10(6), 397–409. <https://doi.org/10.1038/nrn2647>
- Underhill, S. M., Wheeler, D. S., Li, M., Watts, S. D., Ingram, S. L., & Amara, S. G. (2014). Amphetamine modulates excitatory neurotransmission through endocytosis of the glutamate transporter EAAT3 in dopamine neurons. *Neuron*, 83(2), 404–416. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2014.05.043>
- Ungless, M. A., Singh, V., Crowder, T. L., Yaka, R., Ron, D., & Bonci, A. (2003). Corticotropin-releasing factor requires CRF binding protein to potentiate NMDA receptors via CRF receptor 2 in dopamine neurons. *Neuron*, 39(3), 401–407. [https://doi.org/10.1016/s0896-6273\(03\)00461-6](https://doi.org/10.1016/s0896-6273(03)00461-6)
- Wanat, M. J., Hopf, F. W., Stuber, G. D., Phillips, P. E., & Bonci, A. (2008). Corticotropin-releasing factor increases mouse ventral tegmental area dopamine neuron firing through a protein kinase C-dependent enhancement of Ih. *The Journal of physiology*, 586(8), 2157–2170. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2007.150078>
- Wanat, M. J., Willuhn, I., Clark, J. J., & Phillips, P. E. (2009). Phasic dopamine release in appetitive behaviors and drug addiction. *Current drug abuse reviews*, 2(2), 195–213. <https://doi.org/10.2174/18744473710902020195>
- Wang, S. S., Yan, X. B., Hofman, M. A., Swaab, D. F., & Zhou, J. N. (2010). Increased expression level of corticotropin-releasing hormone in the amygdala and in the hypothalamus in rats exposed to chronic unpredictable mild stress. *Neuroscience bulletin*, 26(4), 297–303. <https://doi.org/10.1007/s12264-010-0329-1>
- Waxman, E. A., Baconguis, I., Lynch, D. R., & Robinson, M. B. (2007). N-methyl-D-aspartate receptor-dependent regulation of the glutamate transporter excitatory amino acid carrier 1. *The Journal of biological chemistry*, 282(24), 17594–17607. <https://doi.org/10.1074/jbc.M702278200>
- Willner, P., Golembiowska, K., Klimek, V. & Muscat, R. (1991) Changes in mesolimbic dopamine may explain stress-induced anhedonia. *Psychobiology* 19, 79–84. <https://doi.org/10.1007/BF03337960>
- Yang, M., Silverman, J. L., & Crawley, J. N. (2011). Automated three-chambered social approach task for mice. *Current protocols in neuroscience*, Chapter 8, Unit–8.26. <https://doi.org/10.1002/0471142301.ns0826556>
- Yang, H., de Jong, J. W., Tak, Y., Peck, J., Bateup, H. S., & Lammel, S. (2018). Nucleus Accumbens Subnuclei Regulate Motivated Behavior via Direct Inhibition and Disinhibition of VTA Dopamine Subpopulations. *Neuron*, 97(2), 434–449.e4. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2017.12.022>
- Zarate, C., Jr, Machado-Vieira, R., Henter, I., Ibrahim, L., Diazgranados, N., & Salvatore, G. (2010). Glutamatergic modulators: the future of treating mood disorders?. *Harvard review of psychiatry*, 18(5), 293–303. <https://doi.org/10.3109/10673229.2010.511059>
- Zurawek, D., Faron-Górecka, A., Kuśmider, M., Kolasa, M., Gruca, P., Papp, M., & Dziedzicka-Wasylewska, M. (2013). Mesolimbic dopamine D₂ receptor plasticity contributes to stress resilience in rats

subjected to chronic mild stress. *Psychopharmacology*, 227(4), 583–593.
<https://doi.org/10.1007/s00213-013-2990-3>