

**FACULTAD DE CIENCIAS  
PROGRAMA DE MAGISTER EN CIENCIAS BIOLÓGICAS  
MENCION NEUROCIENCIA**

**Evaluación del efecto de la sobreexpresión del transportador de glutamato EAAT3  
sobre la transmisión sináptica inhibitoria en el hipocampo de ratón.**

**Francisca Henríquez Belmar**

**Tesis para optar al grado de**

**Magíster en Ciencias Biológicas Mención Neurociencia**

**Director de Tesis: Dr. Pablo Moya**

**Cotutor: Dr. Andrés Chávez**

El desarrollo de esta tesis ha sido posible gracias al financiamiento obtenido de los **Proyectos FONDECYT N° 1141272** del Dr. Pablo Moya, **FONDECYT N°1151091** del Dr. Andrés E. Chavez y al **Proyecto NuMIND (NC-130011)** y el instituto **CINV (P09-022-F)**, ambos de la Iniciativa Científica Milenio del Ministerio de economía, fomento y turismo.

## Agradecimientos

A mis tutores **Pablo Moya** y **Andrés Chávez**, a mis compañeros de laboratorio y en especial a **Sebastian Estay** que contribuyó con su trabajo y conocimientos a esta tesis

# ÍNDICE

<i>Índice de figuras</i> .....	6
<i>Glosario de abreviaturas</i> .....	7
<i>Resumen</i> .....	10
<i>Introducción</i> .....	12
Transmisión glutamatérgica y GABAérgica .....	12
Transportadores de Glutamato.....	14
Excitatory amino acid transporter 3 (EAAT3) .....	15
Fisiología del hipocampo.....	18
NEURONAS GABAérgicas: Diferentes tipos y función.....	19
<i>Hipótesis</i> .....	22
<i>Objetivos</i> .....	22
General .....	22
Específicos .....	22
<i>Metodología</i> .....	23
Animales .....	23
Genotipificación de ratones mediante PCR convencional. ....	24
Reacción en cadena de polimerasa (PCR).....	24
Electroforesis de DNA en geles de agarosa .....	25
Registros electrofisiológicos.....	25
Preparación de cortes coronales de hipocampo. ....	25
Registros de campo .....	25
Registros de célula única .....	27
Análisis estadísticos .....	27

<i>Resultados</i> .....	28
Evaluación de la contribución de EAAT3 sobre la transmisión sináptica inhibitoria mediante el uso de un bloqueador selectivo de EAAT3.....	28
Evaluación de los cambios producidos sobre las respuestas sinápticas inhibitorias en el área CA1 del hipocampo de ratones EAAT3glo/GAD65.....	29
Evaluación de los cambios producidos sobre la plasticidad sináptica a corto plazo en las sinapsis inhibitorias en el área CA1 del hipocampo de ratones EAAT3glo/GAD65.....	33
Evaluación de los cambios producidos en la transmisión sináptica inhibitoria por el bloqueo de EAAT3 en animales EAAT3glo/GAD65.....	34
<i>Discusión</i> .....	36
<i>Conclusiones</i> .....	42
<i>Referencias</i> .....	43
<i>Anexos</i> .....	46
Tabla S1: promedios y error estándar figura 10.B.....	46
Tabla S2: Promedios y error estándar figura 10.C.....	46
Tabla S3: Promedios y error estándar figura 11.A.....	47
Tabla S4: Promedios y error estándar figura 11.B.....	47
Tabla S5: Promedios y error estándar figura 12.A.....	48
Tabla S6: Promedios y error estándar figura 12.B.....	48
Tabla S7: Promedios y error estándar figura 13.A.....	49
Tabla S8: Promedios y error estándar figura 13.B.....	50
Tabla S9: Promedios y error estándar figura 14.A.....	51
Tabla S10: Promedios y error estándar figura 14.B.....	51

## ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1. PRINCIPALES COMPONENTES DE LA SINAPSI GLUTAMATÉRGICA .....	12
FIGURA 2. NEUROTRANSMISIÓN GABAÉRGICA .....	13
FIGURA 3. ESTEQUIOMETRÍA DE ACOPLAMIENTO DE FLUJO DE IONES.....	14
FIGURA 4. TRANSMISIÓN SINÁPTICA EXCITATORIA DEPENDIENTE DE NMDA SE ENCUENTRA ALTERADA EN LAS SINAPSI CORTICO-ESTRIATAL DE ANIMALES E3TG <sup>GLO</sup> /CAMKII .....	16
FIGURA 5. FIGURAS REPRESENTATIVAS DE LOS TRABAJOS DE ROTHSTEIN (I) Y HOLMSETH (II) EN LAS QUE SE MUESTRA LA EXPRESIÓN DE EAAT3 EN NEURONAS GABAÉRGICAS.....	17
FIGURA 6 ORGANIZACIÓN LAMINAR DEL HIPOCAMPO.....	19
FIGURA 7. REPRESENTACIÓN ESQUEMÁTICA DE LOS SUBTIPOS DE INTERNEURONAS DEL HIPOCAMPO....	20
FIGURA 8. RATÓN GAD65-E3TG PRESENTA AUMENTO EN LA EXPRESIÓN DE EAAT3 EN HIPOCAMPO .....	21
FIGURA 9. ....	23
<i>FIGURA 10.</i> .....	29
FIGURA 11. ....	30
FIGURA 12. ANÁLISIS DE LAS PROPIEDADES INPUT-OUTPUT DE LA TRANSMISIÓN INHIBITORIA EN CA1 DE ANIMALES CON SOBREENPRESIÓN DE EAAT3 N NEURONAS GABAÉRGICAS.....	31
FIGURA 13. ANÁLISIS DE CAMBIOS EN LA PROBABILIDAD DE LIBERACIÓN PRODUCIDO POR LA SOBREENPRESIÓN CONDICIONAL DE EAAT3. ....	32
FIGURA 14. ANÁLISIS DE LAS CONSECUENCIAS DE LA SOBREENPRESIÓN DE EAAT3 SOBRE LA PLASTICIDAD SINÁPTICA INHIBITORIA A CORTO PLAZO.....	33
FIGURA 15. EFECTOS DE LA APLICACIÓN DE UN BLOQUEADOR ESPECÍFICO DE EAAT3 SOBRE LA TRANSMISIÓN SINÁPTICA INHIBITORIA EN ANIMALES EAAT3GLO/GAD65 .....	34

## GLOSARIO DE ABREVIATURAS

### Unidades

°C	Grados celcius
A	Ampere
nA	Nano Ampere
Hz	Hertz
L	Litro
mL	Mili Litro
µL	Micro Litro
m	Metro
cm	Centimetro
µm	Micro metro
min	Minuto
M	Molar
mM	Mili molar
µM	Micro molar
s	Segundo
ms	Mili segundo
V	Voltios
mV	Mili Voltios

### Iones

Ca <sup>+2</sup>	Ion calcio
Cl <sup>-</sup>	Ion cloruro
H <sup>+</sup>	Ion hidrogeno (protón)
K <sup>+</sup>	Ion potasio
Na <sup>+</sup>	Ion Sodio

### Moleculas

APV	DL-2-Amino-5-phosphonopentanoic acid
CaCl <sub>2</sub>	Cloruro de calcio
CsCl	Cloruro de cesio
CNQX	cyanquixaline (6-cyano-7-nitroquinoxaline-2,3-dione)
DMSO	Dimetilsulfóxido
EGTA	Ácido egtázico
GTP	Guanosín trifosfato
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid
KCl	Cloruro de potasio

<b>MgATP</b>	Adenosina 5'-trifosfato de sal de magnesio
<b>MgSO<sub>4</sub></b>	Sulfato de magnesio
<b>NaCl</b>	Cloruro de sodio
<b>NaHCO<sub>3</sub></b>	Bicarbonato de sodio
<b>3Na<sub>2</sub>PO<sub>4</sub></b>	Fosfato de sodio
<b>Otras abreviaturas</b>	
<b>ACSF</b>	Líquido cefalo raquídeo artificial
<b>AMPA</b>	Adenosina 5'-trifosfato de sal de magnesio
<b>Asp-</b>	Aspartato
<b>CA1-3</b>	Cuerno de amonio 1-3
<b>CamKII</b>	Proteína quinasa II dependiente de calcio y calmodulina
<b>CCK</b>	Colecistoquinina
<b>Cre</b>	Proteína Cre recombinasa
<b>D1R</b>	Receptor de Dopamina tipo 1
<b>DNA</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>gDNA</b>	DNA genómico
<b>DPN</b>	Día post natal
<b>EAAT</b>	Transportador de aminoácidos excitatorios
<b>EGFP</b>	Proteína verde fluorescente
<b>Fw</b>	Forward
<b>GABA</b>	Ácido gamma-aminobutírico
<b>GABAA-R</b>	Receptor de GABA tipo A
<b>GABAB-R</b>	Receptor de GABA tipo B
<b>GABA-T</b>	Transportador de GABA
<b>GAD</b>	Glutamato descarboxilasa
<b>V-GAT</b>	Transportador de GABA vesicular
<b>GLAST</b>	Transportador de glutamato y aspartato (EAAT1)
<b>GLT-1</b>	Transportador de glutamato 1 (EAAT1)
<b>IPSC</b>	Corriente post sináptica inhibitoria
<b>mIPSC</b>	Corriente post sináptica inhibitoria miniatura
<b>SIPSC</b>	Corriente post sináptica inhibitoria espontánea
<b>IPSP</b>	Potencial post sináptico inhibitorio
<b>fIPSP</b>	Potencial post sináptico inhibitorio de campo
<b>I/O</b>	Entrada/salida del inglés Input /output
<b>KO</b>	Knock out
<b>loxP</b>	locus of X-over P1
<b>MAOB</b>	Monoamino oxidasa
<b>mGluR</b>	Receptor metabotrópico de glutamato

<b>NMDA</b>	Ácido N-metil-D-aspartico
<b>NR2A</b>	Subunidad 2A del receptor NMDA
<b>NR2B</b>	Subunidad 2B del receptor NMDA
<b>PCR</b>	Reacción en cadena de la polimerasa
<b>PPR</b>	Razón de pulsos pareados
<b>PV</b>	Parvo albumina
<b>rev</b>	reverse
<b>RNA</b>	Acido ribonucleico
<b>mRNA</b>	RNA mensajero
<b>RT-qPCR</b>	Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real con transcriptasa inversa
<b>SNC</b>	Sistema nervioso central
<b>SOM</b>	Somatostatina
<b>STP</b>	Plasticidad a corto plazo
<b>V-Glut</b>	Transportador de glutamato vesicular

## RESUMEN

El aminoácido L-glutamato es el principal mediador de señales excitatorias en el sistema nervioso central (SNC) de mamíferos, y está involucrado en una serie de funciones cerebrales incluyendo cognición, memoria y aprendizaje. La remoción de este neurotransmisor es un paso esencial en la sinapsis glutamatérgica, tanto por su rol en el proceso de término de la señal como por impedir la excitotoxicidad producida debido a la acumulación de altos niveles de glutamato en el espacio extracelular. Dicha remoción es mediada por la familia de proteínas EAAT, las cuales funcionan como transportadores de glutamato de alta afinidad.

EAAT3 se encuentra expresado en la densidad post sináptica en las sinapsis glutamatérgicas donde, a través del transporte de glutamato, limita su difusión durante los eventos sinápticos. Del mismo modo, EAAT3 regula la activación de los receptores de glutamato del tipo NMDA (NMDAR), específicamente aquellos que contienen la subunidad NR2B y que típicamente se encuentran ubicados fuera del espacio sináptico (peri-sinapsis). En esta línea, nuestro grupo observó que en un modelo de ratón de sobreexpresión de EAAT3 se producen cambios en las subunidades del receptor de NMDA y en la plasticidad sináptica dependiente de estos receptores. Estas evidencias sugieren que EAAT3 estaría jugando un rol importante en la regulación de la comunicación neuronal y plasticidad sináptica dependiente del NMDAR.

Estudios de inmunoblot han demostrado la presencia de EAAT3 en neuronas GABAérgicas, y estudios en un modelo deficiente de EAAT3 (knockout, KO) se encontró un aumento de la excitabilidad neuronal y a una disminución en la síntesis de ácido  $\gamma$ -amino butírico (GABA) en estas neuronas. Además, se ha demostrado que, al disminuir farmacológicamente la recaptura de glutamato por los transportadores gliales, este neurotransmisor difunde hacia las sinapsis

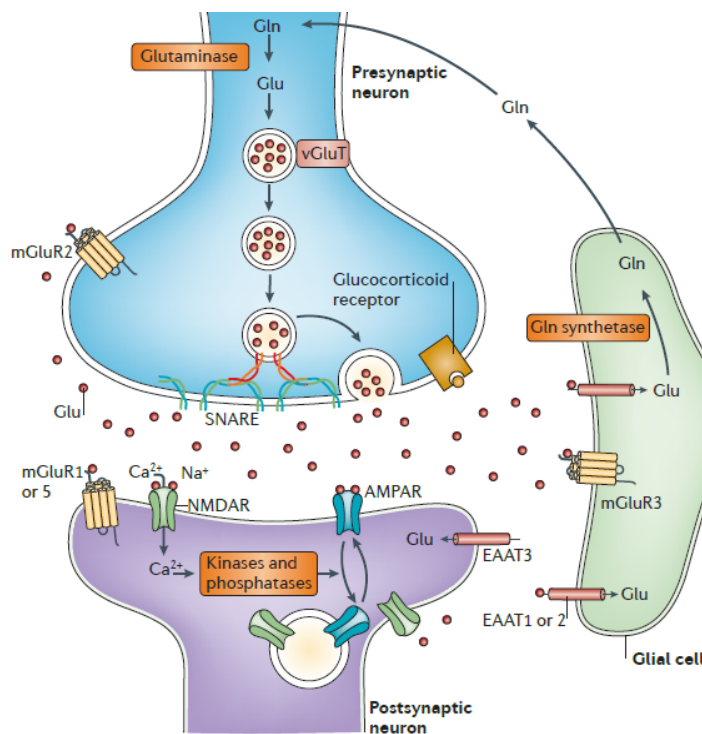
inhibitorias, donde el ingreso de glutamato hacia las neuronas GABAérgicas dado por EAAT3 podría regular dinámicamente la transmisión inhibitoria.

Si bien en su conjunto esta evidencia sugiere que los transportadores de glutamato neuronales EAAT3 juegan un rol en la transmisión sináptica tanto excitadora como inhibitoria, la ausencia de un inhibidor selectivo para EAAT3 ha hecho difícil comprender el papel fisiológico de los EAAT3 en la comunicación neuronal. Mientras, cambios en la función/expresión de EAAT3 han sido asociados con patologías psiquiátricas como la ansiedad y el trastorno obsesivo compulsivo, los estudios en animales carentes de EAAT3 (KO) o heterocigotos no muestran alteraciones en conductas basales tipo ansiosas y compulsivas. Alternativamente, estudios genéticos y un estudio reciente de nuestro laboratorio han sugerido que una sobreexpresión de este transportador podría jugar un rol en estas patologías y en la regulación de la transmisión sináptica en el SNC. Es por ello, que en el presente trabajo de tesis nos propusimos evaluar los efectos del aumento de los niveles de EAAT3 sobre la transmisión sináptica inhibitoria, utilizando un modelo de ratón con sobreexpresión condicional de EAAT3 en neuronas GABAérgicas bajo el promotor GAD65. En particular, evaluamos estos efectos en el hipocampo, un área cerebral importante en los procesos de memoria y aprendizaje, y donde alteraciones en la comunicación neuronal se han involucrado en variadas patologías incluidas la epilepsia.

# INTRODUCCIÓN

## TRANSMISIÓN GLUTAMATÉRGICA Y GABAÉRGICA.

El aminoácido L-glutamato es el principal mediador de señales excitatorias en el sistema nervioso central (SNC), y está involucrado en una serie de funciones cerebrales incluyendo cognición, memoria y aprendizaje. Además, está involucrado en procesos del desarrollo tales como inducción de sinapsis y migración, diferenciación y muerte celular, siendo uno de los componentes claves en el metabolismo celular y como precursor del ácido GABA, el cual es el principal neurotransmisor inhibitorio del SNC (Danbolt, 2001).

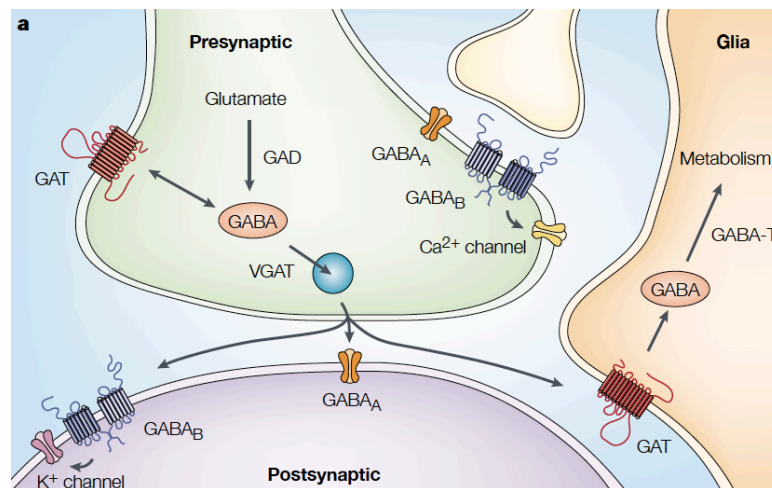


**Figura 1. Principales componentes de la sinapsis glutamatergica**

El glutamato es el neurotransmisor excitador primario en el cerebro adulto. Se empaqueta en vesículas en los terminales del axón mediante el transportador de glutamato vesicular, vGluT. El glutamato se une tanto a los receptores ionotrópicos (NMDA, AMPA y kainato) como a los receptores metabotrópicos (mGluR), postsinápticos, extrasinápticos y presinápticos. Las células gliales, principalmente los astrocitos, desempeñan un papel principal en la recaptación de glutamato a través de los transportadores EAAT1 y EAAT2, que terminan la señal sináptica del glutamato; el transportador neuronal EAAT3 desempeña un papel cuantitativamente menor en este proceso (Imagen tomada desde Pittenger et al., 2011)

Cuando se produce el potencial de acción, el glutamato es rápidamente liberado desde las vesículas presentes en la neurona pre sináptica, difundiendo a través del espacio sináptico para unirse tanto a receptores como transportadores (Figura 1). Una vez liberado, el glutamato es reconocido por receptores de glutamato del tipo ionotrópico como son los NMDA, AMPA y KAINATO y del tipo metabotrópico pertenecientes a la familia de los mGluR del grupo 1 (mgluR1-5).

Por otro lado, GABA es el principal neurotransmisor inhibitorio en el SNC, el cual es sintetizado principalmente en las neuronas que lo utilizan (neuronas GABAérgicas). Su precursor es el glutamato y su biosíntesis es llevada a cabo por la descarboxilación de glutamato catalizada por la Ácido Glutámico Descarboxilasa (GAD) (Figura 4). De este modo, GAD es un buen marcador de neuronas GABAérgicas (Buddhala, Hsu, & Wu, 2009). Cuando GABA es liberado al espacio sináptico es reconocido por receptores ionotrópicos (GABA-A), los cuales funcionan como canales de  $\text{Cl}^-$  hiperpolarizando la neurona y alejándola del umbral de excitación (Govindpani et al., 2017) (Figura 2).

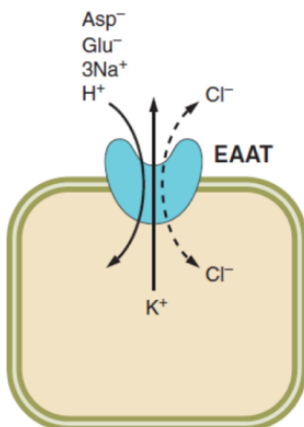


**Figura 2. Neurotransmisión GABAérgica**

GABA se sintetiza a partir de glutamato mediante la acción de la descarboxilasa del ácido glutámico (GAD) en el terminal sináptico de la neurona GABAérgica. El GABA se recluta en vesículas sinápticas mediante la acción del transportador vesicular GABA (vGAT). Después de la despolarización de la membrana, GABA se libera en la sinapsis y puede unirse a los receptores ionotrópicos GABA<sub>A</sub> (GABAAR) o metabotrópicos GABA<sub>B</sub> (GABABR) en la membrana postsináptica, dando como resultado la inhibición de la neurona postsináptica. El GABA liberado se elimina de la sinapsis mediante transportadores de GABA (GAT) unidos a la membrana, localizados en neuronas y astrocitos. En los astrocitos, el GABA se recicla en vesículas sinápticas o es absorbido por las mitocondrias, donde se metaboliza mediante GABA transaminasa (GABA-T) a glutamina para la absorción neuronal (*Imagen tomada desde Govindpani et al, 2017*) por las mitocondrias, donde se metaboliza mediante GABA transaminasa (GABA-T) a glutamina para la absorción neuronal (*Imagen tomada desde Owens et al, 2002*).

## TRANSPORTADORES DE GLUTAMATO

Un paso esencial en la sinapsis glutamatérgica es la rápida eliminación del glutamato extracelular, proceso que es utilizado como mecanismo de término de señal y, a su vez, para prevenir la excitotoxicidad producida por altos niveles de glutamato (Tzingounis and Wadiche, 2007). Por ello, en el SNC se expresan diferentes transportadores de glutamato presentes en la membrana plasmática. Dentro de estos diversos tipos de transportadores, se encuentran los transportadores de aminoácidos excitatorios (EAATs); estas proteínas son los principales encargados de regular las concentraciones de glutamato extracelular, manteniendo bajos los niveles de excitotoxicidad y contribuyendo a la remoción del glutamato liberado durante la transmisión sináptica (Tzingounis and Wadiche, 2007). El transporte de glutamato a través de estas proteínas se realiza acoplado al cotransporte de 3 iones  $\text{Na}^+$  y 1  $\text{H}^+$  y al antiporte de un ion  $\text{K}^+$  (Figura 3). El co-transporte de iones  $\text{Cl}^-$  también se encuentra asociado al transporte de glutamato, pero en diferente proporción, dependiendo del transportador que se esté utilizando (Amara & Fontana, 2002). Estudios recientes sugieren que la mayoría de los EAATs se encuentran predominantemente localizados en neuronas pre-sinápticas y células gliales. Hasta ahora, se han identificado 2 subtipos localizados en células gliales GLT-1 (EAAT2) y GLAST-1 (EAAT1) estos transportadores serían los principales encargados de regular las concentraciones de glutamato extracelular (Amara & Fontana, 2002).



**Figura 3. Estequiometría de acoplamiento de flujo de iones.**

El transporte de glutamato por los EAAT está acoplado al cotransporte de 3  $\text{Na}^+$  y 1  $\text{H}^+$  seguido del contratransporte de 1  $\text{K}^+$  (imagen tomada desde Vandenberg et al, 2013).

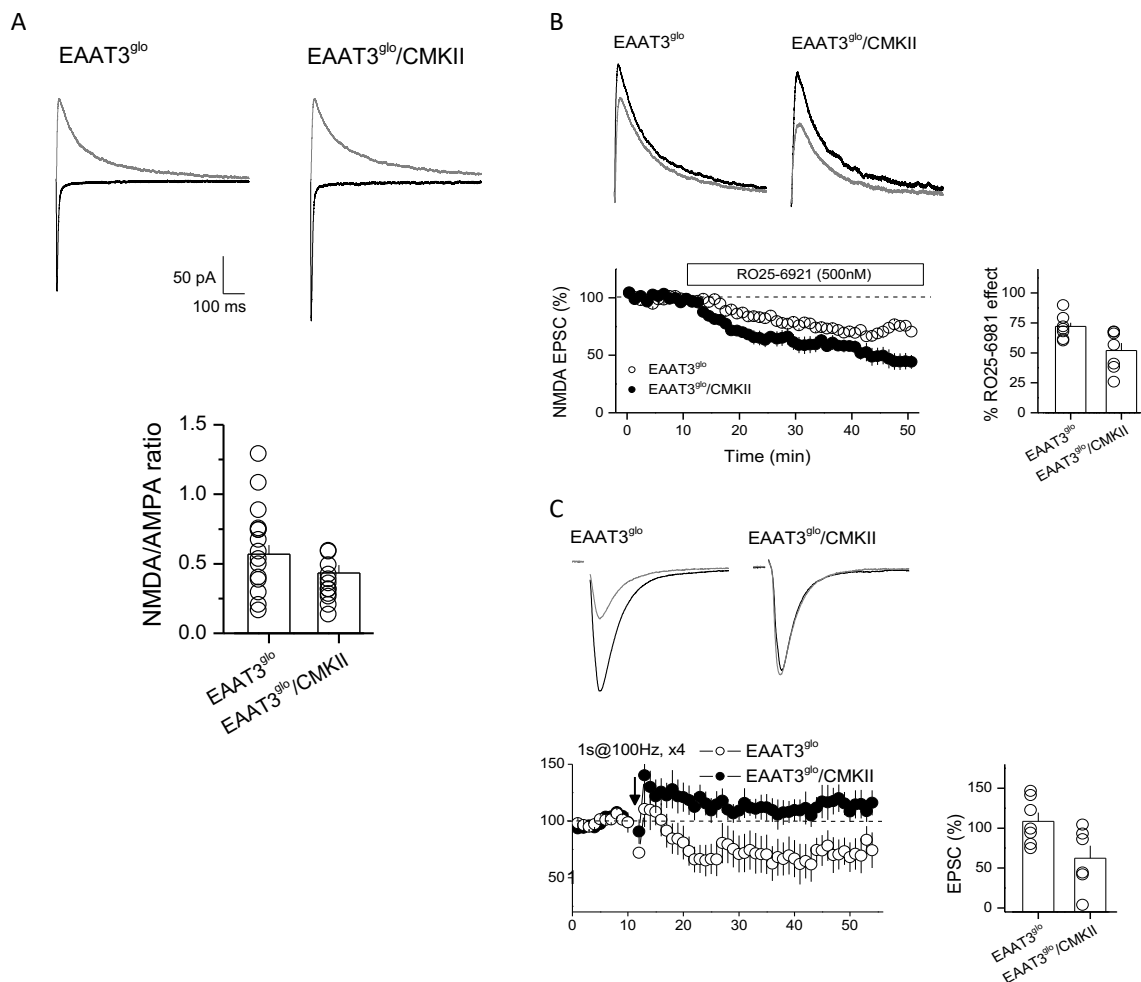
Por otro lado, los transportadores EAAT3 (EAAC1) y EAAT4 se encuentran predominantemente localizados a nivel post sináptico, en los cuerpos celulares y dendritas de las neuronas (Amara & Fontana, 2002).

### EXCITATORY AMINO ACID TRANSPORTER 3 (EAAT3)

Este transportador, al igual que las otras proteínas pertenecientes a la familia EAAT, se encuentra en la membrana plasmática en forma de trímero, formado por subunidades idénticas que contribuyen a la formación del poro de transporte en la membrana plasmática (Danbolt, 2001). En el SNC, EAAT3 es encontrado en altas cantidades en el hipocampo, cerebelo, retina y ganglios basales (He et al, 2000) sin embargo, su función en la comunicación neuronal aún no está completamente clara. Por ejemplo, un estudio realizado por He y colaboradores sugiere que EAAT3 se encuentra preferencialmente en la membrana peri sináptica y no en la membrana sináptica (He et al., 2000). Por otro lado, Scimemi y colaboradores en 2009, mediante un estudio en ratones EAAT3 KO vieron que en las sinapsis excitatorias del hipocampo ocurre un gran decaimiento en las corrientes de transporte de glutamato en astrocitos mediadas por EAAT1 y EAAT2. Los autores sugieren que la función predominante de EAAT3 en estos procesos es hacer de amortiguador, en vez de transportar rápidamente glutamato. Estos efectos amortiguadores aumentan la probabilidad de captura de glutamato por EAAT1 y EAAT2 (Scimemi et al, 2009). Recientemente, Bellini y colaboradores demostraron que EAAT3, en cuerpo estriado, limita la activación de los receptores metabotrópicos de glutamato mGluR1, lo cual a su vez promueve la expresión de receptores de dopamina D1 y la plasticidad a largo plazo (Bellini et al, 2018). Esta evidencia sugiere la participación de EAAT3 en el control fásico de los niveles de glutamato, mientras que GLAST y GLT1 participan en el control tónico de éstos (Bellini et al, 2018). En conjunto, estos mecanismos estarían

limitando la activación de los receptores perisinápticos NR2B-NMDA y así aumentando el límite por inducción de la potenciación a largo plazo (Bellini et al, 2018).

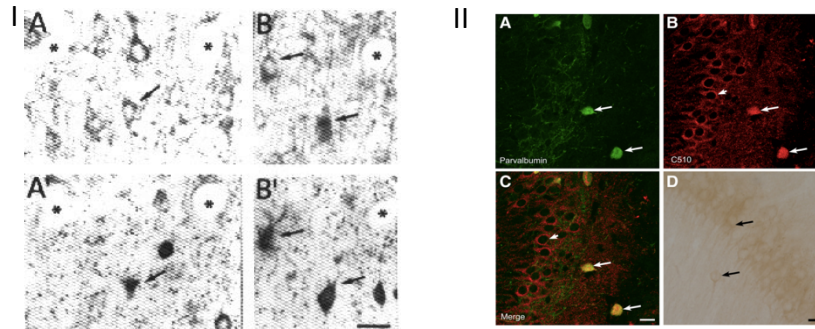
Por otro lado, recientemente nuestro grupo generó y caracterizó un modelo de ratón con sobreexpresión condicional de EAAT3 bajo el promotor de CAMKII $\alpha$  (E3TG<sup>gló</sup>/CAMKII). Este modelo presenta perturbaciones en la sinápsis glutamatérgica cortico-estriatal, donde se vieron cambios en la razón de las subunidades de NMDA NR2A y NR2B, y una alteración de la plasticidad sináptica dependiente de NMDA (ver Figura 4). Esto sugiere que la sobre-expresión de EAAT3 modifica la plasticidad sináptica dependiente de NMDA en cuerpo estriado (Delgado et al, 2018).



**Figura 4. Transmisión sináptica excitatoria dependiente de NMDA se encuentra alterada en las sinapsis cortico-estriatal de animales E3Tg<sup>gló</sup>/CAMKII**

(A) no se encontraron diferencias significativas en la razón NMDA/AMPA de E3Tg<sup>gló</sup>/CAMKII en comparación con animales control (B) transmisión sináptica excitatoria en animales E3Tg<sup>gló</sup>/CAMKII es más sensible al bloqueo de la subunidad NR2B de los receptores NMDA con RO25-6981 en comparación con control (C) Plasticidad sináptica dependiente de NMDA en MSN de cuerpo estriado se encuentra alterada en animales sobreexpresión (Imagen tomada de Delgado et al,2018).

Mediante inmunohistoquímica e inmunofluorescencia, se ha demostrado que EAAT3 se encuentra presente en varios tipos de neuronas, incluyendo los cuerpos celulares (soma) de las neuronas GABAérgicas ((Rothstein et al 1994; Conti et al., 1998; He et al., 2000;Holmseth et al., 2012)) (Figura 5)



**Figura 5. Figuras representativas de los trabajos de Rothstein (I) y Holmseth (II) en las que se muestra la expresión de EAAT3 en neuronas GABAérgicas.** (I) Co-localización de EAAT3 y GAD. Fotomicrografías pareadas de planos enfrentados de dos secciones consecutivas procesadas con EAAT3 (A, B) y GAD (A', B'). Los asteriscos indican los perfiles de los vasos sanguíneos que se utilizaron como puntos de referencia. Las flechas apuntan a las neuronas que expresan ambos antígenos. Barra de escala: 40  $\mu$ m (II) interneuronas GABAérgicas del hipocampo que expresan parvalbúmina también expresan EAAT3. A – C, Anti-parvalbumin (A, verde), anti-EAAT3 (B, rojo), y una imagen combinada de los dos (C). D, Anti-EAAT3 desarrollado con el sistema de etiquetado diaminobenzidina-peroxidasa. Tanto EAAT3 como parvalbúmina se expresan en cuerpos celulares en el estrato piramidal (punta de flecha) y el estrato radiatum (flechas).

Por otro lado, utilizando un modelo de ratas knock down para EAAT3 se ha demostrado un aumento de la excitabilidad neuronal y una disminución de la inhibición tónica en el hipocampo junto a una disminución de la síntesis de GABA; los autores propusieron que EAAT3 podría estar participando en la síntesis de GABA debido a que proveería de glutamato (precursor de GABA) a la neurona GABAérgica (Sepkuty et al., 2002). De hecho, utilizando farmacología en rebanadas de hipocampo, se ha demostrado que durante el bloqueo de estos transportadores se reducen las

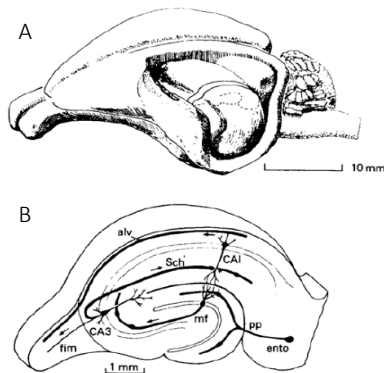
corrientes miniaturas mediadas por el receptor de GABAA (mIPSC), lo que sugiere que la síntesis de GABA y, en consecuencia, el llenado vesicular se redujeron, mientras que el aumento de glutamato aumentaba estas corrientes (Mathews & Diamond, 2003). Más recientemente, mediante el uso de farmacología y pruebas de inmunomarcaje se observó que, al bloquear la recaptura glial de glutamato, este neurotransmisor difunde hacia las sinapsis inhibitoras. En este contexto, la recaptura de glutamato por EAAT3 presente en las neuronas GABAérgicas produce una regulación dinámica de la transmisión inhibitoria, característica única de las sinapsis axodendríticas que pueden desempeñar un papel en el mantenimiento del equilibrio homeostático (Stafford et al, 2010).

Estas evidencias apoyan la hipótesis de que la presencia de EAAT3 estaría cumpliendo un importante rol en la regulación de las sinápsis inhibitorias. Sin embargo, hasta la fecha se desconoce cuál sería el rol que cumple esta proteína en el sistema GABAérgico. Es por esta razón que nos propusimos estudiar el papel funcional de los transportadores EAAT3 sobre la comunicación neuronal GABAérgica en el hipocampo, dada sus características estructurales y organizacionales, y su importancia en procesos cognitivos como memoria y aprendizaje.

#### FISIOLOGÍA DEL HIPOCAMPO

Dada su estructura y organización, el hipocampo es una de las estructuras más ampliamente estudiadas del SNC debido a su función en procesos de memoria y aprendizaje (Reznikov, 1991). Este se divide en dos zonas conocidas como la *fascia dentata* (giro dentado) y el hipocampo propiamente tal (cuerno de Amón) (O'keefe et al, 1978). Mientras el giro dentado está compuesto por tres capas: 1) la capa granular, 2) la capa molecular y 3) la capa de las células polimórficas o *hilus*, el cuerno de Amón se caracteriza por presentar una capa principal de neuronas piramidales en la cual se distinguen tres regiones llamadas CA<sub>1</sub>, CA<sub>2</sub> y CA<sub>3</sub> (O'keefe et al., 1978.).

El hipocampo recibe aferencias excitatorias desde la corteza entorrinal hasta el giro dentado, el cual envía sus proyecciones hasta el área CA3 (Mossy fibers). A su vez CA3 envía proyecciones a CA1 conocidas como las colaterales de Schaffer, quienes a su vez proyectan sus axones a la corteza entorrinal, es decir, vuelve la información al circuito original (Figura 6) (McBain,2017).



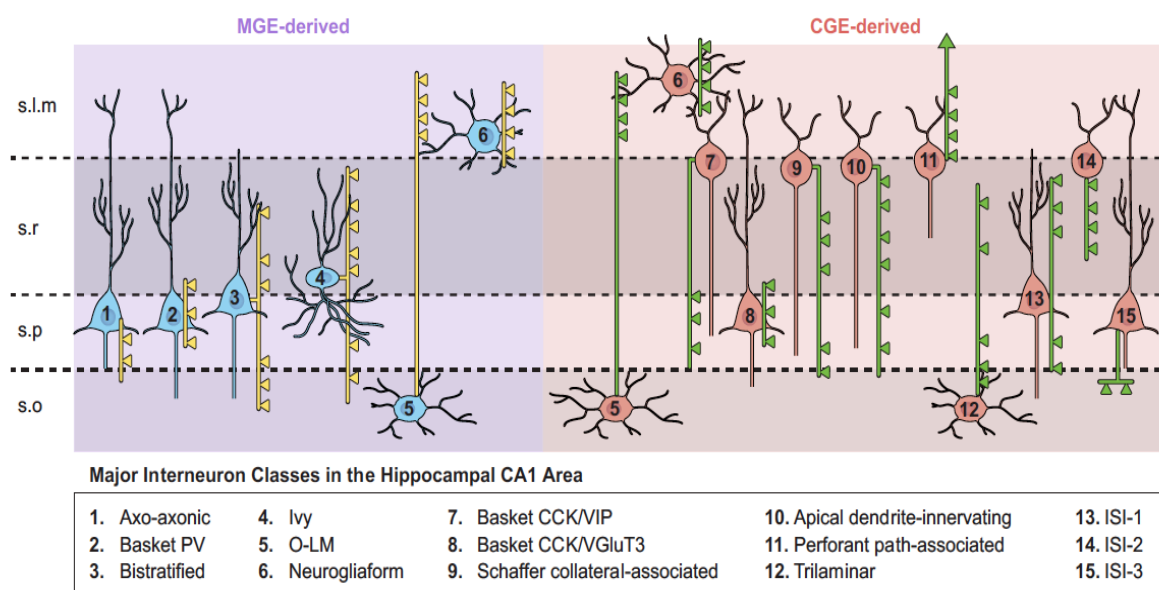
**Figura 6 Organización laminar del hipocampo**

(a) vista lateral del cerebro de rata con el neocórtex lateral y parietal removido para exponer la formación hipocámpica. La rebanada laminar es presentada en (b) para mostrar el circuito hipocámpico, alv, alveus; ento, corteza entorrinal; fim, fimbria; pp, Vía perforante; Sch, colaterales de Schaffer (Figura tomada desde O'keefe, 1978).

## NEURONAS GABAERGICAS: DIFERENTES TIPOS Y FUNCIÓN.

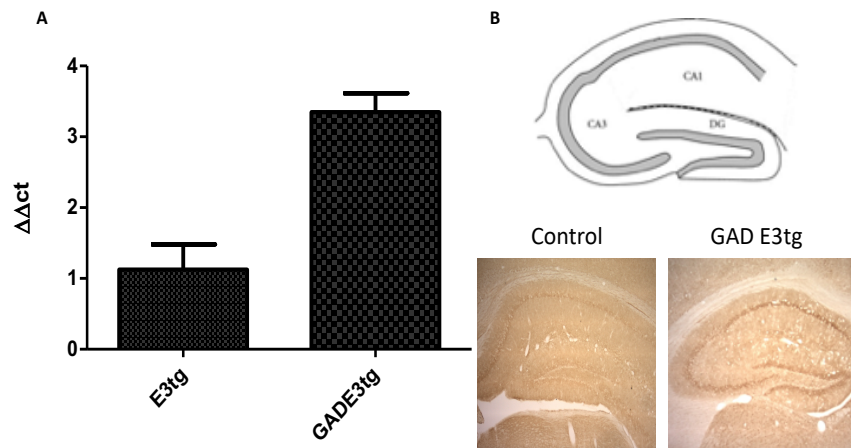
Además de las células piramidales, el hipocampo posee una gran variedad de interneuronas GABAérgicas que median la inhibición de las células principales. Estas interneuronas tienen sus cuerpos celulares dispersos en todos los subcampos del hipocampo, y la posición de sus arborizaciones somatodendríticas les permite integrarse desde un repertorio de entrada aferente intrínseco y extrínseco más restringido que sus homólogos de células piramidales (McBain, 2017). Existen varios tipos de interneuronas GABAérgicas que varían según su patrón de disparo, perfil de expresión y sus proyecciones hacia distintos dominios de las células piramidales. Un grupo son las interneuronas GABAérgicas del tipo parvalbúmina (PV), las cuales se dividen, según el dominio celular al cual inervan, en 3 tipos principales: células axo-axónicas que inervan el segmento axonal inicial de las células piramidales; células en Canasto (Basket Cells) que inervan cuerpos celulares y

dendritas proximales y Células Biestratificadas que inervan dendritas basales. Otras interneuronas que se encuentran en el hipocampo son las llamadas interneuronas de colesistoquinina (CCK), que inervan el soma y las dendritas proximales y apicales (Klausberger & Somogyi, 2008); las células en candelabro (Chandelier cells) con axones que se ubican paralelamente al segmento axónico principal de las células piramidales y granulares, y por ultimo las células Somatostatina positivas (SOM) (Freund & Buzsáki, 1998) (Figura 7).



**Figura 7. Representación esquemática de los subtipos de interneuronas del hipocampo.** Los subtipos de interneuronas se analizan según su origen dentro de la eminencia ganglionar medial (MGE) o eminencia ganglionar caudal (CGE). Las células con orígenes duales están representadas en ambas cohortes. Los perfiles somato dendríticos se representan en color uniforme (azul para MGE, rojo para CGE). Las trayectorias de los axones más delgados se ilustran en amarillo (células derivadas de MGE) y verde (células derivadas de CGE) con triángulos que ilustran los dominios dirigidos predominantemente de células piramidales CA1 inervadas por cada subtipo de interneurona (Figura tomada desde McBain et al 2017).

En este trabajo nos propusimos analizar la transmisión sináptica inhibitoria de un modelo murino de sobreexpresión condicional de EAAT3 en neuronas GABAérgicas bajo el promotor GAD65, con el fin de contribuir al entendimiento de cuáles son los procesos que se ven afectados por esta modificación. Estudios preliminares, mediante RT-qPCR, dan cuenta que estos animales (GAD65-E3tg) poseen un aumento en los niveles de mRNA para EAAT3 en hipocampo de aproximadamente 4 veces en relación con los ratones control, junto a un incremento de neuronas marcadas para EAAT3 en CA1 (Figura 8).



**Figura 8. Ratón GAD65-E3tg presenta aumento en la expresión de EAAT3 en Hipocampo** (A) Aumento de la expresión del mRNA para Slc1a1 en Hipocampo completo. (B) InmunoHistoquímica de EAAT3 en rebanadas de hipocampo, se observa un aumento de la marcación para EAAT3 en CA1.

Dados los argumentos antes expuestos, y el aumento de la expresión de EAAT3 en neuronas GABAérgicas de hipocampo, es posible sugerir que exista un aumento de la transmisión inhibitoria, y por lo tanto del tono inhibitorio sobre las neuronas piramidales de CA1, alterando así la transmisión sináptica inhibitoria.

## HIPÓTESIS

La sobre expresión de EAAT3 en interneuronas GABAérgicas producirá un aumento en el nivel de glutamato intracelular lo que generará un aumento de las respuestas sinápticas inhibitorias en el hipocampo de ratón.

## OBJETIVOS

### GENERAL

Determinar los cambios funcionales que se producen a nivel de sinapsis inhibitoria debido a la sobreexpresión condicional de EAAT3 en neuronas GABAérgicas de ratones (EAAT3glo/GAD65).

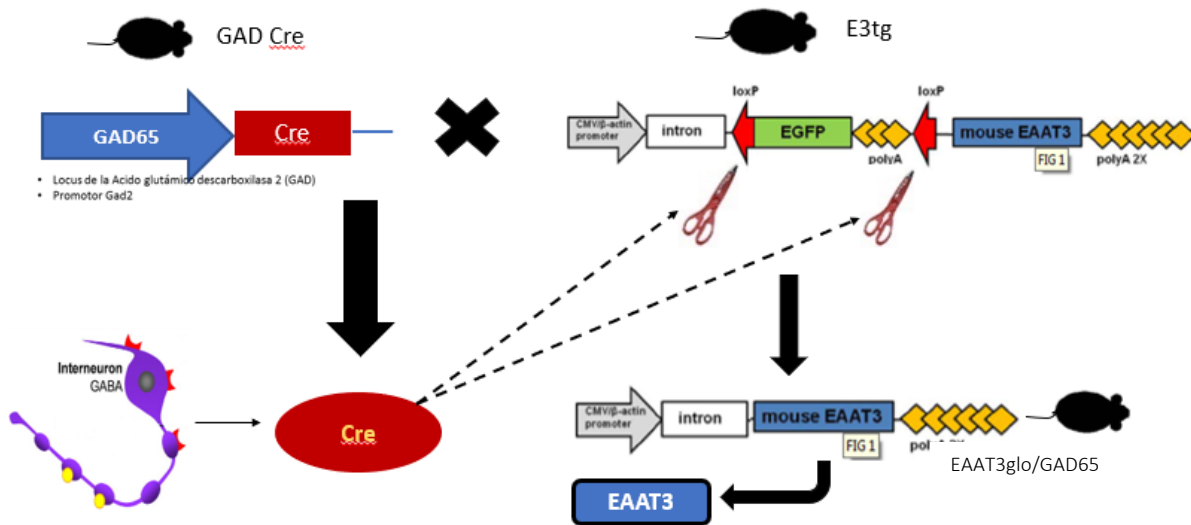
### ESPECÍFICOS

1. Determinar la contribución de EAAT3 sobre la transmisión sináptica inhibitoria mediante el uso de un bloqueador selectivo de EAAT3.
- 2.- Evaluar los cambios producidos sobre las respuestas sinápticas inhibitorias en el área CA1 del hipocampo de ratones EAAT3glo/GAD65.
- 3.- Examinar los cambios producidos sobre la plasticidad sináptica inhibitoria a corto plazo en el área CA1 del hipocampo de ratones EAAT3glo/GAD65.

# METODOLOGÍA

## ANIMALES

Líneas de ratones fundadoras con progenie estable (EAAT3<sup>glo</sup>) se utilizaron para las cruzas con líneas driver GAD65-Cre. Estos últimos expresan Cre- recombinasa bajo el promotor GAD65, lo que permite dirigir la recombinación exclusivamente en neuronas GABAérgicas (ver figura 9). Los ratones se encuentran mantenidos en el bioterio del Núcleo Milenio de Biología de enfermedades Neuropsiquiátricas ubicado en la Facultad de Ciencias de la Universidad de Valparaíso, que cuenta con control de temperatura (21 ± 2°C), humedad (40-70 %) y ciclos de luz y oscuridad de 12 horas (encendiendo la luz de 7 am a 7 pm). Las crías estuvieron con sus respectivas nodrizas hasta el día del destete (día postnatal 21, DPN-21) y posteriormente fueron alojadas de 3 a 4 animales por jaula, con comida y agua *ad libitum*. Los procedimientos experimentales fueron aprobados por los Comités de Bioética y de Bioseguridad de la Universidad de Valparaíso.



**Figura 9. Generación de la línea EAAT3glo/GAD65** La cruce entre ratones de la línea GADCre que expresan condicionalmente la Cre recombinasa en las neuronas gabaérgicas y ratones de la línea E3tg que poseen el vector pCLE EAAT3 da origen a una nueva línea de ratones que sobre expresarían EAAT3 únicamente en las neuronas gabaérgicas (Ratones GAD-E3tg)

## GENOTIPIFICACIÓN DE RATONES MEDIANTE PCR CONVENCIONAL.

Para identificar a los ratones transgénicos, se analizaron muestras de su DNA genómico mediante el método de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) a partir de biopsias de cola de aproximadamente 0,5 cm, obtenidas a los 21 días de vida (día de destete). Se aisló el DNA genómico mediante técnicas convencionales.

### *REACCIÓN EN CADENA DE POLIMERASA (PCR)*

Partidores: Para la determinación de EAAT3 OE condicional se utilizaron dos pares de partidores.

CagGFP: para la detección de ausencia o presencia del trasgen EAAT3.

Secuencia CAGprom Fw: 5' CTC TAG AGC CTC TGC TAA CC 3'

Secuencia EGFP150 Rev: 5' GGT GCA GAT GAA CTT CAG GG 3' 2.

MAOB: control positivo de PCR.

Secuencia Fw: 5' CTA CAA AGC AGA TTG CCA CGC 3'

Secuencia Rev: 5' TAC CTG ACA TCA ACT GGT CCC 3'

Para la detección del trasgen indicativo de la condición GAD65, se usaron los siguientes partidores:

1.GAD2-For

Secuencia: 5'CTT CTT CCG CAT GGT CAT CT 3'

2.GAD2-mutF

Secuencia: 5' AAA GCA ATA GCA TCA CAA ATT TCA3'

3.GAD2-R

Secuencia: 5'CAC CCC ACT GGT TTT GAT TT3'

Condiciones de PCR: 95°C 10:00, [94°C 0:30, 57°C 0:30, 72°C 0:30] x 30 ciclos, 72°C 10:00, 4°C.

### *ELECTROFORESIS DE DNA EN GELES DE AGAROSA*

Se realizó una electroforesis de los fragmentos obtenidos mediante PCR en gel de agarosa (2%). La electroforesis se realizó a 120 V durante 1 hora.

### REGISTROS ELECTROFISIOLÓGICOS

#### *PREPARACIÓN DE CORTES CORONALES DE HIPOCAMPO.*

Los animales de 12 semanas fueron anestesiados con isoflurano para luego ser sacrificados por decapitación, acto seguido se extrajo el cerebro y se sumergió en una solución alta en sucrosa que contiene, 215 mM sucrosa, 2.5 mM KCl, 20 mM glucosa, 26 mM NaHCO<sub>3</sub>, 1.6 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1 mM CaCl<sub>2</sub>, 4 mM MgCl<sub>2</sub> y 4 mM MgSO<sub>4</sub>, a 4°C. Luego se realizó una micro disección para extraer el hipocampo y realizar cortes transversales de 400 µm de espesor mediante el uso de un vibrátomo. Los cortes transversales de hipocampo fueron incubados en una solución 50/50 de solución alta en sucrosa y una solución extracelular o Ringer normal (Líquido céfalo raquídeo artificial; ACSF), que contiene 124 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 26 mM NaHCO<sub>3</sub>, 1 mM 3NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 2.5 mM CaCl<sub>2</sub>, 1.3 mM MgSO<sub>4</sub> y 10 mM glucosa durante 30 minutos, para luego intercambiar gradualmente hasta llegar a una solución de mantención de los cortes en una proporción de 20:80 (sucrosa/ringer normal). Todas las soluciones se mantuvieron saturadas con carbógeno (95%O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>).

#### *REGISTROS DE CAMPO*

Para evaluar cambios en la transmisión sináptica inhibitoria se registraron los potenciales extracelulares Inhibitorios (fIPSP), esto se realizó a 29°C y en presencia de 6-cyano-7-nitroquinoxaline-2,3-dione (CNQX), un antagonista selectivo de los receptores AMPA y kainato, a una concentración de 20 µM. Además, ácido 2-Amino-5-fosfonovaleriánico (APV), un antagonista de los receptores NMDA, a una concentración de 25µM fue utilizado, para aislar las corrientes inotrópicas GABAérgicas. Los fIPSP fueron evocados mediante la estimulación de las fibras

presentes en *stratum radiatum* (*Collaterales de Schaffer*), para lo cual una pipeta de estimulación se llenó con ringer normal (estimulación mono polar) y se posicionó justo en el límite entre CA1 y *stratum radiatum*, mientras que la pipeta de registro con solución de NaCl 1M en su interior fue posicionada en la capa piramidal de CA1.

Para analizar las propiedades de las sinapsis Inhibitorias, realizamos una curva de Intensidad de estímulos (mV) vs Amplitud de respuesta (nA) (Input/Output), utilizando diferentes estímulos a diferentes intensidades (0, 10, 20, 30, 40 y 50 mV). Para determinar si existen cambios en la probabilidad de liberación de las neuronas GABAérgicas, se determinó la razón de pulsos pareados (PPR) en la sinapsis inhibitoria, para lo cual se aplicaron dos pulsos de estímulo separados por intervalos de 300,100,70,30 ms. El PPR se determinó según la siguiente fórmula: amplitud 2º pulso/ amplitud 1º pulso. Finalmente, para determinar si la sobre expresión de EAAT3 produjo cambios en la plasticidad a corto plazo inhibitoria evocada se aplicó un tren de 25 pulsos a 14 Hz.

Para dilucidar cuál es la contribución de EAAT3 en la sinápsis inhibitoria de animales con sobre expresión de EAAT3 en neuronas GABAérgicas, los experimentos fueron realizados en presencia y en ausencia de un bloqueador específico para EAAT3 (PM; P compound). PM fue disuelto en DMSO 100% a una concentración de 30 mM. Una vez realizadas las pruebas en ausencia de droga y después de 15 minutos de estabilización junto a 5 minutos de línea base estable, 8  $\mu$ L del stock fueron agregados a la solución extracelular para llegar a una concentración final de 5  $\mu$ M, bajo la cual se realizaron los registros.

### *REGISTROS DE CÉLULA ÚNICA*

Para evaluar los cambios en la transmisión sináptica inhibitoria basal, se realizaron registros de célula única con los cuales se evaluó la frecuencia y amplitud de las corrientes postsinápticas inhibitorias espontáneas (sIPSC)(dependientes de potenciales de acción). Para ello, células fueron seleccionadas desde la capa piramidal de CA1 y la pipeta de registro contenía una solución de gluconato de cesio (gluconato de Cesio 117.5 mM , CsCl 17.5mM, NaCl 8mM, Hepes 10mM, MgATP 2mM, GTP 0.2mM, y EGTA 0.2-1mM, pH 7.3). El registro de los sIPSC se realizó a 29°C y en presencia de CNQX 20µM y el voltaje se fijó a 0mV. Los cambios en las propiedades de input-output y en la probabilidad de liberación también se evaluaron mediante registros de célula única, al igual que los cambios en la plasticidad a corto plazo (STP). Los registros obtenidos fueron analizados utilizando los softwares IGOR Pro y ORIGIN PRO 8.6.

### *ANÁLISIS ESTADÍSTICOS*

Los resultados obtenidos fueron analizados estadísticamente utilizando el software ORIGIN PRO. Los resultados que siguieron una distribución normal fueron analizados utilizando mediante T-test o T-test pareado según corresponda mientras que los que no siguieron una distribución normal se utilizó el test Mann-Whitney. Los resultados fueron estadísticamente significativos cuando  $p < 0,05$ .

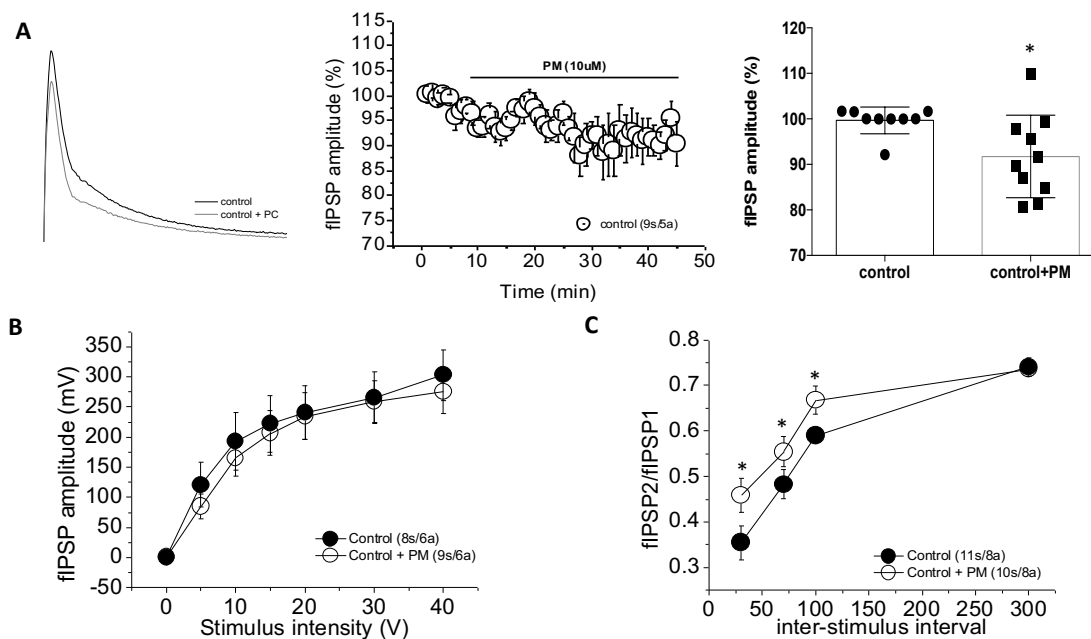
## RESULTADOS

### EVALUACIÓN DE LA CONTRIBUCIÓN DE EAAT3 SOBRE LA TRANSMISIÓN SINÁPTICA INHIBITORIA MEDIANTE EL USO DE UN BLOQUEADOR SELECTIVO DE EAAT3.

Para evaluar el papel de EAAT3 sobre la transmisión GABAérgica, se evaluaron las consecuencias de la aplicación de un bloqueador selectivo de EAAT3 sobre las propiedades Input/output y la razón de pulsos pareados de la sinapsis inhibitoria en presencia de este bloqueador. Primero, evaluamos los efectos de la aplicación de un bloqueador selectivo de EAAT3 (PM, 5 $\mu$ M) sobre la amplitud de los fIPSP luego de una línea base estable y se monitorearon las respuestas inhibitorias durante 40 minutos después de aplicado el compuesto. Tal como se puede apreciar en la figura 10.A, la aplicación del bloqueador de EAAT3 en rebanadas de hipocampo de animales controles produce una disminución en la amplitud de los fIPSP de un 8%. (Control: 99.67 $\pm$ 0.9 vs control + PM: 91.7  $\pm$  2.87, n= 9 rebanadas / 5 animales, p=0.036).

Luego, para evaluar si el bloqueador de EAAT3 produce algún cambio en las propiedades de entrada y salida de la sinapsis GABAérgica, se graficaron las amplitudes de las respuestas inhibitorias a distintas intensidades de estímulo en presencia y ausencia del antagonista. Como se muestra en la figura 10.B, la presencia del bloqueador de EAAT3 no afecta las propiedades de entrada/salida de la sinapsis inhibitoria (Tabla S1).

Posteriormente, para determinar si la aplicación del bloqueador de EAAT3 produce cambios en la probabilidad de liberación de la sinapsis GABAérgica, se calculó el PPR a distintos intervalos inter-estímulos. Tal como se ve en la figura 10.C, la razón de pulsos pareados (PPR) cambia significativamente a 30ms (p=0,022), 70ms (p= 0,014) y 100ms (p=0,024) de intervalo inter-estímulo. Por otro lado, no se ven cambios a 300 ms (Tabla S2).



**Figura 10** Efectos de la aplicación de un bloqueador específico de EAAT3 sobre la transmisión sináptica inhibitoria en animales control (A) Seguimiento de la amplitud de fIPSP a través del tiempo (minutos) antes y durante la aplicación de un bloqueador específico de EAAT3 (medio). A la izquierda se ven los trazos representativos de la amplitud de los fIPSP antes (negro) y después (gris) de la aplicación del bloqueador de EAAT3, mientras que a la derecha se comparan los %fIPSP antes y después de aplicada la droga (B) Curva entrada/salida en la que se muestra la amplitud de los fIPSP distintas intensidades de estímulo antes y después de aplicada la droga en rebanadas de hipocampo de animales control. (C) razón de pulsos pareados determinada a distintos intervalos inter-estimulo, antes y después de aplicada la droga en rebanadas de hipocampo de animales control. Los datos son presentados como promedio  $\pm$ SEM. \*  $p < 0.005$ ; (s representa el nº de slices utilizados y a el número de animales)

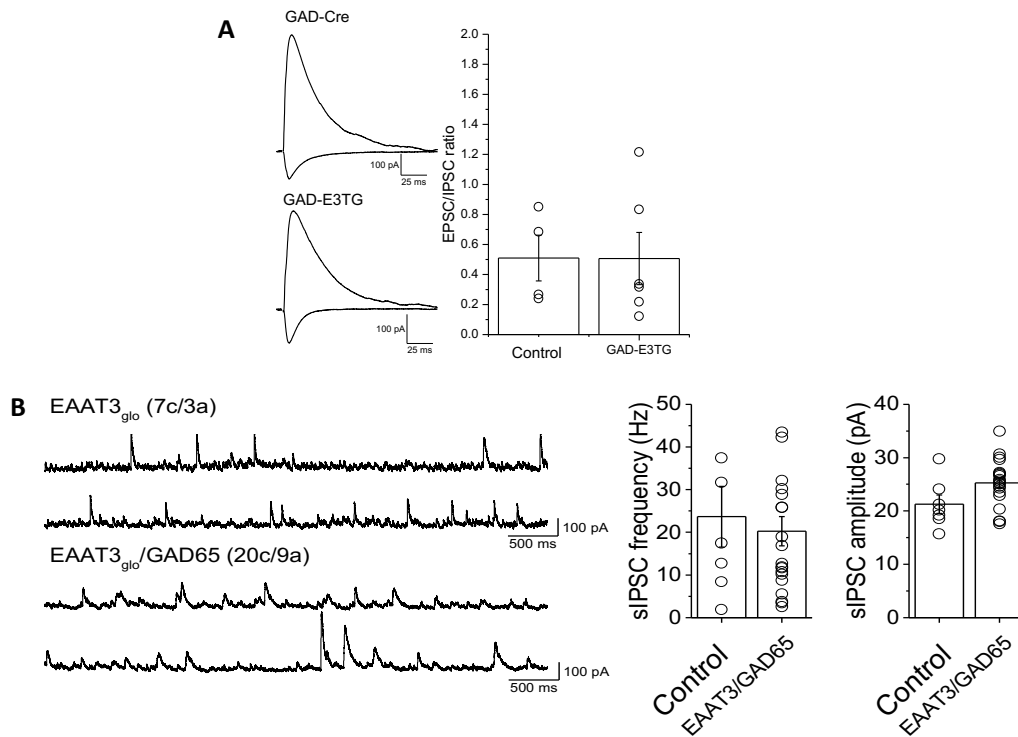
## EVALUACIÓN DE LOS CAMBIOS PRODUCIDOS SOBRE LAS RESPUESTAS SINÁPTICAS INHIBITORIAS EN EL ÁREA CA1 DEL HIPOCAMPO DE RATONES EAAT3<sup>GLO</sup>/GAD65.

Para determinar si la sobreexpresión de EAAT3 produce cambios sobre las respuestas sinápticas inhibitorias, analizamos las propiedades basales de estas sinapsis en el área CA1 de hipocampo por medio de registros de campo y de célula única.

Al haber un aumento en la concentración intracelular de GABA, podrían ocurrir cambios en el balance excitación/inhibición. (E/I) Con el fin de medir si el aumento en la expresión de EAAT3 produce estos cambios, se realizaron registros de célula única donde se midió la respuesta a -60 mV (excitación) y a 0 mV (potencial de reversion de los receptores de glutamato) y se midió la

respuesta inhibitoria. Como se observa en la figura 11, no se observaron diferencias en el balance E/I de los animales EAAT3<sup>glo</sup>/GAD65 en comparación con animales control (control:  $0.5 \pm 0.14$  vs EAAT3<sup>glo</sup>/GAD65:  $0.5 \pm 0.16$ ;  $P=0.98$ )

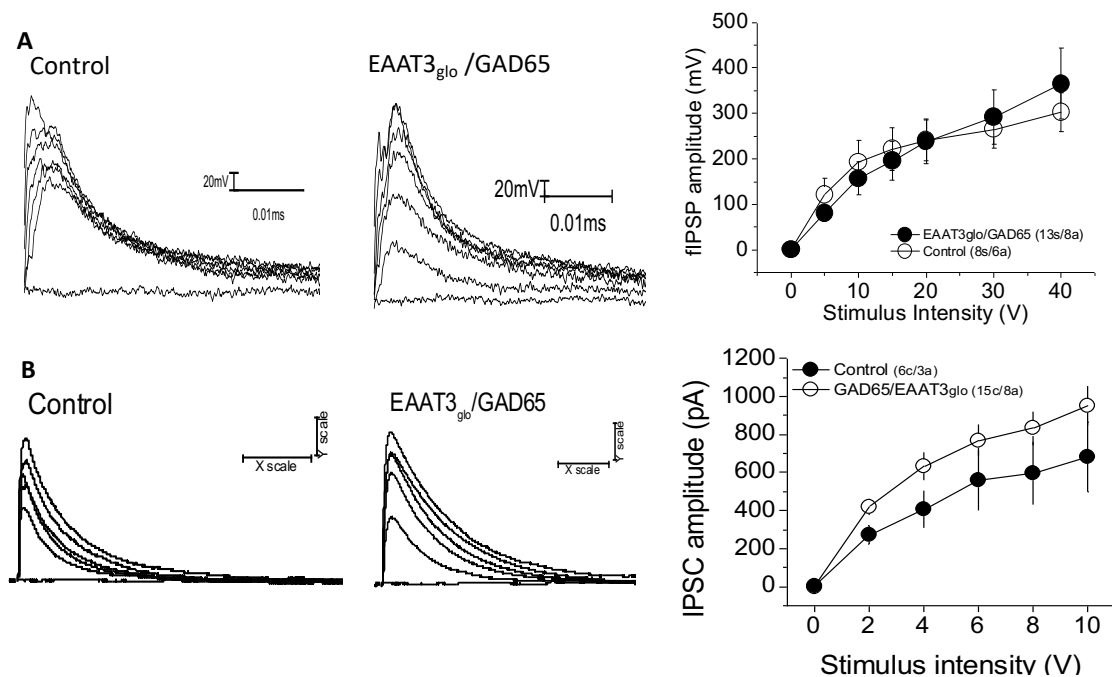
Del mismo modo, se analizó la actividad GABAérgica espontánea (sIPSC) no observándose cambios en la amplitud (Control  $21,27 \pm 1,72$  vs EAAT3<sup>glo</sup>/GAD65  $25,23 \pm 0,99$ ;  $P=0.054$ ) ni en la frecuencia de los sIPSC ((Control  $23,65 \pm 7,14$  vs EAAT3<sup>glo</sup>/GAD65  $20,23 \pm 3,44$ ;  $P=0.064$ ) (Figura 11.B), lo que sugiere que la sobreexpresión de EAAT3 no produce un aumento de la liberación de GABA, al contrario de lo que se ha reportado anteriormente en animales con una menor actividad de EAAT3 (Septuky et al 2002; Mathews et al 2003; Stafford et al 2010).



**Figura 11** (A) Análisis de la razón excitación/inhibición en animales control y EAAT3<sup>glo</sup>/GAD65. A la izquierda se encuentran los trazos representativos de la razón excitación /inhibición para animales control (arriba) y EAAT3<sup>glo</sup>/GAD65 (abajo). (B) Análisis de la frecuencia y amplitud de las corrientes post sinápticas inhibitorias espontaneas en animales control y EAAT3<sup>glo</sup>/GAD65. A la izquierda se encuentran los trazos representativos de los sIPSC en animales control (arriba) y EAAT3<sup>glo</sup>/GAD65 (abajo). Los datos son presentados como promedio  $\pm$ SEM (c representa el n° de células registradas y a el número de animales)

Con el fin de evaluar si la sobre expresión de EAAT3 afecta las propiedades de entrada y salida de las sinapsis inhibitorias, se analizaron las amplitudes de los fIPSP y de los IPSC a distintas intensidades de estímulo. Como se puede ver en la figura 12.A, no se observaron diferencias significativas en las amplitudes de los fIPSP de animales control y sobre expresión a ninguno de los voltajes/potenciales de estimulación (Tabla S3).

Tampoco se observaron diferencias significativas en las amplitudes de los IPSC de animales control y EAAT3glo/GAD65 a 0, 2, 4, 6, 8y 10 (V) (Tabla S4; figura 12.B).

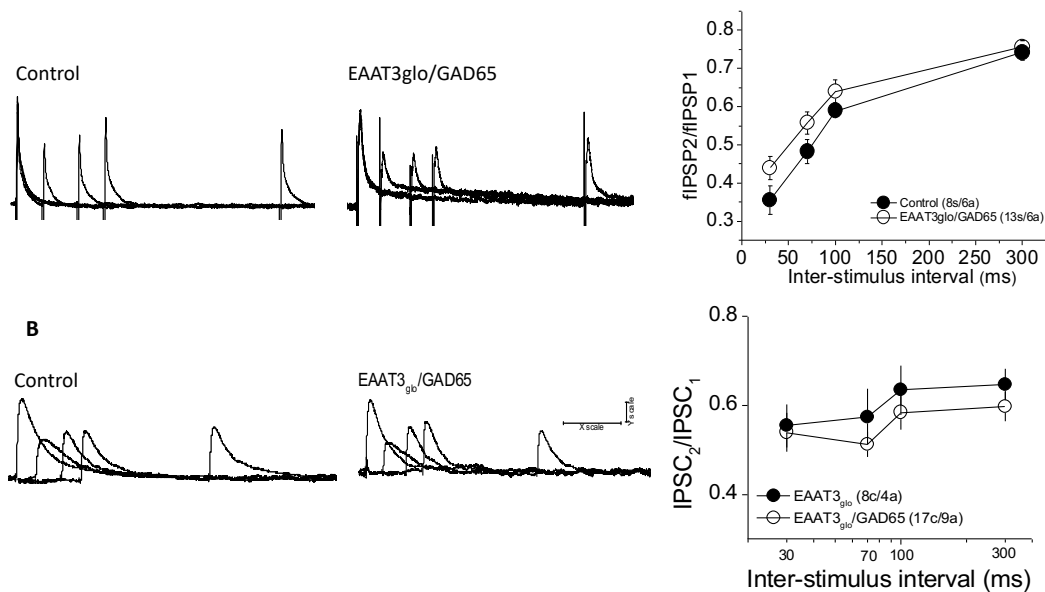


**Figura 12. Análisis de las propiedades input-output de la transmisión inhibitoria en CA1 de animales con sobreexpresión de EAAT3 n neuronas GABAérgicas.**

(A).curva input/output (derecha) en la que se muestra la amplitud de los fIPSP a distintas intensidades de estímulo. A la izquierda se encuentran los trazos representativos de las curvas I/O para animales control (arriba) y sobre expresión (abajo). (B) curva input/output (derecha) en la que se muestra la amplitud de los IPSC a distintas intensidades de estímulo. A la izquierda se encuentran los trazos representativos de las curvas I/O para animales control (arriba) y sobre expresión (abajo). Los datos son presentados como promedio  $\pm$ SEM y se analizaron estadísticamente mediante un test de normalidad y T-test. Las diferencias fueron estadísticamente significativas cuando  $P < 0.05$ . (s representa el nº de slices utilizados, c el número de células registradas y a el número de animales)

Se analizó la posibilidad de que la sobre expresión de EAAT3 pudiera generar cambios en la probabilidad de liberación de la sinápsis inhibitoria mediante el cálculo de la razón de pulsos pareados a distintos intervalos inter estímulo, por medio de registros de campo y registros de célula única.

Como se ve en la figura 13.A, no se observaron diferencias significativas en la razón de pulsos pareados de animales controles y EAAT3glo/GAD65 a 30, 70, 100 y 300 ms (Tabla S5). Lo mismo se vió en el caso de los registros de célula única (figura 13.B) a 30, 70, 100 y 300 ms (Tabla S6).

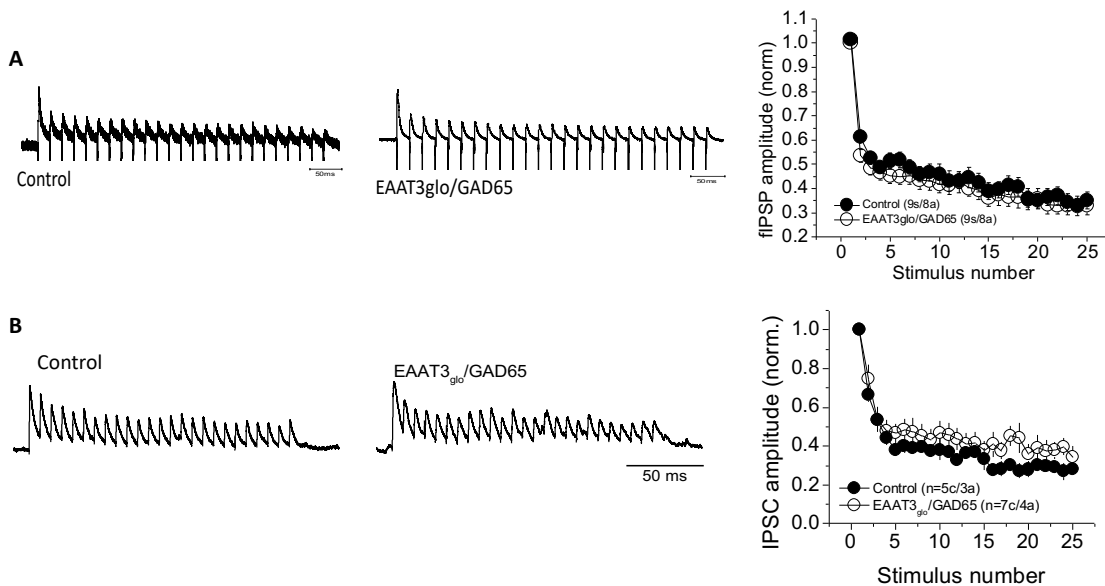


**Figura 13. Análisis de cambios en la probabilidad de liberación producido por la sobre expresión condicional de EAAT3.**

(A) razón de pulsos pareados determinada a distintos intervalos inter estímulo mediante registros de campo. A la izquierda se muestran los trazos representativos para animales control (arriba) y animales EAAT3glo/GAD65 (abajo). (B) razón de pulsos pareados determinada a distintos intervalos inter estímulo mediante registros de célula única. A la izquierda se muestran los trazos representativos para animales control (arriba) y animales EAAT3glo/GAD65 (abajo). Los datos son presentados como promedio  $\pm$ SEM y se analizaron estadísticamente mediante un test de normalidad y T-test. Las diferencias fueron estadísticamente significativas cuando  $P < 0.05$ . (s representa el nº de slices utilizados, c el número de células registradas y a el número de animales)

## EVALUACIÓN DE LOS CAMBIOS PRODUCIDOS SOBRE LA PLASTICIDAD SINÁPTICA A CORTO PLAZO EN LAS SINAPSIS INHIBITORIAS EN EL ÁREA CA1 DEL HIPOCAMPO DE RATONES EAAT3<sup>GLO</sup>/GAD65.

Para evaluar si la sobre expresión de EAAT3 produce cambios en la plasticidad sináptica inhibitoria a corto plazo dependiente de uso (STP), se evaluaron las respuestas a un tren de 25 pulsos con una frecuencia de 14 Hz. Tal como se ve en la figura 14, no se observaron cambios significativos (Tabla S7) entre animales control y EAAT3<sup>glo</sup>/GAD65 mediante registros de campo (Tabla S7; Figura14.A), como tampoco durante registros de célula única (Tabla S8; Figura14.B).

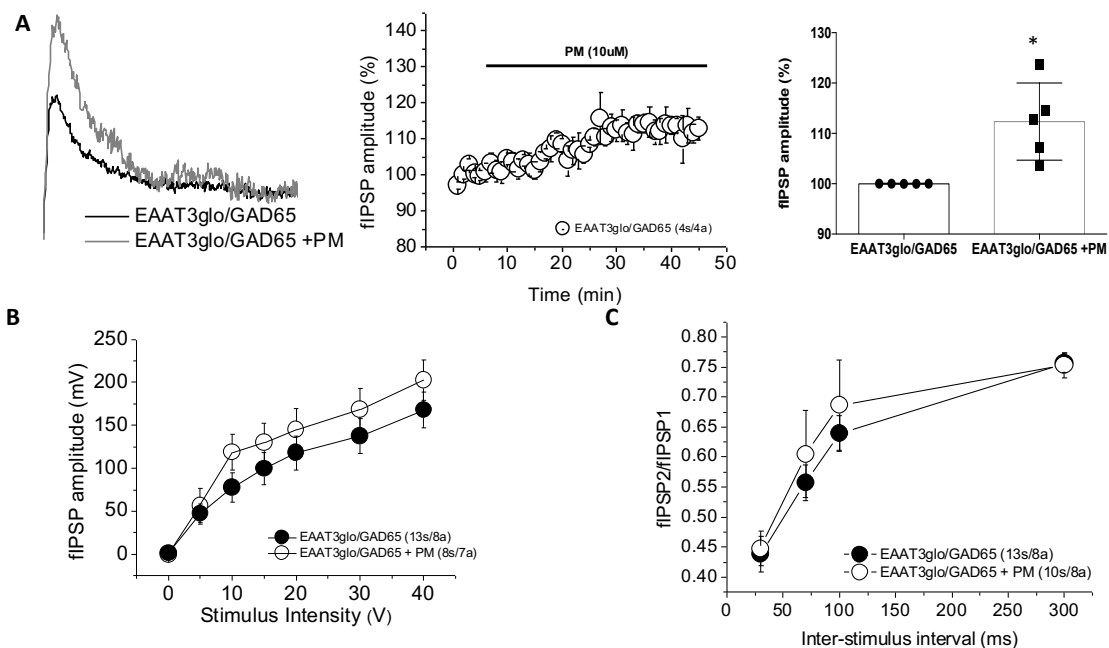


**Figura 14. Análisis de las consecuencias de la sobre expresión de EAAT3 sobre la plasticidad sináptica inhibitoria a corto plazo.**

(A) plasticidad a corto plazo dependiente de uso evocada mediante la aplicación de un tren de 25 pulsos a 14 Hz. Los registros se realizaron mediante registros de campo. No se observaron diferencias significativas entre ambos genotipos ( $P=XX$ ). A la izquierda se muestran los trazos representativos para animales control (arriba) y con sobre expresión (abajo). (B) plasticidad a corto plazo dependiente de uso evocada mediante la aplicación de un tren de 25 pulsos a 14 Hz. Los registros se realizaron mediante registros de célula única se observaron diferencias significativas entre ambos genotipos. A la izquierda se muestran los trazos representativos para animales control (arriba) y sobre expresión (abajo). Los datos son presentados como promedio  $\pm$ SEM y se analizaron estadísticamente mediante un test de normalidad y T-test. Las diferencias fueron estadísticamente significativas cuando  $P<0.05$ . (s representa el n<sup>o</sup> de slices utilizados, c el número de células registradas y a el número de animales)

EVALUACIÓN DE LOS CAMBIOS PRODUCIDOS EN LA TRANSMISIÓN SINÁPTICA INHIBITORIA POR EL BLOQUEO DE EAAT3 EN ANIMALES EAAT3glo/GAD65.

Para evaluar si la aplicación de un bloqueador selectivo de EAAT3 en el baño a una concentración de 5uM produce algún cambio en la amplitud de los fIPSP en animales EAAT3glo/GAD65, después de 5 minutos de línea base estables se monitorearon las respuestas inhibitorias durante 40 minutos después de aplicada la droga. Tal como se puede apreciar en la figura 15.A, la aplicación del bloqueador de EAAT3 en rebanadas de hipocampo de animales EAAT3glo/GAD65 produce un aumento en la amplitud de los fIPSP de un 12% aproximadamente (EAAT3glo/Gad65:  $100 \pm 0,005$  vs EAAT3glo/GAD65 + PM:  $112,3 \pm 7,6$  ;  $P = 0.02$  )



**Figura 15. Efectos de la aplicación de un bloqueador específico de EAAT3 sobre la transmisión sináptica inhibitoria en animales EAAT3glo/GAD65**

(A) Seguimiento de la amplitud de fIPSP a través del tiempo (minutos) antes y durante la aplicación de un bloqueador específico de EAAT3 (medio). A la izquierda se ven los trazos representativos de la amplitud de los fIPSP antes (negro) y después (gris) de la aplicación del bloqueador de EAAT3 mientras que a la derecha se comparan los %fIPSP antes y después de aplicado el bloqueador. (B) Curva Input/Output en la que se muestra la amplitud de los fIPSP distintas intensidades de estímulo antes y después de aplicada la droga en rebanadas de hipocampo de animales EAAT3glo/GAD65. (C) razón de pulsos pareados determinada a distintos intervalos inter-estimulo, antes y después de aplicada la droga en rebanadas de hipocampo de animales EAAT3glo/GAD65. Los datos son presentados como promedio  $\pm$ SEM y se analizaron estadísticamente T-test pareado; \*  $p < 0.005$ . (s representa el n° de slices utilizados y a el número de animales)

Luego, para evaluar si la aplicación del bloqueador de EAAT3 produce algún cambio en las propiedades de entrada y salida de la sinapsis GABAérgica, se graficaron las amplitudes de las respuestas inhibitorias a distintas intensidades de estímulo. Como se muestra en la figura 15.B, al agregar el bloqueador de EAAT3 no se produjeron cambios en las amplitudes de respuestas inhibitorias (Tabla S9). Finalmente, para determinar si la aplicación del bloqueador de EAAT3 produce cambios en la probabilidad de liberación de la sinapsis GABAérgica se calculó la razón de pulsos pareados a distintos intervalos inter-estímulos. Tal como se ve en la figura 15.C no se observaron cambios significativos entre la condición control y el uso del bloqueador (Tabla S10).

## DISCUSIÓN

GABA, el principal neurotransmisor inhibitorio en el SNC, y las proyecciones inhibitorias de las neuronas GABAérgicas posibilitan una amplia gama de funciones adaptativas que desempeñan papeles cruciales en el procesamiento de la información neuronal (Cardinali and Golombek, 1998). En las neuronas inhibitorias, todo el GABA (excepto el que ingresa a través de transportadores de GABA) es sintetizado por la descarboxilación de glutamato por medio de la enzima Glutamato descarboxilasa (GAD). No está aún del todo claro si, en los terminales nerviosos inhibitorios, el metabolismo del glutamato se asemeja al de los terminales excitatorios, pero se cree que éste podría estar ingresando a las células GABAérgicas a través de transportadores de glutamato pre sinápticos (Mathews & Diamond, 2003). A partir de esto, es que se ha propuesto que EAAT3 podría encontrarse en los terminales pre sinápticos de neuronas GABAérgicas proveyendo al terminal de glutamato para la síntesis de GABA (Mathews & Diamond, 2003; Rothstein et al., 1994; Sepkuty et al., 2002). Estos argumentos sirvieron de base para hipotetizar que en un modelo con sobreexpresión condicional de EAAT3 en neuronas GABAérgicas la síntesis de GABA debiera estar aumentada. El aumento en la expresión de EAAT3 y el consecuente aumento en el ingreso de glutamato a los terminales inhibitorios podrían modificar el sistema GABAérgico, afectando los niveles de proteínas involucradas en múltiples procesos que forman parte de la neurotransmisión GABAérgica (síntesis, transporte vesicular, transducción de señal, transportadores, etc.), cambios que finalmente se verían reflejados a nivel de neurotransmisión inhibitoria.

A la fecha, no existen ligandos que sean selectivos por EAAT3 respecto a los otros miembros de la familia de transportadores EAAT, lo que dificulta la determinación del rol que efectivamente estaría ejerciendo EAAT3 en la neurotransmisión inhibitoria. No obstante, nuestro laboratorio ha obtenido un compuesto experimental, no comercial ((PM) proporcionado por Hoffman-La Roche

Neuroscience Center, Suiza) que bloquea selectivamente a EAAT3. Este compuesto posee un peso molecular de 380 gr/mol; una  $K_b$  de 90 nM,  $C_{max}$  de 1350 ng/mL y una  $T_{max}$  de una hora.

Este compuesto se utilizó para evaluar si EAAT3 ejerce un rol regulatorio sobre la transmisión sináptica inhibitoria. El bloqueador fue agregado en el baño y se controló la amplitud de los fIPSP en animales control durante media hora después de aplicado el fármaco, observando que la amplitud de los fIPSP disminuye en un 8% (figura 10.A).

Esta leve disminución en la amplitud de fIPSP podría deberse a una disminución en el contenido de GABA producto del bloqueo del ingreso de glutamato a las neuronas GABAérgicas mediante EAAT3 sugiriendo que, aunque EAAT3 posee un rol regulatorio sobre la transmisión GABAérgica, este rol es mínimo (por lo menos en condiciones basales).

Por otro lado, se analizaron las propiedades entrada/salida y la razón de pulsos pareados de los potenciales fIPSP (Figura 10.B y 10.C), no observándose diferencias significativas en la amplitud de los fIPSP incluso después de media hora de aplicación del compuesto PM.

Sin embargo, sí se observaron cambios significativos en la razón de pulsos pareados a 30,70, y 100 ms de intervalo entre estímulos, los cuales muestran que el bloqueo de EAAT3 aumenta la razón de pulsos pareados de los fIPSP, dando cuenta de cambios a nivel presinápticos. Dichos cambios pueden relacionarse con variaciones en la probabilidad de liberación o en el contenido cuantal de la sinapsis inhibitoria, conceptos que se encuentran asociados al contenido de neurotransmisor en la neurona.

Como se mencionó anteriormente, en las neuronas GABAérgicas GABA es sintetizado a partir de la descarboxilación de glutamato mediada por GAD. Además del ingreso de glutamato por EAAT3,

existen otras formas a partir de las cuales estas células pueden obtener glutamato para la síntesis de GABA, como el ciclo glutamato/GABA – glutamina (Bak et al, 2006) o el ciclo del ácido cítrico (ciclo de Krebs). Esto, en conjunto con los mecanismos de recaptura de GABA presentes en las neuronas GABAérgicas podría explicar la baja contribución de EAAT3 a la mantención de los niveles de GABA en las neuronas GABAérgicas.

Luego, quisimos averiguar si un aumento de EAAT3 en las neuronas GABAérgicas produce cambios en la transmisión inhibitoria, para esto utilizamos animales que sobre expresan condicionalmente EAAT3 bajo el promotor de GAD65 (EAAT3glo/GAD65) con sus respectivos controles (EAAT3glo). Para ello, primero se analizó la razón excitación / inhibición en animales con sobre expresión y animales control y no se encontraron diferencias significativas, lo que demuestra que el balance excitación /inhibición no se ve afectado por el aumento en la expresión de EAAT3.

Dado que los resultados anteriormente mencionados (figura 10) sugieren que EAAT3 tendría un papel de origen presináptico, quisimos ver si el aumento en la expresión de EAAT3 en neuronas GABAérgicas produce cambios en la liberación de neurotransmisor dependiente de potencial de acción. Para lo cual, se registraron las corrientes post sinápticas inhibitorias espontaneas (sIPSC), sin observar diferencias en su amplitud y frecuencia, dando cuenta de que los animales EAAT3glo/GAD65 no poseen cambios en la liberación de neurotransmisor dependiente de potencial de acción.

A continuación, por medio de registros de campo (fIPSP) y de célula única (IPSC) se analizaron las propiedades de entrada/salida y la razón de pulsos pareados de la sinapsis inhibitorias en el hipocampo de animales EAAT3glo/GAD65, sin observar diferencias significativas ni en la curva entrada/salida ni en la razón de pulsos pareados, demostrando que la sobre-expresión EAAT3 en

neuronas GABAérgicas no produce cambios en la transmisión inhibitoria en condiciones basales, a diferencia de lo que se observa cuando, por medio de la aplicación del bloqueador de EAAT3, se inhibe la actividad del transportador de forma selectiva (aunque no específicamente en neuronas GABAérgicas) y se observaron cambios en la razón de pulsos pareados.

Debido a que el glutamato extracelular normalmente se mantiene en niveles muy bajos, debido a la eficiente recaptura de este neurotransmisor por parte de los transportadores gliales (EAAT1 y EAAT2), es poco probable que la captura de glutamato desempeñe un papel constitutivo en la síntesis de GABA, hecho que podría explicar el que no se observen cambios significativos en las propiedades basales de la sinapsis inhibitorias de animales con sobre expresión de EAAT3 en las neuronas GABAérgicas. Esto se ve apoyado por (Mathews et al, 2003), trabajo en el que se determinó que en condiciones de liberación de GABA y glutamato tiempo-espacial coordinada, el bloqueo de la recaptura de glutamato glial mejoró la liberación cuantal de GABA.

Dado que no se observaron cambios en la transmisión sináptica inhibitoria basal de los animales EAAT3glo/GAD65, quisimos determinar si se producían cambios en la transmisión sináptica inhibitoria dependiente de uso, para lo cual se registraron los fIPSP y IPSC evocados por medio de la aplicación de un protocolo de estimulación que consta de 25 pulsos a una frecuencia de 14 Hz. En este experimento tampoco se observaron cambios, demostrando que en estos animales no se encuentra afectada la plasticidad sináptica a corto plazo; en concordancia con lo anteriormente expuesto, estos resultados pueden explicarse debido a que, para poder observar el rol que está ejerciendo EAAT3, pudiera ser necesario un aumento significativo de la concentración de glutamato extracelular, efecto que no se logra con este protocolo ya que la frecuencia de los estímulos podría no ser suficiente como para aumentar significativamente la concentración de glutamato.

Posteriormente, quisimos estudiar cuales son los cambios que se producen en la transmisión sináptica inhibitoria en CA1 de animales EAAT3<sup>glo</sup>/GAD65 al aplicar un bloqueador de EAAT3.

Para esto se realizaron registros de campo y se monitorizó la amplitud de los fIPSP antes y después de aplicado el bloqueador. Tal como se observa en la figura 14, después de 40 minutos de aplicado el bloqueador se puede observar un aumento de la amplitud de los fIPSP, muy en contraste con que se observaba en animales control quienes presentaban una pequeña disminución de la amplitud de las respuestas. A su vez, analizamos los posibles cambios en las propiedades entrada/salida y en la razón de pulsos pareados producidos por la aplicación del bloqueador (Figura 14.B y 14.C), donde no observamos diferencias significativas en ninguno de estos parámetros.

Estos resultados contrastan notablemente con los que se obtuvieron al aplicar el bloqueador de EAAT3 en animales control, en donde se observó una disminución de la amplitud de las respuestas inhibitorias al aplicar el bloqueador de EAAT3 y un aumento significativo de la razón de pulsos pareados a 30, 70 y 100 ms de intervalo entre estímulos.

Los resultados obtenidos en esta tesis demuestran que, en condiciones de niveles extracelulares basales de glutamato, el papel de EAAT3 sobre la regulación de la sinapsis inhibitoria es mínimo. Por, ello se hace muy importante conocer cuáles son los posibles cambios que se producen al manipular los niveles de expresión o de actividad de este transportador, pero bajo condiciones en las cuales la concentración de glutamato extracelular se encuentre aumentada.

La aplicación de un protocolo de alta frecuencia (hfs), que consta de la aplicación de 100 pulsos de estimulación a una frecuencia de 100 Hz, se utiliza para inducir plasticidad sináptica a largo plazo y es una buena forma de aumentar, de forma más fisiológica, el glutamato extracelular.

Por otro lado, se ha descrito que en condiciones de LTP se produce un aumento en la externalización de EAAT3 con el consiguiente aumento en la recaptura de glutamato neuronal en neuronas glutamatérgicas (Lavenson et al, 2002). Por estas razones, sería interesante saber como se comporta la transmisión sináptica de los animales EAAT3<sup>glo</sup>/GAD65 después de aplicado el protocolo y en otras condiciones como después de aplicar glutamato al baño.

Otro punto importante de considerar es el carácter electrogénico de EAAT3, el cual ingresa una carga neta positiva a la célula por cada ciclo de transporte. Esto, en condiciones normales no produce un gran cambio en el potencial de la célula, pero no se sabe qué sucede al sobre expresar el transportador, condición en la cual podría estar acercando el potencial de membrana al umbral de excitación y así aumentando la excitabilidad neuronal, de modo que sería interesante estudiar la excitabilidad de las neuronas GABAérgicas en este modelo animal.

## CONCLUSIONES

Mediante los resultados anteriormente presentados podemos concluir que, bajo niveles extracelulares basales de glutamato, el rol de EAAT3 sobre la regulación de la sinápsis inhibitoria es mínimo. Es por ello, que nuevos experimentos son necesarios para poder dar una respuesta certera al problema planteado inicialmente y así, poder conocer cuál es el papel funcional que ejerce EAAT3 en las neuronas GABAérgicas.

## REFERENCIAS

'keefe, O., Nadel, J. , & Lynn. (n.d.). *The Hippocampus as a Cognitive Map Item Type Book*.

Amara, S. G., & Fontana, A. C. K. (2002). Excitatory amino acid transporters: keeping up with glutamate. *Neurochemistry International*, *41*(5), 313–318.

Bak, L. K., Schousboe, A., & Waagepetersen, H. S. (2006). The glutamate/GABA-glutamine cycle: aspects of transport, neurotransmitter homeostasis and ammonia transfer. *Journal of neurochemistry*, *98*(3), 641-653.

Bellini, S., Fleming, K. E., De, M., McCauley, J. P., Petroccione, M. A., D'Brant, L. Y., Scimemi, A. (2017). Neuronal glutamate transporters control dopaminergic signaling and compulsive behaviors. *The Journal of Neuroscience*, 1906–1917.

Buddhala, C., Hsu, C. C., & Wu, J. Y. (2009). A novel mechanism for GABA synthesis and packaging into synaptic vesicles. *Neurochemistry International*, *55*(1–3), 9–12.

Cardinali Daniel P. and Golombek Diego A. (1998). The Rhythmic GABAergic System. *Neurochemical Research*, *23*(5), 607–614.

Cooke, S. F., Bliss, T. V. P., & Cooke, S. (2006). Plasticity in the human central nervous system. *Brain*, *129*, 1659–1673.

Danbolt, N. C. (2001). Glutamate uptake. *Progress in Neurobiology*, *65*(1), 1–105.

Diamond, J. S. (2001). Neuronal Glutamate Transporters Limit Activation of NMDA Receptors by Neurotransmitter Spillover on CA1 Pyramidal Cells. *Journal of Neuroscience*, *21*(21), 8328–8338.

Freund, T. F., & Buzsáki, G. (1998). Interneurons of the hippocampus. *Hippocampus*, *6*(4), 347–470.

González, L. F., Henríquez-Belmar, F., Delgado-Acevedo, C., Cisternas-Olmedo, M., Arriagada, G., Sotomayor-Zárate, R., Moya, P. R. (2017). Neurochemical and behavioral characterization of neuronal glutamate transporter EAAT3 heterozygous mice. *Biological Research*, *50*(1), 29.

Govindpani, K., Guzmán, B. C. F., Vinnakota, C., Waldvogel, H. J., Faull, R. L., & Kwakowsky, A.

(2017). Towards a better understanding of GABAergic remodeling in alzheimer's disease. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(8).

He, Y., Janssen, W. G. M., Rothstein, J. D., & Morrison, J. H. (2000). Differential synaptic localization of the glutamate transporter EAAC1 and glutamate receptor subunit GluR2 in the rat hippocampus. *Journal of Comparative Neurology*, 418(3), 255–269.

Holmseth, S., Dehnes, Y., Huang, Y. H., Follin-Arbelet, V. V., Grutle, N. J., Mylonakou, M. N., ... Danbolt, N. C. (2012). The Density of EAAC1 (EAAT3) Glutamate Transporters Expressed by Neurons in the Mammalian CNS. *Journal of Neuroscience*, 32(17), 6000–6013.

Klausberger, T., & Somogyi, P. (2008). Neuronal Diversity and Temporal Dynamics: The Unity of Hippocampal Circuit Operations. *Science*, 321(5885), 53–57.

Kwon, J. S., Joo, Y. H., Nam, H. J., Lim, M., Cho, E.-Y., Jung, M. H., Hong, K. S. (2009). Association of the Glutamate Transporter Gene SLC1A1 With Atypical Antipsychotics-Induced Obsessive-compulsive Symptoms. *Archives of General Psychiatry*, 66(11), 1233.

Levenson, J., Weeber, E., Selcher, J. C., Kategaya, L. S., Sweatt, J. D., & Eskin, A. (2002). Long-term potentiation and contextual fear conditioning increase neuronal glutamate uptake. *Nature neuroscience*, 5(2), 155

Lytton, W. W., & Sejnowski, T. J. (1991). Simulations of cortical pyramidal neurons synchronized by inhibitory interneurons. *Journal of Neurophysiology*, 66(3), 1059–1079.

Mathews, G. C., & Diamond, J. S. (2003). Neuronal glutamate uptake Contributes to GABA synthesis and inhibitory synaptic strength. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 23(6), 2040–2048.

Medina-Ceja, L., Sandoval-García, F., Morales-Villagrán, A., & López-Pérez, S. J. (2012). Rapid compensatory changes in the expression of EAAT-3 and GAT-1 transporters during seizures in cells of the CA1 and dentate gyrus. *Journal of Biomedical Science*, 19(1), 78.

Nicoll, R. A. (2017). A Brief History of Long-Term Potentiation. *Neuron*, 93(2), 281–290.

Nudmamud-Thanoi S. (2007). Deficits of neuronal glutamatergic markers in the caudate nucleus in schizophrenia. - PubMed - NCBI. *Journal Neural Transmission*, 285–287.

Reznikov, K. Y. (1991). Cell proliferation and cytogenesis in the mouse hippocampus. *Advances in Anatomy, Embryology, and Cell Biology*, 122, 1–74.

Rothstein, J. D., Martin, L., Levey, A. I., Dykes-Hoberg, M., Jin, L., Wu, D., ... Kuncel, R. W. (1994). Localization of neuronal and glial glutamate transporters. *Neuron*, 13(3), 713–725.

Scimemi, A., Tian, H., & Diamond, J. S. (2009). Neuronal transporters regulate glutamate clearance, NMDA receptor activation and synaptic plasticity in the hippocampus. *Journal of Neuroscience*, 29(46), 14581.14595.

Sepkuty, J. P., Cohen, A. S., Eccles, C., Rafiq, A., Behar, K., Ganel, R., Rothstein, J. D. (2002). A neuronal glutamate transporter contributes to neurotransmitter GABA synthesis and epilepsy. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 22(15), 6372–6379.

Stafford, M. M., Brown, M. N., Mishra, P., Stanwood, G. D., & Mathews, G. C. (2010). Glutamate spillover augments GABA synthesis and release from axodendritic synapses in rat hippocampus. *Hippocampus*, 20(1), 134-144.

Tzingounis, A. V., & Wadiche, J. I. (2007). Glutamate transporters: confining runaway excitation by shaping synaptic transmission. *Nature Reviews Neuroscience*, 8(12), 935.

Wendland, J. R., Moya, P. R., Timpano, K. R., Anavitarte, A. P., Kruse, M. R., Wheaton, M. G., Murphy, D. L. (2009). A Haplotype Containing Quantitative Trait Loci for SLC1A1 Gene Expression and Its Association With Obsessive-Compulsive Disorder. *Archives*

*Geneticalpsychiatry*, 66(4), 408–416.

Ylinen, A., Soltész, I., Bragin, A., Penttonen, M., Sik, A., & Buzsáki, G. (1995). Intracellular correlates of hippocampal theta rhythm in identified pyramidal cells, granule cells, and basket cells. *Hippocampus*, 5(1), 78–90.

Zike, I. D., Chohan, M. O., Kopelman, J. M., Krasnow, E. N., Flicker, D., Nautiyal, K. M., Veenstra-VanderWeele, J. (2017). OCD candidate gene *SLC1A1* /EAAT3 impacts basal ganglia-mediated activity and stereotypic behavior. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 114(22), 5719–5724.

## ANEXOS

TABLA S1: PROMEDIOS Y ERROR ESTÁNDAR FIGURA 10.B

INTENSIDAD ESTIMULO (V)	AMPLITUD FIPSP CONTROL	AMPLITUD FIPSP CONTROL+PM	VALOR P
0	0.47±1.5	1,87±0.76	0.40
5	120.90 ±37.56	84.83±21	0.40
10	193.07±47.96	164.89±30.27	0.61
15	222.05±47.33	206.87±36.75	0.80
20	240.40±44.3	234.55±38.59	0.93
30	265.41±42	259.43±34.7	0.91
40	302.77±42.47	274.98±35.9	0.62

TABLA S2: PROMEDIOS Y ERROR ESTÁNDAR FIGURA 10.C

INTERVALO INTERESTIMULO	PPR CONTROL	PPR CONTROL+PM	VALOR P
30 ms	0.36±0.03	0,45±0,04	0.02
70 ms	0.48±0,03	0,55±0,03	0.01
100 ms	0.59±0.015	0.67±0.003	0.02
300ms	0.74±0.02	0.74±0.916	1.00

TABLA S3: PROMEDIOS Y ERROR ESTÁNDAR FIGURA 11.A

INTENSIDAD ESTIMULO (V)	AMPLITUD FIPSP CONTROL	AMPLITUD FIPSP EAAT3 <sub>GLO</sub> /GAD65	VALOR P
0	0,95±0.96	0.47±1.50	0.78
5	81.10±17.00	120.90±37.60	0.29
10	156.90±36.28	193.07±47.90	0.55
15	196.00±42.70	222.04±47.32	0.69
20	238.69±48.90	240.40±44.35	0.98
30	292.51±59.00	265.41±42.60	0.74
40	365,27±77.90	302.77±42.50	0.54

TABLA S4: PROMEDIOS Y ERROR ESTÁNDAR FIGURA 11.B

INTENSIDAD ESTIMULO (V)	AMPLITUD IPSC CONTROL	AMPLITUD IPSC EAAT3 <sub>GLO</sub> /GAD65	VALOR P
0	1,66±1,7	3,2±2,4	0.4
2	272,9 ±49,2	417,4±42,6	0.19
4	408±98	633,5±73,7	0.22
6	558±159,4	770,06±83,2	0.29
8	596±167,5	832,13±88,1	0.16
10	688±182,18	950,97±103,3	0.05

TABLA S5: PROMEDIOS Y ERROR ESTÁNDAR FIGURA 12.A

INTERVALO INTERESTIMULO	PPR CONTROL	PPR EAAT3 <sub>GLO</sub> /GAD65	VALOR P
30 ms	0.36±0.037	0,44±0,03	0.09
70 ms	0,48±0.03	0,55±0.02	0.01
100 ms	0,58±0,015	0,64±0,03	0.17
300ms	0,74±0,02;	0,76±0,015	0.88

TABLA S6: PROMEDIOS Y ERROR ESTÁNDAR FIGURA 12.B

INTERVALO INTERESTIMULO	PPR CONTROL	PPR EAAT3 <sub>GLO</sub> /GAD65	VALOR P
30 ms	0.56±0.05	0,55±0,42	0.87
70 ms	0,54±0.07	0,49±0.035	0.54
100 ms	0,48±0,05	0,49±0,033	0.99
300ms	0,52±0,04	0,55±0,042	0.66

TABLA S7: PROMEDIOS Y ERROR ESTÁNDAR FIGURA 13.A

NÚMERO DE ESTÍMULO (n)	FIPSP <sub>n</sub> /FIPSP1 CONTROL	FIPSP <sub>n</sub> /FIPSP1 EAAT3 <sub>GLO</sub> /GAD65	VALOR P
1	1.02±0,01	1±0	0.30
2	0.61±0.02	0.54±0.03	0.38
3	0.53±0.03	0.48±0.03	0.18
4	0.49±0.02	0.47±0.03	0.11
5	0.51±0.03	0.45±0.03	0.11
6	0.52±0.03	0.45±0.03	0.45
7	0.49±0.03	0.45±0.04	0.30
8	0.46±0.03	0.44±0.04	0.26
9	0.47±0.03	0.41±0.04	0.30
10	0.46±0.04	0.42±0.03	0.56
11	0.43±0.04	0.41±0,04	0.31
12	0.43±0.03	0.43±0.04	0.50
13	0.44±0.04	0.40±0.03	0.46
14	0.42±0.04	0.39±0.04	0.27
15	0.39±0.04	0.36±0.04	0.36
16	0.40±0.03	0,37±0.05	0.58
17	0.41±0.03	0.36±0.04	0.25
18	0.41±0.04	0.36±0.04	0.58
19	0.36±0.03	0.36±0.04	0.37
20	0.35±0.03	0.36±0.04	0.39
21	0.37±0.04	0.33±0.04	0.21
22	0.37±0.04	0.33±0.03	0.40
23	0.34±0.04	0.33±0.04	0.48
24	0.33±0.03	0.33±0.04	0.56
25	0.35±0,04	0.33±0.04	0.30

TABLA S8: PROMEDIOS Y ERROR ESTÁNDAR FIGURA 13.B

NÚMERO DE ESTÍMULO (n)	FIPSP <sub>n</sub> /FIPSP1 CONTROL	FIPSP <sub>n</sub> /FIPSP1 EAAT3 <sub>GLO</sub> /GAD65	VALOR P
1	1± 0	1±0	1
2	0.66±0.04	0.75±0.07	0.38
3	0.53±0.04	0.54±0.06	0.98
4	0.44±0.04	0.48±0.06	0.64
5	0.38±0.02	0.47±0.05	0.19
6	0.40±0.03	0.48±0.06	0.29
7	0.40±0.02	0.48±0.07	0.35
8	0.40±0.03	0.45±0.06	0.51
9	0.37±0.02	0.43±0.06	0.40
10	0.38±0.05	0.47±0.06	0.35
11	0.37±0.03	0.46±0.06	0.26
12	0.33±0.03	0.44±0.06	0.17
13	0.36±0.03	0.41±0.06	0.51
14	0.37±0.03	0.42±0.05	0.51
15	0.33±0.06	0.38±0.05	0.51
16	0.28±0.03	0.41±0.06	0.14
17	0.28±0.03	0.38±0.04	0.17
18	0.30±0.04	0.45±0.05	0.04
19	0.27±0.04	0.44±0.08	0.10
20	0.28±0.02	0.36±0.05	0.30
21	0.30±0.03	0.39±0.06	0.37
22	0.30±0.02	0.38±0.04	0.30
23	0.29±0.04	0.38±0.04	0.16
24	0.27±0.04	0.40±0.06	0.08
25	0.28±0.03	0.34±0.06	0.47

TABLA S9: PROMEDIOS Y ERROR ESTÁNDAR FIGURA 14.A

INTENSIDAD ESTIMULO (V)	AMPLITUD FIPSP EAAT3 <sub>GLO</sub> /GAD65	AMPLITUD FIPSP EAAT3 <sub>GLO</sub> /GAD65 +PM	VALOR P
0	0.47±1.50	1.87±0.76	0.43
5	120.90±37.60	84.80±21.00	0.37
10	193.07±47.90	64.89±30.28	0.45
15	222.04±47.32	106.87±36.80	0.27
20	240.40±44.35	159.43±34.76	0.17
30	265.41±42.60	176.98±35.90	0.13
40	302.77±42.50	205.06±28.20	0.13

TABLA S10: PROMEDIOS Y ERROR ESTÁNDAR FIGURA 14.B

INTERVALO INTERESTIMULO	PPR EAAT3 <sub>GLO</sub> /GAD65	PPR EAAT3 <sub>GLO</sub> /GAD65 + PM	VALOR P
30 ms	0.44±0.03	0.45±0.03	0.83
70 ms	0.55±0.02	0.60±0.07	0.50
100 ms	0.64±0.03	0.69±0.08	0.52
300ms	0.76±0.02	0.75±0.02	0.88