FACULTAD DE CIENCIAS

PROGRAMA DE MAGÍSTER EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

MENCIÓN NEUROCIENCIA

ESTUDIO DEL EFECTO DE LA INHIBICIÓN QUIMIOGENÉTICA DE NEURONAS DOPAMINÉRGICAS SOBRE LA SENSIBILIZACIÓN LOCOMOTORA INDUCIDA POR QUINPIROL

RUBEN ALEJANDRO SEJAS MUÑOZ

Tesis para optar al grado de

Magíster en Ciencias Biológicas Mención Neurociencia

Director(a) de Tesis:

Dra. Angélica del Pilar Escobar Maldonado

Profesora Auxiliar del Instituto de Fisiología

2023

AGRADECIMIENTOS

A mis padres, por permitirme estudiar un magíster en el extranjero. A la Universidad de Valparaíso y profesores por haberme enseñado los tópicos de neurociencia, principalmente a la profesora Dra. Angélica Escobar por tener paciencia y darme soporte a lo largo de la realización del segundo año y la tesis de grado.

INDICE

1. RESUMEN 1
2. ABSTRACT 2
3. INTRODUCCIÓN 4
   3.1 Trastorno obsesivo compulsivo. 4
   3.2 Circuito dopaminérgico mesolímbico y su relación con el TOC. 4
   3.3 La disminución de dopamina extracelular en el NAc se relaciona con conductas compulsivas. 6
   3.4 Modulación de la actividad neuronal por medio de Quimiogenética: Uso de DREADD. 8
4. HIPÓTESIS 10
5. OBJETIVOS 10
   5.1 OBJETIVO GENERAL 10
   5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS 10
6. DISEÑO EXPERIMENTAL 11
7. MATERIALES Y MÉTODOS 12
   7.1 REACTIVOS 12
      7.1.1 Agentes Virales 12
   7.2 DROGAS 13
   7.3 ANIMALES 13
   7.4 Cirugía estereotáxica para inducir la expresión del DREADD inhibitorio hM4D en neuronas dopaminérgicas 14
   7.5 Administración de fármacos y medición de actividad locomotora 14
8. ANÁLISIS ESTADÍSTICO 15
9. RESULTADOS 16
   9.1 Efecto de la administración crónica de QNP sobre la actividad locomotora de ratones wild-type y ratones TH-Cre. 16
   9.2 Efecto de la administración crónica de C-21 sobre la actividad locomotora. 17
   9.3 Efecto de la administración crónica de QNP en ratones pretratados con C21 18
10. DISCUSIÓN 21
   10.1 Inhibición Quimiogenética de la actividad dopaminérgica 22
   10. 2 Inhibición de la actividad dopaminérgica y facilitación de la sensibilización locomotora inducida por QNP 24
11. CONCLUSIONES 26
12. BIBLIOGRAFÍA 27

1. RESUMEN

El trastorno obsesivo-compulsivo (TOC) es una enfermedad psiquiátrica caracterizada por la aparición de obsesiones y compulsiones y afecta a entre el 1-2% de la población. La vía dopaminérgica mesolímbica es uno de los sistemas cuyas alteraciones se han asociado a esta patología. Este circuito está compuesto por neuronas dopaminérgicas que se proyectan desde el Área Tegmental Ventral (VTA) hasta el Núcleo Accumbens (NAc) donde sinaptan con neuronas de proyección GABAérgicas denominadas neuronas espinosas medias (MSN).

Los receptores de dopamina D2 (D2R) se han relacionado con la patogénesis del TOC. Los D2R se encuentran en las neuronas dopaminérgicas y en las MSN de proyección indirecta y son receptores metabotrópicos acoplados a proteínas Gi, que inhiben las neuronas que los contienen. La activación repetida de los D2R por el agonista Quinpirol (QNP) provoca comportamientos compulsivos como la sensibilización locomotora en ratas y ratones, fenómeno que se acompaña de una disminución de los niveles extracelulares de dopamina en el NAc. Nuestra hipótesis fue que la disminución crónica de los niveles extracelulares de dopamina facilita la sensibilización locomotora inducida por QNP.

Cuando administramos de forma crónica QNP en ratones Wild type y Th-cre sin tratamiento quimiogénetico no vimos diferencias en la locomoción. Al realizar el tratamiento quimiogénetico obtuvimos un aumento en la locomoción cuando aplicamos C21 pero no fue significativo, finalmente cuando se aplicó QNP al grupo con tratamiento vimos un aumento significativo en la locomoción respecto al grupo control. Los resultados sugieren que la inhibición de las neuronas dopaminérgicas puede facilitar la generación de conductas compulsivas. De esta manera podemos develar que los desbalances en el sistema dopaminérgico en el circuito mesolímbico pueden impactar de manera patológica en enfermedades que involucran conductas compulsivas

PALABRAS CLAVES

Trastorno obsesivo compulsivo, Inhibición Quimiogenética, vía mesolímbica, neuronas dopaminérgicas, iMSN, Compuesto 21, VTA, NAc, Quinpirol.

2. ABSTRACT

Obsessive-compulsive disorder (OCD) is a psychiatric illness characterized by the appearance of obsessions and compulsions and affects between 1-2% of the population. The mesolimbic dopaminergic pathway is one of the systems whose changes have been associated with this pathology. This circuit is composed of dopaminergic neurons that project from the Ventral Tegmental Area (VTA) to the Nucleus Accumbens (NAc) where they synapse on GABAergic projection neurons called medium spiny neurons (MSN).

Dopamine D2 receptors (D2R) have been associated with the pathogenesis of OCD. D2Rs are in dopaminergic neurons and indirect projection MSNs and Gi protein-coupled metabotropic receptors, inhibiting the neurons that contain them. Repeated activation of D2R by the agonist quinpirole (QNP) causes compulsive behaviors such as locomotor sensitization in mice, a phenomenon that is accompanied by a decrease in extracellular levels of dopamine in the NAc. We hypothesize that the chronic decrease in extracellular dopamine levels facilitated QNP-induced locomotor sensitization.

When we chronically administered QNP in Wild type and Th-cre mice without chemogenetic treatment we did not see differences in locomotion. When we performed the chemogenetic treatment we obtained an increase in locomotion when we applied C21 but it was not significant, finally when QNP was applied to the treatment group we saw a significant increase in locomotion with respect to the control group. The results suggest that the inhibition of dopaminergic neurons may facilitate the generation of compulsive behaviors. Thus, we can reveal that imbalances in the dopaminergic system in the mesolimbic circuit may have a pathological impact on diseases involving compulsive behaviors.

KEYWORDS

Obsessive compulsive disorder, chemogenetic inhibition, mesolimbic pathway, Dopaminergic neurons, iMSN, Compound-21, VTA, NAc, Quinpirole.

Abreviaturas

C21: Compuesto 21

CNO: N-óxido de clozapina

D1R: Receptores dopaminérgicos D1

D2R: Receptores dopaminérgicos D2

DA: Dopamina

DAT: Transportador de Dopamina

DREADDS: Receptores artificiales activados por drogas de diseño

FSCV: Voltametría cíclica de barrido rápido

GPCR: Receptores acoplados a proteínas G.

HM4DI: Virus Adenoasociado inhibidor de proteína G.

IP: Intraperitoneal

ISRS: Inhibidores Selectivos de la Recaptura de la Serotonina

MSN: Neuronas espinosas Medias

NAc: Núcleo Accumbens

QNP: Quinpirol

TH: Tirosina Hidroxilasa

TOC: Trastorno obsesivo compulsivo

VTA: Área Tegmental Ventral

3. INTRODUCCIÓN

3.1 Trastorno obsesivo compulsivo.

El trastorno obsesivo compulsivo (TOC) consiste en la aparición de obsesiones o pensamientos intrusivos y estresantes, los que se perciben como irracionales o excesivos. Las obsesiones, pueden ser con una introspección buena, donde se reconoce que los "ataques" obsesivos son falsos, o podrían estar acompañados de pensamientos delirantes, donde el sujeto está convencido que los pensamientos obsesivos son ciertos. El segundo criterio para el diagnóstico de TOC según el DSM-V es la presencia de compulsiones o comportamientos ritualísticos y repetitivos, que sirven para mitigar la ansiedad y la inquietud asociada a la obsesión (McGuire et al., 2012; Murphy et al., 2013; Pauls et al., 2014). Cabe recalcar que muchos de los pacientes con otros comportamientos compulsivos como los Tics, son también propensos a desarrollar TOC (American Psychiatric Association, DSM-V, 2013). El TOC es una patología limitante personal y socialmente dada la imposibilidad de controlar los impulsos que surgen a partir de pensamientos intrusivos (Pauls et al., 2014).

El tratamiento farmacológico de primera línea en el TOC consiste en el uso de inhibidores de la recaptura de serotonina, los que son administrados a dosis elevadas y en forma crónica. Sin embargo, aproximadamente un 60% de los pacientes no responden a este tratamiento (Kaplan,2003) por lo que existe la necesidad de conocer y comprender los mecanismos patológicos que subyacen al TOC.

3.2 Circuito dopaminérgico mesolímbico y su relación con el TOC.

Uno de los sistemas de neurotransmisores que puede estar involucrado en la generación de las conductas compulsivas en el TOC es el sistema dopaminérgico mesolímbico (Chamberlain & Ahmari, 2021; Escobar et al., 2020; Pittenger, 2021). Las neuronas dopaminérgicas de este circuito poseen sus cuerpos celulares en el mesencéfalo, en específico en el área del tegmento ventral (VTA) y proyectan sus axones hacia el núcleo accumbens (NAc), localizado en la parte ventral del cuerpo estriado (Gerfen & Surmeier, 2011) (Figura 1). La actividad de estas neuronas, y por tanto la liberación de dopamina (DA) en el NAc median los procesos de recompensa y conductas motivadas hacia el placer, y la gratificación (Bariselli et al., 2019). Se ha visto que alteraciones de la vía dopaminérgica mesolímbica en un modelo con ratas acompañan a conductas adictivas y compulsivas (Escobar et al., 2020; Figee et al., 2016; Poisson et al., 2021; Volkow et al., 2017).

Además de las aferencias dopaminérgicas, las neuronas de proyección del NAc reciben aferencias glutamatérgicas provenientes de la corteza prefrontal medial, el hipocampo ventral y la amígdala basolateral, funcionando como un centro integrador de las señales límbicas para gatillar la conducta. Estas neuronas, denominadas también neuronas espinosas medianas (MSN, por sus siglas en inglés) se dividen en dos grupos dependiendo de los receptores de dopamina que expresan y de su proyección axonal hacia los ganglios basales. Las neuronas que expresan el receptor de dopamina D1 (D1R) proyectan directamente hacia los ganglios basales, mientras que las neuronas que expresan el receptor de dopamina D2 (D2R) proyectan en forma indirecta, es decir con relevos sinápticos (Alexander & Crutcher, 1990; Beckstead & Cruz, 1986; Bertran-Gonzalez et al., 2008; Deng et al., 2006) (Figura 1). La activación de la vía de proyección directa o la inhibición de la vía indirecta promueven la generación de una conducta motivada, por lo que desbalances en la actividad de estas neuronas podrían subyacer a la generación de conductas compulsivas. Por otro lado, los receptores de dopamina expresados en las MSN se acoplan a distintas proteínas G, el D1R señaliza a través de proteína Gs, mientras que el D2R señaliza por Gi/o (Crunkhorn S., 2021). Importantemente, la activación repetida de los D2R en modelos con ratones y ratas genera conductas compulsivas (Asaoka et al., 2019; Culver et al., 2008; Sun et al., 2019; Szechtman et al., 1998, 2001), indicando que la inhibición crónica de la vía indirecta es capaz de generar compulsión.

Además de su localización en las MSN de proyección indirecta, los D2R se expresan en las neuronas dopaminérgicas que proyectan al NAc, encontrándose tanto en sitios somatodendríticos como axonales (Figura 1), donde funcionan como autorreceptores siendo importantes actores en la regulación de la actividad de las neuronas dopaminérgicas y de los niveles extracelulares de dopamina en el NAc. La activación aguda de los D2R en ratas induce una disminución de los niveles extracelulares de dopamina en el NAc y de la locomoción (Centonze et al., 2002; Lebowitz et al., 2022; Margolis et al., 2008; Usiello et al., 2000).

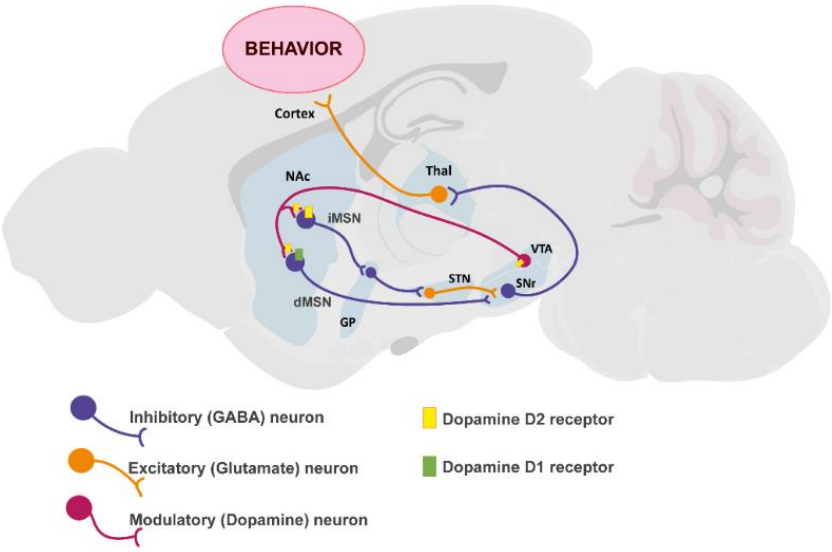

Figura 1. Vía dopaminérgica mesolímbica y neuronas de proyección del NAc. Corte sagital de un cerebro roedor que muestra las neuronas dopaminérgicas del VTA y su proyección hacia el NAc, donde hacen sinapsis con neuronas MSN, cuya proyección se encuentra dividida en MSN de proyección directa (dMSN) o indirecta (iMSN), que expresan D1R y D2R, respectivamente. Las neuronas dopaminérgicas mesolímbicas también expresan receptores D2R tanto en el soma como en los terminales axonales del NAc. *(Obtenido de Proyecto "Estudio de la modulación crónica de los niveles de Dopamina en el núcleo accumbens en conductas compulsivas" autora. Dra. Angélica Escobar Maldonado, Año 2022).*

3.3 La disminución de dopamina extracelular en el NAc se relaciona con conductas compulsivas.

La activación repetida de D2R induce conductas compulsivas, es así como, la administración repetida del agonista D2R Quinpirol (QNP) induce chequeo compulsivo, masticación compulsiva, inflexibilidad conductual y sensibilización locomotora, en ratas y ratones (Asaoka et al., 2019; Culver et al., 2008; Escobar et al., 2015; Sun et al., 2019; Szechtman et al., 1998, 2001), siendo un modelo validado para estudiar mecanismos neurobiológicos del TOC, puesto que presenta validez aparente, de constructo y predictiva con la enfermedad psiquiátrica (Stuchlik et al., 2016). Uno de los aspectos conductuales que induce el tratamiento crónico con QNP es la sensibilización locomotora (Figura 2A), esta conducta se define como un aumento gradual y progresivo de la actividad locomotora inducida por la administración repetida de una droga y que involucra modificaciones neuroplásticas permanentes en el circuito dopaminérgico mesolímbico (Pierce & Kalivas, 1997). A diferencia de la sensibilización locomotora inducida por psicoestimulantes como cocaína y anfetamina, cuyo mecanismo de acción involucra un aumento de la liberación de dopamina, donde la sensibilización conductual ocurre en una porción de

animales, por ejemplo 60% en el caso de anfetamina (Casanova et al., 2013), la sensibilización conductual inducida por QNP ocurre en el 100% de las ratas tratadas repetidamente (A. P. Escobar et al., 2015, 2017), lo que sugiere que la sola activación repetida de D2R es capaz de inducir los cambios neuroplásticos necesarios para que se induzca la sensibilización locomotora. Por otro lado, la ejecución de las compulsiones por pacientes con TOC también involucra un aumento de la locomoción (Stuchlik et al., 2016) por lo que se ha planteado que la sensibilización conductual puede subyacer a la generación de conductas compulsivas involucradas en el TOC (Escobar et al., 2020; Pierce & Kalivas, 1997).

Interesantemente, estudios de microdiálisis cerebral y de voltametría cíclica de barrido rápido (FSCV, por sus siglas en inglés) realizados en ratas anestesiadas, encontraron que las ratas tratadas sensibilizadas con QNP poseen una menor liberación basal de dopamina que las ratas controles, un efecto que se acompaña por un mayor efecto inhibitorio de los D2R ubicados en las neuronas dopaminérgicas (Escobar et al., 2015 and 2017) (Figura 2B).

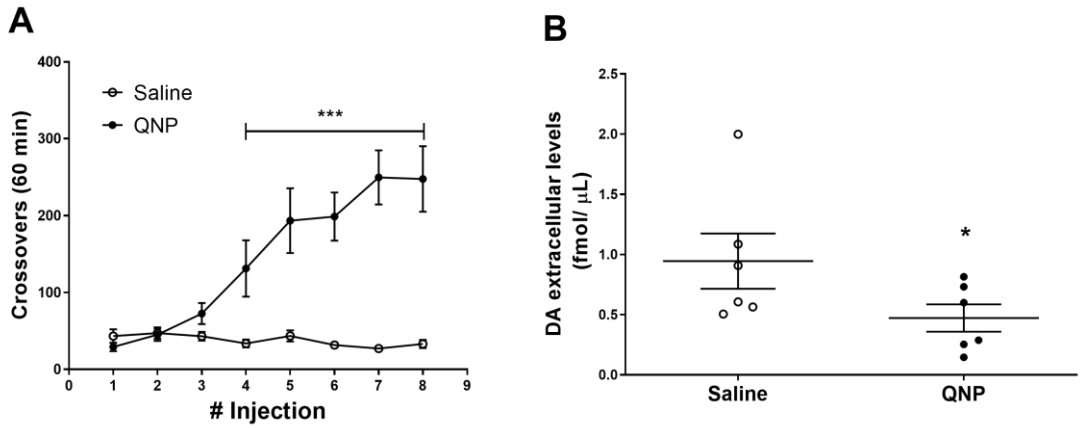

Figura 2. La administración crónica de QNP induce sensibilización locomotora y disminución de la dopamina extracelular en el NAc (Figura adaptada de Escobar et al., 2015). A) Ratas Sprague-Dawley fueron tratadas crónicamente con QNP (0.5mg/kg s.c) o con un volumen equivalente de suero salino. La administración se realizó cada 48 o 72 horas hasta completar 8 inyecciones. Inmediatamente después de cada inyección las ratas fueron puestas en una caja de medición de actividad locomotora horizontal que contaba con 2 pares de haz de luz infrarroja para el conteo de cada cruce horizontal. La actividad locomotora se cuantificó por 1 hora. *** p<0.001 de acuerdo a Two-way Anova y post test Bonferroni. B) 48 horas posterior a la última inyección de QNP las ratas fueron anestesiadas y sometidas a microdiálisis cerebral en el NAc para medir la dopamina liberada * p< 0.05 de acuerdo con test de T no pareado.

Indicando que la disminución de la capacidad de liberación de dopamina durante periodos de reposo (cuando no se realiza la compulsión) es un marcador de la sensibilización conductual

inducida por QNP lo que se puede explicar por una sensibilización de los D2R ubicados en las neuronas dopaminérgicas y de su función inhibitoria como autorreceptor. Por otro lado, personas que padecen de Parkinson, y que por tanto poseen una disminución en los niveles de dopamina por neurodegeneración, tienden a desarrollar pensamientos y conductas compulsivas en respuesta a la farmacoterapia con agonistas D2R como el pramipexol (Ávila et al., 2011; Moore et al., 2014). No se conoce si el efecto de disminución de dopamina contribuye mecanísticamente a la sensibilización locomotora inducida por QNP, o es un efecto que meramente acompaña a la sensibilización.

3.4 Modulación de la actividad neuronal por medio de Quimiogenética: Uso de DREADD.

La Quimiogenética es una técnica en la cual macromoléculas, en este caso un receptor de membrana ha sido modificada genéticamente para que interactúe exclusivamente con una molécula pequeña diseñada (Roth, 2016, 2017). Esta técnica permite manipular la actividad celular por medio de la activación de cascadas de señalización internas de la célula, principalmente la vía de señalización de receptores metabotrópicos, proteínas G. Estos receptores diseñados reciben el nombre de DREADD (receptores de diseño activados exclusivamente por drogas de diseño) (Armbruster et al., 2007) y en la actualidad se conocen DREADDs que se basan en receptores muscarínicos desde M1R a MR5, los M1R, M3R y M5R (HM1Dq, hM3Dq y hM5Dq respectivamente) activan señalización Gq mientras los M2R y M4R (hM2Di y hM4Di, respectivamente) activan señalización Gi (Zhang et al., 2022). Una de las virtudes que tiene este método es que los DREADDs pueden ser aplicados *in vivo* y de esta forma activar la vía de señalización metabotrópica intrínseca a libre demanda, independientemente de los receptores endógenos que existen, por medio del uso de agonistas específicos diseñados químicamente (Mahler et al., 2019). Estos se pueden adquirir comercialmente en vectores virales para lograr la expresión en tipos neuronales específicos. De esta forma, es posible combinar la infección viral con el uso de animales transgénicos, o combinar una doble infección viral o incluso usar animales knock-in que posean en su genoma codificado la secuencia de alguno de los DREADDs disponibles. Si bien existen otras técnicas que permiten la modulación de la actividad neuronal, como por ejemplo la optogenética, la técnica de DREADD es menos invasiva, en cuanto el animal es sometido a una única cirugía para la infección viral, sin implante de fibra óptica. Por otro lado, es menos costosa, puesto que no involucra el uso de equipos de luz LED y permite imitar lo que ocurre con la actividad neuronal por activación de receptores metabotrópicos endógenos.

El agonista de DREADD, CNO (N-óxido de clozapina) ha sido el más usado a lo largo de la experimentación en Quimiogenética. Pruebas con CNO realizadas en ratones han mostrado que este agonista atraviesa en baja medida la barrera hematoencefálica hacia el sistema nervioso central cuando se lo administra de forma sistémica (Gómez et al., 2017). El uso de este agonista depende de la dosis y en dosis bajas puede producir conductas tipo ansiosas que evidentemente pueden influir en los resultados de investigaciones conductuales (Mahler et al., 2018; Ilg A-K 2018). Por otro lado, el C21 (compuesto 21) fue clasificado por ser un excelente fármaco debido a su biodisponibilidad y sus propiedades farmacocinéticas (Thompson, 2018), aunque un estudio reciente realizado en ratas indica que al igual de CNO, C21 podría tener efectos "off target", siendo los mayores efectos selectivos a dosis bajas (Goutaudier, et al.2020).

La necesidad de recrear un modelo murino que permita dilucidar los principios neurobiológicos que subyacen al trastorno obsesivo compulsivo y de manera más general a las conductas compulsivas, ha llevado a esta investigación a tener como principal objetivo el estudio de la reducción de la dopamina extracelular en el núcleo accumbens y su influencia sobre los efectos locomotores inducidos por la administración repetida de QNP. Es así que se hizo uso de la técnica Quimiogenética para poder disminuir de manera crónica la actividad de las neuronas dopaminérgicas de manera selectiva, para luego activar repetidamente los receptores D2R con QNP.

La pregunta que guía esta tesis es: ¿La reducción de dopamina en forma crónica facilita la generación de conductas compulsivas inducidas por D2R?

4. HIPÓTESIS

La disminución de la actividad dopaminérgica mesolímbica facilita la sensibilización locomotora inducida por QNP.

5. OBJETIVOS

5.1 OBJETIVO GENERAL

El objetivo general de esta tesis es dilucidar la contribución de la reducción crónica de la actividad dopaminérgica mesolímbica sobre la sensibilización locomotora inducida por QNP.

5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1.- Establecer el modelo de sensibilización locomotora inducida por Quinpirol en ratones de la cepa TH-CRE Y WT.

2.- Establecer la técnica de Quimiogenética para inhibir crónicamente la actividad de las neuronas dopaminérgicas mesolímbicas y evaluar su rol en actividad locomotora de un modelo en ratones.

3.- Estudiar el efecto de la inhibición Quimiogenética de neuronas dopaminérgicas sobre la sensibilización locomotora inducida por QNP.

6. DISEÑO EXPERIMENTAL

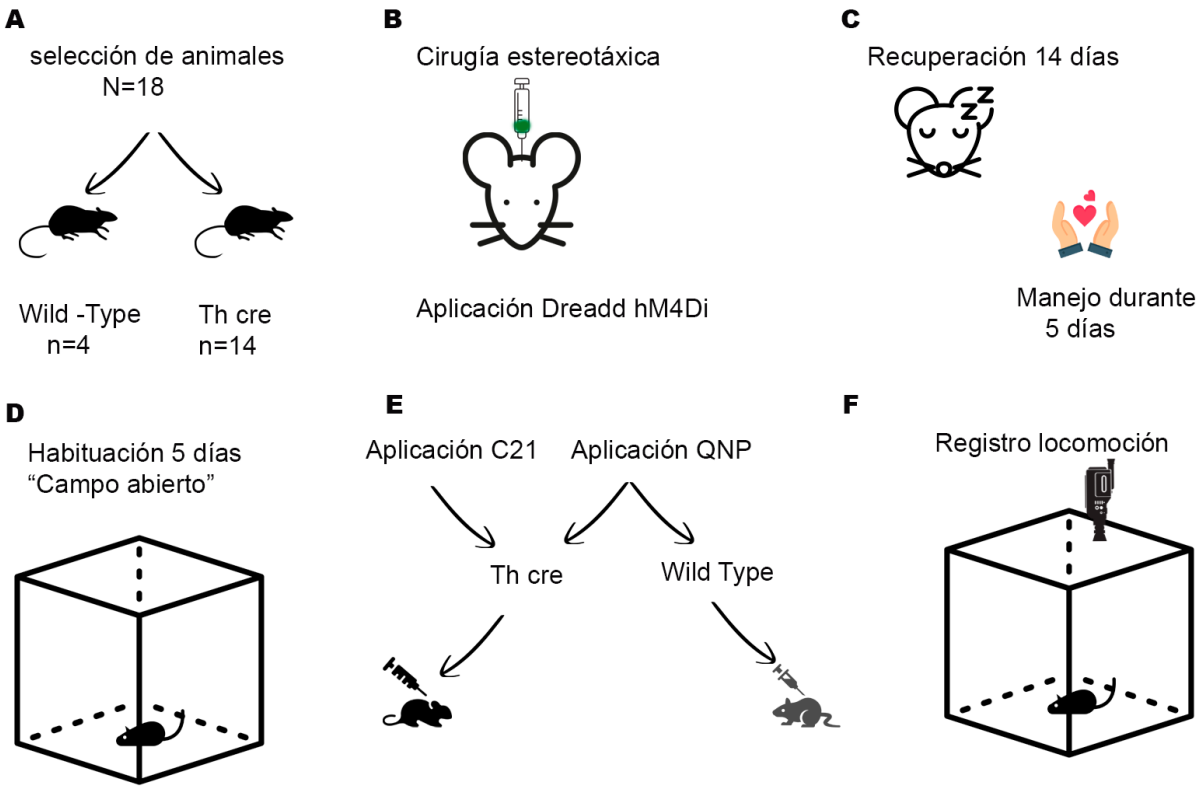

Figura 3. Diseño Experimental. A) Selección de los animales disponibles para la investigación. B) Aplicación del protocolo de infección h4MD. C) Recuperación post cirugía de animales operados. D) Habituación de animales al test de campo abierto. E) Aplicación de drogas C21 y QNP en 2 grupos F) Registro de actividad locomoción mediante el software Ethovision 8Tx.

Utilizamos la Quimiogenética para inhibir la actividad de neuronas dopaminérgicas mesolímbicas y con ello reducir la liberación de dopamina en el NAc en forma crónica, de tal forma de imitar el efecto de la activación crónica de D2R inducida por QNP, pero exclusivamente en las neuronas dopaminérgicas mesolímbicas y no en las MSN. Para ello utilizamos un constructo viral que codifica para el DREADD inhibitorio hM4D, cuya expresión es condicional a la presencia de la proteína Cre-recombinasa. Para alcanzar la selectividad usamos una línea de ratón que puedan ser marcadores selectivos para neuronas dopaminérgicas, en el caso de esta investigación se utilizaron ratones transgénicos que expresaban la proteína Cre recombinasa que se expresa a partir del promotor de la tirosina hidroxilasa (TH), ratones TH-Cre los que fueron infectados por una inyección estereotáxica en el VTA. Luego de la recuperación a la cirugía, éstos fueron

inyectados de forma crónica con el agonista de DREAAD C21 de manera sistémica (i.p.), para finalmente evaluar la actividad locomotora, inducida por la administración crónica de QNP (i.p.).

7. MATERIALES Y MÉTODOS

7.1 REACTIVOS

7.1.1 Agentes Virales

Se utilizó el DREADD HM4D codificado en el vector *(pAAV-hSyn-DIO-HA-hM4D(Gi)-IRES-mCitrine* Double floxed Gi-coupled hM4D-IRES-mCitrine bajo el control del promotor de sinapsina humano 1). Contenido de virus adenoasociado serotipo 8 (AAV8).

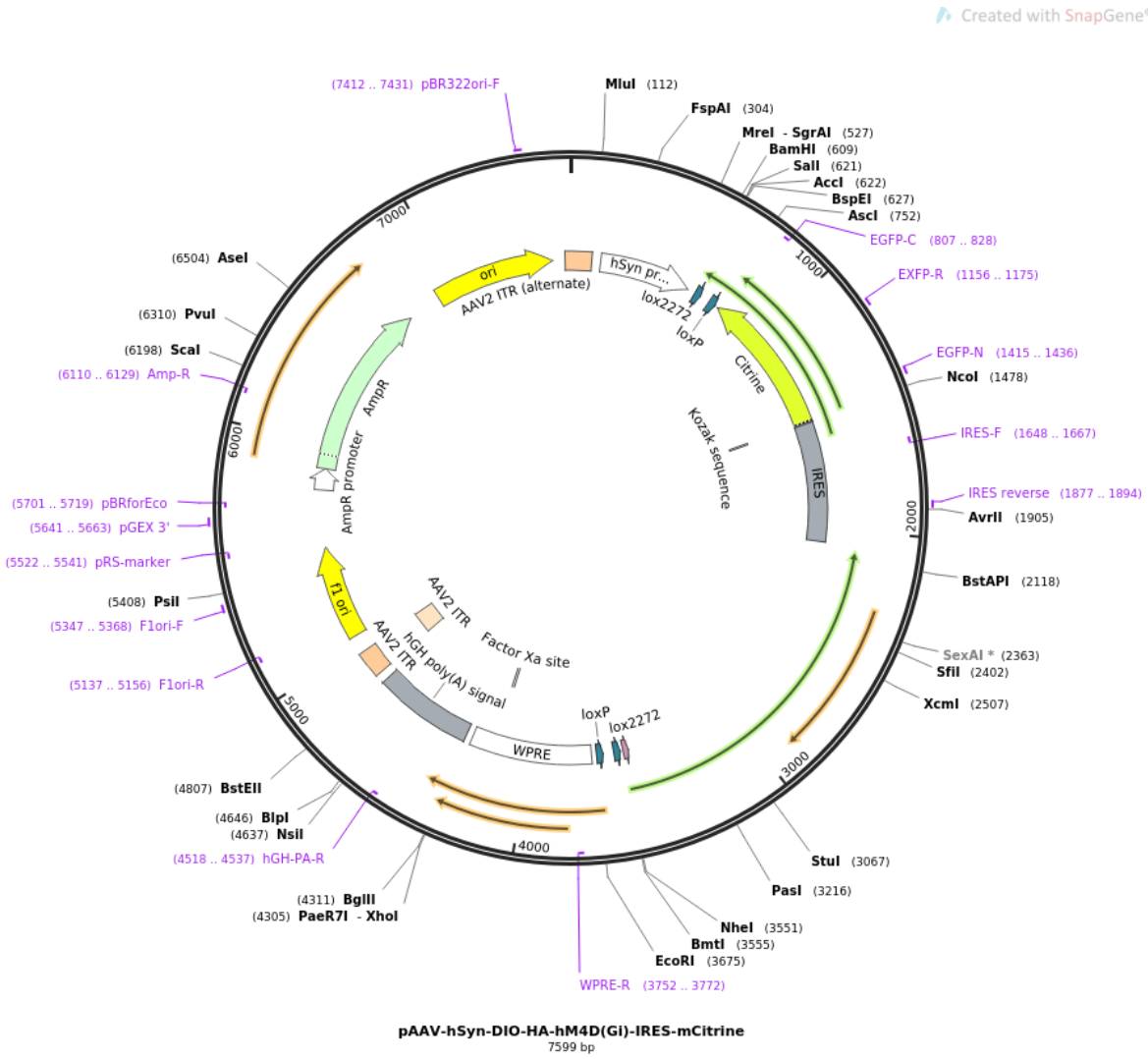

Figura 4. Mapa del vector de expresión de hM4Di adquirido desde el repositorio Addgene: Double floxed Gi-coupled hM4D-IRES-mCitrine bajo el control del promotor de sinapsinas humano (obtenido de https://www.addgene.org/50455).

7.2 DROGAS

Para la cirugía estereotáxica realizada por la tutora de la tesis la Dra. Angélica Escobar utilizamos Isoflurano (Isoflurano, 1-cloro-1-(difluorometoxi)-2,2,2-trifluoroetano, 1-cloro-2,2,2-trifluoroetil difluorometil éter) obtenido de BAXTER (Chile) como anestésico, este se usó en estado gaseoso a través de 2 dosis, una dosis de inducción de anestesia de 3% a un flujo de 0.5 L/min de aire y luego se cambió a una dosis de 1-2% (de acuerdo con la respuesta anestésica del animal) a un flujo de 0.5 L/min. Luego de la recuperación de los animales utilizamos como analgésico Ketoprofeno (Ácido 2-(3-benzoilfenil)propiónico) (Koralen 10%, Virbac Centrovet, Chile) disuelto a una dosis de 5.0 mg/kg, ip, con un volumen de 0.15 ml para un peso de 30g, 1 vez al día durante 3 días de recuperación post cirugía.

Para la activación del DREADD utilizamos el agonista C21 ((11-(1-piperazinyl)-5H-dibenzo[b,e][1,4]diazepina), obtenido de TOCRIS Biociencia (Reino Unido) a una dosis de 3.0 mg/kg, ip disuelto en suero fisiológico (NaCl 0.9%) con 100 µl de C21 para un ratón de 20g .

Se utilizó Quinpirol hidrocloruro (4aR-trans)-4,4a,5,6,7,8,8a,9-Octahydro-5-propyl-1H pyrazolo[3,4-g] Clorhidrato de quinolina) (1mg/kg) como agonista selectivo de D2R, este se obtuvo de la compañía TOCRIS Biociencia (Reino Unido), se disolvió en suero fisiológico (NaCl 0.9%) con 100 µl de solución de QNP para un ratón de 20g .

7.3 ANIMALES

En esta tesis utilizamos ratones transgénicos TH-Cre heterocigotos (B6.Cg-7630403G23RikTg(Th-cre) 1Tmd/J; *Jackson laboratory*), n =14 (5 hembras y 9 machos). Los ratones Th -Cre expresan la enzima Cre-recombinasa bajo el promotor de tirosina hidroxilasa, un marcador de neuronas catecolaminérgicas puesto que es la enzima limitante de la síntesis de catecolaminas. Además, se hizo uso de animales del tipo Wild Type n=4 (2 hembras y 2 machos). Todos los animales pertenecen a la cepa C57BL/6 que fueron obtenidos del bioterio de murinos de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Valparaíso.

Los ratones fueron mantenidos en contenedores específicos ventilados, en una habitación con temperatura controlada (24±2°C), en un ciclo de luz/oscuridad 12/12, con agua y alimento *ad libitum* y con oxigenación continua de aire filtrado por filtros HEPA. Los animales fueron mantenidos en habitáculos con no más de 4-6 individuos. Los animales fueron identificados por medio de un arete con número identificador.

Los animales utilizados en esta tesis, así como los procedimientos a los que fueron sometidos contaban con aprobación bioética BEA 138-19 aprobado por el comité institucional de la Universidad de Valparaíso, CICUAL-UV.

7.4 Cirugía estereotáxica para inducir la expresión del DREADD inhibitorio hM4D en neuronas dopaminérgicas

Para permitir la expresión selectiva de hM4Di en las neuronas dopaminérgicas, utilizamos la línea transgénica B 6. Cg – 7630403G23Rik Tg(Th- cre)1Tmd /J, ratones TH-Cre, disponible en el bioterio institucional y gentilmente donados por el laboratorio del Dr. Pablo Moya. Los ratones TH-Cre fueron anestesiados con un flujo continuo de isoflurano de 0.5ml/min con un porcentaje de isoflurano para la inducción de anestesia de 3%. Luego los animales fueron colocados en un aparato estereotáxico, momento en el que la anestesia fue mantenida con un 1.0- 1.5% de isoflurano. Se realizó una craneotomía bilateral con las siguientes coordenadas para alcanzar el VTA: AP= -3.2 mm; ML=±0.5 mm; DV=-4.2mm. Las inyecciones virales se realizaron a un flujo de 0,1 µ l/min para completar 1.0 µl por medio de una bomba neumática y se esperó 10 minutos para retirar la pipeta de inyección. Luego se procedió a suturar la herida y administrar ketoprofeno 3mg/Kg vía intraperitoneal y suero salino (NaCl 0.9%) para favorecer su recuperación. Los ratones se recuperaron durante al menos 14 días hasta el análisis de comportamiento, periodo en el cual fueron monitoreados diariamente. Este procedimiento fue realizado por la Dra. Escobar con asistencia de mi persona.

7.5 Administración de fármacos y medición de actividad locomotora

Las inyecciones de soluciones y fármacos se realizaron por mi persona imitando el protocolo de activación repetida de D2R para inducir conductas compulsivas en ratones (Asaoka et al., 2019), la que consiste en una administración de solución al día por 9 días consecutivos. Previo a la administración de los fármacos, todos los ratones fueron manipulados durante 5 días consecutivos para permitir su adecuación al experimentador y recibieron durante los últimos 2 días una dosis de solución salina, para permitir su habituación a la inyección. La actividad locomotora fue observada y medida todos los días posterior a la inyección de C21, QNP o sus respectivas soluciones controles. Previamente a la medición por el software y a la inyección se realizó la aclimatación a la arena durante 30 min. Se utilizó una arena de medición conductual consistente en una caja de acrílico blanca de medidas 43 cm de ancho x 43 de largo y 43 de alto, sobre la cual se posicionó una cámara de registro. Se administró el fármaco correspondiente y

se midió la actividad locomotora 40 min posterior a la inyección del fármaco durante 20 min. La cámara grabó la actividad locomotora y ésta se analizó con el programa Ethovision para cuantificar la distancia recorrida por los sujetos.

Como primera aproximación y para establecer el modelo de sensibilización locomotora a QNP en nuestro laboratorio, un grupo de ratones wild-type (WT) y TH-Cre recibió una dosis diaria de QNP de manera intraperitoneal (1.0 mg/kg, i.p.)(wt n=2; TH-Cre n=2) o un volumen equivalente de solución salina (wt n=2; TH-Cre n=7).

Después de la recuperación de la cirugía, los ratones TH-Cre (n=5) se sometieron al protocolo de inhibición de la actividad dopaminérgica mesolímbica la que se realizó mediante el agonismo de hM4Di. Para ello, mi persona inyectó el agonista selectivo DREADD C21 (3.0 mg/kg, ip) por 10 días consecutivos, de forma de imitar el protocolo de sensibilización locomotora inducido por QNP. Elegimos este fármaco porque tiene una mayor biodisponibilidad y menos efectos secundarios que el antiguo agonista de DREADD CNO (Goutaudier et al., 2020). Posterior a la administración de C21 se midió la actividad locomotora diariamente. Después de 24h a 48 h de la última inyección de C21, los ratones recibieron el tratamiento repetido con QNP (1.0 mg/kg) por vía intraperitoneal y se midió la actividad locomotora como se describió anteriormente.

8. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Todos los resultados en la presente tesis fueron presentados como la media ± SEM (error standard de la media) y el análisis estadístico fue realizado con el software GraphPad Prisma 8.02. Las diferencias entre 2 grupos analizados y sus diferencias entre diferentes tiempos y días de aplicación fueron analizadas por columna y fila estableciendo un $p < 0.05$ como estadísticamente significativo.

La diferencia entre grupos fue analizada test paramétrico de t -Student de 2 colas tanto pareada como no pareada. La diferencia con diferentes tratamientos en distintas etapas de tiempo fue realizada mediante Two way-ANOVA ya que se tuvo diferentes ratones a partir de 2 factores (con tratamiento de Dreadds y sin tratamiento de Dreadds) . Finalmente Utilizamos además un R^2 como indicador de un buen modelo teniendo en cuenta que un valor =1 es un modelo perfecto.

9. RESULTADOS

9.1 Efecto de la administración crónica de QNP sobre la actividad locomotora de ratones wild-type y ratones TH-Cre.

Para evaluar si podíamos replicar la sensibilización locomotora inducida por QNP (Asaoka 2019) en ratones, un pequeño grupo de ratones WT y TH-Cre fue tratado por 9 días con QNP (WT n=2; TH-Cre n=2) o con volumen equivalente de salino (WT n=2; TH-Cre n=7). Luego de la inyección se posicionó a los animales en una arena de campo abierto durante 60 min de los cuales se registraron mediante el software Ethovision los últimos 20 min, dado a que se tenía como antecedente que la acción del aumento de locomoción empieza de 20 a 30 min post administración de QNP en ratones (Asaoka, 2019). En la figura 5A podemos observar que, en base a un modelo de administración repetida diaria de 9 inyecciones, la actividad locomotora no cambió en animales WT tratados con salino. Por otro lado, los ratones inyectados con QNP presentaron una actividad locomotora igual o menor a la presentada por los animales tratados con salino, indicando diferencias con lo descrito por Asaoka et al., 2019. En la figura 5B vemos la locomoción de ratones de Th Cre administrados con QNP (n=2) y otro grupo más grande (n=7) tratado con salino en el cual los resultados no son significativos (2 way Anova factor tiempo, eje (x) = 0.1; $p>0.05$).

Dado que no se observaron diferencias conductuales entre los grupos WT y TH-Cre ni en sus respuestas frente a QNP, se decidió unir ambos genotipos. La figura 5C muestra la unión de los grupos (Salino, WT + TH-Cre n= 9 ; QNP, WT + TH-Cre n=4). El análisis de la actividad locomotora entre grupos muestra que no existe diferencias entre la actividad locomotora inducida por salino o QNP (Two-Way ANOVA factor grupo=0.08; $p>0.05$). De esa manera podemos concluir que los grupos no difieren uno de otro, a diferencia de estudios anteriores hechos en ratas (Culver et al., 2008; Szechtman et al., 1998, 2001)

Así, la actividad locomotora inducida por QNP fue similar a la encontrada luego de la administración de salino, sin encontrarse un efecto sensibilizador de la actividad locomotora, esto a diferencia de lo encontrado en ratas (Szechtman y Eilam,1998; Szechtman et al.,2001) y en estudios previos en ratones (Asaoka et al., 2019).

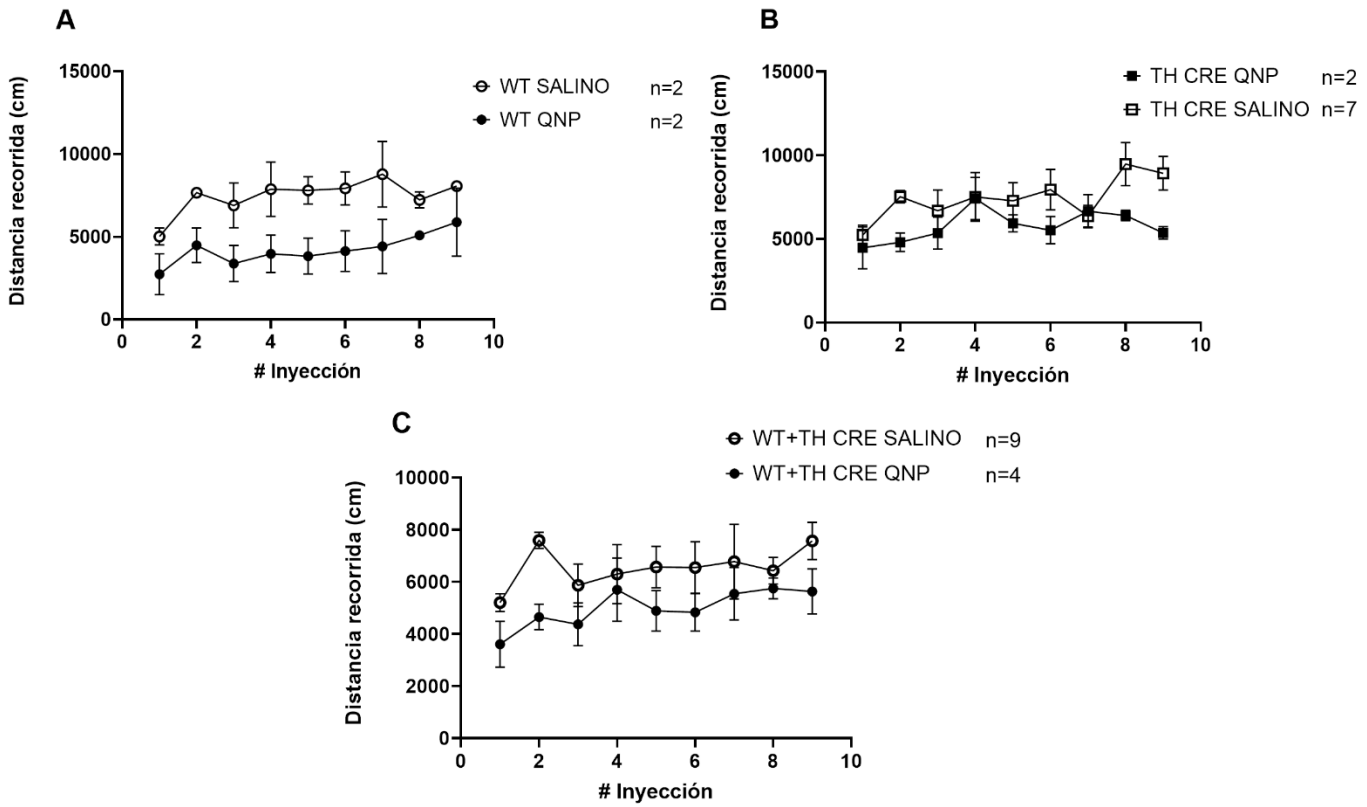

Figura 5. Actividad locomotora de ratones WT y TH-Cre tratados con salino o QNP A) Ratones tipo Wild Type recibieron 9 inyecciones; 2 ratones inyectados con salino y 2 ratones con QNP. B) Ratones con el genotipo TH-Cre recibieron 9 inyecciones; 2 ratones con QNP y otros 7 ratones con Salino. C) Unión de grupos de ratones WT+ TH-Cre salino (n= 9) y WT +Th Cre QNP (n=4).

9.2 Efecto de la administración crónica de C-21 sobre la actividad locomotora.

5 ratones de la línea TH-Cre fueron inyectados por cirugía estereotáxica para lograr la expresión de hM4D en el VTA. Luego del periodo post-cirugía se comenzó con el tratamiento crónico con el agonista c21, el protocolo de inyección fue el mismo que el de QNP, puesto que se buscó imitar el efecto que posee QNP sobre las neuronas dopaminérgicas.

La Figura 6A muestra el efecto individual de la activación repetida de hM4D con C21 sobre la actividad locomotora, observándose un efecto variable donde 2 ratones disminuyeron su actividad y otros aumentaron.

Para comparar la actividad locomotora promedio de los ratones que expresaban hM4D y que fueron tratados repetidamente con C21 respecto de la actividad locomotora control, inducida por salino, se enfrentaron ambos grupos. Como se observa en la figura 6B, no se observan

diferencias significativas en la actividad locomotora de los ratones tratados con C21 y los ratones tratados con salino (2 way ANOVA factor columna= 0.45; p>0.05).

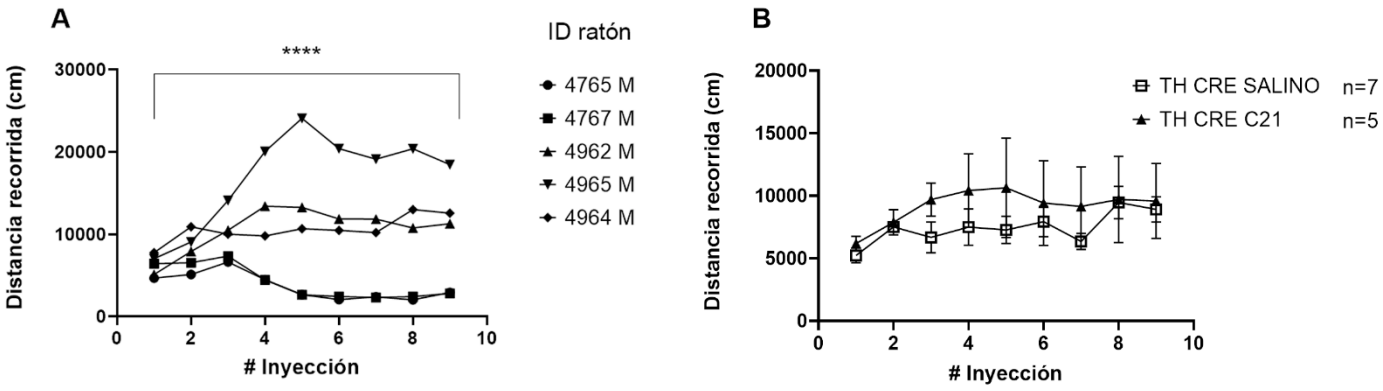

Figura 6. Actividad locomotora de ratones TH-Cre que expresan hM4D en neuronas dopaminérgicas luego del tratamiento con C21. A) Actividad locomotora individual de los 5 ratones tratados. B) Actividad locomotora grupal de ratones tratados con C21 en comparación con la actividad locomotora en respuesta a salino.

9.3 Efecto de la administración crónica de QNP en ratones pretratados con C21

Para evaluar si la inhibición Quimiogenética crónica de la actividad dopaminérgica impacta sobre la conducta inducida por QNP, los ratones TH-Cre que expresaban hM4D fueron tratados repetidamente con QNP posterior al tratamiento crónico con C21. Como se observa en la Figura 7A, los animales presentaron un aumento de la actividad locomotora respecto de aquellos animales tratados solamente con QNP y sin tratamiento previo con C21.

Como se muestra en la Figura 7A, los animales tratados con C21 e infectados con hM4D muestran un aumento progresivo de la actividad locomotora inducida por QNP a lo largo de las inyecciones la que es significativamente mayor a partir del día 2 a la actividad locomotora de los ratones TH-Cre que no poseen hM4Di y que no fueron pre tratados con c21, (Two-Way Anova) . Además, la figura 7B muestra la actividad locomotora alcanzada al día 9 de inyección de QNP, el análisis por test de T no pareado indica una diferencia significativa entre aquellos ratones que se les aplicó el protocolo de infección viral por el DREADD hM4Di y aquellos que no recibieron el tratamiento (T- Test no pareado, grupo pre-tratado con C21 *vs* sin C21;**p<0.0083). En la figura 7C.1 observamos la distancia recorrida por los 5 ratones pertenecientes al grupo experimental

comparando el día 1 de aplicación de QNP con el día 9 mostrando un resultado significativo en su locomoción de acuerdo con Test de T pareado. Indicando que la inhibición crónica de la actividad dopaminérgica mesolímbica inducida por Quimiogenética, facilita el efecto de sensibilización locomotora inducido por QNP. Finalmente, en la figura 7C.2 observamos la distancia recorrida por 4 ratones control, comparando el día 1 de la aplicación de QNP con el día 9 mostrando un resultado no significativo en su locomoción de acuerdo con un Test de T pareado. Lo cual indica que la distancia recorrida es menor a la del grupo experimental.

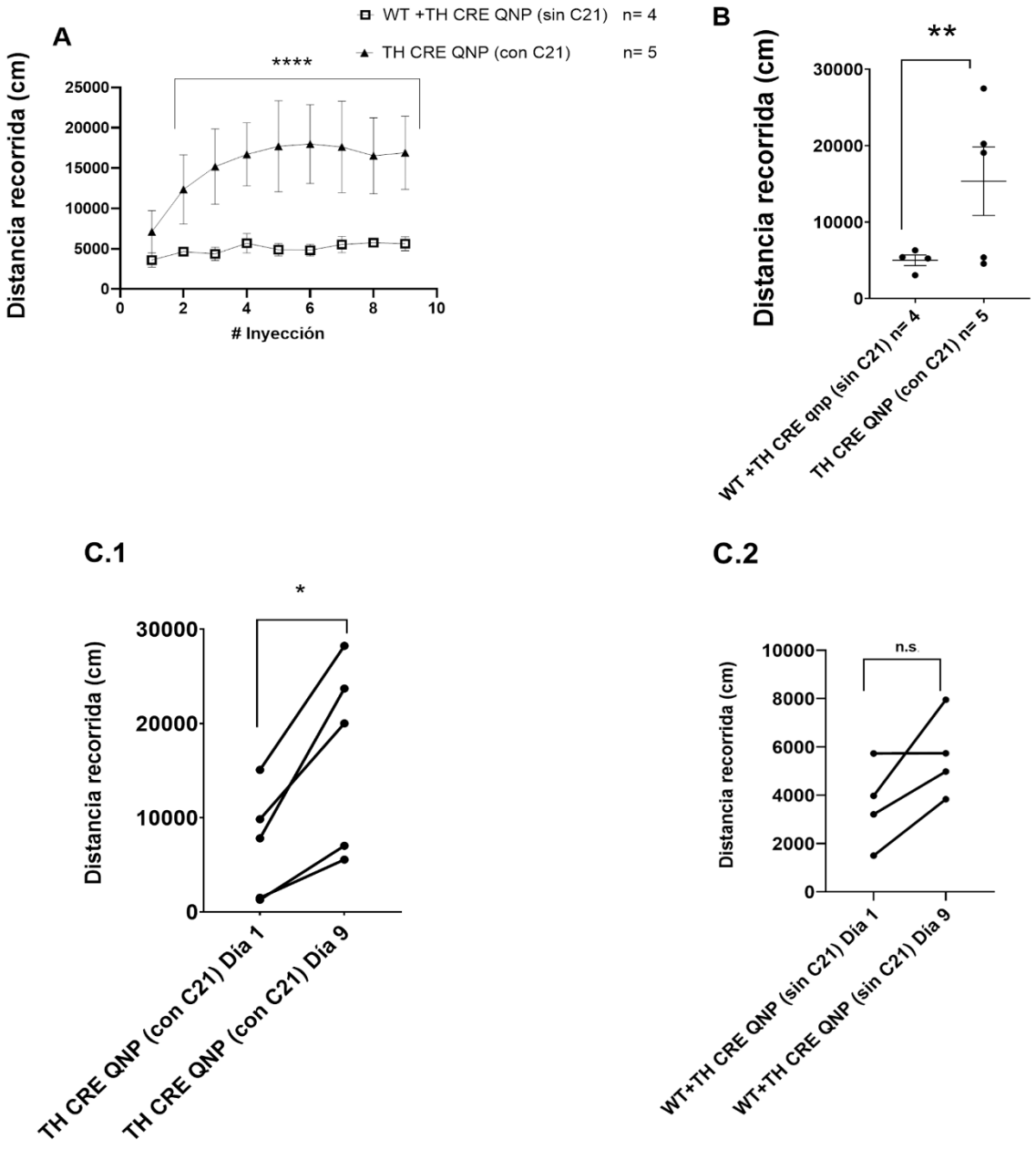

Figura 7. Actividad locomotora de ratones administrados con QNP con y sin agonismo de hM4Di . A) Actividad locomotora diaria de ratones TH-Cre tratados con QNP, con y sin agonismo de hM4Di (**p valor <0.0001, de acuerdo a Two-Way Anova). B) Actividad locomotora en la novena inyección de QNP en ratones TH-Cre con y sin agonismo de hM4D, (**p valor <0.0083, de acuerdo con Test de T-student no pareado de dos colas). C.1).- Comparación de la actividad locomotora alcanzada durante el día 1 y 9 del tratamiento con QNP en los ratones TH-Cre con hM4Di y pretratados con C21 (*p valor <0.0115 , de acuerdo con T-student pareado de dos colas). C.2) Comparación de la actividad locomotora inducida por QNP durante el día 1 y 9 en ratones TH-Cre + Wild Type sin tratamiento con C21 (^{ns}p valor <0.0899 , de acuerdo con T-student pareado de dos colas).**

10. DISCUSIÓN

El estudio de las conductas compulsivas y las enfermedades psiquiátricas es de vital importancia para el desarrollo de la ciencia biológica y la salud. Las enfermedades psiquiátricas involucran una desregularización de neurotransmisores en el sistema nervioso central (Brown et al., 1985). El sistema dopaminérgico mesolímbico se ha descrito como uno de los posibles sistemas cuya alteración puede generar conductas compulsivas. Se ha visto que la señalización de la dopamina estaría implicada en modelos de recompensa, procesamiento y compulsión del TOC (Harsáyi et al., 2007). Una de las alteraciones conductuales que podrían subyacer al desarrollo de conductas compulsivas es la sensibilización conductual.

Una de las alteraciones conductuales que podrían subyacer al desarrollo de conductas compulsivas es la sensibilización conductual. La presente investigación trató de dilucidar la contribución de la reducción crónica de la actividad dopaminérgica mesolímbica sobre la sensibilización inducida por Quinpirol.

En particular, la sensibilización locomotora se describe como un aumento progresivo de la actividad locomotora en respuesta a la administración de una dosis única de droga de manera repetida (Pierce and Kalivas 2007). Este fenómeno conductual se observa a menudo con la administración de drogas de abuso y se ha postulado que modificaciones de la vía dopaminérgica mesolímbica podría subyacer a este fenómeno (Vezina P., 2004; Pierce and Kalivas 2007). De hecho, la activación repetida de los receptores de dopamina D2R con su agonista QNP induce sensibilización locomotora (Eilam y Szechtman 1990). Junto con la sensibilización conductual, QNP induce chequeo compulsivo en ratas (Szechtman et al., 1998; 2001) y conductas repetitivas en ratones (Asaoka et al 2019), por lo que se ha postulado como un bueno modelo animal de TOC (Eilam D. 2017). Interesantemente, estudios de medición de niveles de dopamina extracelular en ratas sensibilizadas a QNP muestran una disminución de los niveles basales de dopamina en el NAc (Koeltzow et al., 2007; Escobar et al., 2015, 2017), indicando una reducción de la actividad dopaminérgica que acompaña a la sensibilización inducida por QNP. En esta tesis intentamos dilucidar el papel que cumple la reducción de la actividad dopaminérgica mesolímbica en la sensibilización locomotora inducida por QNP, por medio del uso de Quimiogenética.

Nuestros resultados mostraron que, las diferentes líneas de ratones, por un lado los ratones WT y los ratones TH-Cre no mostraron diferencias en la locomoción cuando se les aplicó QNP sin la infusión de los DREADDs. Evaluamos si el QNP podía inducir sensibilización locomotora en

ratones de la línea WT y TH-Cre, tal y como se había descrito previamente por (Aozaka 2019). En ratas, la administración repetida de QNP produce una sensibilización locomotora pronunciada (Sullivan et al.,1998; Szechtman et al., 1998, 2001; Escobar et al., 2015, 2017) en la totalidad de las ratas tratadas (Escobar et al., 2015). Los resultados de nuestro estudio muestran que, a la dosis utilizada, 1.0mg/kg, no se encontraron efectos sensibilizadores en la locomoción de los ratones de ambas cepas. Un estudio previo realizado en ratones WT, pero utilizando una dosis de 5.0mg/kg mostró un aumento progresivo de la actividad locomotora desde la 1° hasta la 4° inyección de QNP, un mayor número de inyecciones no generó mayor aumento sino más bien un descenso en la locomoción (Escobar et al., 2015). Interesantemente, estos efectos conductuales alcanzados con la dosis de 5.0mg/kg no se observaron en ratones Knock-out del D2R (Escobar et al., 2015), indicando que los efectos sensibilizadores dependen del receptor D2R y requieren de altas dosis para ser alcanzados. Interesantemente en estudios con ratas cuando se aplica QNP se observa una disminución locomotora durante los primeros 15 minutos post aplicación de inyección y cuando se da una aplicación repetida la hiperlocomoción ocurre hasta 2 horas post inyección de QNP (Campos et al.,2015; Perreault et al., 2006, 2007). Eliam y Szechtman (1989) reportaron que a una dosis de 0.5 mg/kg en ratas inducia a un efecto bifásico en la locomoción empezando con la depresión y continuando con la activación. Por otro lado, estudios en ratones con dosis igual a la utilizada en esta tesis mostraron efectos hiperlocomotores luego de 70 min de la administración de la droga y efectos hipolocomotores entre los 0-50 min post inyección (Luque-rojas et al, 2013), por lo que es probable que parte de los efectos observados durante este trabajo ocurran durante la fase de reducción de la actividad locomotora. Estos resultados muestran diferencias entre distintas especies de roedores donde en ratas es evidente el efecto conductual inducido por QNP, pero que en ratones de la cepa C57bl/6j no es aparente, al menos con el pequeño número de animales que fueron usados en nuestro estudio. Esta diferencia podría estar dada por un metabolismo aumentado en ratones que pueden limitar la biodisponibilidad de QNP a nivel central

10.1 Inhibición Quimiogenética de la actividad dopaminérgica

La sensibilización conductual inducida por QNP se acompaña de una reducción de los niveles de dopamina en el NAc (Koeltzow et al., 2003; Escobar et al., 2015, 2017), lo que indica una reducción de la actividad dopaminérgica mesolímbica que acompaña al proceso de sensibilización. Los estudios realizados en ratas sensibilizadas a QNP se realizaron 72 horas posterior a la última dosis de QNP, lo que sugiere que la reducción de la actividad dopaminérgica permanece, a pesar de no

estar presente la droga. Las neuronas dopaminérgicas mesolímbicas poseen receptores D2R en los cuerpos celulares, ubicados en el VTA, así como en los terminales, ubicados en el NAc. La administración de QNP a nivel sistémico activa los receptores D2R ubicados en las MSN indirectas del NAc y también los receptores D2R ubicados en las neuronas dopaminérgicas, por lo que con cada administración de QNP se reduce los niveles de dopamina en el NAc por disminución de la actividad dopaminérgica gatillada por el acoplamiento del D2R a su vía de señalización iniciada por la disociación de la proteína Gi/olf. Para lograr imitar este efecto, pero de manera independiente de la activación de D2R a nivel postsináptico (en las MSN) se utilizó la técnica de Quimiogenética. Para ello, seleccionamos el DREADD inhibitorio hM4Di, el cual es un derivado del receptor muscarínico M4, que al igual que D2R, se acopla a la proteína Gi/olf, pero que debido a mutaciones en su secuencia no une el ligando endógeno acetilcolina. La selectividad neuronal para la expresión de hM4Di se logra utilizando un vector viral condicional (figura 4) el cual fue inyectado de manera estereotáxica en el VTA de ratones que expresan la proteína Cre recombinasa en neuronas TH positivas (ratón TH-Cre). Este procedimiento se realizó en 5 ratones de esta cepa (figura 6).

Para activar el receptor hM4Di y de esta manera inhibir la actividad dopaminérgica mesolímbica se utilizó C21, el cual a lo largo de esta última década se ha descrito como un mejor ligando, gracias a su biodisponibilidad y eficacia para atravesar la barrera hematoencefálica (Goutaudier et al.,2020). En esta tesis se utilizó una dosis de 3,0 mg/kg, de administración intraperitoneal, el resultado esperado consistía en una reducción de la actividad locomotora, lo que sería consistente con una reducción de la actividad dopaminérgica mesolímbica. De manera interesante encontramos que los ratones tuvieron respuestas variables en la actividad locomotora luego de las inyecciones de C21, encontrando ratones que disminuían y otros que aumentaban la actividad locomotora (figura 6). La dispersión de estos datos pueden ser consecuencias de efectos "off-target" de C21 (Goutaudier et al.,2020; Thompson et al.,2018) y que requerirían de un ajuste de dosis, lo que se puede lograr realizando curvas dosis respuestas en un número mayor de animales. Por otro lado, el efecto puede ser consecuencia de la expresión no específica de hM4D en neuronas de naturaleza química distinta a la dopaminérgica, por ejemplo, en neuronas que rodean el VTA que en su mayoría son neuronas GABAérgicas o que otras regiones que expresan CRE hayan sido afectadas por el procedimiento de cirugía. Si bien esto no debería ser un mayor determinante, debido a que el virus es condicional a la presencia de Cre-recombinasa (Figura 4), un buen ejercicio control sería inyectar el vector en el VTA de

ratones WT y evaluar la expresión de hM4Di, por medio de la inmuno-detección del epítopo HA acoplado al receptor. Otro ajuste factible es refinar el volumen de virus inyectado durante la cirugía estereotáxica, de forma tal de limitar la infección de otras áreas cerebrales cercanas.

Otra alternativa para inhibir la actividad dopaminérgica mesolímbica distinta a la de nuestra investigación es el uso de optogenética, que nos podría dar una mejor comprensión de lo que ha ocurrido en este tipo de circuitos y su efecto en la conducta. Además, un grupo control que aún nos falta por determinar es el grupo SHAM (sin DREADD) o un grupo infectado con el vector vacío o que no contiene la secuencia que codifica para hM4Di o bien administrar C21 a ratones que no se han sometido a la cirugía estereotáxica. De esta manera, podríamos determinar posibles efectos inespecíficos de C21 o bien de hM4Di.

Por otro lado, estudios en paralelo de nuestro laboratorio están determinando el efecto de hM4Di y de C21 de manera funcional sobre la liberación de dopamina en el NAc.

10. 2 Inhibición de la actividad dopaminérgica y facilitación de la sensibilización locomotora inducida por QNP

Con el objetivo de evaluar si la activación del D2R en las neuronas dopaminérgicas contribuye o no a la sensibilización locomotora inducida por QNP, inhibimos crónica y quimiogenéticamente la actividad dopaminérgica para luego administrar repetidamente QNP mientras se medía la actividad locomotora. . Los resultados muestran que los ratones tratados repetidamente con C21 que expresaban hM4D (que imita a D2R) poseen una mayor actividad locomotora que aquellos ratones solo tratados con QNP (figura 7). Notablemente, al observar el perfil de locomoción durante los días de tratamiento con QNP pudimos observar una pendiente positiva en la curva de locomoción, mostrando una menor locomoción en el primer día y la mayor actividad locomotora luego de la última inyección (figura 7 A y 7 C). Ello indica que los ratones pretratados con C21, presentaron un perfil de locomoción similar a lo descrito en el modelo en ratas (Szechtman et al., 1998, 2001; Escobar et al., 2015, 2017), por lo que el tratamiento crónico con QNP pasó de no producir cambios en la actividad locomotora a sensibilizar conductualmente a los ratones. Estos resultados indican que la inhibición Quimiogenética de las neuronas dopaminérgicas facilita la sensibilización locomotora inducida por QNP, sugiriendo que en el NAc el efecto presináptico D2R de disminuir la dopamina de manera crónica contribuye a la sensibilización de los D2R postsinápticos localizados en las MSN. Estos datos van en línea con

estudios previos que muestran que la coadministración de un agonista de receptores kappa opioide (KOR), que al igual que D2R se ubica en las neuronas dopaminérgicas mesolímbicas y se acopla a proteína Gi/olf, potencia el efecto sensibilizador de QNP (Perreault et al., 2006, 2007; Escobar et al., 2015, 2017). Lo anterior indica que la potenciación podría deberse a efectos presinápticos que fomentan la activación de 2 vías de señalización en paralelo que reducen la actividad dopaminérgica y por ende, la liberación de dopamina en el NAc.

Varios estudios han descrito el efecto agudo de la manipulación Quimiogenética de las neuronas dopaminérgicas sobre la liberación de dopamina, la función de DAT (Mahler et al., 2019) o sobre la sensibilización locomotora inducida por psicoestimulantes (Runegaard et al.,2019). Sin embargo, pocos estudios han evaluado los efectos crónicos en neuronas dopaminérgicas y previos a iniciar los protocolos con las distintas drogas. A nuestro entender este es el primer estudio que reporta los efectos de la inhibición crónica de la actividad dopaminérgica sobre los efectos de QNP. Algunos trabajos relacionados al área del abuso de drogas, en los que se han utilizado Dreadds inhibitorios en neuronas dopaminérgicas mesolímbicas y su agonismo crónico, han mostrado que la activación previa a los test conductuales de autoadministración reduce la impulsividad de ratas, pero aumenta el consumo de cocaína (Hynes et al., 2021). Por otro lado, se ha descrito que la respuesta inhibitoria de las neuronas dopaminérgicas en el VTA causa sensibilización hacia otras drogas como la cocaína, pero que el efecto inhibitorio de un DREADD inhibitorio como el hM4D se elimina una vez se ha pasado la abstinencia (Runegaard et al.,2018). Además del efecto de aumento progresivo de la actividad locomotora observado en los ratones inyectados con hM4Di y pretratados con C21, observamos una reducción del movimiento durante los primeros 30 min de la aplicación de QNP. Si bien este efecto no fue cuantificado, se describió como un efecto de inmovilización donde la locomoción era tan reducida que hasta se podría decir que los ratones quedaban catatónicos durante los primeros minutos post inyección de QNP. Como se mencionó anteriormente, QNP induce un efecto dual en ratas (Eilam y Szechtman 1989; Perreault et al., 2006) y ratones (Luque-Rojas et al, 2013), mostrando una disminución de la locomoción durante los primeros minutos, que se debería a la activación preferencial de D2R a nivel presináptico en las neuronas dopaminérgicas, puesto que este receptor posee una mayor afinidad que su variante postsináptica y es por ello que se puede observar con las dosis más bajas de QNP (Eilam y Szechtman 1989; Perreault et al., 2006). Mientras que el efecto potenciador de la locomoción se alcanza con dosis más altas y más tardíamente luego de la administración de QNP. Lo anterior sugiere que la reducción de la actividad dopaminérgica mesolímbica sensibiliza

no solo el efecto hiperlocomotor sino también el efecto inhibitorio de la actividad locomotora, lo que se podría deber a una sensibilización de los receptores D2R ubicados en los terminales dopaminérgicos (Escobar et al., 2015, 2017).

11. CONCLUSIONES

Los resultados de esta investigación permitieron enmarcar la importancia del sistema dopaminérgico en la incidencia de condiciones psiquiátricas tomando en cuenta la experimentación en un modelo murino. En esta tesis se logró establecer un modelo de Quimiogenética para manipular la actividad de neuronas dopaminérgicas; por medio de la combinación de cirugía estereotáxica, infección viral, animales transgénicos y medición conductual se pudo evaluar el efecto de la inhibición crónica de la actividad dopaminérgica mesolímbica sobre la respuesta locomotora inducida por QNP. No observamos el efecto de sensibilización locomotora en respuesta a QNP 1.0mg/kg ni en ratones WT ni en TH-Cre. Por otro lado, observamos un efecto disperso de la activación de hM4D en ratones tratados con C21. Notablemente, los ratones que recibieron un compuesto destinado a modificar la actividad dopaminérgica y que posteriormente recibieron QNP mostraron el efecto de aumento progresivo de la actividad locomotora, indicando que la reducción de la actividad dopaminérgica promueve la sensibilización locomotora a QNP. Ello sugiere que una reducción crónica de los niveles dopaminérgicos podría facilitar la generación de conductas compulsivas y por lo tanto, estrategias que permitan la manipulación de la actividad dopaminérgica podrían ser visualizadas como un posible blanco terapéutico para tratar conductas compulsivas.

Se requiere de más estudios que permitan realizar la medición de dopamina en el espacio extracelular, como la voltametría cíclica de barrido rápido y que además permitan medir la función presináptica de D2R en las neuronas dopaminérgicas.

12. BIBLIOGRAFÍA

A.J Spink, R.A.J Tegelenbosch, M.O.S Buma, L.P.J.J Noldus, The EthoVision video tracking system—A tool for behavioral phenotyping of transgenic mice, Physiology & Behavior,Volume 73, Issue 5,2001,Pages 731744,ISSN 0031-9384,https://doi.org/10.1016/S0031-9384(01)00530-3.

Alexander, G. E., & Crutcher, M. D. (1990). Functional architecture of basal ganglia circuits: neural substrates of parallel processing. In Trends in Neurosciences (Vol. 13, Issue 7, pp. 266–271). Trends Neurosci. https://doi.org/10.1016/0166-2236(90)90107-L.

Armbruster, B. N., Li, X., Pausch, M. H., Herlitze, S., & Roth, B. L. (2007). Evolving the lock to fit the key to create a family of G protein-coupled receptors potently activated by an inert ligand. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 104(12), 5163–5168. https://doi.org/10.1073/PNAS.0700293104.

Asaoka, N., Nishitani, N., Kinoshita, H., Nagai, Y., Hatakama, H., Nagayasu, K., Shirakawa, H., Nakagawa, T., & Kaneko, S. (2019). An Adenosine A2A Receptor Antagonist Improves Multiple Symptoms of Repeated Quinpirole-Induced Psychosis. ENeuro, 6(1), ENEURO.0366-18.2019. https://doi.org/10.1523/ENEURO.0366-18.2019.

Ávila, A., Cardona, X., Martín-Baranera, M., Bello, J., & Sastre, F. (2011). Impulsive and compulsive behaviors in Parkinson's disease: A one-year follow-up study. Journal of the Neurological Sciences, 310(1–2), 197–201. https://doi.org/10.1016/j.jns.2011.05.044.

Bariselli, S., Fobbs, W. C., Creed, M. C., & Kravitz, A. v. (2019). A competitive model for striatal action selection. In Brain Research (Vol. 1713, pp. 70–79). Elsevier B.V. https://doi.org/10.1016/j.brainres.2018.10.009.

Beckstead, R. M., & Cruz, C. J. (1986). Striatal axons to the globus pallidus, entopeduncular nucleus and substantia nigra come mainly from separate cell populations in cat. Neuroscience, 19(1), 147–158. https://doi.org/10.1016/0306-4522(86)90012-6.

Bertran-Gonzalez, J., Bosch, C., Maroteaux, M., Matamales, M., Hervé, D., Valjent, E., & Girault, J.-A. (2008). Opposing patterns of signaling activation in dopamine D1 and D2 receptor-expressing striatal neurons in response to cocaine and haloperidol. The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience, 28(22), 5671–5685. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1039-08.2008.

Bolaños-Jiménez R., J. Arizmendi-Vargas, N. Martínez-Zavala, et al. Quinpirole effects on the dopaminergic system Br J Pharmacol Toxicol, 2 (2011), pp. 310-317.

Brown RP, Mann JJ. A clinical perspective on the role of neurotransmitters in mental disorders. Hosp Community Psychiatry. 1985 Feb;36(2):141-50. doi: 10.1176/ps.36.2.141. PMID: 2579012.

C. Campos-García Rojas, F. Jiménez-Ponce, A. Flores-Vargas, A.P. García.(2015). OCD in animal models using quinpirole as dopaminergic inductor of perseverative behaviour, Revista Médica Del Hospital General De México, Volume 78, Issue 4,2015, Pages 169-176,ISSN 0185-1063, https://doi.org/10.1016/j.hgmx.2015.09.002.

Casanova, J. P., Velis, G. P., & Fuentealba, J. A. (2013). Amphetamine locomotor sensitization is accompanied with an enhanced high K+-stimulated Dopamine release in the rat medial prefrontal cortex. Behavioural Brain Research, 237, 313–317. https://doi.org/10.1016/j.bbr.2012.09.052.

Castrellon, J.J., Young, J.S., Dang, L.C. et al. Mesolimbic dopamine D2 receptors and neural representations of subjective value. Sci Rep 9, 20229 (2019). https://doi.org/10.1038/s41598-019-56858-1.

Centonze, D., Usiello, A., Gubellini, P., Pisani, A., Borrelli, E., Bernardi, G., & Calabresi, P. (2002). Dopamine D2 Receptor-Mediated Inhibition of Dopaminergic Neurons in Mice Lacking D2L Receptors. Neuropsychopharmacology, 27(5), 723–726. https://doi.org/10.1016/S0893-133X(02)00367-6.

Chamberlain, B. L., & Ahmari, S. E. (2021). Animal Models for OCD Research. Current Topics in Behavioral Neurosciences, 49, 55–96. https://doi.org/10.1007/7854_2020_196.

Crunkhorn S. Understanding dopamine receptor signalling. Nat Rev Drug Discov. 2021 Mar;20(3):178. doi: 10.1038/d41573-021-00027-5. PMID: 33568802.

Culver, K. E., Szechtman, H., & Levant, B. (2008). Altered dopamine D2-like receptor binding in rats with behavioral sensitization to quinpirole: effects of pre-treatment with Ro 41-1049. European Journal of Pharmacology, 592(1–3), 67–72. https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2008.06.101.

Deng, Y. P., Lei, W. L., & Reiner, A. (2006). Differential perikaryal localization in rats of D1 and D2 dopamine receptors on striatal projection neuron types identified by retrograde labeling. Journal of Chemical Neuroanatomy, 32(2–4), 101–116. https://doi.org/10.1016/j.jchemneu.2006.07.001.

Eilam D, Szechtman H. Dosing regimen differentiates sensitization of locomotion and mouthing to D2 agonist quinpirole. Pharmacol Biochem Behav. 1990 Aug;36(4):989-91. doi: 10.1016/0091-3057(90)90111-t. PMID: 1977180.

Eilam D. From an animal model to human patients: An example of a translational study on obsessive compulsive disorder (OCD). Neurosci Biobehav Rev. 2017 May;76(Pt A):67-76. doi: 10.1016/j.neubiorev.2016.12.034. PMID: 28434589.

Escobar, A. del P., Casanova, J. P., Andrés, M. E., & Fuentealba, J. A. (2020). Crosstalk Between Kappa Opioid and Dopamine Systems in Compulsive Behaviors. In Frontiers in Pharmacology (Vol. 11). Frontiers Media S.A. https://doi.org/10.3389/fphar.2020.00057

Escobar, A. P., Cornejo, F. A., Olivares-Costa, M., González, M., Fuentealba, J. A., Gysling, K., España, R. A., & Andrés, M. E. (2015). Reduced dopamine and glutamate neurotransmission in the nucleus accumbens of quinpirole-sensitized rats hints at inhibitory D2 autoreceptor function. Journal of Neurochemistry, 134(6). https://doi.org/10.1111/jnc.13209

Escobar, A. P., González, M. P., Meza, R. C., Noches, V., Henny, P., Gysling, K., España, R. A., Fuentealba, J. A., & Andrés, M. E. (2017). Mechanisms of kappa opioid receptor potentiation of dopamine D2 receptor function in quinpirole- Induced locomotor sensitization in rats. International Journal of Neuropsychopharmacology, 20(8). https://doi.org/10.1093/ijnp/pyx042.

Figee, M., Pattij, T., Willuhn, I., Luigjes, J., van den Brink, W., Goudriaan, A., Potenza, M. N., Robbins, T. W., & Denys, D. (2016). Compulsivity in obsessive-compulsive disorder and addictions. European Neuropsychopharmacology, 26(5), 856–868. https://doi.org/10.1016/j.euroneuro.2015.12.003.

Gerfen, C. R., & Surmeier, D. J. (2011). Modulation of Striatal Projection Systems by Dopamine. Annual Review of Neuroscience, 34(1), 441–466. https://doi.org/10.1146/annurev-neuro-061010-113641.

Gomez JL, Bonaventura J, Lesniak W, Mathews WB, Sysa-Shah P, Rodriguez LA, Ellis RJ, Richie CT, Harvey BK, Dannals RF, Pomper MG, Bonci A, Michaelides M. Chemogenetics revealed:

DREADD occupancy and activation via converted clozapine. Science. 2017 Aug 4;357(6350):503-507. doi: 10.1126/science.aan2475. PMID: 28774929; PMCID: PMC7309169.

Goutaudier R, Coizet V, Carcenac C, Carnicella S. Compound 21, a two-edged sword with both DREADD-selective and off-target outcomes in rats. PLoS One. 2020 Sep 18;15(9):e0238156. doi: 10.1371/journal.pone.0238156. PMID: 32946510; PMCID: PMC7500623.

Harsányi A, Csigó K, Demeter G, Németh A. A kényszerbetegség új megközelítése: a dopaminerg teóriák [New approach to obsessive-compulsive disorder: dopaminergic theories]. Psychiatr Hung. 2007;22(4):248-58. Hungarian. PMID: 18167420.

Hynes TJ, Hrelja KM, Hathaway BA, Hounjet CD, Chernoff CS, Ebsary SA, Betts GD, Russell B, Ma L, Kaur S, Winstanley CA. Dopamine neurons gate the intersection of cocaine use, decision making, and impulsivity. Addict Biol. 2021 Nov;26(6):e13022. doi: 10.1111/adb.13022. Epub 2021 Feb 8. PMID: 33559379.

Kaplan A, Hollander E. A review of pharmacologic treatments for obsessive-compulsive disorder. Psychiatr Serv. 2003 Aug;54(8):1111-8. doi: 10.1176/appi.ps.54.8.1111. PMID: 12883138.

Kayla G. Townsley, Marissa B. Borrego, Angela R. Ozburn,Effects of chemogenetic manipulation of the nucleus accumbens core in male C57BL/6J mice,Alcohol,Volume 91,2021,Pages 21-27,ISSN 0741-8329,https://doi.org/10.1016/j.alcohol.2020.10.005.

Lebowitz, J. J., Trinkle, M., Bunzow, J. R., Balcita-Pedicino, J. J., Hetelekides, S., Robinson, B., de La Torre, S., Aicher, S. A., Sesack, S. R., & Williams, J. T. (2022). Subcellular localization of D2 receptors in the murine substantia nigra. Brain Structure & Function, 227(3), 925–941. https://doi.org/10.1007/S00429-021-02432-3.

Luque-Rojas María Jesús and others, Hyperactivity induced by the dopamine D2/D3 receptor agonist quinpirole is attenuated by inhibitors of endocannabinoid degradation in mice, International Journal of Neuropsychopharmacology, Volume 16, Issue 3, April 2013, Pages 661–676, https://doi.org/10.1017/S1461145712000569.

Mahler, S. v., Brodnik, Z. D., Cox, B. M., Buchta, W. C., Bentzley, B. S., Quintanilla, J., Cope, Z. A., Lin, E. C., Riedy, M. D., Scofield, M. D., Messinger, J., Ruiz, C. M., Riegel, A. C., España, R. A., &

Aston-Jones, G. (2019). Chemogenetic manipulations of ventral tegmental area dopamine neurons reveal multifaceted roles in cocaine abuse. Journal of Neuroscience, 39(3), 503–518. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0537-18.2018.

Mahler, S., Aston-Jones, G. CNO Evil? Considerations for the Use of DREADDs in Behavioral Neuroscience. Neuropsychopharmacol.43, 934–936 (2018). https://doi.org/10.1038/npp.2017.299.

Margolis, E. B., Mitchell, J. M., Ishikawa, J., Hjelmstad, G. O., & Fields, H. L. (2008). Midbrain dopamine neurons: projection target determines action potential duration and dopamine D(2) receptor inhibition. The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience, 28(36), 8908–8913. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1526-08.2008.

McGuire, J. F., Lewin, A. B., Horng, B., Murphy, T. K., & Storch, E. A. (2012). The Nature, Assessment, and Treatment of Obsessive–Compulsive Disorder. Postgraduate Medicine, 124(1), 152–165. https://doi.org/10.3810/pgm.2012.01.2528.

Moore, T. J., Glenmullen, J., & Mattison, D. R. (2014). Reports of pathological gambling, hypersexuality, and compulsive shopping associated with dopamine receptor agonist drugs. JAMA Internal Medicine, 174(12), 1930–1933. https://doi.org/10.1001/jamainternmed.2014.5262

Murphy, D. L., Moya, P. R., Fox, M. A., Rubenstein, L. M., Wendland, J. R., & Timpano, K. R. (2013). Anxiety and affective disorder comorbidity related to serotonin and other neurotransmitter systems: obsessive-compulsive disorder as an example of overlapping clinical and genetic heterogeneity. Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences, 368(1615), 20120435–20120435. https://doi.org/10.1098/rstb.2012.0435.

Pauls, D. L., Abramovitch, A., Rauch, S. L., & Geller, D. A. (2014). Obsessive-compulsive disorder: an integrative genetic and neurobiological perspective. Nature Reviews. Neuroscience, 15(6), 410–424. https://doi.org/10.1038/nrn3746.

Pierce, R. C., & Kalivas, P. W. (1997). A circuitry model of the expression of behavioral sensitization to amphetamine-like psychostimulants. Brain Research. Brain Research Reviews, 25(2), 192–216. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9403138.

Pittenger, C. (2021). Pharmacotherapeutic Strategies and New Targets in OCD. Current Topics in Behavioral Neurosciences, 49, 331–384. https://doi.org/10.1007/7854_2020_204

Poisson, C. L., Engel, L., & Saunders, B. T. (2021). Dopamine Circuit Mechanisms of Addiction-Like Behaviors. Frontiers in Neural Circuits, 15. https://doi.org/10.3389/FNCIR.2021.752420.

Roth, B. L. (2016). DREADDs for Neuroscientists. Neuron, 89(4), 683. https://doi.org/10.1016/J.NEURON.2016.01.040.

Roth, B. L. (2017). Use of DREADDS. Neuron, 89(4), 683–694. https://doi.org/10.1016/j.neuron.2016.01.040.DREADDs.

Runegaard AH, Sørensen AT, Fitzpatrick CM, Jørgensen SH, Petersen AV, Hansen NW, Weikop P, Andreasen JT, Mikkelsen JD, Perrier JF, Woldbye D, Rickhag M, Wortwein G, Gether U. (2018). Locomotor- and Reward-Enhancing Effects of Cocaine Are Differentially Regulated by Chemogenetic Stimulation of Gi-Signaling in Dopaminergic Neurons. eNeuro. 2018 Jun 18;5(3):ENEURO.0345-17.2018. doi: 10.1523/ENEURO.0345-17.2018. PMID: 29938215; PMCID: PMC6011418.

Runegaard, A. H., Fitzpatrick, C. M., Woldbye, D. P. D., Andreasen, J. T., Sørensen, A. T., & Gether, U. (2019). Modulating dopamine signaling and behavior with chemogenetics: Concepts, progress, and challenges. Pharmacological Reviews, 71(2), 123–156. https://doi.org/10.1124/pr.117.013995.

Stuchlik, A., Radostová, D., Hatalova, H., Vales, K., Nekovarova, T., Koprivova, J., Svoboda, J., & Horacek, J. (2016). Validity of Quinpirole Sensitization Rat Model of OCD: Linking Evidence from Animal and Clinical Studies. Frontiers in Behavioral Neuroscience, 10(OCT). https://doi.org/10.3389/FNBEH.2016.00209.

Sullivan RM, Talangbayan H, Einat H, Szechtman H. Effects of quinpirole on central dopamine systems in sensitized and non-sensitized rats. Neuroscience. 1998 Apr;83(3):781-9. doi: 10.1016/s0306-4522(97)00412-0. PMID: 9483561.

Sun, T., Song, Z., Tian, Y., Tian, W., Zhu, C., Ji, G., Luo, Y., Chen, S., Wang, L., Mao, Y., Xie, W., Zhong, H., Zhao, F., Luo, M.-H., Tao, W., Wang, H., Li, J., Li, J., Zhou, J., … Zhang, Z. (2019).

Basolateral amygdala input to the medial prefrontal cortex controls obsessive-compulsive disorder-like checking behavior. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 116(9), 3799–3804. https://doi.org/10.1073/pnas.1814292116

Szechtman, H., Eckert, M. J., Tse, W. S., Boersma, J. T., Bonura, C. a, McClelland, J. Z., Culver, K. E., & Eilam, D. (2001). Compulsive checking behavior of quinpirole-sensitized rats as an animal model of Obsessive-Compulsive Disorder(OCD): form and control. BMC Neuroscience, 2, 4. https://doi.org/10.1186/1471-2202-2-4.

Szechtman, H., Sulis, W., & Eilam, D. (1998). Quinpirole induces compulsive checking behavior in rats: a potential animal model of obsessive-compulsive disorder (OCD). Behavioral Neuroscience, 112(6), 1475–1485. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9926830.

Thompson KJ, Khajehali E, Bradley SJ, Navarrete JS, Huang XP, Slocum S, Jin J, Liu J, Xiong Y, Olsen RHJ, Diberto JF, Boyt KM, Pina MM, Pati D, Molloy C, Bundgaard C, Sexton PM, Kash TL, Krashes MJ, Christopoulos A, Roth BL, Tobin AB. DREADD Agonist 21 Is an Effective Agonist for Muscarinic-Based DREADDs in Vitro and in Vivo. ACS Pharmacol Transl Sci. 2018 Sep 14;1(1):61-72. doi: 10.1021/acsptsci.8b00012. Epub 2018 Jul 27. PMID: 30868140; PMCID: PMC6407913.

Usiello, A., Baik, J.-H., Rougé-Pont, F., Picetti, R., Dierich, A., LeMeur, M., Piazza, P. V., & Borrelli, E. (2000). Distinct functions of the two isoforms of dopamine D2 receptors. Nature, 408(6809), 199–203. https://doi.org/10.1038/35041572.

Vezina P. Sensitization of midbrain dopamine neuron reactivity and the self-administration of psychomotor stimulant drugs. Neurosci Biobehav Rev. 2004 Jan;27(8):827-39. doi: 10.1016/j.neubiorev.2003.11.001. PMID: 15019432.

Volkow, N. D., Wise, R. A., & Baler, R. (2017). The dopamine motive system: implications for drug and food addiction. Nature Reviews Neuroscience, 18(12), 741–752. https://doi.org/10.1038/nrn.2017.130.

Zhang, S., Gumpper, R.H., Huang, XP. et al. Molecular basis for selective activation of DREADD-based chemogenetics. Nature 612, 354–362 (2022). https://doi-org.bibliotecadigital.uv.cl/10.1038/s41586-022-05489-0.