



PROGRAMA DE MAGÍSTER EN
CIENCIAS BIOLÓGICAS MENCIÓN
NEUROCIENCIAS
FACULTAD DE CIENCIAS

**EVALUACIÓN DE COMPORTAMIENTOS REPETITIVOS RELEVANTES PARA EL
TOC EN PRUEBAS DE CONDICIONAMIENTO OPERANTE Y DE CONDUCTAS
ESPONTÁNEAS EN RATONES EAAT3^{glo}/CMKII**

MACARENA CHURRUCAMUÑOZ

Tesis para optar al grado de Magíster en Ciencias Biológicas

Mención Neurociencias

Director de Tesis:

Dr. Pablo Moya

Cotutor: Dr. Patricio Casanova

Valparaíso, 31 de marzo de 2020

INDICE

I.- RESUMEN	4
II.- INTRODUCCIÓN	6
2.1 BREVE DESCRIPCIÓN DEL TRASTORNO-COMPULSIVO	6
2.2 EL CIRCUITO CORTICO-ESTRIADO-TALAMOCORTICAL EN EL TOC.	8
2.3 FARMACOTERAPIA UTILIZADA	13
2.4 GENÉTICA DEL TOC.....	15
2.5 MODELOS ANIMALES TIPO TOC.....	16
2.6 EL RATÓN EAAT3GLO/CMKII COMO MODELO DE TOC.....	19
2.7 PRUEBAS PARA EVALUAR CONDUCTAS REPETITIVAS	20
2.8 INNOVACIÓN E IMPACTO	23
III.- HIPÓTESIS	24
3.1 HIPÓTESIS DE INVESTIGACIÓN.....	24
IV.- OBJETIVOS	24
4.1 OBJETIVO GENERAL.....	24
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	24
V.- MATERIALES Y METÓDOS	24
5.1 ANIMALES	24
5.1.1 <i>Restricción de alimentos</i>	25
5.2 PRUEBAS DE CONDUCTA ESPONTÁNEA	26
5.2.1 <i>Anidamiento:</i>	26
5.2.2 <i>Masticación de rejilla de plástico (Plastic Chewing)</i>	26
5.3 PRUEBAS DE CONDUCTA ADQUIRIDA	27
5.3.1 <i>Aparato:</i>	27
5.3.2 <i>Condicionamiento Operante FR1</i>	27
5.3.3 <i>Extinción de la conducta operante</i>	28
5.4 DISEÑO EXPERIMENTAL	29
5.5 ANÁLISIS DE DATOS	29
VI.- RESULTADOS	30
6.1 EVALUACIÓN DE CONDUCTAS ESPONTÁNEAS MEDIANTE LA PRUEBA DE CONSTRUCCIÓN DE NIDO Y LA PRUEBA DE MASTICADO DE PLÁSTICO.	30
6.2 EVALUACIÓN DE LA ADQUISICIÓN Y EXTINCIÓN DEL CONDICIONAMIENTO OPERANTE.	31
VII.- PROYECCIONES	33
7.1 DISCUSIONES Y LIMITACIONES DEL ESTUDIO	33
7.2 CONCLUSIONES	41
VIII.- REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	42
IX.- AGRADECIMIENTOS	55
X.- FIGURAS Y TABLAS	56
10.1 ESQUEMA GANGLIOS BASALES	56
10.2 COMPONENTES DE ROCKET	56
10.3 IMÁGENES DE ROCKET 2.0.....	57
10.4 ESQUEMA DEL DISEÑO EXPERIMENTAL.....	57
10.5 DESCRIPCIÓN DE CONDUCTAS.....	58

10.6	PUNTAJES DE ANIDAMIENTO	59
10.7	RESULTADOS DE ANIDAMIENTO	60
10.8	RESULTADOS DE MASTICADO PLÁSTICO.....	60
XI.-	PROTOCOLO Y PAUTAS PARA EXPERIMENTOS	63
11.1	PROTOCOLO CONDICIONAMIENTO OPERANTE Y EXTINCIÓN DEL COMPORTAMIENTO ADQUIRIDO ADAPTADO PARA ROBUCKET MODIFICADA (CREACIÓN PROPIA)	63
11.2	PROTOCOLO DE RESTRICCIÓN DE ALIMENTOS ANITA RADKE	67
11.3	PAUTA DE CONDICIONAMIENTO Y EXTINCIÓN	68
11.4	LISTADO DE ANIMALES.....	71
11.5	TABLA DE REFERENCIAS DE PESOS	72
11.6	PAUTA DE RESTRICCIÓN DE ALIMENTOS (ABREVIADA)	73

I.- RESUMEN

Introducción: El Trastorno Obsesivo Compulsivo (TOC) es una patología neuropsiquiátrica que afecta al 1-3% de la población mundial. Dada la complejidad sintomática de las alteraciones comportamentales del TOC, la evidencia empírica de pruebas conductuales efectuadas en modelos animales de esta patología es escasa. Los ratones EAAT3^{glo}/CMKII, que sobreexpresan el transportador de glutamato EAAT3, han sido recientemente validados como modelo de conductas tipo-ansiosas y tipo-TOC. Con el objetivo de lograr una mejor categorización de este modelo genético en el espectro de conductas tipo-TOC, se evaluaron conductas de formación de nido, masticación de material y la adquisición y extinción de un condicionamiento operante. **Métodos:** Se utilizaron animales control (EAAT3^{glo}, n=23) y experimentales (EAAT3^{glo}/CMKII, n=12), en modalidad ciega a su genotipo, los que fueron sometidos a pruebas de conducta espontáneas (anidamiento y masticar una rejilla de plástico) y adquiridas (condicionamiento operante FR1 y su extinción). El condicionamiento operante se realizó en ratones con restricción de alimento, en cajas de condicionamiento operante ROBucket 2.0 construidas y programadas en nuestro laboratorio. Finalmente, se concluyó el protocolo experimental con la prueba de extinción de la conducta instrumental. **Resultados:** En las pruebas de conductas espontáneas no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en ambos grupos. Por otra parte, la adquisición del comportamiento operante se logró en ambos grupos, no observándose diferencias.

En la prueba de extinción, se observó que los ratones EAAT3glo/CMKII presentan déficits de extinción comparados con los controles EAAT3glo. **Discusión:** El hallazgo de alteraciones en la extinción es relevante para fortalecer el modelo animal EAAT3glo/CMKII para el estudio del TOC. La extinción de conductas habituales involucra al estriado dorsolateral, en donde ocurren procesos de plasticidad sináptica dependiente de los receptores de glutamato tipo NMDA. Dado que se sabe que el ratón EAAT3glo/CMKII presenta déficits en la plasticidad sináptica en la comunicación cortico-estriatal, y además alteraciones en la composición de subunidades de receptores NMDA a nivel de estriado completo. Los resultados sugieren que dichos cambios subyacen al déficit de extinción del condicionamiento operante. Sin embargo, esto requiere ser demostrado experimentalmente, disectando los posibles cambios funcionales y moleculares específicamente a nivel del estriado dorsolateral.

II.- INTRODUCCIÓN

2.1 Breve descripción del Trastorno-Compulsivo

El Trastorno Obsesivo-Compulsivo (TOC) es un trastorno neuropsiquiátrico heterogéneo que afecta significativamente el funcionamiento de un sujeto (Joel, 2006a) y que puede llegar a ser invalidante (Alonso et al., 2015). El TOC se caracteriza patognomónicamente por su egodistonia (Robbins et al., 2019). Asimismo, por la presencia de obsesiones (pensamientos recursivos o ideas intrusivas persistentes) sin sentido que causan un temor obsesivo (ansiedad excesiva), y compulsiones (acciones o pensamientos repetitivos con una finalidad protectora que el sujeto se ve compelido a realizar) (Wu et al., 2012) cuya finalidad pareciera ser neutralizar los pensamientos o ideas intrusivas (Pittenger, 2015); la mayoría de los pacientes experimentan las obsesiones y las compulsiones (First, 2013). Se cree que los pensamientos o ideas intrusivas generan mayor ansiedad y concomitantemente más rituales para disminuir la ansiedad. Esto sería, en definitiva, un bucle sin término, porque el sujeto que padece TOC siente la urgencia de repetir y repetir una y otra vez el comportamiento (National Institute of Mental Health (NIMH), 2016). Pese a lo anterior, aun no está del todo claro la interrelación funcional entre ansiedad, obsesiones y compulsiones en el TOC. Debido a que las compulsiones pueden generar ansiedad, entonces no es conveniente establecer relaciones causales rígidas. Por ejemplo, en el caso del acaparamiento compulsivo se observa a menudo la presencia de compulsiones sin ansiedad. Desde una perspectiva psicológica se considera como los principales mecanismos presentes en el TOC: déficit en el control cognitivo para regular la conducta, junto a la tendencia hacia la rigidez cognitiva del pensamiento, más un desequilibrio entre los comportamientos dirigidos hacia objetivos y los habituales (Robbins et al., 2019).

Sumado a lo anterior, en casi el 90% de los casos, el TOC cursa en comorbilidad con otros trastornos siendo los más comunes: trastornos de ansiedad, trastornos del ánimo, trastornos del control de impulsos y trastorno por abuso de sustancias (Ruscio et al., 2010). Se estima que alrededor de un 30% de la población padece obsesiones o compulsiones que son causa de un malestar significativo (Pittenger, 2015). La prevalencia del TOC es alta, afectando entre el 1-3% de la población a nivel mundial (Ruscio et al., 2010). Generalmente, el TOC suele presentarse a partir de la pubertad o en la adultez temprana y su sintomatología se agudiza en situaciones de estrés (National Institute of Mental Health (NIMH), 2016). Históricamente, el TOC había sido clasificado dentro de los Trastornos de Ansiedad (First, 2013). Sin embargo, en la última actualización del Manual Diagnóstico y Estadístico de Trastornos Mentales en su quinta versión (DSM V en inglés) se ha incluido una nueva categoría de Trastornos del espectro Obsesivo-Compulsivo y trastornos relacionados que presentan conductas repetitivas, tales como la tricotilomanía y la excoriación (American Psychiatric Association, 2013), agrupándolos según las características comunes y los comportamientos similares como las preocupaciones obsesivas y las acciones repetitivas. No obstante, se ha propuesto que, a futuro, la organización o agrupación de los trastornos mentales se realice a partir de un marco biológico. Es decir, dirigirse hacia disfunciones específicas del TOC que podrían ser endofenotipos como: la hiperactivación del circuito corticoestriado tálamo cortical (CSTC), la respuesta disfuncional a tareas conductuales y la dificultad de adaptación a los cambios estímulo (E)-refuerzo (C) (Monteiro and Feng, 2016). Esto último tiene relación con la representación de las compulsiones como habituales en desmedro de comportamientos dirigidos hacia objetivos. Se denomina modelo del ‘hábito’

debido a que no tienen propósito ni objetivo las compulsiones. Sumado a que las compulsiones se conceptualizan como hábitos desadaptativos (Robbins et al., 2019).

2.2 El circuito Cortico-estriado-talamocortical en el TOC.

La etiología del TOC es aún desconocida. Sin embargo, numerosas investigaciones han demostrado alteraciones anatómicas y funcionales en el circuito Cortico-estriado-tálamo-cortical (CSTC) (Pittenger et al., 2011)(Wu et al., 2012)(Milad, M. R., & Rauch, 2012)(Burguière et al., 2015)(Monteiro and Feng, 2016). Estudios de neuroimágenes han indicado que en el TOC existen anormalidades en la corteza orbito frontal (OFC) (Saxena et al., 1999), la corteza cingulada anterior (ACC), el tálamo y zonas de los ganglios basales (Saxena et al., 1998), así como la interacción funcional entre algunas de estas zonas; también hay evidencia de alteraciones en los circuitos amígdalo-corticales (Burguière et al., 2015). En relación a OFC en imágenes funcionales y resonancia magnética estructural se sugiere hiperactividad (Robbins et al., 2019)(Monteiro and Feng, 2016) de esta zona y se cree que posee un rol relevante en la generación de pensamientos específicos. La corteza cingulada anterior (ACC) envía conexiones a cuerpo estriado conformado por caudado y putamen en humanos. El estriado recibe conexiones excitatorias desde ACC, OFC y corteza prefrontal (Monteiro and Feng, 2016). Se ha evidenciado hiperactividad principalmente en el núcleo caudado (Baxter et al., 1987).

Al respecto, los Ganglios Basales son responsables de dar inicio al movimiento; su estimulación frena la acción y funcionan a través de la desinhibición. Si se piensa el sistema motor organizado en niveles jerárquicos, los ganglios basales estarían en el primer nivel, a cargo de la iniciación del movimiento. También se han encontrado alteraciones en estas estructuras mediante estudios de resonancia magnética estructural y funcional, sumado a tomografía por emisión de positrones. Junto con alteraciones en la conectividad con la corteza frontal (Robbins et al., 2019).

Como se ha mencionado, los estudios han permitido dilucidar que el circuito asociado a conductas compulsivas tiene un componente cortical (OFC) hiperactivo (Robbins et al., 2019)(Monteiro and Feng, 2016), que debería efectuar el control inhibitorio, y uno estriatal (núcleo caudado) hiperactivo asociado al movimiento (Fineberg et al., 2009). Las anomalías en uno o ambos componentes podrían generar comportamientos compulsivos, ya sea una posible disminución en la actividad de la OFC, y/o una hiperactividad dentro de los elementos estriatales. La primera posibilidad se sustenta en estudios que utilizan técnicas de resonancia magnética estructural, que han encontrado consistentemente una disminución de la materia gris en la OFC en pacientes con TOC (Menzies et al., 2008). Por otro lado, la hiperactividad estriatal se ha observado en sujetos compulsivos, asociado con una hipoactividad estriatal asociada a las recompensas. En estos casos, es posible que el desempeño de las conductas repetitivas en sí misma se vayan robusteciendo con el tiempo, aunque conlleve consecuencias negativas a largo plazo. Es decir, se tornan más impulsivos con el tiempo y esto se asocia a una disminución de la activación estriatal a las recompensas (Fineberg et al., 2009).

Para comprender mejor el circuito CSTC, es relevante describir brevemente su funcionamiento y componentes principales, para posteriormente comprender las alteraciones. Según la perspectiva clásica, este circuito está compuesto por dos *loops* o bucles, conocidos como la vía directa y la vía indirecta. A continuación, se gráfica en la Figura 1. La vía directa envía sus aferencias excitatorias desde la corteza hacia el estriado (neostriado). Desde aquí suceden dos cosas: la primera es que recibe aferencias excitatorias (D₁) desde la porción compacta de la sustancia nigra. La segunda vía, se dirige con conexiones transitoriamente inhibitorias hacia el segmento interno del globo pálido/sustancia nigra (complejo pars reticulata/Gpi); este es lugar de salida de las proyecciones inhibitorias del globo pálido hacia el tálamo. Las proyecciones inhibitorias hacia el globo pálido/sustancia nigra inhiben una inhibición activando el tálamo (Saxena et al., 1998) y éste a su vez activa la corteza, enviando aferencias transitorias excitatorias a ésta (Kandel et al., 2000). Por otra parte, la vía indirecta también va de corteza hacia estriado; esta vía tiene tres sinapsis inhibitorias, a diferencia de la directa que cuenta con dos. Esto implica que efectúa un bucle de retroalimentación negativa, impide el movimiento que ya estaba en el plan de marcha. Desde el estriado, proyecta conexiones inhibitorias hacia el segmento externo del globo pálido y este inhibe al núcleo subtalámico, que al mismo tiempo activa al Globo pálido interno/sustancia nigra (parte reticular). Entonces inhiben a los núcleos talámicos y este a su vez a la corteza. Es relevante mencionar que el estriado (caudado y putamen) recibe aferencias inhibitorias desde la porción compacta de la sustancia nigra (D₂) (Kandel et al., 2000). Las neuronas dopaminérgicas de la sustancia nigra compacta actúan sobre el caudado y putamen, a través de dos receptores D₁ (vía directa) y D₂ (vía indirecta). Se considera que, en presencia de dopamina, se ‘activa’ la vía directa y la corteza, mientras que se ‘apaga’ la vía indirecta, esto

implica que la corteza no está inhibida (Ostrosky-Solis, 2000). Los neurotransmisores presentes en este circuito son: glutamato y GABA, y además es modulado por dopamina, serotonina, acetilcolina, entre otros (Saxena et al., 1998)(Wu et al., 2012).

La noción de ‘trastorno del circuito’ CSTC se ha tomado desde los Trastornos del movimiento hacia las enfermedades neuropsiquiátricas como el TOC y el Tourette. A partir de la disfunción de los *loops* no motores dentro del circuito CSTC parece que se generan condiciones neuropsiquiátricas como el TOC y el Tourette. En el TOC partes del circuito límbico que se originan en la corteza orbitofrontal aparentemente están involucrados (Robbins et al., 2019). Se denomina circuito afectivo (ventral) estaría desequilibrado con un predominio de la vía directa enviando señales excitatorias al estriado. Por el contrario, el circuito cognitivo dorsal presenta un predominio de la vía indirecta (mayor inhibición talámica disminuye la excitación en la corteza) explicaría los déficits en el control cognitivo. Por tanto, habría un desbalance entre ambos. Se cree que la hiperactividad de los circuitos afectivo-cognitivos ventrales que posiblemente son responsable de los síntomas de ansiedad y conductas perseverantes (Alonso et al., 2015).

Algunos síntomas del TOC como el acaparamiento y la rumiación mental obsesiva, se sugiere que están mediados por el estriado ventromedial, el globo pálido y el tálamo dorsal medial (estas estructuras se conectan con la OFC) (Saxena et al., 1998). Ambos síntomas se relacionan con la reverberación del sistema. Es decir, un desbalance entre la ruta indirecta y la directa produciría una hiperactivación del sistema. Esto se asocia con la incapacidad para cambiar hacia otros comportamientos y quedar atrapados en preocupaciones sobre sí mismos relativo a los pensamientos y compulsiones concomitantes (Saxena et al., 1998). Del mismo

modo se ha evidenciado en humanos la necesidad autoinformada de realizar hábitos se asoció con la hiperactividad aberrante del núcleo caudado (Gillan et al., 2016).

Se evalúa que las desregulaciones en los sistemas corticoestriatal son comunes a los principales trastornos psiquiátricos. Por esto, es relevante encontrar los sustratos propios del TOC. Es decir, los biomarcadores psicofisiológicos y neurocognitivos. Posibles cinco endofenotipos del TOC significativos para apoyar la teoría corticoestriatal entorno a desregulaciones en las funciones ejecutivas: inhibición de la respuesta, flexibilidad cognitiva, planificación (acciones dirigidos a objetivos), memoria de trabajo y monitoreo de errores (Robbins et al., 2019). En relación con la inhibición de la respuesta en pruebas de rendimiento, los pacientes TOC (y subtipos) obtuvieron un rendimiento descendido y se correlacionó a cambios estructurales significativos de la materia gris en regiones corticoestriatales ya mencionados (Menzies et al., 2008).

Acerca de la dificultad en planificación se ha evidenciado una hiperactividad frontoparietal que se asocia a una red ineficiente en este ámbito. Igualmente, algunos de los síntomas del TOC provienen, en términos conductuales, de la dificultad para integrar los comportamientos instrumentales y los aprendizajes E-R posiblemente por una falla en la vía OFC lateral afectando el flujo de salidas estriatales. Debido a los supuestos roles de estas estructuras en el condicionamiento clásico e instrumental (Balleine and O'Doherty, 2010).

Finalmente, se destaca en algunos trabajos recientes en neurobiología y genética que proponen que los circuitos frontoestriatales y sus vínculos con ganglios basales, tálamo y

tronco cerebral son blancos eficaces para la intervención terapéutica del TOC (Burguière et al., 2015). Recientemente, ha sido objetivo de tratamiento el núcleo accumbens (NAC) y la reducción de la conectividad funcional excesiva en áreas corticales (Robbins et al., 2019).

2.3 Farmacoterapia utilizada

Desde una perspectiva farmacológica, se ha buscado intervenir las alteraciones o síntomas del TOC mediante medicamentos que bloquean la acción de sistemas de neurotransmisores. Sin embargo, aún no hay tratamientos 100% efectivos para este trastorno. Los tratamientos de primera línea son útiles en uno de cada tres casos (Pittenger, 2015). Predominantemente, se ha seguido la hipótesis monoaminérgica. Desde la década de los noventa, el uso de inhibidores de la recaptación de serotonina (IRS) como la clomipramina un antidepresivo tricíclico (Robbins et al., 2019) y los medicamentos actuales que son inhibidores selectivos (ISRS), como citalopram y fluoxetina (Wu et al., 2012) constituyen la farmacoterapia de primera línea (Li et al., 2006). La eficacia de estos fármacos en pacientes con TOC ha sido la base de la hipótesis serotoninérgica (Joel, 2006a). Se considera que los fármacos que afectan los niveles de este neurotransmisor podrían cambiar el equilibrio de las vías directa e indirecta, disminuyendo la actividad del circuito (Saxena et al., 1998) y el tratamiento es a largo plazo para que sea efectivo. Sin embargo, pese a que los ISRS son la farmacoterapia aprobada para el TOC, la respuesta al tratamiento es efectiva solo entre un 40% a 60% (Toro-Martínez, 2005) y muchos pacientes continúan siendo afectados por sus síntomas (Wu et al., 2012). Por lo tanto, hay un importante número de pacientes que son resistentes a la intervención farmacológica disponible, además el tiempo de tratamiento es mucho mayor que el requerido para una depresión (Li et al., 2006).

En el caso de la dopamina, su implicancia en la fisiopatología del trastorno se debe al rol de este neurotransmisor en la actividad de los ganglios basales. Por esto, se han realizado tratamientos con fármacos que bloquean la acción dopaminérgica que lamentablemente no son del todo efectivos. Se ha considerado que el bloqueo selectivo de D₁ tendría que intervenir en la vía directa disminuyendo el ‘tono’ de la actividad del circuito, reduciendo los síntomas del TOC. Del mismo modo, se ha efectuado terapia combinada de IRS con drogas antipsicóticas cuyo blanco farmacológico es el receptor D₂, disminuyendo los niveles del receptor y del transportador de dopamina en los ganglios basales (Escobar et al., 2019).

Actualmente, se ha explorado nuevos tratamientos orientados a modular la acción de otro neurotransmisor implicado en el circuito CSTC: el glutamato (Pittenger et al., 2006). Este es el principal neurotransmisor excitador del SNC y tiene una función diferente a los neurotransmisores monoaminérgicos. Además, las neuronas que utilizan el glutamato como neurotransmisor están distribuidas por todos los circuitos cerebrales. Esta estrategia moduladora se basa en datos que apuntan a una desregulación de glutamato en la fisiopatología del TOC (Chakrabarty et al., 2005)(Monteiro and Feng, 2016). En particular, fármacos que actúan sobre el receptor de glutamato ionotrópico NMDA (NMDAR) (Wilhelm et al., 2008) han mostrado efectos beneficiosos para el tratamiento del TOC (Escobar et al., 2019) incluyendo ketamina y memantina (Kataoka et al., 2010). Varias líneas de investigación sugieren que la desregulación del glutamato está implicada en la fisiopatología heterogénea del TOC, sin embargo debe considerarse como un factor dentro de la complejidad del fenómeno (Pittenger, 2015). El glutamato es el neurotransmisor primario

dentro del circuito CSTC (Wu et al., 2012). Asimismo, se ha constatado que la transmisión glutamatérgica está alterada en el TOC dentro del circuito CSTC (Wu et al., 2012). La alteración en la comunicación sináptica podría estar en diferentes niveles: presinápticos, postsinápticos o glial. No obstante, estudios genéticos y modelos animales sugieren que la disfunción en la señalización ocurre a nivel postsináptico (Pittenger et al., 2011)(Delgado-Acevedo et al., 2019).

2.4 Genética del TOC

Aunque las causas exactas que lo originan aún no son del todo claras, el TOC tiene un componente genético fuertemente establecido (National Institute of Mental Health, 2010)(Nestadt et al., 2000)(Wu et al., 2012). En este sentido, se ha descrito un componente hereditario en el rango de 45%-65% (Van Grootheest et al., 2005) de la enfermedad y un patrón de herencia de tipo de dimorfismo sexual que podría implicar la participación del cromosoma X. Al mismo tiempo, esto daría cuenta de las diferencias entre sexos producto del desarrollo o la presencia hormonal (Dickel et al., 2006). Además, se ha observado una muy alta concordancia sintomática en gemelos monocigóticos (80-87%) respecto a dicigóticos (mellizos) (47%-50%) (Dickel et al., 2006)(Van Grootheest et al., 2005) (Arnold et al., 2006). Se ha observado diferencias entre el TOC de inicio temprano (promedio 11 años) y tardío (promedio 23 años). El primero, tiende a ser más severo, hay más presencia de componentes genéticos, se presenta mayoritariamente en hombres y presentan baja respuesta al tratamiento (Taylor, 2011).

Diversos estudios de ligamiento y de asociación en casos-contróles han posicionado al gen *SLC1A1* como un posible gen candidato de interés en el TOC (Pittenger, 2015). Este

gen codifica el transportador de glutamato EAAT3 (Excitatory Amino Acid Transporter 3), expresado mayormente en la membrana postsináptica y perisináptica (He et al., 2000)(Wu et al., 2012). EAAT3 pertenece a una familia de transportadores encargados de controlar los niveles extracelulares de glutamato y prevenir su exocitotoxicidad; además, tiene una función importante en la producción de antioxidantes neuronales (Pittenger, 2015). EAAT3 participa en el control del glutamato que difunde de la región sináptica (*spillover*) hacia la perisinápsis (He et al., 2000) en las regiones del circuito CSTC, corteza, hipocampo, cerebelo, estriado y ganglios basales (Rothstein et al., 1994)(Bjørn-Yoshimoto and Underhill, 2016), tanto en neuronas GABAérgicas como glutamatérgicas (Dickel et al., 2006).

2.5 Modelos animales tipo TOC

Los modelos animales de enfermedades mentales son esenciales para comprender sus mecanismos neurobiológicos subyacentes, cruciales para el avance clínico (Joel, 2006b)(Goltseker et al., 2015). Es relevante tomar en cuenta que un modelo nunca podría recapitular un síndrome psiquiátrico completo. Por tanto, los modelos de TOC no deben tomarse como modelos animales de la enfermedad sino de alguno de los procesos psicopatológicos (Alonso et al., 2015).

En las últimas tres décadas (Alonso et al., 2015), se han descrito en la literatura diversos modelos animales de TOC (Joel, 2006b). A diferencia de otras patologías neuropsiquiátricas, como por ejemplo trastornos de ansiedad o depresión, existen limitaciones evidentes en el uso de modelos animales en el estudio del TOC, dado que no es

posible modelar las obsesiones (Maio et al., 2014). El diagnóstico de TOC depende fuertemente de las verbalizaciones del paciente, y son parte de la vivencia interna (sus obsesiones). Ante la imposibilidad de modelar síntomas de naturaleza cognitiva del TOC tales como las obsesiones, los modelos animales se focalizan en ansiedad, en estereotipias o conductas repetitivas y compulsividad que están presentes en el TOC (Alonso et al., 2015).

Para evaluar modelos animales de enfermedades mentales, se utilizan tres criterios de validación externos (Martin, 2008): validez aparente, validez predictiva y validez de constructo, descritos originalmente por Willner (Willner, 1986). La validez aparente da cuenta de que el modelo se comporta sintomatológicamente similar a la condición humana estudiada. La validez predictiva se refiere a la capacidad del modelo de predecir marcadores específicos de la patología, incluyendo la respuesta a fármacos que son eficaces en el tratamiento en humanos; este tipo de modelos predictivos usualmente son producidos desde la información clínica (Witkin, 2008). Por último, la validez de constructo se refiere a que el modelo tiene una lógica teórica sólida (Goltseker et al., 2015).

Los modelos animales se pueden categorizar en tres ámbitos: genéticos, farmacológicos y conductuales. Dos modelos genéticos han sido particularmente relevantes en develar el rol del glutamato en TOC. Los ratones deficientes (knockout) de Sapap3 y Slitrk5, ambas proteínas presentes en sinapsis glutamatérgicas y altamente expresadas en regiones estriatales, presentan defectos en la transmisión en la vía corticoestriatal (Shmelkov et al., 2010) de las sinapsis glutamatérgicas (Ting and Feng, 2011) y muestran un fenotipo conductual relevante al TOC (o tipo compulsivo) (Welch et al., 2007). Respecto a los

comportamientos tipo TOC en Sapap3, se ha observado un aumento en las conductas tipo ansioso y en el aseo (*grooming*) que implica mayor pérdida de pelo y lesiones en la piel (Welch et al., 2007). En el caso de Slitrk5, presenta conductas similares a Sapap3 y en ambos casos se puede revertir con ISRS (Shmelkov et al., 2010).

Se conocen algunos modelos transgénicos como D1CT-7, Hoxb8, 5-HT_{2C} cuya asociación al TOC se efectuó a partir de similitudes conductuales (Joel, 2006a). En el caso del ratón knockout del receptor 5-HT_{2C}, además, el gen ha sido implicado previamente en estudios genéticos de TOC. En el aumento de conductas tipo compulsivos como la masticación de arcilla aumentada (Chou-Green et al., 2003).

Los modelos farmacológicos se obtienen a partir del uso de fármacos que inducen comportamientos similares a las conductas TOC en humanos. Uno de los modelos más utilizado es el uso del quinpirol, un agonista de receptores de dopamina D₂/D₃, que provoca un comportamiento de verificación compulsiva (Szechtman et al., 1998). Se observó en ratas, que luego del tratamiento repetitivo con quinpirol los animales aumentaron las visitas a lugares determinados en comparación a los controles (Szechtman et al., 1998). Otro modelo es el efectuado por Yadin et al. en 1991, quienes demostraron que la administración de 8-OHDPAT, un agonista del receptor de serotonina 5-HT_{1A}, disminuyó la alternancia espontánea en ratas en una prueba de laberinto en T (T maze), propiciando la perseveración e indecisión (Yadin et al., 1991).

Respecto a los modelos conductuales, se pueden dividir en comportamientos repetitivos y estereotípicos que ocurren naturalmente como masticar, conductas motoras inducidas por estrés, limpieza (*grooming*) (Pitman, 1989) entre otros.

2.6 El ratón EAAT3^{glo}/CMKII como modelo de TOC

Recientemente, nuestro laboratorio ha desarrollado y descrito al ratón EAAT3^{glo}/CMKII como modelo genético relevante para el TOC (Delgado-Acevedo et al., 2019). Este ratón sobreexpresa EAAT3 en neuronas principales del telencéfalo (bajo promotor CamKII α). Brevemente, el comportamiento ansioso se evidenció mediante la prueba de campo abierto (pasan menos tiempo en el centro que los controles) y de luz-oscuridad (preferencia exacerbada por la zona oscura). Por otro lado, estos ratones pasan un mayor tiempo realizando conductas repetitivas como el acicalamiento (*grooming*) o enterrando bolitas (*marble burying*) respecto a los ratones control, sin observarse diferencias en actividad locomotora horizontal (Delgado-Acevedo et al., 2019). Estas conductas fueron atenuadas mediante la administración crónica de clomipramina y fluoxetina. Estos datos otorgan validez de constructo, aparente y predictiva al modelo, y proporcionan nueva evidencia del rol de EAAT3 en la fisiopatología del TOC. Más aún, el mismo estudio demostró que ratones EAAT3^{glo}/CMKII no presentan déficits en la adquisición ni en la extinción de una memoria aversiva, instalada mediante condicionamiento clásico de miedo contextual. Sin embargo, sí presentaron una mayor recuperación espontánea de esta memoria, indicativo de alteraciones en la extinción a largo plazo de memorias aversivas. El proceso de extinción se produce por un debilitamiento de la respuesta al estímulo condicionado, debido

a la ausencia de exposición repetida al mismo y se cree que podría estar mediada, entre otras estructuras, por la corteza orbitofrontal (Schafe et al., 2001). Un déficit en la extinción es una característica recientemente descrita tanto en pacientes TOC (Mattina et al., 2016)(Milad, M. R., & Rauch, 2012) como en pacientes con Trastorno de Estrés Postraumático (TEPT).

El modelo EAAT3glo/CMKII, a la fecha, solo ha sido evaluado en un grupo discreto de comportamientos tipo-TOC, y no se ha indagado si presenta comportamientos repetitivos en otras pruebas adicionales, tanto espontáneas como inducidas, que pudieran ser relevantes para la caracterización más acabada del modelo.

2.7 Pruebas para evaluar conductas repetitivas

Una de estas pruebas es el Condicionamiento Instrumental, que es basado predominantemente en un mecanismo asociativo Acción-Resultado (A-O). El comportamiento dirigido a objetivos está controlado por los estímulos (E) que anteceden a las consecuencias (C) (Yin and Knowlton, 2006). De hecho, el comportamiento instrumental u operante también es denominado “*acciones dirigidas a un objetivo*” (Rossi and Yin, 2012). Sin embargo, se ha descartado que sólo sea una prueba dirigida a metas (Tolman, 1932). El condicionamiento instrumental se describe en términos del contexto del estímulo (E), la respuesta instrumental (R) y la consecuencia (C) de la respuesta. En el caso de un reforzamiento positivo, se denomina reforzador, a la consecuencia esperada producto de la respuesta al estímulo contextual (Domjan, 2010).

En el condicionamiento instrumental libre, se repite sin restricciones la respuesta instrumental (por ej: en la prueba T es limitado) de manera continua y se produce comportamientos estereotipados (Pisacreta, 1982). Asimismo, hay diferentes programas de entrenamientos, un programa es el criterio bajo una determinada tasa de respuestas se va a recibir el reforzar. Uno de ellos es el de Razón fija (en inglés FR) es un programa de entrenamiento continuo, al principio se espera aumento en la tasa de respuesta y después permanecerá estable (Domjan, 2010).

En este tipo de aprendizaje se producen dos tipos de asociaciones del tipo E-R y E-C. La primera asociación E-R, el contexto expone al sujeto a los estímulos del entorno que anticipan la respuesta y las consecuencias fortalecen o debilitan el enlace E-R. Una vez que ocurre una respuesta inesperada seguida del reforzador. Se instala la asociación E-R (Hull, 1943). Este procedimiento se llama Ley del efecto señalada por Thorndike (1905) (Pinillos, 1960), hace referencia a que se aprende en virtud de las consecuencias y que las asociaciones se fortalecen si se siguen de una recompensa. Respecto a esto, se señala que el control de la conducta, producto del establecimiento del emparejamiento E-R, se externaliza en las señales del contexto (Wood and Neal, 2007).

En cuanto a la asociación E-C, se considera como uno de los mecanismos de la expectativa de la recompensa que puede motivar la conducta instrumental. Si ocurre un estímulo que señala un evento, se espera a que pase algo importante una vez que vuelve a suceder el estímulo o bien permite predecir que algo va a ocurrir. Entonces ineludiblemente se va a emparejar el estímulo (E) con el reforzador (C) y otorga la posibilidad para el condicionamiento clásico (Domjan, 2010). Entonces, el condicionamiento clásico tiene un rol en la conducta operante (Spence, 1956). Debido a que son los estímulos los que se asocian

a la consecuencia de la respuesta y a un estado emocional positivo (suponiendo que el reforzador tiene una valencia positiva). Este tipo de asociación puede incrementar la respuesta ya que crea la expectativa de la recompensa (Domjan, 2010).

Luego, en la etapa de extinción de la conducta operante, se considera un proceso activo y se omite el reforzador (C). Se esperan dos efectos básicos, uno es que aumenta la variabilidad de la respuesta (buscando más alternativas para conseguir el reforzador) y segundo, disminuye la respuesta objetivo sin el reforzamiento (Domjan, 2010). Esto último, sucede porque se espera una recompensa y no sucede, entonces hay frustración de la expectativa. La frustración se traduce en una reacción aversiva incondicionada (Papini, 2003). Es la emoción aversiva que desanima la respuesta (R) y genera una nueva asociación inhibitoria E-R (Rescorla, 2001). Se ha evidenciado una dificultad en pacientes TOC para producir una asociación inhibitoria E-R de aprendizajes previos (Robbins et al., 2019). Por otra parte, el programa de entrenamiento FR1 es de tipo continuo y no produce fijación de la respuesta en extinción (Domjan, 2010).

Adicionalmente, se han descrito otras conductas espontáneas en modelos animales, como la conducta aberrante de anidamiento y la de masticación de material no digerible (plástico). Ambos comportamientos se han sugerido como relevantes para patologías como TOC debido a que son conductas repetitivas en las que “se pierde la meta”. En el caso de la conducta alimenticia, esta tiene una finalidad de supervivencia primaria; sin embargo, en ratones knockout del receptor de serotonina 5-HT_{2C}, que presentan comportamientos tipo compulsivos, se encontró que estos tienden a comer más material no digerible por sobre los nutritivos (Chou-Green et al., 2003). Por tanto, se pierde el objetivo primario. Del mismo

modo, se ha observado un comportamiento repetitivo aberrante tipo compulsivo en una conducta común a todas las especies de mamíferos como es la de anidamiento. El anidamiento aberrante ocurre cuando el animal utiliza mayor cantidad de material de nido que los controles, ambos cuentan con material para anidamiento en exceso (Gomez-Marin and Ghazanfar, 2019).

Planteamiento del problema:

Dado que el ratón EAAT3^{glo}/CMKII presenta alteraciones relevantes para el TOC, cabe preguntarse si este fenotipo se manifiesta en otros paradigmas. Estos resultados podrían robustecer nuestro modelo animal de TOC, y en particular, describir por primera vez, las posibles alteraciones en condicionamiento instrumental y su extinción.

2.8 Innovación e impacto

La línea de investigación que propone una desregulación del glutamato en la fisiopatología del TOC es reciente. Nuestro estudio será fundamental tanto para robustecer el modelo EAAT3^{glo}/CMKII en una nueva arista conductual, como para contribuir con evidencia a la hipótesis glutamatérgica del TOC. Los resultados podrían contribuir a establecer un endofenotipo tipo compulsivo altamente relevante para el TOC. Eventualmente, este estudio también proporcionará datos que permitan elaborar nuevas hipótesis y proyectar estudios posteriores que indaguen las alteraciones a nivel neurofisiológico involucradas en el fenómeno comportamental, a través de experimentos de electrofisiología. Por último, el estudio del comportamiento dirigido a metas en animales recientemente ha comenzado a solidificarse, teniendo grandes vacíos en la producción de

conocimiento (Rossi and Yin, 2012) y esta investigación puede aportar a esta línea de investigación.

III.- HIPÓTESIS

3.1 Hipótesis de investigación

H1: Los ratones EAAT3glo/CMKII presentan un aumento de *conductas repetitivas* en pruebas de condicionamiento instrumental comparados a ratones controles EAAT3glo.

IV.- OBJETIVOS

4.1 Objetivo General

- Caracterizar el fenotipo conductual de ratones EAAT3glo/CMKII mediante pruebas de comportamiento.

4.2 Objetivos Específicos

- Evaluar la adquisición y extinción del condicionamiento operante en los ratones EAAT3glo/CMKII y controles.
- Evaluar las conductas espontáneas mediante la prueba de construcción de nido y la prueba de masticado de plástico de los ratones EAAT3glo/CMKII y controles.

V.- MATERIALES Y METÓDOS

5.1 Animales

Se utilizaron ratones EAAT3glo/CMKII (n=12) y EAAT3glo (n=23) (grupo control) machos y hembras, con un promedio de edad de 8 semanas al inicio del experimento. Los

ratones fueron mantenidos en el bioterio del Laboratorio de Neurogenética de la UV, de 3 a 5 animales por jaula, en condiciones de temperatura y humedad controladas, con un ciclo luz: oscuridad 12:12hrs (luz se enciende a las 7 AM), con agua *ad-libitum* y bajo supervisión de una veterinaria. Los ratones fueron alimentados con comida *ad-libitum* o restringida para mantener el 85% del peso, según la etapa del experimento. Los ratones fueron pesados a diario y trasladados a cajas individuales al inicio de la prueba de anidamiento. Todos los procedimientos se realizaron según los lineamientos éticos descritos por el comité de bioética de la Universidad de Valparaíso, y de acuerdo al Cuarto Taller de Bioética organizado por el Comité Asesor Bioética Fondecyt-Conicyt (Conicyt, 2009). Asimismo, se planteó la realización de los experimentos bajo los principios de las 3 R: reemplazo, reducción y refinamiento (Kirk, 2018). Consecuentemente con el último punto, los animales no fueron sometidos a procedimientos ni condiciones que provoquen sufrimiento ni dolor, ni disminuyan su bienestar. Cada animal fue identificado mediante un aro metálico numerado para su registro individual. Respecto a la reducción, se utilizó el menor número de animales posible para obtener resultados estadísticamente relevantes. Dos ratones fueron excluidos del estudio dado que mostraron signos de estrés agudo por el protocolo. Los experimentos se realizaron siempre entre las 8:00 am y 13:00pm.

5.1.1 Restricción de alimentos

Se estableció una pauta individual para cada animal según edad, peso y sexo comparado con la curva de crecimiento hasta llegar al 85% del peso. Se mantuvo la variación máxima de alimento de 0,3 gr diario sugerida por Minning, S. (2018) y Radke, A. (comunicación personal). Durante el periodo de restricción de alimentos, los animales fueron

manipulados por el experimentador (*handling*) por alrededor de 2 minutos, con la finalidad de disminuir el estrés.

5.2 Pruebas de conducta espontánea

5.2.1 Anidamiento:

Se dispusieron 3.0 g de algodón prensado por jaula, según lo establecido por el protocolo de Deacon (2006). La prueba se realizó durante la fase de oscuridad del animal (19:00 hrs). El animal que estaba en grupo fue trasladado a una jaula individual una hora antes de la fase oscura (18:00hrs). Se evaluó la calidad del nido con una puntuación en una escala de 1 a 5, según la Tabla 1 (Deacon 2006).

5.2.2 Masticación de rejilla de plástico (Plastic Chewing)

En el suelo de la caja-hogar se dejó una rejilla de plástico circular (diámetro 7 cm, 3.0 g) por 10 días. El animal estuvo con comida restringida (ver restricción de comida en punto 11.5) y agua *ad libitum*. Al finalizar la prueba se pesó nuevamente la rejilla para calcular la diferencia de cuánto fue lo que mordió el animal (Chou-Green et al., 2003). Esta prueba se realizó en forma concomitante al condicionamiento operante, ya que en ambas pruebas se requería restricción de alimentos.

5.3 Pruebas de conducta adquirida

5.3.1 Aparato:

El condicionamiento operante se realizó en cuatro cajas ROBucket (Devarakonda et al., 2016) construidas en nuestro laboratorio. El diseño original y su programación fueron adaptados para los requerimientos particulares de nuestro experimento.

Básicamente, la caja ROBucket (Fig. 2) está compuesta principalmente por un Arduino UNO con tres sensores fotointerruptores, un *nose poke housing* que es la placa donde se instalan los tres sensores (uno por cada agujero), y cada uno se programa con una función diferente. En este caso, al activarse el sensor de la derecha no se genera respuesta (inactivo), mientras que el de la izquierda es el activo, da la señal (junto a la emisión de un tono) para entregar la recompensa en el agujero del centro (*magazine poke*), que consiste en solución de sacarosa al 20%. La sacarosa es dispensada por una jeringa calibrada previamente al iniciar el entrenamiento con la finalidad de entregar una cantidad estandarizada en cada oportunidad. También cuenta con una placa de teclado con pantalla cristal líquido (LCD) que sirve para programar el Arduino y una placa de registro de datos digital (SD) donde se almacenan los datos. Esto se montó sobre una caja de plástico transparente, que fue el lugar de entrenamiento de los animales (Fig. 3).

5.3.2 Condicionamiento Operante FR1

Previo a dar inicio al entrenamiento, los animales fueron trasladados a la sala de conducta para su habituación por 30 minutos. Para este experimento utilizamos una razón fija de recompensa FR1, donde una respuesta en el agujero activo (*nose poke*) gatilla una recompensa, genera la entrega de 10 uL de solución de sacarosa al 20% en el agujero del

centro, con un tiempo de espera de 1 s entre cada respuesta. Respecto a la entrega de sucrosa, se verificó la programación de Arduino a través de la medición de la solución con una pipeta de microlitro.

Se consideró que la conducta era adquirida si cumplía los siguientes criterios: obtener más de 20 entregas de sacarosa en 3 sesiones consecutivas y exhibir una discriminación mayor de 2:1 en los *nose poke* activos versus inactivos, durante tres días consecutivos. Este criterio es similar a lo establecido en el protocolo original descrito por los creadores del dispositivo ROBucket (Devarakonda et al., 2016). Aquellos ratones que no cumplieron con el criterio de adquisición al día 9, fueron excluidos del estudio. Después de cada entrenamiento, las cajas ROBucket fueron limpiadas con etanol al 70%.

5.3.3 Extinción de la conducta operante

Dado que los ratones estuvieron con restricción de alimento, previo al entrenamiento de extinción los animales fueron puestos en jaulas idénticas a las que viven normalmente, con acceso *ad libitum* de alimentos. Esto tuvo como finalidad descartar el efecto de una exacerbada motivación por la recompensa, que pudiera interferir con la extinción (Baker et al., 2012) (Rossi and Yin, 2012).

Luego, se efectuó un entrenamiento de una hora en la caja ROBucket. Sin embargo, en esta etapa del entrenamiento el *nose poking* activo estaba encendido, manteniendo el tono emitido al realizar el nose poke por el arduino. Aunque, el animal no recibió ningún refuerzo positivo de la conducta ya que se desconectó la solenoide. Después del entrenamiento de extinción los ratones fueron devueltos a sus cajas-hogares individuales.

5.4 Diseño experimental

Las pruebas de comportamiento se dividieron en tres etapas. La Etapa I consistió en separar a los animales en jaulas individuales para realizar la prueba de nido (día 1), la introducción de la rejilla de plástico (día 2), y la restricción de alimentos hasta que el animal alcanzase el 85% de su peso inicial, lo que se logró, en promedio, alrededor de los 6 días consecutivos. La Etapa II consistió en el entrenamiento para adquirir la conducta operante (días 7 a 15), y en la última Etapa III se realizó la extinción (días 16 al 21). En la Figura 4 se esquematiza todo el proceso experimental.

5.5 Análisis de datos

El análisis cuantitativo de los datos se realizó a través del software GraphPad Prism 8. Para los datos que presentaron una distribución normal, se utilizó ANOVA de dos vías (de mediciones repetidas) seguido de test Bonferroni, o t-test de muestras pareadas, con una significancia de $p < 0.05$ y Bonferroni post-hoc test. La potencia del estudio se determinó al 80% debido al tamaño de la muestra. Se planteó una Hipótesis Estadísticas $H_1: \mu_1 \neq \mu_2$, $p < 0,05$ (potencia de 80%). Para determinar la distribución no normal de los datos se utilizó la prueba de Shapiro. Posteriormente se analizaron con una prueba de estadística no paramétrica Mann-Whitney. A su vez, se ocupó la mediana como parámetro por el tipo de estadística usado.

VI.- RESULTADOS

6.1 Evaluación de conductas espontáneas mediante la prueba de construcción de nido y la prueba de masticado de plástico.

Como se reportó previamente (Delgado-Acevedo et al., 2019), los ratones EAAT3glo/CMKII muestran una conducta exacerbada de grooming inducido. Con el objetivo de profundizar en la caracterización de este modelo, se evaluaron dos conductas espontáneas. En primera instancia, calificamos la construcción del nido usando algodón como material, según la escala de Deacon (Deacon, 2006). El algodón (3 g) fue puesto la noche anterior y la evaluación ocurrió 12 h después. En este caso, tanto animales control EAAT3glo como EAAT3glo/CMKII lograron construir el nido, el cual cumplió con los criterios (ver Tabla 2), no encontrándose diferencias significativas entre ambos grupos (EAAT3glo, mediana = 3,50, n=10; EAAT3glo/CMKII, mediana = 4,00, n=10; $P= 0,74$, Mann-Whitney test; Fig. 5).

Para investigar si los ratones EAAT2glo/CMKII presentan otro tipo de conductas repetitivas además del grooming, realizamos la prueba de masticación de la rejilla de plástico (Chou-Green et al., 2003). Para ello se dispuso una rejilla circular de plástico de (7,62 cm de diámetro, de 7 a 6,5 g se pesó individualmente cada una ya que tenían una variación) por 10 días en la caja hogar, retirándola el día 10 para su análisis, calculando el delta de peso (ver figura 5A) en relación con los 7 g aproximados iniciales. También se hizo el mismo análisis de efectuado en el protocolo original para comparar los grupos (ver figura 5B). Además, se modificó el protocolo original incluyendo la restricción de alimentos durante el experimento

con el objetivo de propiciar la masticación. Sin embargo, los ratones de ambos genotipos masticaron la rejilla en grado similar, no encontrándose diferencias significativas (EAAT3glo, mediana = 0,05, n = 18; EAAT3glo/CMKII, mediana = 0,04 g, n=10; P = 0,83, Mann-Whitney test; Fig. 6A)(EAAT3glo, día 1 promedio = 7,084, día 10 promedio = 6,99; EAAT3glo/CMKII, día 1 promedio = 7,147, día 10 promedio = 6,91; P = 0,2056, Anova; Fig. 6A) .

6.2 Evaluación de la adquisición y extinción del condicionamiento operante.

Este experimento tenía como principal objetivo estudiar posibles déficits en la extinción de una conducta operante adquirida en el modelo EAAT3glo/CMKII. Para ello, los ratones fueron sometidos a un sobreentrenamiento para aprender a realizar un *nose poke* activo que consiste en introducir la nariz en un agujero objetivo (izquierdo), emite un sonido dando una señal, para recibir una recompensa en un agujero diferente (centro) y logra discriminar que hay un agujero inactivo (derecha). Se utilizaron 18 controles EAAT3glo y 9 EAAT3glo/CMKII. De ellos, 7 ratones EAAT3glo y 5 EAAT3glo/CMKII alcanzaron el criterio de adquisición (ver métodos); 6 animales fueron excluidos del experimento debido a inconvenientes técnicos durante el entrenamiento. La figura 7a muestra la adquisición de la conducta de *nose poke* para aquellos ratones que cumplieron con el criterio. Tanto los ratones control EAAT3glo como EAAT3glo/CMKII aumentaron el número de *pokes* activos el día 9 en comparación al día 1 de entrenamiento (Fig. 7B; EAAT3glo, $46,29 \pm 12,29$ pokes activos el día 1 y $101,30 \pm 25,12$ el día 9; P=0,003, paired t-test; EAAT3glo/CMKII, $27,00 \pm 15,66$ pokes activos el día 1 vs $174,8 \pm 64,18$ el día 9; P =0,02, paired t-test; datos en promedio \pm SEM) . Ambos grupos mantuvieron un bajo número de *pokes* inactivos: el grupo control el

día 1 tuvo $14,43 \pm 3,55$ y el día 9 realizaron $6,29 \pm 2,50$ *pokes*. Del mismo modo, los animales EAAT3glo/CMKII el día 1 presentaron una respuesta de $14,20 \pm 6,76$ y el día 9 realizaron $7,20 \pm 5,23$. Se observó que fue significativa la diferencia del número de *pokes* activos/inactivos (Fig. 7b) en el grupo control ($P=0,003$) y experimental ($P=0,019$) con una interacción de significativa en el día 1 y día 9 ($P<0,0001$). Los animales adquirieron el criterio de adquisición incrementaron significativamente la respuesta al *poke* activo entre el primer día y el último día de entrenamiento, finalmente hubo una diferencia significativa entre las respuestas del *poke* activo/inactivo. Respecto al *poke magazine* (del centro) (Fig. 7c y 7d) el grupo control el día 1 realizó $46,29 \pm 12,29$ y el día 9 $101,31 \pm 25,12$. El grupo EAAT3glo/CMKII efectuó el día 1 $27,00 \pm 15,66$ y el día 9 respondió $174,82 \pm 64,18$. En este caso, en el grupo control no fue significativa la comparación entre el día 1 y el día 9 con un $P=0,13$ y en el grupo experimental $P=0,09$. Tampoco se encontró diferencia al día 9 entre ambos grupos ($P=0,64$).

En la etapa de extinción (Fig. 7e y 7f), el grupo control en el día 1 en el *poke* activo obtuvo una respuesta de $68,86 \pm 17,85$ y el día 6 de $21,57 \pm 7,21$. En tanto, el grupo experimental en el *poke* activo presentó en el día 1 una media de $53,00 \pm 11,89$ y el día 6 una media de $35,80 \pm 6,98$. En el caso del *poke* inactivo, el grupo control en el día 1 tuvo $33,71 \pm 13,61$ y el día 6 $10,71 \pm 3,46$. Por parte del grupo EAAT3glo/CMKII se obtuvo en el día 1 una respuesta baja de $30,80 \pm 3,11$ y en el día 6 $21,80 \pm 5,51$. La comparación entre los *pokes* activos en el día 1 y el día 6 entre ambos grupos fue significativa ($P=0,007$). La interacción entre ambos grupos y los *pokes* activos/inactivos no fue significativa ($F=0,94$, $P=0,52$). A diferencia del número de *pokes* ($P=0,002$) y el genotipo ($P<0,0001$) (Fig. 7e).

Respecto al poke del centro durante la extinción (Fig. 7g y 7h) el grupo control realizó $29,14 \pm 9,76$ y el día 6 $13,14 \pm 2,81$. Por otro lado, el grupo experimental se desempeñó el día 1 $30,20 \pm 6,40$ y el día 6 $44,00 \pm 10,54$. Se observa una diferencia significativa en la extinción del centro entre el grupo control y experimental el día 6 ($P=0,008$).

VII.- PROYECCIONES

7.1 Discusiones y limitaciones del estudio

Como se ha mencionado, las pruebas realizadas tuvieron por objetivo estudiar conductas repetitivas o estereotipadas, que podrían ser aspectos psicopatológicos del TOC. No se abordó las compulsiones debido a que aún no existen modelos que den cuenta de ellas, ya que se entiende por compulsión el llevar a cabo una conducta estereotipada o habitual (Fineberg et al., 2009) no deseada y potencialmente dañina según un patrón rígido o como un medio para evitar consecuencias negativas (Eilam et al., 2012). Por otra parte, la estereotipia se refiere a la constancia en el comportamiento generado mediante la ritualización o la repetición homogéneo de los patrones motores. No obstante, existen conductas que son rituales motrices particulares, o bien una rigidez en la conducta, que están arraigados en la conducta de los animales para obtener mayor rapidez (Alonso et al., 2015). Un comportamiento repetitivo efectuado tanto por machos como hembras es la construcción de nidos que tiene una función protectora de los depredadores, ayuda en la reproducción y a conservar el calor corporal aislando el frío exterior (Deacon, 2006). Esta fue una de las pruebas efectuadas para comparar el comportamiento del EAAT3^{glo}/CMKII, sin embargo, no se encontraron diferencias significativas. Una posible explicación a este resultado se debe

a las diferencias de sexo entre los grupos: en el grupo control mayormente hubo hembras (8 hembras de 10 total) y en el grupo experimental machos (6 de 10 totales). Pese a que es una prueba realizada indistintamente por machos y hembras, se ha descrito que el factor hormonal en hembras que aumenta la conducta de anidamiento (Slotnick, B.M. & Nigrosh, 1975). Otra dificultad propia del protocolo de Deacon (2006), es que la escala posee una calificación subjetiva sobre la calidad del nido y en esto el margen de error posible es mayor. Por todo lo anterior mencionado, sería recomendable modificar el protocolo a futuro incluyendo una cantidad en exceso de material para nido, con el fin de indagar si existe una conducta exacerbada en ratones EAAT3gloCMKII, así como incluir cantidades similares de animales de ambos sexos para evaluar dicha variable.

En la prueba de masticación de plástico, nuestro protocolo fue modificado del original Chou-Green et al. (2003), ya que esta prueba se realizó durante la fase de restricción de alimentos previa al condicionamiento operante. Nuestros resultados indican que los ratones controles masticaron una cantidad similar que los animales EAAT3gloCMKII, no se evidenció una diferencia estadísticamente significativa. Este resultado es similar al obtenido por Chou-Green et al. (2003) en esta prueba en el ratón knockout 5-HT_{2C}. Dicho modelo, sin embargo, presentó diferencias estadísticamente significativas en el patrón de masticado de plástico, determinando cualitativamente una manera más ordenada de mordeduras, comparados a los animales controles. Este análisis cualitativo no fue realizado en nuestro estudio.

Respecto a los resultados en el condicionamiento operante, en la etapa de adquisición de la conducta no se observó una diferencia estadísticamente significativa con los animales controles. El entrenamiento operante consistió en pruebas de entrenamiento de una hora diaria recompensando la respuesta con un reforzador asociado a una señal previa (tono). El concepto de refuerzo hace alusión a procesos que mantienen o aumentan la ocurrencia de una conducta. Esto podría ser originado por la suma de un estímulo positivo. Se plantea que el refuerzo positivo se podría relacionar con la potenciación a largo plazo, ya que aumenta la eficacia sináptica de las neuronas de la vía directa (Kravitz and Kreitzer, 2012). El programa de reforzamiento continuo implica un estancamiento rápido y tiende a debilitarse con facilidad si se retiran los reforzamientos (Robbins and Everitt, 1996). El programa de razón fija (FR) consiste en otorgar una recompensa después de un número fijo o constante de respuestas.

Por otra parte, es importante recordar, que los aspectos asociados al establecimiento de comportamientos perseverantes en el TOC tomando como modelo el establecimiento de un hábito han sido poco estudiados en los modelos genéticos disponibles. Se ha medido de manera indirecta a través de fallas en el control dirigido a objetivos. Esta manera de evaluar la perseverancia del hábito tiene un sólido sustento tanto desde la perspectiva conductal como neural (Robbins et al., 2019).

En la prueba de extinción de la conducta operante se observó que los animales EAAT3^{glo}/CMKII presentaron un mayor número de *magazine pokes* (centro) que los grupos controles en el último día de la extinción. Sumado a que, el entrenamiento efectuado es el

tipo FR1 (una acción equivale a una recompensa) y se debió haber debilitado con facilidad (Robbins and Everitt, 1996). Asimismo, la extinción no revierte los efectos de la adquisición, es decir, no son opuestos, sino que es un nuevo aprendizaje (E-R) inhibitorio que se superpone a lo que aprendió con anterioridad (Domjan, 2010). Por lo tanto, estos resultados indicarían que los ratones EAAT3^{glo}/CMKII presentan una dificultad para efectuar el cambio en el aprendizaje a la nueva situación.

Esto daría cuenta de una falla en la actualización del valor de la recompensa (retroalimentación) que podría representar la primera parte de la formación de hábitos (etapa cognitiva). Debido a que la formación de hábitos es un proceso extenso y complejo. (Robbins et al., 2019). Los hábitos se adquieren a través de una historia de aprendizajes de refuerzos que fueron recompensados o no (condicionamiento instrumental). A su vez, contamos con un “sistema de dirigido a” que permite cambiar el rumbo de la acción cuando varían las contingencias (Gillan et al., 2016).

Por lo anteriormente expuesto, esta prueba es relevante para el TOC, ya que podría dar cuenta de una dificultad para extinguir la conducta adquirida, un aspecto que es propio de un acto compulsivo (Joel et al., 2005). Al respecto, existen críticos que plantean que es imposible modelar las compulsiones, debido a que son producidas por obsesiones y es insuficiente con una conducta repetitiva (Alonso et al., 2015). Sin embargo, otros autores proponen reconceptualizar el TOC para poder modelar las compulsiones, comprendiendo al TOC como consecuencia de la falta de control *top-down* desde zonas corticales superiores, responsables de funciones ejecutivas relevantes tales como la flexibilidad cognitiva y la

inhibición de la respuesta, junto a un circuito estriatal hiperactivo involucrado en la formación de hábito. (Chamberlain et al., 2005)(Gillan et al., 2011).

Entonces, se podría plantear que la conducta observada en los EAAT3glo/ CMKII sería una conducta poco flexible y una respuesta persistente. Congruentemente, el comportamiento de los ratones EAAT3glo/CMKII mostrado durante la extinción podría conceptualizarse como un comportamiento habitual, los animales persistieron en un comportamiento aunque no reciben recompensas (Rossi and Yin, 2012). El déficit presentado en la extinción también podría asociarse a una dificultad para llevar a cabo una respuesta asociativa inhibitoria E-R denominada “reacción aversiva de frustración incondicionada” producto de la reacción a la vivencia de frustración por no recibir una recompensa. Lo anterior se podría extrapolar, con que se ha observado en pacientes TOC fallas en la inhibición de la respuesta que podría contribuir a la dificultad de ejercer control sobre las respuestas habituales (Gillan et al., 2016).

Sumado a lo anterior, la prueba de condicionamiento instrumental, el refuerzo y la recompensa están mediadas por las neuronas del estriado, específicamente la vía directa (Kravitz and Kreitzer, 2012), fuertemente implicada en la fisiopatología del TOC. Es relevante mencionar que las neuronas del estriado no responden al movimiento sin objetivo sino que anticipan la recompensa, es decir, respaldan un movimiento dirigido a metas (Kravitz and Kreitzer, 2012). Además, se ha evidenciado que el estriado dorsal en las regiones asociativas desempeña una función clave en la formación de las asociaciones de

resultado de acción (A-O) (Hikosaka and Isoda, 2010). Sin embargo, en este caso, se evidenciaría en los ratones EAAT3^{glo}/CMKII un movimiento sin propósito o bien no realizan el cambio desde el predominio de un sistema sin modelo a otro por objetivos (no reciben recompensas durante la extinción y continúan la conducta). Esto podría estar asociado a que la conducta A-O se independizó de la recompensa y luego cuando se modificó el contexto no se adaptó la conducta a la ausencia de la contingencia.

Esto debido a que se ha evidenciado que un sobreentrenamiento produce un cambio en el control conductual desde uno dirigido a objetivos hacia uno guiado por hábitos (Smith and Graybiel, 2014). Se hace referencia a un sobreentrenamiento, cuando se mantiene la conducta más allá del periodo de adquisición (en 5 días promedio se puede adquirir una conducta operante (Devarakonda et al., 2016)) y los animales tienden a mantener una tasa de respuesta alta constantemente (Yin and Knowlton, 2006). Entonces con un sobreentrenamiento hay un cambio conductual. Además, se ha observado en estriado que se torna más selectivo respecto a sus representaciones motoras. Es decir, si una acción se repite una y otra vez en el tiempo (por ej: FR1 durante 9 días) mientras más se repite hay menor actividad en las neuronas asociadas al movimiento, hay un cambio en la tasa de disparo. Esto se puede relacionar con que el animal responde de una manera específica ante la expectativa de recibir una recompensa.

Según dos sistemas de control del conducta (estrategias de aprendizaje), existe uno basado en un modelo (A-O) y otro en ausencia de éste (hábito) (Smith and Graybiel, 2014). Desde esta perspectiva se asume que si un sistema asume el control del comportamiento el

otro no. Sin embargo, esta suposición es cuestionable, considerar que si una conducta de deteriora se va a reforzar absolutamente otra (Robbins et al., 2019). Entonces, sería más pertinente hablar de un balance o un desbalance entre ambos sistemas (en el caso del TOC). Si existe un predominio de asociaciones habituales (E-R), su incremento puede explicarse por un menor control del sistema de acciones dirigido a objetivos. Se ha evidenciado que los sustratos neurales son disociables. Por un lado, el sistema dirigido a objetivos está mediado por la corteza OFC y núcleo caudado (en roedores es estriado dorsal asociativo; DMS). Por otro lado, el núcleo putamen vinculado a las asociaciones E-R del hábito (en roedores estriado dorsal sensoriomotriz; DLS) (Gillan et al., 2016).

Respecto al estriado dorsal se subdivide en lateral (DLS) y medial (DMS). Este último es considerado fundamental para adquirir conductas instrumentales y llevar a cabo acciones dirigidas a un objetivo (A-O). Por otra parte, el DLS o estriado sensoriomotriz está abocado a respuestas de aprendizaje inflexible (E-R) (Smith and Graybiel, 2014). El estriado dorsal lateral (DLS) está implicado en la extinción de la conducta habitual (Smith and Graybiel, 2014)(Goodman and Packard, 2018). Por tanto, el DLS estaría implicado en la tarea de adquirir un nuevo aprendizaje inhibitorio, disminuyendo el rendimiento de la respuesta y participando en la extinción de la memoria mediado por mecanismos de plasticidad sináptica (LTP). Esto último, requiere la actividad de receptores de NMDA en sinapsis corticoestriatales (Goodman and Packard, 2018). Este aspecto es relevante, ya que el EAAT3glo/CMKII podría presentar problemas para realizar nuevas sinapsis y extinguir la memoria operante. Dada la evidencia reciente de nuestro laboratorio de alteraciones en la composición de subunidades de los receptores de NMDA en el estriado de los ratones

EAAT3glo/CMKII así como los déficits en plasticidad sináptica en la comunicación cortico-estriatal (Delgado-Acevedo et al., 2019), lo que podría ser la explicación de las alteraciones en la capacidad de extinguir (i.e adquirir y consolidar la inhibición de la memoria operante previamente aprendida), tal como se observó en los resultados donde los animales EAAT3glo/CMKII presentaron mayor tasa de respuestas en el *magazine poke* que el grupo control. Esta posibilidad requiere experimentos futuros que diseccionen específicamente las alteraciones moleculares descritas a nivel de estriado completo, y las alteraciones funcionales estudiando específicamente las sinapsis en el DLS.

Respecto a la restricción de alimento, inicialmente se utilizó el protocolo de restricción descrito por Minning, S. et al (2018), sin embargo, se observó que el protocolo no fue tolerado por un animal disminuyendo su peso abruptamente y falleció. Se consultó a dos investigadores expertos (A. Radke y L. Kravitz) y a través de una serie de modificaciones, se logró determinar el protocolo más adecuado para la restricción de alimento, considerando la variabilidad de edad, peso inicial y sexo que tenían nuestros animales, de modo de generar un protocolo individual para cada animal. Además, se corroboró la relevante función que cumple la restricción de alimentos en la motivación para aprender (Baker et al., 2012).

Una limitación de los modelos experimentales actuales, es que no consideran el dimorfismo sexual presente en la fisiopatología del TOC y mayoritariamente utilizan machos para los estudios (Joel, 2006a). Es relevante considerar dicho aspecto, debido a que se ha detectado la función reguladora que tienen las hormonas en el TOC (Joel, 2006a). En humanos, se observan diferencias sexuales en el curso de la enfermedad y respuesta al

tratamiento (Brandes et al., 2004) entre Hombres (inicia antes de los 10 años) y Mujeres (después de los 10 años) (Mattina et al., 2016). Si bien en este estudio se consideró el aspecto mencionado, no se distribuyó de manera homogénea los grupos por ejemplo en el condicionamiento operante: de los animales que aprendieron del grupo control 5 hembras y 2 machos. Por el otro lado, los animales experimentales que adquirieron la conducta fueron 5 machos. Entonces, no fue posible evaluar las diferencias entre ambos sexos.

Finalmente, a futuro sería favorable continuar con experimentos ligados al aprendizaje de conductas instrumentales y clásicas en animales EAAT3glo/CMKII. Primero, posiblemente podría implementarse nuevamente el paradigma operante y su extinción, fortaleciendo estadísticamente los resultados obtenidos. Luego, llevar a cabo el modelo de atenuación de señal de Joel 2006 que se basa en el supuesto que los comportamientos tipo compulsivos se producen debido a una disminución en la retroalimentación del rendimiento de respuestas en conductas dirigidas a objetivos en pruebas de condicionamiento clásico (Joel, 2006b).

7.2 Conclusiones

Los animales EAAT3glo/CMKII no presentaron diferencias en las pruebas de anidamiento y masticación de material plástico respecto a los controles.

Los animales EAAT3glo/CMKII fueron capaces de aprender una conducta operante, y presentaron diferencias significativas, respecto a los controles, en la extinción de dicha conducta. Esta alteración podría señalarse como un comportamiento tipo compulsivo, que puede depender de la alteración en la composición de subunidades de receptores de NMDA expresados en el estriado dorsal de los animales EAAT3glo/CMKII.

VIII.- REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alonso P, López-Solà C, Real E, Segalàs C, Menchón JM (2015) Animal models of obsessive–compulsive disorder: Utility and limitations. *Neuropsychiatr Dis Treat* 11:1939–1955.
- American Psychiatric Association (2013) *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders*, American P. Arlington, VA.: American Psychiatric Association. Available at: <https://psychiatryonline.org/doi/book/10.1176/appi.books.9780890425596> [Accessed December 16, 2018].
- Arnold PD, Sicard T, Burroughs E, Richter MA, Kennedy JL, Arnold, P. D., Sicard, T., Burroughs, E., Richter, M. A., & Kennedy JL (2006) Glutamate transporter gene SLC1A1 associated with obsessive-compulsive disorder. *Arch Gen Psychiatry* 63(7):769–776 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16818866> [Accessed December 10, 2018].
- Baker TW, Weisman RG, Beninger RJ (2012) Reinforcer devaluation by extinction depends on the food restriction protocol. *Behav Processes* 90:124–129 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22469648> [Accessed March 26, 2020].
- Balleine BW, O’Doherty JP (2010) Human and rodent homologies in action control: Corticostriatal determinants of goal-directed and habitual action. *Neuropsychopharmacology* 35:48–69.
- Baxter LR, Phelps ME, Mazziotta JC, Guze BH, Schwartz JM, Selin CE (1987) Local Cerebral Glucose Metabolic Rates in Obsessive-Compulsive Disorder: A Comparison

With Rates in Unipolar Depression and in Normal Controls. *Arch Gen Psychiatry* 44:211–218.

Bjørn-Yoshimoto WE, Underhill SM (2016) The importance of the excitatory amino acid transporter 3 (EAAT3). *Neurochem Int* 98:4–18 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27233497> [Accessed December 19, 2018].

Brandes M, Soares CN, Cohen LS (2004) Postpartum onset obsessive-compulsive disorder: Diagnosis and management. *Arch Womens Ment Health* 7:99–110 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15083345> [Accessed March 22, 2020].

Burguière E et al., Monteiro P, Mallet L, Feng G, Graybiel AM (2015) Striatal circuits, habits, and implications for obsessive–compulsive disorder. *Curr Opin Neurobiol* 30:59–65 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25241072> [Accessed October 22, 2018].

Chakrabarty K, Bhattacharyya S, Christopher R, Khanna S (2005) Glutamatergic dysfunction in OCD. *Neuropsychopharmacology* 30:1735–1740 Available at: <http://www.nature.com/articles/1300733> [Accessed December 19, 2018].

Chamberlain SR, Blackwell AD, Fineberg NA, Robbins TW, Sahakian BJ (2005) The neuropsychology of obsessive compulsive disorder: The importance of failures in cognitive and behavioural inhibition as candidate endophenotypic markers. *Neurosci Biobehav Rev* 29:399–419.

Chou-Green JM, Holscher TD, Dallman MF, Akana SF (2003) Compulsive behavior in the 5-HT_{2C} receptor knockout mouse. *Physiol Behav* 78:641–649 Available at: <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.171> [Accessed March 31, 2019].

Conicyt CABF– (2009) "Aspectos Bioéticos de la Experimentación Animal" 4to Taller de Bioética.

Deacon RMJ (2006) Assessing nest building in mice. *Nat Protoc* 1:1117 Available at: <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.170>.

Delgado-Acevedo C, Estay SF, Radke AK, Sengupta A, Escobar AP, Henríquez-Belmar F, Reyes CA, Haro-Acuña V, Utreras E, Sotomayor-Zárate R, Cho A, Wendland JR, Kulkarni AB, Holmes A, Murphy DL, Chávez AE, Moya PR (2019) Behavioral and synaptic alterations relevant to obsessive-compulsive disorder in mice with increased EAAT3 expression. Nature Publishing Group. Available at: <http://www.nature.com/articles/s41386-018-0302-7> [Accessed January 22, 2019].

Devarakonda K, Nguyen KP, Kravitz A V. (2016) ROBucket: A low cost operant chamber based on the Arduino microcontroller. *Behav Res Methods* 48:503–509 Available at: <http://link.springer.com/10.3758/s13428-015-0603-2> [Accessed December 19, 2018].

Dickel DE, Veenstra-VanderWeele J, Cox NJ, Wu X, Fischer DJ, Van Etten-Lee M, Himle JA, Leventhal BL, Cook EH, Hanna GL (2006) Association testing of the positional and functional candidate gene SLC1A1/EAAC1 in early-onset obsessive-compulsive disorder. *Arch Gen Psychiatry* 63:778–785.

Domjan M (2010) *Principios de Aprendizaje y Conducta* (Cengage Learning Editores SA de CV, ed)., 6th ed. México.

Eilam D, Zor R, Fineberg N, Hermesh H (2012) Animal behavior as a conceptual framework for the study of obsessive-compulsive disorder (OCD). *Behav Brain Res* 231:289–296 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21763354> [Accessed

March 29, 2020].

Eric R. Kandel, James H. Schwartz TMJ (2000) *Principles of Neural Science*, Fifth Edition (Mcgraw Hill Medical, ed).

Escobar AP, Wendland JR, Chávez AE, Moya PR (2019) The neuronal glutamate transporter EAAT3 in obsessive-compulsive disorder. *Front Pharmacol* 10:1362.

Fineberg NA, Potenza MN, Chamberlain SR, Berlin HA, Menzies L, Bechara A, Sahakian BJ, Robbins TW, Bullmore ET, Hollander E (2009) Probing Compulsive and Impulsive Behaviors, from Animal Models to Endophenotypes: A Narrative Review. *Neuropsychopharmacology* 35:591 Available at: <http://www.nature.com/articles/npp2009185> [Accessed April 21, 2019].

First MB (2013) *DSM-5® Handbook of Differential Diagnosis*. American Psychiatric Publishing. Available at: <http://psychiatryonline.org/doi/book/10.1176/appi.books.9781585629992> [Accessed December 16, 2018].

Gillan CM, Pappmeyer M, Morein-Zamir S, Sahakian BJJ, Fineberg NANA, Robbins TWTW, De Wit S, Wit S de (2011) Disruption in the balance between goal-directed behavior and habit learning in obsessive-compulsive disorder. 168 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21572165> [Accessed February 18, 2020].

Gillan CM, Robbins TW, Sahakian BJ, van den Heuvel OA, van Wingen G (2016) The role of habit in compulsivity. *Eur Neuropsychopharmacol* 26:828–840 Available at: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0924977X15004162> [Accessed April 29, 2020].

- Goltseker, K., Yankelevitch-Yahav, R., Albelda, N. S., & Joel D, Joel D (2015) Signal Attenuation as a Rat Model of Obsessive Compulsive Disorder. *J Vis Exp JoVE* 95.
- Gomez-Marin A, Ghazanfar AA (2019) The Life of Behavior. *Neuron* 104:25–36.
- Goodman J, Packard MG (2018) The role of the dorsal striatum in extinction: A memory systems perspective. *Neurobiol Learn Mem* 150:48–55 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29501803> [Accessed March 31, 2020].
- He Y, Janssen WGM, Rothstein JD, Morrison JH (2000) Differential synaptic localization of the glutamate transporter EAAC1 and glutamate receptor subunit gluR2 in the rat hippocampus. *J Comp Neurol* 418:255–269 Available at: <http://doi.wiley.com/10.1002/%28SICI%291096-9861%2820000313%29418%3A3%3C255%3A%3AAID-CNE2%3E3.0.CO%3B2-6> [Accessed December 19, 2018].
- Hikosaka O, Isoda M (2010) Switching from automatic to controlled behavior: cortico-basal ganglia mechanisms. *Trends Cogn Sci* 14:154–161 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20181509> [Accessed March 16, 2020].
- Hull C (1943) Principles of behavior. Available at: <https://pdfs.semanticscholar.org/37f2/16ef09af4b813bb6041e0e9ff77c12c0b32a.pdf> [Accessed April 27, 2020].
- Joel D (2006a) Current animal models of obsessive compulsive disorder: a critical review. *Prog Neuro-Psychopharmacology Biol Psychiatry* 30(3):374–388.
- Joel D (2006b) The signal attenuation rat model of obsessive-compulsive disorder: A review. *Psychopharmacology (Berl)* 186:487–503.

- Joel D, Doljansky J, Schiller D (2005) ‘Compulsive’ lever pressing in rats is enhanced following lesions to the orbital cortex, but not to the basolateral nucleus of the amygdala or to the dorsal medial prefrontal cortex. *Eur J Neurosci* 21:2252–2262 Available at: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1460-9568.2005.04042.x> [Accessed January 13, 2019].
- Kataoka Y, Kalanithi PSA, Grantz H, Schwartz ML, Saper C, Leckman JF, Vaccarino FM (2010) Decreased number of parvalbumin and cholinergic interneurons in the striatum of individuals with Tourette syndrome. *J Comp Neurol* 518:277–291 Available at: <http://doi.wiley.com/10.1002/cne.22206> [Accessed March 29, 2020].
- Kirk RGW (2018) Recovering The Principles of Humane Experimental Technique: The 3Rs and the Human Essence of Animal Research. *Sci Technol Hum Values* 43:622–648.
- Kravitz A V., Kreitzer AC (2012) Striatal mechanisms underlying movement, reinforcement, and punishment. *Physiology* 27:167–177 Available at: <http://www.physiology.org/doi/10.1152/physiol.00004.2012> [Accessed December 16, 2018].
- Li X, Morrow D, Witkin JM (2006) Decreases in nestlet shredding of mice by serotonin uptake inhibitors: Comparison with marble burying. *Life Sci* 78:1933–1939 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16182315> [Accessed January 24, 2020].
- Maio TP, Filgueiras GB, Cunha DC, Estanislau C (2014) Animal Models of Obsessive-Compulsive Disorder: Strain Differences. *Anim Model Obs Disord Strain Differ World J Neurosci* 4:240–246 Available at: <http://www.scirp.org/journal/wjnshttp://dx.doi.org/10.4236/wjns.2014.43027http://dx>.

doi.org/10.4236/wjns.2014.43027<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>

[Accessed March 21, 2020].

Martin W (2008) *Psicología Experimental: Cómo Hacer Experimentos en Psicología*

(Learning C, ed)., 7a ed. México. Available at: www.medilibros.com.

Mattina, G. F., & Steiner M (2016) The need for inclusion of sex and age of onset variables

in genetic association studies of obsessive-compulsive disorder: Overview. *Prog*

Neuro-Psychopharmacology Biol Psychiatry 67:107–116.

Menzies L, Chamberlain SR, Laird AR, Thelen SM, Sahakian BJ, Bullmore ET (2008)

Integrating evidence from neuroimaging and neuropsychological studies of obsessive-

compulsive disorder: The orbitofronto-striatal model revisited. *Neurosci Biobehav*

Rev 32:525–549 Available at:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0149763407001145> [Accessed

November 11, 2018].

Milad, M. R., & Rauch SL (2012) Obsessive-compulsive disorder: beyond segregated

cortico-striatal pathways. *Trends Cogn Sci* 16(1):43–51.

Monteiro P, Feng G (2016) Learning from animal models of obsessive-compulsive

disorder. *Biol Psychiatry* 79:7–16 Available at:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26037910> [Accessed February 18, 2020].

National Institute of Mental Health (2010) Obsessive-Compulsive Disorder: When

Unwanted Thoughts Take Over. Available at:

[https://www.nimh.nih.gov/health/publications/obsessive-compulsive-disorder-when-](https://www.nimh.nih.gov/health/publications/obsessive-compulsive-disorder-when-unwanted-thoughts-take-over/index.shtml)

[unwanted-thoughts-take-over/index.shtml](https://www.nimh.nih.gov/health/publications/obsessive-compulsive-disorder-when-unwanted-thoughts-take-over/index.shtml) [Accessed April 21, 2019].

- National Institute of Mental Health (NIMH) (2016) Obsessive-compulsive Disorder: When Unwanted Thoughts or Irresistible Actions Take Over. NIH Publ No TR 16-4676 Available at: <https://www.nimh.nih.gov/health/publications/obsessive-compulsive-disorder-when-unwanted-thoughts-take-over/index.shtml> [Accessed April 1, 2019].
- Nestadt G, Lan T, Samuels J, Riddle M, Bienvenu OJ, Liang KY, Hoehn-Saric R, Cullen B, Grados M, Beaty TH, Shugart YY (2000) Complex segregation analysis provides compelling evidence for a major gene underlying obsessive-compulsive disorder and for heterogeneity by sex. *Am J Hum Genet* 67:1611–1616.
- Ostrosky-Solis F (2000) Características neuropsicológicas de la enfermedad de Parkinson. *Rev Neurol* 30:788–796 Available at: <http://www.revneurol.com/3008/i080788.pdf> [Accessed December 20, 2018].
- Papini MR (2003) Comparative Psychology of Surprising Nonreward. *Brain Behav Evol* 62:83–95 Available at: <https://www.karger.com/Article/FullText/72439> [Accessed April 27, 2020].
- Pinillos JL (1960) MOTIVACIÓN Y APRENDIZAJE. *Rev Española Pedagog* 18:16–48 Available at: <https://www.jstor.org/stable/23762188> [Accessed April 27, 2020].
- Pisacreta R (1982) SOME FACTORS THAT INFLUENCE THE ACQUISITION OF COMPLEX, STEREOTYPED, RESPONSE SEQUENCES IN PIGEONS. *J Exp Anal Behav* 37:359–369 Available at: <http://doi.wiley.com/10.1901/jeab.1982.37-359> [Accessed April 27, 2020].
- Pitman RK (1989) Animal models of compulsive behavior. *Biol Psychiatry* 26:189–198 Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/000632238990022X>

[Accessed December 16, 2018].

Pittenger C (2015) Glutamatergic agents for OCD and related disorders. *Curr Treat Options*

Psychiatry 2:271–283 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26301176>

[Accessed April 21, 2019].

Pittenger C, Bloch MH, Williams K (2011) Glutamate abnormalities in obsessive

compulsive disorder: Neurobiology, pathophysiology, and treatment. *Pharmacol Ther*

132:314–332 Available at:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0163725811001847> [Accessed

December 19, 2018].

Pittenger C, Krystal JH, Coric V, Pittenger, C., Krystal, J. H., & Coric V (2006) Glutamate-

modulating drugs as novel pharmacotherapeutic agents in the treatment of obsessive-

compulsive disorder. *NeuroRx* 3(1):69–81 Available at:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1545534305000076> [Accessed

December 19, 2018].

Rescorla RA (2001) Are associative changes in acquisition and extinction negatively

accelerated? *J Exp Psychol Anim Behav Process* 27:307–315 Available at:

<https://psycnet.apa.org/record/2001-11515-001> [Accessed April 27, 2020].

Robbins TW, Everitt BJ (1996) Neurobehavioural mechanisms of reward and motivation.

Curr Opin Neurobiol 6:228–236 Available at:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8725965> [Accessed November 23, 2018].

Robbins TW, Vaghi MM, Banca P (2019) Obsessive-Compulsive Disorder: Puzzles and

Prospects. *Neuron* 102:27–47.

- Rossi MA, Yin HH (2012) Methods for studying habitual behavior in mice. *Curr Protoc Neurosci* 1:Unit 8.29 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22752897> [Accessed April 21, 2019].
- Rothstein JD, Martin L, Levey AI, Dykes-Hoberg M, Jin L, Wu D, Nash N, Kuncel RW (1994) Localization of neuronal and glial glutamate transporters. *Neuron* 13:713–725 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7917301> [Accessed December 19, 2018].
- Ruscio AM, Stein DJ, Chiu WT, Kessler RC (2010) The epidemiology of obsessive-compulsive disorder in the National Comorbidity Survey Replication. *Mol Psychiatry* 15:53–63 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18725912> [Accessed April 21, 2019].
- Saxena S, Brody AL, Maidment KM, Dunkin JJ, Colgan M, Alborzian S, Phelps ME, Baxter LR (1999) Localized orbitofrontal and subcortical metabolic changes and predictors of response to paroxetine treatment in obsessive-compulsive disorder. *Neuropsychopharmacology* 21:683–693.
- Saxena S, Brody AL, Schwartz JM, Baxter LR (1998) Neuroimaging and frontal-subcortical circuitry in obsessive-compulsive disorder. *Br J Psychiatry* 173:26–37 Available at: https://www.cambridge.org/core/product/identifier/S0007125000297870/type/journal_article [Accessed December 19, 2018].
- Schafe GE, Nader K, Blair HT, LeDoux JE (2001) Memory consolidation of Pavlovian fear conditioning: A cellular and molecular perspective. *Trends Neurosci* 24:540–546 Available at: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S016622360001969X>

[Accessed December 16, 2018].

Shmelkov S V., Hormigo A, Jing D, Proenca CC, Bath KG, Milde T, Shmelkov E, Kushner JS, Baljevic M, Dincheva I, Murphy AJ, Valenzuela DM, Gale NW, Yancopoulos GD, Ninan I, Lee FS, Rafii S (2010) *Slitrk5* deficiency impairs corticostriatal circuitry and leads to obsessive-compulsive-like behaviors in mice. *Nat Med* 16:598–602.

Slotnick, B.M. & Nigrosh BJ (1975) Maternal behavior of mice with cingulate cortical, amygdala, or septal lesions. *Comp Physiol Psychol* 88:118–127.

Smith KSKS, Graybiel AMAM (2014) Investigating habits: Strategies, technologies and models.

Spence K (1956) Behavior theory and conditioning. Available at:

<https://psycnet.apa.org/psycinfo/2004-16334-000/> [Accessed April 27, 2020].

Szechtman H, Sulis W, Eilam D (1998) Quinpirole induces compulsive checking behavior in rats: A potential animal model of obsessive-compulsive disorder (OCD). *Behav Neurosci* 112:1475–1485 Available at:

<http://doi.apa.org/getdoi.cfm?doi=10.1037/0735-7044.112.6.1475> [Accessed January 24, 2020].

Taylor S (2011) Early versus late onset obsessive-compulsive disorder: Evidence for distinct subtypes. *Clin Psychol Rev* 31:1083–1100.

Ting JT, Feng G (2011) Neurobiology of obsessive-compulsive disorder: Insights into neural circuitry dysfunction through mouse genetics. *Curr Opin Neurobiol* 21:842–848.

Tolman E (1932) Purposive behavior in animals and men. Available at:

[https://books.google.cl/books?hl=es&lr=&id=U_Y63YLP8V0C&oi=fnd&pg=PR7&dq=Tolman,+E.+C.+Purposive+Behavior+in+Animals+and+Man+\(Macmillan,+New+York,+1932\).&ots=xjUGy8mEIX&sig=7ZqOv6UEUU5HPiKRltbSg5Cfvss](https://books.google.cl/books?hl=es&lr=&id=U_Y63YLP8V0C&oi=fnd&pg=PR7&dq=Tolman,+E.+C.+Purposive+Behavior+in+Animals+and+Man+(Macmillan,+New+York,+1932).&ots=xjUGy8mEIX&sig=7ZqOv6UEUU5HPiKRltbSg5Cfvss)
[Accessed April 27, 2020].

Toro-Martínez E (2005) Manejo Farmacológico del Trastorno Obsesivo Compulsivo resistente al tratamiento. Argentina. Available at: www.editorialpolemos.com.ar
[Accessed December 20, 2018].

Van Grootheest DS, Cath DC, Beekman AT, Boomsma DI (2005) Twin studies on obsessive-compulsive disorder: A review. *Twin Res Hum Genet* 8:450–458.

Welch JM, Lu J, Rodriguiz RM, Trotta NC, Peca J, Ding JD, Feliciano C, Chen M, Adams JP, Luo J, Dudek SM, Weinberg RJ, Calakos N, Wetsel WC, Feng G (2007) Cortico-striatal synaptic defects and OCD-like behaviours in Sapap3-mutant mice. *Nature* 448:894–900 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17713528> [Accessed March 21, 2020].

Wilhelm S, Buhlmann U, Tolin DF, Meunier SA, Pearlson GD, Reese HE, Cannistraro P, Jenike MA, Rauch SL (2008) Augmentation of behavior therapy with D-cycloserine for obsessive-compulsive disorder. *Am J Psychiatry* 165:335–341 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18245177> [Accessed March 22, 2020].

Willner P (1986) Validation criteria for animal models of human mental disorders: Learned helplessness as a paradigm case. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 10:677–690.

Witkin JM (2008) Animal models of obsessive-compulsive disorder. John Wiley and Sons

Inc. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18972380> [Accessed February 18, 2020].

Wood W, Neal DT (2007) A New Look at Habits and the Habit-Goal Interface. *Psychol Rev* 114:843–863.

Wu KK, Hanna GL, Rosenberg DR, Arnold PD (2012) The role of glutamate signaling in the pathogenesis and treatment of obsessive-compulsive disorder. *Pharmacol Biochem Behav* 100:726–735 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22024159> [Accessed October 23, 2018].

Yadin E, Friedman E, Bridger WH (1991) Spontaneous alternation behavior: an animal model for obsessive-compulsive disorder? *Pharmacol Biochem Behav* 40:311–315 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1839567> [Accessed March 22, 2020].

Yin HH, Knowlton BJ (2006) The role of the basal ganglia in habit formation. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16715055> [Accessed February 18, 2020].

IX.- AGRADECIMIENTOS

Gracias a mi marido por apoyo incondicional en mi proyecto, sin él, no hubiera sido posible.

A mi Tutor Dr Pablo Moya por orientarme, enseñarme, tolerar pacientemente mis equivocaciones que fueron fruto de aprendizajes y valorar mi desempeño durante este proceso. A mi cotutor Dr Patricio Casanova que contribuyó a materializar el proyecto de tesis a través de sus aportes en el apoyo de la construcción de las cajas de condicionamientos y su supervisión constante pese a estar lejos. A mis compañeros de laboratorio que fueron un soporte para este proceso y me enseñaron día a día.

Por su puesto a mi familia que me han acompañado y alentado durante cada parte del camino, ya que para hacer ciencia hay que desarrollar la tolerancia a la frustración (para eso es importante alguien que te contenga) y perseverancia pese a todas las dificultades que se presentaron en el camino (que no fueron menores).

En particular, este camino estuvo lleno de aprendizaje y siempre tuve la posibilidad de contar con la ayuda de personas generosas con más experiencia. Una de ellas fue el Dr. Alexxai Kravitz, me brindó toda la ayuda necesaria respecto a la mantención de las cajas de condicionamiento operante y la restricción de alimentos de manera desinteresada. Finalmente, mis amigos del magíster siempre estuvieron presentes e hicieron más divertido todo este largo proceso.

X.- FIGURAS Y TABLAS

10.1 Esquema Ganglios Basales

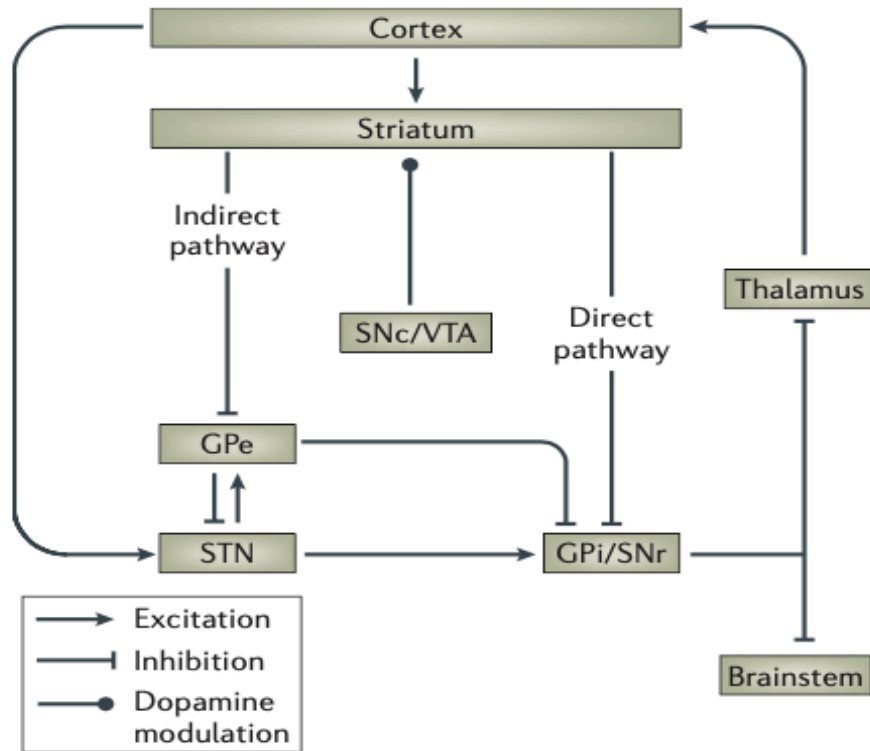


Fig. 1. Circuito esquemático de los Ganglios Basales (Yin and Knowlton, 2006).

10.2 Componentes de ROBucket

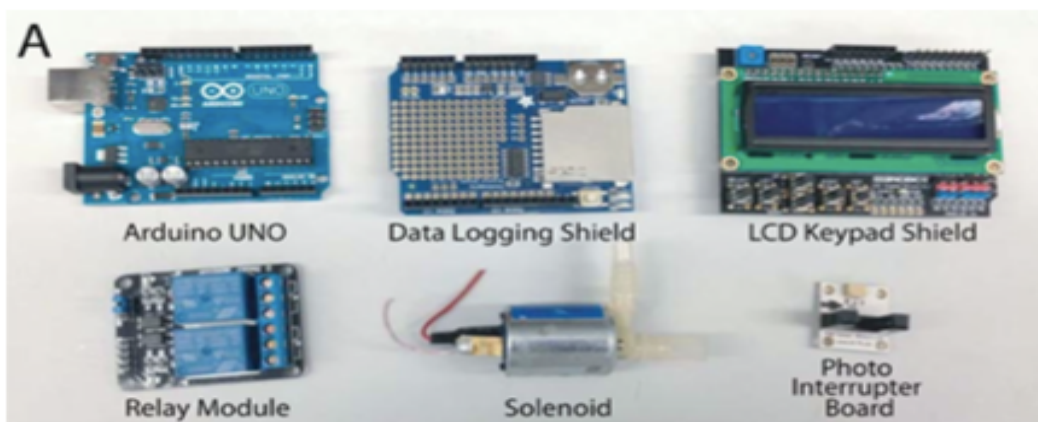
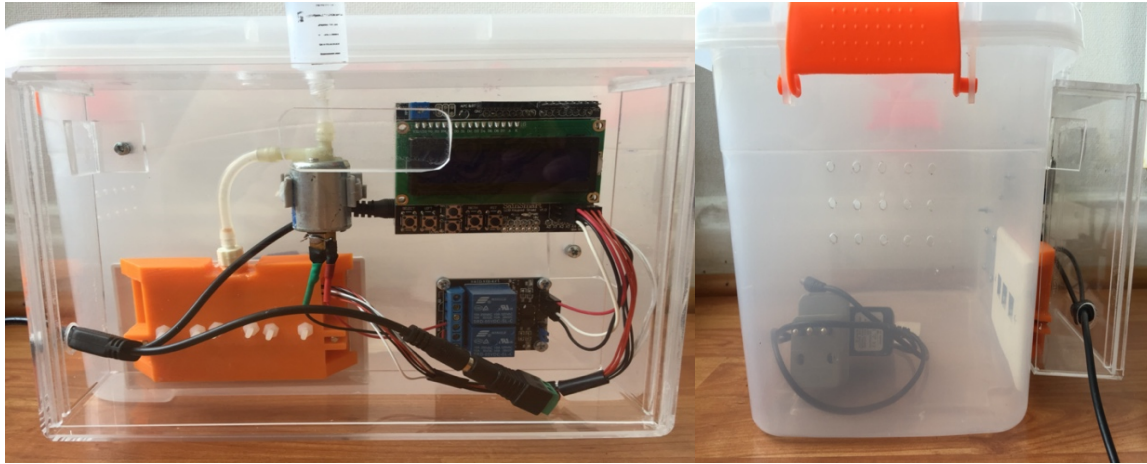


Fig. 2. Componentes del sistema ROBucket (Devarakonda et al., 2016)

10.3 Imágenes de ROBucket 2.0



A

B

Fig. 3. En A se observa la vista frontal de la caja ROBucket 2.0, en la parte superior izquierda está la pantalla LCD montada sobre la placa de Arduino Uno. La pantalla por un lado, por medio de los pines, conecta con el relay (parte inferior) y este a su vez a la corriente para la valvula solenoide (elemento del centro de metal). Por otro lado, recibe las conexiones desde los sensores de los agujeros *nose poke*.

10.4 Esquema del diseño experimental

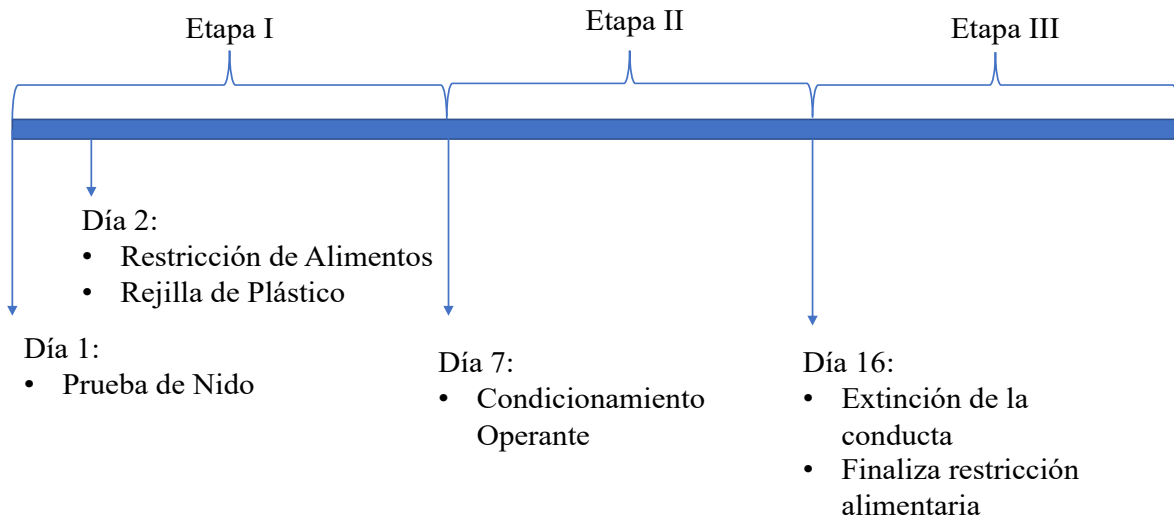


Fig. 4. Diseño experimental: La primera prueba realizada fue la de anidamiento debido a que es necesario que los animales no hayan sido manipulados. Luego, se inició la restricción de alimentos de manera individual y en cada caja hogar se deposito una rejilla de plástico. Una vez que los animales alcanzaron el peso óptimo, se iniciaron las pruebas de condicionamiento operante y por último, la extinción de dicha conducta.

10.5 Descripción de conductas

Tabla 1
Operacionalización de las variables

Variable	Operacionalización	Pruebas	Medidas
Comportamiento Tipo Compulsivo	Se mide comparando las medias entre el grupo experimental y el control en las pruebas de comportamientos. Se espera que la media del comportamiento compulsivo sea mayor que la del control.	Condicionamiento Operante	Promedio de <i>pokes</i> activos de 9 días.
		Extinción	Promedio de <i>pokes</i> activos de 6 días.
		Anidamiento	Algodón utilizado para construir el nido en 24 horas.
		Masticar Plástico	Gramos masticados durante 10 días

Se define brevemente lo que se comprende como comportamiento compulsivo en este escrito junto a una escueta descripción cada una de las pruebas y la medida que se utilizó para su medición.

10.6 Puntajes de Anidamiento

Tabla 2

Escala de Puntuación de la conducta de anidamiento

Puntaje	Descripción
1	Más del 90% sin ser tocado.
2	Está intacto entre el 50-90%, solamente rasgó parcialmente la tela.
3	Está rasgado entre el 50-90%, está esparcido por el suelo de la caja, no se acumula en un sitio específico.
4	Más del 90% está rasgado, se identifica un nido, pero es plano.
5	Más del 90% está rasgado, el nido es profundo con paredes más elevadas a la altura del cuerpo.

La puntuación corresponde a un criterio de observación cualitativo. El investigador debe calificar según su criterio las características del nido a calificar.

Nota. Recuperado de Deacon (2006).

10.7 Resultados de Anidamiento

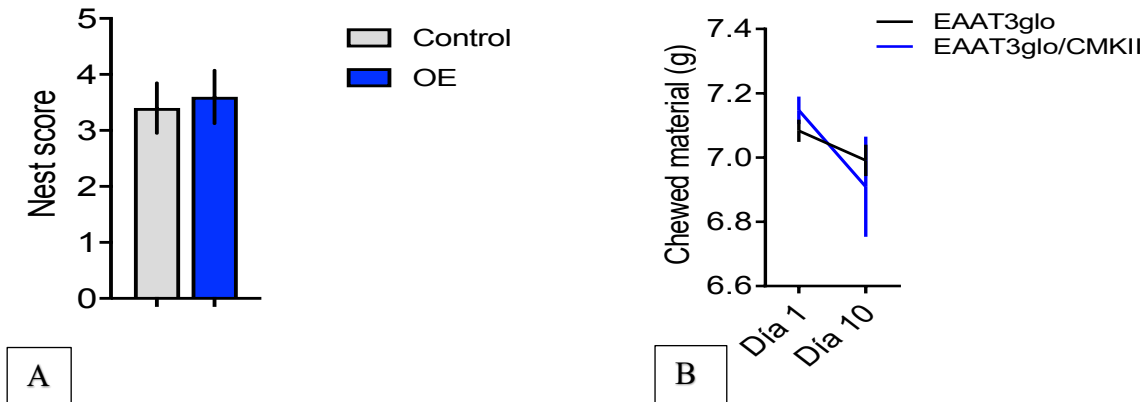


Figura 5. En A se comparan las medianas del puntaje de anidamiento obtenido entre grupo control con el grupo experimental. En B la variación a través del tiempo que tuvieron las rejillas de plástico en ambos grupos, la variación no fue significativa, no hubo interacción.

10.8 Resultados de Masticado Plástico

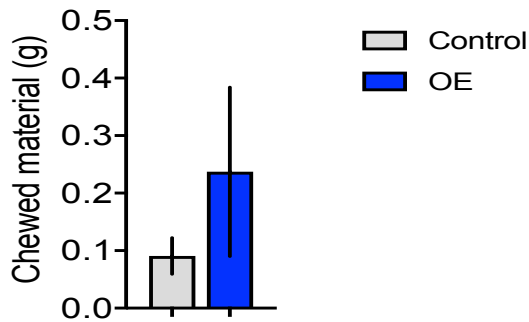


Figura 6. Se comparan las medianas del delta de peso con relación al peso inicial (aprox. 7g) entre el grupo control y el grupo experimental.

10.9 Resultados Condicionamiento Operante y extinción

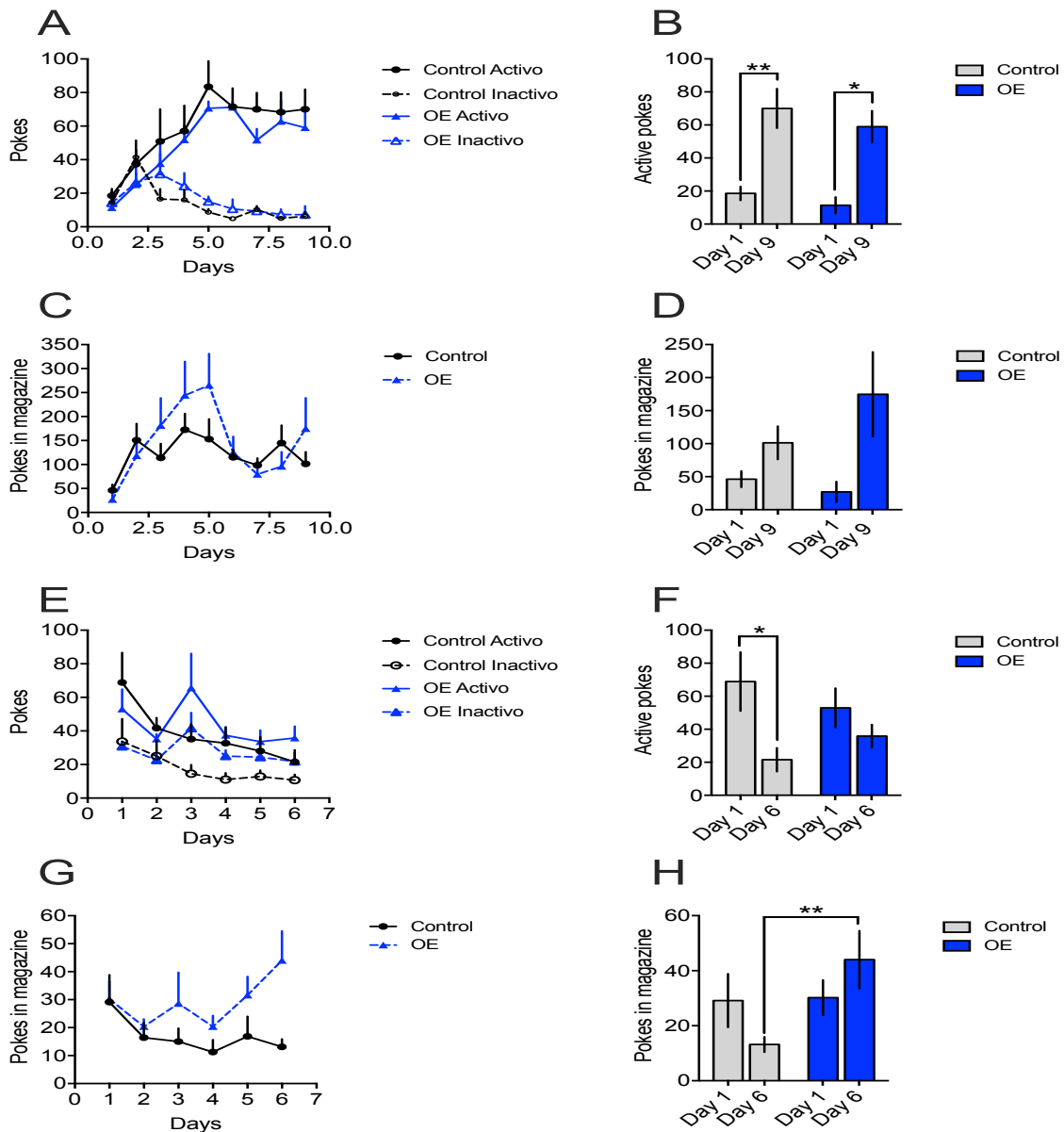


Figura 7. En A muestra la adquisición de la conducta de *nose poke* activo para aquellos ratones que cumplieron con los criterios. Va aumentando progresivamente el número de pokes activos con el transcurso de los días e inversamente va disminuyendo el número de pokes inactivos en ambos grupos. En B se comparan las medias del día 1 y el día 9 del *poke* activo entre ambos grupos. En C se describe el número de *pokes magazine* (centro: lugar donde recibe la recompensa) efectuados por ambos grupos. En D se comparan las medias del día 1 y el día 9 del *poke magazine* entre ambos grupos. En E se presenta la extinción de la conducta *nose poke* activo para aquellos ratones que cumplieron con los criterios. Va disminuyendo progresivamente el número de pokes activos con el transcurso de los días junto con la disminución del número de pokes inactivos en ambos grupos. En F se comparan las medias del día 1 y el día 6 del *poke* activo entre ambos grupos. En G se describe el número de *pokes magazine* efectuados por ambos grupos durante la extinción. En H se comparan las medias del día 1 y el día 6 del *poke magazine* entre ambos grupos.

10.10 Programación anual de los experimentos

Tabla 3
Planificación de las actividades

		Carta Gantt de actividades a realizar																																												
ACTIVIDADES		JUL					AGO					SEPT					OCT					NOV					DIC					ENERO					FEBRERO					MARZO				
Protocolo experimental	Preparación de laboratorio	[Barra azul clara]																																												
	Etapa I	Nido	[Barra roja]		[Barra roja]		[Barra roja]		[Barra roja]		[Barra roja]		[Barra roja]		[Barra roja]		[Barra roja]		[Barra roja]		[Barra roja]		[Barra roja]		[Barra roja]		[Barra roja]		[Barra roja]		[Barra roja]		[Barra roja]		[Barra roja]		[Barra roja]									
		Restricción	[Barra roja]																																											
		Chewing	[Barra verde]		[Barra verde]		[Barra verde]		[Barra verde]		[Barra verde]		[Barra verde]		[Barra verde]		[Barra verde]		[Barra verde]		[Barra verde]		[Barra verde]		[Barra verde]		[Barra verde]		[Barra verde]		[Barra verde]		[Barra verde]		[Barra verde]		[Barra verde]									
	Etapa II	FR1	[Barra morada]		[Barra morada]		[Barra morada]		[Barra morada]		[Barra morada]		[Barra morada]		[Barra morada]		[Barra morada]		[Barra morada]		[Barra morada]		[Barra morada]		[Barra morada]		[Barra morada]		[Barra morada]		[Barra morada]		[Barra morada]		[Barra morada]		[Barra morada]									
		Extinción	[Barra morada]		[Barra morada]		[Barra morada]		[Barra morada]		[Barra morada]		[Barra morada]		[Barra morada]		[Barra morada]		[Barra morada]		[Barra morada]		[Barra morada]		[Barra morada]		[Barra morada]		[Barra morada]		[Barra morada]		[Barra morada]		[Barra morada]		[Barra morada]									
	Extracción datos	[Barra naranja]																																												
	Analisis	[Barra roja]																																												
	Escrito	[Barra azul]																																												
	Presentación	[Barra cian]																																												

Se muestra de manera general las actividades que se llevaron a cabo para realizar este documento. En las cuales hubo un retraso de dos meses respecto a lo presupuestado inicialmente. Debido principalmente a la dificultad para contar con los animales necesarios para efectuar los experimentos. Sumado a problemas técnicos con las cajas condicionamiento operante, que implicó sacar a un grupo del estudio, ya que la medición no era válida.

XI.- PROTOCOLO Y PAUTAS PARA EXPERIMENTOS

11.1 Protocolo Condicionamiento Operante y extinción del comportamiento adquirido adaptado para ROBucket modificada (creación propia).

Etapas I:

Manejo animal y Restricción de alimentos

- Revisar la edad de los animales antes de iniciar el proceso de restricción de alimentos, menos de 8 semanas, es menos probable que ocurra el condicionamiento.
- Al alimentar a los animales es fundamental realizar *handling* para disminuir al máximo posible los niveles de estrés en pro de su bienestar y también puede hablar al animal porque se calma cuando reconocen la voz (observe la respiración).
- Pese todos los días a los animales, deben llegar hasta 85% de su peso para iniciar el condicionamiento, con una variación de 0,3 gr diario. Generalmente, si un animal disminuye de 1g a 2g es posible iniciar el entrenamiento (ver tabla de referencia de pesos).
- La variación **máxima** de peso diaria, para garantizar la salud del animal es de 1 gr.
- En la pauta de restricción anote el peso inicial y el peso correspondiente al 85% hasta que puede llegar como referencia.

- Semanalmente limpie la caja hogar de todos los animales y cambie el agua (revise diariamente que estén tomando agua).

Etapa II:

Condicionamiento Operante

Antes de empezar el entrenamiento

- Preparar sucrosa al 20% para llenar las jeringas con 10 ml cada entrenamiento.
- Deje a los animales en la sala de entrenamiento durante 30 minutos para habituarlos al lugar (inicie el temporizador del reloj).
- Posicionar en orden de N°1 al N°4 las cajas ROBucket.
- Asigne a cada caja hogar una caja de entrenamiento (poner una frente a otra para organizar visualmente el entrenamiento) y saber qué animal está en cada caja.
- Anote en la Pauta de Condicionamiento y extinción el número de caja ROBucket asignado a cada animal.
- Agregue 10 ml de sucrosa en la jeringa y cebe manualmente la válvula solenoide.
- Programe el Arduino con FR1.
- Examine cada uno de los sensores en cada uno de los *nose pokes* (con guantes).
- Reinicie el Arduino y volver a programar FR1.
- Se mantiene la restricción de alimentos durante todo el entrenamiento de condicionamiento operante.
- Pese al animal, verifique que esté dentro del 85% de su peso y que esté en condiciones optimas para iniciar el entrenamiento.

- Considere que Ud. es un estresor para el animal por esto es fundamental cerrar la cortina en la sala de conducta.

Durante el entrenamiento

- Deje al animal en la caja ROBucket asignada durante 50 minutos (inicie el temporizador del reloj).
- Realice *handling* cuando los traspase de una caja a la otra y hábleles (el sonido de la voz los calma).
- Observe el comportamiento del animal.
- Verifique que los *nose pokes* estén funcionando correctamente.
- Revise si hay suficiente sucrosa en la jeringa.
 - Al finalizar el entrenamiento
- Registre en la Pauta de Condicionamiento y extinción la cantidad de nose poke efectuados.
- Devuelva a los animales a su caja hogar.
- Limpie la caja de entrenamiento con etanol al 70%.
- Limpie la válvula solenoide con agua destilada, para esto, se debe agregar 10 ml de agua destilada en la jeringa y pulsar reiteradas veces el botón de cebado manual. Paralelamente secar el *nose poke* del centro.
- Alimente a los animales luego de 20 minutos, según lo que corresponda a su peso (revise la pauta).

Etapa III:

Extinción del comportamiento adquirido

Antes de empezar el entrenamiento

- Habituarse durante 30 minutos en la sala de entrenamiento.
- Revisar que tengan comida disponible en el suelo de la caja hogar durante el periodo de habituación.
- La válvula solenoide debe estar desconectada, sino es posible que se quemara al no pasar líquido por la jeringa.
- Organizar las cajas ROBucket en orden inverso al condicionamiento y las cajas hogar mantener en el mismo lugar.
- Deje a los animales en las cajas de entrenamiento.

Durante el entrenamiento

- Active el temporizador del reloj por 50 minutos.
- Realice *handling* cuando los traspare de una caja a la otra y el guante límpielo con etanol al 70% para condicionarlos al olor (con cada animal hacer esto, ya que identifica el olor y se tranquiliza).
- Observe el comportamiento del animal.
- Verifique que los *nose pokes* estén funcionando correctamente.

Al finalizar el entrenamiento

- Registre en la Pauta de Condicionamiento y extinción la cantidad de nose poke efectuados.
- Devuelva a los animales a su caja hogar.
- Limpie la caja de entrenamiento con etanol al 70%.

11.2 Protocolo de restricción de alimentos Anita Radke

- Los ratones con restricción comienzan a 3.5 g / día y se reducen a 0.3 g / día hasta que alcanzan el 85% del peso de alimentación libre.
- Se pesan los animales 5 días a la semana y se ajusta los alimentos según sea necesario. La comida puede reducirse en 0,3 g / día, pero no más, ya que es estresante para los animales.
- En el fin de semana, o en cualquier otro día en que no se pueda controlar los pesos, sugiero una cantidad constante sin reducciones. Si van a ganar gránulos en la cámara operante, compensa esto los fines de semana o días en que el comportamiento no se ejecuta.
- Mantenga el tiempo de alimentación constante (dentro de una hora). Se sugiere ejecutar el comportamiento a la misma hora cada día y alimentar inmediatamente después de la sesión. Considero que se desempeñan mejor si han sido restringidos 24 h.

11.3 Pauta de Condicionamiento y extinción

Día 1 Condicionamiento

Día 2

Fecha:

Fecha:

Nº de ID	Nº	Activo	Inactivo	Centro	Nº de ID	Nº	Activo	Inactivo	Centro

Día 3

Día 4

Fecha:

Fecha:

Nº de ID	Nº	Activo	Inactivo	Centro	Nº de ID	Nº	Activo	Inactivo	Centro

Día 5

Día 6

Fecha:

Fecha:

Nº de ID	Nº	Activo	Inactivo	Centro	Nº de ID	Nº	Activo	Inactivo	Centro

Día 7

Día 8

Fecha:

Fecha:

Nº de ID	Nº	Activo	Inactivo	Centro	Nº de ID	Nº	Activo	Inactivo	Centro

Día 9

Fecha:

Nº de ID	Nº	Activo	Inactivo	Centro

Día 1 Extinción

Día 2

Fecha:

Fecha:

Nº de ID	Nº	Activo	Inactivo	Centro	Nº de ID	Nº	Activo	Inactivo	Centro

Día 3

Día 4

Fecha:

Fecha:

Nº de ID	Nº	Activo	Inactivo	Centro	Nº de ID	Nº	Activo	Inactivo	Centro

Día 5

Día 6

Fecha:

Fecha:

Nº de ID	Nº	Activo	Inactivo	Centro	Nº de ID	Nº	Activo	Inactivo	Centro

11.4 Listado de Animales

Grupo	Nº Identificación	Genotipo	Sexo
GRUPO 1	2695	0	Hembra
	2698	0	Hembra
	2699	0	Hembra
	2771	1	Macho
	2773	0	Macho
	2779	0	Macho
GRUPO 2	2813	0	Macho
	2815	0	Macho
	2816	0	Hembra
	2809	0	Hembra
	2814	1	Macho
	2808	1	Hembra
GRUPO 3	2811	0	Hembra
	2812	0	Hembra
	2843	1	Macho
	2844	1	Macho
	2845	1	Macho
	2846	1	Hembra
GRUPO 4	2854	0	Hembra
	2856	0	Hembra
	2857	0	Hembra
	2880	1	Hembra
	2881	1	Hembra
	2882	0	Hembra
	2883	1	Macho
	2884	1	Macho
GRUPO 5	3012	0	Macho
	3014	0	Hembra
	3015	0	Hembra
	3017	0	Hembra
	3018	0	Hembra
	3019	0	Hembra
	3020	0	Macho
	3021	0	Hembra

11.5 Tabla de Referencias de pesos

Sujeto ID	G	S	Peso inicial	Gr día 1	Mínimo gr	Observaciones
2813	0	M	24	5	2,5-21g	
2815	0	M	23	4,3	2,5-20g	
2816	0	H	20	3,8	2,7-17g	
2809	0	H	18	3	2,3-16g	Tienden a mantener por dos o tres días el peso y luego bajan abruptamente. Ojo, cuando están en el mínimo.
2811	0	H	24	4,5	3,7-21g	
2812	0	H	23	3,5	3,3-20g	
2814	1	M	22	4	2,7-19g	
2808	1	H	20	3,5	2,5-18g	Cuando llegas al mínimo, mantener por dos días y observar.
2843	1	M	26	4	3-22g	
2844	1	M	23	3,7	2,7-20g	
2845	1	M	20	3,5	3,3-17g	
2846	1	H	19	3,5	2,5-17	
2854	0	H	24	4	3 -22g	Falleció, bajo rápido.
2856	0	H	25	4	3-22g	
2857	0	H	27	5	2,7-23g	
2880	1	H	21	3,7	3-18g	
2881	1	H	21	3	2,5-18 g	
2882	0	H	22	3,4	2,5-19 g	
2883	1	M	26	4,5	2,7-23g	
2884	1	M	25	4	3-22g	
3012	0	M	23	4	3,3-21g	
3014	0	H	15	3,5	2,7-15g	me dio susto restringir más
3015	0	H	19	3,5	2,7-18g	aprendió rápido
3017	0	H	17	3,3	2,7-15g	

3018	0	H	17	3,5	2,7-16g	no toleró restricción (16g) , al decimo día decayó y tuve que aumentar la comida, aún así aprendió al final.
3019	0	H	17	3,5	2,7-16g	
3020	0	M	23	4,3	3,3-22g	
3021	0	H	18	3,5	2,7-17g	

11.6 Pauta de Restricción de Alimentos (abreviada)

N° ID	Fecha 1	Peso	Gramos	Fecha 2	Peso	Gramos
Peso Inicial	Fecha 3	Peso	Gramos	Fecha 4	Peso	Gramos
85%	Fecha 5	Peso	Gramos	Fecha 6	Peso	Gramos
	Fecha 7	Peso	Gramos	Fecha 8	Peso	Gramos
	Fecha 9	Peso	Gramos	Fecha 10	Peso	Gramos
	Fecha 11	Peso	Gramos	Fecha 12	Peso	Gramos
	Fecha 13	Peso	Gramos	Fecha 14	Peso	Gramos
OBSERVACIONES:						